

УДК 591.1, 612.67

ТРИПЕПТИД МОДУЛИРУЕТ УСЛОВНО-РЕФЛЕКТОРНУЮ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ *APIS MELLIFERA L.*

^{1,2}Хавинсон В.Х., ¹Лопатина Н.Г., ^{1,2}Чалисова Н.И., ¹Зачепило Т.Г.,

^{2,3}Линькова Н.С., ²Халимов Р.И., ¹Камышев Н.Г.

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург;

²Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург;

³Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, Санкт-Петербург,
e-mail: linkova@gerontology.ru

В работе изучено влияние пептида глутамил-аспарагил-аргинин (EDR) на формирование кратковременной и долговременной памяти у медоносной пчелы *Apis mellifera carnica Pollm.* Пептид в диапазоне концентраций 10^{-10} – 10^{-5} М оказывал стимулирующее действие на формирование памяти у пчел с исходно низким условно-рефлекторным фоном. У пчел с изначально высоким условно-рефлекторным уровнем пептид ингибировал формирование памяти. Модулирующее действие пептида на формирование памяти у медоносной пчелы может быть связано с тем, что этот пептид является функциональным аналогом оркокинина, вырабатываемого нейронами грибовидных тел мозга насекомых. Проведенные исследования позволили установить сходство в действии пептида на высшую нервную деятельность у насекомых и млекопитающих и могут указывать на ключевую роль нейропептидов в эволюции.

Ключевые слова: пептид EDR, условно-рефлекторная деятельность, память, регуляция, пчелы

TRIPEPTIDE MODULATE THE CONDITIONALLY-REFLECTIVE ACTIVITY IN A HONEY-BEE *APIS MELLIFERA L.*

^{1,2}Khavinson V.H., ¹Lopatina N.G., ^{1,2}Chalisova N.I., ¹Zachepilo T.G.,

^{2,3}Linkova N.S., ²Khalimov R.I., ¹Kamishev N.G.

¹Pavlov Institute of Physiology of RAS, Saint-Petersburg;

²Saint Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, Saint-Petersburg;

³Saint Petersburg State Polytechnical University, Saint-Petersburg, e-mail: linkova@gerontology.ru

It was shown that the influence of the peptide EDR on the short-time and long-time memory formation in a honey-bee *Apis mellifera carnica Pollm.* The peptide in concentration interval 10^{-10} – 10^{-5} M has stimulated the memory formation in a honey-bee with the base low conditional background. The peptide has inhibited the memory formation in a honey-bee with the base high conditional background. The modulating action of the peptide on the memory formation in a honey-bee can be connected with its similar functional activity of orcoinin the petide, which synthesized mushrooms body of insects. The investigation has been shown the neuroprotection activity similarity in mammal and insects. These facts can show the key role of neuropeptides in evolution.

Keywords: peptide EDR, conditionally-reflective activity, regulation, bee

В конце XX в. было показано модулирующее влияние нейропептидов в интегративной деятельности нервной системы у позвоночных и беспозвоночных животных. Нейропептиды принимают участие в запоминании, обучении, механизме сна. Таким образом, нейропептиды являются классом универсальных химических регуляторов, значимость которых «простирается от влияния на функции отдельных групп клеток до управления работой целых систем и органов, включая сложные акты поведения» [1]. В настоящее время открыто около 100 нейропептидов, которые синтезируются различными типами нейронов головного мозга. Большинство нейропептидов синтезируется в виде предшественников и переходят в активную форму путем органического протеолиза. Этот биологический феномен лег в основу создания нейропротекторных лекарств нового поколения – коротких пептидов,

представляющих собой активные центры полипептидных молекул. Так, пептиды семакс и кортаген успешно применяются в лечении дисфункций центральной нервной системы различного генеза [3]. В Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии был сконструирован пептид EDR (пинеалон, Lys-Glu-Arg) [9]. Нейропротекторные свойства пептида EDR были изучены в культурах клеток, в опытах на животных и в клинической практике [3, 4, 8].

