

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ FMRF-ПОДОБНЫХ ПЕПТИДОВ НА МЫШЕЧНОЕ СОКРАЩЕНИЕ У ПЛАНАРИЙ (PLATYHELMINTHES)

© 2021 г. Н.Д. Крещенко

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пущино Московской области, Институтская ул., 3

E-mail: nkreshch@rambler.ru

Поступила в редакцию 10.08.2020 г.

После доработки 20.08.2020 г.

Принята к публикации 21.08.2020 г.

С помощью гисто- и иммуноцитохимического методов, а также флуоресцентной и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии изучена локализация пептидергических нейронов и мышечных волокон мускулатуры тела у планарий *Girardia tigrina* и *Polycelis tenuis*. Продемонстрировано тесное пространственное взаиморасположение FMRF-иммунопозитивных нервных волокон и миофиламентов. Такая локализация периферических нервных волокон может указывать на важную роль FMRF-подобных пептидов в осуществлении мышечной функции. Физиологическое исследование с использованием изолированных мышечных клеток планарий *Procerodes littoralis* подтвердило индуцирующее влияние специфических природных FMRF-подобных нейропептидов – GYIRF и YIRF – на мышечное сокращение у планарий. Установлено, что дигидропиридиновые блокаторы кальциевых каналов – никардипин, нитрендипин и нифедипин, а также антагонист кальциевых каналов эндоплазматического ретикулума рианодин – подавляли пептид-индуцированное сокращение мышечных клеток. Блокаторы обратного захвата ионов кальция – тапсигаргин и циклопиазоновая кислота – уменьшали число пептид-индуцированных мышечных ответов. Данные свидетельствуют, что мышечное сокращение, вызванное FMRF-подобными пептидами, было зависимым как от внеклеточного, так и от внутриклеточного источника ионов кальция. Результаты могут указывать на наличие разнообразных рецепторов и ионных каналов, опосредующих мышечное сокращение у плоских червей.

Ключевые слова: планарии, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, FMRF-подобные пептиды, мускулатура.

DOI: 10.31857/S0006302921030157

Среди регуляторных нейропептидов, выделенных у плоских червей (Platyhelminthes) особое внимание привлекает семейство FMRF-подобных пептидов [1, 2]. У плоских червей было идентифицировано четыре FMRF-подобных пептида, три из которых выделены у свободноживущих представителей таксона, это YIRF у наземной планарии *Bdelloura candida*, GYIRF у планарий *Dugesia tigrina* и *B. candida*; RYIRF, обнаруженный у турбеллярии *Arthioposthia triangulate*, а также GNFFRF, выделенный у паразитических цестод *Moniezia expansa* [3–5]. Пептиды семейства FMRF-подобных – это короткие молекулы, состоящие из четырех-десяти аминокислотных остатков, обладающие амидированным С-концевым мотивом. Их характеризует структурное сходство

с кардиоактивным пептидом моллюсков *Macrocallista nimbosa*, FMRFамидом, обнаруженным еще в 1977 г. [6]. Применение антител к этим пептидам показало широкое распространение иммуноокраски к FMRF-подобным пептидам в центральных и периферических отделах нервной системы у исследованных в этом отношении видов плоских червей [7, 8]. Физиологическая роль FMRF-подобных пептидов остается малоизученной.

Планарии, свободноживущие представители типа Platyhelminthes, характеризуются высокой регенерационной способностью и широко используются в экспериментальной биологии как при исследовании стволовых клеток и молекулярных механизмов их функционирования [9–11], так и при изучении биофизических аспектов регенерации [12–14]. Будучи близкими родственниками паразитических червей, планарии используются при изучении паразито-хозяйственных отношений, а также поиске препаратов с антипа-

Сокращения: PBS-буфер – 4%-й параформальдегид в 0.1 М фосфатном буфере, PBST – PBS-буфер с добавлением 0.3% тритона X-100, FMRF-ип – FMRF-иммунопозитивные нервные волокна.

разитарными свойствами [15–18]. Использование планарий в качестве модельного биологического объекта имеет ряд преимуществ: их добыча и содержание доступны по экономическим соображениям, на них возможна постановка множественных экспериментов, удовлетворяющих любую статистику.

Мускулатура планарий осуществляет функцию поддержания формы тела, а также участвует в различных видах двигательной активности – плавании, поиске и захвате добычи, поглощении пищи, репродуктивном поведении [19, 20]. У паразитических червей мускулатура служит для проникновения в организм хозяина, а также является мишенью действия известных антипаразитарных агентов [21]. Несмотря на определенный интерес исследователей к изучению анатомической организации мышечной системы у представителей паразитических и свободноживущих плоских червей, физиологические аспекты ее функционирования остаются недостаточно изученными. Демонстрация наличия основных белков, принимающих участие в мышечном сокращении – актина и миозина [22, 23], а также разработка гистохимической методики идентификации фибриллярного актина с помощью флуоресцентно-меченого фаллоидина [24] привели к существенному прогрессу в изучении морфологического строения мускулатуры тела у представителей плоских червей [25].

Задачей настоящего исследования явилось изучение структурных и функциональных характеристик мускулатуры тела планарий. С помощью иммуноцитохимического и гистохимического методов и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии было показано тесное пространственное взаиморасположение FMRF-иммунопозитивных (FMRF-ип) нервных волокон и мышечных филаментов у планарий *Girardia tigrina* и *Polycelis tenuis*, указывающее на возможное участие данных нейропептидов в регуляции мышечного сокращения. Физиологические исследования, проведенные на изолированных мышечных клетках планарий *Procerodes littoralis*, продемонстрировали участие FMRF-подобных пептидов (GYIRF и YIRF) в осуществлении и регуляции их мышечной функции. В ходе экспериментальных исследований для определения подходов к изучению механизмов мышечного сокращения у плоских червей были использованы агонисты и антагонисты кальциевых ионных каналов.

Актуальность исследований обусловлена несколькими причинами: во-первых, информация о механизмах функционирования мускулатуры тела у плоских червей, большинство из которых являются опасными паразитами человека и животных, будет чрезвычайно полезна при разра-

ботке новых препаратов для борьбы с паразитарными заболеваниями; во-вторых, мы можем получить важную информацию о базовых принципах мышечного сокращения и его регуляторных механизмах, формирующихся у этих простых организмов, предки которых были близки к основанию эволюционного древа всех билатерально-симметричных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Гисто- и иммуноцитохимия. Для гистохимического определения мускулатуры и иммуноцитохимического определения элементов нервной системы использовали планарий *G. tigrina* (длина 8–9 мм) и *P. tenuis* (длина 11–12 мм). Для иммуноцитохимической идентификации FMRF-подобных нейропептидов в тканях планарий готовили замороженные срезы (*P. tenuis*) и тотальные препараты (*G. tigrina*). Образцы фиксировали PBS-буфером, содержащим 4% параформальдегида (MP Biomedicals, США) в 0.1 М фосфатном буфере («Helicon», Россия) при pH 7.4 в течение 4 ч при комнатной температуре, все последующие процедуры проводили при 4°C. Для приготовления тотальных препаратов образцы промывали 24 ч в растворе, содержащем PBST (раствор PBS с добавлением 0.3% тритона X-100 (Sigma, США), 0.1% азида натрия («Helicon», Россия) и 0.1% бычьего сывороточного альбумина (Amresco, США)). Затем образцы помещали на 48 ч в раствор (в разведении 1 : 1000) первичных поликлональных кроличьих антител к нейропептиду FMRFамиду (Immunostar, США), промывали в PBST (12 ч) и переносили во вторичные FITC-(fluorescein isothiocyanate)-конъюгированные свиньи антикроличьи иммуноглобулины (Daco, Дания; разведение 1:50) или вторичные козы антикроличьи AlexaFluor 488 иммуноглобулины (Abcam, США; разведение 1: 100) на 48 ч. После этого препараты промывали в растворе PBS (1–2 ч).

