ДИСКУССИЯ

DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-10-41-45

АНАЛИЗ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ИНФУЗОРИЙ *Paramecium caudatum* КАК ТЕСТ-СИСТЕМА ОЦЕНКИ СВОЙСТВ АДРЕНАЛИНА

Г. А. Груздев[1,*], О. В. Карпухина[1,2], А. Н. Иноземцев[1], А. В. Латанов[1], А. А. Каменский[1]

Работа посвящена исследованию зависимости двигательной активности *Paramecium caudatum* от концентрации адреналина в среде, в которой находятся исследуемые простейшие. Показано, что адреналин в диапазоне концентраций $5{,}5 \cdot 10^{-8}$ – $5{,}5 \cdot 10^{-18}$ моль/мл снижает двигательную активность, изменяет стратегию движения инфузорий ($p < 0{,}00005$), причем зависимость силы воздействия на поведение от дозы адреналина носит куполообразный характер. У *Paramecium caudatum* выявлена повышенная чувствительность рецепторов к адреналину относительно чувствительности адренорецепторов у высших животных: клетки способны реагировать на адреналин в среде даже в сверхнизкой концентрации до $5{,}5 \cdot 10^{-18}$ моль/мл. Полученные данные демонстрируют широкий спектр поведенческих реакций *Paramecium caudatum*, что подтверждает их ценность и удобство в качестве модельных объектов для фармакологических и токсикологических исследований. Анализ двигательной активности *Paramecium caudatum* позволяет определять диапазон предполагаемых физиологических или рабочих концентраций и степень чувствительности живых клеток к адреномиметикам и адреноблокаторам. Всё это даёт возможность рассматривать данный модельный объект, как новую тест-систему для доклинических исследований.

Ключевые слова: *Paramecium caudatum*; адреналин; клеточная модель нейрона; поведение; адренорецепторы.

ВВЕДЕНИЕ

Paramecium caudatum — одноклеточное животное, относящееся к типу *Ciliophora*, класс *Ciliata*, которое широко используют в качестве модельного объекта для исследования влияния фармакологических веществ (ФВ) различных классов на клетку. Данный объект позволяет наблюдать эффект воздействия ФВ одновременно и на клетку, и на весь организм в целом [2]. К преимуществам работы с инфузориями можно отнести: быстрое размножение исследуемого объекта; возможность отслеживания эффекта воздействия в нескольких поколениях; неприхотливость в содержании. Все это позволяет использовать инфузорий в широком спектре физиологических тестов. А сходство и даже идентичность нейромедиаторных систем инфузорий с таковыми у высших животных дает возможность использовать этот объект в доклинических исследованиях ФВ с различным действием [3]. До настоящего времени проведено много токсикологических исследований с использованием данной клеточной модели [4 – 5, 8]. Кроме того, инфузории заняли лидирующее место в качестве объекта для изучения цитопротекторных свойств ноотропных ФВ с антиоксидантой активностью [1]. Стоит отметить высокую значимость таких сравнительно-физиологических исследований для понимания эволюционных аспектов формирования нейромедиаторных систем. Двигательная активность отражает возникшее в эволюции фундаментальное свойство живых организмов, которое представляет собой точку приложения для изучения различных нейротропных веществ у животных разных уровней филогенеза.

Инфузории способны синтезировать нейромедиаторы, такие как адреналин, серотонин, ГАМК, глутамат и др., и осуществляют их секрецию во внешнюю среду [6, 7, 13]. Так, биогенные моноамины регулируют процесс конъюгации и деления клеток, скорость метаболизма глюкозы, пролиферацию ресничек, эндо- и экзоцитоз, а также определяют взаимодействие особей между собой. Сказанное определяет важность исследования этих объектов для понимания роли вышеупо-

[1] Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12.

[2] Федеральный исследовательский центр химической физики имени Н. Н. Семенова РАН, Россия, 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4, корп. 1.

