

## СЕНСИТИЗАЦИЯ НИКОТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ АЦЕТИЛХОЛИНА СОЦИАЛЬНОЙ ИЗОЛЯЦИЕЙ ПОЧВЕННЫХ НЕМАТОД *CAENORHABDITIS ELEGANS*

Действие социальных сигналов на организм всегда адаптивно для популяций животных, но в ходе регуляции численности популяций может вызывать как снижение плодовитости и выживаемости отдельных особей, так и снижение устойчивости поведения к действию стрессовых условий среды. Известно, что центральные процессы неспецифической стресс-реакции грызунов включают в себя активацию холинергической системы в головном мозге. В связи с тем, что многие функции холинергической системы и их механизмы высококонсервативны в эволюции, можно предположить наличие реакции холинергической системы на стресс, вызванный социальной изоляцией особей, не только у грызунов, но и у простых организмов беспозвоночных.

Для выяснения вопроса о возможном влиянии социальных сигналов на холинергическую систему беспозвоночных были проведены эксперименты со свободноживущей почвенной нематодой *C. elegans*. В этих экспериментах сравнивалась чувствительность плавания, индуцированного механическим стимулом, к ингибитору ацетилхолинэстеразы неостигмину и агонистам никотиновых рецепторов ацетилхолина *C. elegans* левамизолу и никотину у нематод, инкубированных индивидуально и в составе их небольших групп ( $n=3\div 5$ ).

Показано наличие у *C. elegans* эффекта группы, изменяющего реакцию холинергической системы на стресс. У нематод, инкубированных в составе групп ( $n=3\div 5$ ), устойчивость поведения к частичному ингибированию ацетилхолинэстеразы неостигмином выше, чем у нематод, инкубированных индивидуально. Чувствительность плавания, индуцированного механическим стимулом, к левамизолу и никотину значительно выше у нематод, инкубированных индивидуально, по сравнению с нематодами из небольших групп ( $n=3\div 5$ ). Таким образом, реакция простого организма *C. elegans* на стресс включает в себя активацию холинергической системы в результате сенситизации никотиновых рецепторов ацетилхолина.

**Ключевые слова:** *Caenorhabditis elegans*, социальная изоляция, никотиновые рецепторы ацетилхолина, социальные сигналы, поведение.

### Введение

Информация об организмах своего вида чрезвычайно важна для существования популяций животных в изменяющейся окружающей среде [1]. Эта информация передается в виде различных социальных сигналов (химические, звуковые, тактильные, визуальные и др.), которые воспринимаются сенсорными системами и вызывают стереотипные изменения поведения и физиологического состояния организмов животных [1–4]. Действие социальных сигналов на организм всегда адаптивно для популяций животных, но в ходе регуляции численности популяций может вызывать как снижение плодовитости и выживаемости отдельных особей, так и формирование у субдоминантных особей таких форм поведения как избегание местобитаний с высокой численностью животных того же вида [1] и снижение устойчивости поведения к действию стрессовых условий среды [5]. Поэтому негативное влияние социальных сигналов или их отсутствия (социальная изоляция) на поведение грызунов используется как модель для изучения механизмов негативного влияния

стрессовых условий среды на нервную систему человека, вызывающего состояния страха и тревоги, развивающиеся в депрессию [5]–[7]. Результаты этих исследований, имеющие важное значение и для популяционной экологии, сводятся к следующему:

1. Чрезмерно высокая плотность грызунов является стрессом, вызывающим негативные изменения функций нервной системы в их экспериментальных группах [5]. В то же время социальная изоляция грызунов также является стрессом с негативным влиянием на развитие нервной системы и поведение взрослых грызунов [6]–[7].

2. Центральные процессы неспецифической стресс-реакции грызунов как на социальные, так и другие стрессы включают в себя активацию холинергической системы в головном мозге [5], [8]–[10].

