

УДК 57.043:577.171.55:577.175.24:595.77

РОЛЬ 20-ГИДРОКСИЭКДИЗОНА В РЕГУЛЯЦИИ УРОВНЯ УГЛЕВОДОВ У *DROSOPHILA MELANOGASTER* ПРИ КРАТКОВРЕМЕННОМ ТЕПЛОВОМ СТРЕССЕ

© 2023 г. М. А. Бобровских¹, Н. Е. Грунтенко^{1,*}

Представлено академиком РАН В.К. Шумным

Поступило 25.03.2023 г.

После доработки 14.04.2023 г.

Принято к публикации 14.04.2023 г.

Известно, что 20-гидроксиэкдизон является одним из важнейших гормональных регуляторов развития, размножения и адаптации насекомых к неблагоприятным условиям среды. Впервые показано, что экзогенный 20-гидроксиэкдизон повышает содержание двух основных углеводов насекомых, трегалозы и глюкозы, у самок *Drosophila melanogaster* как в нормальных условиях, так и при кратковременном тепловом стрессе. Обнаружено, что после тридцати минут теплового воздействия уровни обоих углеводов повышаются, а после полутора часов — возвращаются к исходному уровню. Предложена схема гормональной регуляции содержания углеводов при тепловом стрессе, включающая 20-гидроксиэкдизон, ювенильный гормон и дофамин.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*, 20-гидроксиэкдизон, углеводный обмен, трегалоза, глюкоза, тепловой стресс

DOI: 10.31857/S2686738923600206, **EDN:** JDUCWJ

ВВЕДЕНИЕ

Нейроэндокринная стресс-реакция — один из универсальных и неспецифических способов защиты организмов от неблагоприятных воздействий. Ключевыми звеньями нейроэндокринной стресс-реакции насекомых являются биогенные амины октопамин (ОА) и дофамин [1], а также истинные гормоны насекомых, сесквитерпеноид ювенильный гормон (ЮГ) и стероид 20-гидроксиэкдизон (20Э), участвующие в регуляции роста и развития, линьки и метаморфоза, а также обладающие гонадотропным действием [2, 3]. Показано, что дофамин принимает участие в регуляции титра ЮГ, повышая его у молодых самок дрозофилы и снижая — у зрелых (активно размножающихся) мух [2]. Кроме того, существует обратная связь в этой регуляции: ЮГ снижает уровень дофамина у молодых самок и повышает его у зрелых. 20Э повышает уровень дофамина у молодых самок и снижает его у зрелых, а дофамин влияет на уровень 20Э у дрозофилы опосредованно, че-

рез метаболизм ЮГ, который повышает титр 20Э как у молодых, так и у зрелых самок дрозофилы [2].

Еще одним компонентом, вовлеченным в нейроэндокринную стресс-реакцию, является сигнальный каскад инсулина/инсулиноподобных факторов роста (И/ИФР), регулирующий у насекомых выработку инсулиноподобных пептидов. У дрозофилы И/ИФР, помимо участия в ответе на стресс, задействован в регуляции роста и развития, углеводного и жирового обмена, продолжительности жизни и репродуктивной функции [4–6]. Существует ряд свидетельств существования сложной взаиморегуляции сигнального каскада И/ИФР и других звеньев нейроэндокринной стресс-реакции насекомых [5, 7].

В частности, показано, что 20Э взаимодействует с сигнальным каскадом И/ИФР для синергетического контроля метаболизма липидов и углеводов у насекомых. Так, 20Э негативно регулирует липогенез посредством ингибирования сигнального каскада И/ИФР у личинок тутового шелкопряда *Bombyx mori* [8] и вызывает ингибирование синтеза липидов и усиление липолиза у личинок американской белой бабочки *Hyphantria cunea* [9]. Также показано, что 20Э ингибирует гликолиз и стимулирует деградацию гликогена и трегалозы, повышая уровень глюкозы в гемолимфе, у диапаузирующих куколок совки хлопковой *Helicoverpa armigera* [10] и китайской дубовой пав-

