

Калинникова Татьяна Борисовна

канд. биол. наук, старший научный сотрудник

Яхина Айгуль Фанузовна

младший научный сотрудник

Гайнутдинов Марат Хамитович

д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией

Институт проблем экологии и недропользования АН РТ

г. Казань, Республика Татарстан

ПОЧВЕННАЯ НЕМАТОДА CAENORHABDITIS BRIGGSAE КАК УДОБНЫЙ МОДЕЛЬНЫЙ ОРГАНИЗМ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ДЕЙСТВИЯ АНТИГЕЛЬМИНТНЫХ СРЕДСТВ

***Аннотация:** в экспериментах с *C. briggsae* продемонстрировано, что чувствительность поведения *C. briggsae* к действию левамизола и никотина значительно выше, чем у нематод близкородственного вида *Caenorhabditis elegans*, являющегося модельным организмом при изучении действия антигельминтных средств.*

***Ключевые слова:** *Caenorhabditis briggsae*, *Caenorhabditis elegans*, антигельминтные препараты, левамизол, никотин, алдикарб.*

В настоящее время различные гельминтозы сельскохозяйственных животных широко распространены на территории России и причиняют значительный экономический ущерб, складывающийся из снижения продуктивности и, нередко, падежа. Поэтому актуальной задачей является разработка и внедрение в практику новых высокоэффективных антигельминтных препаратов с широким спектром действия. В России поиск новых антигельминтиков и доклиническая разработка новых методов химиотерапии гельминтозов до сих пор ведутся на лабораторных моделях животных, экспериментально зараженных гельминтозами, имеющими медицинское или ветеринарное значение или близкими к ним по систематическому положению возбудителей и особенностями течения. Между тем

за рубежом в последние 30 лет для изучения нематоцидов используется свободноживущая почвенная нематода *Caenorhabditis elegans* [5]. Преимуществами этого модельного организма являются, прежде всего, простота и дешевизна культивирования в лаборатории, безопасность для исследователя, короткий жизненный цикл и возможность использования в эксперименте генетически однородные линии нематод. Многие факты говорят о возможности экстраполяции результатов, полученных в экспериментах с *C. elegans*, на паразитических нематод. Это вытекает из общего плана строения тела, а также из изучения сравнительной физиологии и фармакологии Nematoda. В качестве дополнительного к *C. elegans* модельного организма возможно использование другого вида почвенных нематод – *Caenorhabditis briggsae*. *C. elegans* и *C. briggsae* очень сходны по морфологии, особенностям жизненного цикла и системы размножения. Целью работы явилась проверка этого предположения в экспериментах, в которых сравнивалась чувствительность поведения *C. elegans* и *C. briggsae* к действию широко используемого в ветеринарии и медицине нематоцида левамизола. Дополнительно сравнивалась чувствительность организмов этих видов нематод к токсическому действию никотина и ингибитора ацетилхолинэстеразы алдикарба.

Методы.

Эксперименты проводили с *C. elegans* линии дикого типа N2 и *C. briggsae* линии дикого типа AF16, предоставленными Caenorhabditis Genetics Center. Нематод выращивали при 21°C в чашках Петри со стандартной средой выращивания нематод и *E. coli* OP50 для кормления [2]. Молодых половозрелых нематод трижды отмывали 10 мл NG буфера (0,3% NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 25 mM калийфосфатного буфера (pH 7,0)) и переносили индивидуально в пробирки с 1 мл NG буфера с добавлением левамизола гидрохлорида, никотина гемисульфата или алдикарба. Нарушения поведения, вызванные действием агонистов н-холинорецепторов или алдикарба, регистрировали каждые 15 минут с использованием стереоскопического микроскопа SMZ-05. Показателями действия левамизола, никотина и алдикарба на поведение нематод являлись нарушение моторной программы плавания, индуцированного механическим стимулом

(встряхивание пробирки с червем) и паралич нематод (потеря способности к плаванию, индуцированному механическим стимулом). Нарушения моторной программы плавания проявлялись в нарушениях координации мышц, необходимой для синусоидальных движений тела, временной приостановке плавания и плавании по кругу. В каждом варианте эксперимента использовано 30 червей. Эксперименты проводили в трех повторностях. Статистическую обработку результатов проводили с использованием углового преобразования Фишера ϕ^* . В работе использовали реактивы фирмы Sigma.

Результаты и обсуждение.

