

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ ИМ. И.П.ПАВЛОВА**

На правах рукописи

ЗАЧЕПИЛО

Татьяна Геннадьевна

**РОЛЬ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ФОРМИРОВАНИИ ПАМЯТИ
У МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ И ДРОЗОФИЛЫ В НОРМЕ И
В УСЛОВИЯХ ДИСБАЛАНСА КИНУРЕНИНОВ**

03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2011

Работа выполнена в лаборатории генетики высшей нервной деятельности Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург)

Научный руководитель: доктор биологических наук
Вайдо Александр Иванович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Любашина Ольга Анатольевна

доктор биологических наук, профессор
Даев Евгений Владиславович

Ведущая организация: Институт эволюционной физиологии и биохимии им.
И.М.Сеченова РАН

Защита состоится «_____» мая года в 11 часов на заседании Диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций (Д 002.020.01) при Институте физиологии им. И. П. Павлова РАН (199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии им. И. П. Павлова РАН.

Автореферат разослан «_____» апреля 2011 г.

Учёный секретарь Диссертационного совета
доктор биологических наук

Н. Э. Ордян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изучение молекулярно-клеточных механизмов обучения и памяти является одной из основных задач нейробиологии. Известно, что существенную роль в регуляции мозговой деятельности, в частности, в процессах памяти, играет L-глутамат - основной возбуждающий нейромедиатор в ЦНС как позвоночных, так и многих беспозвоночных животных. У насекомых L-глутаминовая кислота является медиатором как в центральной нервной системе, так и в нервно-мышечном синапсе (Kerkut, 1965; Usherwood, 1966).

Физиологическое действие L-глутамата осуществляется посредством ионотропных (NMDA- и не-NMDA-подтипов) и метаботропных глутаматных рецепторов (mGluR). В настоящее время у млекопитающих детально изучены глутаматные NMDA-рецепторы: строение, фармакология, субъединичный состав и локализация в структурах мозга, вклад каждой субъединицы в функционирование рецептора (Rao, 1998; Liu Yun, 2000; Cull-Candy, 2001). NMDA-рецепторам отводится особая роль в регуляции нейрональной возбудимости, синаптической пластичности, в процессах обучения и памяти. (Cotman C.W. et al., 1987), а также в патогенезе эпилепсии и шизофрении (Chapman, 1998; Bradford, 1995; Dingledine et al., 1990; Moghaddam, 2005). Знания в этой области, касающиеся насекомых, скромнее: показано наличие NMDA-рецепторов в головном ганглии (мозге) насекомых (дрозофила, пчела, таракан, сверчок), их связь с процессами обучения и памяти (Лопатина, 2000; Betz, 1993; Fiedler, Ultsch, 1993; Jaffe and Blanco, 1994; Xia, 2005; Maleszka, 2004). Однако вклад конкретных субъединиц в формирование памяти у насекомых, а также особенности распределения в мозге NMDA-рецепторов не изучены.

Метаботропные рецепторы L-глутамата млекопитающих также хорошо исследованы. Семейство mGluR разделено на три группы согласно аминокислотной последовательности и фармакологическому профилю. Рецепторы mGluR участвуют в формировании памяти, тревожности, нейротоксичности через модуляцию пре- и постсинаптически развивающихся процессов. Рецепторы mGluR насекомых изучены недостаточно. К настоящему времени у насекомых обнаружены несколько типов mGluR, наиболее сходных с таковыми mGluR II группы млекопитающих (Altfelder, Muller, 1991; Mitri, 2004; Funada, 2004; Bogdanik, 2004; Kucharski, 2007). Однако, остается неясным какие еще mGluR присутствуют в ЦНС пчелы, какие свойства им присущи, их локализация.

Активация глутаматных рецепторов запускает ряд внутриклеточных сигнальных каскадов, что приводит к ремоделированию цитоскелета нейронов и изменению эффективности синаптической передачи. Цитоскелетные перестройки в нейронах играют

важную роль в онтогенезе нервной системы, в процессах синаптической пластичности, в формировании памяти (Edwards, Gill, 1999; Birkenfeld, Betz, Roth, 2001).

Необходимую пластичность глутаматергической системе обеспечивают множественные пути регуляции чувствительности рецепторов к лигандам, зависимость активности ферментов, образующих вторичные посредники в клетках от состояния мембранных рецепторов. Одним из регуляторов функционального состояния рецепторов глутамата, несомненно, являются эндогенные лиганды рецепторов – кинуренины (Perkins, Stone, 1985). Кинуренины - метаболиты триптофана, синтез которых резко возрастает при стрессе, а содержание изменяется при периферических патологических процессах и наследственно-обусловленных и приобретенных нейропсихических заболеваниях. Данные литературы свидетельствуют о сходной нейроактивности кинуренинов у насекомых и млекопитающих, но характер их взаимодействия с глутаматергическими рецепторами практически не исследован.

Сравнительно просто организованная ЦНС в сочетании со сложными формами интегративной деятельности позволяет использовать насекомых (медоносную пчелу, *Apis mellifera* и плодовую мушку дрозофилу, *Drosophila melanogaster*) в качестве удобных модельных объектов для изучения роли глутаматных рецепторов в формировании памяти.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования явилось исследование роли глутаматных рецепторов в формировании памяти медоносной пчелы и дрозофилы в норме и при дефиците эндогенных кинуренинов.

