

**ЕКСПРЕСІЯ КИСЕНЬ-ЧУТЛИВИХ ГЕНІВ *DROSOPHILA*
MELANOGASTER НА РІЗНИХ СТАДІЯХ ОНТОГЕНЕЗУ В УМОВАХ
ЗНИЖЕНОГО ПАРЦІАЛЬНОГО ТИСКУ КИСНЮ**

В. Березовський, О. Чака*, Р. Янко, М. Левашов, І. Літовка

*Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України
вул. Богомольця, 4, Київ 01024, Україна
e-mail: lenchaka@ukr.net*

Протягом 10 послідовних поколінь проводили селекційний відбір високостійких і низькостійких до гіпоксії *D. melanogaster* лінії *Oregon-R* дикого типу. Мухи дослідних груп постійно перебували в умовах нормобаричної гіпоксії (8% O₂). Виявлено вірогідне збільшення експресії генів *Sir 2* та *CG1470* у личинок десятого покоління дослідних особин обох груп. У личинок високостійких *D. melanogaster* експресія гена *CG1470* була вірогідно вищою на 30%, ніж у низькостійких. У високостійких імаго експресія *CG1470* вірогідно збільшилася на 40%, час реституції після гіпоксичного стресу вірогідно знизився на 31% порівняно з контролем. Отримані нами дані свідчать, що довготривала адаптація до низького парціального тиску кисню істотно скорочує час реституції та підвищує експресію гена *CG1470* у особин із високою вихідною стійкістю до гіпоксії.

Ключові слова: нормобарична гіпоксія, *D. melanogaster*, експресія генів, *Sir 2*, *CG1470*, PyK, HSP 68.

Гіпоксія впливає на рівень експресії багатьох генів, які регулюють активність гліколізу, ліпідного та білкового обміну [7, 10, 14]. Як було показано, ця регуляція здійснюється через чутливий до гіпоксії фактор HIF-1α [17, 18]. У той же час залишаються нез'ясованими механізми, завдяки яким відбувається зміна потужності аеробного й анаеробного шляхів окислення в умовах гіпоксії. Плодова мушка дрозофіла має високу стійкість до гострої кисневої депривації і може перебувати протягом кількох годин в атмосфері з вмістом O₂ близько 1% [8, 19]. Тому вона є зручною генетичною моделлю для вивчення механізмів, які лежать в основі резистентності до довготривалої гіпоксії. Вивченню впливу гіпоксії на експресію генів у *D. melanogaster* присвячено чимало досліджень [8, 11, 20, 21]. Показано збільшення експресії генів, які регулюють метаболізм вуглеводів і білків теплового шоку після 6 годин перебування *D. melanogaster* в атмосфері з 0,5% O₂ [14]. У мух, які протягом 32-х поколінь перебували в атмосфері з 4% O₂, змінилася експресія 2749 генів (у 1534 – збільшилася, а у 1215 – знизилася) [20, 21]. Проте у цих дослідженнях не порівнювали зміни експресії генів під впливом довготривалої жорсткої гіпоксії у мух із різною вихідною стійкістю до нестачі кисню. Цей аспект має надзвичайно важливе значення, оскільки *D. melanogaster*, як і іншим живим істотам, притаманна генетично зумовлена індивідуальна варіабельність чутливості до гіпоксії.

Мета нашої роботи – порівняти зміни експресії генів сиртуїну, піруваткінази, цитратсинтази й білків теплового шоку у личинок та імаго високостійких і низькостійких до гіпоксії особин *D. melanogaster* лінії *Oregon-R* дикого типу після довготривалого (протягом десяти поколінь) впливу нормобаричної гіпоксії.

Матеріали та методи

Дослідження проведено на *D. melanogaster* лінії *Oregon-R* дикого типу. Для досліджень брали як самців, так і самок мух у рівному співвідношенні. *D. melanogaster*