В связи с тем, что многие функции холинергической системы и их механизмы высококонсервативны в эволюции, можно предположить наличие реакции холинергической системы на стресс, вызванный социальной изоляцией

особей, не только у грызунов, но и у простых организмов беспозвоночных. Целью работы явилась проверка этой гипотезы с использованием в качестве модельного организма почвенной нематоды *Caenorhabditis elegans*, холинергическая система которой хорошо изучена методами молекулярной биологии и молекулярной генетики [11]–[12].

### Методы

Эксперименты проводили с *C. elegans* линии дикого типа N2, полученной из *Caenorhabditis Genetics Center*, выращенными при 22°C в чашках Петри со стандартной средой выращивания нематод [13]. Для кормления нематод использовали *E.coli* OP50. Нематод трехдневного возраста трижды отмывали от среды выращивания и *E.coli* 10 мл NG буфера (0,3% NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM калий-фосфатного буфера (pH 6,0)) и переносили индивидуально или в составе небольших групп (n=3÷5) в пробирки с 1 мл NG буфера. Для выяснения вопроса о возможном влиянии социальных сигналов на холинергическую систему *C. elegans* в пробирки с социально изолированными нематодами или группами нематод добавляли ингибитор ацетилхолинэстеразы (АХ-эстеразы) неостигмина бромид (15 mM) или агонисты никотиновых рецепторов ацетилхолина (н-холинорецепторов) левамизола гидрохлорид и никотина гемисульфат, которые вызывают нарушения плавания *C. elegans*, индуцированного механическим стимулом (встряхиванием пробирки с червем) из-за аномального повышения концентрации ацетилхолина (АХ) или гиперактивации н-холинорецепторов. Эти нарушения проявлялись в нарушениях координации локомоторных мышц, необходимой для синусоидальных движений тела при плавании, временной приостановке плавания, плавании по кругу и др. Нарушения регистрировались в течение 10 секунд после стимула через 30 минут экспозиции к левамизолу, через 120 минут экспозиции к никотину и каждые 30 минут экспозиции к неостигмину в течение 120 минут. Для регистрации нарушений локомоции использовали стереоскопический микроскоп SMZ-05. Неостигмин является нетоксичным для организма человека ингибитором АХ-эстеразы. В экспериментах с *C. elegans* он вызывает ано-

мальное повышение концентрации АХ, нарушающее поведение, только при концентрации 10–15 mM, используемой в этой работе. Левамизол – это агонист н-холинорецепторов. Он используется в качестве нематоцида и нарушает поведение *C. elegans* при относительно низких концентрациях (30–60 мкМ) после 30-минутной экспозиции. Никотин также является агонистом н-холинорецепторов, но нарушает поведение *C. elegans* при более высоких концентрациях (3–6 mM) и длительных экспозициях (1–2 часа), чем левамизол. В каждом варианте эксперимента использовано 30 червей. Статистическую обработку результатов проводили с использованием **t-критерия Стьюдента**. В работе использовали реактивы фирмы Sigma.

Высокие концентрации никотина (3–6 mM) и неостигмина (15 mM), использованные в работе, те же, что и в исследованиях, проведенных ранее [14]–[15], и объясняются тем, что из-за чрезвычайно низкой проницаемости кутикулы *C. elegans* концентрации многих лекарственных средств и токсикантов, эффективные для изменения поведения, для *C. elegans* на 3–4 порядка выше, чем для *Daphnia magna* или кольчатых червей [16]–[17].

