

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ ИМ. И.П.ПАВЛОВА РОССИЙСКОЙ  
АКАДЕМИИ НАУК

Научный доклад по результатам проведенного научного исследования на тему:

**Влияние стрессорного воздействия гипоксии на когнитивные процессы  
у *Drosophila melanogaster***

Аспиранта *Каровецкой Дарьи Михайловны*

Направление 1.5 Биологические науки

Профиль 1.5.7 Генетика

Научный руководитель:

Главный научный сотрудник, д.б.н.

Никитина Екатерина Александровна

Санкт-Петербург

2025

# ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	3
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	6
1. Материал исследования.....	6
2. Методы исследования .....	7
2.1. Моделирование условий гипоксии .....	7
2.2. Методика оценки когнитивного поведения.....	10
2.3. Методика оценки продолжительности жизни дрозофилы после воздействия гипоксии.....	12
2.4. Анализ экспрессии генов .....	12
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ .....	16
1. Оценка продолжительности жизни <i>Drosophila melanogaster</i> в условиях гипоксии .....	16
2. Анализ когнитивного поведения .....	19
2.1. Оценка способности к обучению и формированию среднесрочной памяти.....	19
2.1.1. Линия дикого типа Canton-S.....	19
2.1.2. Мутантные линии с нарушениями КПОТ .....	20
2.1.3. Мутантная линия с нарушением ремоделирования актинового цитоскелета agnts3 .....	27
2.2. Оценка способности к обучению, формированию и сохранению долгосрочной памяти .....	29
2.2.1. Линия дикого типа Canton-S.....	29
2.2.2. Мутантные линии с нарушениями КПОТ .....	30
2.2.3. Мутантная линия с нарушением ремоделирования актинового цитоскелета agnts3 .....	34
3. Анализ экспрессии генов, вовлеченных в каскад адаптации к гипоксии .....	36
3.1. Анализ экспрессии hsp70 .....	36
3.2. Анализ экспрессии генов гликолитического каскада.....	37
3.3. Анализ экспрессии генов митохондриальной электрон-транспортной цепи.....	38
ВЫВОДЫ.....	40
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	41
АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ .....	42
НАУЧНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	43
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	47
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	49

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность темы исследования**

В современной биологии и медицине одной из ключевых задач выступает исследование механизмов возникновения и развития нейродегенеративных заболеваний (НДЗ). Согласно статистике Всемирной организации здравоохранения, общемировое количество людей с диагностированной деменцией превышает 50 миллионов, причем каждый год фиксируется около 10 миллионов новых случаев. Наибольший риск развития данной группы заболеваний наблюдается в пожилом возрасте: различные формы нейродегенераций выявляются у 3–20% лиц старше 65 лет (Ставровская, 2018). К НДЗ относят болезнь Альцгеймера (на которую приходится 60–70% всех случаев деменции), болезнь Паркинсона, хорею Гентингтона и ряд других расстройств. НДЗ в большинстве случаев имеют спорадическую природу и иницирующим фактором зачастую выступают неблагоприятные условия окружающей среды. Среди них особое место занимает гипоксия.

Под гипоксией понимается патологическое состояние, характеризующееся недостаточным снабжением кислородом органов и тканей. Данное нарушение представляет собой комплексный процесс, способный развиваться под влиянием разнообразных причин. Его источниками могут служить сбои в функционировании дыхательной и сердечно-сосудистой систем, а также нарушения на клеточно-тканевом уровне.

Воздействие гипоксии запускает ряд адаптационных и компенсаторных реакций организма, направленных на противодействие кислородному голоданию. Эти изменения затрагивают процессы клеточного метаболизма, механизмы транспортировки кислорода и систему регуляции активности генов.

Ключевым эффектом гипоксии на метаболизм клетки является переход энергообеспечения с аэробного дыхания на анаэробный гликолиз. Данная перестройка метаболизма сопровождается существенным падением синтеза АТФ, что негативно сказывается на множестве клеточных функций. Накопление метаболитов гликолиза, в частности молочной кислоты (образующейся при восстановлении пирувата в условиях дефицита кислорода вместо его вовлечения в цикл Кребса), способно усиливать гипоксическое повреждение за счет развития ацидоза и нарушения кислотно-щелочного баланса в тканях.

Высокая чувствительность мозга млекопитающих к дефициту кислорода обуславливает его особую уязвимость к гипоксическим повреждениям. Существуют данные, свидетельствующие о вовлеченности гипоксии в патогенез НДЗ. И вместе с тем, некоторые контролируемые гипоксические воздействия могут оказывать положительный эффект на показатели здоровья (в том числе у пожилых людей) (Timon et al., 2023).

Таким образом, гипоксия является многогранным феноменом, способным оказывать значительное влияние на физиологические и патологические процессы в организме. Современные исследования позволяют глубже понять молекулярные механизмы гипоксического повреждения клеток и разработать стратегии для снижения его негативных последствий. Растущее понимание роли гипоксии в развитии НДЗ открывает перспективы для создания новых диагностических и терапевтических подходов, направленных на улучшение результатов лечения пациентов с неврологическими расстройствами.

Животные модели, особенно с коротким жизненным циклом, позволяют изучать механизмы функциональных нарушений, лежащих в основе НДЗ человека, и помогают в разработке терапевтических подходов. К таким модельным объектам относится дрозофила.

## Цели и задачи исследования

**Цель** настоящей работы – изучение влияния гипоксии на обучение и память у дрозофилы.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценить продолжительность жизни в условиях гипоксии при изменении компонентов генных сетей регуляции функциональных процессов мозга у мутантов дрозофилы.
2. Проанализировать способность к обучению и формированию среднесрочной памяти у самцов дрозофилы линии дикого типа (*CS*), а также мутантных линий с нарушениями КПОТ (*cd*, *cn*, *v*) и ремоделирования актинового цитоскелета (*agn<sup>ts3</sup>*).
3. Проанализировать способность к обучению и формированию долгосрочной памяти у самцов дрозофилы линии дикого типа (*CS*), а также мутантных линий с нарушениями КПОТ (*cd*, *cn*, *v*) и ремоделирования актинового цитоскелета (*agn<sup>ts3</sup>*).
4. Выявить изменения уровня экспрессии генов, вовлеченных в каскад адаптации к гипоксии у дрозофилы при нарушении кинуренинового пути обмена триптофана и ремоделирования актинового цитоскелета.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 1. Материал исследования

В работе использовали следующие линии *Drosophila melanogaster* из биоколлекции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем»):

1. Линия дикого типа *Canton-S (CS)*.

2. Мутантные линии с нарушениями КПОТ

- линия *cardinal (cd)*, несущая мутацию *cd* (3 – 75,7; ярко-красный цвет глаз), нарушающую синтез фермента феноксазиносинтетазы и приводящую к накоплению 3-гидроксикинурина, вызывающего оксидативный стресс и нейродегенерацию;

- линия *vermilion (v)*, несущая мутацию *v<sup>1</sup>* (1 - 33,0; ярко-красный цвет глаз), нарушающую синтез фермента триптофаноксигеназы и приводящую к отсутствию метаболитов КПОТ;

- линия *cinnabar (cn)*, несущая мутацию *cn* (2 – 57,5; ярко-красный цвет глаз), нарушающую синтез фермента кинуренин-3-гидроксилазы, и характеризующаяся накоплением кинуреновой кислоты.

3. Мутантная линия с нарушением ремоделирования актинового цитоскелета *agnostic<sup>ts3</sup> (agn<sup>ts3</sup>)*, несет температурочувствительную (*ts*) мутацию по гену *limk1* (1 – 38,9), который кодирует ключевой фермент ремоделирования актина LIMK1.

Мух содержали в стаканчиках объёмом 160 мл на стандартно изюмно-дрожжевой среде. Условия содержания оставались постоянными на всех этапах развития: световой цикл 12:12; влажность воздуха 60%; температура  $+25 \pm 0,5$  °C.

## 2. Методы исследования

### 2.1. Моделирование условий гипоксии

Гипобарическую гипоксию моделировали в испытательной установке, состоящей из вакуумной камеры, вакуумного насоса, вакуумметра и сопутствующих компонентов.

Принципиальная схема экспериментальной установки представлена на рисунке 1. Установка состоит из вакуумной камеры ERSTEVAK CUBE-30L-VER, вакуумного насоса ERSTEVAK RS 10 B 1 ph, вакуумметра ФТ ВП2-Уф, двух шаровых кранов и системы трубопроводов. Кран 1 предназначен для заполнения вакуумной камеры воздухом после окончания эксперимента (выравнивания давления до атмосферного).

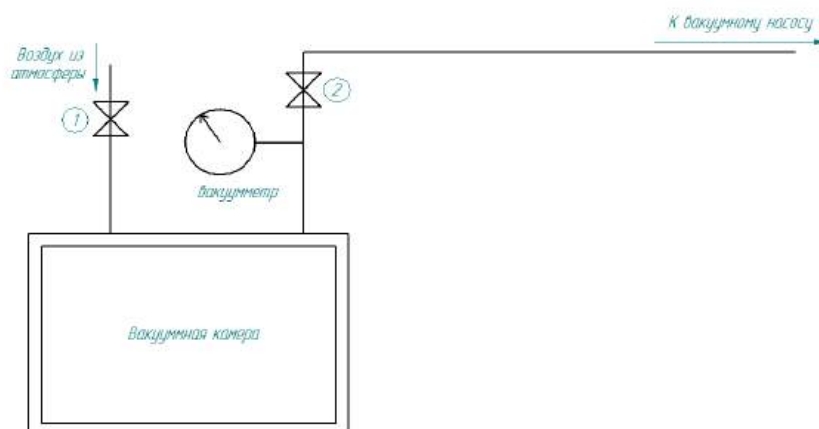


Рис. 1 Принципиальная схема экспериментальной установки

Внешний вид испытательной установки представлен на рисунке 2. Оборудование установки смонтировано на рабочем верстаке.



А



Б

Рис. 2. Испытательная установка. А – общий вид; Б – вакуумная камера крупным планом

Наименования и характеристики используемого в составе испытательной установки оборудования приведены в таблице 1.

Таблица 1 – используемое в составе экспериментальной установки оборудование.

Тип оборудования	Наименование используемого оборудования	Характеристики используемого оборудования	Примечание
Вакуумная камера	ERSTEVAK CUBE-30L-VER	Предельный вакуум: 0,5 мБар; Объем: 30 л; Внутренний размер ДхВ 305х305х295 мм; Толщина стенки: 5 мм.	Металлическая крышка выполнена со смотровым окном.
Вакуумный насос	ERSTEVAK RS 10 B 1 ph	Быстрота откачки: 10 куб.м/час; Предельное остаточное давление – 200 Па (2 мбар) Мощность двигателя – 0,37 кВт, 1ф.	
Вакуумметр	Вакуумметр ПО Физтех ВП2-Уф	Диапазон показаний: -100...0 кПа кт.2,5	Паспорт номер 230708146B79



Работа с установкой осуществляется в следующем порядке:

1. Объект испытания помещается в вакуумную камеру.
2. Крышка вакуумной камеры закрывается. Выполняется затяжка гаек-фиксаторов.
3. Выполняется включение электросистемы стенда.
4. Выполняется краткосрочное включение вакуумного насоса путём нажатия и удержания кнопки «пуск» (см. рис. 2). Достижение необходимого уровня вакуума фиксируется визуально путём контроля показаний вакуумметра. По достижению необходимого уровня вакуума выполняется выключение вакуумного насоса и закрытие крана № 2 (см. рис. 1). Конструкция вакуумной камеры позволяет длительно сохранять достигнутый уровень вакуума.

5. После завершения эксперимента выполняется открытие крана 1 для выравнивания давления внутри камеры до атмосферного.

Условия гипобарической ступенчатой гипоксии задавали по следующему протоколу:

- 5 минут при 10% O<sub>2</sub> (360 мм.рт.ст.);
- 5 минут при 5% O<sub>2</sub> (180 мм.рт.ст.);
- 10 минут при 4% O<sub>2</sub> (140 мм.рт.ст.);
- 10 минут при 3% O<sub>2</sub> (120 мм.рт.ст.).

Экспериментальные условия подбирали опытным путем, учитывая физиологическое состояние дрозофилы (остановка движения).

Анализ способности к обучению и формированию среднесрочной и долгосрочной памяти проводили в нескольких группах:

- 1) интактный контроль;
- 2) тренировка в условиях гипоксии;
- 3) тренировка до гипоксии;

4) гипоксия до тренировки (гипоксическое воздействие проводили за 1 час до тренировки).

## 2.2. Методика оценки когнитивного поведения

Анализ когнитивного поведения проводили в парадигме условно-рефлекторного подавления ухаживания (УРПУ). Преимущество использования УРПУ для оценки способности к обучению и сформированности памяти заключается в том, что она представляет собой естественную форму обучения.

Для всех поведенческих экспериментов использовали самцов, не имеющих опыта полового поведения. Их отбирали в течение 5 часов после вылупления и помещали в отдельные стаканчики с изюмно-дрожжевой средой, где они находились до возраста пяти суток.

Для анализа поведения пятисуточных самцов тестируемой линии помещали с оплодотворенной за сутки до эксперимента самкой линии *CS* в экспериментальную камеру. Видеозапись этограммы вели в течение 300 секунд. Далее регистрировали время отдельных поведенческих элементов, включающих в себя:

1. поведенческие паттерны, связанные с ухаживанием (ориентация, преследование, вибрация, лизание и попытка копуляции) (рис. 3);
2. поведенческие паттерны, не связанные с ухаживанием (активность, покой, прининг).

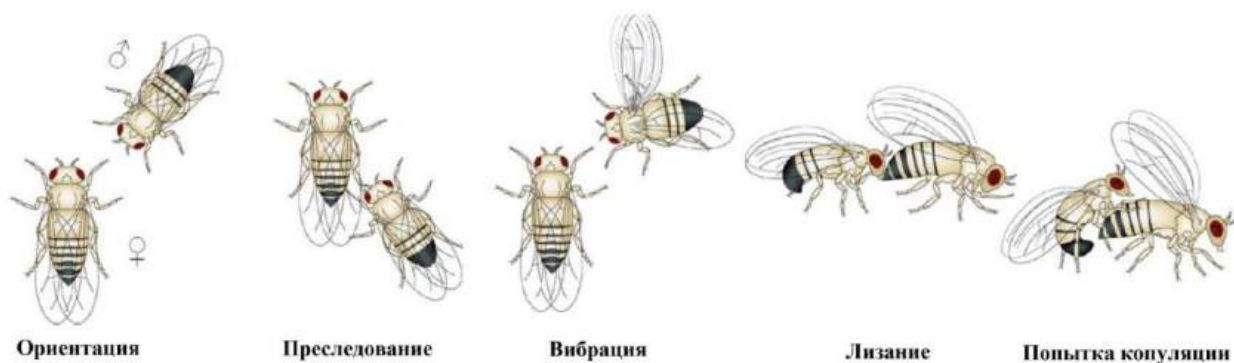


Рис. 3. Поведенческие паттерны ухаживания, наблюдаемые у дрозофилы.