Основные задачи исследования:

1. Идентифицировать и локализовать глутаматные NMDA- (NR1 и NR2 субъединицы) и метаботропные (I-ой группы) рецепторы в мозге насекомых.
2. Изучить участие NR1 субъединицы NMDA-рецепторов и метаботропных рецепторов глутамата в формировании памяти у медоносной пчелы.
3. Изучить влияние генетически детерминированного (мутация *snow laranja*) дефицита кинуренинов на чувствительность NMDA- и метаботропных рецепторов у медоносной пчелы.
4. Исследовать влияние генетически детерминированного (мутации *vermilion*, *cinnabar*, *cardinal* дрозофилы) или полученного путем фармакологического фенотипирования (у пчелы) дисбаланса кинуренинов на характер экспрессии NR1 и NR2 субъединиц NMDA рецепторов и активируемых ими компонентов сигнального пути (LIMK-1, F-актин) в мозге насекомых.

Научная новизна. Впервые выявлены и локализованы глутаматные NMDA-рецепторы (NR1 и NR2 субъединицы) в головном мозге пчелы и дрозофилы и

метаботропные глутаматные рецепторы I в головном мозге пчелы. При этом максимальная экспрессия рецепторных белков наблюдалась в зонах мозга, ответственных за ассоциативную деятельность изученных представителей насекомых. Последнее нашло подтверждение в наших исследованиях, впервые показавших участие гетерогенной популяции ионотропных и метаботропных рецепторов (I и III группы) в формировании долговременных следов памяти у медоносной пчелы.

Впервые получены доказательства модулирующего влияния эндогенных кинуренинов – лигандов рецепторов глутамата – на функционирование ключевых звеньев сигнального пути – GluR– LIMK-1 – F-актин, ответственного как за «настройку» чувствительности рецепторов по принципу обратной связи, так и за экспрессию генов, необходимую для долгосрочного хранения в памяти индивидуально приобретаемой информации.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В мозге медоносной пчелы и дрозофилы локализованы NMDA-рецепторы глутамата. В мозге пчелы локализованы метаботропные рецепторы глутамата I группы. Максимальная экспрессия рецепторных белков наблюдается в зонах мозга, ответственных за ассоциативную деятельность. У медоносной пчелы метаботропные рецепторы глутамата (I и III групп) играют существенную роль в формировании долговременной памяти.

2. Дисбаланс кинуренинов приводит к изменению чувствительности глутаматных рецепторов и к модификации молекулярных звеньев сигнального пути: рецепторы глутамата - лимкиназа-1 - фибриллярный актин у исследованных насекомых.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные данные вносят существенный вклад в эволюционную физиологию, свидетельствуя о сходстве в функционировании рецепторов глутамата у насекомых и млекопитающих, а также выявляя зоны головного ганглия с максимальной экспрессией рецепторов глутамата, уточняя таким образом регионы мозга, ответственные за ассоциативную деятельность у представителей насекомых, различающихся по способности к обучению.

Наиболее весомый вклад полученные данные вносят в нейрогенетику, свидетельствуя о роли генов, контролирующей активность ферментов метаболизма триптофана по кинурениновому пути, в наследственной детерминации особенностей функционирования сигнального каскада – рецепторы глутамата-актин цитоскелета, и нейрофизиологию, позволяя отнести кинуренины к эндогенным модуляторам синаптической пластичности.

Результаты проведенных исследований кроме несомненного общепизиологического и эволюционного значения могут принести практическую пользу. Полученные данные могут быть использованы в сельском хозяйстве при разработке фармакологических агентов повышающих эффективность дрессировки медоносной пчелы, а также для создания

эффективных и низкотоксичных препаратов для защиты растений от насекомых-вредителей. Кроме того, всестороннее изучение глутаматных рецепторов и их сигнальных путей у насекомых может служить основой для создания быстрых тест-систем для доклинических испытаний в медицине лекарственных препаратов.

Апробация работы. Основные материалы диссертации были представлены: на Юбилейной конференции, посвященной 50-летию со дня основания Института физиологии НАН Беларуси, Минск 2003; VII East European regional International Conference «Simpler Nervous Systems», Kaliningrad, Russia, 2003; XIX съезде Физиологического общества им. И. П. Павлова, Екатеринбург, 2004; на V Международной конференции по функциональной нейроморфологии «Колосовские чтения - 2006»; на Симпозиуме стран СНГ по перепончатокрылым насекомым, Москва, 2006; VIII East European regional International Conference «Simpler Nervous Systems», Kazan, Russia, 2006; на XX съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова, Москва, 2007; на XIII съезде Русского энтомологического общества, Краснодар. 2007, на Международной школе-конференции, посвященной 100-летию со дня рождения М.Е. Лобашева «Системный контроль генетических и цитогенетических процессов», Санкт-Петербург, 2007 на конференции «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга», Санкт-Петербург, 2008; на XXI съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова, Калуга, 2010.

Публикации по теме диссертации. По материалам диссертации опубликовано 25 работ, в том числе 9 статей в российских рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата наук.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 156 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения и выводов. Список цитированной литературы включает 45 отечественных и 183 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 47 рисунками и 5 таблицами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом исследований служили медоносная пчела краинской расы *Apis mellifera carnica Pollm* (отряд перепончатокрылые Hymenoptera) и дрозофила *Drosophila melanogaster* (отряд двукрылые Diptera). У пчелы изучали особей дикого типа и линию с мутацией snow laranja (ген гомологичный мутации *vermilion* дрозофилы), вызывающей ингибирование экспрессии гена триптофаноксигеназы и тем самым полностью блокирующей кинурениновой

путь обмена триптофана. У дрозофилы изучали линию дикого типа Canton-S (контроль) и линии, несущие мутации по генам кинуренинового пути обмена триптофана: *vermilion (v)*, *cinnabar (cn)*, *cardinal (cd)*.

