

Секция: Биологические науки

Егорова Анастасия Васильевна

младший научный сотрудник

Институт проблем экологии и недропользования

Академии наук Республики Татарстан;

магистрант кафедры прикладной экологии

Института экологии и природопользования

Казанского (Приволжского) федерального университета,

г. Казань, Россия

Хакимова Диляра Махмутриевна

кандидат медицинских наук,

старший преподаватель кафедры морфологии и общей патологии

Институт фундаментальной медицины и биологии

Казанского (Приволжского) федерального университета

г. Казань, Россия

Гайнутдинов Марат Хамитович

доктор биологических наук, профессор, старший научный сотрудник

Институт проблем экологии и недропользования

Академии наук Республики Татарстан

г. Казань, Россия

Калинникова Татьяна Борисовна

кандидат биологических наук,

заведующая лабораторией экспериментальной экологии

Институт проблем экологии и недропользования

Академии наук Республики Татарстан

г. Казань, Россия

ВЛИЯНИЕ pH СРЕДЫ НА ХОЛИНЕРГИЧЕСКУЮ СИСТЕМУ ПОЧВЕННОЙ НЕМАТОДЫ *Caenorhabditis elegans*

pH является важнейшим фактором внутриклеточной среды для одноклеточных и многоклеточных организмов животных из-за его сильного влияния на активность большинства ферментов и транспортных процессов в мембранах клеток и внутриклеточных органелл [1]. Поэтому поддержание относительно постоянных значений pH как во внутриклеточном, так и в межклеточном пространстве является необходимым условием жизни организмов Metazoa [1–2]. pH такой среды обитания животных, как почва варьирует в крайне широких пределах, от 3,5 до 9,0 и выше. Для поддержания постоянного pH в организме почвенные нематоды приобрели в ходе эволюции эффективные механизмы регуляции этого показателя, позволяющие поддерживать уровень pH, необходимый для метаболизма, в условиях сильного закисления и защелачивания почвы. Известно, что почвенные нематоды *C. elegans* выживают в течение 96 часов в диапазоне pH среды 3,2–11,8 [4] и сохраняют способность к размножению при снижении pH среды до 4,6 [5]. Значительную роль в защите организмов нематод от негативного влияния pH почвы играет отсутствие проницаемости кутикулы для H^+ и OH^- ионов. Также известно, что экстремальные pH вызывают у *C. elegans* экспрессию генов ферментов, регулирующий внутриклеточный pH [2, 6]. В то же время хорошо известно существование в организмах человека и млекопитающих многочисленных ионных каналов с высокой чувствительностью к pH [1, 5], а наличие таких каналов в сенсорных нейронах свидетельствует о том, что информация об изменениях pH поступает в нервную систему для регуляции pH в организме. У *C. elegans* с окружающей средой, в которой сильно изменяется pH, контактируют хемосенсорные нейроны. Поэтому возможно, что и для простой нервной

системы этой нематоды большое значение имеет информация о pH окружающей среды. Кроме того, pH среды может оказывать влияние на pH организма нематоды и через кишечник при питании. Поэтому можно предположить влияние сильных изменений pH окружающей среды на организмы почвенных нематод. Одну из ключевых ролей в функциях нервной системы нематод играет холинергическая система, поскольку более половины из 302 нейронов *C. elegans* являются холинергическими [6]. Известно, что повышение pH среды с 6,0 до 8,0 увеличивает токсичность агониста никотиновых рецепторов ацетилхолина (н-холинорецепторов) левамизола для организмов *C. elegans* и *C. briggsae* [7]. Поэтому можно предположить влияние сильных изменений pH на холинергическую систему почвенных нематод, которое может проявляться как в нарушениях ее функций, так и в адаптивных изменениях ее активности. Целью работы явилась проверка этого предположения в экспериментах с *C. elegans*.

