



Поступила в редакцию 18.03.2016
Принята в печать 24.05.2016

УДК 595.132:577.175.82
DOI: 10.12737/20057

Для цитирования:

Малютина Т.А., Теренина Н.Б. Воздействие fmrфамид-подобных пептидов на мускулатуру фаринкса нематод // Российский паразитологический журнал. — М., 2016. — Т. 36. — Вып. 2. — С. 151–161.

For citation:

Maljutina T.A., Terenina N.B. Effect of FMRFamide-like peptides on the pharyngeal muscle of nematodes. Russian Journal of Parasitology, 2016, V. 36, Iss. 2, pp. 151–161.

ВОЗДЕЙСТВИЕ FMRФАМИД-ПОДОБНЫХ ПЕПТИДОВ НА МУСКУЛАТУРУ ФАРИНКСА НЕМАТОД

Малютина Т.А., Теренина Н.Б.

Центр паразитологии Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, 119071, Москва, Ленинский проспект, 33, Россия, e-mail: maliytina@mail.ru, e-mail: terenina_n@mail.ru

Реферат

FMRFамид — подобные нейропептиды играют важную физиологическую роль в энтерической нервной системе нематод. Об этом свидетельствуют иммуноцитохимические данные о наличии и локализации нейропептидов в фаринксе паразитической нематоды *Ascaris suum*, выявление flp-генов у свободноживущей нематоды *Caenorhabditis elegans*, экспрессирующихся в нейронах фарингальной нервной системы и кодирующих ряд FMRFамид-подобных нейропептидов, а также высокая чувствительность радиальной мускулатуры фаринкса нематод к целому ряду FMRFамид-подобных нейропептидов, выделенных из тканей нематод. Обзор посвящен сравнительному анализу данных о воздействии некоторых относительно коротких FMRFамид-подобных нейропептидов, выделенных из тканей нематод, на двигательную активность фарингеального насоса паразитических и свободноживущих нематод. Обсуждается вопрос возможности использования некоторых нейропептидов в качестве потенциальных антигельминтиков, тормозящих или полностью выключающих работу фарингеального насоса у паразитических нематод.

Ключевые слова: нематоды, фаринкс, фарингеальный насос, FMRFамид-подобные нейропептиды.

Введение

Проблема лекарственной резистентности паразитических организмов требуют поиска новых биологических мишеней у этих животных и разработки новых лекарственных препаратов, воздействующих необратимо на эти мишени и способствующих сдерживанию паразитарной инвазии человека, ресурсных видов животных и растений.

В этом аспекте большой интерес представляют нейропептиды, в частности, FMRFамид-подобные пептиды — относительно короткие пептиды, в аминокислотной последовательности на С-конце которых, расположен RFамид мотив [22].

Установлено, что иммунореактивность к FMRFамид-подобным веществам широко распространена в центральном и периферическом отделах нервной системы свободноживущих и паразитических нематод [15; 6; 14; 23]. Такая обильная распространенность FMRFамид-подобных нейропептидов в нервных структурах нематод указывает на их участие в различных биологических процессах, обеспечивающих жизнедеятельность этих организмов.

В литературе высказывается предположение о том, что эти биологически активные вещества могут принимать участие в регуляции многих поведенческих реакций нематод,



включая локомоторную активность, пищевое поведение, связанное с захватыванием пищи из окружающей среды, активность репродуктивных органов, сенсорное восприятие и др. [15; 25]. Однако прямые данные, описывающие основную функциональную роль FMRФамид-подобных нейропептидов в перечисленных процессах у нематод в литературе фактически отсутствуют.

Статья посвящена анализу данных литературы, описывающих воздействие ряда FMRФамид-подобных нейропептидов, выделенных из тканей свободноживущих и паразитических нематод, на мускулатуру фаринкса (глотки) — жизненно важного органа нематод, принимающего непосредственное участие в захватывании пищи и продвижении ее в кишечник, на примере наиболее хорошо изученных представителей класса нематод — паразитической нематоды *Ascaris suum* и свободноживущей нематоды *Caenorhabditis elegans*.

Важная роль фаринкса в питании нематод и обнаруженная обильная иммунореактивность к FMRФамид-подобным веществам в этом органе у паразитических нематод (*Ascaris suum*) дают веские основания рассматривать его в качестве мишени для воздействия потенциальных антигельминтиков из ряда FMRФамид-подобных нейропептидов, способных направленно модулировать основную функцию фаринкса вплоть до ее полного выключения.

1. Действие FMRФамид-подобных нейропептидов, полученных из тканей нематод, на мускулатуру фаринкса нематод

1.1. Структура и функция фаринкса паразитической нематоды *Ascaris suum*; действие FMRФамид-подобных нейропептидов

Фаринкс (глотка) аскариды является высокоспециализированным непрозрачным мышечным органом, состоящим из радиальной мускулатуры и трирадиального просвета, и связывающим кишечник нематод с окружающей средой [20; 21; 10; 5]. Предполагается, что фарингеальная мускулатура аскариды, в отличие от соматической мускулатуры, не имеет поперечной исчерченности и имеет сходство с гладкой мускулатурой позвоночных [26]. Основной функцией фаринкса является участие в процессе питания нематод содержимым кишечника хозяина путем закачивания пищи и продвижения ее в кишечник с помощью этого органа.

Процесс фарингеального накачивания характеризуется частотой, амплитудой, скоростью и изменением (среднего) фарингеального давления [12].

Сокращение мускулатуры фаринкса нематод, в результате которого просвет фаринкса расширяется, вызывает уменьшение фарингеального давления, что, в свою очередь, облегчает поступление пищи в фаринкс. Быстрое расслабление фарингеальной мускулатуры соответственно вызывает увеличение внутрифарингеального давления, которое является достаточным, чтобы преодолеть высокое внутреннее гидростатическое давление в полости тела червя и продвинуть содержимое глотки в кишечник с помощью фарингеально-интестинального клапана. Процесс сокращения и расслабления мускулатуры фаринкса нематод обозначается как фарингеальный насос [10]. Однако в литературе высказывается предложение рассматривать процесс сокращения и расслабления мускулатуры фаринкса нематоды *Ascaris suum* не как фарингеальный насос, а как фарингеальную перистальтику [26].

