

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

## Вплив зміненого парціального тиску кисню на резистентність до гіпоксії та експресію киснечутливих генів *Drosophila melanogaster*

*За результатами тестування на чутливість до низького  $P_{O_2}$  виділено субпопуляції високостійких (ВГ) та низькостійких до гіпоксії (НГ) дрозофіл *Melanogaster* лінії Oregon, яких утримували протягом 10 поколінь в умовах постійної нормобаричної гіпоксії ( $P_{O_2}=62-64$  мм рт. ст.). Досліджували це ВГ-дрозофіл, котрі зазнавали лише короткочасного впливу гострої гіпоксії ( $P_{O_2}=1,5$  мм рт. ст. протягом 5 хв) у кожному поколінні. Виявлено підвищення відносно контролю експресії гена сіртуїна (*Sir2*) та гена, асоційованого з активністю цитратсинтази (*CG14740*) у личинок дрозофіл усіх дослідних груп. У личинок ВГ-дрозофіл експресія гена *CG14740* була більшою, ніж у НГ-дрозофіл. У ВГ-дрозофіл час реституції після гіпоксичного шоку скоротився на 31 % порівняно з контролем. Отримані результати свідчать про те, що адаптація в ряду поколінь до низького  $P_{O_2}$  у ВГ-дрозофіл істотно скорочує час реституції та супроводжується підвищенням експресії генів *Sir2* та *CG14740*. Ключові слова: гіпоксія, дрозофіла, експресія генів, сіртуїни, ген, асоційований з активністю цитратсинтази, ген піруваткінази.*

### ВСТУП

Безперервне споживання організмом кисню є необхідною умовою існування людини та тварин. Його нестача знижує інтенсивність окисного метаболізму та кількість молекулярної аденозинтрифосфорної кислоти. Внаслідок гіпоксії змінюється співвідношення потужності аеробного та анаеробного шляхів вивільнення енергії, активуються молекулярні сенсори кисневого гомеостазу, стимулюється експресія киснечутливих генів, що забезпечують адаптацію організму до зниженого парціального тиску кисню ( $P_{O_2}$ ). Зі 110 киснечутливих генів, 63 регулюються активністю фактора, індукованого гіпоксією (HIF-1) [1–3]. Водночас активність HIF-1 $\alpha$  та HIF-2 $\alpha$  залежить від рівня експресії генів родини сіртуїнів (*Sir*) [4, 5]. Зниження активності останніх погіршує HIF-залежне пристосування клітин до гіпоксії. Встановлено одночасне зростання рівня експресії *Sir1*

та HIF-1 $\alpha$  в культурі клітин за умов гіпоксії (1%  $O_2$ ) [5]. Киснезалежні гени регулюють численні функції, завдяки яким живі істоти пристосовуються до низького  $P_{O_2}$  [6, 7]. Показано, що експресія ендотеліального фактора росту судин (VEGF) ініціює процеси адаптивного ангиогенезу, гемопоезу, підвищує активність гексокінази, прискорює окиснення глюкози в анаеробних умовах [1, 3, 7, 8].

Дослідження молекулярних шляхів реакції клітин на зниження  $P_{O_2}$  та адаптивних процесів у ряду поколінь доцільно проводити на такому класичному модельному об'єкті з коротким терміном розвитку та життя, як *Drosophila melanogaster* [7–9]. Плодова мушка, як і інші комахи, має еволюційні адаптації, які забезпечують їй високу резистентність до гіпоксії [9, 10]. Відомо, що фізіологічні ефекти нестачі  $O_2$  залежать від типу гіпоксії (нормо-, гіпо- або гіпербарична), ступеня зниження  $P_{O_2}$ , тривалості та режиму (переривчастий або постійний). За останні роки