Целью работы явилось изучение влияния пептида EDR на функцию высших отделов нервной системы, обеспечивающих когнитивную деятельность, в частности формирование памяти. Биохимическая и физиологическая общность механизмов формирования памятного следа в нервной системе у позвоночных и беспозвоночных животных позволяет использовать в качестве модельного объекта насекомых.

Исследование проведено на модельном объекте – медоносной пчеле краинской расы *Apis mellifera carnica Pollm.* Известно, что способность к ассоциативному обучению наибольшей сложности достигает именно у общественных насекомых.

Многолетние исследования свидетельствуют о способности этого вида насекомых к осуществлению высших форм нервной деятельности: к ассоциативному обучению, к долговременному хранению в памяти приобретаемого в процессе пищедобывательной летной деятельности индивидуального опыта, об использовании при этом рецепторных, сигнальных, трансдукционных механизмов, сходных с млекопитающими. В настоящее время ассоциативное обучение у медоносной пчелы изучено на поведенческом, нейрональном, межклеточном и клеточном уровнях, включая изучение генетического аппарата. В модели условно-рефлекторной деятельности пчелы *Apis mellifera* исследована роль глутаматных рецепторов в формировании памяти, изучены некоторые нейропротекторные свойства аминокислот и пептидов, проведены сравнительные генетические исследования функции ЦНС с другими видами модельных насекомых, например с *Drosophila melanogaster* [1, 2].

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служила медоносная пчела краинской расы *Apis mellifera carnica Pollm* в возрасте 10–40 дней. Для изучения условно-рефлекторной деятельности пчел оценивали образование пищевого условного рефлекса вытягивания хоботка на обонятельный раздражитель (PER – Proboscis Extension Response conditioning). У фиксированных за крылья пчел вырабатывали условный рефлекс вытягивания хоботка путем однократного сочетания запаха гвоздики и пищевого подкрепления – 50% раствора сахарозы. Через 1 мин (кратковременная память) и 180 мин (долговременная память) по окончании процедуры обучения у пчел проверяли наличие условной реакции на запах. До обучения у пчел оценивали сенсорную возбудимость – наличие спонтанной реакции вытягивания хоботка на еще неподкрепленный запах (при наличии таковой пчел выбраковывали) и пищевую возбудимость – вытягивание хоботка в ответ на соприкосновение раствора сахарозы с антеннами (вкусовая рецепция) (в отсутствие таковой пчел выбраковывали). За 3 ч до процедуры обучения пчел изолировали, лишая их пищи и контакта с семьей, для повышения пищевой мотивации. Фоновый условно-рефлекторный уровень определяли как количество пчел, сохраняющих в памяти условную реакцию в контрольной группе (инъекции физиологического раствора) и выражали в%. За 30 мин до обучения пчелам дорзально в тораке делали инъекции 2 мкл раствора пептида EDR в ряду концентраций 10^{-11} М– 10^{-4} М (опыт) или 2 мкл физиологического раствора (контроль). В каждой серии экспериментов использовали 60 пчел. Число пчел, ответивших

условной реакцией, оценивали в% по отношению к контрольному уровню (принятому за 100%).