В литературе высказывается мнение о том, что двигательная активность фарингеального насоса нематоды *Ascaris suum* имеет миогенную природу, хотя частично контролируется энтерической нервной системой, которая связана преимущественно с мышечным отделом глотки и кишечным отделом червя, и является компонентом соматической нервной системы аскариды [9; 10; 26].

Энтерическая нервная система аскариды состоит из двух различных компонентов, один из которых располагается в области мышечного фаринкса, а другой — в ректальной области кишки [9]. Фарингеальная энтерическая нервная система у аскариды распространяется по всей длине фаринкса до его соединения с кишечником.

Локализация и распределение нейропептидов в энтерической нервной системе *A. suum* определены с помощью непрямого иммуофлуоресцентного метода и конфокальной сканирующей лазерной микроскопией [9]. В результате экспериментов с использованием антисыворотки к нейропептиду FMRФамиду установлено, что положительная иммунореактивность выявляется в латеральном и дорсальном фарингеальных нервах и телах нервных



клеток, связанных с нервами, в главной фарингеальной комиссуре, а также в ветвящихся нервных отростках.

В литературе представлены сведения о результатах исследования биологической активности ряда FMRFамид-подобных нейропептидов, выделенных из тканей нематод, на работу фарингеального насоса аскариды, а именно — AF1 (KNEFIRFамид), AF2 (KHEYLRFамид), AF3 (AVPGVLRFамид), AF4 (GDVPGVLRFамид), AF6 (FIRFамид), AF8/PF3 (KSAYMRFамид), AF16 (ILMRFамид) — из ткани паразитической нематоды *A. suum*; PF1 (SDPNFLRFамид), PF2 (SADPNFLRFамид), PF4 (KPNFIRFамид) — из ткани свободноживущей нематоды *Panagrellus redivivus*. При этом пептиды PF1, PF2, PF3 являются аналогами пептидов CF1, CF2, CF8, выделенных из ткани свободноживущей нематоды *C. elegans* [10; 11; 12].

Фармакологические эксперименты в этих исследованиях проведены, в основном, с использованием модифицированного преобразователя, измеряющего изменения внутрифарингеального давления в области фарингеально — интестинального (кишечного) клапана нематоды [12]. При этом отмечено, что частота и форма изменений внутрифарингеального давления сходна с формой и частотой потенциала действия мускулатуры глотки нематоды.

Работа фарингеального насоса характеризовалась регулярными ритмическими сокращениями и сопровождалась первоначальным общим увеличением мышечного тонуса мускулатуры глотки, за которым следовало спонтанное сокращение и расслабление. Все фармакологические эксперименты проведены в присутствии серотонина в концентрации 100 μM в экспериментальной среде, который стимулировал ритмические сокращения и расслабления фарингеального насоса с частотой 0,5 Hz.

Установлено, что пороговые концентрации пептида AF1 (в концентрации 1- 10 nM) в присутствии серотонина вызывали слабый возбуждающий эффект на двигательную активность фарингеального насоса. При более высоких концентрациях пептида (10-50 nM) наступало почти общее угнетение работы насоса, хотя все еще сохранялось накачивание с небольшой амплитудой. При воздействии более высоких концентраций AF1 (70-1000 nM) наступало полное прекращение работы фарингеального насоса, при этом фаринкс находился в наиболее расслабленном состоянии без каких-либо накачивающих движений. Продолжительность ингибирования зависела от концентрации применяемого вещества и длилась до 450 секунд (EC_{50} AF1 в этом случае соответствовало концентрации 168 nM). Восстановление к нормальной работе насоса после торможения происходило довольно быстро.

Пептид AF8 в концентрациях 0,1-1000 nM оказывал такое же воздействие на активность фарингеального насоса аскариды, как и пептид AF1, но обладал более сильным эффектом. Добавление пептида AF8 в концентрации 50 nM вызывало значительное изменение работы фарингеального насоса у аскариды, при этом частота накачивания становилась более медленной и значительно уменьшалась амплитуда сокращения по сравнению с нормальной работой фарингеального насоса. Увеличение концентрации добавление в экспериментальную среду пептида AF8 до 500 nM вызывало полное прекращение работы фарингеального насоса на длительное время вплоть до 8 минут, при этом фарингеальная мускулатура находилась в сокращенном состоянии (EC_{50} AF1 в этом случае составила 188 nM). Эффекты пептида AF8 как и AF1 были также дозо-зависимыми. Пептиды AF2 и FMRFамид в концентрациях 0,1 nM — 10 μM , а также пептиды AF3, AF4, AF6 и AF16 не оказывали какого-либо влияния на работу фарингеального насоса нематоды [10; 12].

Таким образом, сравнительный анализ воздействия FMRFамид-подобных нейропептидов, выделенных из тканей нематод, включая пептиды AF1, AF2, AF3, AF4, AF6, AF8/ PF3, AF16, PF1, PF2, и PF4, а также пептид FMRFамид на работу фарингеального насоса паразитической нематоды *Ascaris suum* показал, что только два пептида AF1 и AF8 проявляют свойства сильных ингибиторов двигательной активности фарингеального насоса нематоды в довольно низких концентрациях. Способность пептидов AF1 и AF8 модулировать фарингеальную функцию вплоть до ее полного выключения дает основание рассматривать нейропептидные рецепторы фарингеальной мускулатуры в качестве новой мишени для направленного воздействия антипаразитарных препаратов [10; 11; 12]. Однако следует отметить, что в литературе до настоящего времени отсутствуют прямые данные о выявлении и фармакологических свойствах нейропептидных рецепторов в фарингеальной нервной системе и мускулатуре у аскариды.

