

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича
Российской академии наук

На правах рукописи



Кузнецов Виктор Петрович

**Генерация эндогенного электрического потенциала
в новой модельной системе**

1.5.8 — математическая биология, биоинформатика

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Панчин Юрий Валентинович

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Актуальность темы исследования	4
Степень разработанности темы.....	5
Цели и задачи исследования.....	9
Научная новизна	9
Теоретическая и практическая значимость работы	11
Методология и методы исследования	12
Положения, выносимые на защиту.....	14
Степень достоверности и апробация результатов.....	15
Список публикаций по теме диссертации.....	16
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	18
1. 1. Ритмические процессы. Ультраниантные ритмы.....	18
1. 2. Механизм дефекационной моторной программы нематод	19
1. 3. Роль инозитолтрифосфата в инициации и модуляции ритма. Кальций-зависимый выброс кальция.....	24
1. 4. Роль ионов кальция в инициации дефекационной моторной программы и синхронизации работы клеток. Ca^{2+} передача сигнала и Ca^{2+} волны.....	27
1. 5. Изменения уровня мембранного потенциала и потенциал действия	29
1. 6. Мембранные белки дефекационной моторной программы нематод	32
1. 7. Модельные организмы – нематоды	42
1. 8. Многообразие функций энтодермальных клеток кишечника нематод.....	45
ГЛАВА 2. ВВЕДЕНИЕ НОВОГО МОДЕЛЬНОГО ОРГАНИЗМА – HETERORHABDITIS MEGIDIS В КАЧЕСТВЕ ОБЪЕКТА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ДЕФЕКАЦИОННОЙ МОТОРНОЙ ПРОГРАММЫ НЕМАТОД.....	49
2. 1. <i>Heterorhabditis megidis</i> – новый модельный организм для исследования дефекационной моторной программы нематод	49
2. 2. Базовые характеристики ритмического изменения мембранного потенциала	55
2. 3. Проводимость клеточной мембраны. Суперпозиция работы нескольких ионных каналов	60
2. 4. Модель изменений мембранного потенциала в ходе дефекационной моторной программы нематод. Нарушения работы системы в специфических типах препаратов	62
2. 5. Автономность и синхронность генерации ритмических процессов	64
ГЛАВА 3. МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА В ХОДЕ ДЕФЕКАЦИОННОЙ МОТОРНОЙ ПРОГРАММЫ НЕМАТОДЫ HETERORHABDITIS MEGIDIS.....	67
3. 1. Потенциал зависимый механизм. Возможность ускорения и замедления периодических осцилляций изменения мембранного потенциала. Перезапуск ритма.....	67

3. 2. Внутриклеточный молекулярный механизм. Система фиксации потенциала. Сохранение ритмической активности.....	68
3. 3. Возможные модели зависимости изменения мембранного потенциала от изменения концентрации Ca^{2+} в возбудимых клетках.....	69
3. 4. Моделирование процесса на основе изменения мембранного потенциала и проводимости.....	71
ГЛАВА 4. ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ УЧАСТНИКИ ДЕФЕКАЦИОННОЙ МОТОРНОЙ ПРОГРАММЫ.....	74
4. 1. Тканеспецифичный профиль экспрессии ионных каналов.....	74
4. 2. Деполяризующие ионные каналы нематоды <i>ga1</i> и <i>ga2</i> , потенциально вовлечённые в генерацию ритмических изменений мембранного потенциала.....	78
4. 3. Гиперполяризующие ионные каналы нематоды <i>gb</i> , потенциально вовлечённые в генерацию ритмических изменений мембранного потенциала.....	83
4. 4. Иные потенциальные участники генерации и регуляции ритмических изменений мембранного потенциала.....	86
ГЛАВА 5. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ ДЕФЕКАЦИОННОЙ МОТОРНОЙ ПРОГРАММЫ РАЗЛИЧНЫХ НЕМАТОД.....	91
5. 1. Электрофизиологические свойства изменения мембранного потенциала клеток кишечника нематоды <i>Enoplus brevis</i>	91
5. 2. Сходства и различия паттернов изменений мембранного потенциала в ходе дефекационной моторной программы различных нематод.....	95
5. 3. Физиологический и генетический анализ сходства дефекационной моторной программы отдаленных видов нематод.....	96
ГЛАВА 6. НЕЙРОННЫЕ ФУНКЦИИ КЛЕТОК КИШЕЧНИКА НЕМАТОД.....	103
6. 1. Сходство нейронов и кишечных клеток нематоды <i>Caenorhabditis elegans</i>	103
6. 2. Исследование пресинаптического аппарата кишечника нематоды.....	106
ГЛАВА 7. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	113
7. 1. Культуры нематод.....	113
7. 2. Препарирование и микрохирургия.....	114
7. 3. Электрофизиология.....	116
7. 4. Видеодетекция поведения и микроскопия.....	120
7. 5. Биоинформатика.....	123
7. 6. Анализ данных.....	124
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	126
Выводы.....	126
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	129
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	130

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Ритмические процессы присущи всему живому. Исследования генерации и передачи ритмических сигналов между клетками и сравнение свойств и механизмов такой передачи у разных организмов – актуальная научная проблема. Практически у всех организмов ритмическим поведением управляет нервная система. Впрочем, генерация и контроль ритмической дефекации модельного организма — нематоды *Caenorhabditis elegans* представляют удивительное исключение из этого правила и практически не зависят от работы нервной системы.

C. elegans, вероятно, является одним из самых изученных биологических объектов. Так, для данной нематоды проведена серия блестящих работ, посвященная исследованиям осцилляторной активности клеток кишечника. Ритмическое поведение изучено при помощи различных генетических и молекулярных методов биологии и представляет большой интерес для современной науки, однако применение электрофизиологических методов на *C. elegans* сильно ограничено из-за малого размера клеток этого животного.

Учитывая малые размеры *C. elegans* нами, было предложен новый модельный объект – нематода *Heterorhabditis megidis*. *H. megidis* – близкородственная к *C. elegans* нематода, имеющая заметно больший размер самой нематоды, схожее количество клеток, формирующих кишечник, и как следствие, большие размеры клеток кишечника. Учитывая большие размеры энтодермальных клеток, изучение схожего ритмического процесса на данной нематоды, возможно с использованием более широкого спектра электрофизиологических методов и техник.

Ритмическая программа в энтодерме нематод практически не вовлекает в работу нервную систему, однако исследования работы подобных внутриклеточных «минутных часов» важны для ответа на вопросы о генерации и управлении

ритмическими процессами классическими возбудимыми клетками, многие из которых долгое время оставались открытыми.

В ходе исследований было показано, что дефекационная моторная программа (ДМП) нематоды *H. megidis* управляется центральным генератором паттернов (ЦГП), связанным с необычным гиперполяризационным потенциалом действия (ГПД), который работает по принципу все-или-ничего. Исследуемый механизм ритмического поведения обладает двойственной природой: хотя некоторые аспекты работы ЦГП зависят от уровня мембранного потенциала (МП), осцилляции продолжаются в опытах фиксации МП даже при длительном поддержании потенциала на различных уровнях.

Классическое определение возбудимой ткани не включает в себя возможность энтодермальных клеток генерировать ГПД и тем самым, исследуемая необычная активность клеток кишечника нематоды, требует пересмотра данного определения.

Степень разработанности темы

Со времен работ Луиджи Гальвани в 18 веке миру известно о передаче электрических сигналов в живых тканях. В 1963 году Алан Ходжкин и Эндрю Хаксли получили Нобелевскую премию за выяснение биофизических принципов работы деполяризационного, классического потенциала действия (ПД) в нейронах и мышцах [1]. В 1964 году в журнале Nature появилась работа, описавшая у аскариды необычный гиперполяризационный потенциал действия (ГПД) – противоположный по знаку классическому ПД, и впоследствии ставшая основой для изучения этого явления [2]. В серии работ было показано, что помимо ПД мышечные клетки фаринкса нематоды способны генерировать ГПД в ответ на небольшие гиперполяризационные импульсы и показана роль K^+ каналов в данном процессе [3, 4].

Хотя процессы сходные с ГПД играют значительную роль в работе самых разных систем не только у нематод, но и у большого количества организмов, включая человека, это явление весьма скудно описано в современной литературе. ГПД тесно связаны с механизмами Ca^{2+} сигнализации и нарушения в работе этих систем могут быть причинами серьезных заболеваний.

Первый электрофизиологический эксперимент на млекопитающих, показывающий взаимосвязь изменения проводимости K^+ каналов, и вызванную таким образом гиперполяризацию клеточной мембраны, с возникновением Ca^{2+} токов внутрь клетки, был проведен на мегакариоцитах морской свинки [5]. Впоследствии, технология patch clamp позволила получить аналогичные результаты для большого числа позвоночных [6].

Помимо мегакариоцитов и другие невозбудимые клетки генерировали изменения МП для запуска Ca^{2+} волн. МП L-клеток клеточной линии фибробластов мыши в ответ на электрическую стимуляцию генерирует самопроизвольно повторяющиеся гиперполяризационные ответы, потенциально связанные с эндоцитозной активностью и подвижностью клеток [7]. Увеличение проводимости клеточной мембраны за счет открытия K^+ каналов создает ГПД, приводящий к засасыванию Ca^{2+} по градиенту возникающего потенциала.

Примером межклеточной координации, основанной на ГПД, является передача сигналов вдоль эндотелия, помогающая контролировать кровоток в сети резистивных сосудов [8–12]. Эти сосуды иннервируются вегетативной нервной системой и реагируют на изменения активности нейронов и концентрации гормонов сужением или расширением. Внутриклеточная инъекция тока в эндотелиальные клетки резистивных сосудов инициирует ГПД, который распространяется через щелевые контакты (ЩК), что приводит к вазодилатации. Один из важнейших аспектов работ, описывающих данное явление – взаимосвязь между распространением внутриклеточной Ca^{2+} волны, гиперполяризации клеток и сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Наиболее интересным проявлением передачи сигналов, основанным на ГПД, можно назвать управление энтодермальными клетками сложного поведенческого процесса. Центральные генераторы паттернов (ЦГП) представляют собой единичные клетки или системы взаимосвязанных клеток, например, нейронные сети, способные производить ритмически упорядоченные моторные сигналы при отсутствии сенсорной обратной связи. Клеточные и молекулярные механизмы циркадных (примерно равных 24-часовым) [13, 14] и быстрых (с периодами в несколько секунд) [15] ритмов хорошо изучены в то время, как ультрадианным ритмам (с минутными и часовыми периодами) [16] уделено меньше внимания. Одним из известных минутных ритмов, в основе работы которого стоит ЦГП является ДМП нематоды *C. elegans*.

При температуре 20-25С, постоянно питаясь, *C. elegans* ритмически осуществляет процесс дефекации со стабильным периодом в 45-60 секунд. Дефекация нематод сложный ритмический процесс, вовлекающий разные типы клеток [17, 18]. Генерация ритма внутри кишечника, а также первый такт работы мышц, полностью автономны и не требуют вовлечения нервной системы [17]. Роль нейронов выполняют клетки кишечника нематоды, тесно связанные ЩК и генерирующие ГПД и Ca^{2+} волны [19, 20].

Показано, что ДМП представляет собой последовательную серию сокращений различных мышц тела нематоды. ДМП можно разделить на три этапа, осуществляемые один за другим. Первый этап – сокращение дорзальных и вентральных мышц задней части тела (pVoc), приводящее к уплотнению и переносу пищи в переднюю часть кишечника. Второй этап – сокращение дорзальных и вентральных мышц передней части тела (aVoc), сдавливающих переднюю часть кишечника и фаринкс. Третий – сокращение энтеральных и кишечных мышц (Exp), приводящий к максимальному нагнетанию давления внутри кишечника и после этого к выбросу содержимого кишечника.

Молекулярный механизм данного процесса изучался на протяжении длительного времени [21–23]. Таким образом, было показано, что сокращение

задних мышц тела регулируется при помощи изменения рН в псевдоцеломическом пространстве, которое в свою очередь контролируется работой Na^+/H^+ транспортера РВО-4/ННХ-7, экспрессированного на клеточной мембране кишечных клеток на участках, близких к мышечным клеткам [18, 19].

Было показано, что ДМП контролируется внутриклеточными кальциевыми волнами, начинающимися в апикальной клетке и распространяющимися вдоль всего кишечника от задней части к передней [24]. А важным посредником распространения кальциевых осцилляций являются ЩК [25, 26]. Паннексин INX-16 является основным белком ЩК, необходимым для распространения кальциевой волны в кишечных клетках нематод. Участие же нервной системы минимально. Мотонейроны AVL и DVB необходимы для второй (aVoc) и третьей (Exp) стадии дефекации. Нарушение работы этих нейронов сильно уменьшает качество и количество сокращений мышц передней части тела нематоды, и полностью выключает работу мышц при выбросе содержимого кишечника, однако ДМП сохраняет ритмичность и безошибочно осуществляет рVoc. Генерация ритмичного дефекационного ритма в *C. elegans* не зависит от работы нервной системы, и система является полностью автономной [17].

Электрофизиологические же эксперименты на модельном организме *C. elegans* затруднены ввиду ограничений, связанных с размерами животного и размерами клеток кишечника в данной нематоде. Именно поэтому нами была предложена в качестве модельного объекта близкородственная к *C. elegans* нематода *H. megidis* принадлежащая отряду Rhabditida.

Наряду с обработкой пищи, извлечением питательных веществ и переносом их в другие ткани, энтодермальные клетки нематод могут регулировать деятельность различных систем организма, реагировать на изменения внутренней и внешней среды и даже управлять сложным запрограммированным механизмом гибели целого организма. Голубая авто-флуоресценция клеток кишечника *C. elegans* претерпевает кардинальные изменения в течении жизни. Гибель целого организма сопровождается вспышкой интенсивной синей флуоресценции,

генерируемой в энтодермальных клетках в ходе развития некротического процесса [27].

Цели и задачи исследования

Целью данной работы является исследование механизма генерации и передачи сигналов в цикле дефекации у нематод, в том числе электрофизиологическое исследование характеристик и механизмов ритмического изменения МП клеток кишечника.

Для достижения этих целей были поставлены следующие задачи:

1. введение и использование нового модельного организма для электрофизиологических исследований – нематоды *H. megidis*. Получение параметров гиперполяризационного потенциала действия;
2. регистрация изменений МП клеток кишечника в ответ на использование электрофизиологических стимулов. Проведение исследований в различных типах препаратов;
3. создание модели работы ионных каналов. Предсказание участников процесса на основе биоинформатического анализа данных, прогнозирование их функций;
4. эволюционное исследование наличия и характеристик ДМП у различных видов нематод.

Научная новизна

Исследования на простых модельных организмах способствуют детальному пониманию фундаментальных биологических механизмов. Серия блестящих работ посвящена исследованию механизма ДМП для одного из самых популярных модельных организмов – нематоды *C. elegans*. Исследования на *C. elegans* ограничены сложностью применения различных электрофизиологических методов

из-за малого размера клеток этого животного, что в итоге не дает возможность получить полную картину работы исследуемой системы. Нами предложено новое модельное животное для исследования распространяющегося сигнала в кишечнике нематоды стандартными методами нейрофизиологии – нематода *H. megidis*. Близкородственный к *C. elegans* вид, размеры клеток кишечника которого достаточно велики для применения стандартных электрофизиологических методов.

В работе впервые были обнаружены совершенно новые и неожиданные свойства электрических потенциалов при генерации кальциевой волны. Показано как многообразие возможных вариантов траектории изменения МП при генерации ДМП, так и единый ее паттерн с отчетливо выраженными участками, такими как плато и ГПД. В сравнении с обычными ПД, связанными со входом натрия и кальция в нейронах, мышечных или сердечных клетках, мы обнаружили, что в клетках кишечника нематоды пороговый распространяющийся ПД имеет противоположную полярность (направлен в сторону гиперполяризации меняясь от +10 мВ до -70 мВ и запускается гиперполяризующим толчком тока в отличие от обычных ПД). В рамках проекта мы впервые исследовали с помощью различных электрофизиологических методов механизмы передачи такой волны между клетками кишечника *H. megidis* (для *C. elegans* есть данные о роли паннексинов в этой передаче), предсказали механизмы генерации этих волн и роль белков, потенциально задействованных в этот процесс (потенциал зависимые и кальций зависимые калиевые каналы, кальциевые каналы и пр.).

При помощи мультиэлектродной регистрации электрофизиологических параметров клеток кишечника и введения маркерных молекул показано, что между клетками кишечника *H. megidis* есть электрическая связь с высоким, близким к 1 коэффициентом связи. Правильный подбор необходимых параметров среды позволил проводить многочасовые эксперименты как на препарате состоящим всего из нескольких клеток изолированного участка кишечника, так и на препарированном участке нематоды, так на живой нематоде *in vivo*.

Впервые проведено комплексное электрофизиологическое исследование ультрадианного ритма дефекации нематоды. На основе большого количества собранных данных изменения различных характеристик энтодермальных клеток с течением времени была показана сложность и двоякость работы генератора паттернов. Показана возможность перезапуска ритма при кратковременной подаче гиперполяризующего тока и отсутствие такового при кратковременной подаче деполяризующего тока. Показано увеличение длительности периода цикла при деполяризации и уменьшение длительности при гиперполяризации.

Измерение проводимости клеточной мембраны позволило создать фазовые пространства зависимости МП клетки и самой проводимости от времени и предположить потенциальную роль ионных каналов, межклеточных контактов, ионных насосов и транспортеров в генерации необычных ритмических кальциевых осцилляций в *H. megidis* и сравнить механизмы генерации и распространения ритма в цикле дефекации нематоды с процессами, происходящими в «классических» возбудимых тканях (нервных и мышечных). Тем самым были дополнены и улучшены знания о механизме генерации необычного ритмического поведения и построена модель, описывающая потенциально вовлеченные в генерацию ионные каналы.

Результаты данной работы способствуют пониманию механизмов генерации упорядоченной активности дефекации нематод и переосмыслению определения возбудимых клеток.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты, полученные в ходе описываемой работы, имеют теоретическую значимость, так как позволяют переосмыслить имеющиеся знания как о ГПД в частности, так и о возбудимых тканях в целом. Результаты представленных электрофизиологических исследований дополняют уже имеющиеся молекулярные исследования необычного ультрадианного цикла дефекации нематоды *C. elegans*.

В мире широко распространены исследования генерации и передачи сигналов между клетками, изучаются эволюционные аспекты этих процессов, в том числе свойства и механизмы передачи информации у разных организмов в разных тканях. Помимо исследования механизма ДМП для одной конкретной нематоды *H. megidis*, работа предоставляет изучение и сравнение проявлений ритмического процесса у разных представителей нематод.

Клеточные и молекулярные механизмы циркадных, околосоточных и быстрых ритмов хорошо изучены, в то время как исследований ультрадианных ритмов крайне мало. Нам удалось создать модель изменения МП энтодермальных клеток кишечника нематоды во времени – сложной околominутной моторной программы, практически не вовлекающей в работу нервную систему. Ожидается, что новый тип электрической активности, представленный в кишечнике *H. megidis* и других нематод и отвечающий за ритмический процесс дефекации может быть использован для изучения иных ультрадианных биологических механизмов.

Исследования свойств и роли ЦК, ионных каналов и транспортеров клеточной мембраны и эндоплазматического ретикулума (ЭПР) в генерации и распространении сигнальной волны в клетках кишечника нематоды крайне важны для понимания работы нервной системы (кальциевые волны в глиальных клетках) и сердечно-сосудистой системы (кальциевые волны в эндотелии сосудов, работа сердца). Таким образом, полученные в результате работы данные и подходы определяют практическую значимость проекта.

Методология и методы исследования

В данной работе нами были использованы различные методы экспериментальной биологии, физиологии, в том числе электрофизиологии в сочетании с методами биоинформатики и сравнительной геномики.

Основным модельным организмом в ходе описываемых исследований была нематода *H. megidis*. Данная нематода является энтомопатогенным паразитом, и

объекты исследования были получены выращиванием внутри организма хозяина – пчелиной огневки *Galleria mellonella*. Помимо этого исследования проводились на свободноживущей нематоде *Enoplus brevis* и энтомопатогенных нематодах *Romanomermis culicivorax*.

В качестве модельных объектов были использованы как целые организмы, так и полученные при помощи методов микрохирургии препараты единичных кишечных клеток или групп клеток.

Для регистрации электрофизиологических данных использовалась микроэлектродная установка. Подача тока через один или несколько микроэлектродов позволяет воздействовать на исследуемый объект. Так, например, для перезапуска ритма был использован короткий сильный гиперполяризационный импульс, а при помощи продолжительной деполяризации клеток кишечника нематоды удавалось замедлять ритм. Эксперименты с фиксацией потенциала помогли установить двоякую природу наблюдаемого процесса. Получение необходимых данных для подсчета сопротивления и проводимости клеточной мембраны производилось при помощи повторяющихся импульсов тока и высчитывалась по закону Ома.

Для исследования проводимости клеток помимо электрофизиологических методов с применением нескольких микроэлектродов использовалась методика инъекции флуоресцентных красителей, при определенном подборе которых, позволяющая оценить размер межклеточных контактов.

Идентификацию белков исследуемых нематод, гомологичных белкам генов, известным по литературным данным, проводили путем анализа последовательностей с помощью программы BLASTP и баз данных белков. Проверка на ортологичность производилась методом двунаправленного поиска лучших совпадений (BBH).

Филогенетическое дерево было построено с помощью алгоритма neighbor-joining на основе коллекции белков выровненной с помощью программы MUSCLE.

На основе данных секвенирования РНК единичных клеток [28] был проведен анализ дифференциальной экспрессии, построен UMAP и тепловые карты.

Для наблюдения за частотой первой фазы ДМП рVoc нематоды *H. megidis*, записывались видеоданные фиксированной в агаре нематоды. Обработка видеоматериала проводилась вручную.

Анализ физиологических экспериментов сокращения мышц производился на основе обработки видеоданных. Видеофрагменты разбивались на последовательности кадров, на основе которых финальное изображение генерировалось по алгоритму Z-projection FIJI.