### Результаты и их обсуждение

Для выяснения вопроса о возможном влиянии социальных сигналов на холинергическую систему *C. elegans* были проведены эксперименты, в которых сравнивалась чувствительность плавания, индуцированного механическим стимулом, к ингибитору АХ-эстеразы неостигмину и агонистам н-холинорецепторов *C. elegans* левамизолу и никотину у нематод, инкубированных индивидуально и в составе их небольших групп (n=3÷5). В исследованиях молекулярных механизмов функций холинергической системы *C. elegans* широко используется фармакологический (токсикологический) анализ, который включает в себя измерение чувствительности локомоции к ингибированию АХ-эстеразы алдикарбом и гиперактивации н-холинорецепторов их агонистами левамизолом и никотином [11]–[12]. Этот анализ позволил выявить изменения функций холинергических синапсов, вызванные мутациями каждого из нескольких десятков генов, продукты которых влияют на секрецию ацетилхолина

(АХ) и чувствительность к нему, и поэтому был использован в этой работе для проверки предположения о том, что эффект группы особей изменяет функции холинергической системы *C. elegans*.

В связи с тем, что алдикарб является пестицидом, высокотоксичным для организма человека, в экспериментах с грызунами для активации их холинергической системы используются малотоксичные ингибиторы АХ-эстеразы, являющиеся медикаментозными средствами для лечения заболеваний нервной системы [5], [8]. Поэтому и в наших экспериментах с *C. elegans* вместо алдикарба был использован неостигмин, который в качестве нетоксичного ингибитора АХ-эстеразы используется в медицине.

Как показано на рисунке 1, частичное ингибирование АХ-эстеразы неостигмином вызывает нарушения моторной программы плавания *C. elegans*, индуцированного механическим стимулом (нарушения координации локомоторных мышц, необходимой для синусоидальных движений тела при плавании, временная приостановка плавания, плавание по кругу или полное обездвиживание червей). Эти нарушения обусловлены аномальным повышением уровня АХ в холинергических синапсах, принимающих участие в координации процессов сокращения

и расслабления мышц, необходимой для синусоидальных движений тела при плавании [12].

Результаты экспериментов, в которых сравнивалась чувствительность поведения к неостигмину у нематод, инкубированных индивидуально, и у нематод, находившихся в составе небольших ( $n=3\div 5$ ) групп червей, показали наличие эффекта группы, проявляющегося в повышении устойчивости поведения к частичному ингибированию АХ-эстеразы неостигмином (рис. 1). В связи с тем, что изменения чувствительности локомоции *C. elegans* к ингибированию АХ-эстеразы коррелируют с изменениями функций холинергических синапсов, вызванных мутациями генов, контролирующими эти функции [12], очевидно, что и эффект группы в наших экспериментах является следствием снижения активности холинергической системы *C. elegans* взаимодействиями между особями в группе.

Двумя возможными причинами эффекта группы, проявляющегося при измерении чувствительности поведения *C. elegans* к ингибированию АХ-эстеразы (рис. 1), являются торможение социальными сигналами секреции АХ нейронами или снижение ими чувствительности рецепторов АХ в постсинаптических нейронах или мышцах. Поэтому нами были проведены эксперименты, в которых выяснялась возможность проявления эффекта группы при измерении чувствительности поведения к агонистам никотиновых рецепторов *C. elegans* левамизолу и никотину. Как показано на рис. 2–3, левамизол и никотин вызывают обратимые нарушения поведения *C. elegans*, идентичные нарушениям поведения, индуцированным ингибированием АХ-эстеразы (рис. 1). Следовательно, причиной нарушения моторной программы плавания аномальным повышением внеклеточной концентрации АХ частичным ингибированием АХ-эстеразы является гиперактивация н-холинорецепторов.

Как показано на рисунках 2–3, чувствительность плавания, индуцированного механическим стимулом, к левамизолу и никотину значительно выше у нематод, инкубированных