1.2. Структура и функция фаринкса свободноживущей нематоды *Caenorhabditis elegans*; действие FMRФамид-подобных нейропептидов

Фаринкс нематоды *C. elegans* представляет собой прозрачный мышечный орган, состоящий из восьми мышечных слоев, в своем большинстве состоящих из радиально ориентированных мышечных волокон, которые с одной стороны прикрепляются к основной мембране посредством полудесмосом, а с другой — к кутикуле просвета фаринкса. Нервная система фаринкса нематоды состоит из 20 нервных клеток, функциональная роль которых в регуляции фарингеальной активности к настоящему времени подробно исследована. Установлено также, что мускулатура фаринкса и мускулатура стенки тела нематоды *C. elegans* имеют структурные и биохимические различия [7; 24].

Фаринкс нематоды *C. elegans* представляет собой полуавтономную нервно-мышечную систему, мускулатура которой обладает миогенной активностью [7; 9; 19]. Основная физиологическая функция глотки нематоды *C. elegans*, так же как и аскариды, заключается в закачивании (поглощении) из окружающей среды пищи (бактерии, грибы, водоросли, растения) и продвижения ее в кишечник червя.

Обнаружение у свободноживущей нематоды *C. elegans* семейства генов (flp-гены), кодирующих FMRФамид-подобные нейропептиды и способных экспрессироваться в различных группах фарингеальных нейронов, свидетельствует об участии FMRФамид-подобных нейропептидов в регуляции двигательной активности мускулатуры глотки [17; 119].

Исследование эффектов ряда FMRФамид-подобных нейропептидов на фарингеальную мускулатуру этой нематоды проведено в основном на полуинтактных препаратах, состоящих из фаринкса, нервного кольца и энтерической нервной системы червя. Регистрация частоты потенциала действия в области терминальной луковицы фарингеальной мускулатуры в норме и при воздействии различных FMRФамид-подобных нейропептидов была сделана в этих экспериментах с помощью вне- и внутриклеточной регистрации потенциалов [27; 24].

Фарингеальный потенциал действия тесно связан с мышечным сокращением, и увеличение частоты потенциалов соответственно приводит к повышению активности фарингеального насоса нематоды [8].

Установлено, что большинство FMRФамид-подобных нейропептидов вызывает различные эффекты на мускулатуре глотки нематоды, включая возбуждающее и ингибиторное действие.

Возбуждающее действие нейропептидов выражалось в увеличении частоты потенциалов действия и зависило от концентрации исследуемых нейропептидов [27; 24].

Нейропептиды AF1, FLP-17B (KSQYIRФамид) и FLP-17A (KSAFVRФамид) (все взяты в концентрации 100 нМ), а также — AF2, AF8, FLP-2A (SPREPIRФамид), FLP-4A (PTFIRФамид), FLP-5A (GARFIRФамид), FLP-14A (KHEYLRФамид), FLP-22 (SPSAKWMRФамид) (все в концентрации — 1 мМ) повышали частоту потенциала действия. Установлено, что нейропептид AF1 проявлял наибольшую эффективность на фарингеальном препарате в низкой концентрации (пороговая концентрация нейропептида составляла менее 50 нМ; $EC_{50} = 76$ нМ).

Ряд других нейропептидов, включая FLP-13A (APEASPIRФамид), FLP-11A (AMRNALVRФамид) (оба в концентрации 100 нМ), а также — FLP-3A (SAEPFGTMRФамид), FLP-18A (EMPGVIRФамид), FLP-14B (SLLDYRФамид), FLP-15A (GGPQGPLRФамид), FLP-9A (KPSFVRФамид), FLP-9A (WANQVRФамид), AF-9 (GLGPRPLRФамид), AF-15 (AQTFVRФамид), PF-1, PF-2 (все в концентрации 1 мМ) вызывали ингибиторный эффект на фарингеальном препарате нематоды. Ингибирование выражалось в уменьшении частоты потенциалов действия и снижении скорости спайков мускулатуры. Ингибиторные эффекты были исследованы при постоянном присутствии в экспериментальной среде серотонина в концентрации 500 нМ, который повышал спонтанную активность фарингеального препарата.

Пептиды FLP-7A, FLP-10A, FLP-12A, FLP-14C, FLP-20, FLP-23 (все в концентрации 1 мМ) были неэффективны на фарингеальной мускулатуре нематоды *C. elegans*.

Обсуждение

FMRФамид-подобные нейропептиды играют существенную роль в физиологии нервной и мышечной системы представителей большинства типов животных, включая тип



Nemathelminthes (класс *Nematoda*), принимая участие в ряде физиологических процессов, обеспечивающих жизнедеятельность нематод (локомоции, захват и проглатывание пищи, репродукция и др.) [15; 6; 14; 23].

Однако, сведений о выявлении FMRFамид-подобных нейропептидов и их функциональном значении, например, в фаринксе нематод — специализированном мышечном органе, который связывает кишечник нематод с окружающей средой и получает иннервацию от энтерической нервной системы червей, относительно мало.

У паразитической нематоды *A. suum* локализация и распределение нейропептидов в энтерической нервной системе определены с помощью непрямого иммунофлуоресцентного метода и конфокальной сканирующей лазерной микроскопии. Установлено, что положительная FMRFамид иммунореактивная реакция выявлена в латеральном и дорсальном фарингеальных нервах и телах нервных клеток, связанных с этими нервами, в главной фарингеальной комиссуре, а также в ветвящихся нервных отростках [9].

Об участии FMRFамид-подобных нейропептидов в регуляции активности фарингеальной мускулатуры свободноживущей нематоды *C. elegans* свидетельствует факт выявления большого семейства flp-генов, кодирующих FMRFамид-подобные нейропептиды и способных экспрессироваться в различных группах нейронов глотки [17].

Сравнительный анализ ряда FMRFамид-подобных нейропептидов, выделенных из тканей нематод (пептиды AF1, AF2, AF3, AF4, AF6, AF8/PF3, AF16, PF1, PF2 и PF4, а также пептид FMRFамид) и испытанных на паразитической нематоды *A. suum*, показал, что только два пептида из этого ряда — AF1 и AF8 в довольно низких концентрациях являются эффективными ингибиторами двигательной активности фарингеального насоса нематоды. При этом пептид AF8 является наиболее эффективным. При сравнении физиологических эффектов этих двух пептидов отмечено, что при воздействии AF1 в концентрациях 50-1000 нМ наступало полное прекращение работы фарингеального насоса, при этом мускулатура фаринкса находилась в расслабленном состоянии без каких-либо движений.