Статистика, и построение графиков проводились с использованием OriginPro 9.1 (OriginLab), Microsoft Excel 2019 и SimInTech (simintech.ru).

Положения, выносимые на защиту

1. обнаружен новый тип ритмического распространяющегося электрического потенциала. Изменения МП схожи с классическим потенциалом возбудимых клеток, но имеют обратную полярность и более протяженные длительность и период. Сходно с классическими возбудимыми тканями, энтодермальный потенциал способен передаваться от клетки к клетке. Передача осуществляется за счет электрических связей между клетками, опосредованными ШК, как в электрических синапсах нервной системы;

2. механизм ритмического поведения имеет двоякую природу. Некоторые характеристики работы ЦПП являются потенциал-зависимыми (перезапуск, замедление/ускорение ритма), другие потенциал-независимыми (сохранение осцилляций при фиксации потенциала на различных уровнях);

3. построены траектории изменения базовых характеристик ритмического процесса в энтодермальных клетках нематоды *H. megidis*. Создана простейшая модель работы ионных каналов, включающая три типа проводимости.

Представлены возможные молекулярные участники данного процесса, описан возможный механизм ГПД, учитывая известные литературные данные и биоинформатический анализ баз данных и scRNA-seq. Подсчитан коэффициент связи клеток;

4. сделано предсказание наличия и разнообразия механизма у эволюционно отдаленных видов нематод. Проведено фармакологическое физиологическое исследование, подтверждающее полученные в ходе анализа данные. Показано наличие схожего ритма изменения МП в ходе электрофизиологического эксперимента на *E. brevis*.

Степень достоверности и апробация результатов

По материалам диссертации опубликовано семь статей в рецензируемых научных журналах. Результаты работы были представлены на международной междисциплинарной школе-конференции «Информационные технологии и системы» в 2015, 2016, 2017, 2018 и 2019 годах (ИТиС 2015 – Сочи, Россия; Россия; ИТиС 2017 – Уфа, Россия; ИТиС 2018 – Казань, Россия; ИТиС 2019 – Пермь, Россия; ИТиС 2020 – Москва, Россия), на 11-м Международном нематологическом симпозиуме «Нематоды и другие Ecdysozoa», Чебоксары, Россия в 2015 году, XI конференции «Простые нервные системы» Международного общества нейробиологии беспозвоночных (International Society of Invertebrate Neurobiology, ISIN), Звенигород, Россия в 2016 году, Московской международной конференции по вычислительной молекулярной биологии в 2017 году (Moscow Conference on Computational Molecular Biology, MCCMB'17 – Москва, Россия) и на 5й Московской международной конференции «Molecular phylogenetics and biodiversity biobanking», Москва, Россия в 2018 году.

Список публикаций по теме диссертации

В рецензируемых научных изданиях, индексируемых в системах цитирования Web of Science, Scopus, РИНЦ:

1. **Kuznetsov V.P.**, Slivko-Koltchik G.A., Voronov D.A., Panchin Y. V. Electrophysiology of the rhythmic defecation program in nematode *Heterorhabditis megidis*. // Scientific Reports. – 2017. – 7(1), 17834. doi.org/10.1038/S41598-017-18118-Y
2. Slivko-Koltchik G.A., **Kuznetsov V.P.**, Panchin Y. V. Are there gap junctions without connexins or pannexins? // BMC Evol Biol. – 2019. – 19 (Suppl 1), 46. doi.org/10.1186/S12862-019-1369-4
3. **Kuznetsov V.P.**, Slivko-Koltchik G.A., Popova L.B., Panchin Y. V. Gap junctions in nematodes. // Russ J Nematol. – 2016. – 24(1):1-16. doi:10.24412/cl-17707671
4. Slivko-Koltchik G.A., **Kuznetsov V.P.**, Voronov D.A., Panchin Y. V. Cyclic electrical activity in the intestine of marine nematode *Enoplus brevis*. // Russ J Nematol. – 2018. – 26(1):71-76. doi.org/10.24411/0869-6918-2018-10006
5. Slivko-Koltchik G.A., **Kuznetsov V.P.**, Mikhailov K.V., Voronov D.A., Panchin Y.V. Comparative analysis of nematode defaecation motor program. // Russ J Nematol. – 2018. – 26(2):115-122. doi.org/10.24411/0869-6918-2018-10011
6. **Kuznetsov V.P.**, Slivko-Koltchik G.A., Isaev S.V., Voronov D.A., Panchin Y. V. Ion channels of the intestinal hyperpolarising action potential in nematodes. // Russ J Nematol. – 2019. – 27(2):69-81. doi.org/10.24411/0869-6918-2019-10008
7. **Kuznetsov V.P.**, Slivko-Koltchik G.A., Drozd J.G., Panchin Y. V. Nematode midgut – the unique multifunctional body unit. // Russ J Nematol. – 2020. – 28(2):113-122. doi.org/10.24411/0869-6918-2020-10012

Результаты работы, опубликованные в сборниках тезисов международных конференций:

1. **Kuznetsov V.P.**, Slivko-Koltchik G.A., Voronov D.A., Panchin YU. V. Electrophysiological study of gap junctions in *Heterorhabditis megidis* intestine cells. // 11-й Международный нематологический симпозиум Российского общества нематологов. Russian Journal of Nematology – 2015. – 23(2):74-79.
2. Slivko-Koltchik G.A., **Kuznetsov V.P.**, Panchin YU. V. Electrical oscillation potentials in intestine cells of nematode *Heterorhabditis megidis*. // 11-й Международный нематологический симпозиум Российского общества нематологов. Russian Journal of Nematology – 2015. – 23(2):80-83.
3. **Kuznetsov V.P.**, Slivko-Koltchik G.A., Panchin Y. V. *H. megidis* – a new model organism for electrophysiological studies of the rhythmic oscillations in a nematode's gut // Сборник трудов 39-й междисциплинарной школы-конференции ИППИ РАН «Информационные технологии и системы 2015» – 2015. – 724-728 URL: <http://itas2015.iitp.ru/pdf/1570152441.pdf>
4. Slivko-Koltchik G.A., **Kuznetsov V.P.**, Panchin Y. V. Voltage dependent and intrinsic cellular mechanisms in an ultradian rhythm generator for nematode // Сборник трудов 39-й междисциплинарной школы-конференции ИППИ РАН «Информационные технологии и системы 2015» – 2015. – 730-733 URL: <http://itas2015.iitp.ru/pdf/1570152463.pdf>

5. **Kuznetsov V.P.**, Slivko-Koltchik G.A., Panchin Y. V. Mechanism of membrane potential changes during *Heterorhabditis megidis* defecation program // Сборник трудов 41-й междисциплинарной школы-конференции ИППИ РАН «Информационные технологии и системы 2017» – 2017. – 142-146 URL: http://itas2017.iitp.ru/media/papers/1570374575_0pCnqzr.pdf
6. Panchin Y. V., **Kuznetsov V.P.**, Slivko-Koltchik G.A., Voronov D.A. Ion channels in defecation motor program in nematode *Heterorhabditis megidis* // Proceedings of 8-th International Moscow Conference. 2017 – 2017. – 166 URL: https://www.elibrary.ru/download/elibrary_32563345_41611459.pdf
7. Slivko-Koltchik G.A., **Kuznetsov V.P.**, Voronov D.A., Panchin Y. V. Evolution of nematode defecation motor program // Contributions to the 5th Moscow International Conference «Molecular Phylogenetics and Biodiversity Biobanking». – 2018. – 116-118
8. **Kuznetsov V.P.**, Slivko-Koltchik G.A., Voronov D.A., Panchin Y. V. Defecation motor program in nematodes // Сборник трудов 42-й междисциплинарной школы-конференции ИППИ РАН «Информационные технологии и системы 2018» – 2018. – 597-602 URL: <http://itas2018.iitp.ru/media/papers/1570472495.pdf>
9. **Kuznetsov V.P.**, Slivko-Koltchik G.A., Drozd J.G., Panchin Y. V. Gut synapses and enterocytes as interneurons // Сборник трудов 44-й междисциплинарной школы-конференции ИППИ РАН «Информационные технологии и системы 2020» – 2020. – 309-314 doi: 10.53921/itas2020_309

Объем и структура работы

Полный объём диссертации составляет 139 страниц, включая 28 рисунков. Список литературы содержит 144 наименования.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. 1. Ритмические процессы. Ультрадианные ритмы

Многие процессы характеризуются колебаниями вокруг некоторого среднего значения. Эти колебания могут иметь как повторяющийся, так и случайный характер. Для того, чтобы процесс считался повторяющимся требуется определенное число последовательных повторений [29]. Повторяющиеся процессы подразделяются на периодические и ритмические. Периодические процессы обычно включают значительные паузы между окончанием одного и началом следующего цикла, в то время как ритмические процессы почти непрерывны [30].

Ритмическая активность играет ключевую роль в функционировании различных биологических систем. Период ритмических колебаний охватывает широкий диапазон временных масштабов от нескольких секунд до нескольких лет. Это обуславливает многообразие механизмов, лежащих в основе генерации и регуляции физиологических ритмов. Изучение модельных систем с ритмической активностью является ценным, поскольку оно способствует пониманию функционирования систем в целом.

Биологические ритмы обычно классифицируются по продолжительности их циклов. Классификация включает ультрадианные ритмы с периодом менее 20 часов, включая быстрые ритмы, циркадные или суточные ритмы с периодом около 24 часов, а также инфрадианные ритмы с периодом более суток [31]. Клеточные и молекулярные механизмы циркадных и быстрых ритмов (с периодами несколько секунд или меньше) тщательно изучены, тогда как меньше внимания уделялось ультрадианным ритмам с периодами от минут до часов.

Многие ритмические процессы синхронизированы с изменениями во внешней среде, например, с приливами и отливами, суточными и лунными циклами. Однако, некоторые живые системы регулируются с помощью ЦГП. ЦГП

представляют собой группу взаимосвязанных возбудимых клеток, способных генерировать ритмические упорядоченные исходящие сигналы без входящих ритмических сигналов. Роль отдельных нейронных осцилляторов и нейронных сетей в генерации двигательной активности известна давно, но все больше исследований указывают на роль ЦГП в широком спектре сенсорных, моторных и когнитивных процессов [32].

Примером ультрадианных ненейронных ЦГП является генератор ДМП подробно изученного модельного вида *C. elegans* [23]. Во время питания, нематода ритмически производит дефекацию примерно каждые 45-50 секунд. Генетические и молекулярные механизмы этого поведения продолжают изучаться.

1. 2. Механизм дефекационной моторной программы нематод

Дефекационная моторная программа (ДМП) представляет собой скоординированный набор событий, происходящих в кишечнике, отдельных мышечных клетках и нескольких нейронах нематоды [33]. Данный процесс включает в себя три последовательно происходящих серии мышечных сокращений, происходящих примерно каждые 45 секунд у активно питающихся взрослых гермафродитов. Этапы включают rWoc, aWoc и Ecr [22, 23]. Наиболее изученной является rWoc, в то время как механизмы двух других этапов изучены менее полно.

Регуляция работы ДМП преимущественно происходит за счет клеток кишечника нематоды, способных самостоятельно генерировать ритмические колебания уровня кальция в цитоплазме [24, 34].

Механизм ДМП у нематод изучен в ряде исследований (Рисунок 1), однако некоторые аспекты этого процесса до сих пор не раскрыты полностью [22, 34–36]. Известно, что инозитол 1,4,5-трисфосфат (IP₃) и ионы кальция Ca²⁺ играют ключевую роль в инициации и распространении осцилляторного процесса,

связанного с ДМП [22, 34]. Процесс активации ДМП запускается при активации взаимодействия G-белков и GPCR [37], где Gq α активирует фосфолипазу бета (PLC β). Гидролиз фосфатидинозитол-4,5-бисфосфата (PIP₂), фосфолипида, находящегося в плазматической мембране, фосфолипазой приводит к образованию сигнальных молекул IP₃ и диацилглицерола (DAG). IP₃, являясь растворимой молекулой, может диффундировать через цитоплазму и связываться с рецептором инозитол-(1,4,5)-трифосфата/лиганд-зависимым Ca²⁺ каналом (IP₃R) на поверхности ЭПР [24], регулируя 50-секундный ритм поведения у *C. elegans* [17].

Связывание IP₃ с IP₃R вызывает открытие Ca²⁺ каналов и высвобождение кальция из внутренних запасов ЭПР в цитоплазму [17], что является важной частью механизма ДМП. Активность IP₃R также контролируется сенсорами Ca²⁺, что обеспечивает положительную обратную связь, способствующую возникновению волн и осцилляций Ca²⁺ [38]. В ходе ДМП у нематод наблюдается увеличение концентрации цитоплазматического Ca²⁺ в апикальной точке кишечного эпителия, приводя к формированию межклеточной волны Ca²⁺. Волна увеличения кальциевой концентрации распространяется от задней части кишечника к передней. Эта волна координирует последовательные этапы дефекации: pVoc, aVoc и Exr. Для поддержания цикличности процесса, ретикулярная Ca²⁺-АТФаза (SERCA) способна восстанавливать концентрацию Ca²⁺ до исходного уровня [24, 39].

Механизм ДМП нематод включает в себя множество взаимодействующих процессов и систем. Так, Ca²⁺ волна распространяется по всему кишечнику через ЩК, в частности через INX-16 [25, 26, 40]. Это подчеркивает важность межклеточной коммуникации в регуляции ДМП. В ходе сложного процесса ДМП один из ключевых механизмов сигнальной передачи от клеток кишечника основан на закислении псевдоцеломического пространства. Для активации обменника РВО-4/NHX-7 требуется наличие Ca²⁺ сигнала для возникновения оттока H⁺ через аллостерический эффект связывания H⁺ с РВО-4/NHX-7 [18, 19]. Этот обменник переносит протоны в псевдоцелом и натрий внутрь клетки через мембрану.

Известно, что кальций-связывающий белок PBO-1 играет важную роль в координации натрий-протонного обмена через PBO-4/NHX-7. Отток протонов через PBO-4/NHX-7 из клеток кишечника запускает активность протон-зависимого ионного канала PBO-5/PBO-6, вызывая деполяризацию и pVoc.

Стадия aVoc является менее изученной стадией ДМП. Известно, что уничтожение AVL нейронов приводит к существенным дефектам этого этапа. Но хотя AVL и является ГАМК-эргическим нейроном, у мутантов с дисфункцией ГАМК этап aVoc протекает нормально. Это указывает на то, что мышцы передней части тела контролируются мотонейронами AVL, но не требуют ГАМК на пути от инициации Ca^{2+} волны до деполяризации мышцы.

Синаптоагмин (SNT-2), будучи связанным с кальцием и локализованный на dense core vesicles (DCV), участвует в высвобождении нейропептидоподобного белка NLP-40 с базолатеральной поверхности клеток кишечника. Таким образом осуществляется Ca^{2+} зависимое ритмическое высвобождение белка NLP-40 и передача сигнал за пределы кишечных клеток. Секретируемый NLP-40 активирует GPCR рецептор AEX-2 на нейронах AVL и DVB. Сигнальный путь цАМФ внутри нейронов приводит к притоку кальция в нейроны, их возбуждению и высвобождению ГАМК. Возбуждающий ГАМК-рецептор EXP-1 на энтеральных мышцах (электрически связанные через ШК анальный сфинктер, анальный депрессор и стомато-кишечные мышцы) связывает ГАМК и вызывает их сокращение, что ведет к завершающей стадии ДМП – выбросу содержимого кишечника [39, 41, 42].

Помимо механизмов, участвующих в регуляции циркуляции Ca^{2+} между ЭПР и цитоплазмой, основанных на работе рецептора инозитол-трифосфата (IP_3R) и механизме SERCA, в формирование волн Ca^{2+} также вовлечены потенциал-зависимые механизмы, такие как ионные каналы на плазматической мембране. Энтодермальные клетки кишечника нематод демонстрируют необычные ГПД, которые работают по принципу все-или-ничего [20, 43]. Форма и электрические свойства осцилляций МП в клетках кишечника нематод напоминают спайки,

возникающие в нейронах и миоцитах, однако эти ГПД имеют противоположный знак, переводя МП из деполяризованного состояния в быструю гиперполяризацию.

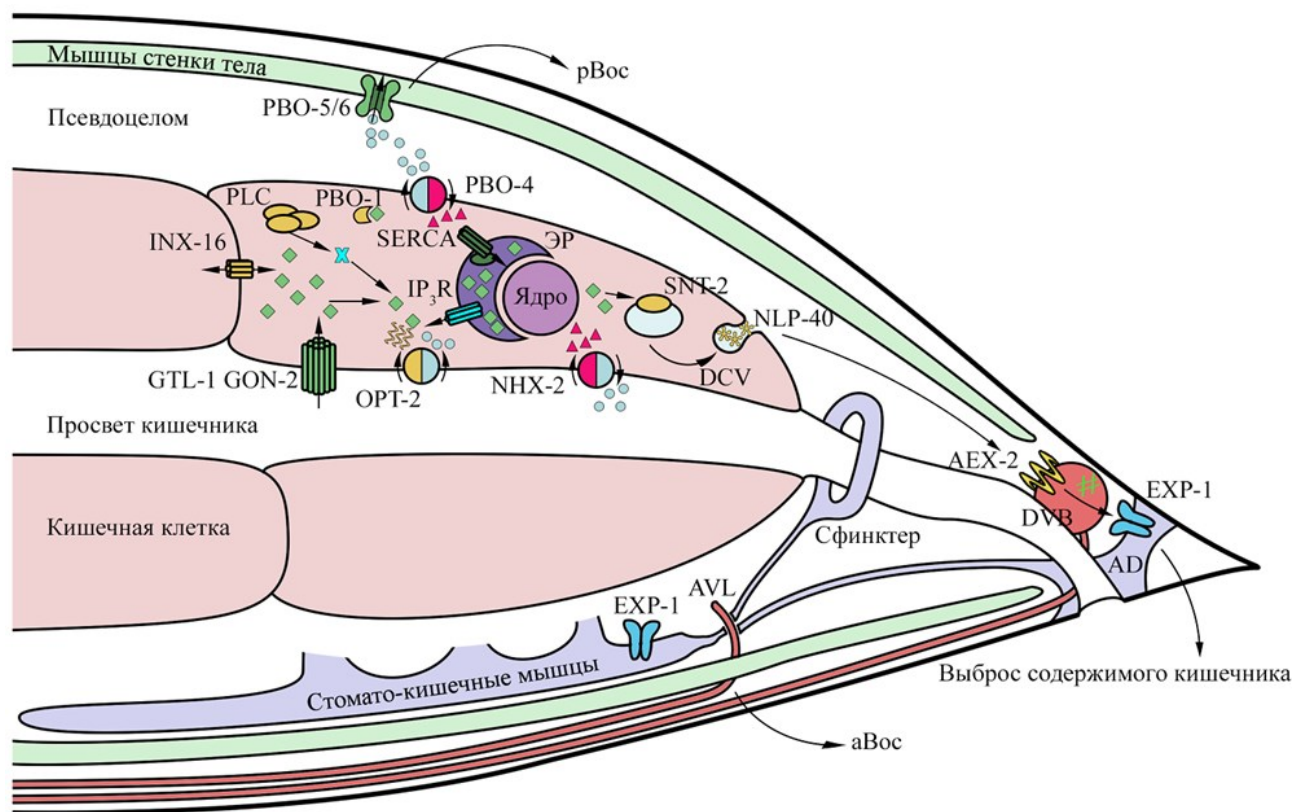


Рисунок 1 – Схематическое изображение задней части тела нематоды *Caenorhabditis elegans* показывающее заднюю часть кишечника, окружающие мышцы и нейроны, участвующие в сигнальных путях, регулирующих поведение дефекации. Инозитол-(1,4,5)-трифосфат (IP_3) (голубой крест) образуется гидролизом фосфолипида PIP_2 (фосфатидинозитол-4,5-бисфосфат) фосфолипазой C (PLC) и активирует рецепторы IP_3R , что вызывает высвобождение ионов Ca^{2+} (зеленый ромб) из эндоплазматического ретикулаума (ЭР). Кальциевая волна распространяется от задней части к передней через ЩК (INX-16). TRPM-каналы GTL-1/GON-2 повышают внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} . Ca^{2+} -АТФаза сарко/эндоплазматического ретикулаума (SERCA) восстанавливает концентрацию Ca^{2+} до исходного уровня. Ca^{2+} белок PBO-1 координирует выброс протонов H^+ (серый кружок) и изменение концентрации ионов Na^+ (пурпурный

треугольник) с колебаниями Ca^{2+} . Ионообменник PBO-4/NHX-7 переносит через базолатеральную мембрану клетки H^+ в псевдоцелом и Na^+ в клетку, а ионообменник NHX-2 переносит через апикальную мембрану H^+ в просвет кишечника и Na^+ в клетку. NHX-2 связан с транспортером олигопептидов OPT-2/PERT-1, который симпортирует дипептиды (желтые волны) и H^+ из просвета кишечника. Гетеродимер протон-управляемого ионного канала PBO-5/PBO-6 деполяризует мышцы задней стенки тела, вызывая рVoc. Мотонейрон AVL контролирует передние мышцы тела. Синаптотагмин (SNT-2), способствует высвобождению нейропептидоподобного белка NLP-40 связываясь с ионами кальция. NLP-40 активирует рецептор AEX-2/GPCR на нейронах AVL и DVB, вызывая возбуждение и выброс ГАМК (зеленый октоторп). ГАМК связывается с рецептором EXP-1 на кишечных мышцах, вызывая сокращение и завершающую стадию ДМП – выброса содержимого кишечника.

Интересно, что частота этих осцилляций МП связана с самим МП, кроме того, ритм может быть искусственно перезапущен искусственной инъекцией электрического тока, аналогичного естественному гиперполяризационному спайку. Гиперполяризация может быть вызвана открытием потенциал-зависимых калиевых каналов, в то время как кальций может поступать в клетку через кальциевые каналы утечки, возникающие из-за градиента потенциала [20].