* e-mail: Gleb-neuro.phys@mail.ru

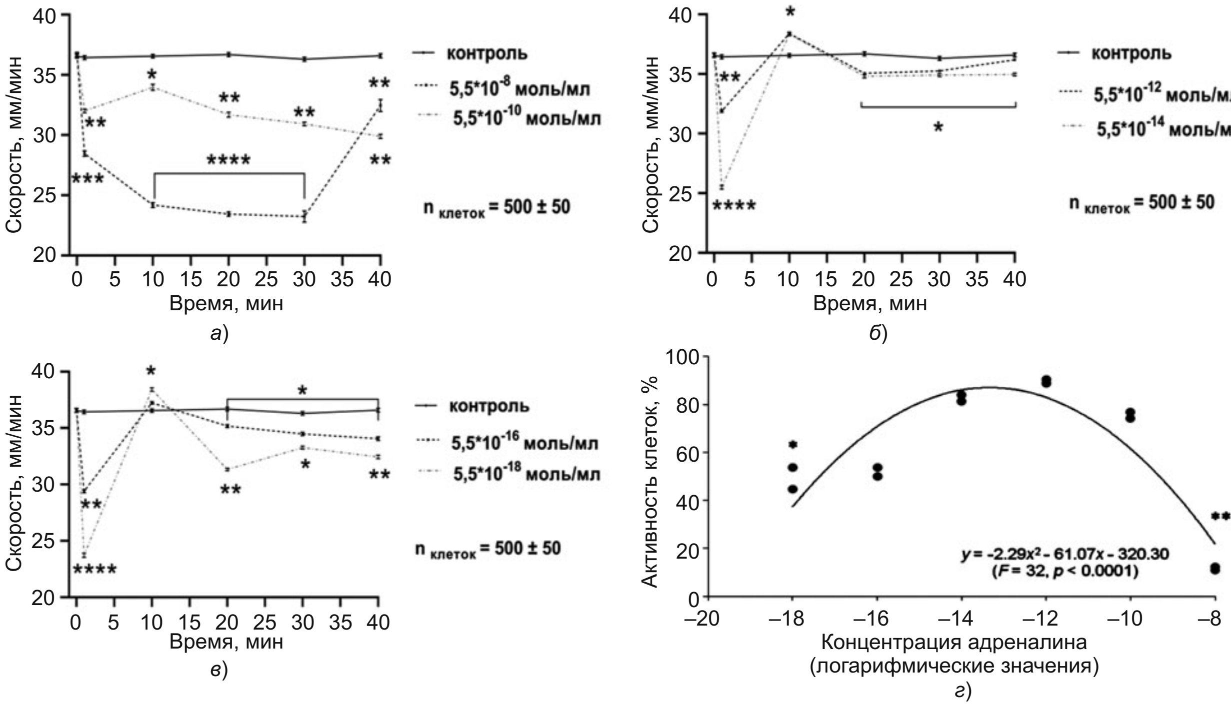

Рис. 1. Влияние адреналина ($5{,}5 \cdot 10^{-8} – 5{,}5 \cdot 10^{-18}$ моль/мл) на скорость движения и активность *Paramecium caudatum*.

Примечания. Сравнение относительно начальной скорости клеток до внесения в среду адреналина. *а – в* — скорость движения клеток при разных концентрациях адреналина в среде (* $p < 0{,}05$; ** $p < 0{,}005$; *** $p < 0{,}0005$; **** $p < 0{,}00005$); *г* — количество активных клеток при разных концентрациях адреналина (* $p < 0{,}05$; ** $p < 0{,}005$).

мянутых нейромедиаторов и выяснения механизмов их действия на биологические объекты самого различного уровня.

Целью нашей работы стало исследование влияния адреналина в разных концентрациях на характер двигательной активности *Paramecium caudatum*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на стерильной культуре живых клеток *Paramecium caudatum*. Инфузорий содержали в условиях, приближенных к естественным условиям их среды обитания: температура воды 24 °C, pH 6,8 – 7,2, с соблюдением 12-часового светового дня. Плотность популяции *Paramecium caudatum* в маточной культуре поддерживали в пределах 1000 клеток/мл.

Кормление инфузорий производили ежедневно раствором дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в объеме 200 мкл на колонию в 100 мл. Для предотвращения нарушения стерильности среды ежемесячно проводили фильтрацию колонии через мелкодисперсную губку. В день эксперимента останавливали кормление, а по окончанию работы производили утилизацию инфузорий.

Маточная культура была разделена на 7 групп (по 1 мл), каждой из которых вводили водный раствор адреналина гидрохлорида (Sigma). Контрольной группе вводили воду (с ионным составом, равным составу среды маточной культуры) по центру емкости в объеме $V = 0{,}1$ мл (1 группа). Вторая группа получила адреналин в концентрации $5{,}5 \cdot 10^{-8}$ моль/мл ($V = 0{,}1$ мл) в среде, следующие группы получали адреналин, разведенный с шагом в 100 раз, до концентрации в среде раствора адреналина $5{,}5 \cdot 10^{-18}$ моль/мл (7 группа). Эксперимент проводился в двух повторениях. Адаптация каждой группы перед введением препарата длилась 40 мин. После введения препарата регистрировали поведенческие реакции инфузорий в течение 40 мин.