В исследованиях использовали следующие **методы**:

1. **Поведенческий критерий** - число пчел (%), удерживающих в памяти в течение 1 мин (кратковременная память) и 180 мин и более (долговременная память) выработанную условную реакцию (вытягивание хоботка) после однократного сеанса обучения - сочетания обонятельного стимула (запаха гвоздики) с безусловным пищевым подкреплением (50% раствором сахарозы) на фоне инъекций (опыт) и физиологического раствора (контроль). Эксперименты по изменению кратковременной и долговременной памяти проводили на разных группах животных. Число особей в каждой серии экспериментов колебалось от 36 до 60.

2. **Фармакологические воздействия** - системные (вентрально в абдомен или дорзально в торакс) и интрацеребральные (медиальный каликс надглоточного ганглия) инъекции агонистов и антагонистов глутаматных рецепторов в широком ряду концентраций (10^{-9} - 10^{-2} М). Инъекции осуществляли с помощью микроинъектора обездвиженным путем охлаждения пчелам за 20 минут до начала эксперимента в объеме 2мкл и 200 нл соответственно.

Таблица 1. Используемые агонисты и антагонисты глутаматных рецепторов.

	Инъектируемые вещества
Агонисты NMDAR	глутамат, аспартат, NMDA, глицин
Антагонисты NMDAR	AP-5, AP-4, AP-3, МК-801, кетамин
Агонисты mGluR	ACPD (I-II), квисквалат (I-II), иботенат(I-II), DHPG(I), L-AP4 (III), фосфосерин (III)
Антагонисты mGluR	MCPG (II), CPCCOEt (I), SIB1757 (III), AP3 (III)

До процедуры обучения изучали влияние всех исследуемых соединений на сенсорную и пищевую возбудимость пчел, а также сенситизирующее влияние самого пищевого подкрепления. Полученный экспериментальный материал обрабатывали статистически, используя непараметрический критерий Вилкоксона-Манна-Уитни и парный критерий Вилкоксона. Влияние инъекций агонистов и антагонистов глутамата оценивали в процентах по отношению к контрольному уровню.

3. **Вестерн-блоттинг.** Для процедуры использовали гомогенаты мозга пчелы и дрозофилы. В опыт брали 20-30 голов самцов дрозофилы дикого типа Canton-S, достигших пятисуточного возраста или 1 голову (мозг) пчелы. Белки разделяли электрофорезом в 10% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (метод Лэммли), после чего

переносили на нитроцеллюлозные мембраны. Мембраны после проведения процедур, уменьшающих неспецифическую сорбцию, последовательно инкубировали в растворах, содержащих первичные и вторичные (конъюгированные с пероксидазой хрена) антитела. Для выявления антигенной специфичности использовали биотин-авидиновую систему мечения белков с пероксидазой хрена и диаминобензидином (Vectastain ABC elite kit и Peroxidase substrate kit DAB, Vector). В работе использовали первичные антитела к NR1 и NR2 субъединицам NMDA-рецептора (Santa Cruz), ImGluR1 (Chemicon).

4. **Иммуногистохимический метод.** Насекомых обездвигивали холодом. Фиксировали в 4% параформальдегиде и заливали в парафин. Срезы депарафинизировали. Демаскировали антигены в микроволновой печи (10 мин в 0.03 М цитратном буфере). инкубировали срезы с блокировочной сывороткой (Vectastain ABC-elite kit, Vector), далее с первичными антителами (разведене 1:300), затем с биотинилированными вторичными антителами (Vectastain ABC-elite kit, Vector). Окрашивали срезы диаминобензидином (Peroxidase substrate kit DAB, Vector). Полученные препараты анализировали с помощью световой микроскопии (микроскоп МИК-МЕД11) и установки, содержащей цифровую CCD-камеру и компьютер с программой Видеотест-FISH. Учитывали распределение окраски по структурам мозга и характер окрашивания.

5. **Флуоресцентное окрашивание на F-актин.** Насекомых обездвигивали холодом. Фиксировали в 4% параформальдегиде и заливали в парафин. Срезы депарафинизировали и инкубировали с фаллоидин-родамином (Molecular Probes, разведение 1:300), заключали срезы в среду Vectashild (Vector). Полученные препараты анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии (микроскоп МИК-МЕД11) при увеличении x10 и установки, содержащей CCD-камеру и компьютер с программой ВидеоТест-FISH. Оценку оптической плотности проводили по встроенной методике программы ВидеоТест.

6. **Метод антисенс-нокдауна.** Для специфичного подавления экспрессии NR1 и ImGluR1 были использованы антисмысловые олигонуклеотиды к соответствующим мРНК (Wahlestedt, 1993; Matties H., 1995; Zapata, 1996, Standaert, 1996, Fiala, 1999; Stein, 1999; Froese, 2005). В нашем эксперименте мы использовали модифицированную методику Fiala, 1999). Контролем служили инъекции смысловых олигонуклеотидов и физиологического растора. Эффективность используемого метода проверяли с помощью иммуногистохимии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. **Рецепторы глутамата у насекомых: идентификация и локализация в головном ганглии насекомых (медоносная пчела и дрозофила).**

1.1. Идентификация и локализация NMDA-рецепторов в мозгу медоносной пчелы. О присутствии NMDA-рецепторов в мозге медоносной пчелы судили по наличию окрашивания при иммунохимических процедурах. Для идентификации рецептора был проведен вестерн-блоттинг с использованием антител против NR1 и NR2 субъединиц NMDA-рецепторов крысы. Основываясь на значительной гомологии генов белков NMDA-рецепторов млекопитающих и дрозофилы, мы использовали антитела и антисмысловые олигонуклеотиды против NMDA-рецепторов крысы для выявления NMDA-рецепторов в головном мозге медоносной пчелы. Вестерн-блоттинг выявил единственный бэнд для NR1 субъединицы молекулярным весом около ~ 110 кДа. Что примерно соответствует молекулярному весу NR1 субъединицы млекопитающих (крысы) (115 кДа). Для NR2 субъединицы вестерн-блоттинг обнаружил единственный бэнд молекулярным весом около ~ 110 кДа, оказавшийся меньше, чем NR2A и B крысы - 165 кДа.