Методика исследования. *C. elegans* линии дикого типа N2 Bristol и *C. briggsae* линии дикого типа AF16 выращивали при 22°C в чашках Петри со стандартной средой выращивания нематод (CBH) и *E. coli* OP50 [8]. Эксперименты проводили в NG буфере (0,3 % NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, и 25 mM калийфосфатного буфера (pH=7.0 или 8.0)). Червей переносили индивидуально в стеклянные стаканчики, содержащие 1 mL NG буфера (pH=7.0 или 8.0). Нарушения плавания червей, индуцированного механическим стимулом (встряхивание пробирки с червем), вызванные действием алдикарба, никотина и левамизола, наблюдали через 15 минут экспозиции к токсикантам при температуре 22°C. Эти нарушения проявлялись в нарушениях координации мышц, необходимой для синусоидальных движения при плавании, и в невозможности поддерживать способность к плаванию в течение 10 секунд

после стимула. Ареколин и атропин добавляли в среду вместе с алдикарбом, никотином и левамизолом.

Высокие концентрации лекарственных средств, использованные в работе (10^{-3} М и более), объясняются чрезвычайно низкой проницаемостью кутикулы *C. elegans* и *C. briggsae* для лекарственных средств и токсикантов.

Эксперименты проводили с июня по август. В каждом варианте эксперимента, проведенном в трех повторностях, использовано 30 червей. Статистическую обработку результатов проводили с использованием углового преобразования Фишера ϕ^* .

Результаты и их обсуждение. Для идентификации изменений активности холинергической системы *C. elegans*, вызванных физическими факторами окружающей среды и многочисленными мутациями генов, регулирующих функции этой системы, широко используется фармакологический анализ поведения [9]. Этот анализ включает в себя измерение чувствительности поведения к частичному ингибированию ацетилхолинэстеразы (АХ-эстеразы) и к гиперактивации н-холинорецепторов левамизолом и никотином [9]. Левамизол, никотин и алдикарб вызывают нарушения координации мышц тела, необходимой для плавания *C. elegans*, индуцированного механическим стимулом [9] (табл. 1). Как показано в табл. 1, увеличение рН среды с 6.0 до 7.0 вызывает сильное увеличение чувствительности поведения *C. elegans* к действию левамизола и никотина, в то время как повышение рН не оказывает влияния на чувствительность поведения к алдикарбу.

Влияние рН на чувствительность поведения *Caenorhabditis elegans* к левамизолу, никотину и алдикарбу

Условия эксперимента	Доля червей (в %), сохранивших нормальное поведение после 15-минутной экспозиции к левамизолу, никотину или алдикарбу								
	Левамизол, мкМ			Никотин мМ			Алдикарб мкМ		
	30	60	120	1	2	4	60	120	240
	100	79±3	52±1	100	82±4	48±3	100	76±3	28±2
	43±2	15±1	–	69±3	32±2	20±1	100	72±2	25±1

Как правило, сенситизация поведения *C. elegans* к действию левамизола и никотина рассматривается как следствие гиперактивации н-холинорецепторов, так как левамизол является самым эффективным агонистом н-холинорецепторов нематод [10], а никотин, как известно, – агонист н-холинорецепторов человека, насекомых и нематод. В то же время известным следствием сенситизации н-холинорецепторов является увеличение чувствительности поведения *C. elegans* к повышению уровня эндогенного ацетилхолина частичным ингибированием АХ-эстеразы [9]. Однако в наших экспериментах сенситизация поведения к действию ингибитора АХ-эстеразы алдикарба после увеличения рН с 6.0 до 7.0 не выявлялась (табл. 1).

Два возможных объяснения отсутствия сенситизации поведения к частичному ингибированию АХ-эстеразы увеличением рН среды, вызывающим сенситизацию поведения к агонистам н-холинорецепторов, заключаются в следующем.

1. Увеличение рН среды вызывает увеличение чувствительности поведения к левамизолу и никотину не в результате сенситизации н-холинорецепторов, а вследствие увеличения проницаемости кутикулы, вызванной депротонизацией молекул левамизола и никотина [7].