© В.Я. Березовський, О.Г. Чака, І.Г. Літовка, М.І. Левашов, Р.В. Янко

вивченню впливу гіпоксії на експресію генів у дрозофіл присвячена значна кількість наукових досліджень [6–9]. Проте умови проведення експериментів суттєво відрізнялися. Так, у роботі американських вчених [11, 12] було виведено *Drosophila melanogaster*, здатних вижити та розмножуватися при вмісті 4 %  $O_2$  в середовищі. У личинок таких дрозофіл змінилася експресія 2749 генів (у 1534 – підвищилась, а у 1215 – знизилась). Водночас у дорослих комах цієї субпопуляції змінилася експресія лише 138 генів (у 95 – підвищилась, у 43 – знизилась) [8–10]. Інші автори порівнювали зміни експресії генів під впливом жорсткої (1 %  $O_2$ ) протягом 2,5 год і переривчастої гіпоксії з таким самим вмістом  $O_2$ . Показано, що під впливом переривчастої або постійної гіпоксії змінюється експресія різних генів [6, 13]. Зростання експресії генів білків теплового шоку, генів ферментів, які регулюють метаболізм вуглеводів і клітинне дихання, після 6 год дії жорсткої гіпоксії (0,5 %  $O_2$ ) описано Liu та співавт. [7]. Виявлено також, що дрозофіли однієї лінії мають різну стійкість до гіпоксії, що зумовлено неоднаковою активністю ферментів аеробного дихання [14]. Однак у літературі немає даних про дію довготривалої жорсткої гіпоксії на експресію генів, що відповідають за адаптацію організму до низького  $PO_2$  у дрозофіл із різною вихідною стійкістю до гіпоксії. Немає відомостей і відносно кількісної оцінки інтенсивності гіпоксичного впливу.

Мета нашої роботи – дослідження в ряду поколінь короткочасного або постійного впливу зниженого  $PO_2$  на експресію генів Sir, піруваткінази, цитратсинтази та резистентність *Drosophila melanogaster* до гострої гіпоксії.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведено на *Drosophila melanogaster* лінії Oregon у кількості приблизно 4000 особин по 1000 в кожній групі. Дрозофіл усіх груп вирощували на стандартному

поживному середовищі (агар, цукор, манна крупа, дріжджі з додаванням пропіонової кислоти) при  $24 \pm 1$  °C. Мушок розділили на чотири групи. I група (контрольна) дрозофіли, яких утримували в атмосферному повітрі ( $PO_2 = 159,6$  мм рт.ст.). До II групи увійшли високостійкі (ВГ), до III – низькостійкі (НГ) до впливу гіпоксії, дрозофіли, які як першого, так і всіх наступних поколінь постійно (24 год на добу) знаходилися в окремих контейнерах в атмосфері дозованої гіпоксії ( $PO_2 = 62–64$  мм рт.ст.) при нормальному атмосферному тиску. Для формування цих дослідних груп попередньо визначали стійкість мушок до низького  $PO_2$ . Дрозофіл розміщували у проточній камері об'ємом 50 мл, в яку подавали 99,8%-й азот зі швидкістю 2,5 см<sup>3</sup>/с, знижуючи  $PO_2$  в ній до 1,5 мм рт. ст. Мушок, які зберігали рухливість в таких умовах понад 30 с, вважали ВГ, а тих, що утримувалися на вертикальних стінках камери менше 30 с – НГ. Кожне покоління мушок перевіряли на стійкість до гіпоксії аналогічним методом. З нащадків ВГ-мух відбирали тільки ВГ-особин, із нащадків НГ – тільки НГ особин наступного покоління. До IV групи увійшли ВГ-дрозофіли, які в кожному поколінні зазнавали лише короткочасного (5 хв) впливу гіпоксії ( $PO_2 = 1,5$  мм рт.ст.). Для їх формування в кожному поколінні відбирали для подальшого розведення тільки ВГ-особин методом, описаним вище.

Селекційний відбір ВГ- та НГ-особин проводили протягом десяти поколінь. Оскільки фізіологічні ефекти гіпоксії, в тому числі на рівні генних механізмів регуляції, залежать від інтенсивності її впливу, виникла необхідність введення нового інтегрального показника, який дав би змогу порівнювати результати різних дослідників. Тому нами був розроблений спосіб кількісної оцінки інтенсивності гіпоксичного впливу, який базується на розрахунку дефіциту  $O_2$  в газовій суміші та тривалості дихання цією сумішшю [15]. Сила гіпоксичного впливу (СГВ) розраховується за формулою:  $СГВ = \Delta PO_2 \cdot T_n$ , де

$T_n$  – тривалість дихання гіпоксичною газовою сумішшю в годинах,  $\Delta P_{O_2}$  – різниця  $P_{O_2}$  в атмосферному повітрі та в газовій суміші. У наших дослідженнях дрозофіли II та III групи знаходилися в умовах гіпоксії (8 %  $O_2$ ) протягом 10 поколінь, що становить 140 днів або 3360 год. Тобто для цих груп дрозофіл  $СГВ = 98,27 \cdot 3360 = 330187,2$ , де 98,27 – різниця  $P_{O_2}$  в атмосферному повітрі та в газовій суміші, яка містить 8 %  $O_2$ . Для дрозофіл IV групи  $СГВ = 158,1 \cdot 0,08 \cdot 10 = 126,5$ , де 158,1 різниця  $P_{O_2}$  в атмосферному повітрі та в газовій суміші.