Характер распределения NR1 и NR2 субъединиц рецептора был изучен с использованием метода иммуногистохимии. Иммуногистохимическое окрашивание срезов мозга медоносной пчелы на NR1 и NR2 было максимальным в районе клеток Кеньона обоих каликсов грибовидных тел (высшие интегративные центры в ЦНС насекомых), а также в зрительных долях. Нейропил был окрашен слабо и достаточно гомогенно как в случае окраски антителами к NR1, так и в случае окраски антителами к NR2.

Таким образом, NR1 и NR2 субъединицы NMDA-рецепторов имеют сходное распределение в мозге медоносной пчелы, и локализуются преимущественно в грибовидных телах и зрительных долях, структурах отвечающих у насекомых за память, обучение и обработку зрительной информации.

1.2. Идентификация и локализация NR1 и NR2 субъединиц NMDA-рецепторов у дрозофилы. О присутствии NMDA-рецепторов в мозге дрозофилы судили по наличию окрашивания при иммуногистохимических процедурах. Для идентификации рецептора был проведен вестерн-блоттинг с использованием антител против NR1.

Для постановки вестерн-блота были использованы те же антитела к NR1 субъединицы, что и для пчелы. Вестерн-блоттинг выявил единственный бэнд для NR1 субъединицы молекулярным весом около ~ 110 кДа, что примерно соответствует молекулярному весу NR1 субъединицы крысы (115 кДа) и результату полученному на пчеле. Вестерн-блоттинг с антителами к NR2 на дрозофиле выявил единственный бэнд, также оказавшийся меньшего молекулярного веса, чем у млекопитающих (Журавлев А., неопубликованные данные)

Характер распределения NR1 и NR2 субъединиц рецептора был изучен с использованием метода иммуногистохимии. Иммуногистохимическое окрашивание срезов

мозга дрозофилы на NR1 и NR2 было максимальным в районах центрального комплекса и зрительных долей. Нейропил был окрашен слабо и достаточно гомогенно как в случае окраски антителами к NR1, так и в случае окраски антителами к NR2. Интенсивность окрашивания в области грибовидных тел в обоих случаях носила промежуточный характер

Таким образом, NR1 и NR2 субъединицы NMDA-рецепторов имеют сходное распределение в мозге медоносной пчелы, и локализуются преимущественно в грибовидных телах и зрительных долях, структурах отвечающих у насекомых за память, обучение и обработку зрительной информации.

1.3. Идентификация и локализация mGluR1 (группа I) субъединицы метаботропных глутаматных рецепторов в мозгу медоносной пчелы. О присутствии метаботропных рецепторов глутамата I группы в головном мозге медоносной пчелы судили по наличию окрашивания при иммуногистохимических процедурах. Для идентификации рецептора был проведен вестерн-блоттинг с использованием антител против субъединицы mGluR1 крысы. Антитело было подобрано с учетом выравнивания нуклеотидных и белковых последовательностей гомологии ImGluR1 крысы и данных по геному пчелы (базы данных сайта ncbi.nih.gov, программы для сравнения последовательностей BLAST и Vector NTI 9.1). Вестерн-блоттинг единственный бэнд с молекулярным весом ~ 140 кДа, что согласуется с литературными данными по млекопитающим (молекулярный вес mGluR1 α крысы ~140кДа).

Характер распределения ImGluR1 был изучен с использованием метода иммуногистохимии. Иммуногистохимическое окрашивание срезов мозга медоносной пчелы на ImGluR1 было максимальным в районе обоих каликсов грибовидных тел, что свидетельствует о наибольшей экспрессии ImGluR именно в этом районе головного ганглия, ответственного за долговременное хранение индивидуально приобретаемого опыта. Остальной нейропил был окрашен слабо и достаточно гомогенно. Окраска клеток Кеньона также была достаточно слабой.

Таким образом, идентифицированы метаботропные рецепторы глутамата I группы в мозге медоносной пчелы. Регионы с наиболее высокой концентрацией рецепторов - грибовидные тела, как известно, связаны с обучением и памятью, а зрительные доли – с получением и обработкой зрительной информации.

2. Рецепторы глутамата у насекомых: функциональное значение центральных рецепторов глутамата у насекомых (медоносная пчела).

2.1. Изучение роли NR1 субъединицы NMDA рецептора в ассоциативном обучении медоносной пчелы. Для изучения вклада NR1 субъединицы в работу NMDA-рецепторов и процессы формирования памяти у медоносной пчелы мы провели процедуру антисенс-нокдауна. Для этого пчелам интрацеребрально вводили раствор антисмысловых

олигонуклеотидов (asON) к мРНК NR1 крысы. Контролями служили: интактные пчелы, пчелы с инъекциями физраствора, пчелы с инъекциями смысловых олигонуклеотидов (sON).

Данные по условно-рефлекторной деятельности медоносной пчелы приведены в таблице 2. Большой процент интактных пчел успешно сохранял в кратковременной памяти условную реакцию. От них не отличались пчелы, которым инъецировали физиологический раствор и sON. Локальная инъекция asON, подавляющего синтез NR1 субъединицы NMDA рецепторного комплекса, оказала четкое ингибирующее действие на способность пчел сохранять в кратковременной памяти условную реакцию. Эффект проявился через 7 часов после инъекции asON. По всем изученным показателям (сенсорной и пищевой возбудимости), как указывалось выше, контрольные группы пчел ни в одном из вариантов испытаний между собой не различались.

Таблица 2. Сохранение в кратковременной памяти медоносной пчелы условной обонятельной реакции через разные интервалы времени после интрацеребральных инъекций (в каждой группе n=36 особей).