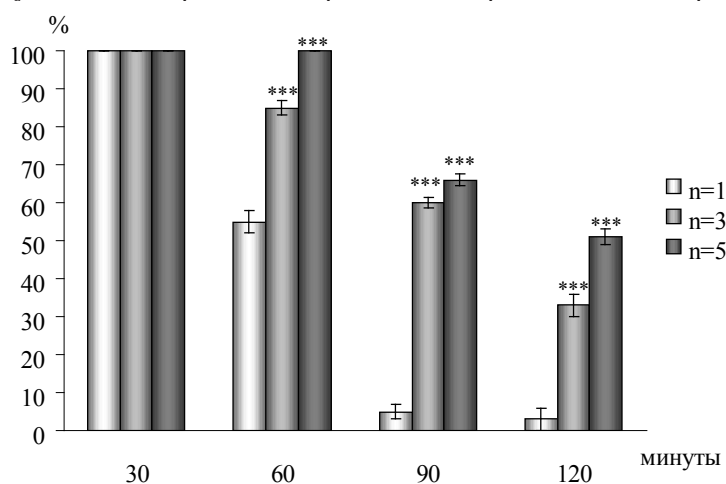


Рисунок 1. Эффект группы при действии неостигмина на поведение *C. elegans*

По оси ординат – доля нематод с нормальным поведением после экспозиции к неостигмину.

По оси абсцисс – время экспозиции нематод к неостигмину.

Концентрация неостигмина 15 мМ.

n – количество червей в группе. Звездочками отмечена достоверность разницы между устойчивостью к неостигмину социально изолированных червей и червей в составе группы ( $n=3\div 5$ ): \*\*\* –  $p < 0.001$

индивидуально, по сравнению с нематодами из небольших групп ( $n=3\div 5$ ). Известно наличие у *C. elegans* двух основных подтипов н-холинорецепторов, соответственно L-подтипа, чувствительных к левамизолу, и N-подтипа, чувствительных к никотину [11]–[12]. Поэто-

му проявление эффекта группы при действии как левамизола, так и никотина на поведение *C. elegans* (рис. 2–3) свидетельствует о том, что этот эффект является следствием снижения чувствительности н-холинорецепторов как L-подтипа, так и N-подтипа.

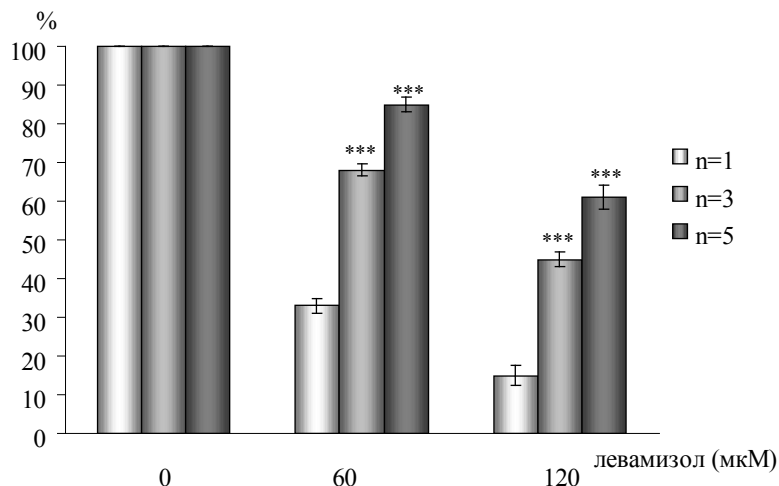


Рисунок 2. Эффект группы при действии левамизола на поведение *C. elegans*

По оси ординат – доля червей с нормальным поведением после 30-минутной экспозиции к левамизолу. По оси абсцисс – концентрация левамизола, мкМ.

n – количество червей в группе. Звездочками отмечена достоверность разницы между устойчивостью к левамизолу социально изолированных червей и червей в составе группы ( $n=3\div 5$ ): \*\*\* –  $p < 0.001$