У 10-му поколінні личинок третього віку визначали експресію Sir2, гена CG14740, асоційованого з активністю цитратсинтази, піруваткінази (PyK). Сумарну РНК одержували кислотнo-фенольною екстракцією за допомогою комплекту для виділення РНК «РИБО-золь-А» («AmpliSens», РФ), згідно з рекомендаціями виробника. Методом диференційного центрифугування виділяли очищену РНК. Для отримання кДНК використовували стандартний набір «РЕВЕРТА-L-100» («AmpliSens», РФ). Реакцію зворотної транскрипції проводили за допомогою M-MLV-транскриптази в об'ємі 20 мкл, використовуючи 5 мкг сумарної РНК. Готовий препарат зберігали при  $-70^\circ\text{C}$ . Експресію на рівні мРНК досліджували методом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Для ЗТ-ПЛР-аналізу були підібрані специфічні праймери: для Sir2 – GTCGGACAACGATGATTC ACT GTCGCTCGCTCTCTGA, для гена CG14740, який асоційований з активністю цитратсинтази – CGATGACCCCTCCGATGAAG та TGCAGTGCTTCATGGCAAAC, для PyK – GCTGACCACCAACAAGGAAT GTGAGATCAGACCGTCATCG. Послідовності генів взято з бази NCBI [16]. Для цитратсинтази використана послідовність CG14740 з FlyBase [17]. Як внутрішній контроль рівня експресії застосовували експресію гена Gapdh2 (гліцеральдегід-фосфат-дегідрогенази) праймери CGTTCATGCCACCACCGCTA CCACGTCCATCACGCCACAA. Всі вони

синтезовані НПФ «ЛИТЕХ» (РФ). Як негативний контроль реакції ЗТ-ПЛР використовували ПЛР-ампліфікацію продукту реакції зворотної транскрипції без додавання РНК-проби та ПЛР-ампліфікацію без додавання кДНК проби. Вміст мРНК досліджуваного гена визначали за числом умовних одиниць флуоресцентного сигналу гена Gapdh2 для стандартизації вихідної кількості РНК. Зміни експресії генів розраховували за різницею між числом умовних одиниць флуоресцентного сигналу експериментальної та контрольної групи.

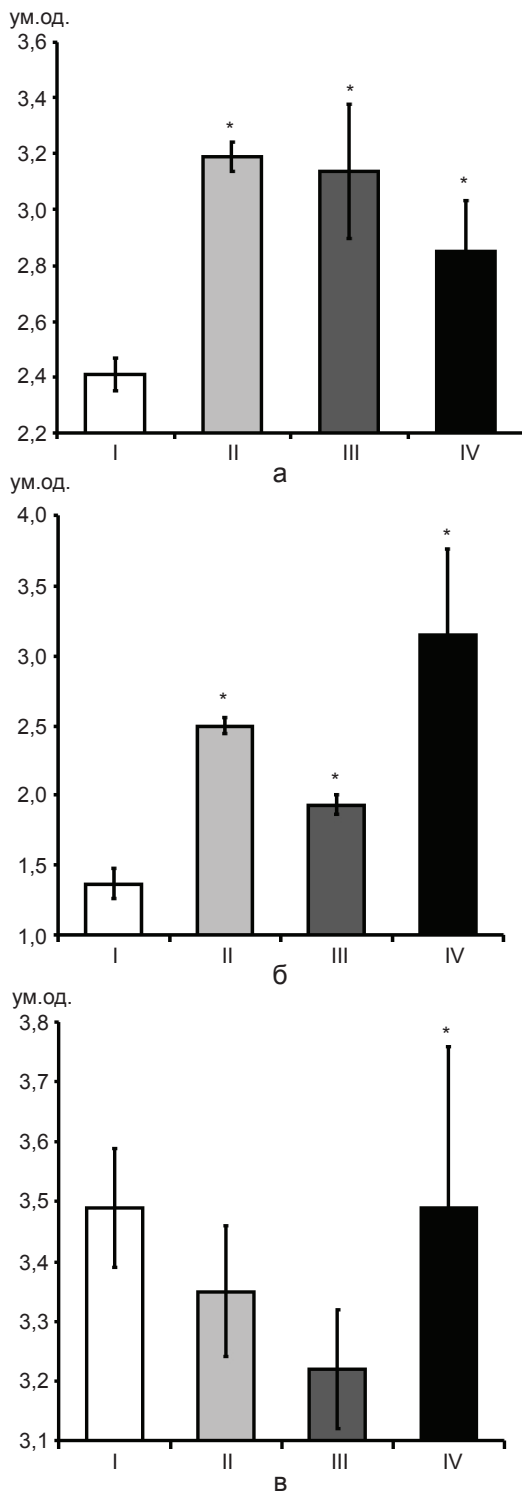
Визначали стійкість 10-го покоління дослідних дрозофіл різних груп до гострої гіпоксії ( $P_{O_2} = 1,5$  мм рт.ст.). Вимірювали час утримання мушок на вертикальних стінках та час відновлення рухової активності (реституції) після гіпоксичного знерухомлення першої та останньої дрозофіли. Розраховували середній час та коефіцієнт швидкості реституції дрозофіл.