Интервал времени	Число пчел (%), ответивших условной реакцией через одну минуту после процедуры обучения у групп пчел:			
	интактные	физ. р-р	sON	asON
3 часа	67±3.4	69±3.5	66±3.6	76±3.8
7 часов	83±4.5	86±4.6	76±3.7	7±3.7*
24 часа	82±3.9	67±6.7	93±6.2	82±3.8

* - различия между опытной (asON) и контрольной (sON и физ. р-р) группами достоверны, $p < 0.01$.

Таким образом, интрацеребральное введение антисмысловых олигонуклеотидов к мРНК NR1 приводит к ингибированию функций NMDA-рецептора и подавлению кратковременной памяти через 7 часов после введения. На основании полученных фактов можно заключить, что NR1 субъединица необходима для формирования кратковременной памяти.

2.2. Изучение роли метаботропных рецепторов глутамата в ассоциативном обучении медоносной пчелы. Исследовали участие метаботропных глутаматных рецепторов в формировании кратковременной и долговременной памяти. Пчелам системно вводили агонисты и антагонисты mGluR, контролем служила группа пчел, которым инъецировали физиологический раствор.

Системное введение селективного агониста I группы метаботропных глутаматных рецепторов DHPG ($10^{-7}M-10^{-4}M$) улучшало сохранение в долговременной памяти пчелы

выработанного условного рефлекса, увеличивая число пчел, отвечающих условной реакцией через 180 мин после обучения по сравнению с контролем. Кратковременная память не изменялась.

Системное введение агониста III группы метаботропных глутаматных рецепторов L-аминофосфонобутирата (AP-4) (10^{-6} , 10^{-5} М) улучшало сохранение в долговременной памяти пчелы выработанного условного рефлекса, увеличивая число пчел, отвечающих условной реакцией через 180 мин после сеанса обучения по сравнению с контролем, но подавляло кратковременную память (1 мин).

Системное введение агониста III mGluR фосфосерина (10^{-6} , 10^{-5} М) стимулировало сохранение в долговременной памяти пчелы выработанного условного рефлекса, увеличивая число пчел, отвечающих условной реакцией через 180 мин после сеанса обучения по сравнению с контролем. Кратковременная память не изменялась.

Системное введение неконкурентного антагониста mGluR1 CPCCOEt (10^{-6} - 10^{-3} М) в широком диапазоне концентраций (10^{-6} - 10^{-3} М) оказывал депрессивное действие на долговременную память. Кратковременная память не изменялась.

Системное введение неконкурентного антагониста mGluR5 SIB1757 (10^{-5} М) ингибировало долговременную память, снижая в число пчел, удерживающих в памяти условную реакцию в течение 180 мин. Кратковременная память не изменялась.

Системное введение конкурентного антагониста I группы метаботропных глутаматных рецепторов AP3 (10^{-5} - 10^{-3} М), подавляло сохранение выработанного условного рефлекса как при исследовании долговременной (180 мин), так и кратковременной памяти (1 мин) пчелы, уменьшая число пчел, отвечающих условной реакцией по сравнению с контролем.

Таким образом, проведенные исследования впервые показали, что метаботропные глутаматные рецепторы пчелы по фармакологическим характеристикам сходны с метаботропными рецепторами глутамата I и III групп млекопитающих и вовлечены преимущественно в процесс формирования долговременной памяти.

Выводы о наличии у пчелы функционально значимых ImGluR и III mGluR подтверждаются также данными электрофизиологических опытов, в которых амплитуда пре- и постсинаптического потенциалов, отводимых от грибовидных тел в ответ на стимуляцию обонятельных долей статистически достоверно изменялась - подавлялась при введении специфического неконкурентного антагониста ImGluR1 CPCCOEt и, напротив, возрастала при введении агониста III mGluR фосфосерина (Лопатина и др., 2004). Длительное ингибирование нейронов медиального каликса грибовидных тел антагонистом ImGluR1 происходит в тот же период времени, когда наблюдается ингибирование обонятельных

условных рефлексов антагонистами ImGluR1 и ImGluR5. Агонист IIIImGluR фосфосерин способствовал сохранению выработанных условных рефлексов через 3 часа после процедуры обучения, но увеличение пре- и постсинаптического компонентов потенциала нейронов грибовидных тел регистрировалось лишь через 7 часов после интрацеребральной инъекции.

3. Исследование чувствительности глутаматных рецепторов в условиях дефицита кинуренинов.

3.1. Изучение чувствительности NMDA-рецепторов медоносной пчелы в условиях дефицита кинуренинов. Изучали фармакологические характеристики и чувствительность к действию агонистов и антагонистов NMDA- рецепторов, вовлекаемых в процесс образования и сохранения ассоциаций в кратковременной памяти у гомозиготных и гетерозиготных особей, по мутации snow laranja, и у пчел дикого типа (норма).

Введение глутамата и аспартата приводило к статистически достоверному увеличению количества пчел, сохраняющих выработанную ассоциацию в кратковременной памяти у пчел дикого типа и с дефицитом кинуренинов. У пчел-мутантов чувствительность к указанным веществам оказалась на порядок выше, чем у пчел дикого типа.

Влияние NMDA на процесс ассоциативного обучения изучали в диапазоне концентраций 10^{-7} - 10^{-2} М. Введение NMDA в концентрациях 10^{-5} - 10^{-4} М пчелам дикого типа приводило к статистически достоверному увеличению количества пчел, сохранивших выработанную ассоциацию в кратковременной памяти, у мутантов при концентрациях NMDA 10^{-6} - 10^{-5} М. Остальные концентрации NMDA не оказывали влияния на формирование ассоциаций в кратковременной памяти.