Таким образом, исследования показывают сложную скоординированную систему молекулярных и электрофизиологических механизмов ДМП у нематод, подчеркивая важность IP_3 и Ca^{2+} сигнализации. Помимо этого, клетки кишечника нематод обладают сложными электрическими свойствами, которые напоминают свойства нейронов.

1. 3. Роль инозитолтрифосфата в инициации и модуляции ритма. Кальций-зависимый выброс кальция

Несколько типов белков, формирующих ионные каналы, участвуют в мобилизации кальция из внутриклеточных резервуаров. Одним из таких типов являются рианодиновые рецепторы (RyRs), представляющие собой разновидность внутриклеточных кальциевых каналов. Они распространены в различных возбудимых тканях, включая мышцы и нейроны, и вовлечены в множество сигнальных путей, в том числе высвобождение кальция из внутриклеточных органелл.

Рецепторы рианодина имеют три основные изоформы. Так для позвоночных: два для разных типов мышц и один, преимущественно экспрессируется в тканях головного мозга. Изоформа рианодинового рецептора RYR2 является ключевым клеточным медиатором кальций-индуцированного освобождения кальция (CICR). У нематоды *C. elegans* существует единственный рианодиновый рецептор, кодируемый геном *unc-68*, также выступающий в качестве медиатора CICR. Этот рецептор участвует в регуляции локомоции и позитивной регуляции программированной клеточной смерти [44]. Рецептор располагается в ретикулуме и экспрессируется в мышечной ткани, кишечнике и нейронах [45].

Вторым типом ионных каналов, способствующих мобилизации кальция, являются рецепторы инозитолтрифосфата (IP₃), представляющие собой внутриклеточные кальциевые каналы, кодируемые геном *itr-1*, также известным под названиями *dec-4* или *lfe-1* [17, 46]. Этот ген преимущественно экспрессируется в задней части кишечника нематоды, но его также можно обнаружить в некоторых нейронах и мышцах. Ген является ортологом аналогичного гена у млекопитающих.

Мутации в гене *itr-1* могут приводить к нарушениям дефекационного цикла, замедленному развитию и стерильности у мутантов *C. elegans*. Для мутантов если и происходит выброс содержимого кишечника, то это случается весьма редко и,

вероятно, вызвано естественным давлением в полости кишечника. Функции фаринкса и локомоции у мутантов по *itr-1* идентичны нематодам дикого типа, но не наблюдается сокращений мускулатуры тела, необходимых для дефекационного процесса. Это свидетельствует о нарушениях инициации ритмической дефекации [23]. Оверэкспрессия гена *itr-1* приводит к увеличению частоты ритма.

Для *C. elegans*, рецептор IP_3 , взаимодействуя с кальциевыми каналами мембраны ЭПР, выполняет функции не только инициатора и переключателя, но и координатора скорости ритма, регулируя весь ритмический поведенческий процесс – дефекационную моторную программу.

При связывании лиганда с G-белок ассоциированным или тирозинкиназным рецептором происходит активация работы фосфолипазы C (PLC-beta для рецепторов G-белка и PLC- γ для тирозинкиназных рецепторов). Это приводит к генерации вторичных мессенджеров IP_3 и диацилглицерола (DAG) путем гидролиза фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфата (PIP2).

IP_3 активирует IP_3 -рецептор и инициирует процесс, известный как кальций-индуцированное высвобождение кальция (CICR). IP_3 , вызывая высвобождение кальция из внутриклеточных запасов, активирует как IP_3 -рецепторы, так и рианодиновые рецепторы, создавая эффект положительной обратной связи на активность IP_3R . Однако со временем повышенные концентрации кальция становятся ингибирующими, и каналы закрываются [47].

Таким образом активация IP_3R инициирует высвобождение кальция из внутриклеточных хранилищ и генерацию кальциевых осцилляций. Эти кальциевые осцилляции, распространяющиеся от одной кишечной клетки к другой, стимулируют всю ДМП. Кальциевые осцилляции в кишечных клетках предшествуют первому этапу сокращения мускулатуры тела, а IP_3 -индуцированный выброс кальция координирует сложное поведение, включающее различные типы клеток и тканей [17]. Подобная зависимость от концентрации кальция может быть одним из основополагающих факторов генерации как

регулируемых кальциевых осцилляций, так и всего ритмического процесса дефекации в нематоде.

Существует две модели того, как IP_3 -рецептор может функционировать в качестве 50-секундных часов. Первая модель основана на скорости активации рецептора, а вторая – скорости восстановления после его инактивации [17].

Первая модель зависит от времени, необходимого для создания порогового уровня кальция в цитоплазме, который достаточен для инициации выброса кальция из внутриклеточных запасов и запуска кальциевой волны. В условиях оверэкспрессии IP_3 -рецептора происходит ускорение этого процесса: пороговое значение концентрации кальция достигается быстрее, что приводит к более раннему запуску кальциевых волн и увеличению их частоты. В результате, частота дефекационного ритма становится выше. В дополнение к этому, исследования показали, что мутации могут усиливать частоту кальциевых осцилляций, увеличивая чувствительность IP_3R . При увеличении чувствительности к IP_3 и Ca^{2+} пороговая концентрация становится ниже, что позволяет быстрее достигать цитоплазматических концентраций IP_3 и/или Ca^{2+} , необходимых для активации канала [24].

Вторая модель утверждает, что частота кальциевых осцилляций зависит от скорости восстановления активности IP_3 -рецептора после его инактивации. При повышении концентрации кальция, активность IP_3 -рецептора снижается, что препятствует выбросу кальция из ЭПР. Кальций затем возвращается из цитоплазмы во внутриклеточные запасы. В этой модели время, за которое IP_3 -рецептор восстанавливает активность, определяет частоту кальциевых волн.

Эти две модели не противоречат друг другу и могут работать совместно для регуляции частоты осцилляций ДМП. Кроме IP_3 -рецептора, в этом процессе может участвовать и другие белки, включая те, которые необходимы для синтеза IP_3 . Например, фосфолипаза PLC, которая гидролизует мембранный липид PIP_2 до IP_3 и DAG, играет важную роль в активации IP_3 -рецептора. Изменения в концентрации

кальция, вызванные работой IP_3 -рецептора, влияют на активацию PLC, создавая более сложную систему самоподдерживающегося осциллятора [17].

1. 4. Роль ионов кальция в инициации дефекационной моторной программы и синхронизации работы клеток. Ca^{2+} передача сигнала и Ca^{2+} волны

Кальций (Ca^{2+}) играет важнейшую роль в клеточных процессах, выступая одним из главных вторичных посредников. Ионы кальция участвуют в многообразии внутриклеточных функций, включая различные метаболические пути, высвобождение нейромедиаторов, мышечные сокращения и экзоцитоз. Например, в организме человека кальций вовлечен в процессы свертывания крови и поддержания стабильного осмотического давления крови. Контролируя множество внутриклеточных функций, кальций может проявляться и как токсин, способный вызывать гибель клетки. Кальций, выступая в роли сигнальной молекулы, причастен к множеству процессов в клетке, от ее формирования до гибели.

Концентрация кальция в клетке существенно различается в зависимости от его локализации. К примеру, уровни кальция в цитоплазме, ядре, митохондриях и внутриклеточных кальциевых хранилищах, таких как ЭПР или саркоплазматический ретикулум в мышцах, могут отличаться в тысячи раз. Низкий уровень кальция поддерживается за счет работы Ca^{2+} ATPase и Na^+/Ca^{2+} обменников. При повышенных цитоплазматических концентрациях активизируется сарко-эндоплазматическая ретикулярная Ca^{2+} ATPase (SERCA), находящаяся на мембране ЭПР. Благодаря этим и другим механизмам в клетке поддерживается стабильно низкая концентрация ионов Ca^{2+} .

Кальций может пересекать мембрану клетки и мембраны внутренних органелл через различные каналы. Ионные каналы обычно имеют несколько сайтов

для связывания с регуляторными молекулами, которые контролируют их открытие и закрытие.

Разнообразные стимулы, такие как внутриклеточные или внеклеточные сигнальные молекулы и изменения МП, могут инициировать процесс повышения концентрации кальция во внутриклеточном пространстве за счет накачивания ионов из внеклеточной среды или же выброса кальция из внутриклеточных хранилищ посредством активации IP_3R и рианодиновых рецепторов. Такой резкий рост концентрации кальция, подкрепленный множеством механизмов положительной и отрицательной обратной связи в цитоплазме, влечет за собой синхронизированную активацию кальциевых каналов и транспортеров, что ведет к гомеостатической регуляции системы [48].

Передача сигнала и активация внутриклеточных процессов, основанных на использовании или переносе ионов Ca^{2+} , называются кальциевой сигнализацией. Нематода *C. elegans*, представляющая собой один из основных модельных организмов для изучения этого процесса, обладает геномом, богатым кальций-связывающими белками, которые преобразуют ионы кальция в сигнал [24]. Существует множество механизмов кальциевой сигнализации, среди которых наиболее распространенным является колебательная передача сигнала или Ca^{2+} волны.

Ca^{2+} волны – это локальное увеличение концентрации цитоплазматического кальция, которое может распространяться по системе взаимосвязанных клеток [49]. У человека такие волны наблюдаются в клетках гладкой мускулатуры сосудов, клетках нервной системы и миоцитах [50]. Эти колебания могут участвовать в различных циклических процессах, включая ультрадианные ритмы, такие как перистальтика кишечника, сердцебиение и дыхание. В нематоды *C. elegans* ионы Ca^{2+} играют ключевую роль в сложных поведенческих механизмах, таких как дефекация и откладывание яиц [36]. Запуск кальциевой волны в нематодах во время дефекации осуществляется невозбудимыми клетками, но в итоге приводит к синхронизированному во времени инициированию ПД в мотонейронах мышц

стенки тела [51]. Открытие ритмических кальциевых волн в клетках кишечника стало важным шагом в исследовании ДМП [17, 24, 34]. Для доказательства связи между распространением кальциевой волны и ритмическим ДМП у нематод применялись комбинированные генетические и физиологические подходы и была создана система с использованием изолированных групп клеток кишечника.

До проведения внутриклеточной регистрации в кишечнике нематод уже было известно, что колебания концентрации Ca^{2+} сопутствуют циклам ДМП. [17, 34]. Было установлено, что кальциевая волна ритмически инициируется в клетках задней части кишечника не через кальциевые потенциал-зависимые каналы и распространяется через все 20 эндотелиальных клеток кишечника к переднему концу с периодичностью, соответствующей циклу дефекации. Два из шести генов, отвечающих за генерацию IP_3 – инициатора высвобождения кальция из внутриклеточных хранилищ, участвуют в стабилизации и поддержании ритма [24].

Согласно основной гипотезе, описывающей молекулярный механизм генерации и распространения кальциевой волны в клетках кишечника нематоды *C. elegans*, начальные клеточные автоколебания кальциевых сигналов запускают активацию рецептора IP_3 на поверхности ЭПР. Затем запускается механизм кальций-зависимого выброса кальция, что вызывает дополнительный приток ионов кальция через TRPM каналы. Повышенная концентрация кальция в клетке позволяет распространять кальций в соседние клетки через ЩК INX-16, создавая волну инициации процесса вдоль всего кишечника [52].

1. 5. Изменения уровня мембранного потенциала и потенциал действия

О передаче электрических сигналов в живых тканях известно со времен работы Луиджи Гальвани в 18 веке. Клетки в живых тканях обладают электрической поляризацией, они поддерживают разницу потенциалов между

внутренней и внешней сторонами клеточной мембраны. Эта разница, генерируемая заряженными молекулами, называется мембранным потенциалом.

Изменения МП могут проявляться в форме деполяризации (уменьшение разницы потенциалов) или гиперполяризации (увеличение МП). Ионные каналы и транспортеры контролируют поток и перенос ионов через мембрану, которые соответственно могут деполяризовать или гиперполяризовать ее [53, 54]. Так, открытие ионных каналов, приводящее к притоку положительно заряженных ионов в клетку, вызывает деполяризацию. Деполяризация мембраны сдвигает МП в сторону равновесного Na^+ потенциала. С другой стороны, гиперполяризация смещает потенциал в сторону равновесного потенциала для ионов K^+ .

В равновесном состоянии, диффузионные и электрические силы противостоят друг другу, и результирующий ионный поток через мембрану равен нулю из-за равенства скоростей потока ионов внутрь и из клетки. Изменения в проводимости мембраны для конкретного иона могут значительно изменить МП. Это смещение потенциала может активировать или деактивировать ионные каналы, и тем самым, создать эффект положительной обратной связи, и привести к еще более сильным изменениям потенциала клеточной мембраны.

Открытие определенных ионных каналов регулирует пассивный ток заряженных частиц, который движется в направлении своего равновесного потенциала. Если изменения, которые происходят, совпадают по направлению с исходным сдвигом, это способствует открытию еще большего числа каналов, генерируя больший ионный ток через клеточную мембрану. В результате такого процесса МП меняется. Описываемые изменения можно классифицировать на градиентные потенциалы (изменения МП пропорциональны величине изменения тока) и ПД (амплитуда изменений МП не зависит от величины изменения тока, принцип работы – «всё или ничего») [55].

Потенциал действия (ПД) представляет собой резкое локальное изменение МП. В соответствии с этим определением, к электрогенным клеткам можно

отнести нейроны, мышечные клетки и некоторые секреторные клетки. ПД возникает в результате активации специфических ионных каналов, которые реагируют на уровень МП. Особенность ПД заключается в наличии механизмов положительной обратной связи ионных каналов клеточной мембраны. В 1963 году Алан Ходжкин и Эндрю Хаксли были награждены Нобелевской премией за исследование биофизических принципов деполяризационного потенциала действия (ПД) в нейронах и мышечных клетках [1, 56–59]. С точки зрения электрофизиологии, деполяризационный потенциал действия (ДПД) проявляется как деполяризация МП клетки, работающей по принципу «всё или ничего», и начинается со значения МП близкого к равновесному для K^+ . Внешний стимул, такой как небольшая деполяризация, инициирует открытие Na^+ каналов и запускает механизмы положительной обратной связи, что вызывает дальнейшую резкую деполяризацию. Последующее закрытие Na^+ каналов, открытие K^+ каналов приводят к возврату на околоисходные значения.

В 1964 году в статье, опубликованной в журнале *Nature*, было представлено описание гиперполяризующего потенциала действия (ГПД) в фаринксе *Ascaris lumbricoides*, который является противоположностью обычного ПД по знаку. Это исследование послужило основой для дальнейшего изучения феномена ГПД [2]. Выяснилось, что подобно ДПД, мышечные клетки фаринкса могут генерировать ГПД в ответ на небольшие импульсы гиперполяризации, кроме того, была описана роль K^+ каналов в этом процессе [3, 4]. Однако в последующем стало известно, что обратный пик в фаринксе нематоды представляет собой реполяризующую часть ДПД, что уменьшило интерес к этому явлению. Тем не менее, на клетках кишечника нематод нами был обнаружен истинный ГПД [20, 43].

Электрофизиологически, МП в клетках кишечника *H. megidis* обнаруживается как периодические колебания. Исследуемый ГПД, который функционирует аналогично ДПД в обычных электрогенных тканях (нейроны и миоциты), но с противоположной полярностью потенциала и тока, до сих пор не имеет убедительной молекулярной модели, объясняющей его механизм.

Большинство потенциал-зависимых ионных каналов открываются при деполяризации и не подходят для моделирования ГПД.

1. 6. Мембранные белки дефекационной моторной программы нематод

Геном *C. elegans* содержит большое количество мембранных белков, которые участвуют в различных поведенческих программах нематоды. Десятилетиями проводились исследования для идентификации и описания генов, потенциально участвующих в ДМП [17, 23]. В то же время совсем недавно стали доступны детализированные данные о моделях экспрессии генов в отдельных клетках и тканях (включая клетки кишечника), полученные в результате исследований по секвенированию РНК одиночных клеток (ОК) нематод [28, 60].

Ионные каналы и рецепторы

Хотя большинство животных используют потенциал-зависимые натриевые каналы (VGSC) для генерации ПД, геномы нематод не кодируют VGSC [61]. Вместо этого несколько каналов из суперсемейства дегенериновых/эпителиальных натриевых/кислоточувствительных каналов DEGenerin/Epithelial Na⁺ Channels/Acid-sensing Ion Channels (DEG/ENaC/ASIC) играют значительную роль в регуляции различных аспектов ритмического поведения [62]. В геноме *C. elegans* представлены 30 генов семейства DEG/ENaC/ASIC [63]. Эти каналы представляют собой тримерные натриевые каналы с субъединицами, состоящими из двух трансмембранных спиралей и внеклеточной петли, при этом аминоконцы и карбоксиконцы расположены в цитозоле. DEG/ENaC/ASIC не являются потенциал-зависимыми. Кислоточувствительные натриевые каналы (ASIC) активируются внеклеточными протонами.

Геном *C. elegans* включает 72 калиевых канала, согласно данным, указанным в Wormbook [64]. Потенциал-зависимые калиевые каналы (VGKC) не только

создают динамические электрические сигналы, но и устанавливают потенциал покоя в большинстве живых клеток. Без них жизнь животных в том виде, в котором мы ее знаем, не существовала бы, не говоря уже о работе высших нервных систем. VGKC способны поддерживать гиперполяризацию плазматической мембраны, индуцированную гиперполяризующим током. Например, для нематоды *A. lumbricoides* отрицательный спайк в фаринксе, а именно быстрая реполяризация после фазы плато ПД напоминает ГПД в клетках кишечника *C. elegans*. Было показано, что возникающий негативный спайк контролируется калиевыми каналами [2–4].

Ген *exp-2* кодирует субъединицу калиевого канала, принадлежащую к семейству калиевых потенциал-зависимых Shab (Kv2)-подобных каналов [65–67]. EXP-2 обеспечивает быстрое возвращение к покойному электрическому потенциалу после фазы плато в мышцах фаринкса. Каналы EXP-2 являются Kv-типом – калиевым каналом внутреннего выпрямления. Следующее семейство – каналы KCNQ, которые являются гомологами *kqt-2* и *kqt-3*, активируются при деполяризации и участвуют в фазе реполяризации обычного ПД [68]. Свойства каналов *kqt* нематод, включая канал *kqt-1*, специфический для фаринкса, были тщательно исследованы с использованием гетерологичной экспрессии в ооцитах *Xenopus* [69].

Еще одно хорошо представленное семейство – калиевые каналы внутреннего выпрямления с двумя трансмембранными доменами на субъединицу (2ТМ) и одним Р-доменом. Семейство калиевых каналов two-pore-domain (ТВК), включающее 46 генов, является наиболее обширно представленным в *C. elegans* [64]. Каналы, состоящие из белков этого семейства, не являются потенциал-зависимыми [70]. Известно несколько механизмов регуляции активности этих каналов, включая Ca^{2+} , рН, различные крупные сигнальные молекулы, насыщенность кислородом, механическое растяжение и G-белки.

О том, что колебания Ca^{2+} сопровождаются циклами ДМП, было известно еще до проведения внутриклеточной регистрации в кишечнике нематоды [17, 34].

Высвобождение кальция в кишечнике через ЭПР, опосредованного через инозитол 1,4,5-трисфосфат (IP₃) и рецептор ITR-1, считается наиболее важным аспектом Ca²⁺ осцилляций в клетках кишечника нематоды *C. elegans* [17, 35, 37, 71]. Взаимодействие между ITR-1 и IP₃ вызывает колебания концентрации Ca²⁺ по механизму кальций-индуцированного высвобождения кальция (CICR).

Каналы транзистентного рецепторного потенциала (TRP-каналы) представляют собой группу ионных каналов, в основном расположенных на плазматической мембране [72]. Они обычно не являются потенциал-зависимыми и активируются разнообразными лигандами или сенсорными сигналами. В большинстве случаев, TRP-каналы проявляют относительно неселективную проницаемость для катионов, включая натрий, кальций и магний [73].

Была продемонстрирована вовлеченность двух каналов, GTL-1/GON-2, в Ca²⁺ сигнальную систему, связанную с изменением МП у нематод [74]. У мутантов по *gon-2* и *gtl-1* ритмичность Ca²⁺ осцилляций нарушена, поскольку *gon-2* и *gtl-1* взаимодействуют с компонентами кальциевого сигнального механизма. Эти каналы участвуют в внутриклеточной регуляции концентрации Mg²⁺ и Ca²⁺, т.е. они опосредуют селективный приток Ca²⁺ и регулируют активность IP₃-рецепторов [72, 75, 76]. Мессенджерная РНК *glc-1* нематоды *C. elegans*, экспрессированная в ооцитах *Xenopus*, кодирует авермектин-чувствительный глутамат-зависимый хлорид-проницаемый канал [77]. Консервативные мембранные белки *piezo* образуют механочувствительные ионные каналы у многих видов нематод [78].

Щелевые контакты

Межклеточная коммуникация служит основой согласованной работы многоклеточных организмов. Важную роль в этом процессе играют разнообразные типы молекул, передающих биологические сигналы от одной клетки к другой. Обычно такие молекулы высвобождаются специализированным механизмом из одной клетки, после чего диффундируют в внеклеточное пространство, чтобы

воздействовать на соседние или отдаленные клетки в рамках одного многоклеточного организма. Существует и другой механизм коммуникации, который предполагает прямые контакты между клетками с использованием сигнальных молекул и связанных с мембранами рецепторов. Самые близкие межклеточные контакты возникают при прямом соединении цитоплазмы двух клеток. В некоторых случаях возможно даже полное слияние клеток, как это наблюдается в многоядерных синцитиях.

Специализированные каналы могут соединять соседние клетки. У растений и грибов такие межклеточные каналы формируются клеточной мембраной и называются плазмодесмами и септальными порами. У животных (Metazoa) межклеточные каналы составлены из специализированных белков, известных как щелевые контакты (ЩК). Эти структуры представляют собой одну из самых распространенных форм межклеточной коммуникации. Предполагается, что они выполняют аналогичную функцию для всех многоклеточных животных, обеспечивая передачу сигналов от клетки к клетке в различных тканях и типах клеток. В возбудимых тканях (нейронах, мышцах) взаимодействие через ЩК также называется электрическими синапсами.