Для каждого самца вычисляли несколько показателей: индекс ухаживания (ИУ) и индекс обучения (ИО). ИУ – это время ухаживания самца за самкой, выраженное в процентах. ИО вычисляли по формуле:

$$\text{ИО} = [(\text{ИУ}_\text{н} - \text{ИУ}_\text{т}) / \text{ИУ}_\text{н}] \times 100\% = (1 - \text{ИУ}_\text{т} / \text{ИУ}_\text{н}) \times 100\%,$$

где ИУ<sub>н</sub> и ИУ<sub>т</sub> – средние индексы ухаживания для независимых выборок самцов, не имеющих опыта полового поведения, и самцов, прошедших тренировку (Камышев и др., 1999).

Статистическую оценку достоверности осуществляли с помощью теста двусторонней рандомизации ( $p < 0,05$ ).

Методика УРПУ была использована для оценки способности к обучению, а также формированию среднесрочной и долгосрочной памяти.

Для формирования среднесрочной памяти (ССП) самцов тестируемой линии помещали в экспериментальную камеру с оплодотворенной самкой CS на 30 минут. Запись этограммы проводили сразу после окончания тренировки (точка 0 минут) для проверки способности к обучению и через 3 часа (точка 180 минут) для проверки сформированности среднесрочной памяти. Кроме того, производили запись этограммы самцов, не имеющих опыта полового поведения (наивных) в качестве контроля. В каждой группе тестировали не менее 20 пар мух.

Тренировку для формирования долгосрочной памяти (ДСП) проводили иным путём. Самцов помещали в стаканчик с питательной средой вместе с оплодотворенной самкой на 5 часов. При этом свободное для перемещений пространство составляло около 3 см<sup>3</sup>. Обучение тестировали сразу после окончания тренировки, сформированность долгосрочной памяти проверяли через 2 суток, а сохранение – через 8 суток. Для каждого теста использовали новых оплодотворенных самок линии CS. Для каждой точки записывали этограммы соответствующих групп наивных самцов. В каждой группе тестировали не менее 20 пар мух.

### 2.3. Методика оценки продолжительности жизни дрозифилы после воздействия гипоксии

Для оценки продолжительности жизни дрозифилы после воздействия гипоксии было отобрано 120 самцов каждой линии (*CS*, *cn*, *cd*, *v*, *agn<sup>ts3</sup>*) в течение 5 часов после вылупления. Самцы были помещены вместе самками соответствующих линий в стаканчики с питательной средой и содержались в стандартных условиях (см. «Материал исследования»). Перемещение на стаканчики с новой средой и подсчет живых особей производили каждые трое суток. Гипоксическое воздействие в условиях гипобарии с постепенным снижением процентного содержания кислорода от 10% до 3% производили на 5 сутки.

### 2.4. Анализ экспрессии генов

Для анализа экспрессии генов производили выделение РНК из тел дрозифил, проводили реакцию обратной транскрипции и затем определяли количественные различия содержания ДНК в пробе методом ПЦР в режиме реального времени. Используемое оборудование и реактивы приведены в таблице 2.

Табл. 2. Используемое оборудование и реактивы

Оборудование и реактивы	Производитель	Страна-изготовитель	Применение
ExtractRNA	Евроген	Россия	Выделение РНК
HiPure RNA Mini Columns	Magen	Китай	Выделение РНК
Buffer RW1	Magen	Китай	Выделение РНК
Buffer RW2	Magen	Китай	Выделение РНК
Вода, свободная от РНКаз	Magen	Китай	Выделение РНК
Спектрофотометр Nano-500	ALLSHENG	Китай	Выделение РНК

ДНКаза	Евроген	Россия	Очистка проб РНК от ДНК
Деионизированная свободная от нуклеаз вода	Евроген	Россия	Очистка проб РНК от ДНК, реакция обратной транскрипции, ПЦР в режиме реального времени
10xDNase Reaction Buffer	Евроген	Россия	Очистка проб РНК от ДНК
EDTA	Евроген	Россия	Реакция обратной транскрипции
Случайные праймеры	Евроген	Россия	Реакция обратной транскрипции
5x first buffer	Евроген	Россия	Реакция обратной транскрипции
dNTP 10 mM	Евроген	Россия	Реакция обратной транскрипции
DTT	Евроген	Россия	Реакция обратной транскрипции
RiboCare RNase Inhibitor (ингибитор РНКаз)	Евроген	Россия	Реакция обратной транскрипции
MMLV revertase (обратная транскриптаза)	Евроген	Россия	Реакция обратной транскрипции
qPCR mix	Евроген	Россия	ПЦР в режиме реального времени
Микроцентрифуга FV-2400	Biosan Sia	Латвия	Очистка проб РНК от ДНК, реакция обратной транскрипции, ПЦР в режиме реального времени
Центрифуга MPW-65R	MPW Med. instruments	Польша	Выделение РНК

Водяная баня TB1	Biometra	Германия	Реакция обратной транскрипции
Амплификатор Veriti <sup>tm</sup> 96-Well Thermal Cycler	Applied Biosystems	США	Реакция обратной транскрипции
StepOnePlus Real-time PCR systems	Applied Biosystems	США	ПЦР в режиме реального времени

### **Метод выделения РНК.**

РНК из тел дрозофил (10-12 тел) выделяли при помощи реагента ExtractRNA. Тела мух помещали в стерильные пробирки типа «эппендорф» объемом 1,5 мл, гомогенизировали в 400 мкл ExtractRNA. Затем осаждали на центрифуге 2 минуты (12.000 xg, 22°C) и удаляли твердые остатки. 300 мкл получившегося гомогената переносили на новые стерильные пробирки того же объема и добавляли 300 мкл этанола 96%. После смесь переносили на колонки и центрифугировали (1 минута, 12.000 xg, 22°C). Для удаления артефактов колонку последовательно промывали путем добавления 700 мкл Buffer RW1 и двукратного добавления 500 мкл Buffer RW2. После каждого добавления буферного раствора колонку центрифугировали (1 минута, 12.000 xg, 22°C). Смыв РНК с колонок производили путем промывки фильтра в 30 мкл свободной от РНКаз воды. Концентрацию общей РНК в каждом образце измеряли на спектрофотометре Nano-500. С учетом этих данных производили выравнивание концентрации, после чего объем каждой пробы составлял 8 мкл.

Для очистки проб от ДНК использовали ДНКазу. В каждый образец добавляли 0,1 мкл ДНКазы, разведенной в 0,9 мкл деионизированной свободной от нуклеаз воды и 1 мкл 10xDNase Reaction Buffer. После чего пробу нагревали на водяной бане TB1 30 минут при 37°C. Затем ДНКазу инактивировали добавлением 0,5 мкл EDTA в каждую пробу.

Для проверки целостности РНК и отсутствия ДНК в пробах проводили горизонтальный электрофорез в 1% агарозном геле.

### Метод обратной транскрипции.

К каждой пробе добавляли 1 мкл случайных праймеров и нагревали на водяной бане 2 минуты при 70°C. Затем в образцы добавляли 4 мкл 5x first buffer, 2 мкл dNTP 10 mM, 2 мкл DTT и 0,5 мкл ингибитора РНКаз. В опытные пробы далее добавляли 1 мкл обратной транскриптазы, а в контрольные – 1 мкл воды. Далее реакцию обратной транскрипции проводили в амплификаторе при температурных условиях 40°C – 70°C в течение 70 минут.

### Метод ПЦР в режиме реального времени.

Праймеры для ПЦР разводили по следующей схеме: 5 мкл прямого праймера, 5 мкл обратного праймера и 90 мкл воды. Пробы с кДНК и праймеры перед постановкой реакции тщательно перемешивали и осаждали на микроцентрифуге. К 4 мкл кДНК добавляли 8 мкл смеси для ПЦР qPCR mix, 24 мкл воды и 4 мкл праймера. Затем получившуюся смесь разделяли на 4 лунки в планшете для ПЦР.

ПЦР в режиме реального времени проводили в установке StepOnePlus Real-time PCR systems при условиях, указанных на рисунке 4.



Рис. 4. Условия протекания ПЦР в режиме реального времени

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

### 1. Оценка продолжительности жизни *Drosophila melanogaster* в условиях гипоксии

Гипоксия является одним из факторов, влияющих на продолжительность жизни. Несмотря на то, что у дрозофилы эволюционно выработана некоторая устойчивость к гипоксическому воздействию, исследования показывают, что у мух, подвергшихся воздействию гипоксии на личиночной стадии, во взрослом возрасте снижается устойчивость к голоданию и сокращается продолжительность жизни (Polan, 2020). В то же время выращивание от стадии яйца до взрослой особи в условиях умеренного снижения кислорода приводит к повышению продолжительности жизни дрозофилы (Rascon, 2010).

Исследование динамики численности дрозофил при гипоксическом воздействии в условиях гипобарии со ступенчатым снижением процентного содержания кислорода от умеренной до тяжелой гипоксии, проведенное на взрослых 5-суточных самцах *Drosophila melanogaster*, показало статически достоверное снижение количества особей, подвергшихся гипоксическому воздействию, на 40 сутки по сравнению с интактным контролем. На 20 сутки статистических различий обнаружено не было (рис. 5).



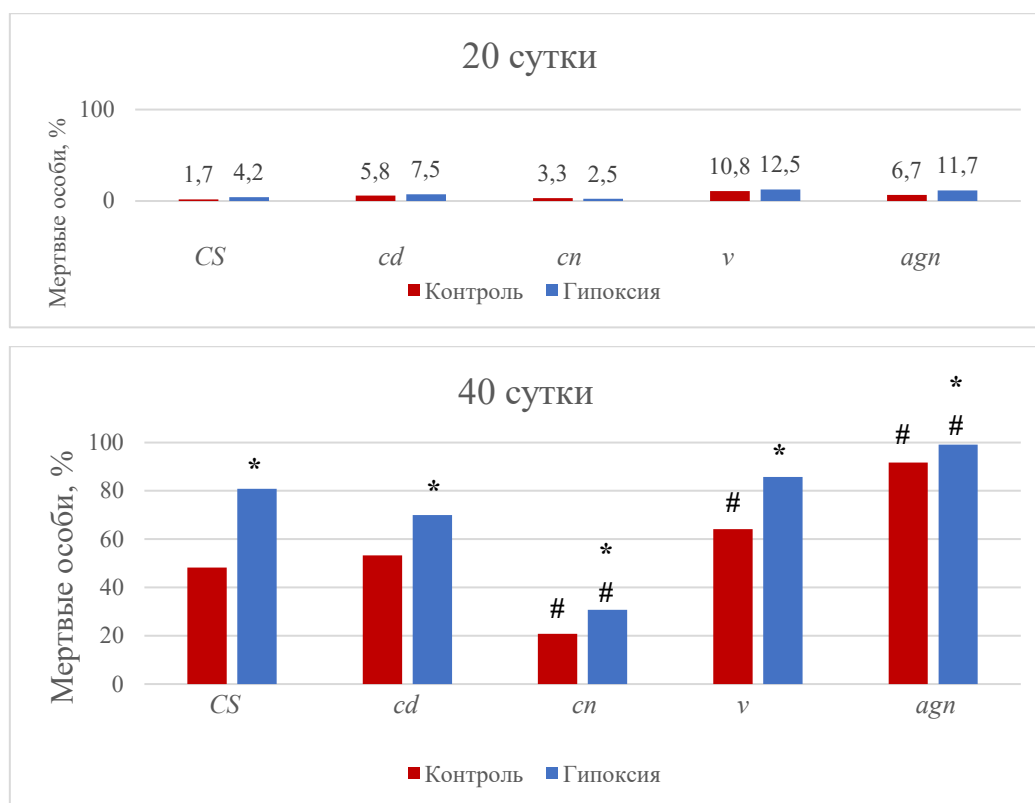


Рис.5. Гибель *Drosophila melanogaster* мутантных линий и линии дикого типа в условиях гипоксии. \* - достоверно отличается от контроля ( $p < 0,05$ , критерий Фишера), # - достоверно отличается от линии дикого типа CS.

Переломный момент между показателями выживаемости наступал примерно на 28-30 сутки после воздействия, что соотносится с данными, полученными Rascon в исследовании продолжительности жизни дрозофилы после выращивания до стадии взрослой особи в условиях различных гипоксических воздействий (рис. 6).

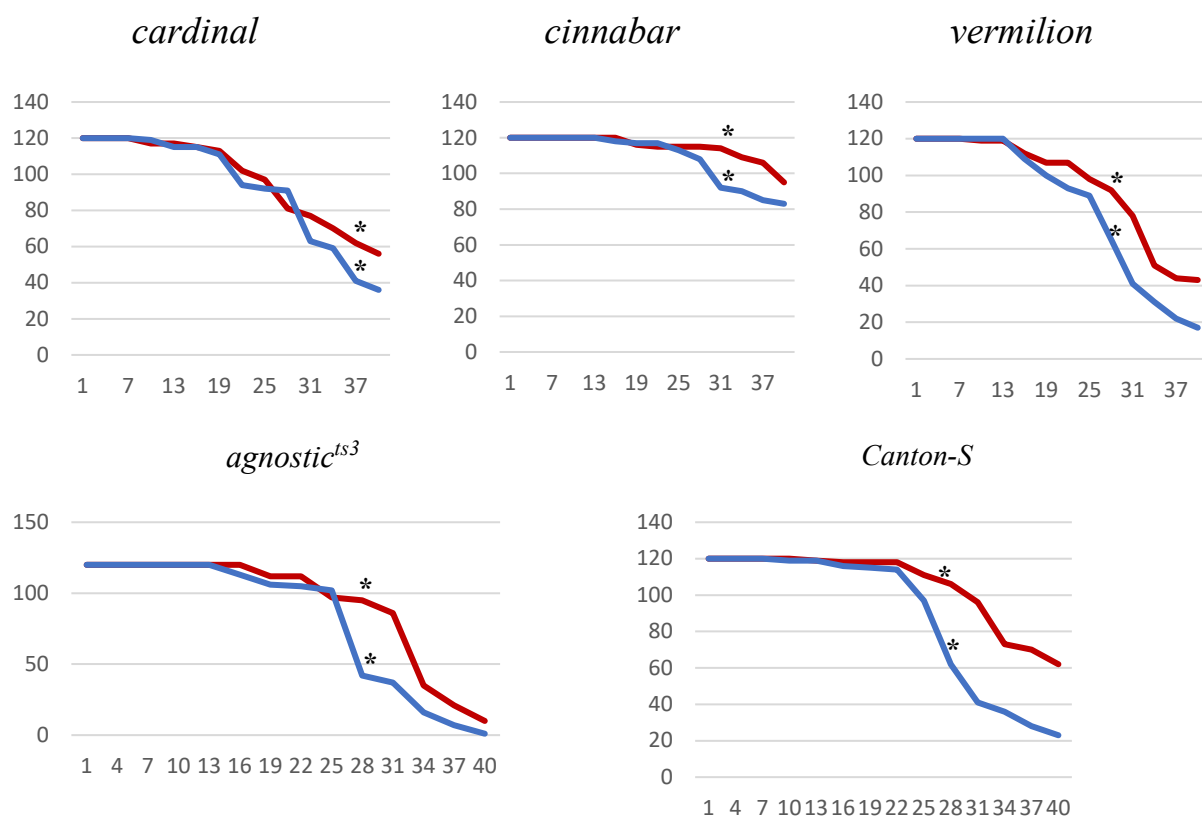


Рис. 6. Кривая гибели дрозофил мутантных линий и линии дикого типа. \* отмечены значимые различия в выживаемости ( $p < 0,05$ ). Красным обозначена кривая выживаемости группы контроля, синим — группы, подвергавшейся гипоксическому воздействию.