Статистическая обработка данных включала в себя подсчет среднего арифметического, стандартного отклонения от среднего и доверительного интервала для каждой выборки и проводилась в программе «Statistica 7.0». Для анализа вида распределения и проверки нулевой гипотезы использовали критерий Шапиро-Уилка. Для оценки статистической однородности нескольких выборок были использованы непараметрические процедуры однофакторного дисперсионного анализа (критерий Крускала–Уоллиса). Для статистического анализа достоверных различий характеристик памяти у пчел применяли двухвыборочный критерий Вилкоксона ранговых сумм. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Эффективные концентрации пептида EDR находились в диапазоне 10^{-10} – 10^{-5} М. Если пептид EDR оказывал стимулирующее или ингибирующее влияние на кратковременную память при использовании всех указанных концентраций, то воздействие на долговременную память оказывали только низкие концентрации пептида (10^{-10} – 10^{-8} М). Стимулирующий или ингибирующий эффект пептида EDR зависит от фонового условно-рефлекторного уровня. В среднем $67,8 \pm 1,3\%$ пчел сохраняют в кратковременной/долговременной памяти выработанный условный рефлекс на обонятельный раздражитель при пищевом подкреплении. В данном исследовании все насекомые были разделены на 2 подгруппы – в первой условно-рефлекторный фон отклонялся от среднего значения в меньшую сторону, когда $47,6 \pm 3,5\%$ пчел сохраняли в памяти условную реакцию. Во второй подгруппе контрольный условно-рефлекторный фон отклонялся от среднего значения в большую сторону – $92,3 \pm 4,7\%$ пчел сохраняли в памяти условную реакцию. Введение пептида EDR в случае исходного низкого условно-рефлекторного уровня оказывало стимулирующее воздействие на процессы, способствующие сохранению в памяти выработанного условного рефлекса (рис. 1). При концентрации пептида 10^{-8} М количество пчел, сохраняющих в кратковременной памяти условную реакцию, увеличивалось на 23% по сравнению с начальным низким условно-рефлекторным уровнем. При концентрации пептида 10^{-7} М количество таких пчел увеличивалось на 40%, при концентрации 10^{-6} М – на 28%, при концентрации 10^{-5} М – на 36%. На сохранение в долговременной памяти выработанного рефлекса у пчел с исходно низким условно-рефлекторным уровнем пептид EDR не оказывал влияния.

Иная картина наблюдалась при исходном высоком фоновом условно-рефлекторном уровне (рис. 2). В этом случае при воздействии пептида EDR в диапазоне 10^{-10} – 10^{-7} М количества пчел, сохраняющих в кратковременной и долговременной памяти условную реакцию, значительно снижалось. При введении пептида в концентрации 10^{-10} М количество пчел, сохраняющих в кратковременной памяти условную реакцию, уменьшалось на 34%, а количество пчел, сохраняющих в долговременной памяти условную реакцию, снижалось на 15% по сравнению с исходным высоким условно-рефлекторным уровнем.

Концентрация пептида 10^{-9} М оказывала ингибирующее влияние только на кратковременную память. При этом количество пчел, сохраняющих в кратковременной памяти условную реакцию, уменьшалось на 38%. Концентрация пептида 10^{-8} М оказывала влияние на оба вида памяти. Количество пчел, способных сохранять приобретенный опыт в кратковременной памяти, уменьшалось на 35%, а в долговременной памяти – на 17%. Воздействие пептида EDR в концентрации 10^{-7} М ингибировало долговременную память – количество пчел, сохраняющих в памяти условную реакцию, уменьшалось на 30%.

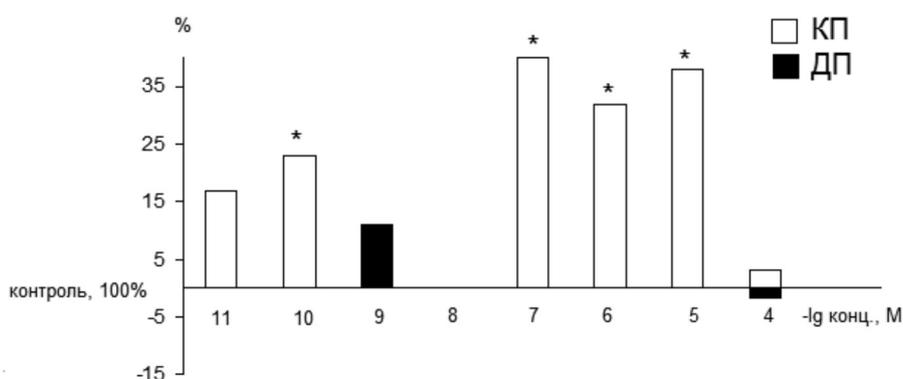


Рис. 1. Влияние пептида EDR на формирование кратковременной/долговременной памяти у медоносных пчел с исходно низкой способностью сохранять в памяти выработанный условный рефлекс. Условные обозначения (здесь и на рис. 2): белые столбики – кратковременная память, черные столбики – долговременная память по отношению к контрольному уровню (инъекции физиологического раствора), принятому за 100%.
Примечание. * – $p < 0,05$ – по сравнению с соответствующим контролем

