

О РОЛИ ХОЛИНЕРГИЧЕСКИХ СИНАПСОВ В ТЕРМОТОЛЕРАНТНОСТИ ПОЧВЕННЫХ НЕМАТОД *CAENORHABDITIS ELEGANS* И *CAENORHABDITIS BRIGGSAE*

В экспериментах с почвенными нематодами близкородственных видов *C. elegans* и *C. briggsae* показано, что устойчивость холинергических синапсов к гипертермии коррелирует с различиями теплоустойчивости поведения нематод. Повышение теплоустойчивости функций холинергических синапсов может быть причиной адаптивных изменений термотолерантности организмов нематод рода *Caenorhabditis* в ходе их эволюции.

Ключевые слова: *Caenorhabditis elegans*, *Caenorhabditis briggsae*, ацетилхолин, ацетилхолинэстераза, алдикарб, холинергические синапсы, теплоустойчивость поведения, эволюция термотолерантности.

В связи с сильным влиянием современного глобального потепления климата Земли на численность и географическое распространение многих видов животных [1]–[2] большое значение имеет вопрос о закономерностях и механизмах эволюции термотолерантности пойкилотермных животных, температура тела которых из-за отсутствия системы терморегуляции изменяется вслед за изменением температуры среды. Поэтому организмы пойкилотермных животных настроены в ходе их эволюции на температурные параметры их экологических ниш, и превышение физиологического оптимума температур оказывает сильное негативное влияние на все функции организма (поведение, размножение, развитие и др.) [3]–[5]. Самой чувствительной мишенью негативного влияния температуры на организм Metazoa является нервная система из-за нарушения процессов синаптической трансмиссии тепловым стрессом, подпороговым для повреждения нейронов [6]–[8]. В то же время, из-за высокой чувствительности к температуре большинства нейронов при чрезвычайной сложности организации нервной системы остается открытым вопрос о том, какие типы синапсов являются мишенью действия гипертермии на поведение. Ацетилхолин (АХ) является основным возбуждающим нейротрансмиттером, необходимым для регуляции всех основных функций организмов человека и животных [9]–[11]. Поэтому возможно, что холинергические синапсы являются мишенью действия высокой температуры на поведение беспозвоночных, и теплоустойчивость функций этих синапсов изменяется в ходе эволюции термотолерантности. Целью

работы явилась проверка этой гипотезы в экспериментах с почвенными нематодами близкородственных видов *Caenorhabditis elegans* и *Caenorhabditis briggsae*, обитающих в контрастных температурных нишах [12]–[13].

Методы

Эксперименты проводили в сентябре–декабре с молодыми половозрелыми нематодами линии *C. elegans* дикого типа N2 Bristol и линии *C. briggsae* дикого типа AF16, выращенными при температуре 23°C в чашках Петри со стандартной средой выращивания нематод (СВН) [13] при кормлении *E. coli* OP50. Исследование влияния высокой температуры и ингибитора ацетилхолинэстеразы (АХ-эстеразы) алдикарба на поведение *C. elegans* и *C. briggsae* проводили с нематодами, инкубированными индивидуально в 1 мл NG буфера (0,3% NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 25 mM калийфосфатного буфера (pH 6,0)) [13] при температурах: 23, 30, 33 и 36°C. Это влияние на плавание нематод, индуцированное механическим стимулом (встряхивание пробирки с червем), проявлялось в нарушениях координации мышц тела, необходимой для синусоидальных движений тела при плавании, отсутствии способности к непрерывному плаванию в течение 10 секунд после стимула (плавание с остановками) и полной потере способности к плаванию. Изменения поведения регистрировались с использованием стереоскопического микроскопа SMZ-05. В работе использовали реактивы фирмы Sigma. Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