При сравнении линии дикого типа и мутантов были выявлены некоторые межлинейные различия. Мутанты *cn* демонстрируют лучшие показатели продолжительности жизни по сравнению с линией дикого типа как в контрольной группе, так и в условиях гипоксического воздействия. У *v*, другого мутанта КПОТ, наоборот, наблюдается сниженная по сравнению с *CS* выживаемость. В то же время, в условиях гипоксического воздействия этот показатель становится неотличим от линии дикого типа. Также падение продолжительности жизни наблюдается у мутантной линии *agn<sup>ts3</sup>*. Для нее характерна меньшая продолжительность жизни как в контрольной группе, так и в группе, подвергающейся гипоксическому воздействию.

## 2. Анализ когнитивного поведения

### 2.1. Оценка способности к обучению и формированию среднесрочной памяти

#### 2.1.1. Линия дикого типа *Canton-S*

Для мух линии *CS* показана достоверная способность к обучению как с гипоксическим воздействием, так и без него. Для группы, проходившей тренировку до гипоксического воздействия, характерно значительное падение индекса обучения (ИО) сразу после тренировки. Однако спустя 3 часа ИО достоверно повышается и становится неотличим от контроля (рис. 7).

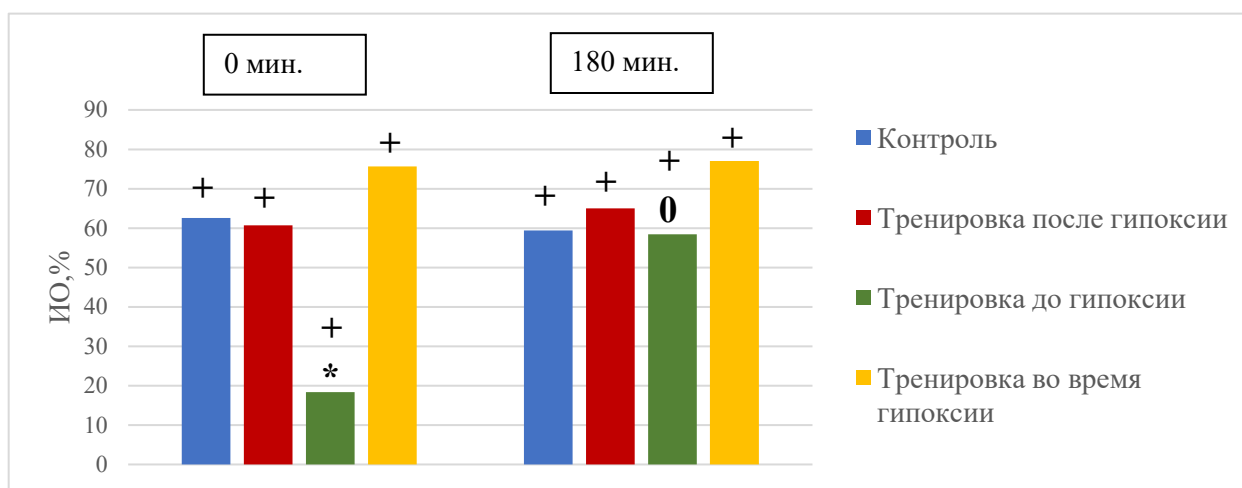


Рис. 7. Индексы обучения линии дикого типа *Canton S*. \* - ИО после воздействия достоверно отличается от интактного контроля ( $p < 0,05$ ); + - достоверно отличается от 0 (эффект обучения достоверен) ( $p < 0,05$ ); 0 - достоверно отличается от 0 мин ( $p < 0,05$ ).

По-видимому, воздействие гипоксии сразу после тренировки приводит к нарушению процессов формирования краткосрочной памяти. Ранние стадии формирования памяти длятся от нескольких секунд до нескольких часов и зависят, главным образом, от ковалентных модификаций уже существующих белков. В формировании краткосрочной памяти важную роль играют NMDA и AMPAR -рецепторы, локализующиеся по всей нервной системе, но достигающие наибольшей плотности у млекопитающих в гиппокампе, миндалине, полосатом теле и коре больших полушарий. Активация рецептора происходит под влиянием глутамата в присутствии глицина и при отсутствии

на рецепторе ионов магния. Высвобождение глутамата во время ранней потенциации приводит к активации канала и открывает возможность проникновения  $\text{Ca}^{2+}$  внутрь постсинаптического нейрона. В нормальных условиях  $\text{Ca}^{2+}$  активирует  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -зависимую протеинкиназу II (CaMKII), которая активирует AMPAR -рецептор за счет фосфорилирования его субъединицы GluA1. AMPAR диффундируют в синапсы из других областей мембраны, облегчая дальнейшую передачу импульса и способствуя быстрой нейронной коммуникации. Изменения в синаптическом трафике AMPAR являются одним из основных механизмов синаптической пластичности (Kamalova, 2021).

Гипоксическое воздействие может регулировать функцию NMDA-рецептора, привлекая новые белки, в том числе киназу семейства Src, протеинкиназу C, CaMKII и другие киназы, в постсинаптическую область. Показано, что после воздействия гипоксии наблюдается чрезмерная активация NMDA-рецепторов, приводящая к избыточному притоку  $\text{Ca}^{2+}$  и повреждению клеток (Xiaotong Zhang et al., 2020). Возможно, изменения функционирования данных рецепторов лежит в основе нарушения краткосрочной памяти в условиях недостаточного уровня оксигенации.

Также немаловажно учитывать, что воздействие гипоксии после тренировки приводит к тому, что в данном варианте мы тестируем мух не сразу после тренировки, а через 30 минут после нее. Как показано в недавних исследованиях лаборатории нейрогенетики, именно на этом временном интервале наблюдается снижение ИО, что может быть обусловлено процессами забывания (Zhuravlev et al., 2024).

### **2.1.2. Мутантные линии с нарушениями КПОТ**

#### **Мутантная линия *cardinal (cd)***

Динамика УРПУ линии *cd*, характеризующейся накоплением 3-гидроксикинуруенина (ЗНОК), отличается от дикого типа. Для групп с

предъявлением гипоксического воздействия до и после обучения выявляется общая тенденция: наблюдается недостоверность эффекта обучения в точке 180 минут (рис. 8).

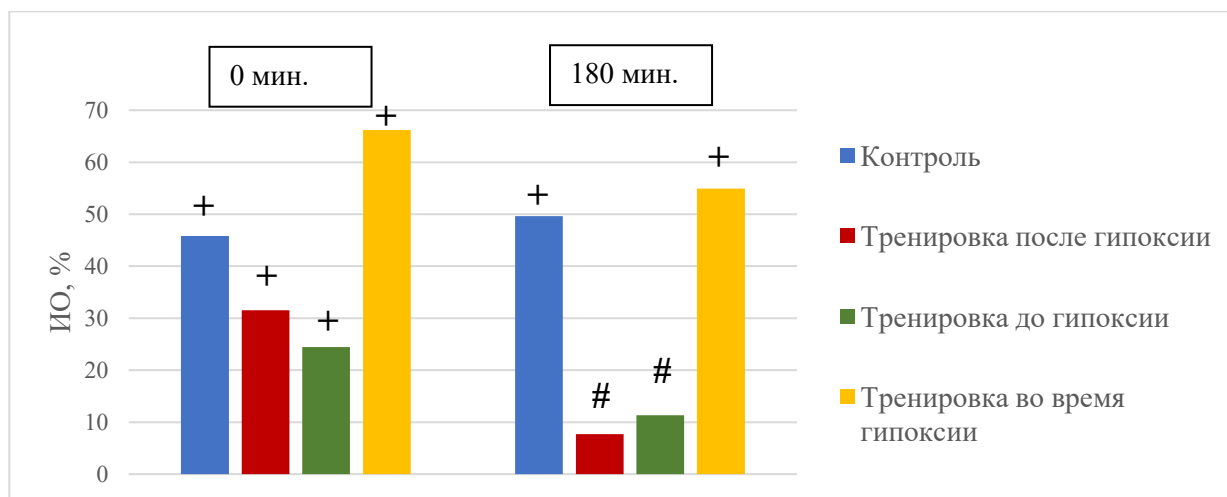


Рис. 8. Индексы обучения линии *cardinal*. + - достоверно отличается от 0 (эффект обучения достоверен) ( $p < 0,05$ ); # - ИО достоверно ниже, чем у линии дикого типа *CS* в аналогичных условиях ( $p < 0,05$ ).

При сравнении линии дикого типа и мутанта видно, что предъявление гипоксии после тренировки в обоих случаях приводит к значительному уменьшению ИО. По прошествии 3 часов у линии *CS* ИО возвращается к высокому значению, а у мутантной линии *cd* продолжает снижаться. Кроме того, для *cd* также характерно падение ИО в случае предъявления гипоксии до тренировки (рис. 9).

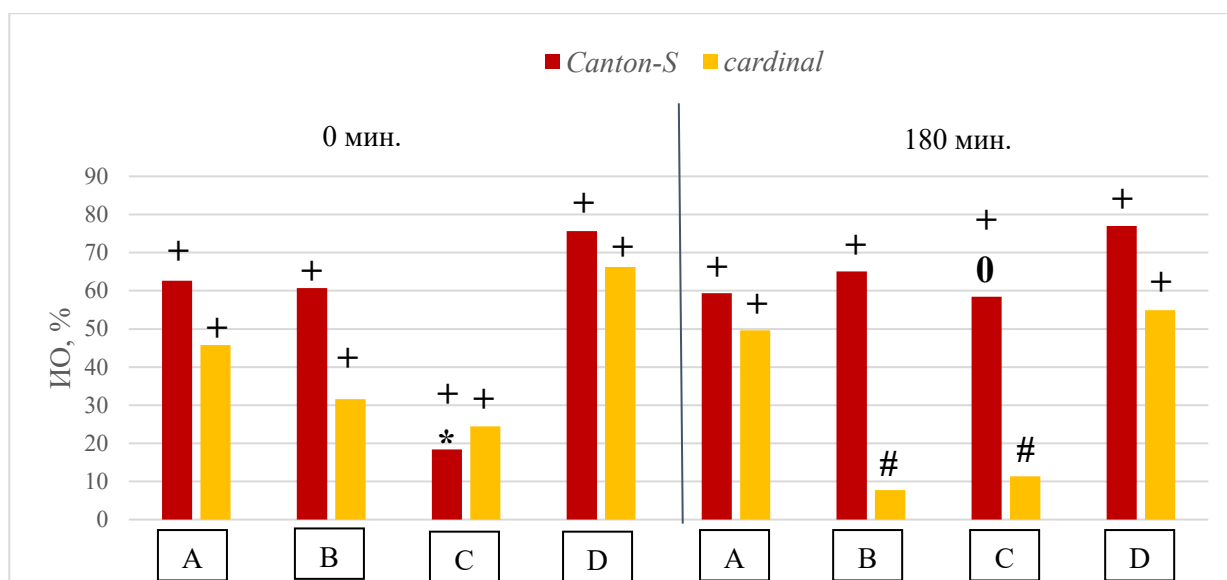


Рис. 9. Сравнение индексов обучения *Canton-S* и *cardinal*. \* - ИО после воздействия достоверно отличается от интактного контроля ( $p < 0,05$ ); + - достоверно отличается от 0 (эффект обучения достоверен) ( $p < 0,05$ ); 0 - достоверно отличается от 0 мин ( $p < 0,05$ ); # - ИО достоверно ниже, чем у линии дикого типа *CS* в аналогичных условиях ( $p < 0,05$ ). А - Интактный контроль; В – Тренировка после гипоксии; С – Тренировка до гипоксии; D – Тренировка во время гипоксии.

У мутантов линии *cd* происходит нарушение на уровне фермента феноксазиносинтетазы, что приводит к накоплению в мозговой ткани 3-гидроксикинуруенина (3-НОК), который, в свою очередь вызывает оксидативный стресс и нейродегенерацию. 3НОК, накапливающийся в тканях мух линии *cd*, способствует образованию свободных радикалов и приводит к апоптозу и нейродегенерации (Eastman et al, 1989). Молекула 3НОК обладает ароматической системой и легко принимает и отдает электроны. Этому способствует наличие у ароматического кольца полярных заместителей, таких как гидроксигруппа. Аутоокисление данных метаболитов ведет к гиперпродукции АФК, повреждающих липиды клеточных мембран, белки и ДНК (Iwahashi et al, 1988). Так, при аутоокислении 3НОК в концентрации ~10 мкМ образуется пероксид водорода, вызывая апоптоз нервных клеток в культуре (Valko et al, 2007). Это может лежать в основе чувствительности данной линии к гипоксическому воздействию.

Кроме того, возможный механизм нарушения формирования среднесрочной памяти в условиях накопления ЗНОК может быть связан с изменениями в углеводном обмене. Гипоксия сопровождается изменениями в энергетическом балансе, выраженными в снижении эффективности аэробного и увеличении роли анаэробного метаболизма, что приводит к энергодефициту в клетках. ЗНОК под действием кинуренинаминотрансферазы (КАТ) трансаминируется в ксантуреновую кислоту (Шатова и др., 2023), которая, в свою очередь, напрямую не участвует в энергетическом обмене напрямую, но влияет на эффективность углеводного обмена. Она образует комплекс с инсулином и понижает его эффективность. Это приводит к снижению эффективности транспорта глюкозы внутрь клеток и ухудшает энергетический обмен, и без того сниженный вследствие недостаточного уровня кислорода.

### **Мутантная линия *cinnabar (cn)***

Неожиданные данные были получены при исследовании влияния гипоксии на когнитивные процессы у мутантной линии *cn*. Вследствие нарушения синтеза фермента кинуренин-3-гидроксилазы у мух данной линии накапливается кинуреновая кислота (KYNA), которая является неспецифическим антагонистом ионотропных рецепторов глутамата и ингибитором эксайтотоксических процессов (Журавлев и др., 2020). Кинуреновая кислота является нейропротектором и у *cn* с накоплением KYNA связывают позитивные изменения формирования памяти (Журавлев и др., 2020). Воздействие гипоксии не показало статистически значимого влияния на способность к обучению. Тем не менее, во всех группах, подвергшихся гипоксическому воздействию, было отмечено резкое и значительное снижение индекса обучения через 3 часа после тренировки, что указывает на нарушение процессов формирования среднесрочной памяти (рис. 10)

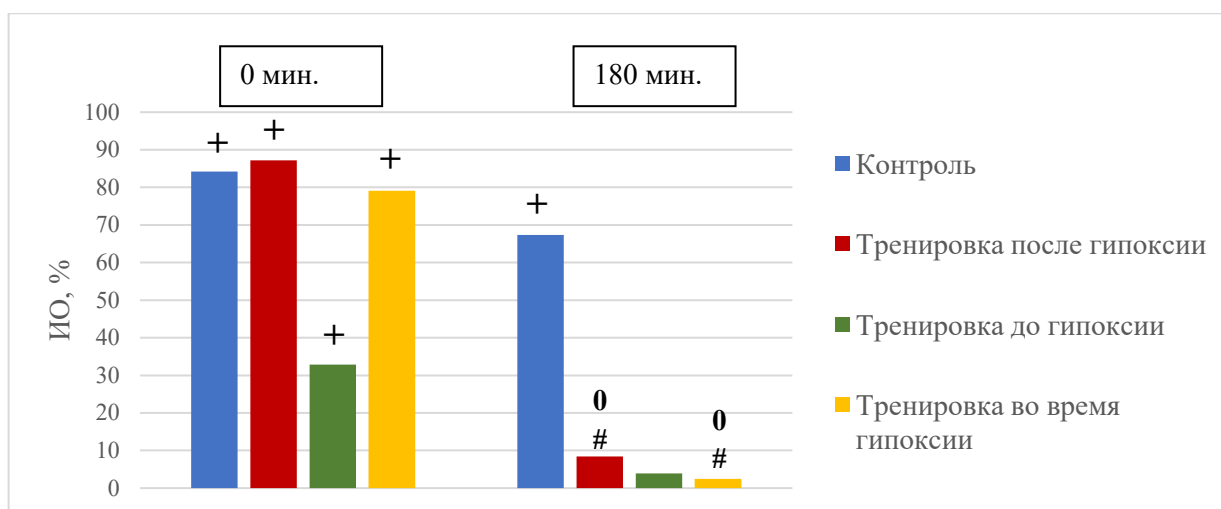


Рис. 10. Индексы обучения линии *cinnabar*. + - достоверно отличается от 0 (эффект обучения достоверен) ( $p < 0,05$ ); 0 - достоверно отличается от 0 мин ( $p < 0,05$ ); # - ИО достоверно ниже, чем у линии дикого типа *CS* в аналогичных условиях ( $p < 0,05$ ).