розділили на три групи. Контрольну групу мух (I) розводили в атмосферному повітрі (вміст O_2 20,9%). Для формування експериментальних груп попередньо визначали стійкість *D. melanogaster* до гіпоксії. Для цього мух розміщували у герметичній камері, до якої подавали азот (99,8%) зі швидкістю $2,5 \text{ cm}^3/\text{c}$, поступово знижуючи PO_2 до 1,5 мм рт.ст. Мух, які зберігали рухливість за умов гіпоксичного стресу понад 30 с, вважали високостійкими до впливу гіпоксії (ВГ) – II група, а тих, що утримувалися на стінках камери менше 30 с, – низькостійкими (НГ) – III група (табл. 1). Кожне наступне покоління мух перевіряли на стійкість до гіпоксії аналогічним методом. У кожному поколінні з групи ВГ відбирали високостійких особин, із групи НГ – тільки низькостійких особин. Селекційний відбір високо- та низькостійких до гіпоксії особин проводили протягом 10-ти поколінь. Дослідні мухи (в кількості \approx по 800 шт.) II (ВГ) та III (НГ) груп як першого, так і всіх наступних поколінь постійно перебували в окремих контейнерах в атмосфері дозованої гіпоксії з вмістом кисню $9 \pm 1\%$ при нормальному атмосферному тиску.

Таблиця 1

Розподіл дрозофіл на експериментальні групи залежно від їхньої стійкості до гіпоксії

Група	Стойкість до гіпоксії	Умови утримання
К	Контрольні	Нормоксія 21% O_2
II – ВГ	Високостійкі	Постійна гіпоксія $9 \pm 1\% O_2$
III – НГ	Низькостійкі	Постійна гіпоксія $9 \pm 1\% O_2$

D. melanogaster усіх груп вирощували на стандартному поживному середовищі (агар, цукор, манна крупа, дріжджі та пропіонова кислота) при температурі $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Експресію генів визначали у личинок третього віку, які мають повністю сформовані імагінальні диски, та у імаго віком 5 діб. Визначали експресію генів сиртуїну (*Sir 2*), гена *CG1470* (асоційованого з активністю цитратсинтази), *HSP 68*, піруваткінази (*PyK*). Для цього використовували стандартні методи [4]. Сумарну РНК одержували за допомогою комплексу для виділення РНК «РИБО-золь-А» («AmpliSens», РФ) методом кислородно-фенольної екстракції згідно з рекомендаціями виробника. Методом диференційного центрифугування виділяли очищену РНК. Для отримання кДНК використовували стандартний набір «РЕВЕРТА-L-100» («AmpliSens», РФ). Експресію на рівні мРНК досліджували методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Для ПЛР аналізу були підібрані специфічні праймери (таб. 2).

Таблиця 2

Перелік послідовностей праймерів, використаних для визначення експресії генів

Ген	Праймер	Літературне джерело
<i>Sir2</i>	<i>G T C G G A C A A C G A T G A T T C</i> <i>ACTGTGCTCGCTCTCTGA</i>	Database resources of the National Center for Biotechnology Information [24]
<i>CG1470</i>	<i>C G A T G A C C C T C C G A T G A A G</i> <i>TGCAGTGCTTCATGGCAAAC</i>	FlyBase consortium. FlyBase: improvements to the bibliography [15]
<i>PyK</i>	<i>G C T G A C C A C C A A C A A G G A A T</i> <i>GTGAGATCAGACCGTCATCG</i>	Database resources of the National Center for Biotechnology Information [24]
<i>Hsp 68</i>	<i>C T G G C A C C A C C T A C T C C T</i> <i>GCGTTCGAGTCTGTGAAA</i>	Database resources of the National Center for Biotechnology Information [24]
<i>GAPDH</i>	<i>C G T T C A T G C C A C C A C C G C T A</i> <i>CCACGTCCATCACGCCASAA</i>	Database resources of the National Center for Biotechnology Information [24]

Внутрішнім контролем рівня експресії слугувала експресія гена *GAPDH* (гліцеральдегід-фосфат-дегідрогенази). Усі праймери синтезовані НПФ «ЛИТЕХ» (Москва, РФ). Як негативні контролю реакції ЗТ-ПЛР використовували ПЛР-ампліфікацію продукту

реакції зворотної транскрипції без додавання РНК-проби та ПЛР-ампліфікацію без додавання кДНК проби. Рівень мРНК досліджуваного гена визначали за числом умовних одиниць флуоресцентного сигналу (використовуючи число ум.од. флуоресцентного сигналу гена *GAPDH* для стандартизації вихідної кількості РНК). Для розрахунку змін експресії генів використовували різницю між числом ум. од. флуоресцентного сигналу експериментальної та контрольної групи.

Визначали стійкість 10-го покоління адаптованих до постійної гіпоксії *D. melanogaster* різних груп до жорсткої гіпоксії ($P_{O_2} = 1,5$ мм рт.ст). Вимірювали час утримання мушок на вертикальних стінках і час відновлення рухової активності після гіпоксичного стресу першої та останньої дрозофіли. Розраховували середній час реституції дрозофіл кожної групи. Визначали коефіцієнт швидкості реституції як відношення часу реституції до часу утримання на стінках пробірок [3].