Мишенью действия многих нематоцидов на организмы паразитических и свободноживущих нематод является холинергическая система [1; 4–6]. Основой избирательного токсического действия нематоцидов-агонистов никотиновых рецепторов ацетилхолина (н-холинорецепторов) на организмы нематод при отсутствии их токсичности для организма человека и сельскохозяйственных животных являются различия в организации этих рецепторов, появившиеся в ходе эволюции [4–6]. Поэтому такие нематоциды, как левамизол, пирантел и морантел вызывают гиперактивацию н-холинорецепторов в организмах нематод, но не в организмах человека и животных. Токсическое действие левамизола на организм *C. elegans* проявляется в нарушениях поведения, развития и гибели нематод [5]. В зависимости от концентрации левамизола и времени экспозиции нематод к нему нарушения поведения, индуцированные гиперактивацией н-холинорецепторов, проявляются в нарушениях моторной программы плавания, индуцированного механическим стимулом, сменяющихся полным обездвиживанием (параличом) нематод и их последующей гибелью, если нематоды продолжают оставаться в среде с левамизолом [5].

Таблица 1

Действие левамизола на поведение *Caenorhabditis elegans*
и *Caenorhabditis briggsae*

Условия эксперимента	Доля червей с нарушениями моторной программы плавания после 15-минутной экспозиции к левамизолу, %			
	Левамизол			
	4 мкМ	8 мкМ	16 мкМ	32 мкМ
<i>C. elegans</i> при температуре 22°C	0	0	5 ± 1	32 ± 2
<i>C. briggsae</i> при температуре 22°C	0	8 ± 1	38 ± 2***	81 ± 4***
<i>C. elegans</i> при температуре 30°C	0	24 ± 2	61 ± 3	100
<i>C. briggsae</i> при температуре 30°C	22 ± 2***	72 ± 4***	100***	100

Примечание: *** – достоверность разницы между *C. elegans* и *C. briggsae*;

*** – $p < 0,001$.

Как показано в табл. 1, чувствительность поведения к левамизолу при температуре 22°C у *C. briggsae* значительно выше, чем у *C. elegans*. Это различие проявляется как при измерении среднего времени нарушения моторной программы плавания, индуцированного механическим стимулом (табл. 1), так и при измерении среднего времени наступления паралича нематод при повышении концентрации левамизола и увеличении времени экспозиции к нему (табл. 2). Высокая, по сравнению с *C. elegans*, чувствительность поведения *C. briggsae* проявляется не только к левамизолу, но и к никотину – еще одному агонисту н-холинорецепторов, который малотоксичен для нематод, но используется в растениеводстве в качестве инсектицида (табл. 3).

Таблица 2

Действие левамизола и алдикарба на время наступления паралича
Caenorhabditis elegans и *Caenorhabditis briggsae*

Условия эксперимента	Доля червей, полностью утративших способность к плаванию после 90-минутной экспозиции к левамизолу или алдикарбу при 22°C, %					
	Левамизол			Алдикарб		
	30 мкМ	60 мкМ	120 мкМ	50 мкМ	100 мкМ	200 мкМ
<i>C. elegans</i>	0	7 ± 1	36 ± 2	10 ± 1	45 ± 2	83 ± 3
<i>C. briggsae</i>	14 ± 1***	55 ± 3***	100***	12 ± 2	43 ± 3	85 ± 4

Примечание: *** – достоверность разницы между *C. elegans* и *C. briggsae*;
*** – $p < 0,001$.

Ранее нами было показано, что повышение температуры среды вызывает увеличение чувствительности *C. elegans* к токсическому действию левамизола, выявляющемуся в параличе нематод [1]. Как показано в табл. 1, повышение температуры среды с 22 до 30°C сенситизирует поведение *C. elegans* и *C. briggsae* и к действию низких концентраций левамизола, вызывающему нарушения моторной программы локомоции при сохранении способности нематод к плаванию, индуцированному механическим стимулом. Более высокая чувствительность поведения *C. briggsae* к действию левамизола, по сравнению с *C. elegans*, выявляется не только при температуре 22°C, но и при 30°C.