Статистичний аналіз отриманих результатів здійснювали за допомогою пакета програм Statistica 6.0 (Stat-Soft, 2001, США). Вірогідність різниці між середніми значення оцінювали за критерієм t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У личинок, відкладених ВГ-дрозофілами експресія гена Sir2 зростала на 32 %, а НГ-дрозофіл – на 30 %. У личинок IV групи, що виростили в умовах нормоксії, експресія цього гена збільшилася на 16 % порівняно з контролем. Тобто під впливом постійної гіпоксії у личинок як ВГ-, так і НГ-дрозофіл, експресія гена Sir2 зростає значно більше, ніж у личинок IV групи, які зазнавали лише короточасного впливу гіпоксії (див. рисунок).

Відомо, що існує 7 гомологічних генів родини Sir. Вони знайдені в усіх видах організмів від бактерій до людини [4, 5]. Показано, що Sir знаходяться як в ядрі, так і в цитоплазмі клітин. Вони беруть участь у деацетилюванні протеїнів і в антиоксидантному захисті клітин.



Експресія гена Sir2 (а), CG14740 (б), PyK (в) у личинок дрозофіл після впливу постійної або переривчастої гіпоксії: I – контроль, II – високостійкі, III – низькостійкі, IV – високостійкі дрозофіли.  $P < 0,05$  порівняно з контролем

Згідно з літературними даними, гени Sir регулюють процеси старіння, транскрипції, апоптозу, запалення [18, 19]. У дослідженнях на клітинах дріжджів встановлено, що сіртуїни можуть не тільки змінювати щільність гістонової упаковки і таким чином регулювати активність генів, а й брати участь у репарації пошкодженої ДНК [20, 21]. Встановлено, що сіртуїни відіграють важливу роль у регуляції тривалості життя та розвитку нейродегенеративних захворювань дрозофіл [18, 19, 21]. Показано, що збільшення експресії Sir2 втричі у жировій тканині дрозофіл збільшує тривалість життя як самців, так і самиць на 13 % [22].

Доведено [4, 5, 18], що активність сіртуїнів залежить від енергетичного стану клітини, вмісту НАД, НАДН і концентрації нікотинаміду. В умовах гіпоксії знижується співвідношення НАД<sup>+</sup>/НАДН та редокс-потенціал клітини. Зниження концентрації НАД<sup>+</sup> в умовах гіпоксії пригнічує діяльність Sir2, що в свою чергу стимулює HIF-2 $\alpha$  та сприяє пристосуванню клітин до зниженого  $Po_2$  [18]. Навпаки, пригнічення активності гліколізу підвищує рівень НАД<sup>+</sup>, що призводить до зростання експресії генів Sir [20]. Водночас інші дослідники на культурі клітин хребетних показали, що Sir2 пригнічує активність HIF-1 $\alpha$  деацетилюванням Lys 674 [5].