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук” (ИЦиГ СО РАН)
Новосибирск, Россия

*e-mail: nataly@bionet.nsc.ru

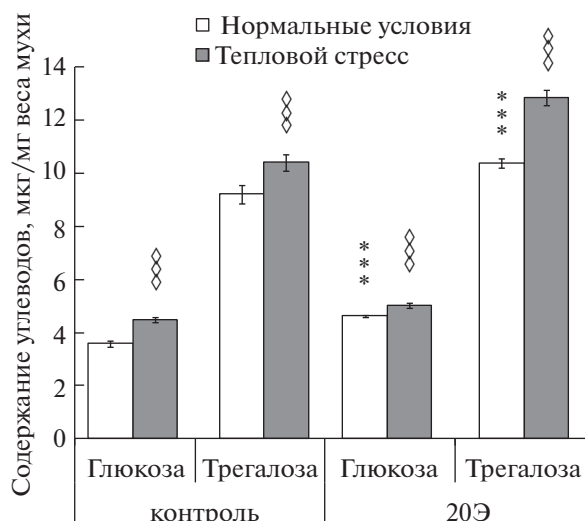


Рис. 1. Влияние 20Э на содержание углеводов у 3-суточных самок *D. melanogaster* линии дикого типа Canton-S в нормальных условиях и при тепловом стрессе (38°C, 30 мин). Каждое значение — среднее из 5-11 измерений. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Звездочка — достоверность отличий контроля от мух, кормленных 20Э, ромб — достоверность различий между подвергнутыми тепловому стрессу и контрольными мухами. 3 ромба или звездочки — различия достоверны при $p < 0.001$; два ромба или звездочки — различия достоверны при $p < 0.01$.

линоглазки *Antheraea pernyi* [11]. Повышение содержания глюкозы и подавление гликолиза и синтеза гликогена под действием 20Э также продемонстрировано у личинок медоносной пчелы *Apis mellifera* [12]. Подавление экспрессии генов, участвующих в синтезе глюкозы, выявлено у личинок *H. cunea* [9]. Обнаружено, что подавление рецептора 20Э, EcR, снижает экспрессию ряда генов, участвующих в гликолизе и метаболизме гликогена, приводя к увеличению содержания гликогена в жировом теле и накоплению углеводов у желтолихорадочного комара *Aedes aegypti* [13].

Ранее мы показали, что повышение уровней как дофамина, так и ЮГ способствует ингибированию уровней основных углеводов насекомых, трегалозы и глюкозы, в нормальных условиях при тепловом стрессе [7], и предположили, что гормоны, участвующие в нейроэндокринной стресс-реакции *D. melanogaster*, играют роль в регуляции углеводного обмена, и эта роль заключается в нормализации уровня углеводов после окончания действия стрессора. В настоящей работе мы проверили это предположение касательно 20Э, проанализировав его влияние на метаболизм трегалозы и глюкозы у *D. melanogaster* в нормальных условиях и при тепловом стрессе (38 °C, 30 мин).

Результаты представлены на рис. 1. Очевидно, что тепловой стресс вызывает увеличение содер-

жания как трегалозы (СТРЕСС — $F_{(1, 21)} = 19.54$, $p < 0.00024$), так и глюкозы

(СТРЕСС — $F_{(1, 30)} = 13.18$, $p < 0.0011$) у самок дрозофилы, что согласуется с данными, полученными ранее (Kargova et al., 2019). Под действием экзогенного 20Э уровни обоих углеводов повышаются, как в нормальных условиях, так и при тепловом стрессе (20Э — $F_{(1, 30)} = 19.40$, $p < 0.00013$ для глюкозы и 20Э — $F_{(1, 21)} = 19.07$, $p < 0.00027$ для трегалозы).