2. н-холинорецепторы *C. elegans* являются ионными каналами с высокой чувствительностью к изменениям рН в организме, но их

сенситизация увеличением рН компенсируется снижением скорости секреции ацетилхолина нейронами, регулирующими локомоцию, и поэтому не происходит сенситизация поведения к действию алдикарба.

Второе из этих объяснений находится в соответствии с современными представлениями о гомеостазе синаптических связей между нейронами и нейронами и мышцами [11–12]. Эти представления сводятся к двум положениям:

1. Процессы синаптической передачи детерминированы и относительно стабильны, несмотря на высокую чувствительность нейронов к малейшим воздействиям физических факторов среды и лекарственных средств на нервную систему, которая проявляется в изменениях секреции нейротрансмиттеров и чувствительности постсинаптических нейронов и мышц к действию нейротрансмиттеров [11–12].

2. Стабильность синаптической трансмиссии достигается компенсаторными процессами, развивающимися в зависимости от их механизмов в течение секунд, минут и часов после внешнего воздействия на синапс [11–12].

Таблица 2

Влияние атропина и ареколина на чувствительность поведения *Caenorhabditis elegans* к левамизолу при рН 6.0 и 8.0

Условия эксперимента	Доля червей (в %%), сохранивших нормальное поведение после 15-минутной экспозиции к левамизолу					
	Левамизол, мкМ					
	рН 6.0			рН 8.0		
	30	60	120	7.5	15	30
Контроль	100	82±3	56±2	100	75±3	41±2
+ 2 мМ атропина	100	70±2	41±2	71±3	38±2	12±1
+ 1 мМ ареколина	100	65±3	35±1	48±1	21±1	8±1

Возможно, что влияние рН на чувствительность н-холинорецепторов не является прямым, так как эта чувствительность модулируется активацией метаботропных мускариновых рецепторов ацетилхолина (м-холинорецепторы) [13–14]. В пользу этого предположения свидетельствуют результаты экспериментов, в которых исследовалось влияние рН среды на чувствительность *C. elegans* к агонисту м-холинорецепторов ареколину и их антагонисту атропину в условиях нарушения поведения нематод левамизолом. Как показано в табл. 2, ареколин и атропин сенситизируют поведение *C. elegans* к действию левамизола. Следовательно, как активация м-холинорецепторов ареколином, так и блокирование этих рецепторов атропином вызывают сенситизацию н-холинорецепторов L-подтипа в организме *C. elegans*. Кажущаяся парадоксальность этих результатов объясняется наличием у *C. elegans* трех подтипов м-холинорецепторов (GAR-1, GAR-2 и GAR-3), активация которых может вызывать противоположно направленные изменения возбудимости нейронов [14–15], и эти противоположно направленные изменения могут происходить даже в одном нейроне, если в нем экспрессируются гены двух подтипов м-холинорецепторов.

Как показано в табл. 2, увеличение рН среды значительно усиливает сенситизацию поведения к действию левамизола, вызванную ареколином и атропином. Следовательно, модуляция чувствительности н-холинорецепторов внутриклеточными сигналами, поступающими из м-холинорецепторов, обладает высокой чувствительностью к рН среды. Влияние рН, проявляющееся в этих экспериментах, нельзя объяснить изменением проницаемости кутикулы для атропина и ареколина, так как рН не может оказывать влияние на конформацию их молекул. Поэтому очевидно, что рН среды увеличивает чувствительность м-холинорецепторов и, как следствие, усиливает модуляцию

чувствительности н-холинорецепторов, осуществляемую этими рецепторами при их связывании с ацетилхолином.