Каждая из двух клеток участвует в создании ЩК, предоставляя полуканал. Два таких полуканала из соседних клеток могут соединяться, формируя функциональные коаксиальные каналы «клетка-клетка». Предполагается, что все изученные ЩК (включая те, что найдены у позвоночных и беспозвоночных) имеют схожие структуры, размер пор, потенциал-зависимые свойства и чувствительность к одним и тем же классам фармакологических агентов [79–81]. Эти внешне похожие структуры состоят из белков, принадлежащих к двум или, возможно, большему числу различных неродственных белковых семейств.

В настоящее время два крупных семейства белков, образующих ЩК, были идентифицированы и описаны: коннексины, встречающиеся только у хордовых, и паннексины/иннексины, которые можно обнаружить в геномах как хордовых, так и беспозвоночных. Возможность существования третьего семейства белков,

формирующих ЩК, до сих пор является предметом дискуссии. Коннексины были установлены как молекулярные компоненты ЩК позвоночных примерно 30 лет назад [82]. На протяжении длительного времени коннексины считались единственным семейством белков, образующих ЩК. Однако многие попытки клонировать коннексины у беспозвоночных не принесли успеха, что привело к предположению о том, что ЩК беспозвоночных могут формироваться из белков, не являющихся коннексинами [83].

Геном *C. elegans*, опубликованный в 1998 году, стал первым секвенированным геномом животного, позволившим осуществить поиск гомологов коннексинов среди беспозвоночных [84]. Отсутствие единственного, известного на тот момент, семейства белков коннексина у *C. elegans* служит подтверждением того, что другое семейство белков ответственно за функцию ЩК у данной нематоды, а возможно и у всех беспозвоночных. Это новое семейство белков было обнаружено при исследовании мутантов *Drosophila melanogaster* и *C. elegans* и первоначально было обозначено как OPUS, сокращение от названий четырех мутаций: *ogre*, *passover*, *unc-7* и *shakingB* [83, 85–87].

Эксперименты по гетерологичной экспрессии с потенциальными белками ЩК *C. elegans* и *D. melanogaster* подтвердили функцию белков семейства OPUS [88–90]. Позднее они были переименованы в иннексины, поскольку предполагалось, что они являются специфическими белками ЩК беспозвоночных (Invertebrates) [91]. Однако обнаружение гомологов иннексинов у человека и других позвоночных привело к предложению переклассифицировать иннексины и их позвоночные гомологи в более обширное семейство, названное паннексины [92].

Несмотря на их независимое филогенетическое происхождение, как коннексины, так и паннексины обладают схожей структурой, состоящей из четырех (4-ТМ) трансмембранных доменов (Рисунок 2А). Более того, оба типа белков образуют каналы ЩК, предполагаемая структура которых имеет много общего. ЩК сформированы из двух групп мембранных белковых субъединиц, каждая из

которых формирует полуканал, в совокупности образующий канал, соединяющий цитоплазму соседних клеток.

В соответствии с текущими моделями, полуканал ЩК формируется путем объединения субъединиц, создавая тороидную структуру. Такой полуканал обозначается как коннексон или паннексон в зависимости от семейства белков (Рисунок 2Б). Полноценный канал с общей осью образуется из пары противоположно ориентированных тороидных структур, расположенных в мембранах соседних клеток (Рисунок 2В). Образующиеся таким образом каналы пропускают ионы и мелкие молекулы, служа главным образом для межклеточной коммуникации.

Большинство каналов, составленных из белков обоих семейств, имеют гексамерную организацию с шестью субъединицами в одном полуканале. Методы кристаллографии высокого разрешения позволили подтвердить гексаметрическую структуру коннексинов, обнаружив структуру полуканала, сформированного коннексином 26 человека в культуре клеток [93]. Аналогично, сверхэкспрессия INX-6 *C. elegans* в культуре клеток насекомых показала, что этот белок образует гексамерные каналы, аналогичные коннексинам 26 человека [94]. Однако фактическая геометрия канала INX-6 оказалась октамерной [95]. Это вызывает вопросы о предполагаемой универсальной гексамерной структуре ЩК, и возможно, говорит о том, что это представление ошибочно.

Исследования показывают, что у позвоночных один непарный полуканал на плазматической мембране отдельной клетки может функционировать как обычный ионный канал [96]. У млекопитающих паннексины 1 и 3 способны формировать функциональные полуканалы на мембране ЭПР, выполняющие роль каналов утечки кальция [97, 98]. Тем не менее, подобные функции паннексинов у нематод и других беспозвоночных пока изучены недостаточно.

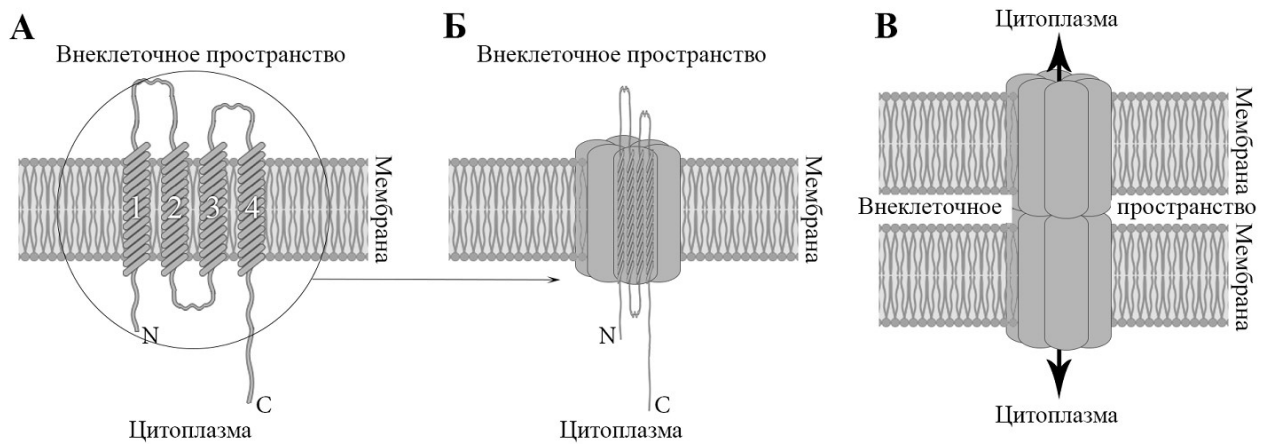


Рисунок 2 – Структура каналов паннексина А. Мономеры паннексина имеют типичную трансмембранную топологию с четырьмя трансмембранными доменами, двумя внеклеточными петлями и центральной цитоплазматической петлей. Амино- (N) и карбоксильный (C) концы имеют внутриклеточное расположение. Б. Паннексон/иннексон или полуканал на клеточной мембране. Состоит из шести или восьми мономеров, которые образуют канал, соединяющий цитоплазму с внеклеточным пространством. Полуканал может находиться в открытом или закрытом состоянии. В. Межклеточный канал состоит из двух паннексонов, по одному от каждой соседней клетки. Стрелка показывает образуемую пору, которая напрямую соединяет цитоплазмы соприкасающихся клеток. В зависимости от участвующих в формировании канала паннексонов будет формироваться гомотипический, гетеротипические или гетеромерный каналы.

Одной из общепризнанных функций полуканалов млекопитающих является транспорт АТФ во внеклеточное пространство, что дает возможность паннексинам играть решающую роль в пуринергической сигнализации. Так паннексины, экспрессированные в ооцитах лягушки, образуют АТФ-проницаемые полуканалы [99], а паннексиновый полуканал, экспрессированный в сенсорных нейронах *C. elegans*, является механочувствительным потенциал-зависимым калиевым каналом [100]. Таким образом, паннексины участвуют в разнообразных клеточных процессах, которые не всегда напрямую связаны с основной функцией ЩК.

Геномы различных видов нематод содержат от 12 до 25 паннексинов. ЩК, образуемые паннексинами, как для *C. elegans*, так и для других видов нематод, были тщательно идентифицированы при помощи трансмиссионной электронной микроскопии [101]. ЩК нематод участвуют в функционировании различных тканей и органов, а мутации паннексинов могут вызывать заметные морфологические дефекты, включая летальный фенотип [40, 102, 103].

Во время всего жизненного цикла нематод фаринкс регулярно сокращается, обеспечивая перекачку пищи. Структура фаринкса включает в себя мышечные клетки, нейроны, эпителиальные клетки и клетки желез. Исследования показывают, что из двадцати пяти иннексинов *C. elegans*, семнадцать экспрессируются в фаринксе, причем десять из них активно экспрессируются в мышечных клетках [25]. Предполагается, что фарингеальные иннексины поддерживают синхронизацию повышения внутреннего давления, обеспечивая стабильную и последовательную доставку пищи.

Каждый сегмент мышц фаринкса экспрессирует от трех до пяти различных иннексинов, и некоторые из них экспрессируются более чем в одном сегменте. Несмотря на вариативность паттернов экспрессии иннексинов в различных клетках фаринкса, всегда присутствует по крайней мере один иннексин, представленный в соседних клетках мышечного сегмента (Рисунок 3). Основываясь на этих данных, можно сделать вывод, что для нормальной работы все сегменты мышечных клеток вдоль фаринкса должны быть связаны ЩК.

Локомоция *C. elegans* реализуется за счет синхронизированных синусоидальных волновых движений мышц стенки тела. Было исследовано воздействие мутаций паннексинов на соседние мышечные клетки [104]. Установлено, что мутации некоторых генов ЩК вызывали существенное уменьшение коэффициентов связи клеток, ухудшение функциональной проводимости, асинхронность ПД, а также сокращение зоны распространения Ca^{2+} . Мутанты *inx-3*, *inx-12*, *inx-13* оказались летальными или стерильными. В то время

как *unc-9*, *inx-1*, *inx-10*, *inx-11*, *inx-16* и *inx-18* внесли наибольший вклад в электрические связи мышечных клеток [40].

Для нематоды *C. elegans* была продемонстрирована существенная роль ЦК в координировании равновесия между передвижением вперед и назад [105]. У этих нематод, передвижение в обоих направлениях контролируется специализированными мотонейронами, что противоречит классическому «принципу конечного общего пути» [106–108].

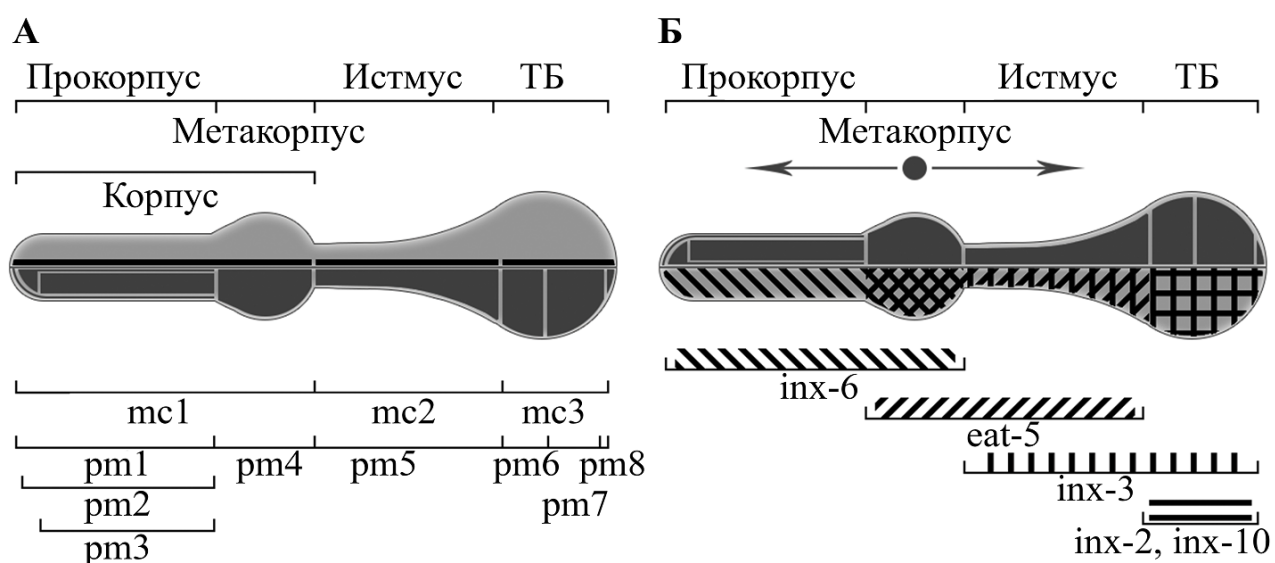


Рисунок 3 – Строение фаринкса и перекрестная экспрессия иннексинов для нематоды дикого типа *Caenorhabditis elegans* Области экспрессия различных иннексинов отмечены различными типами штриховок. Предполагаемый центр синхронизации ритмики отмечен точкой, стрелки показывают направление связанных и скоординированных клеток. А. Строение одной из трех симметричных сторон фаринкса. Отмечены восемь мышечных сегментов (pm1-8), три сегмента маргинальных клеток (mc1-3) и четыре физиологических участка (прокорпус, метакорпус, истмус и терминальная бульба). Б. Перекрестное экспрессия иннексинов (*inx-6*, *eat-5*, *inx-3*, *inx-2*, *inx-10*) в четырех физиологических участках, необходимая для синхронизации фарингеальных клеток.

Сеть из пяти пар локомоторных интернейронов и четырех классов мотонейронов мышц тела регулирует движение вперед и назад. Интернейроны AVA и AVB функционируют взаимосвязанно и взаимодействуют соответственно с мотонейронами А и В. Интернейроны AVA и мотонейроны А способствуют движению назад, связываясь через ЦК и химические синапсы. Интернейроны AVB и мотонейроны В, способствующие движению вперед, связываются исключительно через ЦК. Так, мутанты с нарушениями в иннексинах обнаруживаются некоординированными и лишенными способности двигаться вперед, но сохраняют способность двигаться назад [105].

Кишечник *C. elegans*, составляющий примерно треть от общей соматической массы, является одним из основных органов. Во время питания, *C. elegans* ритмически испражняется с постоянным периодом 45-50 секунд [109]. В клетках кишечника нематоды регулярно генерируются кальциевые волны, которые распространяются между клетками. За каждой кальциевой волной следуют сокращения мышц задней и передней части тела, а также энтеральных мышц. Эта последовательность событий формирует ДМП [34].

Многие исследования подтверждают важную роль ЦК в распространении кальциевых волн [26, 34]. В кишечнике нематоды *C. elegans* выявлены четыре типа паннексинов: INX-2, INX-17, INX-15, INX-16 [25]. При этом INX-2 также обнаружен в фаринксе и, предположительно, может влиять на взаимодействие функций фаринкса и кишечника. Описанные белки ЦК могут формировать гетеромерный канал с незаменимой субъединицей INX-16. Тем не менее, INX-2, INX-17 и INX-15 могут не иметь прямого отношения к функционированию ЦК, поскольку иннексины/паннексины не только образуют межклеточные ЦК, но и могут функционировать как полуканалы на плазматической и ER-мембранах [96, 98, 100].

INX-16 экспрессируется исключительно в клетках кишечника. Известно, что генерация кальциевых волн является эндогенной функцией клеток кишечника и не контролируется нервной системой [17]. Изучалась роль паннексинов в

распространении кальциевых волн по кишечнику, исследуя мутантов INX-16 (*oxl44*), у которых был обнаружен фенотип запора [26]. У большинства из этих мутантных особей распространение кальциевой волны было нарушено. Причина, по которой два других высокоэкспрессируемых гена, *inx-17* и *inx-15*, не могут компенсировать мутацию *oxl44*, остается неясной. Было обнаружено, что в клетках кишечника у мутантных особей кальциевые спайки генерируются асинхронно и, по всей видимости, не зависели от соседних клеток.

1. 7. Модельные организмы – нематоды

Caenorhabditis elegans

C. elegans является одним из самых изученных модельных организмов. Работы по молекулярным и генетическим исследованиям этого вида начались еще в 1974 году под руководством Сиднея Бреннера [110]. В 1986 году был полностью описан коннектом этой нематоды [101], а в 1998 году *C. elegans* стала первым многоклеточным организмом с полностью расшифрованным геномом [84].

C. elegans — это свободно живущая почвенная нематода длиной около 1 мм. Она представлена двумя полами: самцами (X0) и гермафродитами (XX), которые способны к самооплодотворению. Постэмбриональное развитие проходит через четыре стадии: L1, L2, L3 и L4. Взрослые гермафродиты постоянно питаются при наличии пищи, в то время как взрослые самцы прерывают питание во время поиска партнера [111].

При температуре 20-25С и наличии постоянного источника питания, *C. elegans* регулярно осуществляет процесс дефекации со стабильным периодом от 45 до 60 секунд. Отсутствие пищи приводит к более редкой активации ДМП, а ее разбавление увеличивает продолжительность цикла.

Как и многие другие нематоды, *C. elegans* в течение своего развития несколько раз обновляет свою кутикулу. Каждый этап развития, всего их четыре, предшествует период летаргии, когда подавляются локомоция, работа фаринкса нематоды и другие ритмические процессы, включая дефекацию [112, 113]. Обычно период летаргии занимает около двух часов. Генетика и механизмы уникального поведения нематод изучались в течение длительного времени [21, 22, 23, Р. 90].

ДМП у *C. elegans* преимущественно контролируется клетками кишечника, которые способны автономно генерировать ритмические колебания концентрации кальция в цитоплазме [24, 34]. В сложном комплексе программы один из основных механизмов передачи исходящего от кишечника сигнала основан на закислении псевдоцеломического пространства: клетки кишечника выкачивают из себя протоны, воздействующие на мышечные клетки как передатчик сигнала [18, 19].

Heterorhabditis megidis

Электрофизиологические эксперименты на модельном организме *C. elegans* представляют сложности из-за ограничений, связанных с размерами самого организма и клеток его кишечника. *H. megidis* — это энтомопатогенный паразит, относящийся к тому же отряду Rhabditida, что и *C. elegans*. Энтомопатогенные (паразитирующие на насекомых) нематоды *H. megidis* были впервые описаны в 1987 году как новый род, вид и семейство (Heterorhabditidae) из отряда Rhabditida [114]. Этот вид широко используется в биологической борьбе с насекомыми, а также в качестве облигатного хозяина для симбиотических бактерий *Photorhabdus luminescens* [115].

Нематоды, проникая в тело насекомого через рот, анус или дыхальца начинают борьбу с иммунной системой насекомого. При подавлении иммунной системы насекомого *H. megidis* высвобождает своих симбиотических бактерий. Внутри трупa насекомого-хозяина бактерии создают условия, благоприятные для питания, развития и размножения нематод. Жизненный цикл энтомопатогенной

нематоды включает в себя несколько стадий: проникновение личинки в тело насекомого, распространение, циклы развития и размножения внутри хозяина, а затем выход из мертвого насекомого и поиск нового хозяина.

H. megidis обладает рядом свойств, сходных с *C. elegans*, включая короткий репродуктивный цикл, высокую плодовитость, гермафродитизм, прозрачность туловища и небольшой размер генома. Однако, главное отличие *H. megidis* заключается в значительно большем размере самой нематоды, а также большинства ее органов (Рисунок 4). Кроме того, у неё более тонкая кутикула, что обусловлено паразитическим образом жизни [114].

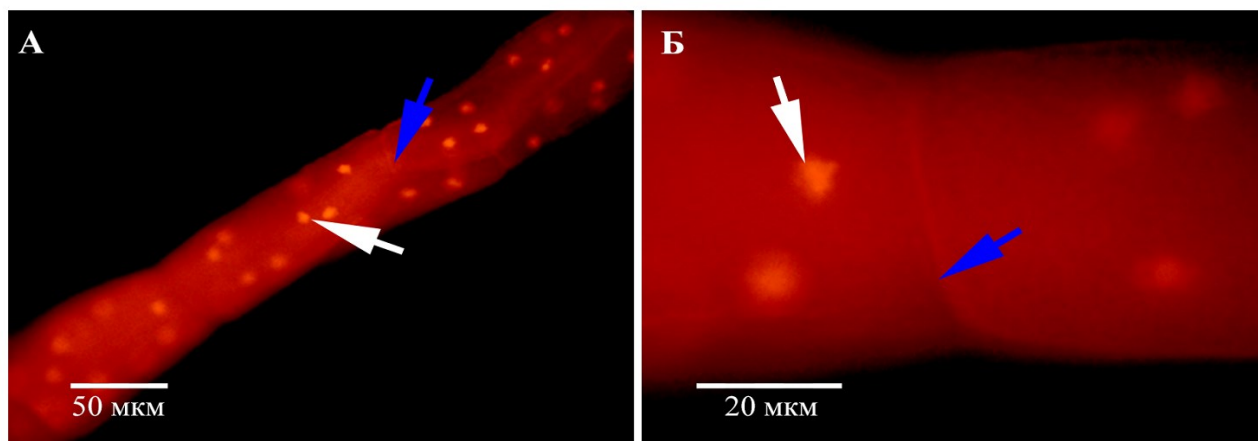


Рисунок 4 – Препарат изолированного кишечника *Heterorhabditis megidis* с окрашиванием бромистым этидием Рисунки А и Б представляют собой различное увеличение одного препарата под флуоресценцией, фильтры WIB. Каждая клетка имеет несколько ядер. Одно ядро отмечено белой стрелкой. Синие стрелки показывают хорошо различимые границы клеток. Тем не менее, точный подсчет клеток кишечника затруднен. Интактные половые железы животных непрозрачны и сильно уменьшают поле зрения, в то время как в препаратах изолированного кишечника некоторые клетки могут отсутствовать. Как и у *C. elegans*, кишечные клетки *H. megidis* содержат множество ядер, поэтому их окрашивание не помогает при подсчете клеток.