Для визначення стійкості особин *D. melanogaster* до підвищеної температури проводили термотестування. Пробірки з імаго віком 5 діб розміщували в термостаті й витримували їх при 41°C протягом 30 хв. Визначали відсоток мух, які вижили після нагрівання.

Фізіологічні ефекти гіпоксії, в тому числі на рівні генних механізмів регуляції, залежать як від тривалості дихання газовою сумішшю, так і від ступеня зниження P_{O_2} . Запропоновано спосіб кількісної оцінки сили гіпоксичного впливу, який базується на розрахунку дефіциту кисню в газовій суміші та на тривалості дихання цією сумішшю [4]. Сила гіпоксичного впливу (СГВ) розраховується за формулою: $СГВ = \Delta P_{O_2} \cdot T_n$, де T_n – тривалість дихання гіпоксичною газовою сумішшю в годинах. У наших дослідженнях дрозофіли перебували в умовах гіпоксії ($9 \pm 1\% O_2$) протягом життя 10-ти поколінь, що становить близько 140 діб. Тобто $СГВ = 98,27 \cdot 140 = 13760$ у.о., де 98,27 – різниця P_{O_2} в атмосферному повітрі та в газовій суміші, яка містить 8% O_2 .

Статистичний аналіз отриманих даних здійснювали за допомогою пакету статистичних програм STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001, США). Вірогідність різниці середніх величин оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Зміни показників вважали вірогідними при $P < 0,05$.

Результати і їхнє обговорення

Спостерігали вірогідне зростання експресії гена *Sir 2* у личинок ВГ та НГ адаптованих до гіпоксії мух 10-го покоління. У личинок ВГ *D. melanogaster* експресія гена сиртуїну збільшилася на 32%, у НГ – на 30% (рис. 1). Таким чином, рівень експресії гена *Sir 2* у личинок НГ та ВГ *D. melanogaster* був однаковим. У імаго експресія цього гена як у групі ВГ, так і у групі НГ залишалася близькою до контрольних значень. Відомо, що гіпоксія змінює редокс-потенціал клітини. Це активує діяльність редокс-чутливого фактора, яким є сиртуїн, що, у свою чергу, призводить до стимуляції HIF-2 α і сприяє пристосуванню клітин до зниженого P_{O_2} [11, 13]. Відомо, що активність сиртуїнів залежить від енергетичного стану клітини, рівня НАД, НАДН і нікотинаміду. В умовах гіпоксії співвідношення $NAD^+/NADH$ зменшується, це пригнічує активність сиртуїну й активує HIF [13]. Навпаки, пригнічення активності гліколізу підвищує рівень NAD^+ , що призводить до зростання експресії гена сиртуїну. Фізіологічна роль гена сиртуїну була відкрита 10 років тому. Згідно з даними літератури, сиртуїни регулюють процеси старіння, транскрипції та апоптозу [11, 16]. Дослідники вважають, що змінюючи активність сиртуїнів, можна подовжити тривалість життя *D. melanogaster*.

Експресія гена *CG1470*, асоційованого з активністю цитратсинтази, у личинок ВГ *D. melanogaster* вірогідно підвищилася на 82%, а у НГ особин – на 40%. Таким чином, у

личинок ВГ *D. melanogaster* експресія цього гена була вірогідно більшою на 32%, ніж у групі НГ. У імаго групи ВГ, які протягом 10-ти поколінь перебували в гіпоксичних умовах, експресія гена *CG1470* вірогідно зросла на 40%, а у групі НГ мала тенденцію до збільшення на 13% (рис. 1). Цитратсинтаза – один із ключових ферментів циклу Кребса, яка каталізує перенесення залишку оцтової кислоти з ацетил-КоА. Унаслідок цього утворюється щавлева кислота. Ця реакція є незворотною, тому активність цитратсинтази може лімітувати швидкість окислення глюкози в циклі Кребса. Зростання експресії гена цитратсинтази, на нашу думку, може свідчити про інтенсифікацію процесів аеробного окислення у дослідних мух після їх адаптації до низького P_{O_2} .