При сравнении линии дикого типа *CS* и мутантной линии *sp* наблюдается следующая тенденция: гипоксическое воздействие после тренировки вызывало значительное ухудшение способности к обучению у линии дикого типа, но не у мутанта *sp*. Это может быть связано с нейропротективными свойствами KYNA. Неропротекторные свойства KYNA вызваны тем, что она выступает антагонистом NMDA-рецепторов и ее повышение может сбалансировать токсичное действие хинолиновой кислоты, которая также является метаболитом КПОТ.

Тем не менее, у мутантной линии *sp* также отмечается нарушение формирования среднесрочной памяти (рис. 11)



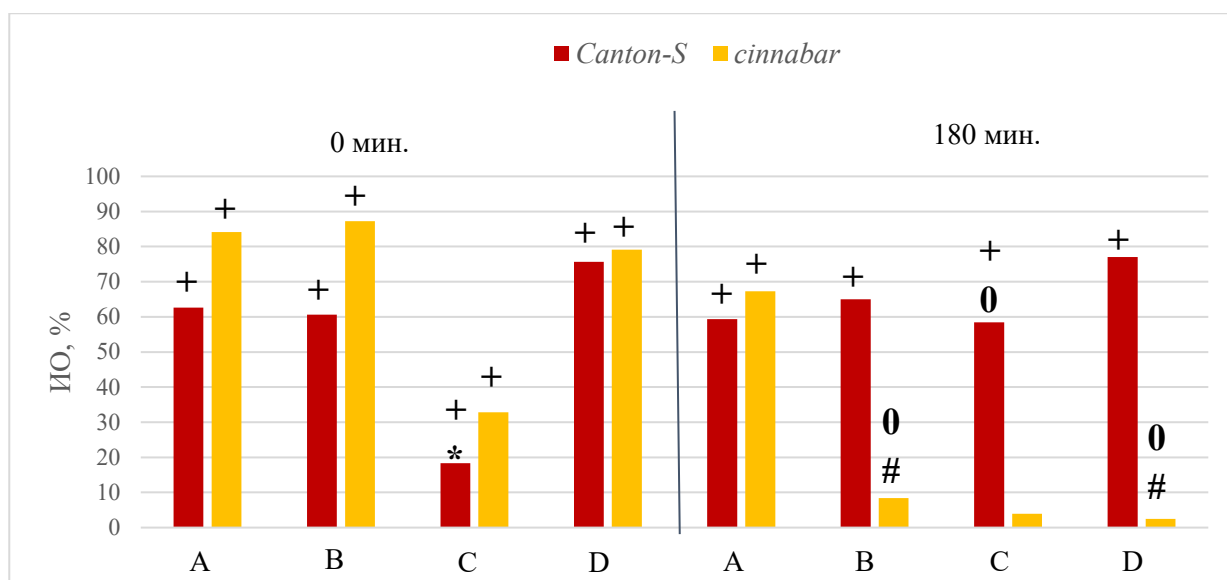


Рис. 11. Сравнение индексов обучения *Canton S* и *cinnabar*. \* - ИО после воздействия достоверно отличается от интактного контроля ( $p < 0,05$ ); + - достоверно отличается от 0 (эффект обучения достоверен) ( $p < 0,05$ ); 0 - достоверно отличается от 0 мин ( $p < 0,05$ ); # - ИО достоверно ниже, чем у линии дикого типа *CS* в аналогичных условиях ( $p < 0,05$ ). А - Интактный контроль; В – Тренировка после гипоксии; С – Тренировка до гипоксии; D – Тренировка во время гипоксии.

Несмотря на то, что KYNA в большинстве случаев проявляет защитные функции, ее избыточное накопление может приводить к негативным последствиям, некоторыми из которых являются угнетение дофаминергической нейротрансмиссии и глутаматергическая гипофункция. Механизм негативного воздействия основан на антагонистическом действии KYNA не только к NMDA-рецепторам, но и к ACh-рецепторам. Избыток KYNA может нарушать работу холинергической системы и способствовать нарушению когнитивных функций (Olney et al, 1991; Hilmas et al, 2001; Wu et al, 2006; Шилов и др, 2013).

### Мутантная линия *vermilion (v)*

Последний рассмотренный в данном исследовании мутант характеризуется полным отсутствием метаболитов КПОТ. Для мух линии *v* определяющей чертой является нарушение синтеза фермента

триптофаноксигеназы, который является ключевым начальным ферментом цепи катаболической деградации триптофана. Он катализирует окисление L-триптофана до N-формил-L-кинуруенина и играет центральную роль в физиологической регуляции потока триптофана в организме человека.

При одновременном воздействии гипоксии и тренировки, а также если гипоксия применяется до тренировки, это приводит у мух линии *v* к ухудшению процессов формирования памяти (рис. 12)

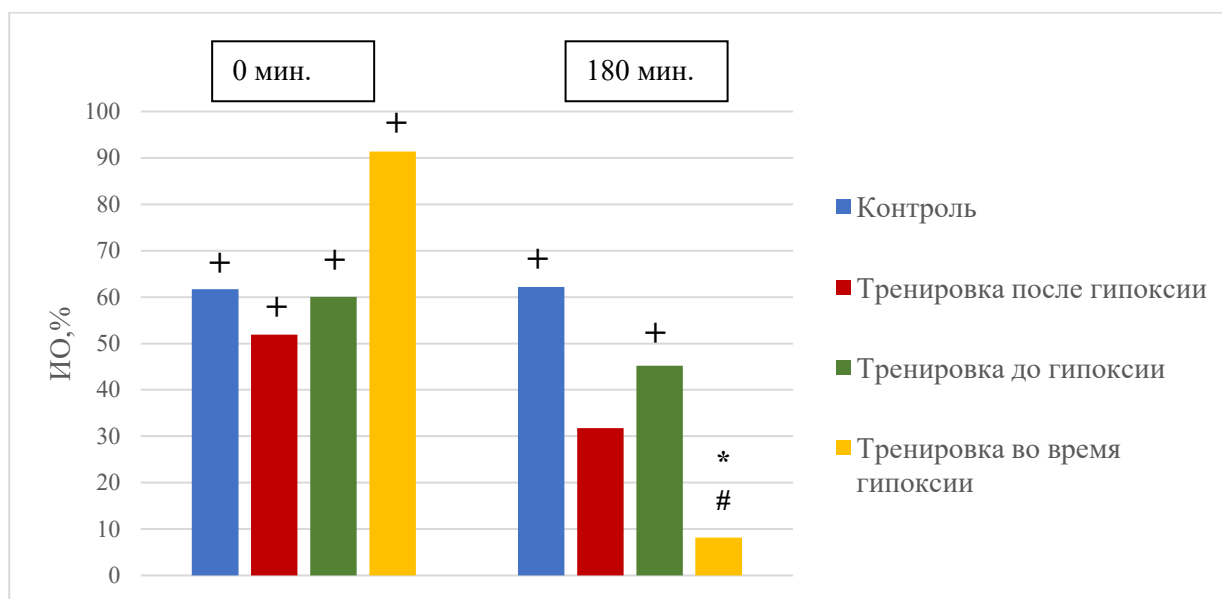


Рис. 12. Индексы обучения линии *vermilion* \* - ИО после воздействия достоверно отличается от интактного контроля ( $p < 0,05$ ); + - достоверно отличается от 0 (эффект обучения достоверен) ( $p < 0,05$ ); # - ИО достоверно ниже, чем у линии дикого типа *CS* в аналогичных условиях ( $p < 0,05$ ).

При сравнении линии дикого типа и данного мутанта видно, что отсутствие метаболитов КПОТ при гипоксическом воздействии негативно сказывается на формировании памяти (рис. 13).

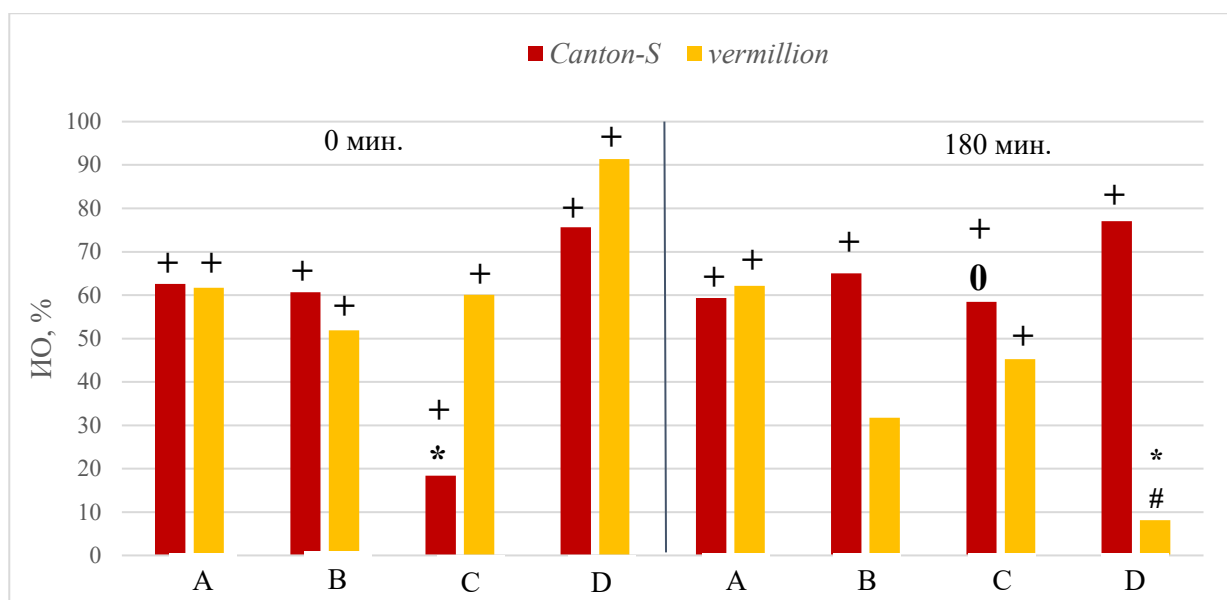


Рис. 13. Сравнение индексов обучения *Canton S* и *vermilion*. \* - ИО после воздействия достоверно отличается от интактного контроля ( $p < 0,05$ ); + - достоверно отличается от 0 (эффект обучения достоверен) ( $p < 0,05$ ); 0 - достоверно отличается от 0 мин ( $p < 0,05$ ); # - ИО достоверно ниже, чем у линии дикого типа *CS* в аналогичных условиях ( $p < 0,05$ ). А - Интактный контроль; В – Тренировка после гипоксии; С – Тренировка до гипоксии; D – Тренировка во время гипоксии.

У мутантов *v* КПОТ практически полностью блокируется, что ведет к 6-кратному повышению уровня триптофана (Ryall et al, 1974). Часть триптофана реализуется в синтезе белков, что может приводить к изменениям молекулярных каскадов, отвечающих за формирование краткосрочной и долгосрочной памяти.

### 2.1.3. Мутантная линия с нарушением ремоделирования актинового цитоскелета *agn<sup>ts3</sup>*

В норме у линии *agn<sup>ts3</sup>* отсутствует способность к обучению и формированию памяти. Предъявление гипоксии после тренировки не оказывает достоверного эффекта на эти процессы. В то же время гипоксическое воздействие до и во время тренировки приводит к восстановлению способности к обучению (рис. 14).

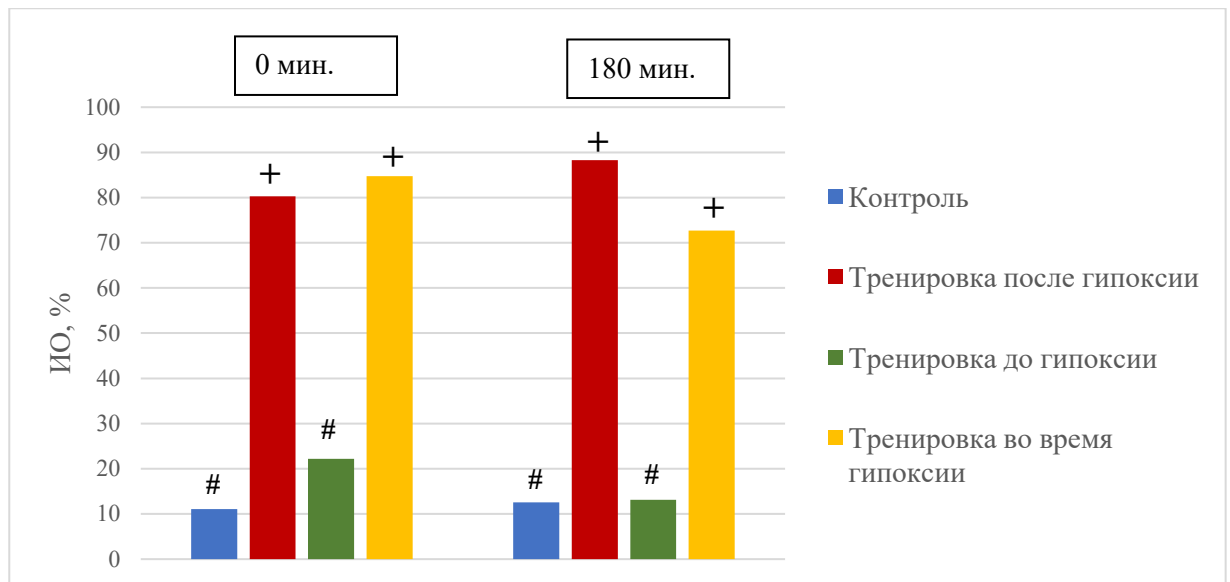


Рис. 14. Индексы обучения линии *agn<sup>ts3</sup>*. + - достоверно отличается от 0 (эффект обучения достоверен) ( $p < 0,05$ ); # - ИО достоверно ниже, чем у линии дикого типа *CS* в аналогичных условиях ( $p < 0,05$ ).

При сравнении контрольной и мутантной линии данная закономерность прослеживается более отчетливо (рис. 15).