Данные по динамике содержания трегалозы и глюкозы у самок дрозофилы под действием теплового стресса (38 °C), приведенные на рис. 2, свидетельствуют, что после полутора часов теплового воздействия уровни обоих углеводов возвращаются к исходному уровню. Поскольку ранее мы показали, что дофамин и ЮГ вызывают снижение уровней трегалозы и глюкозы как в нормальных условиях, так и при тепловом стрессе [7], возможно предположить, что функцией этих гормонов по отношению к углеводному метаболизму является сохранение статус-кво. А здесь мы видим, что 20Э оказывает противоположный эффект на содержание обоих углеводов. Это позволяет предположить, что 20Э действует на углеводный метаболизм опосредованно, через дофамин, снижая его уровень, как это было показано ранее [2], и тем самым повышая уровень углеводов.

Таким образом, суммируя наши результаты с данными о влиянии дофамина и ЮГ на метаболизм углеводов и о взаимодействии дофамина, ЮГ и 20Э, полученными ранее [2, 7], мы предлагаем следующую схему возможной гормональной регуляции нормализации содержания углеводов у *D. melanogaster* при тепловом стрессе (рис. 3). Поскольку у зрелых мух ЮГ повышает уровень дофамина, а дофамин понижает уровень ЮГ, то действие последнего на содержание углеводов опосредуется дофамином, так как уровни трегалозы и глюкозы понижаются как при кормлении мух его предшественником L-ДОФА (и повышении титра дофамина), так и при аппликации им ЮГ [2]. Если бы действие дофамина на углеводы, напротив, было опосредовано ЮГ, то их влияние на углеводный метаболизм было бы противоположным, так как дофамин снижает уровень ЮГ по механизму обратной связи [2]. По-видимому, 20Э также действует на углеводы опосредованно через дофамин: повышаясь, 20Э снижает уровень амина, что приводит к повышению содержания трегалозы и глюкозы (см. рис. 1). Если бы 20Э влиял на содержание углеводов непосредственно, то характер его воздействия на них должен был бы совпадать с действием ЮГ, так как последний стимулирует синтез 20Э из прогормона экдизона [14]. А поскольку экзогенный ЮГ снижает уров-

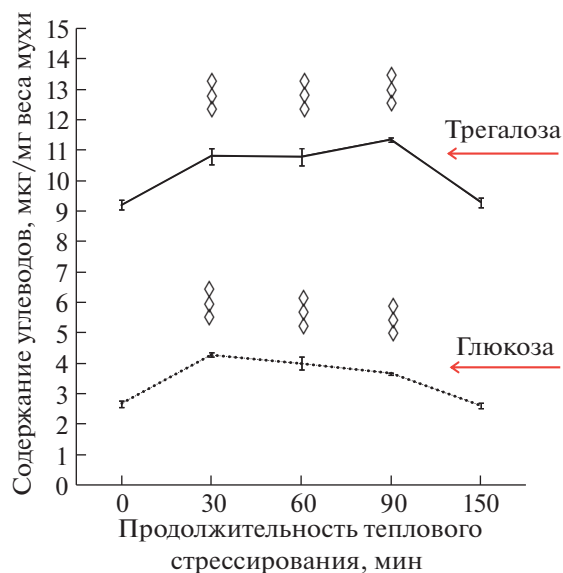


Рис. 2. Динамика содержания углеводов у 3-суточных самок *D. melanogaster* линии дикого типа Canton-S при тепловом стрессе (38°C, 30–150 мин). Глюкоза (сплошная линия), трегалоза (пунктирная линия). Каждое значение — среднее из 9–10 измерений. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Ромб — достоверность отличий мух, стрессированных 30, 60 и 90 мин, от контроля (три ромба — $p < 0.001$).