Отримані нами результати збігаються з даними літератури про підвищення активності цитратсинтази при зниженні P_{O_2} . Показано збільшення активності цитратсинтази та зростання експресії генів, асоційованих з активністю цитратсинтази, у *D. melanogaster*, яких протягом 32-х поколінь утримували в умовах гіпоксії 4% O_2 [20, 21]. На думку авторів, підвищення стійкості до нестачі кисню у мух, адаптованих до гіпоксії, пов'язано зі зростанням аеробної потужності й окисної здатності мітохондрій [14, 19]. Збільшення активності ферментів аеробного окислення у популяцій, які постійно перебувають в умовах гіпоксії, сприяє підтриманню необхідного рівня кисню в клітинах [2,10].

У цих роботах показано також, що адаптовані до гіпоксичних умов дрозофіли швидше відновлювали рухову активність після гіпоксичного впливу. Автори вважають, що збільшення активності ферментів аеробного окислення у популяцій, які перебувають в умовах гіпоксії, забезпечує ефективну адаптацію до низького P_{O_2} , хоча конкретні механізми підвищення стійкості до гіпоксії потребують подальших досліджень.

Піруватдегідрогеназа – поліферментний комплекс, який каталізує окислювальне декарбоксілювання піровиноградної кислоти з утворенням ацетил-КоА у тканинах тварин, рослин і аеробних мікроорганізмів. Завдяки цій реакції вуглеводи включаються в цикл Кребса. У нашому дослідженні експресія гена *Pyc* у личинок *D. melanogaster* II та III груп не вірогідно знизилася на 5 і 8% відповідно, щодо контрольної групи ($p > 0,05$). У високостійких імаго експресія гена *Pyc* не вірогідно знизилася на 12% ($p > 0,05$), а у низькостійких – залишалася на контрольному рівні (рис. 1). Інші дослідники також не виявили вірогідних змін експресії генів, які кодують піруваткіназу у *D. melanogaster*, вирощених у середовищі з 4% O_2 [19]. Стабільність активності піруваткінази може бути пов'язана з тим, що сім генів кодують цей фермент у *D. melanogaster* [20].

У багатьох експериментах, проведених на *D. melanogaster*, показана активація генів родини *HSP* (*HSP23*, *HSP26*, *HSP27*, *HSP67*, *HSP67BC* та *HSP68*) під впливом нормобаричної та гіпобаричної гіпоксії і інших стресогенних факторів [22, 23]. У подальшому було встановлено, що одна з функцій *HSP* у клітині – зв'язування з пошкодженими поліпептидами, внаслідок чого вони приймають нативну конформацію. Завдяки цьому гени родини *HSP* захищають клітину від окислювального стресу й інших факторів, які викликають апоптоз, регулюють життєдіяльність клітин [12, 23]. Також було показано, що підвищення експресії мітохондріального *HSP* веде до збільшення утворення АТФ, що покращує енергозабезпечення клітин [23]. Тому збільшення експресії *HSP* може сприяти підвищенню резистентності дрозофіли до впливу несприятливих факторів навколишнього середовища [12, 23]. У наших дослідженнях у личинок ВГ *D. melanogaster* спостерігали збільшення експресії гена *HSP 68* на 4%, а у НГ – зниження експресії цього гена на 14% ($p > 0,05$). Експресія *HSP 68* у личинок ВГ *D. melanogaster* була на 18% ($p > 0,05$) більшою порівняно з личинками НГ особин. У ВГ імаго, адаптованих до гіпоксії, експресія гена *HSP 68* вірогідно знизилася на 13%, а у НГ – на 10% (рис. 1).