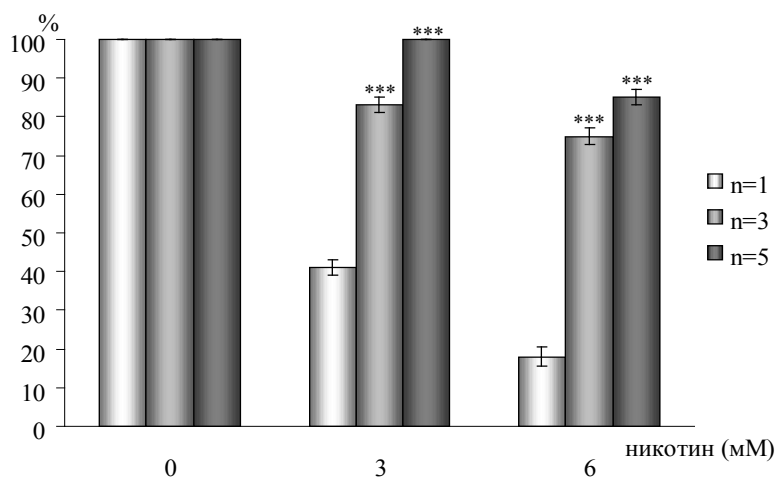


Рисунок 3. Эффект группы при действии никотина на поведение *C. elegans*

По оси ординат – доля червей с нормальным поведением после двухчасовой экспозиции к никотину. По оси абсцисс – концентрация никотина, мМ.

n – количество червей в группе. Звездочками отмечена достоверность разницы между устойчивостью к никотину социально изолированных червей и червей в составе группы ( $n=3\div 5$ ): \*\*\* –  $p < 0.001$

В связи с тем, что наши эксперименты проводились в отсутствие в среде *E. coli*, причиной эффекта группы, выявляющегося в снижении чувствительности поведения *C. elegans* к частично ингибированию АХ-эстеразы неостигмином (рис. 1) и гиперактивации н-холинорецепторов левамизолом (рис. 2) и никотином (рис. 3), не может быть конкуренция нематод за пищу. Поэтому единственно возможной причиной этого эффекта является непрерывное влияние социальных сигналов на холинергическую систему *C. elegans*, которое отсутствует в экспериментах с нематодами, инкубированными индивидуально.

Известно, что социальная изоляция грызунов является для них стрессом, оказывающим негативное влияние на развитие их нервной системы и поведение [6]–[7]. В то же время неспецифическая стресс-реакция грызунов на неблагоприятные факторы среды проявляется в активации холинергической системы в головном мозге [5, [8]–[10]. Результаты этой работы показывают, что и для *C. elegans* социальная изоляция особей является стрессом, вызывающим активацию холинергической системы (схема на рис. 4).

У *C. elegans* основными социальными сигналами являются феромоны, регулирующие численность популяции, переход личинок II возраста в диапаузу и некоторые формы поведения [2]–[3]. Поэтому наиболее веро-

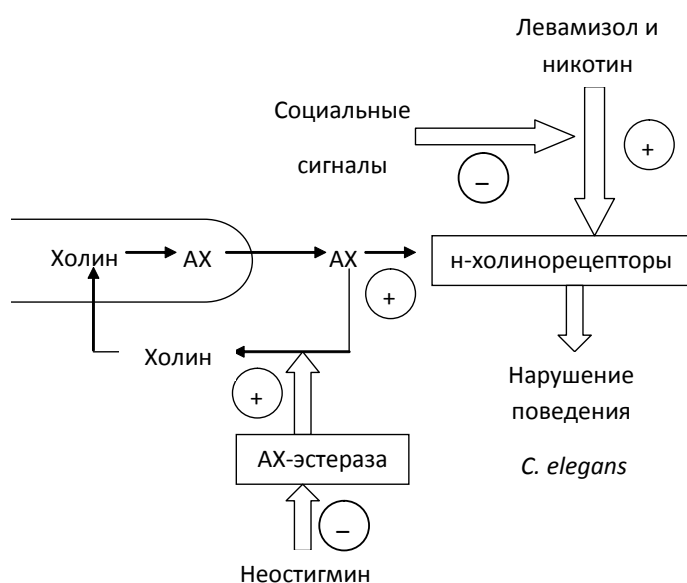


Рисунок 4. Общая схема влияния социальных сигналов на чувствительность поведения *C. elegans* к левамизолу, никотину и неостигмину.  
 АХ – ацетилхолин  
 АХ-эстераза – ацетилхолинэстераза