У этой нематоды замечен уникальный ритм, который, вероятно, представляет собой аналог ДМП *C. elegans*. Исследования показывают, что ДМП у *C. elegans* инициируется механизмами, связанными с изменениями уровня кальция в клетках кишечника, причем без участия нервной системы. Аналогичное явление наблюдается у нематоды *H. megidis*, где ДМП сопровождается колебаниями МП в клетках кишечника. Этот ритм сопровождается периодическими изменениями МП клеток кишечника, которые синхронизируются через ЩК [20]. Особенно интересным является то, что и осцилляции кальция, и МП у этих видов происходят автономно в опытах на отдельных клетках, однако *in vivo* синхронизируются между собой через ЩК. Это показывает, что нематоды используют сложные механизмы регуляции для координации ритмических действий, таких как дефекация [116].

1. 8. Многообразие функций энтодермальных клеток кишечника нематод

Запрограммированная гибель всего организма

Кишечник нематоды *C. elegans* играет уникальную роль в процессе запрограммированной гибели всего организма. Идеи о существовании запрограммированной смерти всего организма не находят подтверждения для большинства модельных систем. Традиционно смерть считается противоречащей принципам эволюции, поскольку она прекращает размножение организма, и трудно представить себе эволюционный механизм, который бы приводил к закреплению подобной программы. Хотя механизмы запрограммированной клеточной смерти изучены довольно хорошо, полная картина запрограммированной смерти организма, особенно у беспозвоночных, остается малоизученной.

У *C. elegans* наблюдается уникальный процесс, в котором кишечник, самый крупный соматический орган, проходит через стадию самоуничтожения. Этот процесс включает в себя как внутриклеточный, так и межклеточный каскад

клеточного некроза. Одним из ключевых признаков этого процесса является изменение голубой автофлуоресценции, испускаемой клетками кишечника. Эта флуоресценция изменяется в течение всей жизни организма и служит визуальным свидетельством пространственно-временной динамики процесса смерти.

Особенно интересным является быстрый всплеск пиковой интенсивности голубой флуоресценции, возникающий при активации кальпаин-катепсинового некротического процесса в клетках кишечника. Этот всплеск интенсивности флуоресценции увеличивается на 400% и свидетельствует о смерти всего организма [27]. Ранее предполагалось, что источником голубой флуоресценции может быть липофусцин [117], продукт окислительного повреждения. Однако последующие исследования показали, что источником флуоресценции являются глюкозилловые эфиры антраниловой кислоты, хранящиеся в лизосом-связанных органеллах клеток кишечника [27].

Инициированные энтодермальными клетками кишечника нематод, процессы могут задействовать механизм, ведущий к гибели всего животного. Торможение системного некроза в энтодерме позволяет отсрочить гибель, вызванную внешними стимулами, тем самым показывая вклад механизмов энтодермы в процесс гибели организма. Начальная фаза волны гибели происходит в передней клетке кишечника и распространяется от передней к задней части тела через цепи клеток за счет притока кальция через ЩК INX-16. Этот процесс сопровождается ацидозом цитозоля.

Распространение Ca^{2+} через иннексины во время голубой флуоресцентной волны смерти напоминает механизм, задействованный в ДМП, но движется в противоположном направлении [25, 26]. Интересно, что процесс иницируется из самой передней клетки независимо от внешних стимулов, и даже после искусственного нагрева самой задней части тела нематоды точка инициации волны остается неизменной. Всплеск флуоресценции происходит из-за высвобождения антраниловой кислоты в менее кислую среду, вызванного высвобождением из гранул. Некроз энтодермальных клеток кишечника нематод имеет сходства с

некрозом нейронов, который основывается на высвобождении Ca^{2+} из запасов ЭПР. Мутации в рианодиновых и IP_3 рецепторах, а также в кальций-связывающем белке кальретикулине, подавляют как некроз нейронов, так и гибель клеток энтодермы [27, 118, 119].

Эволюционное объяснение такого механизма запрограммированной гибели организма может заключаться в том, что стареющая особь, потерявшая способность к размножению, жертвует собой, запуская некротический процесс, который начинается в клетках кишечника. Этот процесс обеспечивает питательными веществами последнее поколение личинок, находящихся внутри организма [120].

Нейронные функции кишечных клеток

Нервная система играет центральную роль в координации поведения и в передаче сигналов между различными частями организма, в то время как, кишечник многоклеточных организмов в первую очередь ассоциируется с пищеварительными функциями. Однако у нематод, благодаря уникальному эволюционному пути, энтероциты кишечника приобрели функции, схожие с «нервными». Помимо основной роли в обработке пищи, извлечением и транспортировке питательных веществ, клетки кишечника нематод способны регулировать работу различных систем организма, реагировать на изменения окружающей среды и участвовать в управлении сложными процессами, такими как запрограммированная гибель организма.

Примером такой комплексной функции является ДМП, представляющая собой точно синхронизированное ритмическое поведение. Клетки кишечника в этом процессе передают информацию о времени не только друг другу, но и целевым тканям, создавая ритмичные сигналы.

Ритмические поведения, такие как дыхание и локомоция, которые вовлекают в процесс весь организм, обычно координируются нервной системой. Ритмичная

дефекация нематод, будучи одной из основных функций организма, и вовлекающей различные типы клеток и тканей, является удивительным исключением. Этот процесс уникален тем, что молекулярные механизмы ДМП, связанные с необычным ГПД и кальциевыми осцилляциями в клетках энтодермы кишечника нематод тщательно скоординированы, управляются ЦПП и в значительной части процесса не требуют участия нервной системы [17].

Синхронизированные сигналы клеток кишечника вовлекают в механизм мышечные сокращения непосредственно и через нижележащие ГАМК-ергические нейроны. Это подчеркивает сложность механизма, в котором клетки кишечника выполняют функции, аналогичные различным типам нейронов, включая сенсорные, интернейрональные и моторные. Такое многофункциональное поведение клеток кишечника нематод подробно исследовано на примере *C. elegans* с использованием генетических и молекулярно-биологических методов [21, 23, 76, 121].

Эти исследования предоставляют уникальное понимание роли кишечных клеток в координации сложных физиологических процессов, выходящих за рамки традиционных пищеварительных функций.

ГЛАВА 2. ВВЕДЕНИЕ НОВОГО МОДЕЛЬНОГО ОРГАНИЗМА – HETERORHABDITIS MEGIDIS В КАЧЕСТВЕ ОБЪЕКТА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ДЕФЕКАЦИОННОЙ МОТОРНОЙ ПРОГРАММЫ НЕМАТОД

2. 1. *Heterorhabditis megidis* – новый модельный организм для исследования дефекационной моторной программы нематод

Осцилляторная активность клеток кишечника *C. elegans* хорошо изучена используя различные генетические и молекулярные методы. ДМП нематоды *C. elegans* представляет собой ультрадианный ритмический процесс. Взрослая особь гермафродит *C. elegans* производит ритмическую дефекацию стабильно раз в 45 – 50 секунд. Исключением являются периоды покоя/летаргии или длительные периоды при отсутствии пищи, во время которых продолжительность цикла сильно увеличивается. Однако небольшие размеры данной нематоды усложняют применение определенных электрофизиологических методов для изучения процесса.

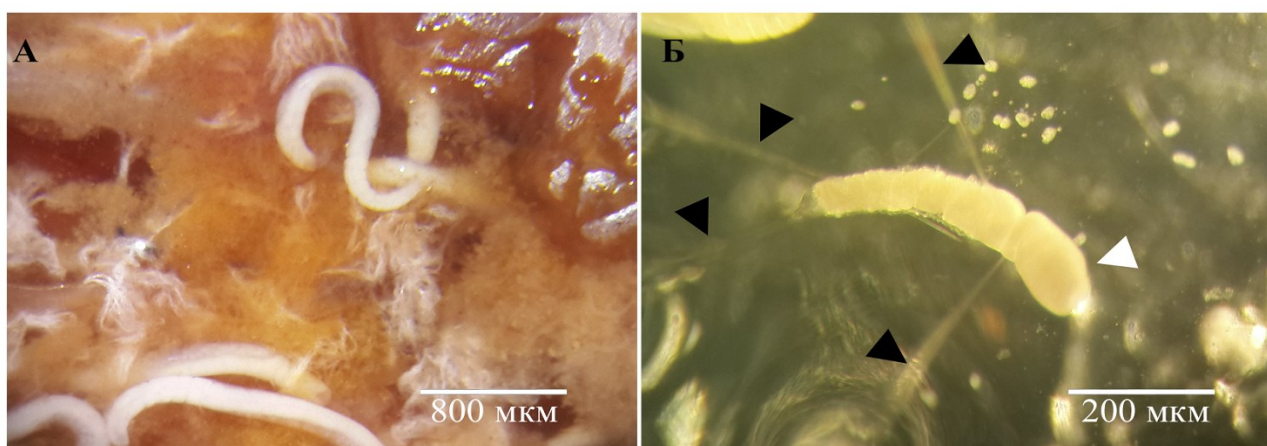


Рисунок 5 – Нематода *Heterorhabditis megidis* – новый модельный организм для электрофизиологических экспериментов А. Интактная нематода

внутри рассеченного насекомого. Б. Препарат изолированного кишечника нематод (белая стрелка) и система из четырех микроэлектродов (черные стрелки).

Нами предложена новая модель для электрофизиологических исследований – нематода *H. megidis*, которая является близкородственной к *C. elegans*, но имеет более крупные размеры и тонкую кутикулу, что позволяет применять широкий спектр электрофизиологических методов (Рисунок 5).

Наблюдаемый процесс имеет двоякую природу и имеет обладает как потенциал-зависимыми свойствами, так и возможностью сохранения осцилляций в экспериментах фиксации МП на разных уровнях в течение длительного времени. В рамках исследований на новой модельной системе было показано, что ДМП управляется необычным ГПД, который работает по принципу все-или-ничего.

Средняя продолжительность гиперполяризационной фазы составляет около одной минуты, а амплитуда колебаний МП примерно равна 60 мВ. Средний период генерации сигнала ЦГП сильно зависит от большого количества параметров, включая размеры животного, а также зависит от уровня МП и меняется при продолжительных искусственных гипер- и деполяризациях. Непродолжительные сильные гиперполяризационные импульсы тока могут привести к сбросу и перезапуску фазы цикла (Рисунок 6).

Несмотря на описанные потенциал-зависимые изменения среднего периода генерации сигнала ЦГП, генерация ритмической активности ЦГП сохранялась в экспериментах, где МП клеток кишечника нематоды, при помощи методов фиксации потенциала, оставался на постоянном определенном уровне (Рисунок 6ЛМ).

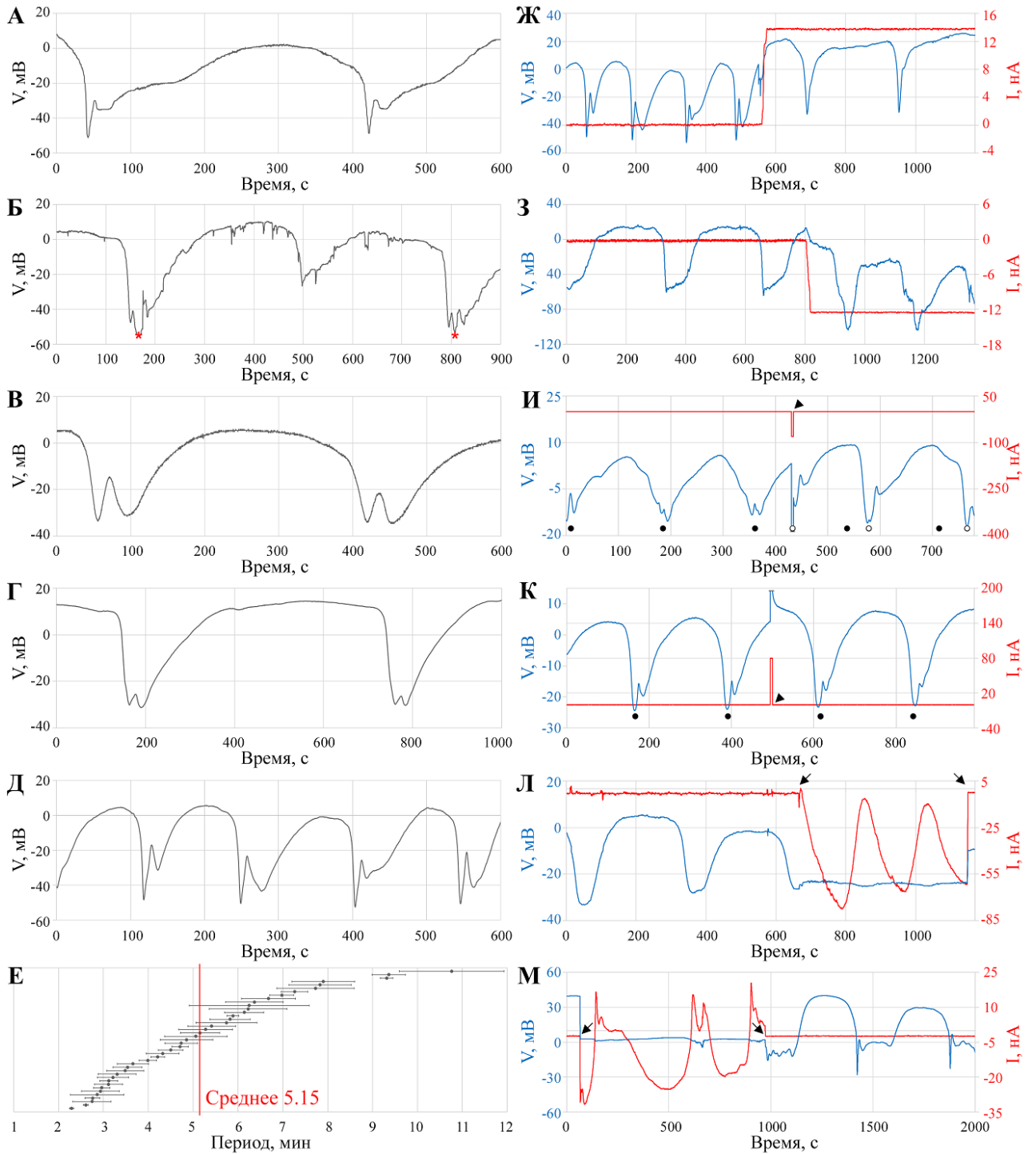


Рисунок 6 – Электрическая активность в клетках кишечника нематоды *Heterorhabditis megidis* А. Классическое проявление регистрируемого ритмического изменения МП с ярко выраженным деполяризационным плато и гиперполяризационным спайком. Б. Изменения МП в препарате целого животного, иммобилизованного в тонком слое агара. Звездочками указаны моменты выброса содержимого кишечника, регистрируемые визуально. В. Изменения МП в препарате изолированного фрагмента кишечника, состоящего всего из четырех

клеток. Примеры А. средних Г. длительных и Д. коротких по продолжительности периодов цикла. Е. Вариабельность периода ДМП *H. megidis*, выраженная через среднее значение со среднеквадратичным отклонением (SD) периодов изменений МП для 41 эксперимента с зарегистрированными минимум четырьмя циклами ДМП, ранжированная в соответствии со средней продолжительностью периода. Ж-М. Единовременные внутриклеточные отведения двух электродов. Первый электрод регистрирует потенциал – синий, второй инжецирует ток – красный. Ж. Продолжительная деполяризация посредством подачи тока увеличивает период наблюдаемых колебаний. З. Продолжительная гиперполяризация уменьшает период колебаний. И. Короткий сильный импульс гиперполяризующего тока (стрелка) перезапускает ритм ДМП, а импульс деполяризующего тока К не имеет эффекта. Черными точками отмечен начальный период ДМП. Белыми точками отмечена период после сброса. Описанные эффекты воспроизводились по меньшей мере три раза. Л-М. Метод фиксации потенциала в двух экспериментах с различными уровнями фиксации (Л -25 мВ и М 0 мВ). Стрелками показывают включение и выключение фиксации потенциала.

В отличие от *C. elegans*, *H. megidis* является энтомопатогенным паразитом, вследствие чего кутикула данной нематоды значительно мягче. Эта особенность позволяет проникать в клетки кишечника при помощи микроэлектродной установки на препарате интактного животного, помещенного в плотный агарозный гель. Подобная фиксация служит для подавления локомоторной активности животного, что уменьшает возникающий шум при регистрации данных и снижает риск повреждения клеток.

При сравнении различных видов препаратов — от изолированных фрагментов кишечника с небольшим числом клеток до целого организма, закрепленного в агарозном геле — данные, полученные с помощью электрофизиологических записей, оказывались весьма схожими (Рисунок 7).

Зарегистрированные значения амплитуды и периода колебаний МП имеют примерно одинаковые средние значения (Рисунок 6АВ).

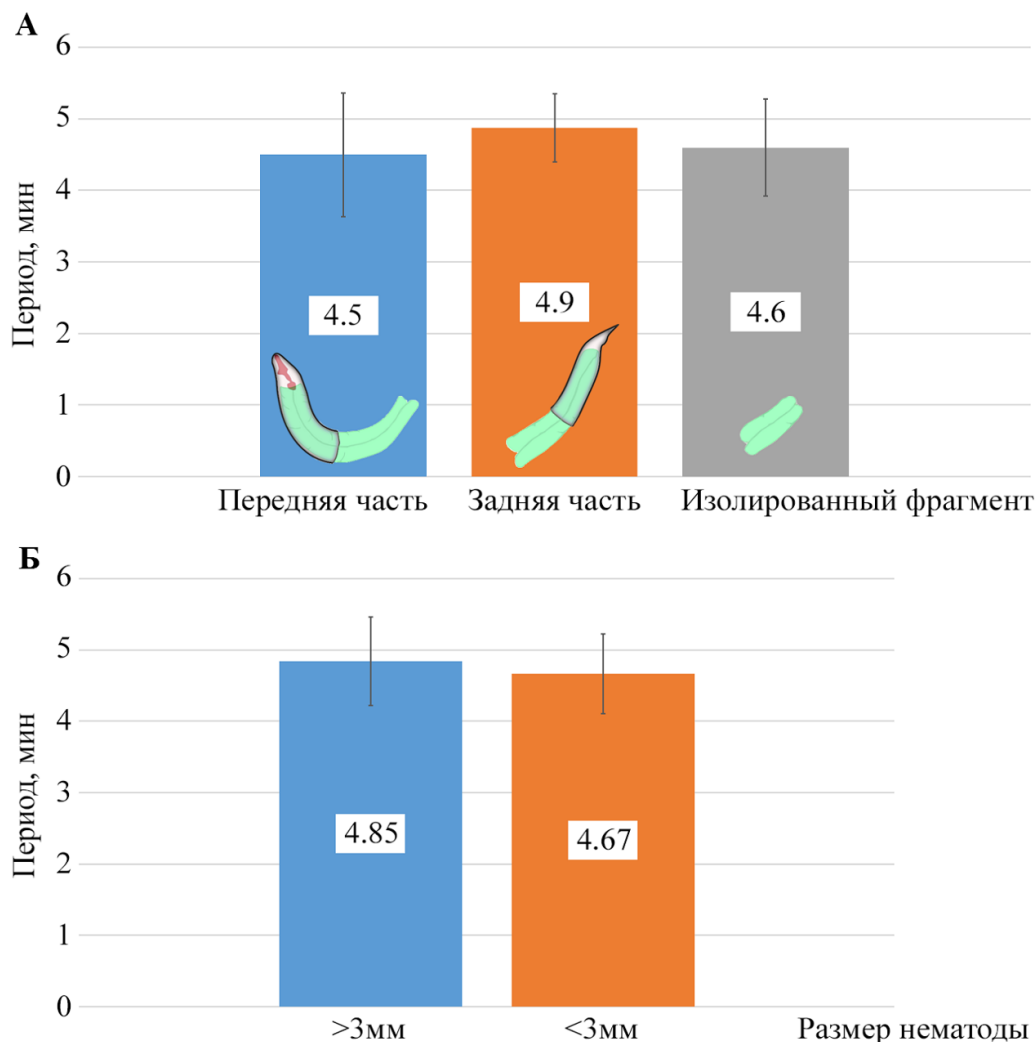


Рисунок 7 – Отсутствие существенной разницы в периоде колебаний в различных типах препаратов А. между тремя типами препаратов. Средние значения \pm SEM для препарата передней части нематоды (синий), задней (оранжевый) и полностью изолированного фрагмента кишечника (серый) составляют $4,5 \pm 0,87$ мин ($n=4$), $4,88 \pm 0,48$ мин ($n=8$), $4,6 \pm 0,68$ мин ($n=5$) соответственно. Б. Между крупными (более 3 мм в длину) и мелкими (менее 3 мм в длину) нематодами. Среднее значение \pm SEM для препаратов кишечника крупных нематод (синий) составляет $4,85 \pm 0,62$ минуты ($n = 13$), среднее значение \pm SEM

для препаратов кишечника мелких нематод (оранжевый) составляет $4,67 \pm 0,56$ минуты ($n = 6$).

Средний период колебаний МП *H. megidis*, зарегистрированных электрофизиологическими методами, соответствует временному интервалу между последовательными актами дефекации нематоды. То есть, временной интервал между двумя наблюдаемыми стадиями pVoc (что является наиболее выраженной фазой ДМП (Рисунок 8) приблизительно равен интервалу между двумя электрофизиологически зарегистрированными гиперполяризационными спайками и составляет примерно 5 минут (Рисунок 6БЕ). На основе проведенных *in vivo* экспериментов выяснилось, что акт выброса содержимого кишечника синхронизирован с фазой резкой гиперполяризации МП. Среднее значение со среднеквадратичным отклонением (SD) периода колебаний МП у препаратов изолированных клеток кишечника составляет (5,1 (2,1) минуты, $n=41$) и у целых животных в *in-vivo* экспериментах (7,2 (1,9) минуты, $n=6$). Период между двумя pVoc, измеренный у интактных животных, составил 5,8 (0,9) минуты $n=7$. Длительность сокращения длины хвоста у *H. megidis* в ходе pVoc равна приблизительно 6 секунд. Эти наблюдения, зафиксированные с помощью микроэлектродной установки, указывают на то, что зарегистрированная гиперполяризация коррелирует с физиологическим процессом выброса содержимого кишечника.