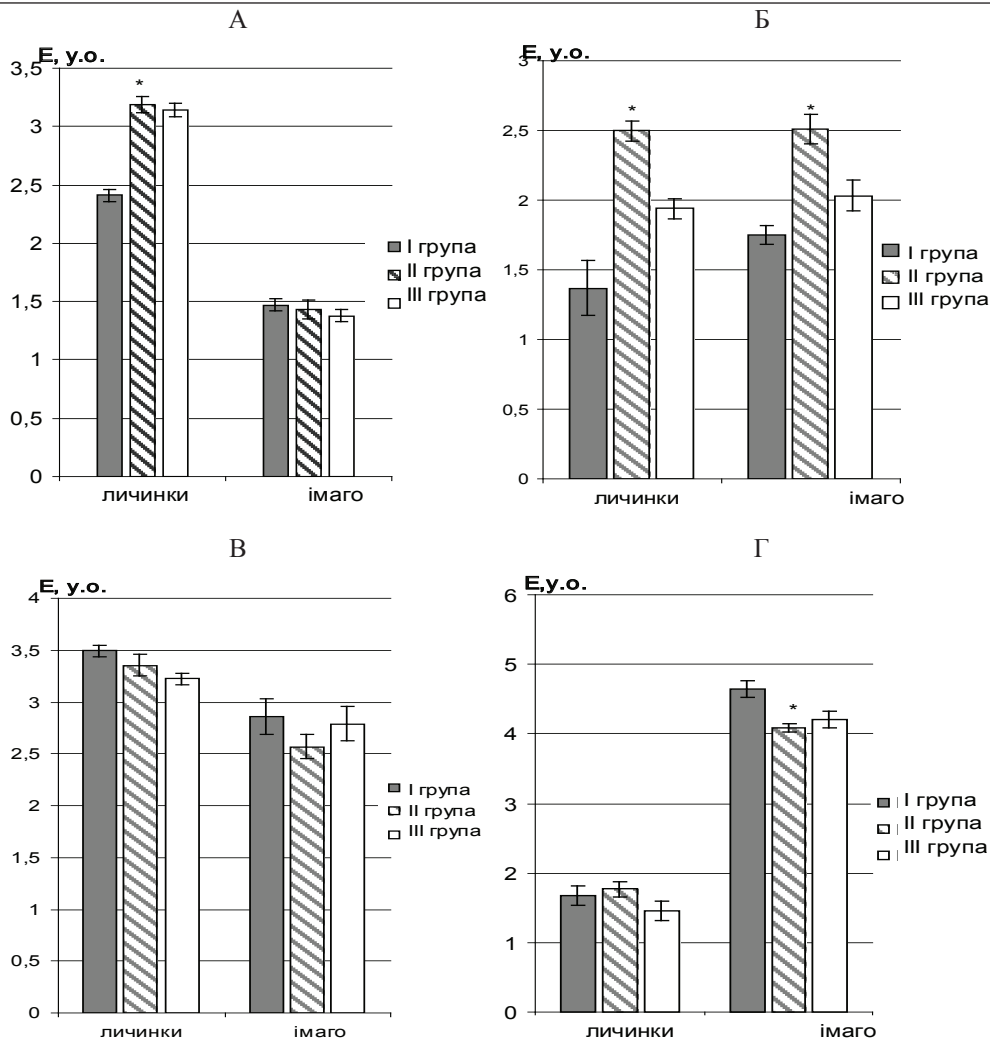


Рис. 1. Рівень експресії генів *Sir 2* (А), *CG1470* (Б), *PyK* (В), *HSP 68* (Г) у личинок та імаго *D. melanogaster* лінії Oregon R під впливом постійної гіпоксії протягом 10-ти поколінь ($9 \pm 1\% O_2$). * $P < 0,05$ – вірогідність порівняно з контролем.

Відомо, що адаптація до зниженого PO_2 підвищує стійкість особин до інших стресових факторів навколишнього середовища [1 – 3]. Підвищення температури повітря є значним стресогенним фактором для дрозофіли. Показано, що самці *D. melanogaster* при температурі вище $31^\circ C$ втрачають здатність до запліднення, і популяція гине.

Для того, щоб з'ясувати, як змінилася стійкість дослідних особин після адаптації до гіпоксії до такого стресового впливу, як висока температура, ми проводили термотестування. Результати випробувань показали збільшення виживання НГ мух, адаптованих до гіпоксії після температурного шоку ($41^\circ C$). 67% імаго НГ вижило після термотестування. Для групи ВГ цей показник становив 38%. Серед контрольних мух вижило 52%. Таким чином, у наших дослідженнях збільшення резистентності до теплового шоку після довготривалої адаптації протягом 10-ти поколінь до низького PO_2 спостерігали тільки у імаго групи НГ. У

ВГ мух стійкість до високої температури зменшилася. Зменшення стійкості до теплового шоку у ВГ *D. melanogaster* може бути пов'язане зі зниженням експресії гена *HSP 68*, яку ми спостерігали в наших дослідженнях.

Проведені нами дослідження показали, що личинки дрозофіли більш чутливі до впливу гіпоксії ніж дорослі особини. Так, експресія гена *SIR* вірогідно збільшилась у личинок як ВГ, так і НГ груп, тоді як у дорослих комах рівень експресії цього гена залишався близьким до контрольних значень. У личинок групи ВГ експресія гена *CG1470*, асоційованого з активністю цитратсинтази, збільшилася на 82%, а у імаго – тільки на 40%. Ці результати узгоджуються з даними американських учених, які виявили, що у імаго *D. melanogaster*, розведених при 4% O₂, змінилася експресія 138 генів, а у личинок – у 20 разів більше, а саме 2749 генів [21].