Сравнительное исследование характеристик глицинового сайта NMDA рецепторов проводили при помощи инъекций глицина и антагониста глицинового сайта DChK. Введение глицина (10^{-9} - 10^{-6} М) не изменяла способности к обучению у мутантов и пчел дикого типа. Последовательная инъекция NMDA (10^{-2} М) и глицина приводила к увеличению числа пчел, сохранявших условную реакцию в кратковременной памяти. При этом концентрация глицина, потенцирующая действие NMDA, оказалась у гомозиготных по мутации особей на два порядка ниже, чем у пчел дикого типа (10^{-8} М и 10^{-6} М соответственно). У пчел изученных генотипов DChK подавлял активирующее действие NMDA и оказывал депрессивное влияние на процесс сохранения выработанного условного рефлекса в кратковременной памяти.

Эффект инъекции блокаторов ионных каналов МК-801 и кетамина исследовали на фоне активирующего действия NMDA (10^{-5} М у пчел дикого типа и 10^{-6} М у мутантов). Исследуемые неконкурентные антагонисты NMDA ионных каналов оказывали депрессивное действие на процесс кратковременной памяти у насекомых всех исследованных генотипов.. Однако у насекомых с дефицитом кинуренинов наименьшая концентрация кетамина и МК-

801, при которой наблюдалось статистически достоверное уменьшение количества пчел, сохраняющих ассоциацию в кратковременной памяти, была на порядок ниже, чем у нормальных особей.

Таким образом, мутация *snow laranja* не изменяет фармакологического профиля NMDA рецепторов, но резко увеличивает чувствительность основных сайтов NMDA рецепторного комплекса, включая глициновый сайт, участки связывания агонистов и антагонистов, а также ионный канал, что согласуется с поведенческими эффектами мутации.

3.2. Изучение чувствительности mGluR в условиях генетически детерминированного дефицита кинуренинов (мутация *snow laranja*). Исследовали влияние системных инъекций неспецифических агониста ImGluR и IImGluR ACPD и квисквалата в диапазоне концентраций 10^{-9} - 10^{-2} М на сохранение условных рефлексов в долговременной памяти.

Инъекции ACPD и квисквалата не оказывали влияния на пищевую возбудимость и на осуществление самой ассоциативной реакции. Введение ACPD и квисквалата приводило к статистически достоверному увеличению количества пчел, сохраняющих выработанную ассоциацию в долговременной памяти у пчел дикого типа и с дефицитом кинуренинов. У пчел-мутантов чувствительность к указанным веществам оказалась на порядок выше, чем у пчел дикого типа (для ACPD -10^{-6} М vs 10^{-5} М, для квисквалата -10^{-7} М vs 10^{-6} М).

4. Изучение распределения белков сигнального пути, приводящего к ремоделированию актина цитоскелета в мозге пчелы и дрозофилы в условиях дефицита кинуренинов.

4.1. Изучение распределения белков каскада NMDA-рецепторы-актин цитоскелета в мозге дрозофилы в условиях дефицита кинуренинов. Влияние содержания кинуренинов на состояние белков каскада, запускаемого NMDA-рецепторами и приводящему к ремоделированию актина цитоскелета изучали на мутантах дрозофилы по КПОТ.

Полученные данные приведены в таблице.3 Как можно видеть из таблицы, у мутантов КПОТ наблюдаются разнонаправленные изменения в состоянии изучаемых компонентов каскада по сравнению с контролем.

Таблица 3. Компоненты сигнального каскада в головном ганглии различных линий дрозофилы

Линии дрозофилы	Содержание метаболитов КПОТ	Характер окрашивания срезов мозга (гистохимия)			
		NR1	NR2	LIMK-1	F--actin

Canton-S	норма	гомогенное окрашивание всего нейропиля с максимумом окраски в ЦК			
<i>vermilion</i>	отсутствуют	норма	норма	- (в ЦК)	++
<i>cinnabar</i>	избыток KYNA	+ (в ЦК)	- (в ЦК)	++ (в ЦК)	норма
<i>cardinal</i>	избыток 3- ГОК	- (в ЦК)	+ (в ЦК)	+ (в ЦК)	++

Условные обозначения: ЦК - центральный комплекс; + - выше нормы; - - ниже нормы
KYNA- кинуреновая кислота, 3-ГОК- 3-гидроксининуридин.

Как следует из данных приведенных в таблице, дефицит кинуренинов приводит к драматическим изменениям в экспрессии отдельных компонентов каскада, приводящим к ремоделированию актинового цитоскелета в головном мозге дрозофилы, и возможно, как следствие, к изменениям в обучении и памяти. Существенно отметить, что соотношение между экспрессией LIMK1 и f-актина соответствует теоретически ожидаемому только у мутантов *cardinal*. У *vermilion* и *cinnabar* оно или противоположно или отсутствует.

4.2. Изучение распределения LIMK-1 и фибриллярного актина в условиях вызванного аллопуринолом дефицита кинуренинов в головном мозге медоносной пчелы. Введение аллопуринола вызывает ситуацию дефицита кинуренинов, фенокопию мутации *vermilion* у дрозофилы и *snow* у пчелы. Характер распределения LIMK-1 был изучен с использованием метода иммуногистохимии. У пчел контрольной группы иммуногистохимическое окрашивание срезов мозга на LIMK-1 было максимальным в районе центрального комплекса. У пчел, после инъекций аллопуринола окраска центрального комплекса (ЦК) была слабее и практически не отличалась по интенсивности окраски от остального мозга.

Содержание фибриллярного актина в мозге пчелы изучали на срезах, окрашенных флюоресцентным комплексом фаллоидин-родамином. Полученные данные были проанализированы денситометрически (программа Видеотест). У пчел опытной группы окраска мозга на F-актин была интенсивнее (0.46 ± 0.3 ед.опт.пл.), чем в контроле (0.31 ± 0.2 ед.опт.пл.).