ятым механизмом эффекта группы, проявляющегося в изменении функций холинергической системы *C. elegans*, является непрерывная стимуляция феромонами хемосенсорных нейронов. В то же время известно, что развитие нервной системы *C. elegans* регулируют и сигналы о партнерах по популяции, воспринимаемые механосенсорными нейронами [4]. Поэтому необходимы дополнительные исследования для идентификации социальных сигналов, регулирующих функции холинергической системы *C. elegans* изменением чувствительности н-холинорецепторов.

Активация холинергической системы сенситизацией н-холинорецепторов выявляется не

только в условиях социальной изоляции, но и при действии теплового стресса [18]. Следовательно, социальная изоляция является стрессом, активирующим холинергическую систему *C. elegans*.

В целом результаты этой и нашей предыдущей работы [18] свидетельствуют о том, что реакция простого организма *C. elegans* на стресс, так же как и реакция на стресс организмов грызунов [5], [8]–[10] включает в себя активацию холинергической системы. В то же время известным механизмом активации холинергической системы организмов грызунов является стимуляция секреции АХ нейронами [8], [10], в то время как активация холинергической системы *C. elegans* тепловым стрессом [18] и социальной изоляцией нематод (рис. 2–3) происходит в результате сенситизации н-холинорецепторов. Это различие активации холинергической системы

стрессом могло появиться в ходе эволюции организмов Metazoa. В то же время возможно, что у *C. elegans* и у грызунов в стрессовых условиях среды могут использоваться оба механизма активации холинергической системы (стимуляция секреции АХ и увеличение чувствительности к нему) в зависимости от фактора среды, являющегося стрессом, но в экспериментах с *C. elegans* исследовалось действие на холинергическую систему только теплового стресса [18] и социальной изоляции, а в исследованиях активации стрессом холинергической системы в головном мозге грызунов из-за их сложности не оценивались изменения чувствительности н-холинорецепторов.

7.12.2015

#### Список литературы:

1. Wilson E.O. Sociobiology: the new synthesis. – Cambridge (Massachusetts): London: The Belknap Press of Harvard University Press, 2002. – 720 p.
2. Srinivasan J., von Reuss S.H., Bose N., Zaslaver A., Mahanti P., Ho M.C., O'Doherty O.G., Edison A.S., Sternberg P.W., Schroeder F.C. A modular library of small molecule signals regulates social behavior in *Caenorhabditis elegans* // PLoS Biology. – 2012. – V. 10. – P. e1001237.
3. Ludwig A.H., Schroeder F.C. Ascaroside signaling in *C. elegans* // WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.155.1, <http://www.wormbook.org>.
4. Rose J.K., Sangha S., Rai S., Norman K.R., Rankin C.H. Decreased sensory stimulation reduces behavioral responding, retards development and alters neuronal connectivity in *Caenorhabditis elegans* // J. Neurosci. – 2005. – V. 25. – P. 7159–7168.
5. Mineur Y.S., Obayemi A., Wigstrand M.B., Fote G.M., Calarco C.A., Li A.M., Picciotto M.R. Cholinergic signaling in the hippocampus regulates social stress resilience and anxiety- and depression-like behavior // PNAS. – 2013. – V. 110. – P. 3573–3578.
6. Trabace L., Zotti M., Colaianna M., Morgese M.G., Schiavone S., Tucci P., Harvey B.H., Wegener G., Cuomo V. Neurochemical differences in two rat strains exposed to social isolation rearing // Acta Neuropsychiatrica. – 2012. – V. 24. – P. 286–295.
7. Fischer C.W., Liebenberg N., Elfving B., Lund S., Wegener G. Isolation-induced behavioral changes in a genetic animal model of depression // Behav. Brain Res. – 2012. – V. 230. – P. 85–91.