Добавление в экспериментальную среду пептида AF8 в концентрации 500 нМ также вызвало полное прекращение работы фарингеального насоса на длительное время вплоть до 8 минут, при этом фарингеальная мускулатура находилась в сокращенном состоянии. Длительность ингибирования работы фарингеального насоса аскариды при воздействии нейропептидов AF1 и AF8 зависела от концентрации вводимых веществ, при этом пороговой концентрацией для нейропептида AF1 была концентрация 1 нМ, а для AF8 — 0,1 нМ. Однако, значения EC_{50} 168 нМ для AF1 и EC_{50} 188 нМ для AF8 не имели статистически достоверных различий.

Предполагается, что ингибирование работы фарингеального насоса аскариды в фазе длительного расслабления мускулатуры глотки под воздействием нейропептида AF1 и аналогичное угнетение работы насоса под воздействием AF8, но в фазе наибольшего сокращения мускулатуры глотки, может быть связано либо с воздействием этих пептидов на различные популяции пептидных рецепторов, либо с различным сродством этих пептидов к одному и тому же рецептору [12].

Таким образом, высокая чувствительность фарингеальной мускулатуры паразитической нематоды *A. suum* к нейропептидам AF1 и AF8 предполагает наличие рецепторов в мускулатуре, посредством которых реализуется ответ мускулатуры глотки на воздействие этих веществ. Эти рецепторы, вероятно, могут быть рассмотрены в качестве мишени для потенциальных антигельминтиков, избирательно вмешивающихся в работу такого жизненно важного органа у паразитических нематод как фаринкс.

На мускулатуре фаринкса свободноживущей нематоды *C. elegans* исследована биологическая активность большой группы нейропептидов, кодируемых 23 flp-генами, выделенных из тканей нематод [24]. Исследования проведены методами регистрации вне- и внутрифарингеальной электрофизиологической активности этого органа [13].

Экспериментально установлено, что 11 пептидов, кодируемых flp-генами, вызывали ингибирование активности мускулатуры глотки нематоды, а 8 пептидов, кодируемых flp-генами, вызывали возбуждающий эффект фарингеальной активности. При этом не для всех flp-генов, кодирующих пептиды с ингибиторными или возбуждающими эффектами на мускулатуре фаринкса нематоды, была выявлена экспрессия в нервной системе фаринкса



нематоды. Так, например, было показано, что ген *flr-13*, кодирующий сильный ингибиторный пептид FLP-13A и ген *flr-17*, кодирующий сильные возбуждающие пептиды FLP-17A и FLP-17B, экспрессируются в фарингальных мотонейронах, а ген *flr-8*, кодирующий сильный возбуждающий пептид AF1, и ген *flr-11*, кодирующий сильный ингибиторный пептид FLP-11A, вероятно, экспрессируются в нейронах, находящихся за пределами фарингеальной системы. Эти сведения, по мнению авторов, могут указывать на то, что пептиды FLP-13A, FLP-17A и FLP-17B проявляют свое действие через рецепторы, локализованные в мускулатуре фаринкса, а пептиды AF1 и FLP-11A воздействуют на мускулатуру глотки нематоды непрямым путем, возможно, как нейрогормоны [24; 19].

Кроме того, было установлено, что пептиды FLP-14B, FLP-15A, FLP-16A, FLP-18A и FLP-21 вызывали ингибиторное действие на активность полунтактного препарата фаринкса в том случае, если исходная частота сокращений фарингеального насоса этого препарата имела низкие значения, как это наблюдалось при отсутствии серотонина в экспериментальной среде.

Среди возбуждающих пептидов наиболее сильные эффекты вызывали пептиды FLP-8 (AF1), FLP-17A и FLP-17B (особенно — нейропептид AF1). При этом установлено, что ген *flr-8*, кодирующий пептид AF1, не экспрессируется в нервной системе фаринкса нематоды. Эффекты возбуждающих пептидов были легко обратимы после отмывания в течение 5 минут. Среди ингибиторных пептидов наиболее сильное угнетение фарингеальной активности полунтактного препарата нематоды, вызывали пептиды FLP-11A и FLP-13A. При этом установлено что ген *flr-11*, кодирующий пептид FLP-11A, не экспрессируется в нервной системе глотки нематоды. Время, необходимое для возобновления работы фарингеального насоса после воздействия ингибиторных пептидов, зависело от тестируемого пептида.

В связи с разнообразием эффектов экзогенных FMRFамид-подобных нейропептидов на мускулатуре фаринкса нематод *A. suum* и *C. elegans*, высказывается предположение о том, что эти биологически активные вещества могут воздействовать на радиальную мускулатуру глотки нематод различными физиологическими путями [12; 27; 24]. Так, в ряде случаев, эти вещества могут вызывать прямые эффекты, возможно, путем воздействия на родственные рецепторы эндогенного пептида, экспрессируемого в мускулатуре фаринкса, как в случае с сильным ингибиторным пептидом FLP-13A и сильными возбуждающими пептидами FLP-17A и FLP-17B у *C. elegans* или вызывать эффекты на мускулатуре фаринкса опосредованно по типу нейрогормонов (пептиды AF1 и FLP-11A) [24].

Представляет интерес тот факт, что из длинного ряда FMRFамид-подобных нейропептидов, выделенных из тканей нематод (AF1, AF2, AF3, AF4, AF6, AF8/PF3, AF16, PF1, PF2 и PF4), включая пептид FMRFамид, и исследованных на фарингеальном насосе паразитической нематоды *A. suum*, физиологическую активность проявили только два пептида AF1 и AF8 в довольно низких концентрациях, вызывая ингибирование двигательной активности насоса глотки нематоды в присутствии серотонина (Brownlee et al., 1999). Ингибирование работы фарингеального насоса аскариды в фазе длительного расслабления под воздействием нейропептида AF1 и аналогичное угнетение работы фарингеального насоса аскариды под воздействием AF8, но в фазе наибольшего сокращения мускулатуры авторы связывают с возможным воздействием этих пептидов либо на различные популяции пептидных рецепторов, либо с различным сродством этих пептидов к одному рецептору [12].