Різні автори використовували у своїх дослідженнях неоднакову силу гіпоксичного впливу, через це опубліковані в літературі дані часто бувають суперечливими. Використання нами СГВ кількісно визначеної сили (13760 у.о.) дало змогу спостерігати виражене збільшення експресії досліджуваних генів.

Ми порівнювали стійкість до жорсткої гіпоксії контрольних особин і тих, що протягом 10-ти поколінь утримували в гіпоксичних умовах (9±1% O₂). Час утримання на стінках пробірок в умовах гіпоксичного стресу у ВГ *D. melanogaster* був вірогідно більшим на 46%, ніж у мух, що росли в умовах нормоксії. У НГ *D. melanogaster* цей показник мав тенденцію до збільшення на 23% (табл. 3). Середній час реституції ВГ мух II групи, адаптованих до гіпоксії, після гіпоксичного стресу вірогідно знизився і становив 194 с, проти 281 с у контрольних. У НГ особин цей показник вірогідно не відрізнявся від показників контролю (табл. 3).

Таблиця 3

Зміни часу реституції після гіпоксичного стресу у *D. melanogaster*, адаптованих до низького парціального тиску кисню

Група	Час утримання на стінках пробірок, с	Середній час реституції, с	Коефіцієнт швидкості реституції
I – К	13,1±2,02	281±25,03	21,45±3,06
II – ВГ	19,2±2,04	194,57±32,18*	17,75±6,63*
III – НГ	16,5±2,37	263,50±32,32	28,35±3,48

Примітка. * P<0,05 – вірогідність порівняно з контролем.

Коефіцієнт швидкості реституції у ВГ особин II групи був вірогідно нижчим на 20% за контроль, що свідчить про підвищення стійкості *D. melanogaster* до жорсткої гіпоксії після довготривалої адаптації до низького Po₂. Унаслідок селекційного відбору у групі ВГ мух збільшився відсоток високостійких до гіпоксії особин. Так, у 1-му поколінні високостійкі особини становили 37% від загальної кількості, а у 10-му поколінні ВГ мух цей показник зріс до 69%. Збільшення відносної кількості ВГ особин у популяції та вірогідне зменшення часу реституції свідчить про підвищення стійкості мух до низького Po₂, які мали високу вихідну резистентність до гіпоксії. Підвищення стійкості *D. melanogaster* до низького Po₂ при повторних підйомах на висоту 1600 м показано в роботах, проведених на різних лініях плодкових мушок [3, 6]. У *D. melanogaster* лінії *Oregon-R* спостерігали збільшення часу утримання на вертикальних стінках на 83% та зменшення часу реституції на 31%. Такі дані свідчать про здатність *D. melanogaster* активувати механізми індивідуальної адаптації до низького Po₂.

У роботах [7, 21] показано, що стійкість до гіпоксії зумовлена мутаціями, які передаються у спадок. *D. melanogaster* дикого типу, які протягом 32-х поколінь

розвивалися в умовах гіпоксії, помістили в нормоксичні умови. Через 8 поколінь їх знову перемістили в середовище з вмістом кисню 4%. Більше ніж 80% дослідних особин вижили і могли нормально розвиватися в цих зазвичай непридатних для життя умовах [20]. На думку авторів, це свідчить про те, що стійкість до гіпоксії – спадкова риса, зумовлена зміною експресії кисень-чутливих генів. Наші дослідження свідчать про те, що крім генної спадковості, наявний також і епігенетичний компонент зростання резистентності *D. melanogaster* до гіпоксії, що здатний підвищувати активність кисень-чутливих генів і поліпшувати стан організму за умов гіпоксичного стресу.

Залежність часу реституції від експресії кисень-чутливих генів була показана в роботі [14], проведеної на *D. melanogaster* лінії *Oregon-R*, яких протягом 6 годин утримували в середовищі з вмістом O_2 0,5%. У цьому експерименті виявили, що час реституції після гіпоксичного стресу в мух із низькою активністю чутливих генів був більшим, ніж у особин із високою активністю цих генів. Із даних сучасної літератури [14, 17, 19, 20] відомо, що стійкість до гіпоксії зумовлюється комплексом генів (більше 300), які кодують ферменти аеробного й анаеробного метаболізму. Виявлене нами вірогідне збільшення експресії гена *CG1470*, асоційованого з активністю цитратсинтази, у адаптованих до гіпоксії личинок та імаго *D. melanogaster* лінії *Oregon-R*, дає підстави вважати, що цитратсинтаза є одним із компонентів епігенетичної реакції, котра забезпечує зростання резистентності комах до гіпоксії.