ни углеводов, можно заключить, что непосредственная стимуляция им синтеза дофамина (снижающего содержание углеводов) превалирует над подавлением последнего 20Э, повышающимся под действием ЮГ и снижающим уровень дофамина (см. рис. 3).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились на 3-суточных самках *Drosophila melanogaster* линии дикого типа Canton-S, которые содержались на стандартной питательной среде (агар-агар E406, (“Green Fresh (Fujian) Foodstuff Co., Ltd”, Китай), 7 г/л; кукурузная крупа (ООО ТД “Царица”, Россия), 50 г/л; сухие дрожжи (ЧУП “Аман-Трейддинг”, Беларусь), 18 г/л; сахар (ООО “Сибирский бакалейный центр”, Россия), 40 г/л) в инкубаторе (Sanyo, Япония) при температуре 25°C, относительной влажности 50%, 12-часовом световом дне. Для экспериментов мух синхронизировали по вылету (собирались мухи, вылетевшие в течение 3–4 ч).

Кормление 20-гидроксиэкдином. Мух помещали в пробирки, дно и 1 см стенок которых покрывали фильтровальной бумагой, смоченной 0.5 мл питательного раствора, содержащего 5% сахара (ООО “Сибирский бакалейный центр”, Россия), 2% дрожжей (ООО “Саф-Нева”, Рос-

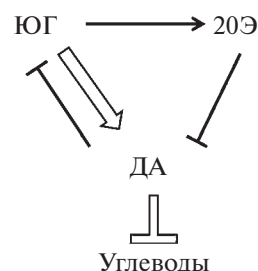


Рис. 3. Схема возможной гормональной регуляции нормализации содержания углеводов у *D. melanogaster* при тепловом стрессе. ЮГ — ювенильный гормон, 20Э — 20-гидроксиэкдизон, ДА — дофамин.

сия) и 60 мкг 20Э (“Sigma-Aldrich”, США) в 96-% этиловом спирте (АО “Кемеровская фармацевтическая фабрика”, Россия). В контрольных сериях вместо раствора 20Э добавляли чистый 96-% этиловый спирт.

Условия стрессирования. Мух подвергали кратковременному тепловому стрессу помещением стеклянных плоскодонных пробирок (20 × 100 мм) с ними в суховоздушный термостат (Redline by Binder, Германия) при температуре 38°C на 30 мин. Контрольных особей содержали при 25°C. После окончания стрессирования экспериментальных и контрольных мух замораживали в жидком азоте.