Для регистрации движения клеток использовали тринокулярный стереоскопический микроскоп Olympus SZ6. Для анализа движения по полученным видеозаписям использовали программу ImageJ (Fiji) плагин “Track Mate” (среднюю скорость рассчитывали за каждую 1 мин движения в течение 40 мин эксперимента) [9]. Оценивали характер движения (кривизну трека, активность клеток по количеству подвижных особей в группе). Для оптимальной работы программы число особей в каждой из групп составляло 500 ± 50 шт/мл. Такое количество клеток в мл позволяет удовлетворить все статистические потребности, а также исключить погрешность в построении и считывании параметров траекторий (например, наложение трека на 2 и более объектов сразу). В полученных изображениях представлены треки для каждой особи за 1 мин регистрации (см. рис. 2, *а*). Концентрированные трековые пятна на полученных изображениях свидетельствуют о локальном скоплении инфузорий и про-

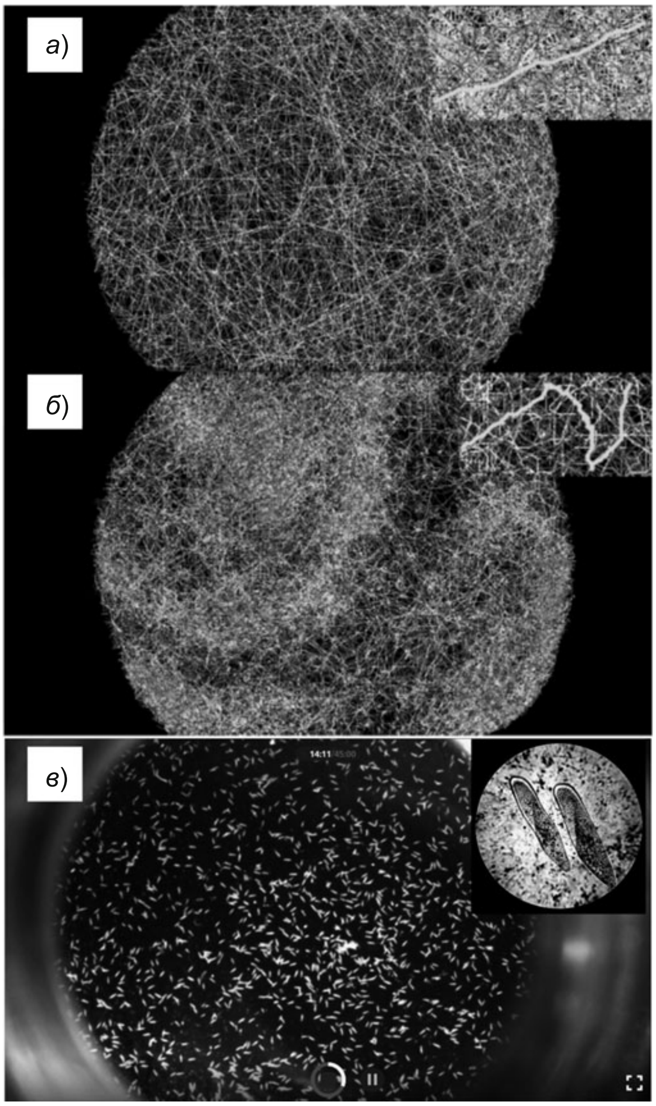

Рис. 2. Влияние адреналина ($5{,}5 \cdot 10^{-8}$ моль/мл) на стратегии поведения инфузорий.

Примечание. *а* — поведение клеток контрольной группы (добавление воды); *б* — положительный хемотаксис после введения в среду адреналина; *в* — вызванная реакция полового поведения (конъюгация) в ответ на внесение адреналина.

должительном времени нахождения особей на этих участках за время регистрации (см. рис. 2, *б*).

Статистический анализ проводили в программе “Statistica 10” с использованием непараметрического критерия Манна — Уитни, поскольку выборки данных не соответствовали нормальному закону распределения критерию Шапиро — Вилка. Достоверными считали отличия при $p < 0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольной группе в течение всего эксперимента у 95 % животных отмечали преимущественно прямолинейное движение, а пройденное расстояние составило около 150 см за 40 мин. При добавлении в среду адреналина пройденное расстояние за 40 мин сократилось до 100 – 120 см в зависимости от концентрации добавленного в среду адреналина (рис. 1).