Таким образом, дефицит кинуренинов у медоносной пчелы вызывает изменения в распределении лимкиназы-1 и фибриллярного актина в мозге, сходные с таковыми у *vermilion*: ослабление экспрессии лимкиназы-1 и увеличение содержания фибриллярного актина, что подтверждает данные, полученные на дрозофиле и заставляет полагать наличие

кроме наиболее исследованного сигнального каскада глутаматные рецепторы – Rho - LIMK1 - f-актин и других путей, идущих в обход LIMK1.

ВЫВОДЫ

1. Идентифицированы и локализованы в мозге медоносной пчелы и дрозофилы NMDA-рецепторы глутамата (NR1 и NR2 субъединицы) и в мозге пчелы метаботропные рецепторы глутамата I группы. Максимальную экспрессию рецепторных белков наблюдали в зонах мозга, ответственных за ассоциативную деятельность и обработку зрительной информации. У пчелы это область грибовидных тел и зрительные доли, у дрозофилы – центральный комплекс и зрительные доли.
2. Подтверждено участие NMDA рецептора, а именно NR1 его субъединицы в формировании кратковременной памяти у медоносной пчелы.
3. Показана сходная с млекопитающими роль метаботропных рецепторов глутамата в формировании долговременной памяти. Исследованные метаботропные рецепторы глутамата пчелы по фармакологическим характеристикам близки к метаботропным рецепторам глутамата I и III групп млекопитающих.
4. Впервые установлено, что в условиях наследственного дефицита кинуренинов (медоносная пчела, мутация по гену КПОТ *snow laranja*) увеличивается чувствительность NMDA- и метаботропных (I-II групп) рецепторов глутамата.
5. Показано, что в условиях наследственного (мутации по генам КПОТ у дрозофилы - *vermilion*, *cinnabar*, *cardinal*) и индуцированного введением ингибитора триптофандиоксигеназы аллопуринола (пчела) дисбаланса кинуренинов изменяется паттерн экспрессии NR1 и NR2 субъединиц NMDA-рецепторов, LIMK-1 и F-актина в мозге насекомых. Характер этого изменения позволяет предположить наличие нескольких сигнальных путей рецепторы глутамата- актин цитоскелета.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. Лопатина Н.Г., Рыжова И.В., Чеснокова Е.Г., Зачепило Т.Г., Войке Е. Центральные не-NMDA рецепторы медоносной пчелы в условиях наследственно-обусловленного дефицита кинуренинов // Бюлл. эксп. биол. и мед. 2002. - Т. 135. № 4. - С. 458-460.
2. Лопатина Н.Г., Зачепило Т.Г., Рыжова И.В., Смирнов В.Б., Чеснокова Е.Г. Дифференциальное участие центральных рецепторов L-глутамата не-NMDA подтипа в ассоциативном обучении медоносной пчелы *Apis mellifera* // Ж. эвол. биох. и физиол. - 2004. - Т. 40. № 3. - С. 220-224.

3. Лопатина Н.Г., Рыжова И.В., Зачепило Т.Г., Смирнов В.Б., Чеснокова Е.Г. L-глутамат в формировании долговременной памяти медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) // Ж. эвол. биох. и физиол. - 2004. - Т. 40. № 6. - С. 539-546.
4. Лопатина Н.Г., Рыжова И.В., Зачепило Т.Г., Смирнов В.Б., Чеснокова Е.Г. Возрастная динамика чувствительности центральных рецепторов возбуждающих аминокислот к агонистам глутамата у медоносной пчелы // Ж. эвол. биох. и физиол. - 2006. - Т. 42. № 1. - С.88-91.
5. Лопатина Н.Г., Зачепило Т.Г., Чеснокова Е.Г., Савватеева-Попова Е.В.. Мутации структурных генов ферментов метаболизма триптофана по кинурениновому пути в модуляции звеньев сигнального каскада – рецепторы глутамата – актин цитоскелета // Генетика. - 2007. - Т. 43. № 10. - С. 1396-1401.
6. Зачепило Т.Г., Ильиных Ю.Ф., Лопатина Н.Г., Молотков Д.А., Попов А.В., Савватеева-Попова Е.В., Вайдо А.И., Чеснокова Е.Г. Сравнительный анализ особенностей локализации субъединиц рецептора NMDA-NR1 и NR2 в структурах головного ганглия медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) и дрозофилы (*Drosophila melanogaster*, линия дикого типа Canton-S) // Морфология. - 2007. - Т. 131. № 2. - С. 59-62.
7. Лопатина Н.Г., Зачепило Т.Г., Савватеева-Попова Е.В.. Лимкиназа-1 в головном ганглии дрозофилы в условиях генетических нарушений баланса кинуренинов // ДАН. - 2008. - Т. 418. № 1. - С. 125-127.
8. Лопатина Н.Г., Зачепило Т.Г., Чеснокова Е.Г., Савватеева-Попова Е.В. Поведенческие и молекулярные последствия дефицита эндогенных кинуренинов у медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) // Ж. ВНД. - 2010. - Т. 60. № 2. С. 229-235.
9. Рыжова И.В., Зачепило Т.Г., Чеснокова Е.Г., Лопатина Н.Г. Метаботропные глутаматные рецепторы в механизмах пластичности центральной нервной системы медоносной пчелы *Apis mellifera* // Ж. эвол. биох. и физиол. - 2010. - Т. 46. № 3.- С. 211-217.