В исследованиях механизмов функций холинергических синапсов *C.elegans* используется фармакологический (токсикологический) анализ, включающий в себя измерения чувствительности локомоции к действию ингибитора АХ-эстеразы алдикарба и агониста никотиновых рецепторов АХ левамизола [10]–[11]. У червей с мутациями генов, регулирующих секрецию АХ, снижена или повышена чувствительность к повышению концентрации АХ ингибированием АХ-эстеразы, которое в результате гиперактивации н-холинорецепторов вызывает обратимые нарушения локомоции или ее полное прекращение [10]–[11]. Сходное действие на локомоцию *C.elegans* оказывает гиперактивация н-холинорецепторов их агонистами никотином и левамизолом, чувствительность к которым изменяется мутациями генов н-холинорецепторов [11]. Этот анализ был использован нами для проверки предположения о том, что умеренное и экстремальное повышение температуры среды изменяет функциональное состояние холинергических синапсов *C.elegans* и *C.briggsae*.

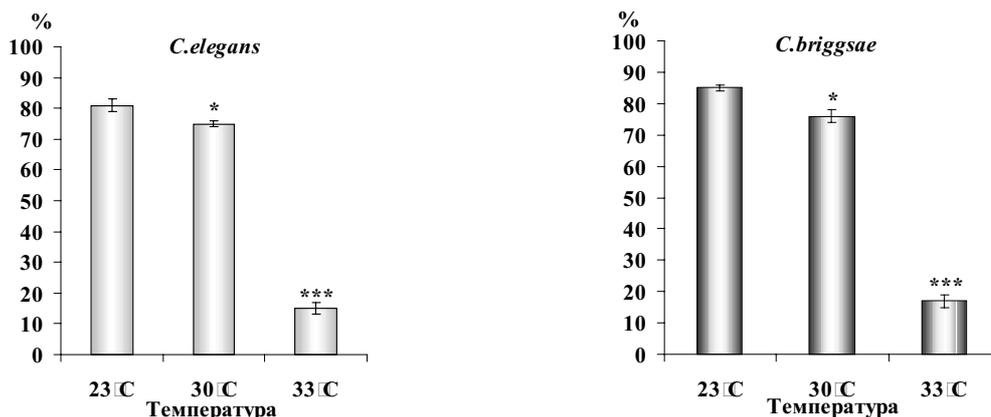
В экспериментах с *C.elegans* чувствительность поведения к нарушениям, индуцированным алдикарбом, не изменяется при повышении температуры с 23 до 30°С и возрастает при 33°С (рис. 1). Повышение температуры с 33 до 36°С вызывает не только тепловые нарушения поведения *C.elegans*, но и качественное изменение реакции нематод на повышение концентрации АХ ингибитором АХ-эстеразы алдикарбом (рис. 2). Если в диапазоне температур 23–33°С алдикарб нарушает локомоцию *C.elegans*, то при температуре 36°С он, напротив, ослабляет нарушения поведения, индуцированные экстремальной высокой температурой (рис. 2). При 36°С проявляется парадоксальное взаимодействие эффектов экстремальной высокой температуры и алдикарба: гипертермия защищает поведение от токсического действия алдикарба, а алдикарб, в свою очередь, оказывает протекторное действие на поведение, нарушенное гипертермией.

Реакция поведения *C.elegans* на ингибирование АХ-эстеразы алдикарбом может измениться в результате как ингибирования секреции АХ холинергическими нейронами, так и снижения чувствительности н-холинорецепторов к повышению концентрации АХ [10]. Ране нами было показано, что повышение температуры до 36°С не только сохраняет, но и увели-

чивает чувствительность поведения *C.elegans* к агонисту н-холинорецепторов левамизолу [8]. Следовательно, гипертермия нарушает функции холинергических синапсов *C.elegans* ингибированием секреции АХ холинергическими нейронами, а не блокированием н-холинорецепторов. Двумя возможными причинами ингибирования секреции АХ при гипертермии могут быть прямое действие высокой температуры на холинергические нейроны или стимуляция секреции серотонина серотонинергическими нейронами, так как экзогенный серотонин ингибирует секрецию АХ [11] и снижает устойчивость поведения *C.elegans* к температуре 36°С [14].