Выявленная высокая чувствительность мускулатуры фаринкса паразитической нематоды *A. suum* к нейропептидам AF1 и AF8, вызывающим угнетение работы фарингеального насоса аскариды в низких концентрациях, создают предпосылку для создания новых антигельминтных препаратов из ряда FMRFамид-подобных нейропептидов, обладающих ингибиторными эффектами на работу фарингеального насоса и направленно нарушающих функцию этого важного органа, обеспечивающего жизнедеятельность нематоды.

В отличие от мускулатуры фаринкса паразитической нематоды *A. suum*, мускулатура свободноживущей нематоды *C. elegans* проявляет чувствительность к большому ряду FMRFамид-подобных нейропептидов (AF1, FLP-17B и FLP-17A (все в концентрации 100 нМ), а также AF2, AF8, FLP-2A, FLP-4A, FLP-5A, FLP-14A, FLP-22 (все — в концентрации 1 мМ), а также FLP-13A, FLP-11A (оба в концентрации 100 нМ, а также FLP-3A, FLP-18A, FLP-14B, FLP-15A, FLP-9A, FLP-9A, AF-9, AF-15, PF-1, PF-2 (все в концентрации 1 мМ) [16]. При этом



одни пептиды вызывают повышение частоты потенциала действия на полуинтактном фарингеальном препарате червя, а другие — ингибиторный эффект, который выражается в уменьшении частоты потенциалов действия и снижении скорости спайков мускулатуры.

Сравнительный анализ воздействия ряда FMRFамид — подобных пептидов на мускулатуру глотки паразитических и свободноживущих нематод на примере *A. suum* и *C. elegans* соответственно показал следующее. В литературе высказывается мнение о том, что двигательная активность фарингеального насоса нематоды *Ascaris suum* имеет, в основном, миогенную природу, хотя частично контролируется энтерической нервной системой [9; 10; 12; 26]. Анализ сократительной активности мускулатуры глотки аскариды был выполнен с помощью модифицированного преобразователя, который регистрировал изменения в внутрифарингеальном давлении при воздействии нейропептидов. При этом было показано, что внутрифарингеальное давление находится в прямой связи с двигательной активностью радиальной мускулатуры глотки нематоды [12].

Установлено, что из десяти исследованных FMRFамид-подобных пептидов только два пептида — AF1 и AF8 в низких концентрациях ингибировали работу фарингеального насоса [12]. Стимуляция ритмических сокращений и расслаблений фарингеальной мускулатуры глотки нематоды с частотой 0,5 Hz при этом осуществлялась с помощью серотонина, добавленного в экспериментальную среду в концентрации 100 μM .

В фармакологических экспериментах на свободноживущей нематоды *C. elegans* использован полуинтактный фарингеальный препарат червя. Оценка эффективности нейропептидов была выполнена с помощью методов вне- и внутриклеточной регистрации электрических потенциалов [27; 24]. При этом установлено, что мускулатура глотки *C. elegans* обладает собственной миогенной активностью [24].

Установлено, что нейропептиды AF1, FLP-17B и FLP-17A (все в концентрации 100 nM), а также AF2, AF8, FLP-2A, FLP-4A, FLP-5A FLP-14A, FLP-22 (все в концентрации 1 μM) повышали частоту потенциала действия. При этом нейропептид AF1 проявлял наибольшую эффективность на фарингеальном препарате в низкой концентрации (пороговая концентрация была менее 50 nM; $\text{EC}_{50} = 76$ nM). Пептиды FLP-13A, FLP-11A (оба в концентрации 100 nM), а также FLP-3A, FLP-18A, FLP-14B, FLP-15A, FLP-9A, AF-9, AF-15, PF-1, PF-2 (все в концентрации 1 μM) вызывали ингибиторный эффект.

Таким образом, в результате применения разных методов и подходов фармакологического анализа воздействия различных FMRFамид — подобных пептидов на фарингеальную мускулатуру паразитических (*Ascaris suum*) и свободноживущих (*C. elegans*) нематод, показано что такие нейропептиды как AF1, AF2, AF8, PF1, PF2 вызывают неоднозначные эффекты на мускулатуре фаринкса паразитических и свободноживущих нематод. Так, нейропептиды AF1 и AF8 в низких концентрациях являются наиболее сильными ингибиторами работы фарингеального насоса у аскариды [12]. В то же время, нейропептиды AF2, PF1 и PF2 не проявляют какого-либо эффекта на работу фарингеального насоса у аскариды.

В экспериментах на мускулатуре фаринкса *C. elegans* пептиды AF8 и AF1 (в низких концентрациях) являются сильными стимуляторами, вызывая увеличение частоты фарингеального накачивания [27; 24]. Нейропептид AF2 также стимулировал частоту фарингеального накачивания, но в более высоких концентрациях, а пептиды PF1 и PF2 обладали ингибиторными эффектами, снижая частоту фарингеального накачивания.

В литературе представлены различные аргументы в пользу того, что свободноживущая нематода *C. elegans* является хорошей моделью для изучения механизма действия и скрининга антигельминтных препаратов [16]. Однако, факт выявления различной чувствительности мускулатуры фаринкса паразитической нематоды и свободноживущей на воздействие некоторых нейропептидов, выделенных из нематод (например, AF2, PF1 и PF2), которые могут представлять интерес в качестве потенциальных антигельминтиков, свидетельствует о необходимости выбора альтернативной модели, относящейся к паразитическим червям.