Литература

1. Holzer P. Acid-sensitive ion channels and receptors / P. Holzer // In: Sensory nerves. Handbook of experimental pharmacology / Eds. B.J. Canning and D. Spina – NY: Springer, 2009. – P. 283–332.
2. Hall R.A. External pH influences the transcriptional profile of the carbonic anhydrase, CAH-4b in *Caenorhabditis elegans* / R.A. Hall, D. Vullo, A. Innocenti, A. Scozzafava, C.T. Supuran, P. Klappa, F.A. Muhlschlegel // *Mol. Biochem. Parasitol.* – 2008. – V. 161. P. 140–149.
3. Supuran C.T. Carbonic anhydrases – an overview / C.T. Supuran // *Curr. Pharm. Des.* – 2008. – V. 14. – P. 603–614.
4. Khanna N. Tolerance of the nematode *Caenorhabditis elegans* to pH, salinity and hardness in aquatic media / N. Khanna, C.P. Cressman III, C.P. Tataru, P.L. Williams // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* – 1997. – V. 32. – P. 110–114.
5. Boyd W.A. A high-throughput method for assessing chemical toxicity using a *Caenorhabditis elegans* reproduction assay / W.A. Boyd, S.J. McBride, J.R. Rice, D.W. Snyder, J.H. Freedman // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2010. – V. 245. – P. 153–159.
6. Pereira L. A cellular and regulatory map of the cholinergic nervous system of *C. elegans* / L. Pereira, P. Kratsios, E. Serrano-Saiz, H. Sheftel, A.E. Mayo, D.H. Hall, J.G. White, B. LeBoeuf, L.R. Garcia, U. Alon, O. Hobert // *eLife.* – 2015. – V. 4. – P. e12432.
7. Белова Е.Б. Влияние pH среды на чувствительность нематод *Caenorhabditis elegans* и *Caenorhabditis briggsae* к токсическому действию левамизола и никотина / Е.Б. Белова, Р.Р. Колсанова, О.Ю.

- Тарасов, Р.Р. Шагидуллин, Т.Б. Калининкова, М.Х. Гайнутдинов // Ветеринарный врач. – 2015. – № 4. – С. 23–28.
8. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* / S. Brenner // *Genetics*. – 1974. – V. 77. – P. 71–94.
 9. Kalinnikova T.B. Opposite responses of the cholinergic nervous system to moderate heat stress and hyperthermia in two soil nematodes / T.B. Kalinnikova, R.R. Kolsanova, E.B. Belova, R.R. Shagidullin, M.Kh. Gainutdinov // *J. Therm. Biol.* – 2016. – V. 62. – P. 37–49.
 10. Satelle D.B. Invertebrate nicotinic acetylcholine receptors – targets for chemicals and drugs important in agriculture, veterinary medicine and human health / D.B. Satelle // *J. Pestic. Sci.* – 2009. – V. 34. – P. 233–240.
 11. Marder E. Variability, compensation and homeostasis in neuron and network function / E. Marder, J.-M. Goaillard // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2006. – V. 7. – P. 563–574.
 12. Davis G.W. Homeostatic control of neural activity: from phenomenology to molecular design / G.W. Davis // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2006. – V. 29. – P. 307–323.
 13. Гайнутдинов М.Х. Сенситизация никотиновых рецепторов ацетилхолина почвенной нематоды *Caenorhabditis elegans* активацией мускариновых рецепторов ареколином / М.Х. Гайнутдинов, Е.Б. Белова, Т.Б. Калининкова, Р.Р. Колсанова, Р.Р. Шагидуллин // *Журн. эвол. биох. физиол.* – 2015. – Т. 51. – С. 305–307.
 14. Kim S. Regulation of ERK1/2 by the *C.elegans* muscarinic acetylcholine receptors GAR-3 in Chinese hamster ovary cells / S. Kim, Y. Shin, Y. Shin, Y.-S. Park, N.J. Cho // *Mol. Cells.* – 2008. – V. 25. – P. 504–509.
 15. Lee Y.S. Characterization of GAR-2, a novel G protein-linked acetylcholine receptor from *Caenorhabditis elegans* / Y.S. Lee, Y.S. Park, S. Nam, S.J. Suh, J. Lee, B.K. Kaang, Cho N.J. // *J. Neurochem.* – 2000. – V. 75. – P. 1800–1809.