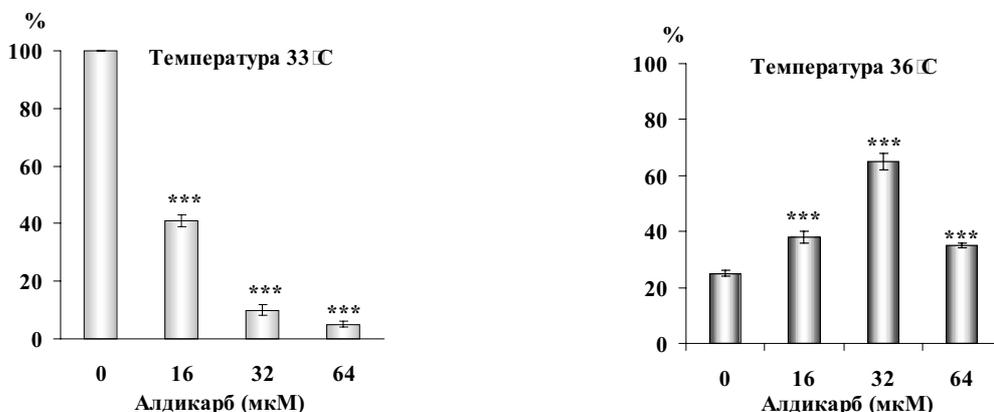
В связи с тем, что организмы почвенных нематод в ходе эволюции настроены на температурные параметры их экологических ниш, были проведены эксперименты, в которых сравнивалась зависимость реакции поведения на ингибирование АХ-эстеразы алдикарбом от экстремального повышения температуры до 36°С у организмов двух близкородственных видов – *C.elegans* и *C.briggsae*. Различия чувствительности к алдикарбу между *C.elegans* и *C.briggsae* не выявляются в диапазоне температур 23–33°С (рис. 1), но при температуре 36°С имеют качественный характер (рис. 2, 3). При температуре 36°С изменяется знак эффекта алдикарба на поведение *C.elegans* при сохранении его негативного влияния на поведение *C.briggsae* (рис. 2, 3). Следовательно, тепловой стресс, эффективный для ингибирования секреции АХ у *C.elegans*, оказывает слабое влияние на эту секрецию у *C.briggsae*.

Результаты наших экспериментов позволяют сделать вывод о том, что тепловые нарушения функций холинергических синапсов являются одной из причин нарушения поведения *C.elegans* тепловым стрессом. Во-первых, известно, что ингибиторы АХ-эстеразы используются не только как пестициды, но и как лекарственные средства при патологических состояниях человека с дефицитом АХ [15]. Результаты наших экспериментов показывают, что гипертермия вызывает в организме *C.elegans* состояние с дефицитом АХ, поскольку повышение концентрации АХ ингибированием АХ-эстеразы не только не токсично, но и повышает теплоустойчивость поведения (рис. 2). Во-вторых, температура 36°С, нарушающая функции холинергических синапсов у *C.elegans*, является подпороговой



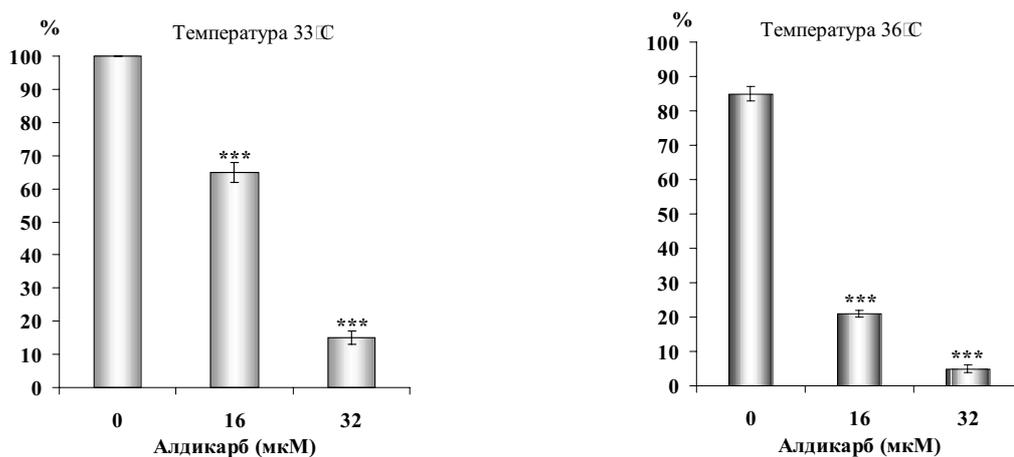
По оси ординат доля червей с нормальным поведением после 30-минутной экспозиции к 32 мкМ алдикарба. По оси абсцисс температура среды. В каждом варианте использовано 30 нематод. В среде без алдикарба при температуре 23, 30 и 33°C как у *C.elegans*, так и у *C.briggsae* сохранялось нормальное поведение у 100% червей. Звездочками отмечена достоверность разницы между контролем (инкубация при 23°C) и опытом (инкубация при 30 или 33°C): * – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$