Итак, анализ литературы показал, что FMRFамид-подобные нейропептиды играют важную физиологическую роль в энтерической нервной системе нематод. Об этом свидетельствуют иммуноцитохимические данные о локализации и распределении нейропептидов в фаринксе паразитической нематоды *A. suum*, выявление flp-генов у свободноживущей



нематоды *C. elegans*, экспрессирующихся в нейронах фарингеальной нервной системы и кодирующих ряд FMRФамид-подобных нейропептидов.

Кроме того, показана высокая чувствительность радиальной мускулатуры фаринкса нематод к целому ряду FMRФамид-подобных нейропептидов, выделенных из ткани нематод [9; 17; 10; 12; 27; 24].

Во всех исследованиях отмечается сложность и разнообразие эффектов, вызываемых экзогенными FMRФамид-подобными нейропептидами при их воздействии на фарингеальную мускулатуру нематод *A. suum* и *C. elegans*, и трудность выявления какой-либо основной функции нейропептидов в регулировании фарингеальной активности у нематод. В связи с этим высказывается предположение о том, что эти биологически активные вещества могут воздействовать на радиальную мускулатуру фаринкса нематод различными физиологическими путями [12; 27; 17; 24].

Возможно, что одной из причин в трудности определения физиологической функции нейропептидов, в том числе, и FMRФамид-подобных пептидов в фаринксе нематод, является полифункциональность этих нейроактивных молекул. Полифункциональность нейропептидов заключается в их способности играть роль либо нейротрансмиттеров, либо нейрорегуляторов, либо модуляторов в зависимости от физиологической ситуации, и взаимное перекрывание функций между различными нейропептидами, что было впервые выявлено в исследованиях на более высокоорганизованных животных [1].

Другим уникальным биологическим свойством регуляторных пептидов, включая нейропептиды, обнаруженным у животных, является их способность вместе с другими гуморальными регуляторами образовывать функциональную непрерывность — континуум, обеспечивающий реализацию любых совместимых биологических активностей. При всей сложности действий и взаимодействий нейропептидов в большинстве случаев имеет место сочетание их прямых и опосредованных каскадных эффектов на эффекторные клетки [2; 3].

В связи с этим можно высказать предположение о том, что разнообразие эффектов FMRФамид-подобных нейропептидов, выделенных из нематод, на фарингеальной мускулатуре нематод *A. suum* и *C. elegans* также является следствием полифункциональности и других уникальных биологических свойств этих веществ.

К последним можно отнести способность рецепторов FMRФамид-подобных нейропептидов соматической мускулатуры некоторых нематод (на примере *C. elegans*) связываться с пептидами, кодируемыми различными генами, и одного пептида — связываться с множеством рецепторов FMRФамид-подобных нейропептидов [25; 18].

Ранее вопрос о полифункциональности FMRФамид-подобных нейропептидов уже обсуждался в литературе при анализе воздействия ряда FMRФамид-подобных нейропептидов на локомоторное поведение паразитических нематод [4]. Вероятно, полифункциональность нейропептидов и сочетание их прямых и опосредованных каскадных эффектов на эффекторные клетки, характерные для этих биологически активных веществ, существенно осложняет поиск пептидергических веществ, выбранных из ряда FMRФамид-подобных нейропептидов, выделенных из нематод, которые вызывали бы однозначные эффекты на фарингеальной мускулатуре *A. suum* и *C. elegans*. Однако, такие FMRФамид-подобные нейропептиды, как AF1 и AF8, которые в низких концентрациях однозначно нарушают мышечную активность фаринкса у аскариды, могут служить предпосылкой для создания потенциальных антигельминтиков.

Литература.

1. Ашмарин И.П., Каменская М.А. Нейропептиды в синаптической передаче // Итоги науки и техники. Сер. Физиология человека и животных. — М: ВИНТИ.- 1988. — Т. 34. — 184 с.
2. Ашмарин И.П., Обухова М.Ф. Регуляторные пептиды, функционально-непрерывная совокупность // Биохимия. — 1986.- Т. 51. — Вып. 4. — С. 531-544.
3. Ашмарин И.П., Стукалов П.В. / Нейрохимия. М.: Издательство Института Биомедицинской Химии РАН. — 1996. — 469 с.
4. Малютина Т.А., Теренина Н.Б., Крещенко Н.Д. Нейропептиды у нематод: наличие, локализация, влияние на локомоторное поведение // Ученые записки Казанского университета. — 2015. — Т. 157. — Кн. 2. С. 35 — 48.