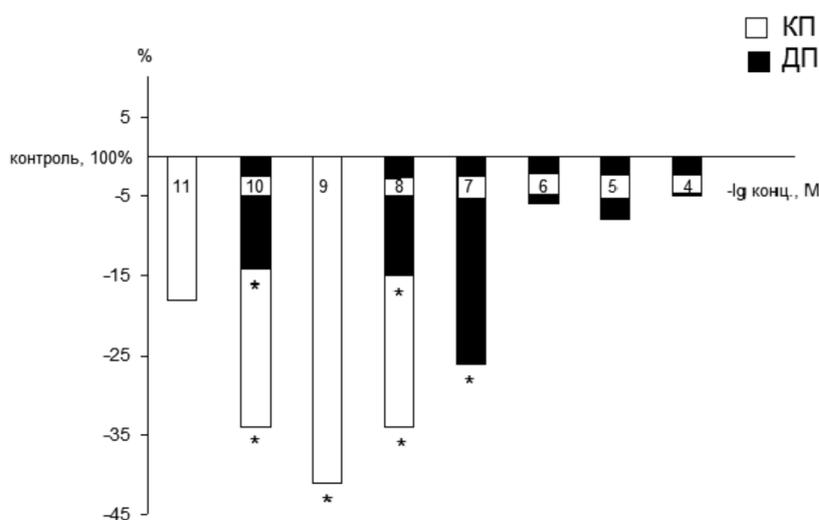


Рис. 2. Влияние пептида EDR на формирование кратковременной/долговременной памяти у медоносных пчел с исходно высокой способностью сохранять в памяти выработанный условный рефлекс

Одна и та же концентрация пептида EDR стимулировала процесс формирования способности к сохранению памяти у пчел с исходно низкой пищевой мотивацией, и ингибировала этот процесс у пчел с исходно высокой пищевой мотивацией. Таким образом, пептид EDR обладает модулирующей способностью в зависимости от уровня исходного условно-рефлекторного фона.

Проведенные исследования позволяют сделать вывод о влиянии пептида EDR на функцию высших отделов центральной нервной системы насекомых, ответственных за когнитивную деятельность. У пчелы – это парные грибовидные тела, выполняющие основную роль в обязательном обучении и памяти при пищевом подкреплении. При исследовании нейропептидов, экспрессирующихся и утилизируемых нейронами грибовидных тел отмечаются особенности эволюции пептидергической сигнальной системы у насекомых [7, 10]. Наиболее близким по аминокислотному составу к пептиду EDR нейропептидом у пчел является оркокинин, включающий в себя глутамат (E), аспартат (D), аргинин (R) [10]. Оркокинин регулирует циркадианные ритмы локомоторной активности насекомых, участвует в процессах нейромодуляции, регулирует синтез некоторых нейромодуляторов [6, 7, 10].

Установлено, что молекулярный механизм биологической активности пептида EDR связан с его способностью регулировать экспрессию фермента 5-триптофангидроксилазы, селективно связываясь с промоторной зоной соответствующего гена по последовательности CCTGCC [4]. Известно, что 5-триптофангидроксилаза является ключевым ферментом, участвующим в синтезе серотонина. Кроме того, пептид EDR регулирует синтез серотонина в клетках нейронов млекопитающих [4]. Таким образом, пептид EDR, подобно оркокинину, способен регулировать синтез нейромодуляторов.