Рисунок 1. Зависимость чувствительности поведения *C.elegans* и *C.briggsae* к алдикарбу от температуры среды



По оси ординат доля нематод с нормальным поведением после 30-минутной экспозиции к температурам 33 или 36°C в среде с алдикарбом или без алдикарба. По оси абсцисс концентрация алдикарба (мкМ). В каждом варианте использовано 30 нематод. Звездочками отмечена достоверность разницы между контролем (инкубация в среде без алдикарба) и опытом (инкубация в среде с алдикарбом): *** – $p < 0.001$.

Рисунок 2. Чувствительность поведения *C.elegans* к действию высокой температуры и алдикарба



По оси ординат доля нематод с нормальным поведением после 30-минутной экспозиции к температурам 33 или 36°C в среде с алдикарбом или без алдикарба. По оси абсцисс концентрация алдикарба (мкМ). В каждом варианте использовано 30 нематод. Звездочками отмечена достоверность разницы между контролем (инкубация в среде без алдикарба) и опытом (инкубация в среде с алдикарбом): *** – $p < 0.001$.

Рисунок 3. Чувствительность поведения *C.briggsae* к действию высокой температуры и алдикарба

для сильного их нарушения у *C.briggsae* (рис. 3). Высокая, по сравнению с *C.elegans*, термостабильность холинергических синапсов *C.briggsae* может быть причиной высокой, по сравнению с *C.elegans*, устойчивости поведения к температуре 36°C у этой нематоды (рис. 2, 3) [5].

В связи с тем, что линии *C.elegans* и *C.briggsae* выделены из популяций, обитающих в контрастных температурных нишах (умеренные широты и тропики соответственно) [5], [12]–[13], очевидно, что высокая теплоустойчивость холинергических синапсов и, как следствие, поведения у *C.briggsae* является результатом эволюции термотолерантности почвенных нематод рода *Caenorhabditis*.

Известно, что как и у большинства других пойкилотермных Metazoa [3]–[4] эволюция термотолерантности *Caenorhabditis* включает в себя однонаправленные изменения верхнего предела температур для размножения и устой-

чивости поведения к экстремальному повышению температуры среды [5]. Поэтому у линии *C.briggsae* AF16, выделенной из популяции, обитающей в Индии, по сравнению с линией *C.elegans* N2, выделенной из популяции, обитающей на Британских островах, повышены как устойчивость поведения к кратковременному действию экстремальной высокой температуры (рис. 2, 3), так и верхний предел температур для размножения [5]. Если теплоустойчивость фертильности и устойчивость поведения к экстремальному тепловому стрессу являются у *Caenorhabditis* сопряженными признаками, то отбор на повышение теплоустойчивости фертильности в условиях умеренного превышения физиологического оптимума температуры может повышать теплоустойчивость холинергических синапсов и, как следствие, теплоустойчивость локомоции.