Для приготовления замороженных срезов фиксированные образцы помещали на четверо-пятеро суток в 10%-й раствор сахарозы («Helicon», Россия), затем на криотоме Shandon Cryomatrix (Thermolectron Corporation, США) при температуре –18°C готовили срезы, поместив препараты в заливочную среду NEG 20 (Thermo Scientific, США). Замороженные серийные срезы собирали на обработанные предметные стекла (Polysine, Menzel-Glaser, Германия) и хранили при –20°C. Перед окраской препараты промывали в PBST (трижды по 5 мин в горизонтальном положении), окрашивали антителами к FMRF (Immunostar, США; разведение 1 : 1000, 48 ч), горизонтально, во влажной камере при 4°C. После промывки в PBST (трижды по 5 мин) препараты помещали во вторичные флуоресцентно-мече-

ные иммуноглобулины на 24 ч и окончательно промывали в PBS (трижды по 5 мин).

Мускулатуру планарий *P. tenuis* и *G. tigrina* идентифицировали с помощью TRITC-(tetramethylrhodamine B isothiocyanate)-меченого фаллоидина (Sigma-Aldrich, США; в разведении 1 : 200), докрашивая срезы в течение 6 ч, а тотальные препараты – в течение 12–24 ч при 4°C. После промывки в PBS образцы заключали в 75%-й глицерин («Helicon», Россия) на PBS, накрывали покровным стеклом (Menzel-Glaser, Германия) и хранили при –20°C. Отрицательный контроль включал инкубацию образцов в растворе без первичных антител и замещение иммунной антисыворотки неиммунной. Контрольные образцы показали отсутствие в ткани исследованных образцов неспецифической окраски.

Микроскопия. Для анализа использовали по пять-семь препаратов каждого вида планарий. Готовые окрашенные срезы изучали с помощью флуоресцентного микроскопа DM6000 B (Leica Microsystems, Германия), оснащенного цифровой фотокамерой DC300F (Leica Microsystems, Германия), в Секторе оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН (Пушино, Россия). Для анализа использовали фильтры возбуждающего света с длиной волны в 450–490 нм (I3) для флуорохромов FITC и AlexaFluor488 и длиной волны 515–560 нм (N2.1) для локализации флуорохрома TRITC.

Тотальные препараты планарий анализировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия). Микрофотографии с конфокального лазерного сканирующего микроскопа представлены в виде отдельных оптических срезов, полученных при сканировании через толщину тканей в 30–60 мкм. Микрофотографии, полученные с помощью флуоресцентного и конфокального микроскопов, сохраняли в формате TIFF. Изображения анализировали с помощью программы LAS AF Lite program (версия 2.4.6384.1; Leica Microsystems CMS GmbH, Германия).

Физиология мышечного волокна. Объектом исследования служили изолированные (индивидуальные) мышечные клетки планарий *Procerodes littoralis* (Turbellaria, Tricladida). Культуру мышечных клеток получали при энзиматическом расщеплении тканей. Метод выделения индивидуальных мышечных волокон у паразитических и свободноживущих плоских червей успешно применялся ранее [4, 26]. Для каждого эксперимента использовали свежеприготовленную культуру мышечных клеток планарий. Из 25 особей длиной 9–10 мм с помощью тонкого скальпеля готовили гомогенат тканей, помещали в инкубационную среду, содержащую 13.6 мМ CaCl₂, 13.4 мМ

KCl, 458 мМ NaCl, 9.8 мМ MgCl₂×6H₂O, 13.6 мМ Na₂SO₄, 10 мМ HEPES, 10 мМ D-глюкозы и 1%-й раствор антибиотика (GibcoBRL, Великобритания), в которую добавляли 0.11 мг/мл коллагеназы (type 1A, из *Clostridium histolyticum*; Sigma, США), 0.15 мг/мл протеазы (type XIV, из *Streptomyces griseus*; Sigma, США), 0.15 мг/мл дитиотреитола (Sigma, США), после чего оставляли диспергировать в течение 12 ч при 4°C. Полученную суспензию клеток перемешивали на магнитной мешалке 10 мин, аккуратно пропускали через тонкий кончик пипетки, помещали в 15-миллилитровые пробирки (типа Falcon) и центрифугировали при 28 g в течение 5 мин. Супернатант сливали, а осадок ресуспендировали в инкубационной среде, не содержащей ферментов, в течение 15 мин (4°C). После этого полученную смесь (суспензию) клеток распределяли в пластиковые чашки Петри (50 мм, Falcon) по 3 мл в каждую, и сохраняли при 4°C в течение 30–90 мин для дальнейшего исследования.

Микроперфузионную систему, соединенную с инвертированным микроскопом Nikon Eclipse TE200 (Nikon, Япония; оборудование Королевского университета в г. Белфаст, Великобритания), использовали для визуального наблюдения процесса мышечного сокращения. Все эксперименты проводили при комнатной температуре (21–23°C). Во всех опытах использовали только неподвижные – спонтанно не сокращающиеся – мышечные клетки. Под микроскопом с помощью инжектора и тонкой стеклянной микропипетки (диаметр кончика около 5 мкм) исследуемое вещество вводили в непосредственной близости к мембране мышечной клетки (на расстоянии около 10–15 мкм). Сокращение наблюдали на экране монитора, соединенного с микроскопом. В одной серии использовали сто случайным образом выбранных клеток, взятых по 25 клеток в каждой из четырех чашек Петри с суспензией, приготовленной из тканей 25 особей планарий. Каждую клетку считали положительной при наблюдении ее сокращения в течение 10 с после введения тестируемого вещества. Опыты повторяли минимум три раза. Исследовали влияние нейропептидов GYIRFамида (GYIRF) и YIRFамида (YIRF) (Immunogenetics, США), для сравнения был также использован серотонин (5-НТ; Sigma, США). Данные на графиках и диаграммах представлены в виде процентной доли мышечных клеток, сокращающихся в ответ на введение тестируемого вещества. Перед применением тестируемого вещества проводили аппликацию инкубационной среды (негативный контроль); после аппликации тестируемых веществ в качестве положительного контроля на клетки подавали среду с высоким содержанием ионов калия (15–75 мМ), которая, как известно, вызывает сокращение мышечных воло-

кон [27]. Для статистической обработки результатов использовали *t*-тест Стьюдента. Для построения графиков и диаграмм, а также статистического анализа данных использовали программу GraphPad Prism 3.02 (США).

Для изучения механизмов мышечного сокращения и роли кальция в пептид-индуцируемом мышечном сокращении клетки предварительно инкубировали с избранными антагонистами наружных и внутренних ионных кальциевых каналов: никардипином, нитрендипином, нифедипином, дилтиаземом и верапамилом, рианодином, а также циклопиазоновой кислотой и тапсигаргином (все вещества получены от компании Sigma, США). Во всех опытах вещества в концентрациях 10 и 100 мкМ добавляли в чашки Петри с диспергированными мышечными клетками за 10 мин до начала основного тестирования.

Вещества, используемые для растворения антагонистов, а именно диметилсульфоксид (Sigma, США) и этиловый спирт, были также протестированы для установления их возможного влияния на мышечную активность. Было установлено, что 0.01%-й диметилсульфоксид ($n = 11$) и этанол в концентрациях 0.1% ($n = 7$) и 0.5% ($n = 10$) при их добавлении в культуру мышечных клеток за 10 мин до начала эксперимента не оказывали существенного влияния на базовый уровень мышечного сокращения, вызванного деполяризацией (30 мМ, K^+) серотонином (10^{-5} М) и пептидами (10^{-5} М).