У нашому дослідженні експресія гена CG14740, асоційованого з активністю цитратсинтази, у личинок, відкладених ВГ-дрозофілами, підвищилася на 82 % (див. рисунок), а у НГ-особин – лише на 40 %. Експресія гена CG14740 у личинок ВГ-дрозофіл була більшою на 30 %, ніж у групі НГ. У личинок дрозофіл IV групи вона зросла на 129 %, і стала на 63 % вище, ніж у НГ-дрозофіл. Таке зростання експресії, на нашу думку, може свідчити про інтенсифікацію аеробного окиснення у дрозофіл після їх адаптації до низького  $Po_2$ . Отримані нами результати збігаються з літературними даними про підвищення активності цитратсинтази при зниженні  $Po_2$ . Показано збільшення активності

цитратсинтази та зростання експресії генів, асоційованих з активністю цитратсинтази [6, 12] у дрозофіл, яких протягом 32 поколінь утримували в умовах гіпоксії (4 % O<sub>2</sub>). На думку авторів, підвищення стійкості до нестачі кисню у дрозофіл, адаптованих до гіпоксії, пов'язано зі зростанням аеробної потужності та окисної здатності мітохондрій [7, 10]. З'ясовано також, що треновані до низького Po<sub>2</sub> дрозофіли швидше відновлюють рухову активність після гіпоксичного впливу. Автори вважають, що збільшення активності ферментів аеробного окиснення у популяцій, які знаходяться в умовах гіпоксії, забезпечує ефективну адаптацію до низького Po<sub>2</sub>, хоча конкретні механізми підвищення резистентності до гіпоксії залишаються нез'ясованими [9–11].

Встановлено, що у дрозофіл, яких утримували в умовах гіпоксії (6 % O<sub>2</sub>), знижується експресія генів, що кодують ферменти аеробного окиснення (цитратсинтази, ізоцитратдегідрогенази, сукцинатдегідрогенази, фумарази) [12]. При цьому дослідні комахи мали значно менші розміри, ніж ті, що виростили в умовах нормоксії. Автори стверджують, що в умовах гіпоксії такої інтенсивності пригнічується енергетичний метаболізм, що дає змогу мінімізувати невідповідність між постачанням кисню та його потребою [11, 12].

Піруватдегідрогеназа – поліферментний комплекс, який каталізує окиснювальне декарбоксилювання пірвіноградної кислоти з утворенням ацетил-КоА в тканинах тварин, рослин та аеробних мікроорганізмів. Завдяки цій реакції вуглеводи включаються до циклу Кребса. В наших дослідженнях експресія гена Рук у личинок дрозофіл II та III групи мала тенденцію до зниження на 5 і 8 % відповідно відносно контрольної групи. Не виявлено вірогідних відмінностей між рівнем експресії цього гена у личинок ВГ- та НГ-дрозофіл і між личинками II та IV групи (див. рисунок).

Відомо, що активність піруваткінази кодується сімома генами [12]. У дрозофіл, яких протягом 32 поколінь утримували в

середовищі зі вмістом кисню 4 %, експресія більшості генів, які кодують піруваткіназу, зменшувалась, а одного з цих генів (CG12229) – не змінювалась. У цій праці також показано, що у дослідних дрозофіл активність піруваткінази зростала порівняно з контролем.

При аналізі даних літератури складно порівняти результати досліджень. Автори використовують різний ступінь гіпоксії і тривалість її дії, не враховуючи дозу гіпоксичного впливу. У наших дослідженнях експресія генів Sir2 та CG14740 підвищилась у личинок II та IV груп. СГВ для цих груп становила 330187,2 ум.од. та 126,5 ум.од відповідно. Такі результати свідчать, що активація експресії генів в умовах гіпоксії відбувається навіть при невеликих рівнях СГВ. Подальше її збільшення не призводить до ще більшого підвищення рівня експресії досліджуваних генів.

Ми порівнювали стійкість до нестачі кисню контрольних дрозофіл та тих, що протягом 10 поколінь постійно знаходилися в гіпоксичних умовах (8 % O<sub>2</sub>). Час утримання на стінках пробірок в умовах аноксії у ВГ-дрозофіл, які виростили в умовах гіпоксії, був вірогідно більшим на 46 %, ніж у дрозофіл, що зростали в умовах нормоксії. У НГ-дрозофіл цей показник мав лише тенденцію до збільшення на 23 % (таблиця).

Важливим показником адаптивних змін метаболізму може бути час відновлення вихідного стану комах після гіпоксії. Середній час реституції ВГ-мух II групи після впливу гострої гіпоксії знизився і становив 194 с порівняно з 281 с у контрольних комах. У дрозофіл III та IV груп тривалість реституції не відрізнялася від показників контролю (див. таблицю). Коефіцієнт швидкості реституції (відношення тривалості відновлення до тривалості утримання на стінках пробірок) у ВГ-дрозофіл II групи був нижче на 20 % порівняно з контрольною групою, що свідчить про підвищення їх резистентності до гострої гіпоксії після довготривалої адаптації до низького парціального тиску кисню.