26.05.2014

Список литературы:

1. Hoffmann, A.A. Climate change and evolutionary adaptation / A.A. Hoffmann, C.M. Sgro // Nature. – 2011. – V. 470. – P. 479–485.
2. Invertebrates, ecosystem services and climate change / C.M. Prather [etc.] // Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. – 2013. – V. 88. – P. 327–348.
3. Шмидт-Нильсен, К. Физиология животных. Приспособление и среда. В 2 т. / К. Шмидт-Нильсен. – М.: Мир, 1982. – Т. 1. – 414 с.
4. Андроников, В.Б. Терморезистентность гамет и температурные условия размножения пойкилотермных животных / В.Б. Андроников // Успехи соврем. биол. – 1999. – Т. 119. – С. 548–556.
5. Термотолерантность организмов почвенных нематод *Caenorhabditis briggsae* линии AF16 и *Caenorhabditis elegans* линии N2 в эксперименте / Т.Б. Калининкова [и др.] // Экология. – 2011. – №5. – С. 398–400.
6. Natural Variation in the Thermotolerance of Neural Function and Behavior due to a cGMP-Dependent Protein Kinase / K. Dawson-Scully [etc.] // PLoS ONE. – 2007. – P. 773.
7. Robertson, R.M. Temperature and neuronal circuit function: compensation, tuning and tolerance / R.M. Robertson, T.G. Money // Curr. Opin. Neurobiol. – 2012. – V. 22. – P. 724–734.
8. Kalinnikova, T.B. Heat stress: causes, treatment and prevention / T.B. Kalinnikova, R.R. Kolsanova, M.Kh. Gainutdinov. – Eds Josipovic S., Ludwig E. N.Y.: Nova Science Publishers, 2012. – P. 113–140.
9. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function / E.X. Albuquerque [etc.] // Physiol. Rev. – 2009. – V. 89. – P. 73–120.
10. Presynaptic UNC-31 (CAPS) is required to activate the G alpha(s) pathway of the *Caenorhabditis elegans* synaptic signaling network / N.K. Charlie [etc.] // Genetics. – 2006. – V. 172. – P. 943–961.
11. A homolog of FHM2 is involved in modulation of excitatory neurotransmission by serotonin in *C.elegans* / E.G. Govorunova [etc.] // PLoS ONE. – 2010. – V. 5. – e10368.
12. Comparison of a new wild-type *Caenorhabditis briggsae* with laboratory strains of *C.briggsae* and *C.elegans* / A. Fodor [etc.] // Nematologica. – 1983. – V. 29. – P. 203–217.
13. Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* / S. Brenner // Genetics. – 1974. – V. 77. – P. 71–94.
14. О роли гена рецептора серотонина SER-4 в теплоустойчивости поведения *Caenorhabditis elegans* / Т.Б. Калининкова [и др.] // Генетика. – 2013. – Т. 49. – С. 415–419.
15. Tabet, N. Acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease: anti-inflammatories in acetylcholine closing! / N. Tabet // Age and Ageing. – 2006. – V. 35. – P. 336–338.

Сведения об авторах:

Колсанова Руфина Рифкатовна, научный сотрудник лаборатории экспериментальной экологии Института проблем экологии и недропользования Академии наук Республики Татарстан, e-mail: rufina-r@bk.ru

Калининкова Татьяна Борисовна, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной экологии Института проблем экологии и недропользования Академии наук Республики Татарстан, кандидат биологических наук, e-mail: tbkalinnikova@gmail.com

Белова Евгения Борисовна, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной экологии Института проблем экологии и недропользования Академии наук Республики Татарстан, e-mail: dzhesi@yandex.ru

Гайнутдинов Тимур Маратович, научный сотрудник лаборатории экспериментальной экологии
Института проблем экологии и недропользования Академии наук Республики Татарстан,
кандидат биологических наук, e-mail: gt.tashkent@rambler.ru

Гайнутдинов Марат Хамитович, заведующий лабораторией экспериментальной экологии
Института проблем экологии и недропользования Академии наук Республики Татарстан,
доктор биологических наук, профессор, e-mail: mgainutdinov@gmail.com
420087, г. Казань, ул. Даурская, 28, тел. (843) 2985610