Иммуноцитохимические и гистохимические исследования по идентификации актина и FMRF-подобных нейропептидов в тканях планарий *G. tigrina* и *P. tenuis* выполнены в Институте биофизики клетки РАН (ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»). Физиологические исследования мышечного сокращения проводили в Королевском университете г. Белфаст, Великобритания (Queen's University Belfast, UK). Результаты ранее были частично опубликованы в виде тезисов докладов [28, 29].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Иннервация мускулатуры тела планарий *G. tigrina* и *P. tenuis* FMRF-иммунопозитивными нервными элементами. У *P. tenuis* и *G. tigrina* окраска актиновых филаментов флуоресцентно-меченым фаллоидином была обнаружена в мышечных волокнах стенки тела планарий (рис. 1а,б; 2а,г) и окологлоточной зоны (рис. 1в). Мышечная стенка тела хорошо дифференцирована и состоит из компактно упакованных кольцевых, диагональных и продольных мышечных волокон (рис. 1а, острия стрелок, рис. 1б, тонкие стрелки). Немногочисленные, редко, но регулярно расположенные диагональные мышечные волокна локализу-

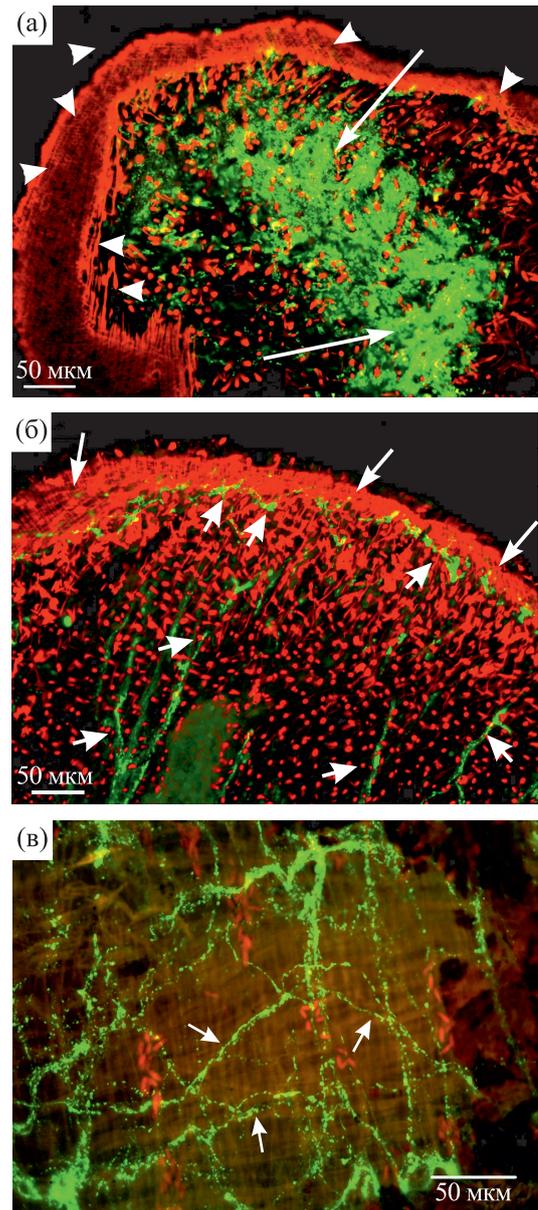


Рис. 1. Иммуноцитохимическая окраска нервных FMRF-ип-волокон (зеленое свечение) и гистохимическая окраска актиновых миофиламентов (красное свечение) TRITC-меченым фаллоидином в теле планарий *Polycelis tenuis* (замороженные срезы, флуоресцентная микроскопия). (а) — Сагиттальный срез головного конца тела планарий: головной нервной ганглий (FMRF-ип-структуры) отмечен длинными стрелками, диагональные, продольные и кольцевые мышечные филаменты стенки тела планарий отмечены остриями стрелок. (б) — Головной конец тела, фронтальный срез; отмечены нервные FMRF-ип-отростки (короткие толстые стрелки), простирающиеся к переднему краю между мышечными волокнами, тонкие стрелки — кольцевые и продольные мышечные волокна стенки тела. (в) — Нервная FMRF-ип-сеть (короткие стрелки) в окологлоточной области тела планарий.

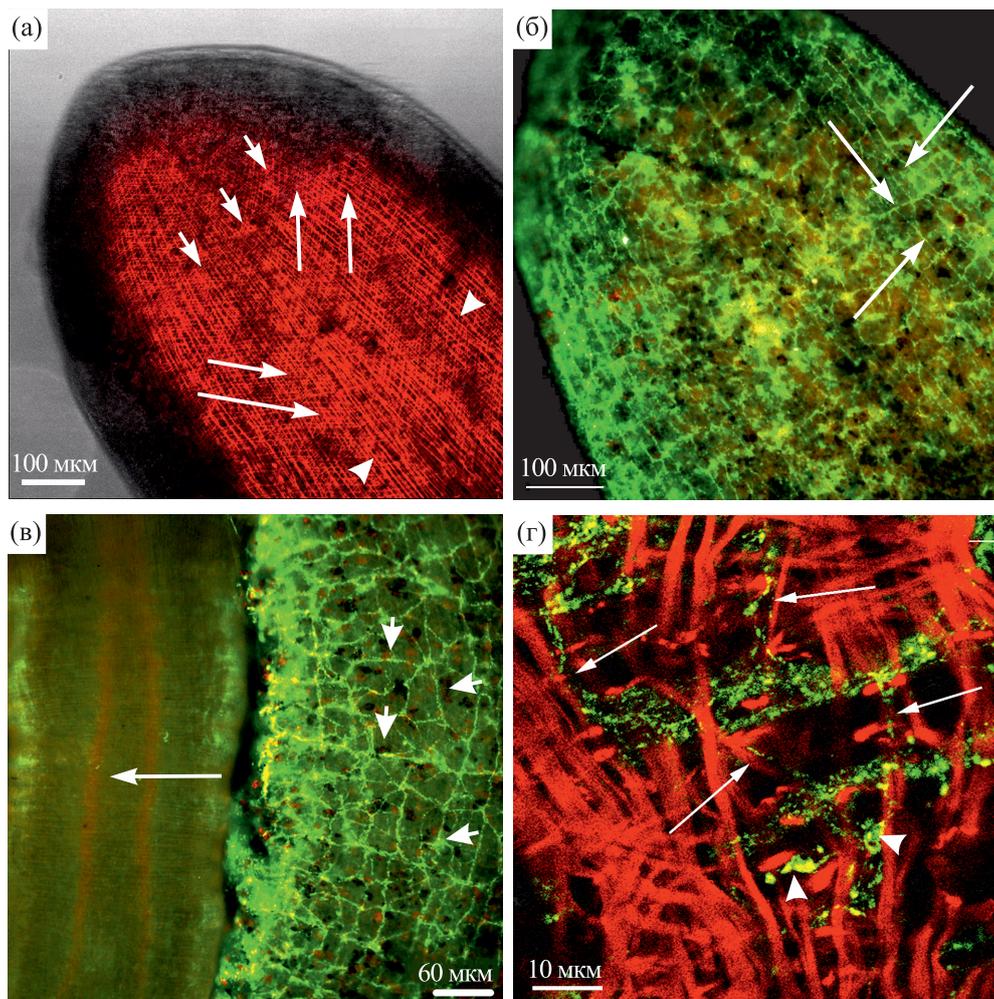


Рис. 2. Иммуноцитохимическая (зеленое свечение) окраска нервных FMRF-ип-волокон и гистохимическая окраска мышечных филаментов (красное свечение) планарий *Girardia tigrina*, тотальные препараты, световая и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (а и г), флуоресцентная микроскопия (б, в). (а) – Головной конец тела, мускулатура стенки тела планарий, оптический срез, отмечены продольные (острия стрелок), диагональные (длинные тонкие стрелки) и кольцевые (короткие стрелки) мышечные волокна; (б) – головной конец тела с тонкими нервными FMRF-ип-волоконками нервного плексуса (тонкие длинные стрелки); (в) – глотка (длинная стрелка) и окологлоточная область тела, видна FMRF-ип-окраска в окологлоточном нервном плексусе (короткие стрелки); (г) – нервные FMRF-ип-волокна (тонкие длинные стрелки) и нейроны (острия стрелок), окружающие мышечные филаменты стенки тела (оптический срез), тонкие FMRF-ип-волокна следуют на близком расстоянии вдоль единичных диагональных и кольцевых мышечных волокон (тонкие длинные стрелки).