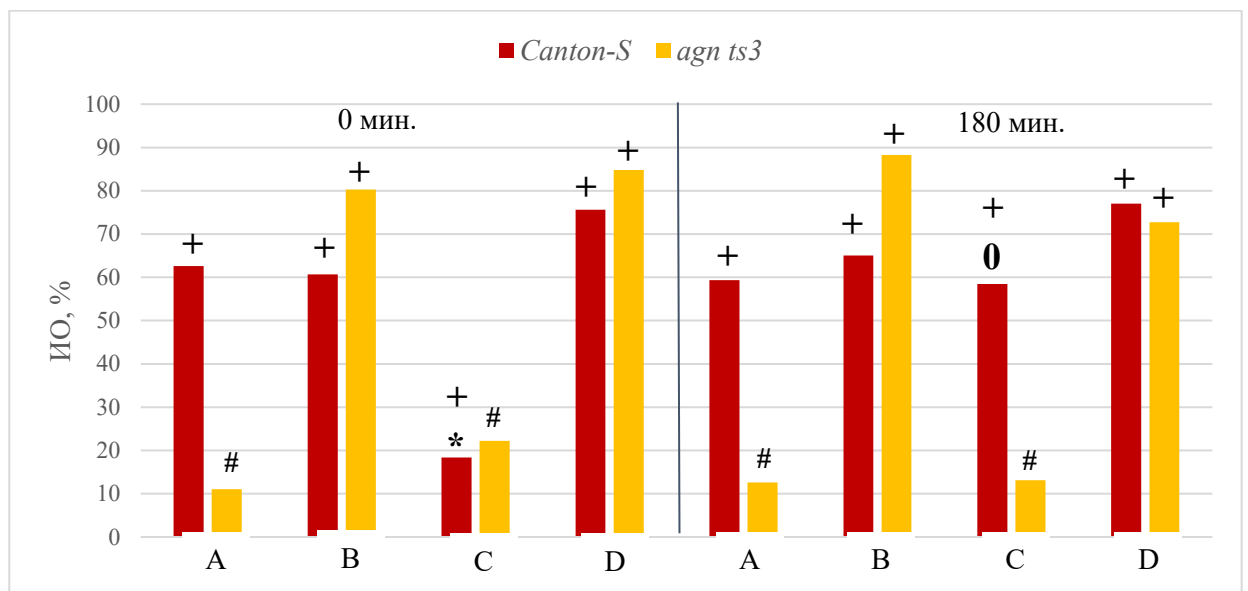


Рис. 15. Сравнение индексов обучения *Canton S* и *agn<sup>ts3</sup>*. \* - ИО после воздействия достоверно отличается от интактного контроля ( $p < 0,05$ ); + - достоверно отличается от 0 (эффект обучения достоверен) ( $p < 0,05$ ); 0 - достоверно отличается от 0 мин ( $p < 0,05$ ); # - ИО достоверно ниже, чем у линии дикого типа *CS* в аналогичных условиях ( $p < 0,05$ ). А - Интактный контроль; В - Тренировка после гипоксии; С - Тренировка до гипоксии; D - Тренировка во время гипоксии.

Это согласуется с показанным ранее фактом, что некоторые внешние воздействия (например, тепловой шок) для данного мутанта приводят к восстановлению способности к обучению и формированию памяти.

## 2.2. Оценка способности к обучению, формированию и сохранению долгосрочной памяти

### 2.2.1. Линия дикого типа *Canton-S*

В интактном контроле, а также при всех вариантах гипоксического воздействия для линии *CS* показана достоверная способность к обучению. Без гипоксического воздействия ИО на 2 и 8 сутки держится на высоком уровне, что свидетельствует о сформированности и сохранении ДСП. При воздействии гипоксии после и во время тренировки отсутствует достоверная сформированность и, соответственно, сохранение ДСП. В то же время, при гипоксическом воздействии до тренировки память формируется, но не сохраняется (рис. 16).

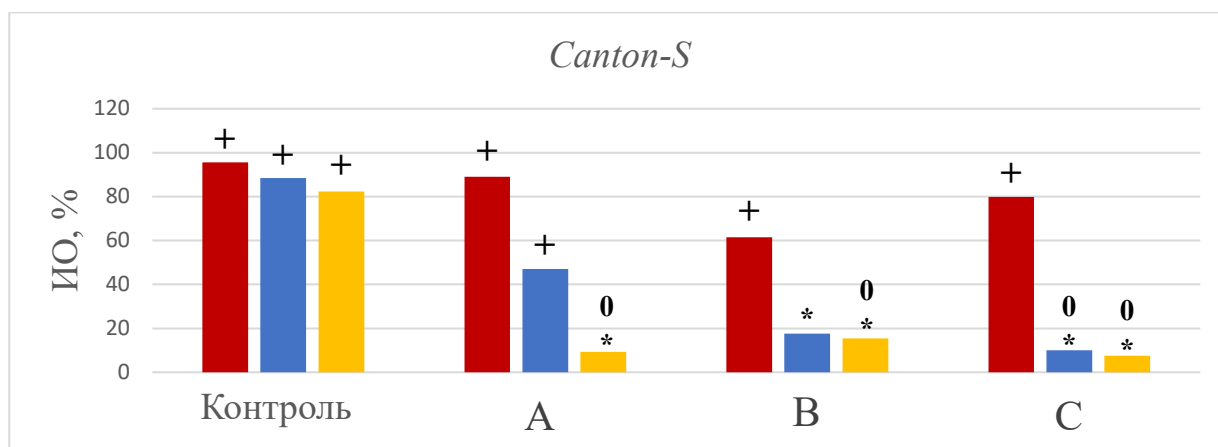


Рис. 16. Индексы обучения линии *Canton-S*. + - достоверно отличается от 0 (эффект обучения достоверен) ( $p < 0,05$ ); 0 - достоверно отличается от 0 мин ( $p < 0,05$ ); \* - ИО после воздействия достоверно отличается от интактного контроля ( $p < 0,05$ ) А- Тренировка после гипоксии; В – тренировка до гипоксии; С – тренировка во время гипоксии. Красным цветом обозначена точка 0 минут (обучение), синим – 2 суток (эффект ДСП), жёлтым – 8 суток (сохранение ДСП).

Полученные результаты демонстрируют влияние гипоксии на динамику формирования и сохранения ДСП. Отсутствие достоверного формирования ДСП при тренировке до и во время гипоксии свидетельствует о деструктивном воздействии низкого уровня кислорода на консолидацию памяти. Отсутствие сохранения ДСП у мух, прошедших тренировку после гипоксии связано вероятно связано с нарушением стабильности синаптических изменений.

## 2.2.2. Мутантные линии с нарушениями КПОТ

### Мутантная линия *cardinal* (*cd*)

Для линии *cd* в интактном контроле продемонстрировано наличие способности к обучению и формированию ДСП, однако ее сохранение нарушено. При всех вариантах гипоксического воздействия на 2 сутки ИО достоверно снижался и оставался на низком уровне, что свидетельствует об нарушениях формирования ДСП (рис. 17, рис. 18).

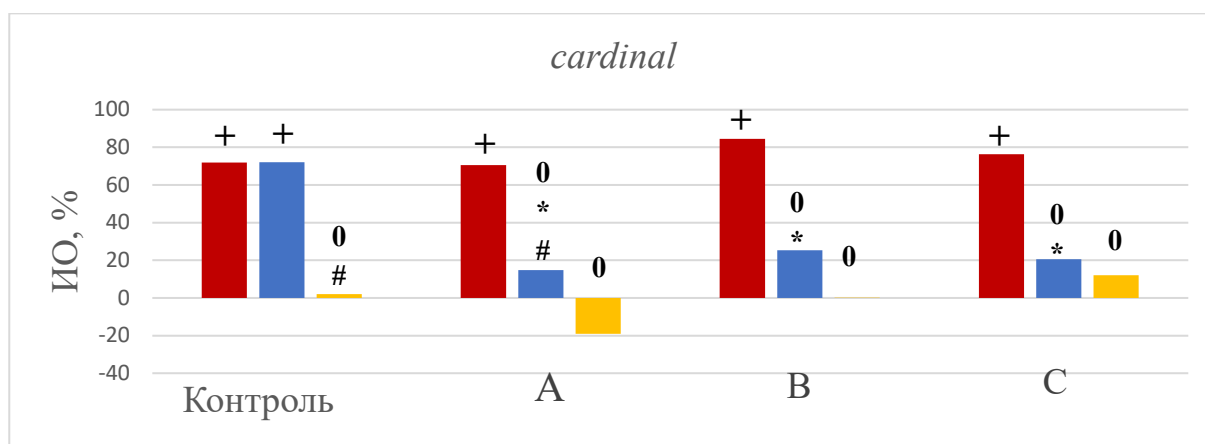


Рис. 17. Индексы обучения линии *cardinal*. + - достоверно отличается от 0 (эффект обучения достоверен) ( $p < 0,05$ ); 0 - достоверно отличается от 0 мин ( $p < 0,05$ ); \* - ИО после воздействия достоверно отличается от интактного контроля ( $p < 0,05$ ); # - ИО достоверно ниже, чем у линии дикого типа *CS* в аналогичных условиях ( $p < 0,05$ ). А- Тренировка после гипоксии; В – тренировка до гипоксии; С – тренировка во время гипоксии. Красным цветом обозначена точка 0 минут (обучение), синим – 2 суток (эффект ДСП), жёлтым – 8 суток (сохранение ДСП).

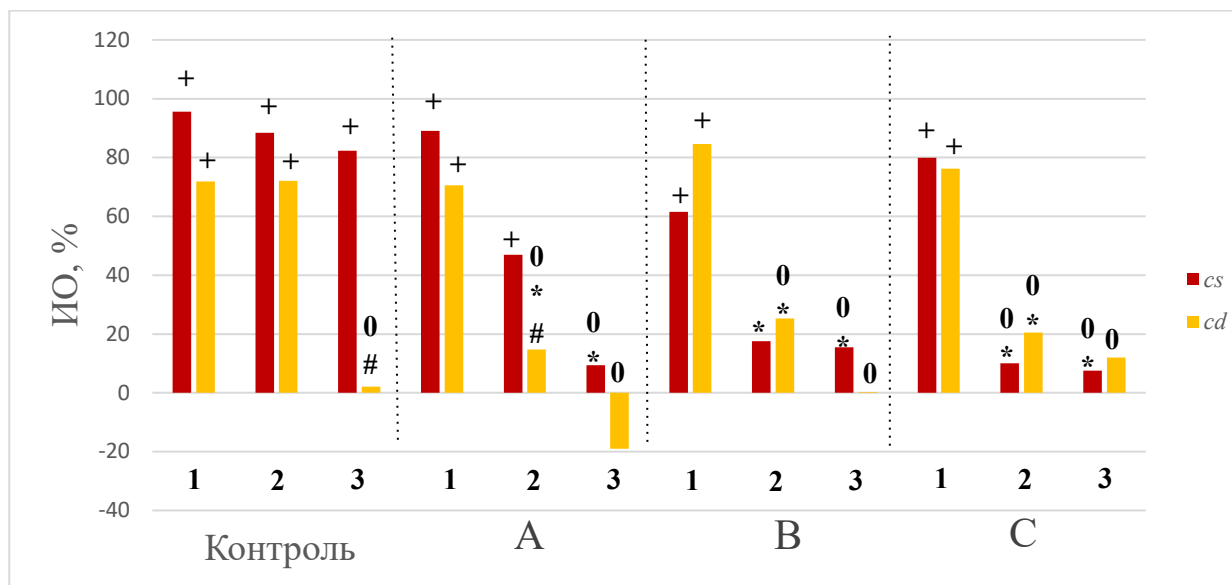


Рис. 18. Индексы обучения линии *Canton-S* и *cardinal*. + - достоверно отличается от 0 (эффект обучения достоверен) ( $p < 0,05$ ); 0 - достоверно отличается от 0 мин ( $p < 0,05$ ); \* - ИО после воздействия достоверно отличается от интактного контроля ( $p < 0,05$ ); # - ИО достоверно ниже, чем у линии дикого типа *CS* в аналогичных условиях ( $p < 0,05$ ). 1 – 0 минут (обучение); 2 – 2 суток (эффект ДСП); 3 - 8 суток (сохранение ДСП). А- Тренировка после гипоксии; В – тренировка до гипоксии; С – тренировка во время гипоксии.

### Мутантная линия *cinnabar (cn)*

Для мух линии *cn* показана достоверная способность как к обучению, так и формированию ДСП в условиях гипоксии, однако сохранение памяти нарушено (рис. 19, рис. 20).

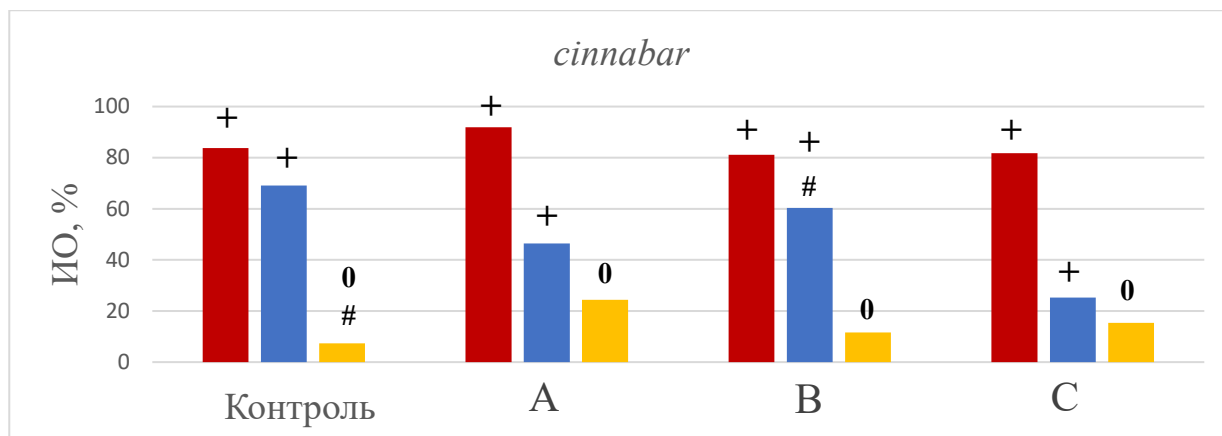


Рис. 19. Индексы обучения линии *cinnabar*. + - достоверно отличается от 0 (эффект обучения достоверен) ( $p < 0,05$ ); 0 - достоверно отличается от 0 мин ( $p < 0,05$ ); # - ИО достоверно ниже, чем у линии дикого типа *CS* в аналогичных условиях ( $p < 0,05$ ). А- Тренировка после гипоксии; В – тренировка до гипоксии; С – тренировка во время гипоксии. Красным цветом обозначена точка 0 минут (обучение), синим – 2 суток (эффект ДСП), жёлтым – 8 суток (сохранение ДСП).