Проведені нами дослідження показали, що внаслідок адаптації до гіпоксії протягом десяти поколінь у личинок ВГ та НГ *D. melanogaster* десятого покоління вірогідно збільшилася експресія гена *SIR*. Тоді як у імаго цих груп експресія гена *SIR* залишалася близькою до контрольних значень. У високостійких до гіпоксії дрозофіл 10-го покоління (нащадків розмноження ВГ особин) унаслідок селекційного відбору і тривалого перебування в умовах нормобаричної гіпоксії скоротилася тривалість реституції та зменшився коефіцієнт її швидкості після гіпоксичного стресу. Це свідчить про наявність і достатню потужність епігенетичних механізмів адаптації до гіпоксії *D. melanogaster*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Барабашова З. И. Акклиматизация к гипоксии и ее физиологические механизмы. М.: Изд-во АН СССР, 1960. 248 с.
2. Березовский В. А. Природная и инструментальная оротерапия. Донецк: Заславский, 2012. 301 с.
3. Березовский В. А. Гипоксия: индивидуальные особенности реактивности. К.: Наук. думка, 1978. 215 с.
4. Епринцев А. Т., Попов В. Н., Федорин Д. Н. Идентификация и исследование экспрессии генов: учеб.-метод. пособие. Воронеж: Изд.-полиграф. центр Воронеж. ун-та, 2008. 62 с.
5. Патент на корисну модель № 67049. Спосіб кількісної оцінки інтенсивності гіпоксичного впливу / Березовський В. Я. – 28.07. 2011, Бюл. № 2.
6. Чака О. Г., Березовський В. Я., Левашов М. І. та ін. Вплив нормобаричної гіпоксії на стійкість *Drosophila melanogaster* до стресу // Дрозофіла в експериментальній генетиці та біології: III Міжнар. конф. К., 2012. С. 44–46.
7. Azad P., Haddad G. G. Survival in acute and severe low O_2 environment: use of a genetic model system // Ann. N Y Acad. Sci. 2009. Vol. 1177. P. 39–47.
8. Charette M., Darveau C., Perry S. F. et al. Evolutionary consequences of altered atmospheric oxygen in *Drosophila melanogaster* // PLoS One. 2011. Vol. 6. N 10. e 26876.

9. *Dioum E. M., Chen R., Alexander M. S. et al.* Regulation of hypoxia-inducible factor 2 alpha signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1 // *Sci.* 2009. Vol. 324. N 5932. P. 1289–1293.
10. *Feala J. D., Coquin L., Zhou D.* Metabolism as means for hypoxia adaptation: metabolic profiling and flux balance analysis // *BMC Systems Biology.* 2009. Vol. 3. N 1. P. 91.
11. *Frankel S., Ziafazeli T., Rogina B.* dSir2 and longevity in *Drosophila* // *Exp. Gerontol.* 2011. Vol. 46. N 5. P. 391–396.
12. *Gusev N. B., Bogatcheva N. V., Marston S. B.* Structure and properties of small heat shock proteins (sHsp) and their interaction with cytoskeleton proteins // *Biochemistry (Mosc).* 2002. Vol. 67. N 5. P. 511–519.
13. *Laemmle A., Lechleiter A., Roh V. et al.* Inhibition of SIRT1 impairs the accumulation and transcriptional activity of HIF-1 α protein under hypoxic conditions // *PLoS One.* 2012. Vol. 7. N 3. e 33433.
14. *Liu G, Roy J., Johnson E.A.* Identification and function of hypoxia-responsive genes in *Drosophila melanogaster* // *Physiol. Genomics.* 2006. Vol. 25. N 1. P. 134–141.
15. *Marygold S.J., Leyland P.C., Seal R.L. et al.* FlyBase: improvements to the bibliography // *Nucleic Acids Res.* 2013. Jan; 41 P.751–D757.
16. *Rogina B., Helfand S. L.* Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2004. Vol. 101. N 45. P. 15998–16003.
17. *Semenza G. L., Shimoda L. A., Prabhakar N. R.* Regulation of gene expression by hypoxia-inducible factor 1 // *Novartis Found. Symp.* 2006. Vol. 272. P. 2–8.
18. *Shen C., Nettleton D., Jiang M. et al.* Roles of the HIF-1 hypoxia-inducible factor during hypoxia response in *Caenorhabditis elegans* // *J. Biol. Chem.* 2005. N 280. P. 20580–20588.
19. *Zhao H. W., Haddad G. G., Jiang M. et al.* Review: Hypoxic and oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster* // *Placenta.* 2011. Vol. 32. Suppl 2. P. 104–108.
20. *Zhou D., Xue J., Chen J. et al.* Experimental selection for *Drosophila* survival in extremely low O₂ environment // *PLoS One.* 2007. Vol. 2. N 5. e 490.
21. *Zhou D., Xue J., Lai J. C. et al.* Mechanisms underlying hypoxia tolerance in *Drosophila melanogaster*: hairy as a metabolic switch // *PLoS Genet.* 2008. Vol. 4. N 10. e 1000221.
22. *Ruoff P., Mohsenzadeh S.* Heat shock and oxidative stress-induced exposure of hydrophobic protein domains as common signal in the induction of Hsp68 // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. N 3. P. 1814–1821.
23. *Vasenkova I. A., Khlebodarova T. M., Sukhanova M. Z. et al.* The heat-shock reaction is disturbed in a *Drosophila virilis* strain incapable of a neurohormonal stress reaction // *Cytology and Genetics.* 2000. Vol. 34. N 3. P. 43–48.
24. *Wheeler D., Barrett T., Yaschenko E.* Database resources of the National Center for Biotechnology Information // *Nucleic Acids Res.* 2006. Vol. 34. N 1. P. 173–180.