ются между продольными и кольцевыми слоями миофибрилл. Дорзо-вентральные мышечные волокна расположены довольно равномерно и пронизывают все тело планарий. FMRF-иммунопозитивная (FMRF-ип) окраска отмечена в головном нервном ганглии планарий *P. tenuis* (рис. 1а, две длинные стрелки), от которого к переднему краю тела простираются FMRF-ип-нервные волокна, располагаясь между мышечными филаментами и следуя вдоль них (рис. 1б, короткие стрелки). FMRF-ип-окраска выявлена в нервных волокнах, иннервирующих мускулатуру тела *P. tenuis* (рис. 1б, короткие стрелки). В окологлоточной области тела (в стенке окологлоточного кар-

мана) также наблюдали густую нервную сеть FMRF-ип (рис. 1в, короткие стрелки).

Тотальный препарат планарий *G. tigrina* (рис. 2а) демонстрирует мускулатуру стенки головного отдела тела. В мышечной стенке выявлены продольные (рис. 2а, острия стрелок), кольцевые (рис. 2а, короткие стрелки) и диагональные мышечные волокна (рис. 2а, длинные стрелки); диагональные волокна следуют в двух перпендикулярных направлениях. Расположение миофиламентов в стенке тела у *G. tigrina* менее плотное, по сравнению с *P. tenuis*, однако порядок расположения мышечных слоев не отличается от такового у *P. tenuis*. У *G. tigrina* FMRF-ип-окраска выяв-

лена в тонких волокнах субмышечной нервной сети (рис. 2б). Многочисленные нервные FMRF-ип-элементы обнаружены в окологлоточной области тела (рис. 2в) планарий *G. tigrina*. Глотка (рис. 2в), лежащая в особом окологлоточном кармане, находится в центре туловища планарии, этот карман (или окологлоточная полость) открывается наружу ротовым отверстием на брюшной стороне тела. Стенка глоточного кармана (как и стенка тела планарии) состоит из продольных, диагональных и кольцевых мышечных волокон. FMRF-ип-окраску наблюдали в телах нейронов (рис. 2г, острия стрелок) и их отростках (рис. 2г, тонкие стрелки), расположенных между мышечными волокнами стенки тела планарий *G. tigrina*. По нашим наблюдениям, нервные FMRF-ип-клетки периферической нервной сети представлены преимущественно мультиполярными нейронами. Их нервные FMRF-ип-волокна с расширениями (varicosities) следуют как вдоль продольных и кольцевых мышечных волокон, так и вдоль диагональных миофибрилл. По всей вероятности, нервные FMRF-ип-окончания локализируются на продольных, кольцевых, а также диагональных мышечных волокнах.

Таким образом, проведенные у двух видов планарий иммуноцитохимические исследования свидетельствуют о том, что нервные FMRF-ип-элементы принимают участие в иннервации мускулатуры стенки тела, а также мышечной стенки окологлоточной полости *P. tenuis* и *G. tigrina*, указывая на возможную регуляторную функцию FMRF-подобных нейропептидов в сокращении мускулатуры тела планарий.

Физиологические исследования. Для изучения мышечного сокращения были проведены физиологические исследования на изолированных мышечных клетках планарий *P. littoralis* с использованием природных нейропептидов GYIRF и YIRF, среды с высоким содержанием ионов K^+ , а также дигидропиридиновых (никардипин, нитрендипин, нифедипин), бензотиазепиновых (дилтиазем) и фенилалкиламиновых (верапамил) блокаторов наружных кальциевых каналов и рианоидина, блокатора внутриклеточных кальциевых каналов эндоплазматического ретикулума (или рианоидиновых рецепторов). Изучали также влияние ингибиторов обратного захвата кальция в каналах эндоплазматического ретикулума — циклопиазоновой кислоты и тапсигаргина — при их добавлении в культуру мышечных клеток.

Эксперименты на изолированных мышечных клетках планарий показали, что введение нейропептидов GYIRF и YIRF в непосредственной близости к клеточной мембране вызывало сокращение мышечных клеток. Максимальное число сокращений под воздействием пептида YIRF (10^{-3} М) составило $60 \pm 1.8\%$, в то время

как под воздействием пептида GYIRF (10^{-3} М) сокращалось до $76 \pm 1.6\%$ мышечных клеток. Пептиды GYIRF и YIRF (в концентрациях от 10^{-3} до 10^{-10} М) вызывали сокращение индивидуальных мышечных клеток планарий в дозозависимой манере (рис. 3а).

Исследования показали, что предварительное (за 10 мин до начала тестирования) добавление никардипина (в концентрации 10 и 100 мкМ), нитрендипина, нифедипина и верапамила (все — в концентрации 100 мкМ) достоверно уменьшало число мышечных клеток планарий, сокращающихся в ответ на введение пептида GYIRF. Порядок ингибирующей активности был следующим: никардипин > нитрендипин > нифедипин > верапамил (рис. 3б). Дилтиазем в концентрациях 10 и 100 мкМ не оказал влияния на индуцированное пептидом сокращение мышечных клеток.

В качестве положительного контроля использовали среду с высоким содержанием ионов K^+ , вызывающих деполяризацию клеточной мембраны и сокращение мышечной клетки (рис. 4). Так, в наших опытах при введении вблизи мембраны мышечной клетки среды с 20 мМ ионов калия сокращались около $42 \pm 1.6\%$ мышечных клеток ($n = 9$); при концентрации ионов калия в 30 мМ — $67 \pm 2.8\%$ клеток ($n = 20$), при введении 40 мМ K^+ — $79.6 \pm 4.3\%$ клеток ($n = 10$), использование концентрации в 50 мМ K^+ вызывало сокращение $88 \pm 2.8\%$ мышечных клеток планарий ($n = 4$).

Число мышечных клеток, сокращающихся в ответ на введение пептидов YIRF и GYIRF, существенно уменьшалось после предварительной инкубации их с рианоидином (рис. 5а,б). Рианодин (в концентрациях от 10^{-4} до 10^{-8} М) подавлял пептид-индуцированное мышечное сокращение в дозозависимой манере (рис. 5а). Интересно, что рианодин (в концентрациях 10^{-5} и 10^{-6} М) блокировал также мышечное сокращение, вызываемое избытком ионов калия (K^+), но не оказывал существенного влияния на сокращение, вызываемое биогенным амином (серотонином) даже в концентрации 10^{-4} М (рис. 5б).