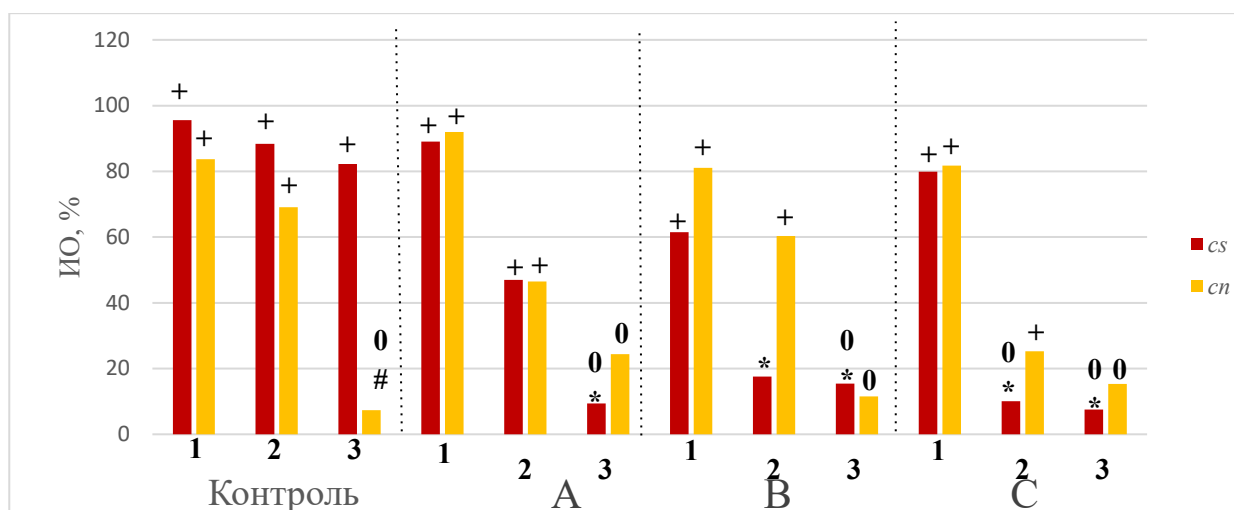


Рис. 20. Индексы обучения линии *Canton-S* и *cinnabar*. + - достоверно отличается от 0 (эффект обучения достоверен) ( $p < 0,05$ ); 0 - достоверно отличается от 0 мин ( $p < 0,05$ ); \* - ИО после воздействия достоверно отличается от интактного контроля ( $p < 0,05$ ); # - ИО достоверно ниже, чем у линии дикого типа *CS* в аналогичных условиях ( $p < 0,05$ ). 1 – 0 минут (обучение); 2 – 2 суток (эффект ДСП); 3 – 8 суток (сохранение ДСП). А- Тренировка после гипоксии; В – тренировка до гипоксии; С – тренировка во время гипоксии.

### Мутантная линия *vermilion (v)*

Для мутанта *v* показаны данные, сходные с результатами для линии *cd*. В обеих линиях наблюдается способность к обучению как в интактном



контроле, так и при всех вариантах гипоксического воздействия. Для мух, не подвергающихся гипоксическому воздействию, показана достоверная способность к формированию ДСП, однако ее сохранение нарушено. При всех вариантах воздействия гипоксии ИО на 2 и 8 суток резко снижается, иногда принимая отрицательные значения, что свидетельствует об отсутствии способности к формированию ДСП (рис. 21, рис. 22).

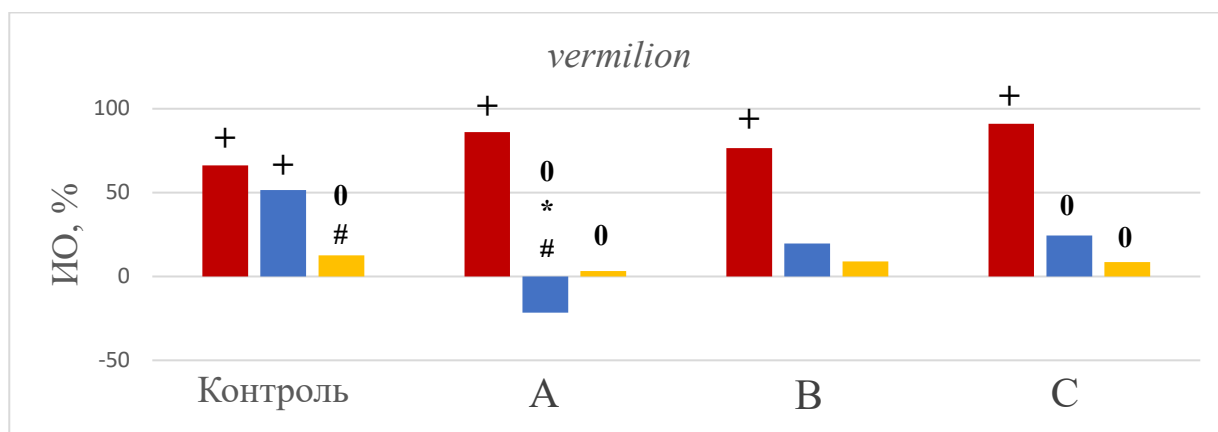


Рис. 21. Индексы обучения линии *vermilion*. + - достоверно отличается от 0 (эффект обучения достоверен) ( $p < 0,05$ ); 0 - достоверно отличается от 0 мин ( $p < 0,05$ ); \* - ИО после воздействия достоверно отличается от интактного контроля ( $p < 0,05$ ); # - ИО достоверно ниже, чем у линии дикого типа *CS* в аналогичных условиях ( $p < 0,05$ ). А- Тренировка после гипоксии; В – тренировка до гипоксии; С – тренировка во время гипоксии. Красным цветом обозначена точка 0 минут (обучение), синим – 2 суток (эффект ДСП), жёлтым – 8 суток (сохранение ДСП).

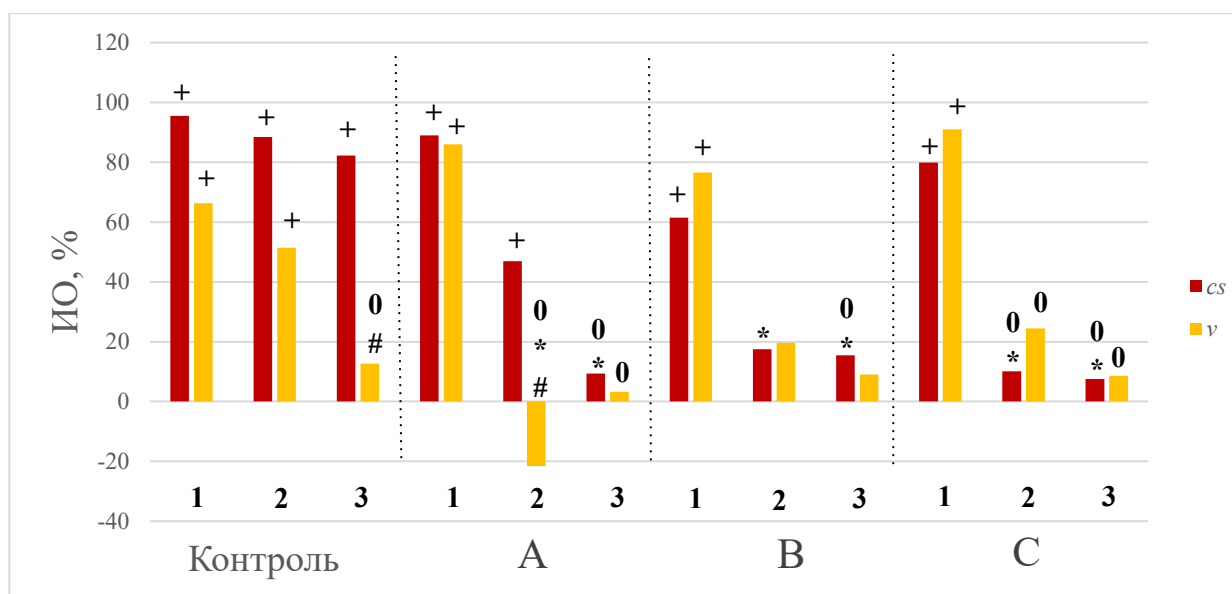


Рис. 22. Индексы обучения линии *Canton-S* и *cardinal*. + - достоверно отличается от 0 (эффект обучения достоверен) ( $p < 0,05$ ); 0 - достоверно отличается от 0 мин ( $p < 0,05$ ); \* - ИО после воздействия достоверно отличается от интактного контроля ( $p < 0,05$ ); # - ИО достоверно ниже, чем у линии дикого типа *CS* в аналогичных условиях ( $p < 0,05$ ). 1 – 0 минут (обучение); 2 – 2 суток (эффект ДСП); 3 - 8 суток (сохранение ДСП). А- Тренировка после гипоксии; В – тренировка до гипоксии; С – тренировка во время гипоксии.

### 2.2.3. Мутантная линия с нарушением ремоделирования актинового цитоскелета *agn<sup>ts3</sup>*

У мутанта *agn<sup>ts3</sup>* во всех вариантах эксперимента наблюдается наличие способности к обучению. Однако в интактном контроле ИО через 2 и 8 суток резко снижен и достоверно отличается от достигнутого сразу после тренировки в точке 0 минут. Это свидетельствует о нарушении формирования ДСП. В группе гипоксического воздействия после тренировки наблюдается такая же картина, что может свидетельствовать об отсутствии эффекта гипоксического посткондиционирования. Для групп, проходивших тренировку во время или после гипоксии, показана другая тенденция. Гипоксическое воздействие способствует восстановлению способности к формированию и сохранению ДСП (рис. 23, рис. 24).

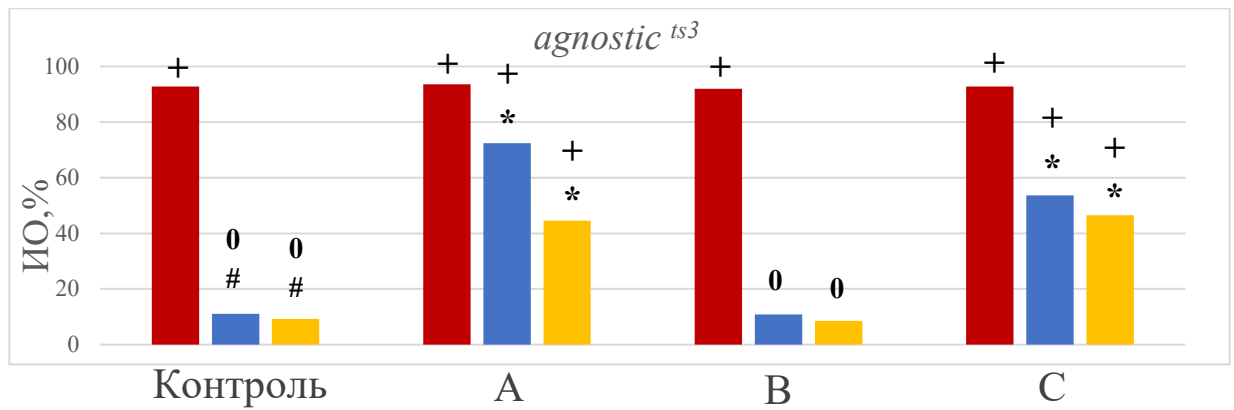


Рис. 23. Индексы обучения линии *agnostic<sup>ts3</sup>*. + - достоверно отличается от 0 (эффект обучения достоверен) ( $p < 0,05$ ); 0 - достоверно отличается от 0 мин ( $p < 0,05$ ); \* - ИО после воздействия достоверно отличается от интактного контроля ( $p < 0,05$ ); # - ИО достоверно ниже, чем у линии дикого типа *CS* в аналогичных условиях ( $p < 0,05$ ). А- Тренировка после гипоксии; В – тренировка до гипоксии; С – тренировка во время гипоксии. Красным цветом обозначена точка 0 минут (обучение), синим – 2 суток (эффект ДСП), жёлтым – 8 суток (сохранение ДСП).

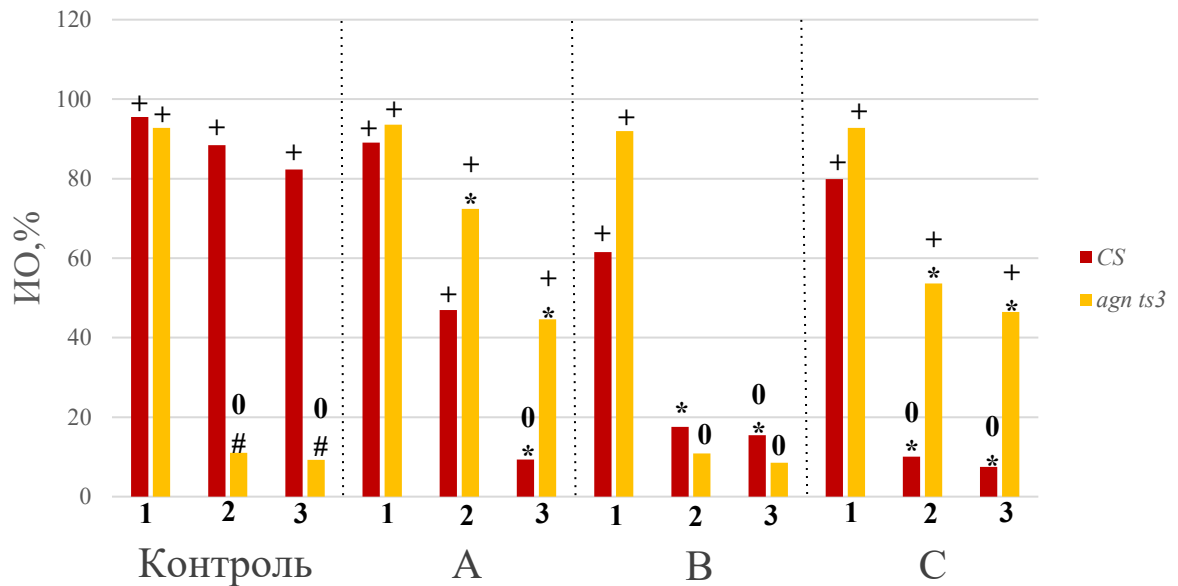


Рис. 24. Индексы обучения линии *Canton-S* и *agnostic<sup>ts3</sup>*. + - достоверно отличается от 0 (эффект обучения достоверен) ( $p < 0,05$ ); 0 - достоверно отличается от 0 мин ( $p < 0,05$ ); \* - ИО после воздействия достоверно отличается от интактного контроля ( $p < 0,05$ ); # - ИО достоверно ниже, чем у линии дикого типа *CS* в аналогичных условиях ( $p < 0,05$ ). 1 – 0 минут (обучение); 2 – 2 суток (эффект ДСП); 3 – 8 суток (сохранение ДСП). А- Тренировка после гипоксии; В – тренировка до гипоксии; С – тренировка во время гипоксии.

### 3. Анализ экспрессии генов, вовлеченных в каскад адаптации к гипоксии

#### 3.1. Анализ экспрессии *hsp70*

Для противодействия повреждающим последствиям гипоксии у организмов эволюционно выработан ряд защитных механизмов, которые заключаются в активации комплексов консервативных молекулярных каскадов. Одним из элементов защиты от гипоксического воздействия является индукция генов белков теплового шока (*hsp*), среди которых особое место занимает *hsp70*. В норме экспрессия *hsp70* находится на довольно низком уровне, но экспериментально подтверждено, что при длительной хронической гипоксии (ХГ) у дрозофилы более чем в 5 раз повышается экспрессия *hsp70*. Кроме того, индуцированная специфическая сверхэкспрессия этого гена в грибовидных телах, некоторых частях антеннальных долей, кардиобластах и лимфатической железе приводила к значительному увеличению выживания взрослых мух при ХГ. В то же время нокаут по этому гену приводит к резкому снижению жизнеспособности дрозофилы в условиях длительного пониженного уровня кислорода (Azad et al., 2009).