5. Шульц П.С., Гвоздев В.В. Основы общей гельминтологии / Отв. ред. акад. К.И.Скрябин. 1970. М: Наука. Т.1. 491 с.
6. Atkinson H.J., Isaac R.E., Harris P.D., Sharpe C.M. 1988. FMRFamide-immunoreactivity within the nervous system of the nematodes *Panagrellus redivivus*, *Caenorhabditis elegans* and *Heterodera glycines* // *J. Zool.* — 1988. — V. 216. — P. 663 — 671.
7. Albertson D.A., Thomson J. The pharynx of *Caenorhabditis elegans* // *Phil.Trans.Royal Soc. London.* 1976. V. 275. P. 299-325.
8. Avery L, Thomas J. Feeding and Defecation..In: Riddle D., Blumenthal T., Meyer B.J., editors. *C. elegans II*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1977. P. 679-716.
9. Brownlee D.J.A, Fairweather I., Johnston C.F., Shaw C. Immunocytochemical demonstration of peptidergic and serotonergic components in the enteric nervous system of the roundworm, *Ascaris suum* (Nematoda, Ascaroidea) // *Parasitology.* 1994. V. 108. P. 89-103.
10. Brownlee D.J.A., Holden-Dye L., Walker R.J., Fairweather I. The pharynx of the nematode: structure and function // *Acta biologica hungarica.* 1995a. v. 46. N 2-4. 195-204.
11. Brownlee D.J.A, Holden-Dye L., Walker R.J., Fairweather I. The action of serotonin and the nematode neuropeptide KSAYMRamide on the pharyngeal muscle of the parasitic nematode, *Ascaris suum* // *Parasitology.* 1995, vol. 111, I. 3, pp. 379-384.
12. Brownlee D.J.A, Walker R.J. Actions of nematode FMRFamide-related peptides on the pharyngeal muscle of the parasitic nematode, *Ascaris suum* // *Ann N Y Acad Sci.* 1999. V. 897. P. 228-238.
13. Cook A., Franks C.J., Holden-Dye L. Electrophysiological recordings from the pharynx. The *C. elegans* Research Community, WormBook, 2006
14. Cowden C., Stihogmul P., Brackley P., Guastella J., Stretton A.O.W. Localization and differential expression of FMRFamide-like immunoreactivity in the nematode *Ascaris suum* // *J. Comp. Neurol.* — 1993. — V. 333. — P. 455-468.
15. Day T.A., Maule A.G. Parasitic peptides! The structure and function of neuropeptides in parasitic worms // *Peptides.* — 1999. V. 20. — P. 999-1019.
16. (26). Geary T.G., Thompson D.P. *Caenorhabditis elegans*: how good model for veterinary parasites? // *Veterinary Parasitology.* V. 101. Iss. 3-4. P. 371-386. 2001. DOI: 10.12737/200.10.1016/S0304-4017(01)00562-3.
17. Kim K, Li C. Expression and regulation of an FMRFamide-related neuropeptide gene family in *Caenorhabditis elegans* // *Journal of Comparative Neurology.* 2004. V. 475. Issue 4. P. 540-550.
18. Li C., Kim K. Neuropeptides // In *WormBook: The C. elegans Research Community*, editor. 2008. WormBook.
19. Li C., Kim K. Family of FLP peptides in *Caenorhabditis elegans* and related nematodes // *Front. Endocrinol.* 14 October 2014, <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2014.0015019>.
20. Mapes C.J. Structure and function in the nematode pharynx. 1. The structure of pharynges of *Ascaris lumbricoides*, *Oxiuris equi*. *Aplectana brevicaudata* and *Panagrellus silusiae* // *Parasitology.* 1965. v. 55. P. 269-284.
21. Mapes C.J. Structure and function in the nematode pharynx. III. The pharyngeal pump of *Ascaris lumbricoides* // *Parasitology.* 1966. V. 56. P. 137-149.
22. Marder E., Calabrese R.L., Nusbanm M.P., Trimmer B.A. Distribution and partial characterization of FMRFamide-like peptides in the stomatogastric ganglion of the rock crab *Cancer borealis*, and the spiny lobster *Panulirus interruptus* // *J. Comparative Neurology.* — 1987. — V. 259. — P. 150-163.
23. Masler E.P., Kovaleva E.S., Sardanelli S. Comparison of FaRP- immunoreactivity in free-living nematodes and in the plant-parasitic nematode *Heterodera glycines* // *Ann NY Acad Sci.* - 1999. — V. 897. — P. 253-263.
24. Papaioannou S., Marsden D., Franks C.J., Walker R.J., Holden-Dye L. Role of a FMRFamide-like family of neuropeptides in the pharyngeal nervous system of *Caenorhabditis elegans* // *J. Neurobiol.* — 2005. — V. 65. — N 3. — P. 304-319.
25. Peymen K., Watterey J., Froninckx L., Schoofs L., Beets I. The FMRFamide-like peptide family in nematodes // *Frontiers in endocrinology.* — 2014. — V.5. Art. 90. P. 1-21.
26. Puttachary S. Electrophysiological studies to counter anthelmintic resistance: studies in somatic muscle and pharynx of *A. suum* // *Iowa State University Graduate Theses and Dissertations Graduate College.* 2012.
27. Rogers C.M., Franks C.J., Walker R.J., Burke J.F., Holden-Dye L. Regulation of the pharynx of *Caenorhabditis elegans* by 5-HT, octopamine, and FMRFamide-like neuropeptides. *J. Neurobiol.* — 2001. — V. 49. — P. 235-244.

References

1. Ashmarin I.P., Kamenskaya M.A. Neuropeptides in the synaptic transmission. *Itogi nauki i tekhniki. Ser. Fiziologiya cheloveka i zhivotnykh* [Results of Science and Technology. Human and Animal Physiology Series]. M, VINITI, 1988, vol. 34. 184 p. (In Russian).