Тапсигаргин и циклопиазоновая кислота в концентрациях от 10^{-4} до 10^{-8} М, при добавлении в культуру клеток планарий за 10 мин до начала тестирования, уменьшали число мышечных клеток, сокращающихся в ответ на введение пептида GYIRF (10^{-5} М), а также в ответ на деполяризацию, вызванную высоким содержанием ионов K^+ (30 мМ), но не оказывали существенного влияния на индуцированное серотонином (10^{-5} М) мышечное сокращение (рис. 6а,б).

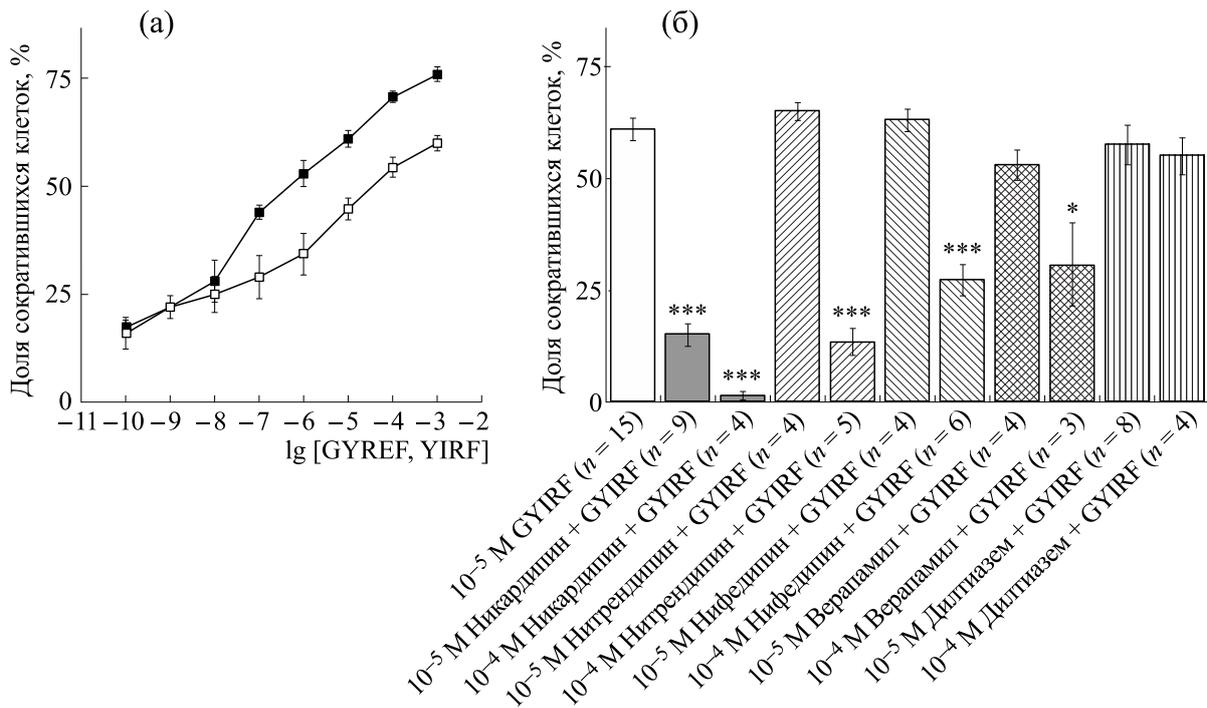


Рис. 3. (а) – Кривые пептид-индуцированного (GYIRF – темные квадраты, YIRF – светлые квадраты) сокращения изолированных мышечных клеток планарий *Procerodes littoralis*. По оси ординат – доля сократившихся мышечных клеток в процентах, по оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации пептида. Разбросы – стандартная ошибка среднего (SE). Число повторных опытов в каждой точке кривой $n = 4-8$ для GYIRF, $n = 4-18$ для YIRF. (б) – Доля сократившихся изолированных мышечных клеток планарий (ось ординат, в процентах) в ответ на введение нейропептида GYIRF при предварительном инкубировании клеток в течение 10 мин с дигидропиридиновыми блокаторами. Разбросы – стандартная ошибка среднего (SE). Различия с контролем (10^{-5} М GYIRF, без инкубации) достоверны при $***p < 0.0001$ и $*p < 0.01$ при использовании непарного (two-tailed) t -теста Стьюдента.

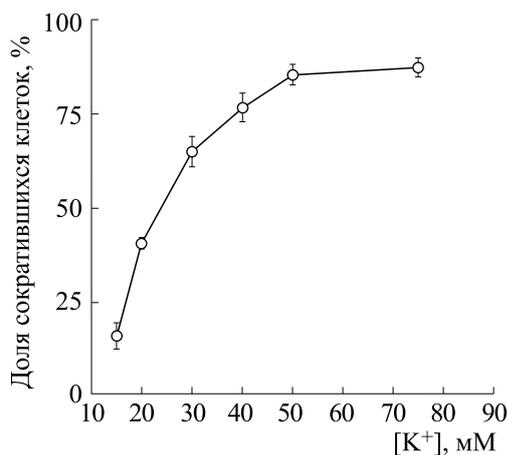


Рис. 4. Сокращение мышечных клеток планарий в ответ на введение среды с высоким содержанием ионов K^+ . По оси ординат – доля сократившихся мышечных клеток в процентах, по оси абсцисс – концентрация ионов калия, mM; разбросы – стандартная ошибка среднего (SE). Число повторных измерений в каждой из точек графика – от 4 до 20.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на некоторый прогресс в изучении мускулатуры паразитических червей, сведения о ее строении и, тем более, функционировании ограничены для большинства видов Platyhelminthes. Необходимость добычи животных в нужном для экспериментов количестве, создания специальных условий для сохранения их жизнеспособности, а также практические трудности воспроизведения в лабораторных условиях сложных и разнообразных жизненных циклов паразитических гельминтов создают объективные трудности в работе с паразитическими представителями плоских червей. Преимущество свободноживущих планарий, при использовании их в качестве биологической модели для изучения механизмов мышечного сокращения, состоит в простоте и удобстве манипуляций с этими организмами, в дешевизне их содержания, в возможности использования большого количества животных и постановки множественных экспериментов, удовлетворяющих любую статистику.