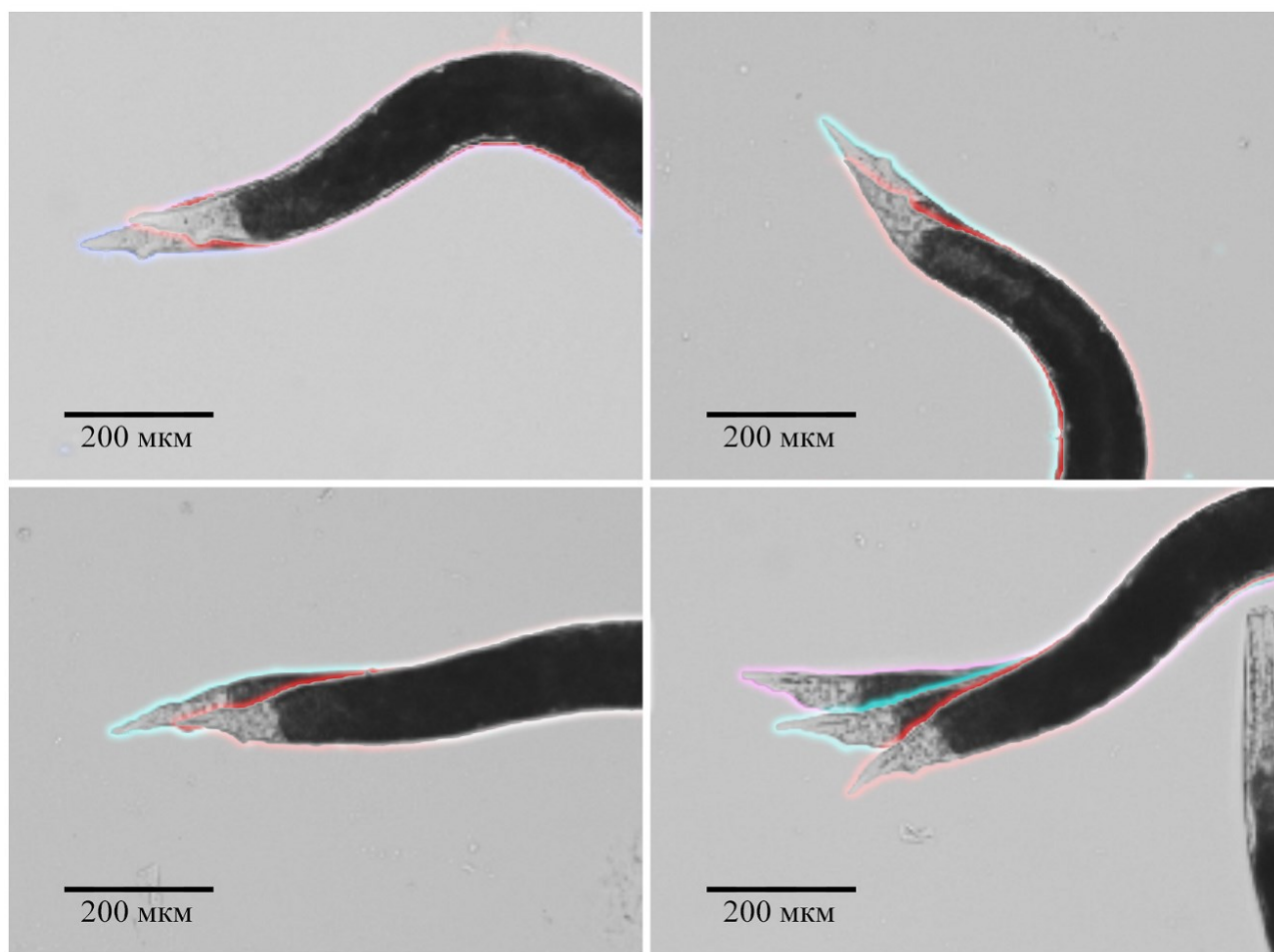


Рисунок 8 – Визуальная детекция rVoc у интактной нематоды *Heterorhabditis megidis* Каждая панель представляет собой наложение двух фотографий одного и того же животного с интервалом 6 секунд. Начальная фаза отмечена голубым цветом, а сокращение, произошедшее через 6 секунд — красным.

2. 2. Базовые характеристики ритмического изменения мембранного потенциала

В ходе исследований на *C. elegans* была продемонстрирована важная роль молекул ЦК иннексина/паннексина (INX-16) в кишечнике нематод, а также и их ключевое значение для координации ДМП *C. elegans* [26]. Нами же на нематодe *H. megidis* для определения наличия связи между клетками кишечника через

селективные межклеточные каналы было проведено исследование с использованием флуоресцентных красителей. Эти красители были введены в клетки с помощью электрофореза через микроэлектроды.

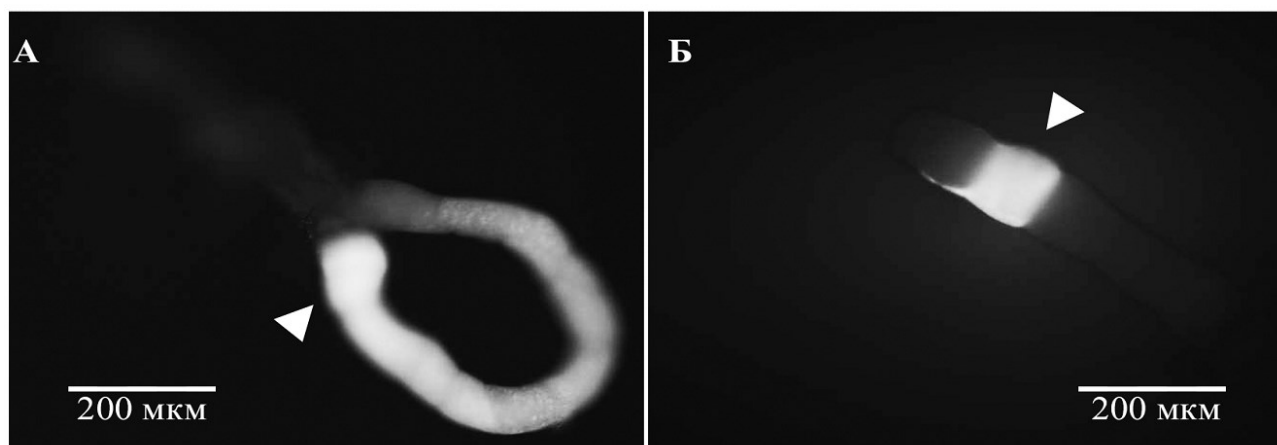


Рисунок 9 – Различия распространения флуоресцентного красителя из инъецированной клетки в препарате изолированного кишечника нематод *Heterorhabditis megidis* А. Флуоресцентный краситель люцифер желтый СН быстро диффундирует в соседние клетки (3 минуты после инъекции). Б. Флуоресцентный краситель карбоксифлуоресцеин сохраняется в одной клетке спустя длительное время (два часа после инъекции). Инъецированная клетка отмечена белой стрелкой.

Флуоресцентный краситель люцифер желтый СН диффундирует из исходно инъецированной клетки во все связанные с ней клетки в течение нескольких минут (Рисунок 9А, n=4). В то же время другой краситель – карбоксифлуоресцеин – не переходит в соседние клетки и остается исключительно в клетке, где был введен, даже спустя продолжительное время (Рисунок 9Б, n=5). Такие результаты указывают на наличие селективных межклеточных каналов между клетками кишечника. Размер данного канала достаточен для того, чтобы пропускать молекулы люцифера и недостаточен для карбоксифлуоресцеинового красителя. Таким образом было показано, что эти клетки тесно связаны между собой и образуют функциональный электрический синцитий.

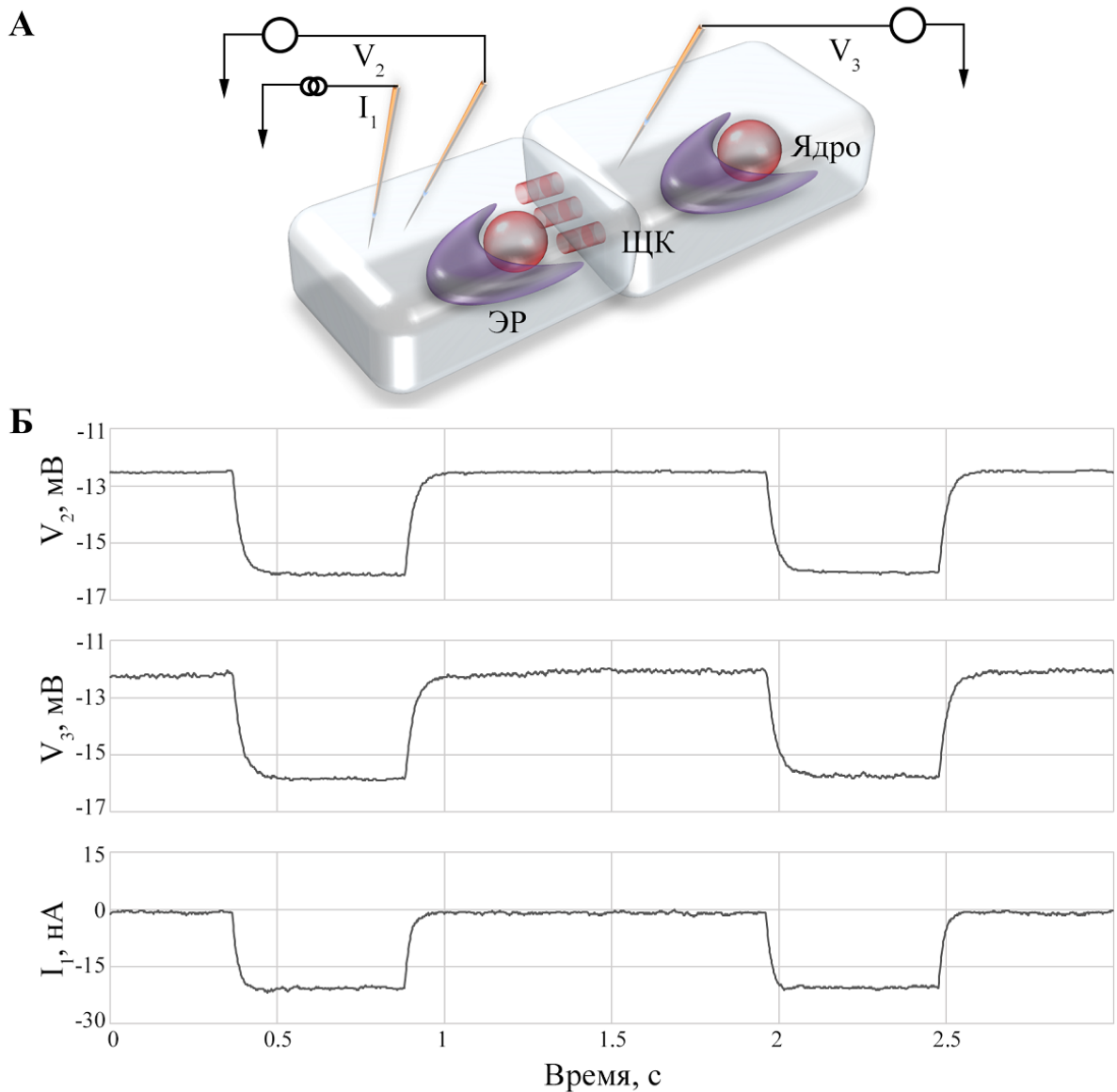


Рисунок 10 – Коэффициент связи клеток *Heterorhabditis megidis* А. Схематическое представление электрофизиологического эксперимента, в котором два микроэлектрода I_1 и V_2 помещаются в одну клетку кишечника нематоды, а микроэлектрод V_3 помещается в соседнюю клетку кишечника. В кишечных клетках отмечены ядро и эндоплазматический ретикулум (ЭР), клетки соединены щелевыми контактами (ЩК). Б. Полученные в ходе эксперимента данные с микроэлектродной установки после аналого-цифрового преобразования. Через микроэлектрод I_1 подается импульс отрицательного тока в -20 нА. В ответ происходит отклонение МП как в инъецируемой клетке ΔV_2 , так и в соседней ΔV_3 ,

регистрируемое микроэлектродами V_2 и V_3 . Коэффициент связи клеток высчитывается как отношение изменения МП соседних клеток $\Delta V_3/\Delta V_2$.

Электрофизиологические методы с использованием микроэлектродной установки позволяют детальнее изучить ШК клеток и коэффициенты связи клеток кишечника нематод. (Рисунок 10). Было обнаружено, что все клетки кишечника нематоды *H. megidis* имеют сильную электрическую связь. В частности, средний подсчитанный коэффициент связи между двумя соседними клетками составляет $0,95 \pm 0,012$ ($n = 10$). Однако коэффициент связи между более удаленными клетками уменьшается экспоненциально. Например, при расстоянии в шесть клеток, измеренный коэффициент связи составляет около 0,75. Это значение очень близко к расчетному в шестой степени $0,95^6 = 0,74$. Таким образом, наши данные подтверждают, что соседние клетки кишечника нематоды связаны между собой мощной электрической связью, которая может синхронизировать эндогенные водители ритма отдельных клеток.

В клетках кишечника нематод, которые тесно связаны электрическими контактами, наблюдается синхронизованное и периодическое изменение МП. Эти колебания можно зарегистрировать с помощью внутриклеточных микроэлектродов и подвергнуть анализу различными методами. В большинстве экспериментов колебания МП в клетках кишечника имеют амплитуду около 60 мВ и период около 5-6 минут (Рисунок 11). Максимальная зарегистрированная амплитуда наблюдаемых колебаний составила 87,5 мВ, максимальный наблюдаемый период колебаний – более 10 минут, а самый короткий период – около 2 минут. Первоначальный МП находится на уровне небольшой деполяризации в районе 10 мВ, и затем переходит в быструю гиперполяризацию, особый ПД, сменяющийся медленным возвращением к потенциалу покоя.

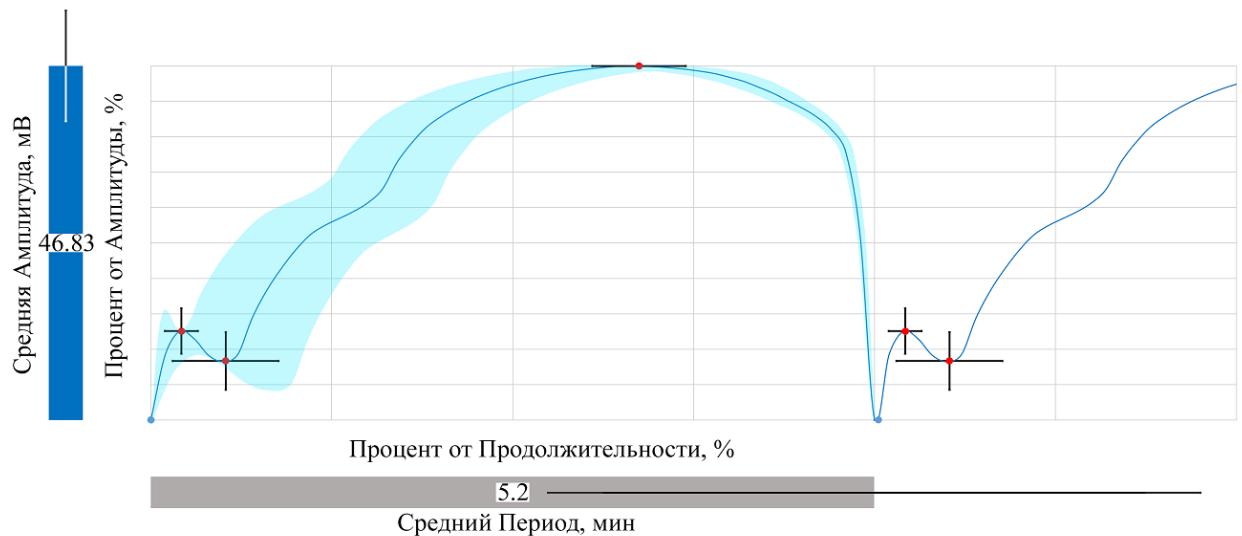


Рисунок 11 – Характер изменения мембранного потенциала, регистрируемый в клетках нематоды *Heterorhabditis megidis* Для составления сводной диаграммы были проанализированы типичные циклы колебаний из 28 экспериментов. Период и амплитуда каждого случая были нормализованы к 100% и полученные нормированные графики были подвергнуты дальнейшему статистическому анализу. Темно-синяя линия представляет собой среднее время нормализованных колебаний МП. Две синие точки обозначают нижнее значение амплитуды, которое было взято за отправную точку для каждой записи. Красные точки обозначают локальные экстремумы. Столбцы вокруг красных точек обозначают значения SD для времени и амплитуды, рассчитанные для нормализованных данных (максимальная точка была установлена как 100% для каждого эксперимента, поэтому дана только зависящая от времени характеристика SD). Голубое поле вокруг траектории показывает возможные границы вариативности изменений МП, основываясь на SD. По осям расположены два столбца с реальными (ненормализованными) значениями. Синяя полоса — среднее значение со среднеквадратичным отклонением (SD) для амплитуды и равное 46,8 (7,3) мВ, серая полоса — среднее значение со среднеквадратичным отклонением (SD) для периода колебаний мембраны и равное 5,3 (2,4) мин.

2. 3. Проводимость клеточной мембраны. Суперпозиция работы нескольких ионных каналов

Для более детального изучения процесса ритмической генерации ДМП нами было проведено измерение проводимости клеточной мембраны (g), что представляет собой величину, обратную сопротивлению. Всего было проведено 14 измерений проводимости мембраны на разных особях с использованием препарата изолированного кишечника. Анализируя изменения МП и проводимости, а также зависимости $V(t)$, $g(t)$ и $g(V)$, в цикле ДМП нами было выделено шесть фаз (1-6) (Рисунок 12АБВ). Каждая фаза определяется временем между двумя экстремальными значениями изменения МП или ее проводимости. Так как рост проводимости сопровождается как гиперполяризацией, так и деполяризацией в разных этапах цикла, для создания полного фазового портрета периодических изменений параметров клеток кишечника (кривая $g(V)$) необходимы по крайней мере два различных типа ионных каналов (Рисунок 12А).

Исходя из наблюдения о наличии как минимум двух типов ионных каналов для оценки простейшей модели исследуемого процесса регистрируемая мембранная проводимость (g_r) была разделена на два компонента. Первый компонент (g_a) связан с ионами, концентрация которых снаружи клетки значительно превышает внутриклеточную (вероятно, это Na^+ или Ca^{2+}). Вторым компонентом (g_b) связан с ионами, для которых внутриклеточная концентрация превосходит внеклеточную (предположительно, K^+).

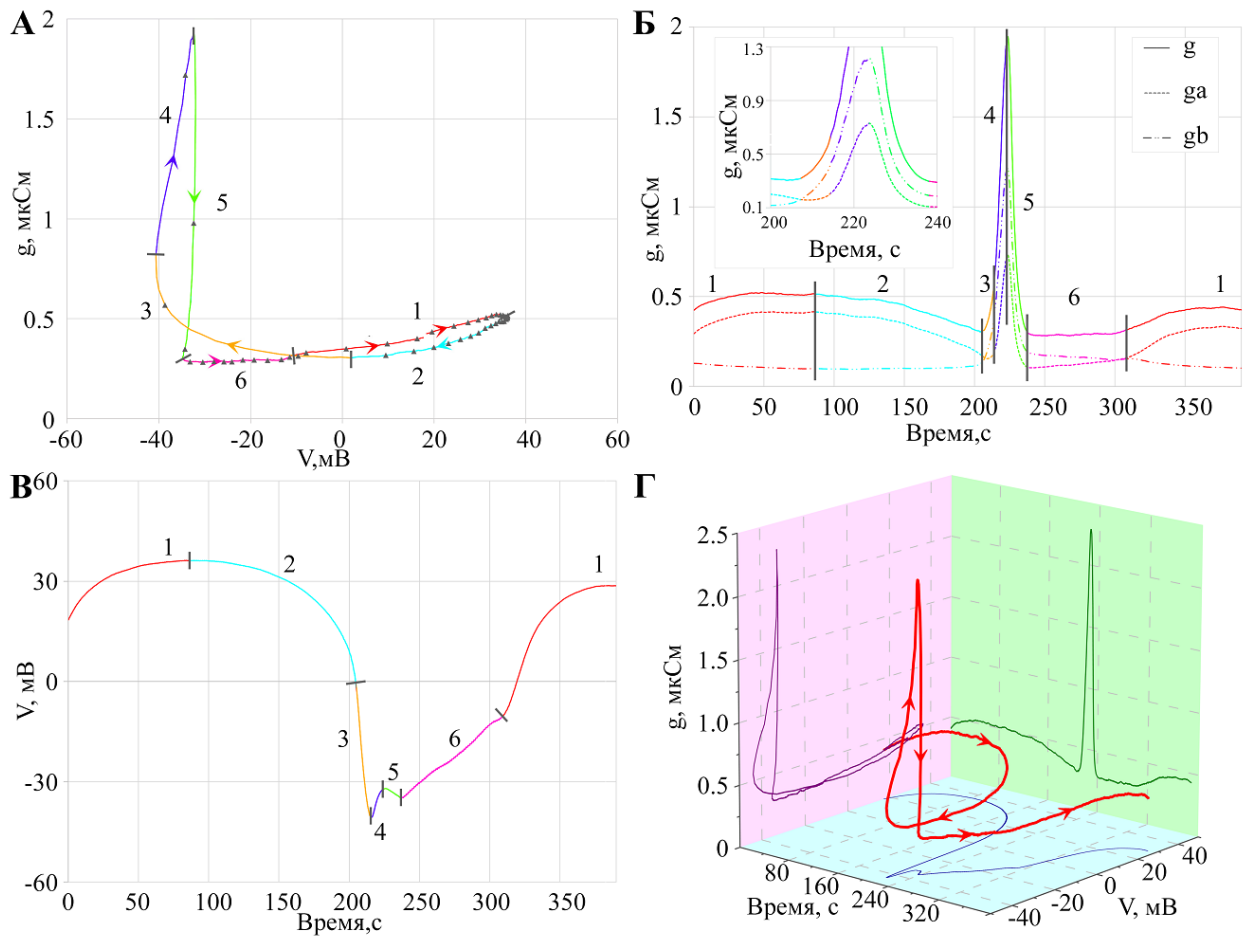


Рисунок 12 – Изменение мембранного потенциала клеток кишечника (V) и проводимости (g) с течением времени (t) в ходе одного цикла ДМП нематоды *Heterorhabditis megidis* Графики АБВ разделены на 6 фаз, различающихся суперпозицией изменений $V(t)$ и $g(t)$. А. График функции $g(V)$. Координаты функции, устанавливаются каждые 7 секунд и обозначены треугольниками. Стрелками показано направление хода времени во время изменений функции $g(V)$. Б. График функции $g(t)$. Полная проводимость мембраны g (сплошная линия) равная суперпозиции двух компонент g_a (пунктирная линия) и g_b (штрихпунктирная линия) в соответствии с моделью, изложенной в тексте. Подробные изменения $g(t)$ в фазах 3-5 показаны во вставке. В. График функции $V(t)$. Г. Трехмерное представление траектории изменения параметров g , V , t в ходе одного цикла ДМП (красная линия). На проекциях представлены графики функций: $g(V)$ – пурпурный, $g(t)$ – зеленый и $V(t)$ – синий. Стрелками показано направление хода времени.