Проведенный анализ изменения уровня экспрессии *hsp70* после 30 минут гипоксического воздействия у взрослых самцов дрозофилы показал устойчивое увеличение мРНК у всех линий (рис 25).

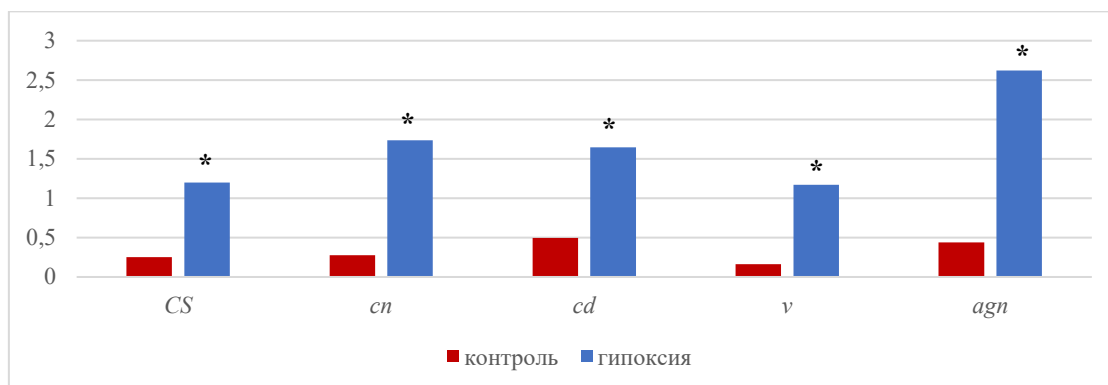


Рис. 25. Изменение экспрессии *hsp70*. \* - достоверно отличается от контроля ( $p < 0,05$ , двусторонний тест Стьюдента)

### 3.2. Анализ экспрессии генов гликолитического каскада

У *Drosophila melanogaster* ген *sima* кодирует гомолог гипоксии-индуцируемого фактора 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ), называемый Sima/HIF1 $\alpha$ . Этот белок играет ключевую роль в регуляции метаболической адаптации к гипоксии. В условиях нормоксии Sima/HIF1 $\alpha$  подвергается кислород-зависимой деградации: фермент Fatiga (аналог PHD2 у млекопитающих) гидроксилирует пролиновые остатки в белке Sima/HIF-1 $\alpha$ , что служит сигналом для убиквитинирования Sima/HIF-1 $\alpha$  комплексом VHL и последующей деградации в протеасоме (Lavista-Llanos, 2002). При воздействии гипоксии механизм деградации Sima/HIF-1 $\alpha$  отключается, и стабилизированный белок транспортируется в ядро, где совместно с Tango/ARNT (ортолог ключевого фактора транскрипции млекопитающих ARNT) активирует экспрессию целевых генов, тем самым запуская каскад адаптации к гипоксическому воздействию. Недавние исследования на мутантах *sima* демонстрируют значительное снижение экспрессии почти всех генов, вовлеченных в гликолиз, что свидетельствует о *sima*-зависимой регуляции гликолитического каскада (Heidarian, 2025).

Для более детального понимания изменения углеводного обмена в условиях гипоксии был проведен сравнительный анализ уровня мРНК гексокиназы А (ген *hex-A*) и лактатдегидрогеназы (ген *ldh*) с использованием метода ПЦР в реальном времени.

Во всех линиях показано достоверное повышение уровня экспрессии *hex-A*, в то время как экспрессия *ldh* достоверно повышается только у линии дикого типа и мутантов КПОТ *cn* и *v* (рис. 26, рис. 27).

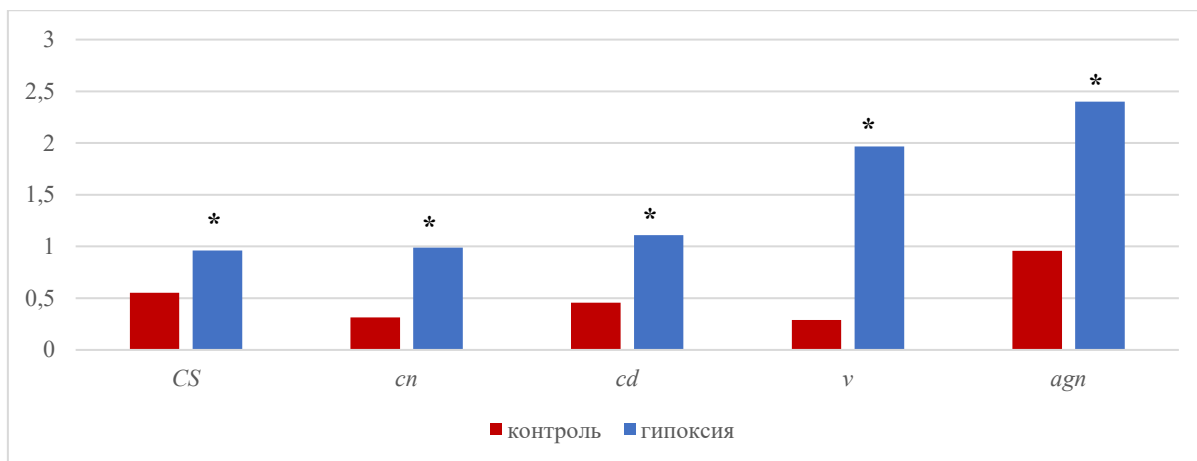


Рис. 26. Изменение экспрессии *hex-A*

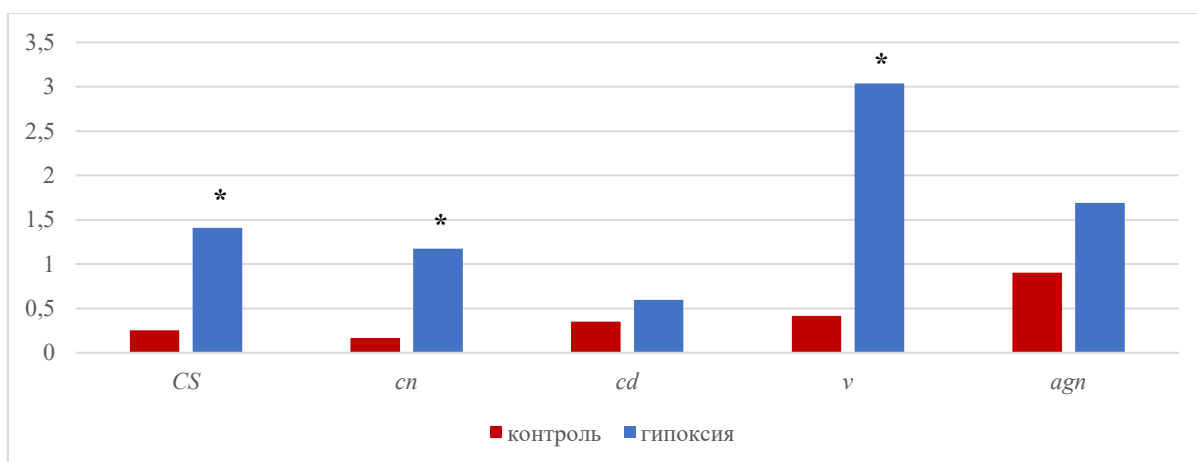


Рис. 27. Изменение экспрессии *ldh*

### 3.3. Анализ экспрессии генов митохондриальной электрон-транспортной цепи.

При кислородном голодании в митохондриях, являющихся энергетическими станциями клетки, происходят серьезные метаболические перестройки, характеризующиеся в первую очередь снижением выработки АТФ и сопровождающиеся нарушением окислительного фосфорилирования, накоплением молочной кислоты и развитием ацидоза.

В ходе исследования был проведен анализ изменения уровня мРНК 3 субъединицы цитохром-С-оксидазы (COX3) и субъединиц комплекса I дыхательной цепи митохондрий NDUFA3 и NDUFV3. Однако достоверного

различия уровня экспрессии между контрольными группами и группами, подвергающимися гипоксическому воздействию, выявлено не было (рис. 28, рис. 29, рис. 30)

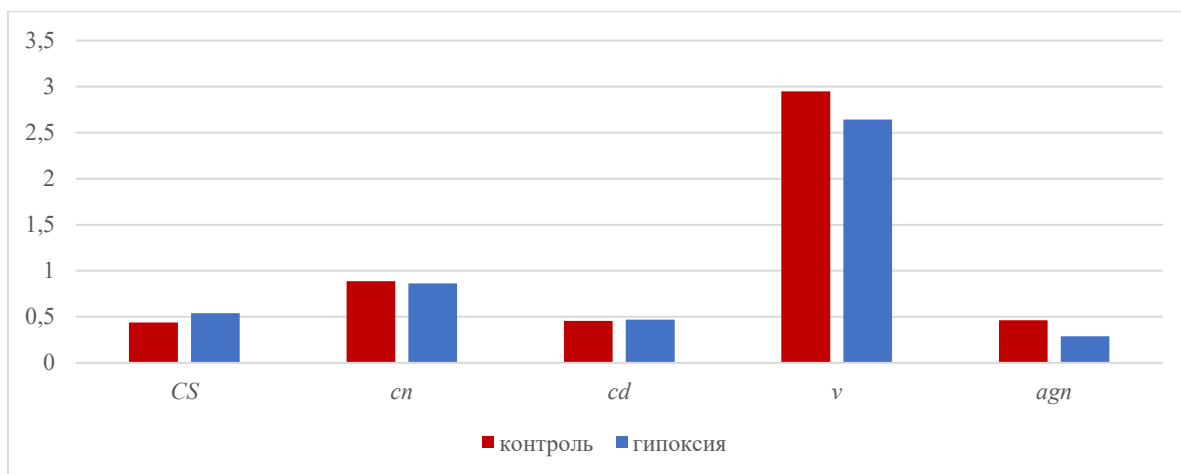


Рис. 28. Изменение экспрессии *COX3*.

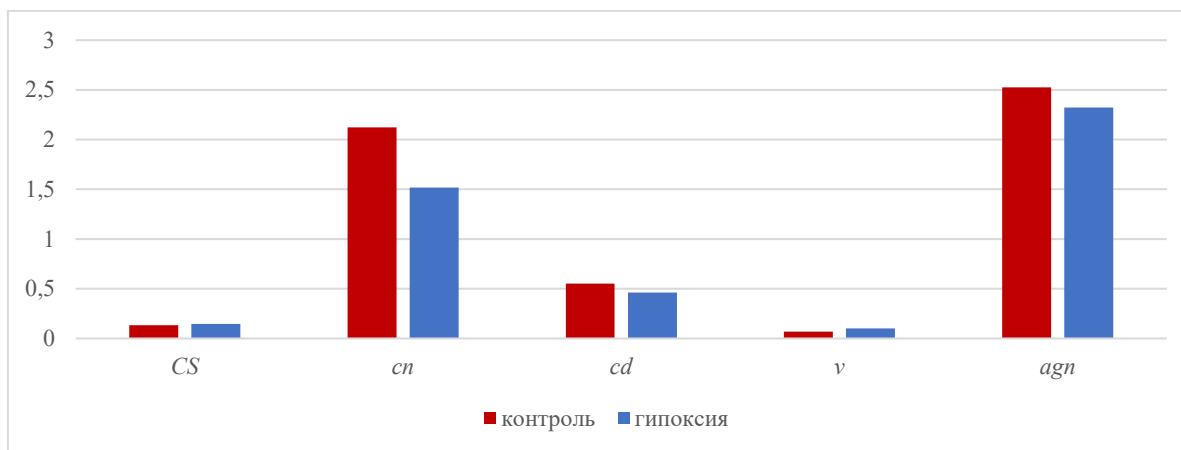


Рис. 29. Изменение экспрессии *NDUF A3*.

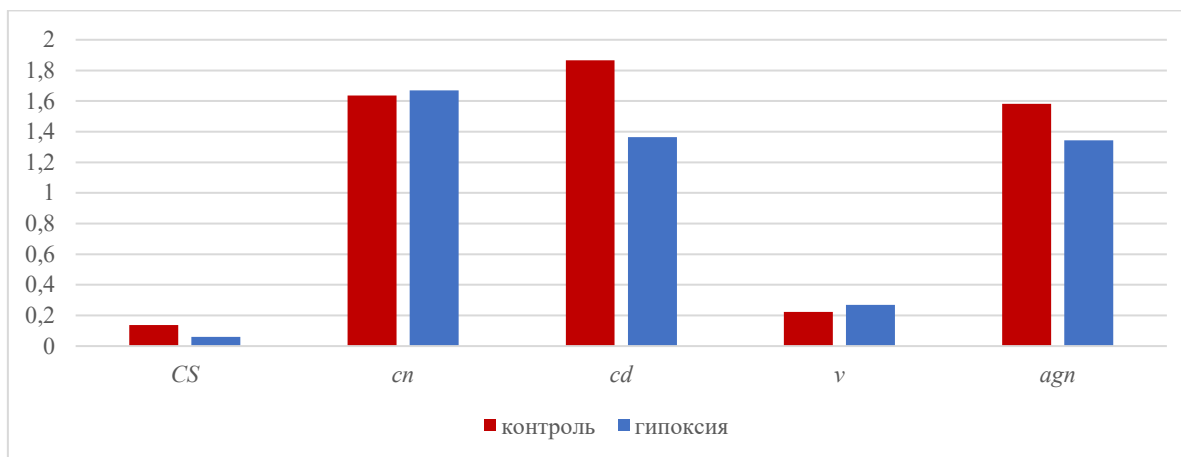


Рис. 30. Изменение экспрессии *NDUF V3*.

## ВЫВОДЫ

1. Анализ выживаемости в условиях гипоксии показал достоверное снижение продолжительности жизни мух всех линий, начиная с 28-30 дня эксперимента. Мутанты *sn* демонстрировали лучше показатели выживаемости по сравнению с линией дикого типа, у мутанта *v* продолжительность жизни достоверно снижалась относительно *CS* в условиях нормоксии, а у мутанта *agn<sup>ts3</sup>* снижалась как в контрольной, так и в опытной группах.
2. Линия дикого типа *CS* демонстрирует высокую способность к обучению и формированию среднесрочной памяти, в то время как у линий с нарушениями КПОТ наблюдаются нарушения ее формирования. Для линии *agn<sup>ts3</sup>* с дисфункцией *limk1* показано восстановление способности к обучению и формированию среднесрочной памяти при воздействии гипоксии до и во время тренировки.
3. Для всех исследуемых линий показана способность к обучению как в нормальных условиях, так и в условиях гипоксии. Однако гипоксическое воздействие приводит к нарушениям формирования и сохранения долгосрочной памяти не только у мутантов, но и у линии дикого типа.
4. Продемонстрировано повышение экспрессии *hsp70* и *hex-A* после гипоксического воздействия у мух всех линий, *ldh* повышается только у линий *CS*, *sn* и *v*. Изменение уровня экспрессии митохондриальных генов выявлено не было.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На фоне роста социально-значимых патологий, таких как НДЗ, ключевое значения приобретают исследования их механизмов развития, клинического течения, диагностики и профилактики. Ввиду в основном спорадического характера возникновения НДЗ, особую роль имеют исследования факторов, предрасполагающих к развитию этих заболеваний. Важнейшим элементом их патогенеза является нарушение клеточного энергетического обмена и оксидативного стресса, что напрямую связывает их с изучением последствий гипоксии на молекулярном уровне.