Как уже упоминалось, оркокинин регулирует локомоторную активность у насекомых. Подобный эффект наблюдался под действием пептида EDR у людей. Пептид EDR повышал уровень энергетического обеспечения мышечной ткани, что коррелировало с увеличением экспрессии генов PPARA и PPARG, кодирующих белки, увеличивающие окислительную способность скелетных мышц [3]. Кроме того, установлено, что пептид EDR способствовал повышению умственной и физической работоспособности людей старших возрастных групп [4]. Сопоставляя эти данные с полученным модулирующим действием пептида

EDR на долговременную и кратковременную память у медоносной пчелы, можно предположить эволюционную общность механизмов пептидной регуляции у млекопитающих и насекомых. Вероятно, пептидная регуляция функций нейронов является одним из древнейших механизмов нейропластичности.

Список литературы

1. Лопатина Н.Г. Поведенческие и молекулярные аспекты дефицита эндогенных кинуренинов у медоносной пчелы *Apis mellifera L* / Н.Г. Лопатина, Т.Г. Зачевило, Е.Г. Чеснокова, Е.В. Савватеева-Попова // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. – 2010. – Т. 60, № 2. – С. 229–235.
2. Лопатина Н.Г. Центральные не-NMDA рецепторы медоносной пчелы в условиях наследственно обусловленного дефицита кинуренинов / Н.Г. Лопатина, И.В. Рыжова, Е.Г. Чеснокова, Т.Г. Зачевило, Е. Войке // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2002. – Т. 135, № 4. – С. 458–460.
3. Умнов Р.С. Нейропротекторные эффекты пептидных биорегуляторов у людей разного возраста: обзор литературы / Р.С. Умнов, Н.С. Линькова, В.Х. Хавинсон // Успехи геронтологии. – 2013. – Т. 26, № 4. – С. 671–678.
4. Хавинсон В.Х. Короткие пептиды стимулируют экспрессию серотонина в клетках коры головного мозга / В.Х. Хавинсон, Н.С. Линькова, С.И. Тарновская, Р.С. Умнов, Е.В. Елашкина, Р.С. Умнов // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2014. – Т. 157, № 1. – С. 89–93.
5. Chalisova N.I. Effect of Tetrapeptide Lys-Glu-Asp on Physiological Activity of Neuroimmunendocrine System Cells / N.I. Chalisova, N.G. Lopatina, N.G. Kamishev, N.S. Linkova, E.A. Koncevaya, A.V. Dudkov, L.S. Kozina, V.Kh. Khavinson, Yu.S. Titkov // Cell Technologies in Biology and Medicine. – 2012. – № 2. – P. 569–572.
6. Chen X. A neuropeptide signaling pathway regulates synaptic growth in *Drosophila* / X. Chen, B. Ganetzky // J.Cell Biol. – 2012. – Vol. 196, № 4. – P. 529–543.
7. Heuer C.M. Neuropeptides in insect mushroom bodies / C.M. Heuer, M. Kolmann, M. Binzer, J. Schachtner // Arthropod Structure & Development. – 2012. – Vol. 41. – P. 199–226.
8. Khavinson V. Pinealon increases cell viability by suppression of free radical levels and activating proliferative processes / V. Khavinson, Y. Ribakova, K. Kulebiakin, E. Vladychenskaya, L. Kozina, A. Arutjunyan, A. Boldyrev // Rejuvenation Research. – 2011. – Vol. 14, № 5. – P. 535–541.
9. Khavinson V.Kh., Grigoriev E.I., Malinin V.V., Ryzhak G.A. Peptide substance stimulating regeneration of central nervous system neurons, pharmaceutical composition on its base, and the method of its application // European patent № 2024388. 2009.
10. Sterkel M. OKB, a novel family of brain-gut neuropeptides from insects / M. Sterkel, P.L. Oliveira, H. Urlaub, S. Hernandez-Martinez, R. Rivera-Pomar, S. Ons // Insect Biochemistry and Molecular Biology. – 2012. – Vol. 42. – P. 466–473.