Таблица 3

Действие никотина на поведение *Caenorhabditis elegans*
и *Caenorhabditis briggsae*

Условия эксперимента	Доля червей с нарушениями моторной программы плавания после 15-минутной экспозиции к никотину, %			
	Никотин			
	0,3 мМ	0,6 мМ	1,2 мМ	2,4 мМ
<i>C. elegans</i> при температуре 22°C	0	0	15 ± 2	32 ± 3
<i>C. briggsae</i> при температуре 22°C	0	7 ± 1	38 ± 2***	81 ± 3***
<i>C. elegans</i> при температуре 30°C	0	11 ± 1	42 ± 2	85 ± 3
<i>C. briggsae</i> при температуре 30°C	9 ± 1	39 ± 2***	78 ± 2***	89 ± 4

Примечание: *** – достоверность разницы между *C. elegans* и *C. briggsae*;
*** – $p < 0,001$.

Результаты наших экспериментов показывают, что в ходе эволюции появились различия чувствительности н-холинорецепторов к их агонистам левамизолу и никотину между двумя близкородственными видами нематод – *C. elegans* и *C. briggsae*. Эти различия могут быть причиной различий холинергической синаптической трансмиссии у *C. elegans* и *C. briggsae*. Для проверки этого предположения были проведены эксперименты, в которых сравнивалась чувстви-

ность поведения *C. elegans* и *C. briggsae* к частичному ингибированию ацетилхолинэстеразы алдикарбом, так как токсическое действие алдикарба на организмы нематод является следствием гиперактивации н-холинорецепторов аномальным повышением концентрации ацетилхолина [5; 6]. Как показано в табл. 2, при действии алдикарба на поведение не выявляются различия между *C. elegans* и *C. briggsae*. Следовательно, холинергическая синаптическая трансмиссия в организме *C. briggsae* находится на том же уровне, что и в организме *C. elegans*, несмотря на то, что чувствительность н-холинорецепторов у *C. briggsae* значительно выше, чем у *C. elegans* (табл. 1–2).

Известно, что универсальным свойством синапсов в нервной системе является их способность сохранять процессы синаптической трансмиссии на одном детерминированном уровне в условиях действия на нервную систему внешних факторов, которые оказывают сильное влияние на процессы, происходящие как на пресинаптическом, так и на постсинаптическом уровнях [3]. Эта стабильность синапсов обеспечивается процессами компенсации изменений, индуцированных факторами среды, которые происходят как на физиологическом, так и на генетическом уровне [7]. Результаты этой работы свидетельствуют о том, что в ходе эволюции возникли различия чувствительности н-холинорецепторов у организмов *C. elegans* и *C. briggsae*, но эти различия скомпенсированы разным уровнем секреции ацетилхолина пресинаптическими нейронами (низкая скорость секреции у *C. briggsae* по сравнению с *C. elegans*). Из-за того, что чувствительность н-холинорецепторов у *C. briggsae* значительно выше, чем у *C. elegans*, организм *C. briggsae* является более удобным, чем *C. elegans* как для стандартизации большого класса существующих нематоцидов-агонистов н-холинорецепторов (левamisол, пирантел, морантел и др.), так и для разработки следующих поколений нематоцидов этого типа. Дополнительным преимуществом *C. briggsae* по сравнению с *C. elegans* является чрезвычайно короткий срок развития до полового созревания (48 часов при 22 у *C. briggsae* и 72 часа – у *C. elegans*).

Список литературы

1. Калинникова Т.Б. Активация холинергической системы почвенной нематоды *Caenorhabditis elegans* стрессовыми условиями окружающей среды / Т.Б. Калинникова [и др.] // Российский журнал прикладной экологии. – 2015. – №1. – С. 71–75.
2. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* / S. Brenner // Genetics. – 1974. – V. 77. – P. 71–94.
3. 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.
4. Gottschalk A. Identification and characterization of novel nicotinic receptor associated proteins in *Caenorhabditis elegans* / A. Gottschalk, R.B. Almedom, T. Schedletzky, S.D. Anderson, J.R. III Yates, W.R. Schafer // The EMBO J. – 2005. – V. 24. – P. 2566–2578.
5. Holden-Dye L. Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans* [WormBook] / L. Holden-Dye, R.J. Walker // WormBook, ed. The C. elegans Research Community. – 2014 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.wormbook.org>
6. Rand J.B. Acetylcholine [WormBook] / J.B. Rand // WormBook, ed. The C. elegans Research Community. – 2007 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.wormbook.org>
7. Turrigiano G.G. Homeostatic plasticity in the developing nervous system / G.G. Turrigiano, S.B. Nelson // Nat. Rev. Neurosci. – 2004. – V. 5. – P. 97–107.