## Показники стійкості до гострої гіпоксії дрозофіл контрольних та дослідних груп

Групи дрозофіл	Час утримання на стінках пробірок, с	Середня тривалість реституції, с	Коефіцієнт швидкості реституції
Контроль	13,1±2,02	281±25,03	21,45±3,06
Високостійкі	19,2±2,04	194,57±32,18*	17,75±6,63*
Низькостійкі	16,5±2,37	263,50±32,32	28,35±3,48
Високостійкі, які зазнавали короткочасного впливу гострої гіпоксії	12,85±1,11	252,92±18,05	21,68±2,02

\*  $P < 0,05$  порівняно з контролем.

Зменшення часу реституції може бути наслідком зміни експресії генів, які кодуєть активність мітохондріальних ферментів [10, 23]. Залежність тривалості реституції після гіпоксичного знерухомлення від активності киснечутливих генів показано також у дослідженні, проведеному на дрозофілах [11], яких протягом 6 год утримували в середовищі зі вмістом кисню 0,5 % .

Внаслідок проведеного нами селекційного відбору у ВГ-дрозофіл збільшився відсоток ВГ-комах. Так, у 1-му поколінні ВГ-особини становили 37 % від загальної кількості, а у 10-му поколінні ВГ-дрозофіл II групи цей показник підвищився до 69 %. Збільшення відносної кількості ВГ-дрозофіл у субпопуляції та зменшення часу реституції свідчать про підвищення їх резистентності до низького  $P_{O_2}$ . Таким чином, після селекційного відбору ВГ-дрозофіл протягом 10 послідовних поколінь отримано субпопуляцію особин зі значно вищою резистентністю до нестачі  $O_2$ .

Підвищення стійкості дрозофіл до низького  $P_{O_2}$  при повторних підйомах на висоту 1600 м показано також у дослідах, проведених на різних лініях плодових мушок [24, 25]. У дрозофіл лінії дикого типу спостерігали збільшення часу утримання на вертикальних стінках на 83 % та скорочення тривалості реституції на 31 %.

Деякі автори довели, що стійкість до гіпоксії зумовлена мутаціями, які передаються у спадок. Дрозофіл, які протягом 32 поколінь розвивалися в умовах гіпоксії, повернули в нормоксичні умови [12]. Через 8 поколінь їх

знову перемістили в середовище зі вмістом кисню 4 %. Більше ніж 80 % дрозофіл жили і давали нащадків у такому середовищі. Контрольні дрозофіли в цих умовах виявилися не здатними до розмноження. На думку авторів, це свідчить про те, що стійкість до гіпоксії – видова спадкова риса, що зумовлена мутаціями та зміною експресії певних генів [12, 13]. Проведені нами дослідження показали, що після довготривалого гіпоксичного впливу, інтенсивність якого сягала 330187,2 ум.од., у ВГ-дрозофіл експресія гена CG14740 зросла на 32 % порівняно з НГ-дрозофілами. Це може свідчити про те, що стійкість дрозофіл до гіпоксії пов'язана з рівнем експресії цього гена.

Під дією постійної гіпоксії експресія гена Sir2, який опосередковано впливає на активність HIF [4, 5], зростала у дрозофіл усіх дослідних груп. Але за рівнем експресії цього гена між ВГ- та НГ-дрозофілами різниці не виявлено. Це свідчить про те, що рівень експресії Sir2 не залежить від стійкості дрозофіл до гіпоксії.

Відомо [2, 7, 10, 11], що стійкість до гіпоксії зумовлюється комплексом генів (більше 300), що кодуєть ферменти аеробного та анаеробного метаболізму. У загальному «комплексі» всіх складових реакції організму на гіпоксію проблематично кількісно визначити роль того чи іншого ферменту. Виявлене нами статистично вірогідне зростання рівня експресії гена CG14740, асоційованого з активністю цитратсинтази, після довготривалого впливу жорсткої гіпоксії дає можливість

вважати, що вона є одним з компонентів, які забезпечують високу резистентність комах до гіпоксії.

## ВИСНОВКИ

1. У личинок 10-го покоління ВГ до нестачі кисню дрозофіл як після короточасного, так і довготривалого впливу нормобаричної гіпоксії ( $P_{O_2}=62-64$  мм рт.ст.) встановлено підвищення експресії генів Sir2 та CG14740.

2. Експресія гена CG14740 у личинок ВГ-дрозофіл, що зазнавали постійного або короточасного впливу гіпоксії, була більшою, ніж у НГ.