References

1. Lopatina N.G. Povedencheskie i molekularnye aspekty deficita jendogennykh kinureninov u medonosnoj pchely *Apis mellifera L* / N.G. Lopatina, T.G. Zachevilo, E.G. Chesnokova, E.V. Savvateeva-Popova // Zhurnal vysshej nervnoj dejatel'nosti im. I.P. Pavlova. 2010. T. 60, no. 2. pp. 229–235.
2. Lopatina N.G. Central'nye ne-NMDA receptory medonosnoj pchely v uslovijah nasledstvenno obuslovlennogo deficita kinureninov / N.G. Lopatina, I.V. Ryzhova, E.G. Chesnokova, T.G. Zachevilo, E. Vojke // Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny. 2002. T. 135, no. 4. pp. 458–460.

3. Umnov R.S. Nejiroprotektornye jeffekty peptidnyh bioreguljatorov u ljudej raznogo vozrasta: obzor literatury / R.S. Umnov, N.S. Lin'kova, V.H. Havinson // *Uspehi gerontologii*. 2013. T. 26, no. 4. pp. 671–678.
4. Havinson V.H. Korotkie peptidy stimulirujut jekspressiju serotoninu v kletkah kory golovnogo mozga / V.H. Havinson, N.S. Lin'kova, S.I. Tarnovskaja, R.S. Umnov, E.V. Elashkina, R.S. Umnov // *Bjull. jeksp. biol. med.* 2014. T. 157, no. 1. pp. 89–93.
5. Chalisova N.I. Effect of Tetrapeptide Lys-Glu-Asp on Physiological Activity of Neuroimmunoendocrine System Cells / N.I. Chalisova, N.G. Lopatina, N.G. Kamishev, N.S. Linkova, E.A. Koncevaya, A.V. Dudkov, L.S. Kozina, V.Kh. Khavinson, Yu.S. Titkov // *Cell Technologies in Biology and Medicine*. 2012. no. 2. pp. 569–572.
6. Chen X. A neuropeptide signaling pathway regulates synaptic growth in *Drosophila* / X. Chen, V. Ganetzky // *J. Cell Biol.* 2012. Vol. 196, no. 4. pp. 529–543.
7. Heuer C.M. Neuropeptides in insect mushroom bodies / C.M. Heuer, M. Kolmann, M. Binzer, J. Schachtner // *Arthropod Structure & Development*. 2012. Vol. 41. pp. 199–226.
8. Khavinson V. Pinealon increases cell viability by suppression of free radical levels and activating proliferative processes / V. Khavinson, Y. Ribakova, K. Kulebiakin, E. Vladychenskaya, L. Kozina, A. Arutjunyan, A. Boldyrev // *Rejuvenation Research*. 2011. Vol. 14, no. 5. pp. 535–541.
9. Khavinson V.Kh., Grigoriev E.I., Malinin V.V., Ryzhak G.A. Peptide substance stimulating regeneration of central nervous system neurons, pharmaceutical composition on its base, and the method of its application // European patent no. 2024388. 2009.
10. Sterkel M. OKB, a novel family of brain-gut neuropeptides from insects / M. Sterkel, P.L. Oliveira, H. Urlaub, S. Hernandez-Martinez, R. Rivera-Pomar, S. Ons // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2012. Vol. 42. pp. 466–473.

Рецензенты:

Медведев Д.С., д.м.н, доцент, заведующий кафедрой геронтологии и гериатрии ЧОУ ВПО «Санкт-Петербургский медико-социальный институт», г. Санкт-Петербург;

Евгений И.Ч., д.б.н., профессор, профессор кафедры биологии, эмбриологии и гистологии Санкт-Петербургской государственной академии ветеринарной медицины, г. Санкт-Петербург.

Работа поступила в редакцию 12.02.2015.