2. Ashmarin I.P., Obukhova M.F. Regulatory peptides, functionally continuous totality. *Biochimiya* [Biochemistry], 1986, vol. 51, i. 4, pp. 531-544 (In Russian).
3. Ashmarin I.P., Stukalov P.V. *Neurochimiya* [Neurochemistry]. M., Institute of Biomedical Chemistry RAMS. 1996. 469 p. (In Russian).
4. Mal'yutina T.A., Terenina N.B., Kreshchenko N.D. Neuropeptides in nematodes: presence, localization, effect on locomotor behavior. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta*. [Scientific notes of the Kazan University], 2015, vol. 157, Book 2, pp. 35 — 48.
5. Schultz R.S., Gvozdev V.V. *Osnovy obshhey gel'mintologii* [Essentials of General Helminthology]. M., Science, 1970, vol. 1. 491 p. (In Russian).
6. Atkinson H.J., Isaac R.E., Harris P.D., Sharpe C.M. 1988. FMRFamide-immunoreactivity within the nervous system of the nematodes *Panagrellus redivivus*, *Caenorhabditis elegans* and *Heterodera glycines*. *J. Zool.*, 1988, vol. 216, pp. 663-671.
7. Albertson D.A., Thomson J. The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Phil. Trans. Royal Soc. London*, 1976, vol. 275, pp. 299-325.
8. Avery L, Thomas J. Feeding and Defecation. *C. elegans II*. Plainview. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1977, pp. 679-716.
9. Brownlee D.J.A, Fairweather I., Johnston C.F., Shaw C. Immunocytochemical demonstration of peptidergic and serotonergic components in the enteric nervous system of the roundworm, *Ascaris suum* (Nematoda, Ascaroidea). *Parasitology*, 1994, vol. 108, pp. 89-103.
10. Brownlee D.J.A., Holden-Dye L., Walker R.J., Fairweather I. The pharynx of the nematode: structure and function. *Acta Biologica Hungarica*, 1995a, vol. 46, no. 2-4, pp. 195-204.
11. Brownlee D.J.A, Holden-Dye L., Walker R.J., Fairweather I. The action of serotonin and the nematode neuropeptide KSYMRFamide on the pharyngeal muscle of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *Parasitology*, 1995, vol. 111, i. 3, pp. 379-384.
12. Brownlee D.J.A, Walker R.J. Actions of nematode FMRFamide-related peptides on the pharyngeal muscle of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *Ann N Y Acad Sci*. 1999, vol. 897, pp. 228-238.
13. Cook A., Franks C.J., Holden-Dye L. Electrophysiological recordings from the pharynx. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, 2006
14. Cowden C., Sthigorngul P., Brackley P., Guastella J., Stretton A.O.W. Localization and differential expression of FMRFamide-like immunoreactivity in the nematode *Ascaris suum*. *J. Comp. Neurol.*, 1993, vol. 333, pp. 455-468.
15. Day T.A., Maule A.G. Parasitic peptides! The structure and function of neuropeptides in parasitic worms. *Peptides*, 1999, vol. 20, pp. 999-1019.
16. Geary T.G., Thompson D.P. *Caenorhabditis elegans*: how good model for veterinary parasites? *Veterinary Parasitology*, 2001, vol. 101, i. 3-4, pp. 371-386.
17. Kim K, Li C. Expression and regulation of an FMRFamide-related neuropeptide gene family in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Comparative Neurology*, 2004, vol. 475, i. 4, pp. 540-550.
18. Li C., Kim K. Neuropeptides. *WormBook* «The *C. elegans* Research Community», 2008.
19. Li C., Kim K. Family of FLP peptides in *Caenorhabditis elegans* and related nematodes *Front. Endocrinol.*, 14 Oct. 2014. Available at: <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2014.0015019>.
20. Mapes C.J. Structure and function in the nematode pharynx. 1. The structure of pharynges of *Ascaris lumbricoides*, *Oxiuris equi*. *Aplectana brevicaudata* and *Panagrellus silusiae*. *Parasitology*, 1965, vol. 55, pp. 269 — 284.
21. Mapes C.J. Structure and function in the nematode pharynx. III. The pharyngeal pump of *Ascaris lumbricoides*. *Parasitology*, 1966, vol. 56, pp. 137-149.
22. Marder E., Calabrese R.L., Nusbanm M.P., Trimmer B.A. Distribution and partial characterization of FMRFamide-like peptides in the stomatogastric ganglion of the rock crab *Cancer borealis*, and the spiny lobster *Panulirus interruptus*. *J. Comparative Neurology*, 1987, vol. 259, pp. 150-163.
23. Masler E.P., Kovaleva E.S., Sardanelli S. Comparison of FaRP- immunoreactivity in free-living nematodes and in the plant-parasitic nematode *Heterodera glycines*. *Ann NY Acad Sci*, 199, vol. 897, pp. 253-263.
24. Papaioannou S., Marsden D., Franks C.J., Walker R.J., Holden-Dye L. Role of a FMRFamide-like family of neuropeptides in the pharyngeal nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurobiol.*, 2005, vol. 65, No 3. pp. 304-319.
25. Peymen K., Wattey J., Frooninckx L., Schoofs L., Beets I. The FMRFamide-like peptide family in nematodes. *Frontiers in endocrinology*, 2014, V.5, Art. 90, pp. 1 — 21.
26. Puttachary S. Electrophysiological studies to counter anthelmintic resistance: studies in somatic muscle and pharynx of *A. suum*. Iowa State University Graduate Theses and Dissertations Graduate College, 2012.
27. Rogers C.M., Franks C.J., Walker R. J., Burke J.F., Holden-Dye L. Regulation of the pharynx of *Caenorhabditis elegans* by 5-HT, octopamine, and FMRFamide-like neuropeptides. *J. Neurobiol.*, 2001, vol. 49, pp. 235-244.



Russian Journal of Parasitology, 2016, V. 36, Iss. 2

DOI: 10.12737/20057

Received 18.03.2016

Accepted 24.05.2016

EFFECT OF FMRFAMIDE-LIKE PEPTIDES ON THE PHARYNGEAL MUSCLE OF NEMATODES

Maljutina T.A., Terenina N.B.

Center of Parasitology IPEE RAS, 33 Leninsky Ave., Moscow 119071, Russia, e-mail: maliytina@mail.ru, e-mail: terenina_n@mail.ru

Abstract

FMRFamide-like peptides play an important physiological role in the enteric nervous system of nematodes.

This is confirmed by immunocytochemical data on the presence and localization of neuropeptides in the pharynx of parasitic nematode *Ascaris suum*; identification of *flp*-gene in free-living nematode *Caenorhabditis elegans* expressing in pharyngeal neurons of the nervous system and encoding a number of FMRFamide-like neuropeptides; high sensitivity of the radial muscle of the pharynx nematodes towards a variety of FMRFamide-like neuropeptides isolated from the nematode tissues.

This review is devoted to a comparative analysis of data on the effects of some relatively short FMRFamide-like neuropeptides isolated from the nematode tissues, on pharyngeal pumping behavior in parasitic and free-living nematodes.

The question about the possible use of some neuropeptides as potential anthelmintics inhibiting or completely turning off the work of the pharyngeal pump in parasitic nematodes is being discussed.

Keywords: Nematodes, pharynx, pharyngeal pump, FMRFamide-like neuropeptides.

© 2016 The Author(s). Published by All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants named after K.I. Skryabin. This is an open access article under the Agreement of 02.07.2014 (Russian Science Citation Index (RSCI)http://elibrary.ru/projects/citation/cit_index.asp) and the Agreement of 12.06.2014 (CA-BI.org/Human Sciences section: <http://www.cabi.org/Uploads/CABI/publishing/fulltext-products/cabi-fulltext-material-from-journals-by-subject-area.pdf>).