2. 4. Модель изменений мембранного потенциала в ходе дефекационной моторной программы нематод. Нарушения работы системы в специфических типах препаратов

Модель не учитывает емкостные характеристики мембраны как конденсатора, а также изначально не рассматривает токи, возникающие при переносе ионов через транспортеры, так как предположительно они имеют минимальное воздействие на окончательную модель. Потенциалы реверсии для двух компонентов g_a и g_b были произвольно установлены как $V_a = +70$ мВ и $V_b = -100$ мВ, что, предположительно, соответствует потенциалам реверсии для Na^+ и K^+ соответственно.

Принимая во внимание, что проводимость аддитивна (1), токи для разнонаправленных иона равны в состоянии покоя (2), а результирующий МП определяется суперпозицией потенциала реверсии и изменения МП из-за ионных токов для каждого типа иона (3), можно утверждать, что общий МП V_r может быть рассчитан по формуле (4). Следуя из этого и уравнения (3), мы можем выразить g_a и g_b как (5) и (6) соответственно.

$$g_r = g_a + g_b, \quad (1)$$

$$-I_a = I_b, \quad (2)$$

$$V_r = V_x + \frac{I_x}{g_x}, \quad (3)$$

$$V_r = \frac{V_a g_a + V_b g_b}{g_a + g_b}, \quad (4)$$

$$g_a = \frac{(V_r - V_b) g_r}{V_a - V_b}, \quad (5)$$

$$g_b = \frac{(V_r - V_a) g_r}{V_b - V_a}. \quad (6)$$

Анализируя данные, изложенные на графиках рисунка 12 (рисунки А, Б, В), можно сделать следующие выводы: медленное деполяризационное плато (фазы 1 и 2) формируется преимущественно одним типом каналов с проводимостью g_a , в то время как более короткий гиперполяризующий этап (фазы 3-6) формируется благодаря суперпозиции g_a и g_b .

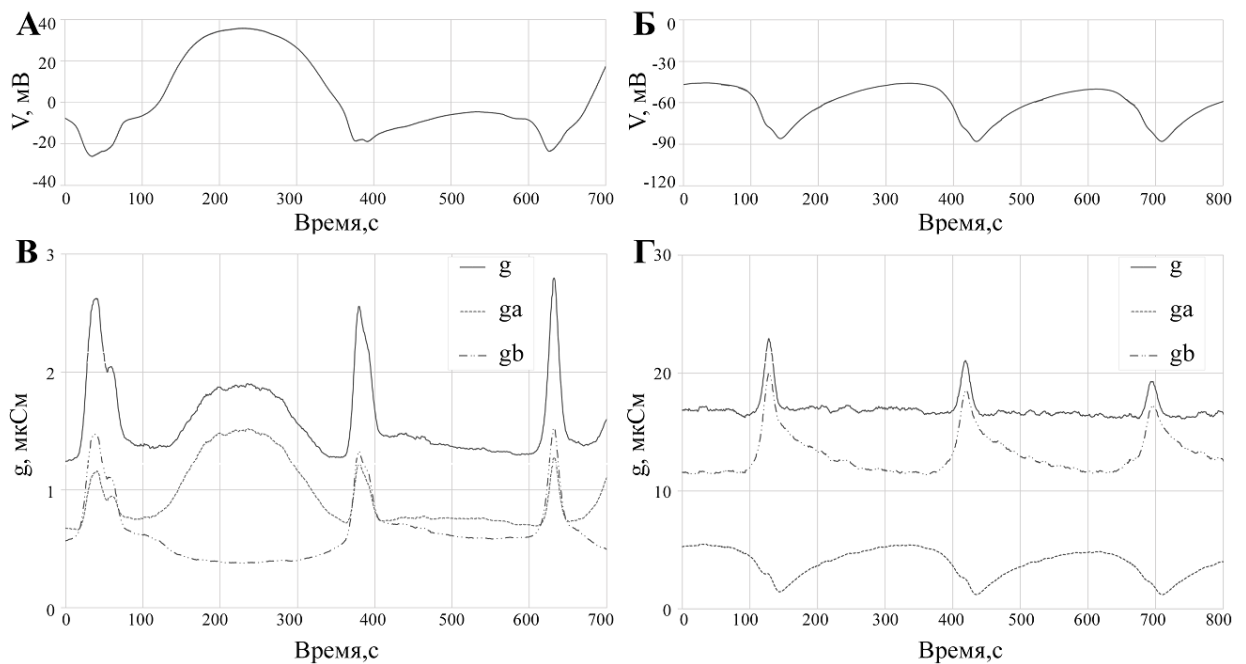


Рисунок 13 – Нетипичный ход изменений мембранного потенциала в ходе дефекационной моторной программы нематоды *Heterorhabditis megidis* А. В. Модификация хода деполяризующей фазы во втором цикле осцилляций, вызванная отсутствием изменений проводимости g_{a1} . Б. Д. Длительное отсутствие второго пика изменения МП, связанного, по-видимому, с работой каналов с проводимостью g_{a2} . На рисунках В и Г проводимость мембраны (сплошная линия) разделена на компоненты g_a (пунктирная линия) и g_b (штрихпунктирная линия) в соответствии с описываемой моделью.

Рассмотрим детальнее характер функций $g_b(t)$ и $g_a(t)$. Форма функции $g_b(t)$ проста и характеризуется наличием одного пика, в то время как $g_a(t)$ имеет более

сложный профиль с двумя пиками (Рисунок 12Б). Такая сложная форма функции $g_a(t)$ может быть объяснена комбинированным влиянием двух различных типов ионных каналов с проводимостями g_{a1} и g_{a2} . Эта теория находит подтверждение при анализе специфических случаев электрофизиологических записей, имеющих нетипичный ход изменений МП с отсутствием компонента с проводимостью g_{a1} или g_{a2} (Рисунок 13). На рисунках 13А и 13В видно, что деполяризирующее плато, связанное с g_{a1} , отсутствует во втором цикле, в то время как все этапы гиперполяризации не отличаются от нормы. В другом примере (рисунки 6Б и 6Д) присутствует лишь деполяризирующее плато g_{a1} , в то время как пик g_{a2} не наблюдается.

2. 5. Автономность и синхронность генерации ритмических процессов

Хотя кишечник нематоды сама по себе не содержит нейронных или мышечных клеток, генерация ритма изменения МП, все же находится внутри клеток кишечника. Интересно, что некоторые внешние стимулы, такие как наличие пищи или линька, могут влиять на процесс дефекации [22]. Кроме того, обнаружено, что механическое воздействие, например, легкое прикосновение, может сбросить фазу дефекации [23]. Влияние нервной системы в регулировании этого процесса крайне ограничено. Это было продемонстрировано с помощью лазерной микроручековой абляции, где было показано, что удаление только одного конкретного нейрона влияло на ход ДМП [39].

Из литературных данных известно, что для *C. elegans* ритм инициированный ЦГП, возникает благодаря внутренним/эндогенным свойствам отдельных клеток. Результаты исследований указывают на то, что клетки кишечника могут демонстрировать ритмическую активность даже с нарушенной работой ШЖ. для *C. elegans* этот факт подтверждается исследованиями, где были зафиксированы

осцилляции концентрации кальция в культуре отдельных эмбриональных клеток кишечника нематоды [122].

Данные, полученные нами в электрофизиологических экспериментах для нематоды *H. megidis* схожи. В результате экспериментов было показано, что разные участки изолированного кишечника, в том числе и фрагменты из 3-8 клеток, показывают активность, схожую с активностью целого кишечника. В большинстве экспериментов на *C. elegans*, представленных в литературе для мониторинга периодичности ДМП использовались Ca^{2+} волны в качестве индикатора. Однако, из-за сильной автофлуоресценции *H. megidis*, нам не удалось визуализировать Ca^{2+} , и, следовательно, определить наличие осцилляций Ca^{2+} у этого вида.

Известно, что для сложного ритмического процесса для нематоды *C. elegans* межклеточные ЩК, состоящие из белков семейства иннексинов/паннексинов, играют ключевую роль в синхронизации активности клеток кишечника. Подобное утверждение поддерживается как нашими физиологическими экспериментами с использованием флуоресцентных красителей, так и данными регистрации сильной электрической связи между клетками на *H. megidis*.

Дополнительной интересной особенностью является зависимость клеток кишечника от изменений МП. В исследованиях, описанных в литературе для *C. elegans* было замечено, что кальциевые сигналы почти одновременно инициируются в задней и передней частях кишечника. Этот краткий временной интервал исключает возможность распространения химического сигнала, такого как IP_3 , от одного конца к другому. А наблюдаемое нами синхронное изменение МП подтверждает гипотезу о том, что изменение МП в одной клетке может стимулировать активность соседней клетки через прямую электрическую связь, минуя механизмы диффузии сигнальных молекул (например, IP_3 или Ca^{2+}).

И хотя эндодерма обычно не классифицируется как возбудимая ткань, наблюдаемые электрические волны в кишечнике нематод напоминают ПД в возбудимых клетках. На Рисунке 14 приведено схематичное сравнение между

распространением изменений МП в кишечнике нематод и аналогичным процессом в цепочке клеток возбудимых тканей, таких как клетки сердца или аксон аннелиды.

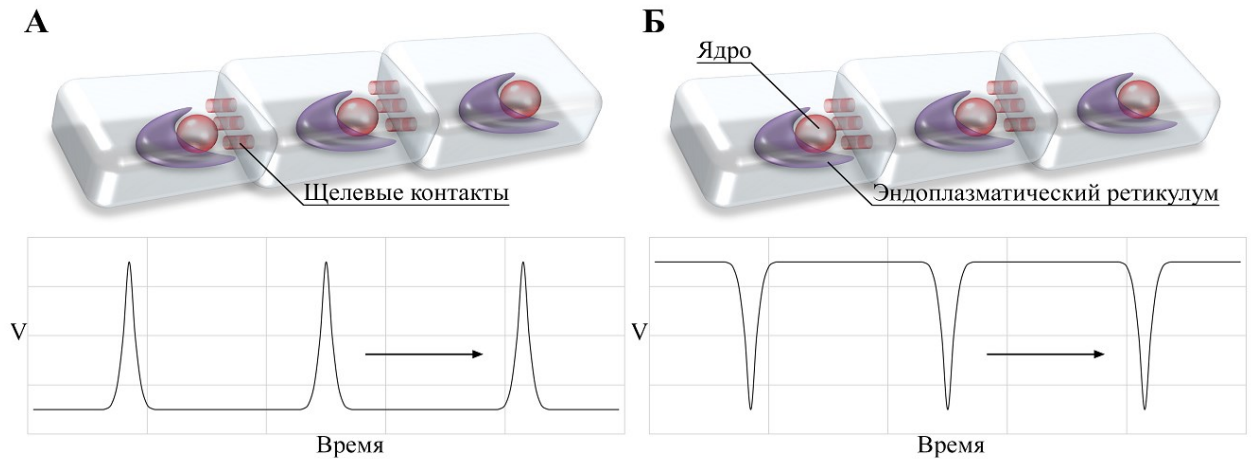


Рисунок 14 – Сходство изменений мембранного потенциала в клетках кишечника нематоды и классических возбудимых тканях А. В классических нервной и мышечной тканях всплеск деполяризации может распространяться по цепочке возбудимых клеток, соединенных через ЩК. Б. В системе клеток кишечника нематоды *H. megidis* наблюдается аналогичное изменение МП, обратное по знаку к классическому ПД. Такой ГПД также распространяется по цепочке клеток, соединенных через ЩК.

ГЛАВА 3. МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА В ХОДЕ ДЕФЕКАЦИОННОЙ МОТОРНОЙ ПРОГРАММЫ НЕМАТОДЫ *HETERORHABDITIS MEGIDIS*

3. 1. Потенциал зависимый механизм. Возможность ускорения и замедления периодических осцилляций изменения мембранного потенциала. Перезапуск ритма

Детальное рассмотрение влияния длительной и краткосрочной деполяризации и гиперполяризации клеток кишечника нематоды на наблюдаемую ритмическую активность показывает зависимость скорости генерации ритма и начального уровня МП. Продолжительная небольшая искусственная деполяризация клеток кишечника нематоды замедляет ритм изменений МП, увеличивая длительность периода колебаний. И, напротив, продолжительная небольшая искусственная гиперполяризация ускоряет генерацию ритма, создавая более интенсивную активность и сокращая период колебаний (Рисунок 6ЖЗ).

В ходе исследования возможности перезапуска ритма было обнаружено, что короткий, но интенсивный гиперполяризационный импульс силой около -80 нА, и длительностью 4 секунды может вызвать ГПД «все или ничего» в клетках кишечника нематоды *H. megidis*. Таким образом, не в фазу, искусственно, при помощи гиперполяризационного импульса можно досрочно «перезапустить» ритмические изменения МП. Однако, аналогичный импульс деполяризационного тока силой примерно в $+80$ нА и продолжительностью в 4 сек не оказывает никакого влияния на период ритмических изменений МП. Это указывает на вовлеченность в процесс генерации ритма потенциал зависимых механизмов и асимметрию реакции клеток кишечника нематоды на воздействие разных типов импульсов.

Подобная электрическая активность, регистрируемая в клетках кишечника нематоды, имеет схожесть с механизмами генерации ПД в классических возбудимых тканях, таких как нейроны или миоциты. К примеру, в обычных возбудимых тканях активация ПД происходит только после достижения МП определенного порогового значения, а продолжающаяся цепочка спайков определяется уровнем МП и может быть инициирована искусственно при подаче тока через микроэлектрод.

Таким образом, аналогично возбудимым тканям, генерация спайков происходит и в кишечнике *H. megidis*, но несмотря на общую схожесть механизмов, особенностью является обратная полярность как потенциала, так и тока. Описанные свойства отражают как схожесть, так уникальность наблюдаемой электрической активности в этих организмах по сравнению с более изученными системами.

На основе представленных данных можно сделать вывод о том, что ритмическая генерация изменений МП в клетках кишечника нематоды *H. megidis* формируется благодаря координации действия потенциал-зависимых ионных каналов.

3. 2. Внутриклеточный молекулярный механизм. Система фиксации потенциала. Сохранение ритмической активности

В условиях экспериментов с двухэлектродной фиксацией потенциала на изолированных клетках кишечника, осцилляции тока продолжают при стабильном заданном МП. Это указывает на то, что периодические изменения, наблюдаемые в экспериментах, не обусловлены исключительно активностью потенциал-зависимых ионных каналов.

Учитывая эти результаты, представляется вероятным наличие двух различных механизмов водителя ритма, регулирующих как ритмическое изменение МП, так и ДМП в целом. Первый из них, как было отмечено, связан с потенциал-зависимыми ионными каналами, присутствующими на плазматической мембране. Второй же, предположительно, основан на работе внутриклеточных молекулярных механизмов, которые также играют немаловажную роль в формировании электрической активности клетки.

3. 3. Возможные модели зависимости изменения мембранного потенциала от изменения концентрации Ca^{2+} в возбудимых клетках

Высвобождение кальция из ЭПР посредством инозитол 1,4,5-трисфосфата и его рецептора *itr-1* играет ключевую роль в механизме генерации Ca^{2+} осцилляций в клетках кишечника нематоды *C. elegans*. Это подтверждается большим количеством исследований. Так, например, мутанты *itr-1* проявляют удлиненные циклы дефекации или вовсе их отсутствие. Тем временем, сверхэкспрессия этого гена ускоряет циклы дефекации и сокращает их продолжительность.

Описанные ранее периодические изменения силы тока в ходе ДМП в экспериментах при фиксированном мембранном потенциале на нематоды *H. megidis* также подчеркивают важность IP_3 сигнализации в управлении генерации ритма в клетках кишечника данной нематоды. Не исключено, что зарегистрированные Ca^{2+} осцилляции преимущественно зависят только от внутриклеточного IP_3 -индуцированного механизма, циклично осуществляющего высвобождение кальция из ЭПР и его последующую реабсорбцию, и не имеют никакого воздействия на изменение уровня МП (Рисунок 15А). Однако рассмотрим и иные случаи, когда изменение внутриклеточных концентраций кальция приводит к изменению МП клетки.

Первым механизмом, обуславливающим изменение МП в зависимости от изменения концентрации Ca^{2+} в возбудимых клетках, является деполяризационный спайк. Его действие основывается на работе потенциал-зависимых каналов, способных индуцировать ПД, называемые спайками. В нормальных условиях, базовый МП клетки находится на отрицательном уровне, а переходные Na^+ и/или Ca^{2+} токи приводят к кратковременной деполяризации мембраны, инициируя колебания МП и вызывая Ca^{2+} волны (Рисунок 15Б).

Вторым механизмом, обуславливающим изменение МП в зависимости от изменения концентрации Ca^{2+} в возбудимых клетках, является гиперполяризационный спайк или ГПД. ГПД представляет собой особый электрофизиологический феномен, представленный в клетках кишечника нематоды *H. megidis*, который, фактически, является «зеркальным» отображением стандартных спайков, характерных для нейронов и миоцитов. Как уже отмечалось, МП в ходе данного процесса переходит от базового деполяризованного состояния к кратковременной сильной гиперполяризации (Рисунок 15В). Частота возникновения подобных гиперполяризационных изменений МП обычно коррелируют с базовым МП, и, как и в случае с обычными спайками, их можно инициировать короткими и сильными электрическими стимулами. Вероятно, механизм связан с работой K^+ каналов, так открытие K^+ каналов, способно вызвать быстрый вывод калия из клетки приводя к уменьшению внутриклеточного положительного заряда и, следовательно, к гиперполяризации мембраны. Параллельно этому, за счет возникающего электрического градиента, Ca^{2+} активно проникает в клетку через специализированные каналы утечки. Этот процесс можно аллегорически описать фразой: «ветер дует потому, что деревья качаются», подразумевая, что причина и следствие в этом механизме меняются местами.

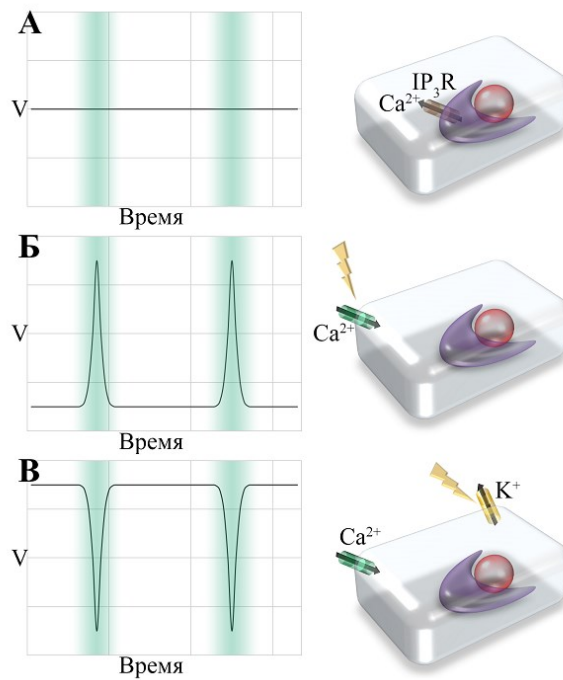


Рисунок 15 – Вариации механизма изменения мембранного потенциала клеток кишечника нематоды синхронизованного с Ca^{2+} волнами На графиках (слева) отмечен МП $V(t)$ и повышение концентрации Ca^{2+} в клетке (циановая полоса) для трех теоретических механизмов (справа). А. IP_3R зависимое высвобождение Ca^{2+} из ЭПР. Увеличение концентрации Ca^{2+} за счет внутриклеточных запасов не имеет существенного влияния на МП. Б. Потенциал зависимый механизм возникновения Ca^{2+} волны. Открытие потенциал зависимых Ca^{2+} каналов приводит к деполяризации мембраны клетки. В. Механизм, основанный на свойствах каналов утечки. Открытие потенциал зависимых K^+ каналов приводит к гиперполяризации мембраны клетки, а по каналам утечки из-за возникшей разницы потенциала происходит вход ионов Ca^{2+} .

3. 4. Моделирование процесса на основе изменения мембранного потенциала и проводимости

Электрофизиологические исследования нематоды *H. megidis* показали, что её кишечные клетки генерируют ГПД. При этом наблюдаемый ГПД действует

аналогично ПД возбудимых тканей, таких как нейроны и миоциты, но с обратной полярностью. Вероятно, формирование ритмических изменений МП связано с активностью специфических ионных каналов.

ГПД представляет собой уникальный механизм клеточной возбудимости, отличающийся от классического, деполяризующего спайка. Мы предполагаем, что ГПД создается благодаря специфическим потенциал-зависимым ионным каналам в плазматической мембране клетки, и что для исследуемого процесса изменения МП у нематод, все три описываемые ранее модели зависимости изменения МП от изменения концентрации Ca^{2+} в возбудимых клетках, имеют определенный вклад и взаимодействуют между собой. Собирая и анализируя все полученные ранее данные изменения МП и проводимости была создана простейшая модель исследуемой системы, состоящей из трех типов ионных каналов плазматической мембраны с проводимостями g_{a1} , g_{a2} и g_b (Рисунок 16).