Стаття: надійшла до редакції 27.12.14

доопрацьована 14.01.14

прийнята до друку 30.04.14

**EXPRESSION OF OXYGEN-SENSITIVE GENES OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*
ON THE DIFFERENT STAGES OF ONTOGENESIS IN THE CONDITION OF LOW
PARTIAL OXYGEN PRESSURE****V. Berezovskyi, O. Chaka, R. Yanko, M. Levashov, I. Litovka***Bogomolets Institute of Physiology of NAS of Ukraine
4, Bogomolets St., Kiev 01024, Ukraine
e-mail: lenchaka@ukr.net*

It was held a selection of high resistant and low resistant *D. melanogaster Oregon-R* line to hypoxia during 10 generation. Experimental flies were constantly incubated in normobaric hypoxia condition ($9\pm 1\%$ O₂). *Sir2* and *CG1470* expression significantly raised in high and low resistant larvae of tenth generation. *CG1470* gene expression in high resistant larvae was significantly higher in 30% according to low resistant. *CG1470* gene expression in high resistant imago significantly raised in 40% and the restitution time decreased in 31% according to the control. Our result show that long-term adaptation to low oxygen partial pressure significantly reduces restitution time and increases *CG1470* gene expression in *D. melanogaster* which are high resistant to hypoxia.

Keywords: normobaric hypoxia, *D. melanogaster*, *Sir2*, *CG1470*, PyK, gene expression.

**ЭКСПРЕССИЯ КИСЛОРОД-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ГЕНОВ *DROSOPHILA*
MELANOGASTER НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ ОНТОГЕНЕЗА В УСЛОВИЯХ
ПОНИЖЕННОГО ПАРЦИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ КИСЛОРОДА****В. Березовский, Е. Чака, Р. Янко, М. Левашов, И. Литовка***Институт физиологии имени А.А. Богомольца НАН Украины
ул. Богомольца, 4, Киев 01024, Украина
e-mail: lenchaka@ukr.net*

Проводили селекционный отбор высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии особей *D. melanogaster* дикого типа линии *Oregon-R* на протяжении 10 поколений. Подопытные мухи постоянно находились в условиях нормобарической гипоксии (8% O₂). Экспрессия генов *Sir 2* и *CG1470* достоверно увеличилась у высокоустойчивых и низкоустойчивых личинок десятого поколения. У личинок высокоустойчивых мух экспрессия гена *CG1470* была достоверно выше на 30% по сравнению с низкоустойчивыми. У высокоустойчивых имаго экспрессия гена *CG1470* достоверно увеличилась на 40%, а время реституции достоверно снизилось на 31% по сравнению с контролем. Полученные нами данные свидетельствуют, что продолжительная адаптация к низкому парциальному давлению кислорода существенно сокращает время реституции и повышает экспрессию гена *CG1470* у особей с исходно высокой устойчивостью к гипоксии.

Ключевые слова: нормобарическая гипоксия, *D. melanogaster*, экспрессия генов, *Sir 2*, *CG1470*, PyK, HSP 68.