Анализ двигательной активности *Paramecium caudatum* под влиянием адреналина показал, помимо снижения скорости движения, изменение характера двигательной активности. Кроме того, мы выявили характерные для инфузорий контрольной и опытной групп паттерны движения (рис. 2).

Скорость и характер движения, а также другие характеристики жизнедеятельности инфузорий напрямую зависят от изменения электрического потенциала мембраны клеток. Потенциал покоя мембраны клетки инфузории поддерживается в пределах –30 мВ, что существенно отличается от потенциала покоя клеток других животных. На мембране клетки инфузории идентифицированы калиевые, кальциевые, хлорные и другие виды ионных каналов. При гиперполяризации мембраны клетки инфузории скорость движения увеличивается, и она начинает двигаться по сглаженным, выпрямленным траекториям. Деполяризация клетки замедляет движение животного, делая траекторию ломанной (рис. 2). В случае с инфузориями наблюдается противоположный эффект тормозного и возбуждающего действия медиаторов в сравнении с действием аналогичных медиаторов высших млекопитающих. Такой эффект обусловлен тем, что при деполяризации мембраны биение ресничек замедляется, что напрямую влияет на снижение скорости клеток. А при изменении мембранного потенциала на противоположный, реснички инфузорий начинают “биться” в обратную сторону, позволяя объекту двигаться в обратном направлении. Если мембрана клеток перезаряжается только локальными участками, то инфузория будет вращаться вокруг своей оси [10].

Снижение скорости движения клеток после воздействия адреналина на адренорецепторы (АР) может быть вызвано деполяризацией мембраны с дополнительной реакцией в ответ на активацию других клеточных процессов, таких как секреция везикул, заполненных разными биологически активными молекулами.

Paramecium caudatum имеют большую плотность β_1- и β_2-АР на поверхности клеточной мембраны, гомология которых достигает 80 % с таковыми у высших млекопитающих. В природе наличие адреналина может сигнализировать о появлении пищи в среде или о возможной готовности клетки к конъюгации и необходимости поиска клетки-партнера. При этом адреналин не является “молекулой опасности”, так как не приводит к выбросу трихоцист (защитных нитей) во внешнюю среду [13].

При достижении концентрации адреналина в среде $5{,}5 \cdot 10^{-8}$ моль/мл (в данной концентрации адреналин способен оказывать влияние на работу сердечной мышцы у человека) отмечено резкое кратковременное снижение скорости движения инфузорий через минуту после добавления препарата (рис. 1, *а*). Скорость движения инфузорий восстанавливалась до контрольных значений в течение последующих 40 мин. Эффект восстановления скорости движения, возможно, связан с десенсибилизацией АР, а также с метаболизмом адреналина в неактивные соединения. Метаболизм адреналина у инфузорий осуществляется внутри клетки по двум путям — с прямым образованием ванилилминдалиевой кислоты (VMA) либо с дополнительным образованием дигидроксифенилэтиленгликоля (DOPEG) с помощью моноаминоксидазы и последующего его разрушения до VMA.

При снижении концентрации адреналина до $5{,}5 \cdot 10^{-12}$ моль/мл отмечено кратковременное повышение скорости движения инфузорий к 10 минуте после изначального снижения скорости (рис. 1, *б*). Однако не исключено, что такой эффект мог быть обусловлен вовлечением α_2-АР, активация которых приводит к выходу внутриклеточного кальция из организма, что приводит к гиперполяризации мембраны клетки. По такому механизму клетка будет отвечать при воздействии адреналина в концентрации $5{,}5 \cdot 10^{-18}$ моль/мл (рис. 1, *в*) [12]. Из чего можно предположить, что селективность к адреналину представленных АР различная.

Количество активно движущихся инфузорий (рис. 1, *г*, представлены медианами с межквартильным разбросом) существенно снижается при введении в среду адреналина в концентрации от $5{,}5 \cdot 10^{-8}$ до $5{,}5 \cdot 10^{-18}$ моль/мл. Зависимость количества активных клеток от концентрации адреналина в среде достоверно описывается уравнением параболической регрессии: $y = -2{,}29x^2 - 61{,}07x - 320{,}30$ ($F = 32$, $p < 0{,}0001$). Зависимость относительного числа (% от контроля) движущихся клеток от концентрации адреналина описывается куполообразной кривой. Такая зависимость характерна для многих биологических молекул, действие которых реализуется через метаботропные рецепторы разного типа. В данном случае активация адреналином α_1-, β_1-, β_2-АР приведет к приближению потенциала мембраны к положительному заряду, в то время как активация α_2-АР рецепторов — к более отрицательному заряду на мембране.