Тезисы

1. Lopatina N.G., Grinkevich L.N., Zachepilo T.G., Mokrushin A.A., Smirnov V.B., Sharagina L.M., Chesnokova E.G. Comparative analyses of role main NR1 subunit NMDA receptors in forming neuronal activity and associative learning honey bee and rat // VII Europ. Conf. of ISIN «Simpler Nervous Systems»: proceedings. - Kaliningrad, 2003. - P. 73.
2. Лопатина Н.Г., Зачепило Т.Г., Гринкевич Л.Н., Мокрушин А.А., Рыжова И. В., Смирнов В.Б., Чеснокова Е.Г. Ионотропные рецепторы L-глутамата NMDA и не-NMDA подтипов и их субъединиц в пластических изменениях функции ЦНС медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) // Юбил. конф. посвящ. 50-летию со дня основ. Инст. физиол. нац. акад. наук Беларуси: тезисы доклада. – Минск, 2003. - С. 53.

3. Лопатина Н.Г., Савватеева Е.В., Зачепило Т.Г., Чеснокова Е.Г. К механизмам влияния наследственно-обусловленных нарушений кинуренинового пути обмена триптофана на функцию нервной системы и поведения насекомых // XIX съезд Физиол. об-ва им. И.П. Павлова: тезисы доклада. – Екатеринбург, 2004. - С.164.
4. Зачепило Т.Г., Ващенко И.С. Метаботропные рецепторы L-глутамата в формировании долговременных следов памяти медоносной пчелы // XIX съезд Физиол. об-ва им. И.П. Павлова: тезисы доклада. - Екатеринбург, 2004. - С.161.
5. Ryzhova I.V., Lopatina N.G., Savvateeva E.V., Zachepilo T.G., Tchesnokova E.G. Excitatory amino acids in memory formation and retention of the honeybee (*Apis mellifera* L.): ontogenetic and genetic aspects // 3rd European Congress on Social Insects: proceedings. - St.Petersburg, 2005. - P.49.
6. Лопатина Н.Г., Зачепило Т.Г., Рыжова И.В., Чеснокова Е.Г. Ионотропные и метаботропные рецепторы L-глутамата в формировании памяти у медоносной пчелы *Apis mellifera* L. // Симп. стран СНГ по перепонч. насек.: тезисы доклада. - Москва, 2006. - С.58.
7. Zachepilo T.G., Medvedeva A.V., Savvateeva-Popova E.V., Lopatina N.G. F-actin in the brain of *Drosophila melanogaster* with kynurenine metabolism genetic defect // VIII Europ. Conf. of ISIN «Simpler Nervous Systems»: proceedings. - Kazan, 2006. - P.103.
8. Plinykh U.F., Popov A.K., Savvateeva-Popova E.V., Zachepilo T.G. NMDA-receptor localization in the *Drosophila melanogaster* brain in wild type and kynurenine pathway of tryptophan metabolism mutants // VIII Europ. Conf. of ISIN «Simpler Nervous Systems»: proceedings. - Kazan, 2006. - P.32.
9. Лопатина Н.Г., Зачепило Т.Г., Чеснокова Е.Г., Савватеева-Попова Е.В. Сигнальный каскад – ионотропные рецепторы глутамата – актин цитоскелета – мозг – поведение – в условиях генетически-детерминированного дефицита кинуренинов // XX съезд Физиол. об-ва им. И.П. Павлова: тезисы доклада. - Москва, 2007. - С.58.
10. Зачепило Т.Г., Лопатина Н.Г., Рыжова И.В., Чеснокова Е.Г. К механизмам формирования долговременной памяти у медоносной пчелы .. XIII Съезд Рус. энтомол. об-ва.: тезисы доклада в сб. «Достижения энтомологии на службе агропромышленного комплекса, лесного хозяйства и медицины». - Краснодар, 2007. - С.76-77.
11. Зачепило Т.Г. Компоненты сигнального пути рецепторы глутамата – актиновый цитоскелет у мутантов дрозофилы, испытывающих дисбаланс кинуренинов // Междунар. школа-конф., посвящ. 100-летию со дня рождения М.Е. Лобашева «Системный контроль генетических и цитогенетических процессов»: тезисы доклада. - Санкт-Петербург, 2007. - С. 52-53.

12. Зачепило Т.Г., Чеснокова Е. Г., Лопатина Н. Г., Савватеева-Попова Е. В. Нейроактивная роль кинурениновых метаболитов триптофана (молекулярный аспект) // Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга: тезисы доклада. - Санкт-Петербург, 2008 - С. 59-60.
13. Рыжова И.В., Зачепило Т.Г., Смирнов В.Б., Чеснокова Е.Г., Лопатина Н.Г. Роль metabotropic glutamate receptors в механизмах пластичности центральной нервной системы медоносной пчелы // Всерос. конф., посвящ. 125-летию Л.А. Орбели. «Научное наследие академика Л.А. Орбели. Структурные и функциональные основы эволюции функций, физиология экстремальных состояний»: тезисы доклада. - Санкт-Петербург, 2008. - С.142-143.
14. Зачепило Т.Г. Сравнительный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей metabotropic glutamate receptors в различных филогенетических линиях // V съезд ВОГиС, посвящ. 200-летию Ч. Дарвина: тезисы доклада. - Москва, 2009. - С. 280.
15. Zachepilo T.G., Chesnokova E.G., Savvateeva-Popova E.V., Lopatina N.G. Kynurenines in the brain plasticity processes // IX Europ. Conf. of ISIN «Simpler Nervous Systems»: proceedings. -St-Petersburg, 2009. - P.114.
16. Зачепило Т.Г., Рыжова И.В., Чеснокова Е.Г., Лопатина Н.Г. Рецепторы L -глутамата в условиях дисбаланса эндогенных кинуренинов // XX съезд Физиол. об-ва им. И.П. Павлова: тезисы доклада. - Калуга, 2010. - С.58.