3. У ВГ-дрозофіл 10-го покоління внаслідок селекційного відбору скоротився час та коефіцієнт швидкості реституції після впливу гострої гіпоксії.

**В.А. Березовский, Е.Г. Чака, И.Г. Литовка, М.И. Левашов, Р.В. Янко**

## ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕННОГО ПАРЦИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ КИСЛОРОДА НА РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ГИПОКСИИ И ЭКСПРЕССИЮ КИСЛОРОД-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ГЕНОВ DROSOPHILA MELANOGASTER

По результатам тестирования на резистентность к гипоксии выделено субпопуляции исходно высокоустойчивых (ВГ) и низкоустойчивых к гипоксии (НГ) дрозофил *Melanogaster* линии Oregon, которых содержали в течение 10 поколений в условиях постоянной нормобарической гипоксии ( $P_{O_2}=62-64$  мм рт.ст.). Исследовали еще ВГ-дрозофил, которых подвергали кратковременному воздействию аноксии ( $P_{O_2}=1,5$  мм рт.ст.) в каждом поколении. Выявлено достоверное повышение относительно контроля экспрессии гена сиртуина (Sir2) и гена, ассоциированного с активностью цитратсинтазы (CG14740) у личинок дрозофил всех исследованных групп. У личинок ВГ-дрозофил экспрессия гена CG14740 была достоверно больше, чем у личинок НГ-дрозофил. Время реституции после воздействия острой гипоксии достоверно сократилось на 31% у ВГ-дрозофил относительно контроля. Полученные результаты свидетельствуют о том, что долговременная адаптация к низкому парциальному  $P_{O_2}$  у ВГ-дрозофил существенно сокращает время реституции и сопровождается повышением экспрессии генов Sir2 и CG14740. Ключевые слова: гипоксия, дрозофила, экспрессия генов, сиртуины, ген, ассоциированный с активностью цитратсинтазы, ген пируваткиназы.

**V.A. Berezovskyi, E.G. Chaka, I.G. Litovka, M.I. Levashov, R.V. Yanko**

## THE EFFECT OF ALTERED OXYGEN PARTIAL PRESSURE ON THE RESISTANCE TO HYPOXIA AND EXPRESSION OF OXYGEN-SENSITIVE GENES IN DROSOPHILA MELANOGASTER

As a result of resistance test to hypoxia of *Drosophila melanogaster* of Oregon strain, we identified a high resistance (Group II) and low resistance (Group III) subpopulations of flies. Flies from groups II and III were incubated in a constant normobaric hypoxia ( $P_{O_2}=62-64$  mm Hg) for 10 generations. A highly resistant group (Group IV) were exposed to a short-term anoxia ( $P_{O_2}=1,5$  mm Hg, 5 min) every generation. Larvae from Groups II, III, and IV demonstrated significantly elevated levels of Sir and CG14740 expression. Larvae from Group II had a significantly higher expression of CG14740 compared to group III. The restitution time after exposure to anoxia was significantly reduced in Group II (on 31% of the control values). Our results suggest that long-term adaptation to low oxygen partial pressure of highly resistant *Drosophila* significantly reduces the time of restitution and increases the expression of Sir2 and CG14740 genes.

Key words: hypoxia, drosophila, expression of genes Sir2, CG14740, PyK.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

## REFERENCES

- Iyer N.V., Kotch L.E., Agani F., Leung S.W., Laughner E., Semenza G.L. Cellular and developmental control of  $O_2$  homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Genes Dev.* 1998; 12 (2): 149–162.
- Semenza G.L., Shimoda L.A., Prabhakar N. R. Regulation of gene expression by hypoxia-inducible factor 1. *Novartis Found. Symp.* 2006;272: 2–8.
- Shen C., Nettleton D., Jiang M., Kim S. K., Powell-Coffman J.A. Roles of the HIF-1 hypoxia-inducible factor during hypoxia response in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol chem.* 2005; 280: 20580–20588.
- Hubbi M.E., Hu H., Kshitiz, Gilkes D.M., Semenza G.L. Sirtuin-7 inhibits the activity of hypoxia-inducible factors. *J Biol Chem.* 2013; 288 (29): 20768–20775.
- Laemmle A., Lechleiter A., Roh V., Schwarz C., Portman S., Furer C., Keogh A., Tschan M., Candinas D., Vorbuerger S.A., Stroka D. Inhibition of SIRT1 impairs the accumulation and transcriptional activity of HIF-1 $\alpha$  protein under hypoxic conditions. *PLoS One.* 2012; 7 (3): 33433
- Feala J.D., Coquin L., Zhou D. Metabolism as means for hypoxia adaptation: metabolic profiling and flux balance analysis. *BMC Systems biology.* 2009; 3 (1): 91.
- Liu G., Roy J., Johnson E.A. Identification and function