Применение дрозофилы как классического генетического объекта — позволяет всесторонне исследовать патогенез НДЗ. Данная модель дает возможность задействовать генетические и нейрофизиологические подходы, позволяющие изучать этиологию заболеваний на различных уровнях организации: от макропроявлений в виде нарушений когнитивных функций (память, обучение) до микромолекулярных основ патологии.

Подобные исследования, направленные, в том числе, на изучение гипоксии-индуцируемых путей (таких как экспрессия шаперонов типа БТШ70), имеют высокий потенциал. Полученные данные могут способствовать созданию новых фармакологических препаратов, нацеленных на коррекцию клеточного ответа на стресс и облегчение состояния пациентов с нейродегенеративными заболеваниями.

## АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Результаты работы были представлены в виде доклада на различных конференциях:

1. Всероссийская конференция с международным участием «Интегративная физиология» (2022, Санкт-Петербург);
2. XXVI научная школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии (2022, Москва);
3. Молодежная школа-конференция «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций» (2023, Москва);
4. Всероссийская конференция с международным участием «Дрозофила – 2023» (2023, Гатчина);
5. XXVII научная школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии, посвященная 300-летию РАН (2023, Москва);
6. Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 175-летию со дня рождения академика И.П. Павлова и 120-летию со дня вручения академику И.П. Павлову Нобелевской премии (2024, Санкт-Петербург).

## НАУЧНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Статьи в научных журналах:

**Каровецкая Д.М.** Стрессорные воздействия и когнитивная деятельность: поиск мишеней и общих механизмов с использованием мутантов дрозофилы / Д.М. Каровецкая, А.В. Медведева, Е.В. Токмачева, С.А. Васильева, А.В. Реброва, Е.А. Никитина, Б.Ф. Щеголев, Е.В. Савватеева-Попова // Нейрохимия. — 2024. — Т. 41, № 1. — С. 44-54.

Тезисы из сборников конференций:

1. Nikitina E.A. Effects of hypoxia on cognitive processes in drosophila / E.A. Nikitina, A.V. Medvedeva, **D.M. Karovetskaya**, D.D. Safarova, E.V. Savvateeva-Popova // Modern Achievements in Population, Evolutionary, and Ecological Genetics: International Symposium. — Vladivostok, 2022. — P. 60.

2. **Каровецкая Д.М.** Влияние гипоксии на обучение и долгосрочную память дрозофилы в условиях нарушения кинуренинового пути обмена триптофана / Д.М. Каровецкая, А.В. Медведева, И.В. Якимова, Е.А. Никитина // Интегративная физиология: тезисы докладов VI Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 175-летию со дня рождения академика И.П. Павлова и 120-летию со дня вручения академику И.П. Павлову Нобелевской премии. — СПб., 2024. — С. 143.

3. **Каровецкая Д.М.** Влияние гипоксии на обучение и память *Drosophila melanogaster* в условиях накопления кинуреновой кислоты / Д.М. Каровецкая, А.В. Медведева, Е.А. Никитина // Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций: сборник материалов 4-й молодежной школы-конференции. — 2023. — С. 70-71.

4. **Каровецкая Д.М.** Влияние гипоксии на обучение и память дрозофилы в условиях нарушения ремоделирования актинового цитоскелета / Д.М. Каровецкая, А.В. Медведева, Е.А. Никитина, Е.В. Савватеева-Попова // Дрозофила 2023: сборник тезисов Всероссийской конференции с международным участием. — Гатчина, 2023. — С. 64.

5. **Каровецкая Д.М.** Влияние гипоксии на обучение и память дрозофилы в условиях отсутствия метаболитов кинуренинового пути обмена триптофана / Д.М. Каровецкая, А.В. Медведева, Е.А. Никитина // XXVII научная школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии, посвященная 300-летию РАН: тезисы участников конференции. — 2023. — С. 66-67.
6. **Каровецкая Д.М.** Влияние гипоксии на обучение и память дрозофилы в условиях накопления 3-гидроксикинурина / Д.М. Каровецкая, А.В. Медведева, Е.А. Никитина, Е.В. Савватеева-Попова // Интегративная физиология. — 2022. — С. 94.
7. **Каровецкая Д.М.** Влияние гипоксии на обучение и память линии дикого типа *Canton-S Drosophila melanogaster* / Д.М. Каровецкая, А.В. Медведева, Е.А. Никитина // Сборник тезисов XXVI научной школы-конференции молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии. — М., 2022. — С. 149-152.
8. Никитина Е.А. Влияние гипоксии на обучение и память у дрозофилы / Е.А. Никитина, А.В. Медведева, **Д.М. Каровецкая**, Е.В. Савватеева-Попова // Учение академика И. П. Павлова в современной системе нейронаук: сборник тезисов докладов, посвященный 175-летию со дня рождения академика И. П. Павлова и 120-летию со дня вручения академику И. П. Павлову Нобелевской премии. — СПб., 2024. — С. 303-304.
9. Никитина Е.А. Влияние гипоксии на организацию хромосомного аппарата и когнитивные функции у дрозофилы / Е.А. Никитина, А.В. Медведева, А.В. Реброва, Д.Д. Сафарова, **Д.М. Каровецкая**, Е.В. Савватеева-Попова // VII Съезд биофизиков России: сборник научных трудов. В 2-х томах. — Краснодар, 2023. — С. 17-18.
10. Никитина Е.А. Влияние стрессорных воздействий на когнитивные функции: модели на дрозофиле / Е.А. Никитина, А.В. Медведева, Е.С. Заломаева, С.А. Васильева, **Д.М. Каровецкая**, А.В. Реброва, Е.С. Егозова, Б.Ф. Щеголев, Е.В. Савватеева-Попова // Современные проблемы

нейробиологии: материалы IV международной научной конференции. — Ярославль, 2023. — С. 54.

11. Никитина Е.А. Молекулярно-генетические механизмы нейродегенеративных заболеваний: модели на дрозофиле / Е.А. Никитина, А.В. Медведева, А.В. Журавлев, Е.С. Заломаева, С.А. Васильева, **Д.М. Каровецкая**, Е.С. Егозова, Е.В. Токмачева, П.Н. Иванова, Е.В. Савватеева-Попова // Нейропсихиатрия в трансдисциплинарном пространстве: от фундаментальных исследований к клинической практике: электронный ресурс. — 2023. — С. 499-501.

12. Никитина Е.А. Роль гипоксии в реализации когнитивных функций у дрозофилы / Е.А. Никитина, А.В. Медведева, **Д.М. Каровецкая**, Е.В. Савватеева-Попова // Международный Конгресс "VIII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 300-летию российской науки и высшей школы": сборник тезисов. — СПб., 2024. — С. 333.

13. Никитина Е.А. Роль нарушений актинового каскада в реализации процессов обучения и памяти у дрозофилы в условиях гипоксии / Е.А. Никитина, А.В. Медведева, **Д.М. Каровецкая**, Е.В. Савватеева-Попова // Интегративная физиология: тезисы докладов VI Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 175-летию со дня рождения академика И.П. Павлова и 120-летию со дня вручения академику И.П. Павлову Нобелевской премии. — СПб., 2024. — С. 136.

14. Савватеева-Попова Е.В. Криптохром (cry) - универсальный и единый преобразователь света, температуры, гипоксии и магнитного поля земли в успешность обучения / Е.В. Савватеева-Попова, **Д.М. Каровецкая**, Е.В. Токмачева, Б.Ф. Щеголев // Международный Конгресс "VIII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 300-летию российской науки и высшей школы": сборник тезисов. — СПб., 2024. — С. 339.

15. Якимова И.В. Изменение обучения и памяти у линии дикого типа *Canton-S Drosophila melanogaster* при гипоксическом воздействии / И.В.

Якимова, Д.М. Каровецкая, Е.А. Никитина // Студент - Исследователь -  
Учитель: тезисы докладов 26-й Межвузовской студенческой научной  
конференции. — спб., 2024. — С. 13-14.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДСП – долгосрочная память

ИО – индекс обучения

ИУ<sub>н</sub> – средний индекс ухаживания для независимой выборки самцов, не имеющих опыта полового поведения;

ИУ<sub>т</sub> - средний индекс ухаживания для независимой выборки обученных самцов, прошедших тренировку

КАТ – кинуренинаминотрансфераза

КПОТ – кинурениновый путь обмена триптофана

НДЗ – нейродегенеративные заболевания

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ССП – среднесрочная память

ССП -среднесрочная память

УРПУ – условно-рефлекторное подавление ухаживания

ХГ – хроническая гипоксия

ЗНОК – 3-гидроксикинуренин

ACh-рецептор – рецептор ацетилхолина

agn<sup>ts3</sup> - agnostic<sup>ts3</sup>

AMPAР-рецептор - рецептор α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты

ARNT – ядерный транслокатор рецептора ароматических углеводородов

CaMKII - Ca<sup>2+</sup>/CaM-зависимая протеинкиназа II

cd – cardinal

cn - cinnabar

COX3 - 3 субъединица цитохром-С-оксидазы

CS - Canton-S

HEX-A – гексокиназа A

HIF1 $\alpha$  - гипоксия-индуцируемый фактор 1 $\alpha$

HSP70 – белок теплового шока 70

KYNA – кинуреновая кислота

LDH – лактатдегидрогеназа

NDUFA3 - субъединица A3 НАДН:убихинон оксидоредуктазы

NDUFV3 - субъединица V3 НАДН:убихинон оксидоредуктазы

NMDA-рецептор - рецептор N-метил-D-аспартата

PHD2 – фактор пролилгидроксилаза 2, индуцируемый гипоксией

v – vermilion

VHL – антионкобелок



## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Журавлев А. В., Никитина Е. А., Савватеева-Попова Е. В. Роль кинуренинов в регуляции поведения и процессов памяти у дрозофилы // Интегративная физиология. – 2020. - Т. 1. № 1. - С. 40-50.
2. Камышев Н.Г., Илиади К.Г., Брагина Ю.В., Савватеева-Попова Е.В., Токмачева Е.В., Преа Т. Выявление мутантов дрозофилы, проявляющих дефекты памяти после выработки условно-рефлекторного подавления ухаживания // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. - 1999. - Т. 85. № 1. - С. 84-92.
3. Никитина Е. А., Медведева А. В., Захаров Г. А., Савватеева-Попова Е. В. Лocus agnostic дрозофилы: вовлеченность в становление когнитивных нарушений при синдроме Уильямса // Acta naturae. – 2014. - Т. 6. №2. - С. 58-66.
4. Ставровская А.В., Ямщикова Н.Г., Олышанский А.С., Гущина А.С. Выявление дефицита когнитивных функций у крыс с моделью болезни Альцгеймера // Асимметрия. – 2018. - Т. 12. №4. - С. 639-645.
5. Шатова О. П., Ягодкина Е. М., Кайдошко С. С., Заболотнева А. А., Шестопалов А. В. Роль метаболитов триптофанового обмена и короткоцепочечных жирных кислот в патогенезе аутоиммунных заболеваний // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2023. - Т. 109. № 8. - С. 1028-1044.
6. Шилов Ю.Е., Безруков М.В. Кинуренины в патогенезе эндогенных психических заболеваний // ВЕСТНИК РАМН. – 2013. - № 1. - С. 35-41.
7. Azad P., Zhou D., Russo E., Haddad G.G. Distinct mechanisms underlying tolerance to intermittent and constant hypoxia in *Drosophila melanogaster* // PLoS One. – 2009. - Vol. 4. - P. 5371.
8. Eastman C.L., Guilarte T.R. Cytotoxicity of 3-hydroxykynurenine in a neuronal hybrid cell line // Brain Res. – 1989. - Vol. 28, No. 495(2). - P. 225-31.

9. Heidarian Y., Fasteen T.D., Mungcal L., Buddika K., Mahmoudzadeh N.H., Nemkov T., D'Alessandro A., Tennessen J.M. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is required to establish the larval glycolytic program in *Drosophila melanogaster* // *Mol Metab.* – 2025. Vol. 93. - P. 102106.
10. Hilmas C., Pereira E.F., Alkondon M., Rassoulpour A., Schwarcz R., Albuquerque E.X. The brain metabolite kynurenic acid inhibits  $\alpha 7$  nicotinic receptor activity and increases non- $\alpha 7$  nicotinic receptor expression: physiopathological implications // *J Neurosci.* - 2001. Vol.1. - P. 7463-73.
11. Iwahashi H., Ishii T., Sugata R., Kido R. Superoxide dismutase enhances the formation of hydroxyl radicals in the reaction of 3-hydroxyanthranilic acid with molecular oxygen // *Biochem J.* – 1988. - Vol. 1, No. 251(3). - P. 893-9.
12. Kamalova A., Nakagawa T. AMPA receptor structure and auxiliary subunits // *J Physiol.* – 2021. - Vol. 599. - P. 453-469.
13. Lavista-Llanos S., Centanin L., Irisarri M., Russo D.M., Gleadle J.M., Bocca S.N., Muzzopappa M., Ratcliffe P.J., Wappner P. Control of the hypoxic response in *Drosophila melanogaster* by the basic helix-loop-helix PAS protein similar // *Mol Cell Biol.* – 2002. - Vol. 22. - P. 6842-53.
14. Olney J.W., Labruyere J., Wang G., Wozniak D.F., Price M.T., Sesma M.A. NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention // *Science.* – 1991. - Vol.6, No. 254(5037). - P. 1515-8.
15. Polan D.M., Alansari M., Lee B., Grewal S.S. Early-life hypoxia alters adult physiology and reduces stress resistance and lifespan in *Drosophila* // *J Exp Biol.* – 2020. - Vol. 23, No. 223. - P. 226027.
16. Rascon B., Harrison J.F. Lifespan and oxidative stress show a non-linear response to atmospheric oxygen in *Drosophila* // *J Exp Biol.* – 2010. - Vol. 15, No. 213. - P. 3441-8.
17. Ryall, R.L., Howells, A.J. Ommochrome biosynthetic pathway of *Drosophila melanogaster*: variations in levels of enzyme activities and intermediates during adult development // *Insect Biochemistry.* – 1974. - Vol. 4. - P. 47-61.

18. Timon R., Martinez-Guardado I., Brocherie F. Effects of Intermittent Normobaric Hypoxia on Health-Related Outcomes in Healthy Older Adults: A Systematic Review // *Sports Med Open*. – 2023. - Vol. 26, No.9. - P. 19.
19. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // *Int J Biochem Cell Biol*. – 2007. - Vol. 9. - P. 44-84.
20. Wu H.Q., Rassoulpour A., Schwarcz R. Kynurenic acid leads, dopamine follows: a new case of volume transmission in the brain? // *J Neural Transm*. – 2007. - Vol. 114, No.9. - P. 33-41.
21. Zhang X., Peng K., Zhang X. The Function of the NMDA Receptor in Hypoxic-Ischemic Encephalopathy // *Front Neurosci*. – 2020. - Vol. 14. - P. 567665.
22. Zhuravlev A. V., Vetrovoy O. V., Zalomaeva E. S. Overexpression of the *limk1* Gene in *Drosophila melanogaster* Can Lead to Suppression of Courtship Memory in Males // *Biochemistry*. – 2024. – Vol. 89, No. 3. – P. 393-406.