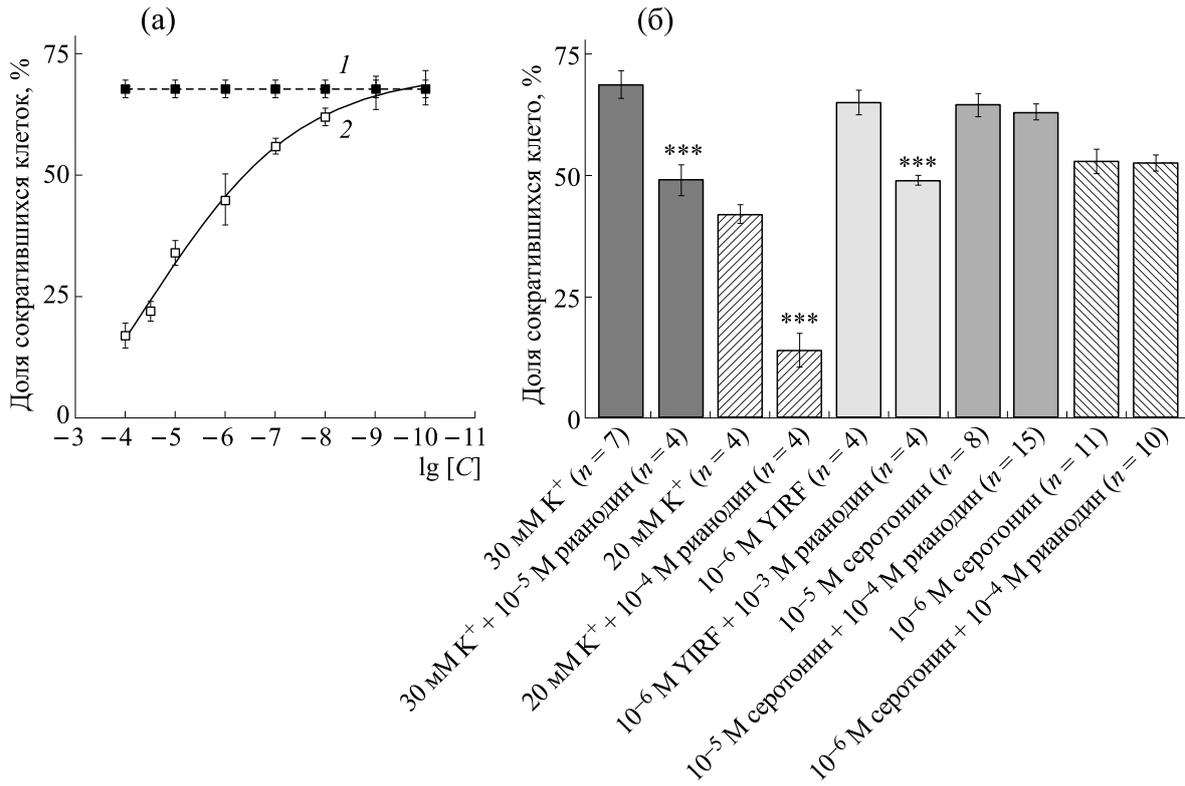


Рис. 5. (а) — Число сокращений изолированных мышечных клеток планарий, индуцированных нейропептидом GYIRF ($5 \cdot 10^{-5}$ М, $n = 12$, темные квадраты), после предварительного культивирования с рианоудином (светлые квадраты). По оси ординат — доля сократившихся мышечных клеток в процентах, по оси абсцисс — десятичный логарифм концентрации раствора рианоидина, добавленного в культуру мышечных клеток за 10 мин до начала эксперимента. Эмпирическая кривая, описывающая ответы мышечных клеток на введение пептида (GYIRF, $5 \cdot 10^{-5}$ М) после их инкубации с рианоудином, построена с помощью анализа методом Fit spline в статистической программе Prizm 3.02 (GraphPad Software Inc., США). Число повторных опытов в каждой точке кривой — от 4 до 8. Разбросы — стандартная ошибка (SE). Достоверность отличий кривой 1 (пептид) от кривой 2 (рианодин + пептид) была оценена согласно непарному t -тесту Стьюдента. (б) — Сокращение изолированных мышечных клеток планарий, вызванное деполяризацией (высоким содержанием ионов K^+), нейропептидом YIRF и серотонином, до и после предварительной инкубации мышечных клеток с рианоудином. По оси ординат — доля сократившихся мышечных клеток планарий. Разбросы — стандартная ошибка среднего (SE). Различия с контролем (без инкубации) достоверны при $***p < 0.0001$ согласно непарному t -тесту Стьюдента.

Мускулатура плоских червей преимущественно гладкомышечного типа. По своему происхождению она относится к первичным мышечным тканям, развившимся из эпителиально-мышечных клеток предков многоклеточных [21]. Механизм сокращения клеток гладкой мускулатуры у плоских червей, как и вообще у беспозвоночных, плохо изучен. Известно, что гладкомышечные клетки подвергаются действию нейромедиаторов, высвобождающихся из варикозных утолщений нерва. Поступление сократительного стимула (деполяризация мембраны, гормон или нейромедиатор) инициирует открытие кальциевых каналов в мембране мышечной клетки и/или эндоплазматического ретикулума. Действие нейромедиатора на сокращение клеток гладких мышц может быть возбуждающим либо тормозным. Возбуждающими нейромедиаторами мускулату-

ры плоских червей являются ацетилхолин, серотонин и специфические пептиды [21].

У паразитических Platyhelminthes положительная иммуноокраска к FMRF-подобным пептидам обнаружена у цестод и трематод в центральной нервной системе, субэпителиальном и субмышечном нервных плексусах, в нервных волокнах, пронизывающих прикрепительные органы - ротовую и брюшную присоски, глотку, репродуктивные структуры [30, 31]. FMRF-подобные пептиды были также показаны иммуноцитохимически у нескольких видов свободноживущих планарий: *B. candida* [4], *Microstomum lineare* [32], *Microstomum histicinum marinum* [33], *Planaria torva* [34], *Dugesia tigrina* [35, 36], *P. tenuis* и *Dendrocoelum lacteum* [37], *Schmidtea mediterranea* [38] с использованием целого ряда разных антител. У планарий *P. littoralis* нейропептид GNFFRF был иден-

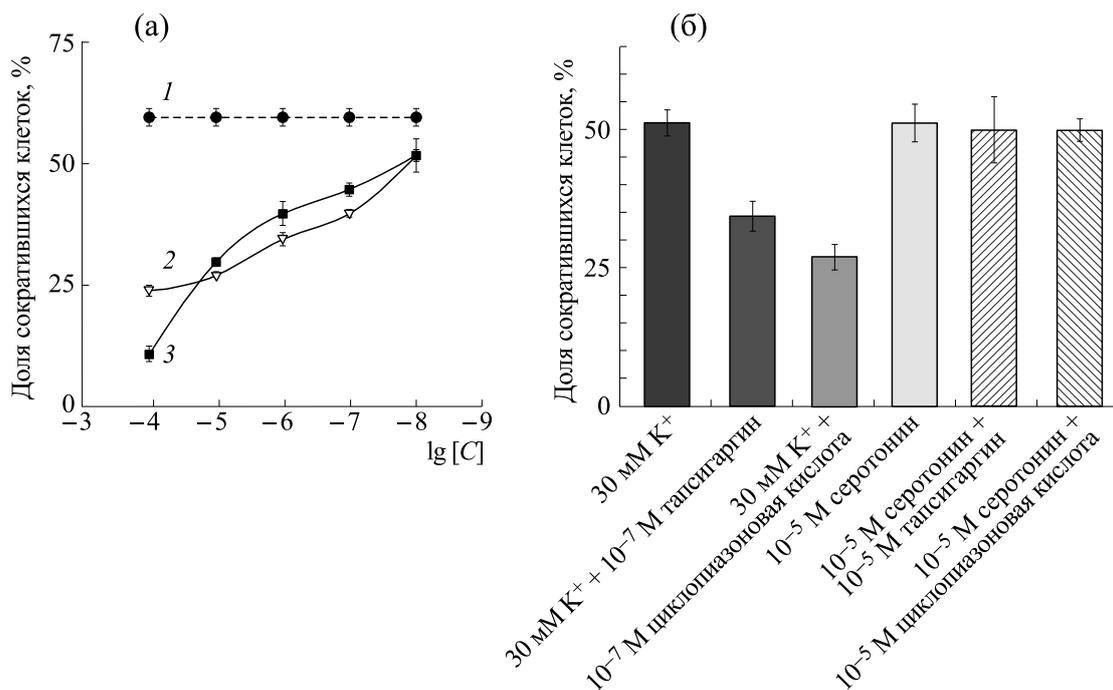


Рис. 6. (а) – Действие таусигаргина и циклопиазоновой кислоты на сокращение изолированных мышечных клеток, вызванное нейропептидом GYIRF. По оси ординат – доля сократившихся мышечных клеток в ответ на введение пептида (в процентах), по оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации таусигаргина и циклопиазоновой кислоты, добавленных в культуру мышечных клеток планарий за 10 мин до начала эксперимента. 1 – Контроль (пептид GYIRF, 10^{-5} М, $n = 4$); эмпирические кривые, описывающие ответы мышечных клеток на введение пептида (GYIRF, 10^{-5} М) после их предварительной инкубации с циклопиазоновой кислотой (2) и таусигаргином (3), построенные с помощью анализа методом Fit spline в статистической программе GraphPad Prizm 3.02. Число повторных опытов в каждой точке – от 3 до 6 (таусигаргин) и от 4 до 7 (циклопиазоновая кислота). Разбросы – стандартное отклонение (SD). (б) – Действие таусигаргина и циклопиазоновой кислоты на сокращение изолированных мышечных клеток, вызванное деполяризацией (30 mM K^+) и серотонином в концентрации 10^{-5} М. Число повторных подсчетов в каждой точке $n = 4$. Разбросы – стандартная ошибка среднего (SE).