Проведенное нами исследование позволяет предположить, что для изучения свойств новых адреноблокаторов и адреномиметиков на *Paramecium caudatum* применение адреналина в концентрации $5{,}5 \cdot 10^{-18}$ моль/мл в среде будет более показательно, чем в концентрации $5{,}5 \cdot 10^{-8}$ моль/мл в среде, так как это соответствует концентрациям адреналина, выделяемого в окружающую среду самими клетками для “общения” между собой внутри колонии. Такая рабочая концентрация позволяет избежать ложных результатов при нежелательном токсическом воздействии на клетку в случае одновременного использования антагониста и агониста АР в среде.

Инфузории в природных условиях движутся линейно и равномерно, что мы и можем наблюдать у животных из контрольной группы (рис. 2, *а*). Такое поведение сохраняется у инфузорий до воздействия на них внешних стимулов (световых, химических или механических) [11].

Аналогичное линейное и равномерное движение отмечено у животных опытных групп до введения в среду адреналина. После воздействия этого ФВ характер движения инфузорий изменился на хаотичное и прерывистое. В некоторых случаях мы наблюдали локальное скопление инфузорий, которое выражается в концентрированных трековых пятнах на полученных изображениях, что свидетельствует о продолжительном времени нахождения особей на этих участках (рис. 2, *б*). С помощью секреции сигнальных молекул во внешнюю среду клетки могут сигнализировать о своем местонахождении и формировать химические следы, по которым инфузории способны ориентироваться внутри колонии.

Некоторые клетки не только снижали скорость движения под влиянием адреналина, но и образовывали дуплеты или триплеты, выстраивались друг к другу боковой стороной и останавливались для последующей конъюгации (рис. 2, *в*). Возможно, адреналин приводил к запуску программы полового размножения у инфузорий или просто стимулировал эндо-/экзоцитоз между клетками в культуре.

Нами показано, что характер воздействия адреналина в разных концентрациях на двигательную активность *Paramecium caudatum* носит нелинейный характер, что, вероятно, обусловлено гетерогенностью рецепторов к адреналину, обнаруженных на мембране клеток инфузорий.

Эти физиологические механизмы ранее не были изучены, однако в последующих работах при изучении селективных адреномиметиков и адреноблокаторов возможно будут найдены специфические ответы на активацию того или иного АР.

Полученные в этой работе данные помогут использовать тест-систему для первичного скрининга ФВ с адренергическим действием.

ВЫВОДЫ

1. Адреналин ($5{,}5 \cdot 10^{-8} - 5{,}5 \cdot 10^{-18}$ моль/мл) снижает скорость и двигательную активность клеток *Paramecium caudatum* в среднем на 10 мм/мин ($p < 0{,}00005$). Поведенческий ответ инфузорий в присутствии адреналина носит временный и обратимый характер.

2. У *Paramecium caudatum* выявлена повышенная чувствительность рецепторов к адреналину относительно чувствительности адренорецепторов у высших животных. Клетки способны реагировать на адреналин в среде даже в сверхнизкой концентрации до $5{,}5 \cdot 10^{-18}$ моль/мл.

3. Концентрационная зависимость силы воздействия адреналина на поведение и активность инфузорий носит куполообразный характер.

4. Анализ двигательной активности *Paramecium caudatum* позволяет определять диапазон предполагаемых физиологических или рабочих концентраций и степень чувствительности живых клеток к исследуемым веществам. Это позволяет рассматривать данный модельный объект как новую тест-систему для доклинических исследований лигандов адренорецепторов.

Источники финансирования

Исследование выполнено при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета "Мозг, когнитивные системы, искусственный интеллект".

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

Вклад авторов

Идея работы и планирование эксперимента (Груздева Г. А., Каменский А. А.), сбор данных (Груздев Г. А., Карпухина О. В.), обработка данных (Груздев Г. А., Латанов А. В., Иноземцев А. Н.), написание и редактирование статьи (Груздев Г. А., Карпухина О. В., Латанов А. В., Иноземцев А. Н., Каменский А. А.).