Измерение содержания углеводов. Углеводный обмен у самок оценивали с помощью спектрофотометра SmartSpec Plus (Bio-Rad, США) при длине волны 340 нм, как описано ранее [15]. Декапированные (во избежание влияния глазного пигмента на результаты измерений) тела мух (3 мухи на образец) гомогенизировали на льду в 300 мкл гипотонического буфера для лизиса (20 мМ HEPES, 2 мМ MgCl₂, 2 мМ EGTA) и затем переносили в охлажденные на льду микроцентрифужные пробирки. После 10 мин инкубации образцы центрифугировали 5 мин при 13 400 g и определяли титры метаболитов в надосадочной жидкости. Титр глюкозы измеряли с использованием набора для анализа глюкозы (НК) (Sigma-SLBLE3912V). Трегалозу переводили в глюкозу добавлением трегалазы (Sigma-T8778, 0.5 ед/мл) с последующим измерением титра глюкозы.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (бюджетный проект № FWNR-2022-0019).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проведено в соответствии с протоколом, утвержденным комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (№ 7 от 19.11.2011).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Раушенбах И.Ю. Нейроэндокринная регуляция развития насекомых в условиях стресса: Генетико-физиологические аспекты. // Новосибирск, 1990. Rauschenbach I.Yu. Neuroendokrinnaia regulatsiya razvitiya nasekomykh v usloviyakh stressa: Genetikofiziologicheskie aspekty[Neuroendocrine Regulation of Insect Development under Stress:Genetic and Physiological Aspects]. // Novosibirsk: Nauka Publ., 1990. (in Russian)
2. Gruntenko N.E., Rauschenbach I.Y. Interplay of JH, 20E and biogenic amines under normal and stress conditions and its effects on reproduction // J. Insect Physiol. 2008. V. 54. № 6. P. 902–908. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.04.004>
3. Miyashita A., Adamo S.A. Stayin' Alive: Endocrinological stress responses in insects. In: Advances in Invertebrate Endocrinology. Toronto, 2020.
4. Broughton S.J., Piper M.D.W., Ikeya T., et al. Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands // PNAS. 2005. V. 102. № 8. P. 3105–3110.
5. Gruntenko N.E., Rauschenbach I.Y. The role of insulin signalling in the endocrine stress response in *Drosophila melanogaster* // Gen. Comp. Endocrinol. 2018. V. 258. P. 134–139.
6. Rulifson E.J., Kim S.K., Nusse R. Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes // Science. 2002. V. 296. № 5570. P. 1118–1120.
7. Karpova E.K., Eremina M.A., Pirozhkova D.S., et al. Stress-related hormones affect carbohydrate metabolism in *Drosophila* females // Arch. Insect Biochem. Physiol. 2019. V. 101. № 1. e21540.
8. Keshan B., Thounaojam B., Kh S.D. Insulin and 20-hydroxyecdysone action in *Bombyx mori*: Glycogen content and expression pattern of insulin and ecdysone receptors in fat body // Gen. Comp. Endocrinol. 2017. V. 241. P. 108–117.
9. Zhang S.Y., Gao H., Askar A., et al. Steroid hormone 20-hydroxyecdysone disturbs fat body lipid metabolism and negatively regulates gluconeogenesis in *Hyphantria cunea* larvae // J. Insect Sci. 2022.
10. Wang X.P., Huang Z., Li Y-L. et al. Krüppel-like factor 15 integrated autophagy and gluconeogenesis to maintain glucose homeostasis under 20-hydroxyecdysone regulation // PLoS Genet. 2022. V. 18. № 6. e1010229.
11. Li Y.N., Lio Y-B., Xie X-Q., et al. The modulation of trehalose metabolism by 20-hydroxyecdysone in *Antheraea pernyi* (Lepidoptera: Saturniidae) during its diapause termination and post-termination period // J. Insect. Sci. 2020. V. 20. № 5.
12. Yu J., Wang H., Chen W., et al. 20-Hydroxyecdysone and receptor interplay in the regulation of hemolymph glucose level in honeybee (*Apis mellifera*) larvae // Metabolites. 2023. V. 13. № 1.
13. Hou Y., Wang X-L., Saha T.T., et al. Temporal coordination of carbohydrate metabolism during mosquito reproduction // PLoS Genet. 2015. V. 11. № 7. e1005309.
14. Gruntenko N.E., Laukhina O.V., Rauschenbach I.Yu., et al. Role of D1- and D2-like receptors in age-specific regulation of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone levels by dopamine in *Drosophila* // J. Insect. Physiol. 2012. V. 58. № 12. P.1534–1540.
15. Musselman L.P., Fink J.L., Narzinski K., et al. A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila* // Dis. Models. Mech. 2011. V. 4. № 6. P. 842–849.

THE ROLE OF 20-HYDROXYECDYSONE IN THE CONTROL OF CARBOHYDRATE LEVELS IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* UNDER SHORT-TERM HEAT STRESS

M. A. Bobrovskikh^{a,*} and N. E. Gruntenko^{a,*}

^aInstitute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

*e-mail: nataly@bionet.nsc.ru

It is known that 20-hydroxyecdysone is one of the most important hormonal regulators of development, reproduction and adaptation to unfavourable conditions in insects. Here, we show for the first time that exogenous 20-hydroxyecdysone increases the content of two main insect carbohydrates, trehalose and glucose, in *Drosophila melanogaster* females both in normal conditions and under short-term heat stress. It has been found that the levels of both trehalose and glucose increase after thirty minutes of heat exposure, and return to their original levels after an hour and a half. A scheme of hormonal regulation of carbohydrate content under heat stress, involving 20-hydroxyecdysone, juvenile hormone and dopamine, is suggested.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, 20-hydroxyecdysone, carbohydrate metabolism, trehalose, glucose, heat stress