тифицирован в синапсах нейронов с помощью электронной микроскопии и иммуно-мечения золотом [39]. В большинстве этих работ взаимодействие пептидергических нервных окончаний с мускулатурой тела не изучалось.

Наши данные подтверждают полученные ранее сведения о наличии FMRF-подобных пептидов у планарий. В настоящем исследовании продемонстрировано тесное пространственное взаимодействие пептидергических нервных волокон и мышечных филаментов у планарий. Показано, что мускулатура стенки тела, а также структуры с сильно развитой мускулатурой, такие как окологлоточная полость, интенсивно иннервируются отростками FMRF-ип-нейронов. Иннервация мускулатуры пептидергическими нервными элементами свидетельствует в пользу того, что эти молекулы могут быть вовлечены в регуляцию мышечной функции у плоских червей. В самом деле, литературные сведения указывают на важную роль FMRF-подобных пептидов в функционировании мускулатуры у паразитических видов червей. Так, было выявлено стимулирующее

действие FMRF-подобных пептидов на двигательную активность взрослых моногеней *Diclidophora merlangi* [40], личинок цестод *Mesocostoides corti* [41], обнаружено сократительное влияние FMRF-подобных пептидов на мышечные препараты трематод *Fasciola hepatica* [42, 43].

Успешное изолирование жизнеспособных мышечных волокон стало следующим важным шагом в изучении физиологии мышечного сокращения у плоских червей [44, 45]. В отличие от мышечных препаратов, использование отдельной мышечной клетки позволяет детально изучать фармакологические свойства тестируемых препаратов без влияния на них нейрональных сигналов. Непосредственное участие FMRF-подобных пептидов в индукции мышечного сокращения удалось показать на изолированных мышечных волокнах трематод *Schistosoma mansoni* [46], турбелларий *B. candida* [4], *P. littoralis* [27] и *D. tigrina* [47].

Результаты проведенного нами физиологического исследования с использованием изолированных мышечных клеток планарий, а также дан-

ные, полученные другими исследователями [27, 47], свидетельствуют о том, что специфические FMRF-подобные нейропептиды являются мощными индукторами сокращения мускулатуры у плоских червей. Начатые нами исследования механизмов стимулирующего влияния FMRF-подобных пептидов на мускулатуру показали, что у планарий *P. littoralis* сокращение зависело от поступления ионов Ca^{2+} через плазматическую мембрану, поскольку подавлялось дигидропиридиновыми блокаторами кальциевых каналов (никардипином, нитрендипином и нифедипином), а также фенилалкиламиновым блокатором верапамилом. Это указывает на наличие в мембране мышечной клетки планарий медленных потенциалуправляемых кальциевых ионных каналов L-типа, обладающих, по крайней мере, некоторыми свойствами кальциевых каналов позвоночных животных (дигидропиридиновая чувствительность). Эти предположения подтверждаются данными, полученными также на планариях *D. tigrina* [48]. Также установлено, что рианодин, антагонист внутренних кальциевых каналов эндоплазматического ретикулума, блокировал мышечное сокращение, вызываемое пептидами GYIRF и YIRF. Кроме того, тапсигаргин и циклопиазоновая кислота, специфические ингибиторы Ca^{2+} -АТФ-азы эндоплазматического ретикулума, вызывающие пассивный выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо в цитозоль, также значительно уменьшали число мышечных сокращений в ответ на введение пептида. Таким образом, результаты показали, что резерв внутриклеточного кальция играет центральную роль в регуляции пептид-индуцированного мышечного сокращения у планарий. Очевидно, что в ходе пептид-индуцированного мышечного сокращения вход внеклеточного кальция через плазматическую мембрану вызывает Ca^{2+} -индуцированный выход ионов кальция Ca^{2+} из внутриклеточного депо через внутренние рианодиновые кальциевые каналы. Полученные сведения в целом соответствуют представлениям о сокращении гладкомышечной мускулатуры и могут указывать на существование универсальных механизмов, задействованных в мышечном сокращении, как у высокоорганизованных, так и у таких простых организмов, как плоские черви, планарии. Индуцирующее влияние ряда агентов, таких как нейропептиды, серотонин, деполяризация, свидетельствует о наличии множества разнообразных специфических рецепторов на мембране мышечной клетки планарий. Результаты показали, что известные для позвоночных животных пути поступления внеклеточного кальция, а также механизмы высвобождения кальция из внутриклеточных депо в цитозоль присутствуют также и в гладкомышечных клетках плоских червей. Для выявления функциональных свойств му-

скулатуры плоских червей необходимо проведение дальнейших экспериментов. Эти исследования практически необходимы — поскольку мускулатура плоских червей является мишенью действия антипаразитарных препаратов. Выявление характерных физиологических свойств мускулатуры плоских червей должно в перспективе помочь в разработке специализированных лекарственных средств, селективно действующих на мускулатуру плоских червей, большинство которых являются возбудителями опасных заболеваний человека и животных.

ВЫВОДЫ

Иммуноцитохимические исследования с использованием специфических антител показали тесное пространственное взаиморасположение пептидергических (FMRF-подобных) нервных окончаний с мышечными волокнами стенки тела планарий.

Результаты демонстрируют способность природных нейропептидов (GYIRF и YIRF) индуцировать сокращение изолированных мышечных клеток, что может указывать на существование их специфических рецепторов на мембране мышечной клетки планарий.

Пептид-индуцированное мышечное сокращение подавлялось дигидропиридиновыми блокаторами Ca^{2+} -каналов и, таким образом, было зависимым от поступления внеклеточного Ca^{2+} в клетку.

В регуляции пептид-индуцированного мышечного сокращения у планарий центральную роль играет внутренний резерв ионов кальция Ca^{2+} , поступающего из внутриклеточного депо, вероятно через внутренние рианодиновые кальциевые каналы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность Д.В. Халтону (prof. D.W. Halton) и А.Г. Моу (prof. A.G. Maule) Королевского Университета г. Белфаст (Queen's University of Belfast, Northern Ireland, UK) за предоставленную возможность работать в лаборатории и их чуткое руководство, а также А. Моусли (dr. A. Mousley) за помощь в освоении методики культивирования мышечных клеток.