Соблюдение этических стандартов

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. А. Тушмалова, Н. Е. Лебедева, Ю. В. Иголкина, Е. И. Сарапульцева, *Вестник Московского университета. Серия 16*, № 2, 27 – 30 (2014).
2. R. Brette, *eNeuro*, **8**(3) (2021); doi: 10.1523 / ENEURO.0018-21.2021.
3. E. G. Cheremnykh, P. A. Ivanov, O. Y. Sokolov, et al., *J. Neuroimmune Pharmacol.*, **14**, 369 – 374 (2019); doi: 10.1007 / s11481-019-09860-3.
4. A. N. Inozemtsev, O. V. Karpukhina, I. V. Melikhov, et al., *J. Phys. Conf.*, Ser: 1238 (2019); doi: 10.1088 / 1742-6596 / 1238 / 1 / 012050.
5. I. G. Morgunov, S. V. Kamzolova, O. V. Karpukhina, et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **103**, 3549 – 3558 (2019); doi: 10.1007 / s00253-019-09729-8.
6. P. Ramoino, S. Candiani, A. M. Pittaluga, et al., *J. Exp. Biol.*, **217**, 463 – 471 (2014); doi: 10.1242 / jeb.093914.
7. P. Ramoino, L. Gallus, F. Beltrame, et al., *J. Cell Sci.*, **119**, 2056 – 2064 (2006); doi: 10.1242 / jcs.02931.
8. V. P. Savinov, V. G. Yakunin, O. V. Karpukhina, et al., *J. Phys. Conf.*, Ser: 1348 (2019); doi: 10.1088 / 1742-6596 / 1348 / 1 / 012007.
9. J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, et al., *Nat. Methods*, **9**, 676 – 682 (2012); doi: 10.1038 / nmeth.2019.
10. C. H. Schlaepfer, R. Wessel, *J. Undergrad. Neurosci. Educ.*, **14**(1), 82 – 86 (2015).
11. V. Slaveykova, B. Sonntag, J. Carlos, *Europe PMC Funders Group Stress and Protists: No life without stress*, 55, 39 – 49 (2016); doi: 10.1016 / j.ejop. 2016.06.001.Stress.
12. J. L. Houten Van, W. Q. Yang, A. J. Bergeron, *Nutr.*, **130**, 946 – 949 (2000); doi: 10.1093 / jn / 130.4.946S.
13. J. Wiejak, L. Surmacz, E. Wyroba, *J. Exp. Biol.*, **207**, 1625 – 1632 (2014); doi: 10.1242 / jeb.00914.

Поступила 07.06.22

MOTOR ACTIVITY OF CILIATES *Paramecium caudatum* AS A TEST SYSTEM FOR EVALUATING THE PROPERTIES OF ADRENALINE

G. A. Gruzdev[1,*], O. V. Karpukhina[1,2], A. N. Inozemtsev[1], A. V. Latanov[1], and A. A. Kamensky[1]

[1] Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory, 1, building 12, 119234, Moscow Russia

[2] Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina, 4, 119334, Moscow Russia

[*] e-mail: Gleb-neuro.phys@mail.ru

The results of studying the dependence of the motor activity of *Paramecium caudatum* on the concentration of adrenaline in the experimental habitat are presented. It is shown that adrenaline in a dose range of $5{,}5 \times 10^{-8} – 5{,}5 \times 10^{-18}$ mol/ml reduces the motor activity ($p < 0{,}00005$) and changes the strategy of *Paramecium caudatum* movement (movement patterns), the dose dependence of the strength of the adrenaline impact on their behavior being dome-shaped. *Paramecium caudatum* exhibited higher sensitivity of the receptors to adrenaline compared to the sensitivity of adrenoreceptors in higher animals. The cells are able to respond to adrenaline present in the medium even at an ultra-low concentration up to 5.5×10^{-18} mol/ml. The obtained data demonstrate a wide range of behavioral reactions of *Paramecium caudatum* which confirms their value and convenience as model objects for pharmacological and toxicological experiments. Analysis of the motor activity in *Paramecium caudatum* makes it possible to determine the range of expected physiological or working concentrations, as well as the sensitivity of living cells to the to adrenomimetics and adrenergic blocking agents. The results obtained provide for considering this model object a new testsystem for preclinical research.

Keywords: *Paramecium caudatum*; epinephrine; cellular model of a neuron; behavior; adrenoreceptors.