- of hypoxia-response genes in *Drosophila melanogaster*. *Physiol. Genomics*. 2006; 25(1):134–141.
8. Ma E., Xu T., Haddad G.G. Gene regulation by O<sub>2</sub> deprivation: an anoxia-regulated novel gene in *Drosophila melanogaster*. *Brain res. mol. brain res.* 1999; 63: 217–224.
  9. Charette M., Darveau C., Perry S.F., Rundle H. Evolutionary consequences of altered atmospheric oxygen in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*. 2011;6(10): e26876
  10. Zhao H.W., Haddad G.G., Jiang M., Kim S., Powell-Coffman A. Review: Hypoxic and oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *Placenta*. 2011; 32 (2): 104 – 108.
  11. Zhou D., Xue J., Chen J., Morcillo P., Lambert J.D. Experimental selection for *Drosophila* survival in extremely low O<sub>2</sub> environment . *Plos One*. 2007; 2 ( 5): e. 490.
  12. Zhou D., Xue J., Lai J.C. Schork N.J, White K.P., Haddad G.G. Mechanisms underlying hypoxia tolerance in *Drosophila melanogaster*: hairy as a metabolic switch *PLoS Genet*.2008; 4 (10): e1000221.
  13. Azad P., Haddad G.G. Survival in acute and severe low O<sub>2</sub> environment: use of a genetic model system. *Ann N Y acad sci*. 2009; 1177: 39 – 47.
  14. Berezovskyi V.A. Hypoxia: individual special features of reactivity. – Kyiv: Nauk. dumka, 1978. – 215 p.
  15. Berezovskyi V.A. Patent for the useful model № 67049. Method of quantitative evaluation of intensivity of hypoxia influence. – 28.07.2011, Bul. № 2.
  16. Wheeler D., Barrett T., Yaschenko E. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*. 2006; 34 (1): 173 – 180.
  17. Marygold S.J., Leyland P.C., Seal R.L., Goodman J.L., Thurmond J., Strelets V.B., Wilson R.J.; FlyBase consortium. FlyBase: improvements to the bibliography. *Nucleic Acids Res*. 2013;- Jan; 41 (Database issue).
  18. Dioum E. M., Chen R., Alexander M. S., Zhang Q., Hogg R. T., Gerard R. D., Garcia J. A. Regulation of hypoxia-inducible factor 2 alpha signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1. *Science*.2009; 324 (5932): 1289 – 1293.
  19. Frankel S., Ziafazeli T., Rogina B. dSir2 and longevity in *Drosophila*. *Exp gerontol*. 2011; 46(5): 391–396.
  20. Ji-Hong L., Yoon-Mi L., Yang-Sook C. , Junjie C., Ja-Eun K., Jong-Wan P. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Molecular cell*. 2010; 38 (6): 864–878.
  21. Rogina B., Helfand S.L. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc nat acad sci U S A*. 2004; 101 (45):15998–16003.
  22. Hoffmann J., Romey R., Fink C., Yong L., Roeder T. Overexpression of Sir2 in the adult fat body is sufficient to extend lifespan of male and female *Drosophila*. *Aging (Albany NY)*. 2013; 5 (4): 315 – 327.
  23. Chen N., Rinner O., Czernik D., Nytko K.J., Zheng D., Stiehl D.P., Zamboni N., Gstaiger M., Frei C. The oxygen sensor PHD3 limits glycolysis under hypoxia via direct binding to pyruvate kinase. *Cell Res*. 2011; 21(6): 983 – 986.
  24. Berezovskyi V.A. Natural and instrumental orotherapy. – Donetsk: Zaslavskyi, 2012 – 301 p.
  25. Chaka E., Berezovskyi V.A., Levashov M.I., Litovka I.G., Janko R.V. Influence of normobaric hypoxia on the stability of *Drosophila melanogaster* to the stress // III International conference «*Drosophila* in experimental genetics and biology» Digest of scientific papers. – Kyiv. – 2012. – P. 44 – 46.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ*  
*E-mail: lenchaka@ukr.net*

*Матеріал надійшов*  
*до редакції 02.12.2013*