В работе использовано оборудование Сектора оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН (Пушино, Россия).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа по изучению физиологии мышечного сокращения была поддержана стипендией Королевского Общества Великобритании (Royal Society Fel-

lowship Program, Великобритания). Иммуноцитохимические исследования по идентификации FMRF-подобных пептидов и гистохимическое исследование мускулатуры у планарий выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №18-04-00349а).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. Shaw, A. G. Maule, and D. W. Halton, *Int. J. Parasitol.* **26** (4), 335 (1996).
2. P. McVeigh, G. R. Mair, L. Atkinson, et al., *Int. J. Parasitol.* **39**, 1243 (2009).
3. R. N. Johnston, C. Shaw, D. W. Halton, et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **209**, 689 (1995).
4. R. N. Johnston, C. Shaw, D. W. Halton, et al., *J. Neurochem.* **67**, 814 (1996).
5. G. Maule, D. W. Halton, and L. Thim, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **193**, 1054 (1993).
6. D. A. Price and M. J. Greenberg, *Science* **197** (4304), 670 (1977).
7. N. D. Kreshchenko, *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology* **8** (1), 89 (2014).
8. O. O. Tolstenkov, L. Akimova, N. B. Terenina, and M. K. S. Gustafsson, *Parasitol. Res.* **111**, 1977 (2012).
9. M. Almuedo-Castillo, X. Crespo, F. Seebeck, et al., *PLoS Genetics* **10** (6), e1004400 (2014).
10. L.-Ch. Cheng, K. C. Tu, C. W. Seidel, et al., *Dev. Biol.* **433**, 357 (2018).
11. J. Bagunà, *Seminars in Cell and Developmental Biology* **87**, 3 (2019).
12. V. V. Novikov, I. M. Sheiman, and E. E. Fesenko, *Bioelectromagnetics* **29** (5), 387 (2008). DOI: 10.1002/bem.20407
13. P. G. Barghouth, M. Thiruvalluvan, and N. J. Oviedo, *Biochim. Biophys. Acta* **1848** (10, Part B), 2629 (2015). DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.02.024
14. F. Durant, J. Bischof, Ch. Fields, et al., *Biophys. J.* **116**, 948 (2019).
15. T. Nogi, D. Zhang, J. D. Chan, et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3** (6), e464 (2009).
16. J. J. Collins and Ph. A. Newmark, *PLoS Pathogens* **9** (7), e1003396 (2013).
17. N. J. Wheeler, P. N. Agbedanu, M. J. Kimber, et al., *Parasitol. Vectors* **8**, 34 (2015).
18. E. I. Maciel, C. Jiang, P. G. Barghouth, et al., *Devel. Compar. Immunol.* **93**, 18 (2019).
19. F. Cebrià, *Front. Cell Devel. Biol.* **4**, 8 (2016). DOI: 10.3389/fcell.2016.00008
20. N. D. Kreshchenko, *Biophysics* **62** (2), 271 (2017).
21. D. W. Halton and A. G. Maule, *Can. J. Zool.* **82**, 316 (2004).
22. R. Pascolini, F. Panara, I. Di Rosa, et al., *Cell. Tiss. Res.* **267**, 499 (1992).
23. R. Pascolini, F. Panara, G. Gabbiani, et al., *Bolletino di Zoologia* **60** (4), 403 (1993). DOI: 10.1080/11250009309355848
24. M. H. Wahlberg, *Cell. Tiss. Res.* **291** (3), 561 (1998).
25. G. R. Mair, D. W. Halton, A. G. Maule, and C. Shaw, *Parasitology Today* **14**, 73 (1998).
26. K. L. Blair, T. A. Day, M. C. Lewis, et al., *Parasitology* **102**, 251 (1991).
27. C. G. Moneypenny, N. Kreshchenko, T. A. Day, et al., *Parasitology* **122**, 447 (2001).
28. N. Kreshchenko, T. A. Day, D. W. Halton, and A. G. Maule, in *Abstr. 8th Eur. Multicolloquium of Parasitology* (Poland, *Acta Parasitologica* **45** (3), 2000), p. 256.
29. N. D. Kreshchenko, M. Totten, A. G. Maule, et al., in *Abstr. Book of Int. Symp. "Biological motility: new trends in research"* (Pushchino, 2001), pp. 82–83.
30. N. B. Terenina, N. D. Kreshchenko, N. V. Mochalova, and S. O. Movsesyan, *Helminthologia* **55** (3), 185 (2018).
31. O. O. Tolstenkov, V. V. Prokofiev, N. B. Terenina, and M. K. S. Gustafsson, *Parasitol. Res.* **108**, 1219 (2011). DOI: 10.1007/s00436-010-2166-6
32. M. Reuter, M. K. S. Gustafsson, J. Lang, and C. J. P. Grimmelkuijzen, *Zoomorphology* **109**, 303 (1990).
33. G. R. Mair, R. N. Johnston, D. W. Halton, et al., *Zoomorphology* **116** (4), 213 (1996).
34. K. Mäntylä, D. W. Halton, M. Reuter, et al., *Hydrobiologia* **383**, 167 (1998).
35. M. Reuter, M. K. S. Gustafsson, I. M. Sheiman, et al., *Invertebrate Neurosci.* **1**, 133 (1995).
36. N. Kreshchenko, M. Reuter, I. Sheiman, et al., *Invertebrate Reproduction and Development* **35** (2), 109 (1999).
37. M. Reuter, M. K. S. Gustafsson, K. Mäntylä, and C. J. P. Grimmelkuijzen, *Zoomorphology* **116**, 111 (1996).
38. F. Cebrià, *Neurosci. Res.* **61**, 375 (2008).
39. K. Mäntylä, M. Reuter, D. W. Halton, et al., *Acta Zoologica (Stockholm)* **79** (1), 1 (1998b).
40. C. G. Moneypenny, A. G. Maule, C. Shaw, et al., *Parasitology* **115**, 281 (1997).
41. G. Hrkova, S. Velebný, D. W. Halton, et al., *Int. J. Parasitol.* **34**, 83 (2004).
42. N. J. Marks, S. Johnson, D. W. Halton, et al., *Parasitology* **113**, 394 (1996).
43. M. K. Graham, I. Fairweather, and J. G. McGeown, *Parasitology* **114**, 455 (1997).
44. K. L. Blair and P. A. V. Anderson, *Parasitology* **109**, 325 (1994).
45. T. A. Day, A. G. Maule, C. Shaw, et al., *Parasitology* **109**, 455 (1994).
46. T. A. Day, A. G. Maule, C. Shaw, and R. A. Pax, *Peptides* **18**, 917 (1997).

47. T. A. Day, J. Haithcock, M. Kimber, and A. G. Maule, *Parasitology* **120**, 417 (2000). 48. P. Cobbett and T. A. Day, *Com. Biochem. Physiol. Part A* **134**, 593 (2003).

An Exploration of the Mechanisms of Action of FMRF-Like Peptides in Inducing Muscle Contraction in Planarians (Platyhelminthes)

N.D. Kreshchenko

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

The present work focuses on the study of localization of peptidergic neurons and muscle fibers of body wall musculature in planarians *Girardia tigrina* and *Polycelis tenuis* with the use of immunohistochemistry and immunocytochemistry methods, fluorescent microscopy and confocal laser scanning microscopy. A close spatial relationship between FMRFamide-immunopositive nerve fibres and myofilaments is shown. Such localization of peripheral peptidergic nerve fibres may suggest an important role FMRF-like neuropeptides play in the regulation of muscle function. Physiological analysis of the muscle cells isolated from planarian *Procerodes littoralis* confirmed that native flatworm FMRF-like peptides GYIRF and YIRF have the inducing effect on muscle contractions in planarian. It was found that dihydropyridine calcium channel blockers, nifedipine, nitrendipine and nifedipine, as well as ryanodine, an antagonist of the endoplasmic reticulum calcium channels inhibited peptide-induced muscle contraction. The blockers of the intracellular calcium ions reuptake – thapsigargin and cyclopiazonic acid decreased the number of peptide-induced muscular responses. The findings suggest that FMRF-like peptide-induced muscle contraction is dependent on calcium ions from both extracellular pool and intracellular stores. The results demonstrate the presence of different receptors and ion channels controlling muscle contractions in flatworms.

Keywords: planarians, confocal laser scanning microscopy, FMRF-like peptides, musculature