8. Picciotto M.R., Higley M.J., Mineur Y.S. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior // *Neuron*. – 2012. – V. 76. – P. 116–129.
9. Belujon P., Grace A.A. Hippocampus, amigdala, and stress: interacting systems that affect susceptibility to addiction // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2011. – V. 1216. – P. 114–121.
10. Gilad G.M. The stress-induced response of the septo-hippocampal cholinergic system. A vectorial outcome of psychoneuroendocrinological interactions // *Psychoneuroendocrinology*. – 1987. V. 12. – P. 167–184.
11. Sattelle D.B. Invertebrates nicotinic acetylcholine receptors – targets for chemicals and drugs important in agriculture, veterinary medicine and human health // *J. Pesti. Sci.* – 2009. – V. 34. – P. 233–240.
12. Jospin M., Qi Y.B., Stawicki T.M., Boulin T., Schuske K.R., Horvitz R., Bessereau J.-L., Jorgensen E.M., Jin Y. A neuronal acetylcholine receptor regulates the balance of muscle excitation and inhibition in *Caenorhabditis elegans* // *PLoS Biology*. – 2009. – V. 7. – P. e1000265.
13. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* // *Genetics*. – 1974. – V. 77. – P. 71–94.
14. Gottshalk A., Almedon R.B., Schedletzky T., Anderson S.D., Yates J.R. III, Schafer W.R. Identification and characterization of novel nicotinic-receptor-associated proteins in *Caenorhabditis elegans* // *The EMBO J.* – 2005. – V. 24. – P. 2566–2578.
15. Kalinnikova T.B., Shagidullin R.R., Kolsanova R.R., Osipova E.B., Zakharov S.V., Gainutdinov M.Kh. Acetylcholine deficiency in *Caenorhabditis elegans* induced by hyperthermia can be compensated by ACh-esterase inhibition or activation of GAR-3 mAChRs // *Environment and Natural Resources Research* – 2013 – V. 3. – P. 98–113.
16. Chase D.L., Pepper J.S., Koelle M.R. Mechanism of extrasynaptic dopamine signaling in *Caenorhabditis elegans* // *Nature Neurosci.* – 2004. – V. 7. – P. 1096–1103.
17. Tissenbaum H.A., Hawdon J., Perregaux M., Hotez P., Guarente L., Ruvkin G. A common muscarinic pathway for diapause recovery in the distantly related nematode species *Caenorhabditis elegans* and *Ancylostoma caninum* // *PNAS*. – 2000. – V. 97. – P. 460–465.
18. Колсанова Р.Р., Белова Е.Б., Гайнутдинов М.Х., Калининкова Т.Б. Сенситизация н-холинорецепторов как новый механизм адаптации почвенной нематоды *Caenorhabditis elegans* к действию теплового стресса и высокой плотности особей в популяции // Сборник научных трудов Института проблем экологии и недропользования АН РТ. – Казань: Отечество, 2014. – С. 134–145.

**Сведения об авторах:**

**Белова Евгения Борисовна**, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной экологии Института проблем экологии и недропользования Академии наук Республики Татарстан  
420087, г. Казань, ул. Даурская, д. 28, ИПЭН АН РТ, тел.: (843)2985610, e-mail: dzhesi@yandex.ru

**Колсанова Руфина Рифкатовна**, научный сотрудник лаборатории экспериментальной экологии Института проблем экологии и недропользования Академии наук Республики Татарстан  
420087, г. Казань, ул. Даурская, д. 28, ИПЭН АН РТ, тел.: (843)2985610, e-mail: rufina-r@bk.ru

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

**Калининкова Татьяна Борисовна**, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной экологии Института проблем экологии и недропользования Академии наук Республики Татарстан, кандидат биологических наук  
420087, г. Казань, ул. Даурская, д. 28, ИПЭН АН РТ, тел.: (843)2985610, e-mail: tbkalinnikova@gmail.com