Можно предположить, что каналы с проводимостью g_{a1} , соответствуют Na^+ или иным, схожим по электрофизиологическим параметрам ионным каналам. На Рисунок 16А проводимость канала (зеленым) моделируется в соответствии с экспериментальными данными, что позволяет получить рассчитанное значение МП (синим). Второй тип каналов, с проводимостью g_b , вероятно, является K^+ или иным, схожим по электрофизиологическим параметрам типом ионных каналов. Для него смоделированная зависимость проводимости от времени согласно экспериментальным данным представлена на Рисунке 16Б зеленым, а соответствующая высчитанная кривая потенциала синим. Интересно отметить, что суперпозиция $g(t)$ всего двух типов каналов с проводимостями g_{a1} и g_b на высчитываемой кривой изменения МП уже дает приближенное к реальности представление о $V(t)$, как показано на Рисунке 16В. Каналы с проводимостью g_{a2} , предположительно, ассоциированные с Ca^{2+} или аналогичными каналами отвечают за кратковременное увеличение концентрации Ca^{2+} во время резкой сильной гиперполяризации или ГПД. Суперпозиция всех трех проводимостей g_{a1} , g_{a2} , g_b и рассчитанный МП схожи (Рисунок 16Д) на паттерн реальной записи (вставки на

Рисунке 16Д), включая даже такие детали, как небольшой деполяризационный пик 4-5 фазы исследуемого процесса.

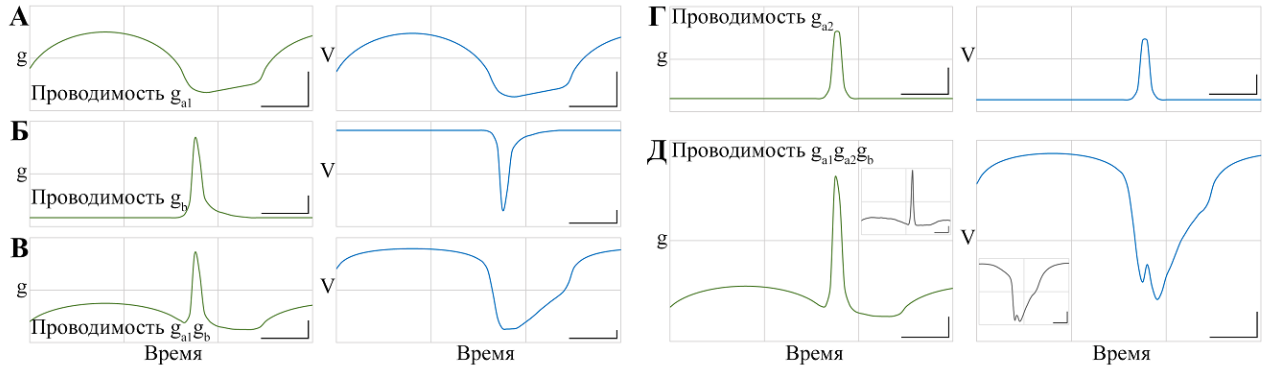


Рисунок 16 – Модель суперпозиции трех ионных каналов, обуславливающих наблюдаемые изменения мембранного потенциала в клетках кишечника нематоды *Heterorhabditis megidis* Полтора цикла изменений проводимости $g(t)$ в ходе ДМП обозначены зеленым цветом, а результирующие изменения МП $V(t)$, высчитанные согласно формулам (4)-(6) и закону Ома синим. Калибровка на каждом графике составляет 10 сек; 0,2 мкС (для проводимости); 15 мВ (для МП). А. Смоделированная на основе данных нетипичного хода ДМП изменения проводимости ионного канала g_{a1} и вызванные этим осцилляции МП. Б. Аналогичная модель для проводимости g_b . В. Суммарное изменение проводимости и МП для клетки с двумя типами ионных каналов g_{a1} и g_b . Г. Простейшее изменение проводимости при открытии канала g_{a2} и высчитанное на основе этих данных значение изменения потенциала. Д. Суперпозиция изменения проводимости от трех типов ионных каналов g_{a1} , g_{a2} , g_b и МП, Полученный результат моделирования близок к реальным экспериментальным данным, представленным в микровставках.

ГЛАВА 4. ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ УЧАСТНИКИ ДЕФЕКАЦИОННОЙ МОТОРНОЙ ПРОГРАММЫ

4. 1. Тканеспецифичный профиль экспрессии ионных каналов

Предсказанные ранее в модели каналы с проводимостями g_{a1} , g_{a2} и g_b , возможно, являются гомологами уже известных Na^+ , Ca^{2+} и K^+ каналов, описанных для *C. elegans*. Так, например, существует исследование, которое демонстрирует влияние Na^+ канала на ДМП у *C. elegans* и мутации по гену *flr-1* приводят к коротким и нестабильным периодам дефекации. Этот ген экспрессируется в клетках кишечника и кодирует ионный канал из семейства дегенериновых (DEG) амилорид-чувствительных эпителиальных натриевых каналов. Подобный Na^+ канал мог бы являться тем самым ионным каналом с проводимостью g_{a1} .

Потенциал-зависимые K^+ каналы, играющие ключевую роль в гиперполяризации, хорошо изучены у различных организмов, включая нематод. В контексте ГПД, потенциал-зависимый K^+ канал можно рассматривать как аналог Na^+ или Ca^{2+} потенциал-зависимых каналов, ведущих к формированию обычных спайков в обычных нейронах или миоцитах. Среди многочисленных K^+ каналов *C. elegans*, каналы KQT (*kqt-2* и *kqt-3*) были показаны в литературе как участники ДМП нематоды. В качестве альтернативного механизма генерации ГПД можно рассмотреть кальций-зависимые калиевые (КСа) каналы или их аналоги. Предполагается, что приток Ca^{2+} в цитоплазму, вызванный естественной или искусственной гиперполяризацией, может активировать подобные каналы в режиме положительной обратной связи. Так, несколько Ca^{2+} селективных ионных каналов, участвующих в ДМП нематоды *C. elegans*, принадлежат к семейству TRPM-каналов: *gtl-1*, *gtl-2* и *gon-2*.

За десятилетия исследований *C. elegans* было выявлено и охарактеризовано множество генов, потенциально вовлеченных в ДМП нематод. Современные

данные секвенирования РНК ОК позволяют детальнее изучить паттерны генной экспрессии в различных клетках и тканях, включая кишечник. Некоторые гены активно экспрессируются только в определенных тканях, что, возможно, отражает их специфические функции. Учитывая особенности электрической активности клеток кишечника, мы предполагаем, что они содержат уникальный комплекс генов, регулирующих колебания МП, отличный от других клеток. Поиск потенциальных участников данного процесса сочетает электрофизиологические данные с данными секвенирования РНК ОК *C. elegans*, доступными в открытом доступе.

Нами был проанализирован уровень экспрессии определённого набора ионных каналов *C. elegans* в различных тканях нематод, включая возбудимые и невозбудимые. Исходя из уникальности электрофизиологических свойств энтероцитов нематод, этот анализ позволяет нам отфильтровать потенциальных кандидатов, участвующих как в ДМП, так и в генерации ГПД. Для предварительного отбора использовались данные с сайта WormBase (URL: <https://wormbase.org/>) и детальные обзоры с wormbook [63, 64, 123].

На основе данных секвенирования РНК ОК, были составлены кластерная карта с дендрограммой и UMAP. Исследование охватывает два набора данных. 20271 ген или полный набор и 222 гена мембранных белков. Эти данные иллюстрируют функциональную кластеризацию генов мембранных белков *C. elegans* по разным типам тканей, подчеркивая, что большинство из них тканеспецифичны (Рисунок 17). Это особенно заметно в нейронах и клетках кишечника, где спектр экспрессии мембранных белков существенно отличается от других тканей нематод. Таким образом путём сравнения электрофизиологических данных и данных экспрессии генов, связанных с мембранными белками, в различных тканях нематод, был выявлен уникальный профиль экспрессии мембранных белков в кишечных клетках нематоды, который отличается от других тканей, что сильно сужает поиск потенциальных кандидатов.

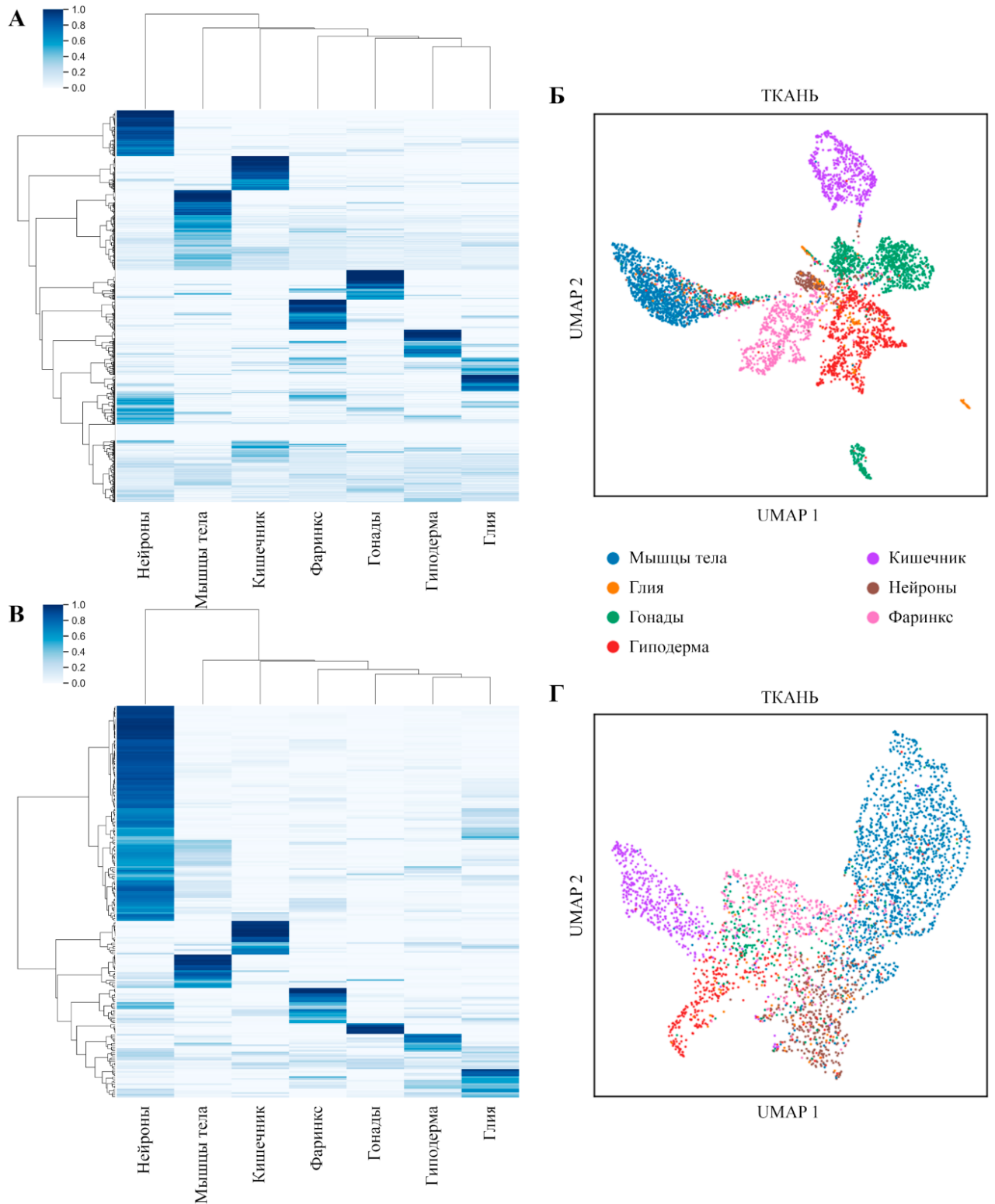


Рисунок 17 – Схожесть и различия тканеспецифичной дифференциальной экспрессия генов нематоды *Caenorhabditis elegans*
 Кластерная карта с дендрограммой (А, В) и метод уменьшения размерности UMAP [124] (Б, Г) для данных секвенирования РНК ОК об экспрессии всех генов *C. elegans* (А, Б) и только мембранных белков (В, Г). Таблицы UMI на клетку и

экспрессии генов на ткань были взяты из [28]. Аннотация от клетки к ткани была получена из исходного набора данных. При построении кластерная карта с дендрограммой А, В для каждого гена было рассчитано соотношение экспрессии гена в специфичной ткани к общей экспрессии этого гена. (Значение экспрессии для каждого гена в каждой ткани делили на сумму всех значений экспрессии гена для каждой ткани). Значения варьируются от 0 до 1, сумма для каждого гена равна 1. Данные сгруппированы с помощью метода Уорда [125]. Гены с высокой мультитканевой экспрессией практически не наблюдаются. Б. UMAP сгенерированный на основе данных об экспрессии всех генов, образует очевидные кластеры. Д. Аналогичный UMAP, сгенерированный на основе данных об экспрессии 222 мембранных белков дифференцирован в меньшей степени, но клетки кишечной ткани демонстрируют результаты, аналогичные результатам UMAP по экспрессии всех генов. Выбранный набор генов мембранных белков каналов также является тканеспецифичным. Для построения UMAP в обоих случаях использовались первые шесть главных компонентов анализируемого пространства; количество соседей для каждой точки в расчетах установлено равным 15. Анализ был проведен с помощью библиотек SCANPY и SEABORN [126] для Python 3.

Набор генов мембранных белков состоит из 222 генов: *cca-1, ccb-1, ccb-2, egl-19, itr-1, nca-2, orai-1, stim-1, tag-180, unc-2, unc-36, unc-68, unc-77, che-6, cng-1, cng-2, cng-3, tax-2, tax-4, acc-1, acc-2, acc-3, acc-4, avr-14, avr-15, exp-1, gab-1, ggr-1, ggr-2, ggr-3, glc-1, glc-2, glc-3, glc-4, lgc-32, lgc-33, lgc-34, lgc-35, lgc-36, lgc-37, lgc-38, lgc-39, lgc-40, lgc-41, lgc-42, lgc-43, lgc-44, lgc-45, lgc-46, lgc-47, lgc-48, lgc-49, lgc-50, lgc-51, lgc-52, lgc-53, lgc-54, lgc-55, mod-1, unc-49, C08B6.5, F59E12.8, glr-1, glr-2, glr-3, glr-4, glr-5, glr-6, glr-7, glr-8, nmr-1, T25E4.2, W02A2.5, ZK867.2, kqt-2, twk-26, twk-37, kqt-3, twk-33, twk-45, twk-28, twk-46, irk-2, twk-20, slo-2, kcnl-3, twk-47, twk-3, twk-31, twk-40, twk-7, twk-34, kcnl-2, egl-2, twk-9, twk-24, twk-14, twk-29, unc-58, twk-8, twk-42, twk-12, kqt-1, twk-48, kvs-4, twk-11, twk-13, irk-3, twk-30, egl-36, twk-35, twk-18, twk-16, twk-25, twk-21, twk-2, kcnl-1, kvs-5, unc-103, kvs-1, twk-43, egl-23,*

twk-32, twk-1, twk-10, shk-1, shw-1, slo-1, twk-49, exp-2, irk-1, kcnl-4, kvs-3, shl-1, shw-3, sup-9, twk-17, twk-22, twk-23, twk-36, twk-39, twk-4, twk-44, twk-5, twk-6, acd-1, acd-2, acd-3, acd-4, acd-5, asic-1, asic-2, deg-1, degt-1, del-1, del-10, del-2, del-3, del-4, del-5, del-6, del-7, del-8, del-9, delm-1, delm-2, egas-1, egas-2, egas-3, egas-4, flr-1, mec-10, mec-4, unc-105, unc-8, pezo-1, cup-5, ced-11, gon-2, gtl-1, gtl-2, lov-1, ocr-1, ocr-2, ocr-3, ocr-4, osm-9, pkd-2, spe-41, trp-1, trp-2, trp-4, trpa-1, trpa-2, trpl-2, trpl-3, trpl-4, trpl-5, eat-5, inx-1, inx-10, inx-11, inx-12, inx-13, inx-14, inx-15, inx-16, inx-17, inx-18, inx-19, inx-2, inx-20, inx-21, inx-22, inx-3, inx-5, inx-6, inx-7, inx-8, inx-9, unc-7 and unc-9

4. 2. Деполяризующие ионные каналы нематоды *ga1* и *ga2*, потенциально вовлечённые в генерацию ритмических изменений мембранного потенциала

Деполяризующий ионный канал с проводимостью g_{a1} мог бы являться Na^+ ионным каналом. Большинство животных используют потенциал-зависимые натриевые каналы (VGSC) в качестве основных каналов, ответственных за генерацию классических ПД. Однако нематоды являются исключением, и их геномы не кодируют VGSC [61].

В простейшей модели генерации ГПД у *H. megidis* проводимость g_{a1} отдана Na^+ потенциал-зависимым каналам плазматической мембраны. Ввиду отсутствия таковых каналов в геноме нематоды суперсемейство ионных каналов DEGenerin/Epithelial Na^+ Channels/Acid-sensing, включающее 30 генов в геноме *C. elegans* [63] предлагается возможной альтернативой, обладающей характеристиками натриевых каналов. Эти каналы являются тримерными каналами, имеющими субъединицы с двумя трансмембранными спиралями и внеклеточной петлей. Амино- и карбокси-концы этих каналов находятся в цитозоле. Данные секвенирования РНК ОК показали, что пять генов из этого семейства, включая *acd-5, flr-1, del-5, acd-1* и *acd-2*, экспрессируются в клетках

кишечника значительно сильнее по сравнению с другими тканями) (Рисунок 18А). Согласно базе данных WormBase (URL: <https://wormbase.org>), фенотипы мутантов *acd-5*, *del-5*, *acd-1* и *acd-2* не влияют на функциональность клеток кишечника. В то же время, мутанты с потерей функции *flr-1* показывают сокращенные периоды цикла дефекации и одновременно низкую эффективность этого процесса, что может привести к формированию фенотипа запора [127, 128]. Интересно, что мутанты, у которых удален С-концевой внутриклеточный хвост белка FLR-1, имеют удлиненные периоды дефекации. Поскольку мутанты *flr-1* демонстрируют короткие периоды цикла дефекации (loss-of-function), то удаление регуляторной С-концевой внутриклеточной области может иметь эффект gain-of-function для ионного канала FLR-1 [129]. Несмотря на все эти данные, электрофизиологические механизмы, стоящие за этими мутациями, пока еще не изучены.

Отсутствие потенциал-зависимых механизмов вызывает вопрос: могут ли каналы DEG/ENaC/ASIC играть роль в генерации ГПД и механизмах ДМП? Кислоточувствительные натриевые каналы из этого семейства (ASIC) активируются ответом на внеклеточные протоны. Учитывая, что изменения pH в псевдоцеломимическом пространстве являются частью процесса изменений МП [19], эти каналы могут являться связующим звеном между колебаниями концентрации протонов, натриевыми потоками и изменениями МП.

Работа ионного канала с проводимостью g_{a2} по всей видимости сопряжена с изменением концентрации ионов Ca^{2+} . Ранее было установлено, что колебания Ca^{2+} взаимосвязаны с циклами ДМП и ритмическим изменением МП [17, 34]. Поэтому казалось возможным, что Ca^{2+} может поступать в клетку через кальциевые потенциал-зависимые каналы (VGCC) подобно тому, как это происходит в сердце позвоночных, фаринксе нематод или для некоторых нейронов и миоцитов (Рисунок 15В) [130]. Однако анализ данных секвенирования РНК ОК выявил, что экспрессия VGCC в кишечнике существенно ниже, чем в стандартных возбудимых тканях.

Другим аспектом осцилляций Ca^{2+} в клетках кишечника нематоды *C. elegans* является высвобождение кальция из ЭПР посредством инозитол 1,4,5-трисфосфата

(IP₃) и его основного рецептора ITR-1 [17, 35, 37, 71]. Эта динамика подтверждается поведенческими экспериментами: мутанты *itr-1* имеют нарушенный ритм дефекации, в то время как сверхэкспрессия *itr-1* сокращает периоды этого цикла [17]. Согласно результатам секвенирования РНК ОК [60], ген *itr-1* экспрессируется почти исключительно в клетках кишечника нематоды (Рисунок 18А).

Ритмическая активность изменений МП при ДМП, сохраняющаяся даже при фиксации потенциала, подтверждает ключевую роль IP₃-рецептора в генерации ДМП. Предполагается, что эти ритмические изменения концентрации Ca²⁺ могут зависеть исключительно от внутриклеточных механизмов, связанных с высвобождением и поглощением Ca²⁺ из ЭПР. В случае поступления Ca²⁺ из ЭПР, также, как и его реабсорбции, изменений МП не происходит (Рисунок 15А).

Аналогично *itr-1* потенциальным участником ДМП мог являться рианодиновый рецептор (*unc-68*), однако согласно данным секвенирования РНК ОК [28], он экспрессируется в основном в мышцах и, в меньшей степени, в нейронах.

CICR и IP₃ рецепторная активность зависит от взаимодействия двух внутриклеточных сигнальных молекул: Ca²⁺ и IP₃. Исходя из этих сведений была продемонстрирована роль еще одного участника механизма осцилляций Ca²⁺ в кишечнике нематоды *C. elegans* – фосфолипазы C β (EGL-8) [35]. PLCβ считается важным компонентом этого процесса, и по данным секвенирования подтверждена повышенная экспрессия этого гена в нейронах и клетках кишечника.

Работа CICR зачастую требует притока Ca²⁺ из внеклеточной среды, как правило, через потенциал-зависимые Ca²⁺ каналы. Однако, как было замечено ранее, эти каналы не экспрессируются в кишечнике. Было предложено, что в данной роли могут быть привлечены каналы из семейства TRP [37].

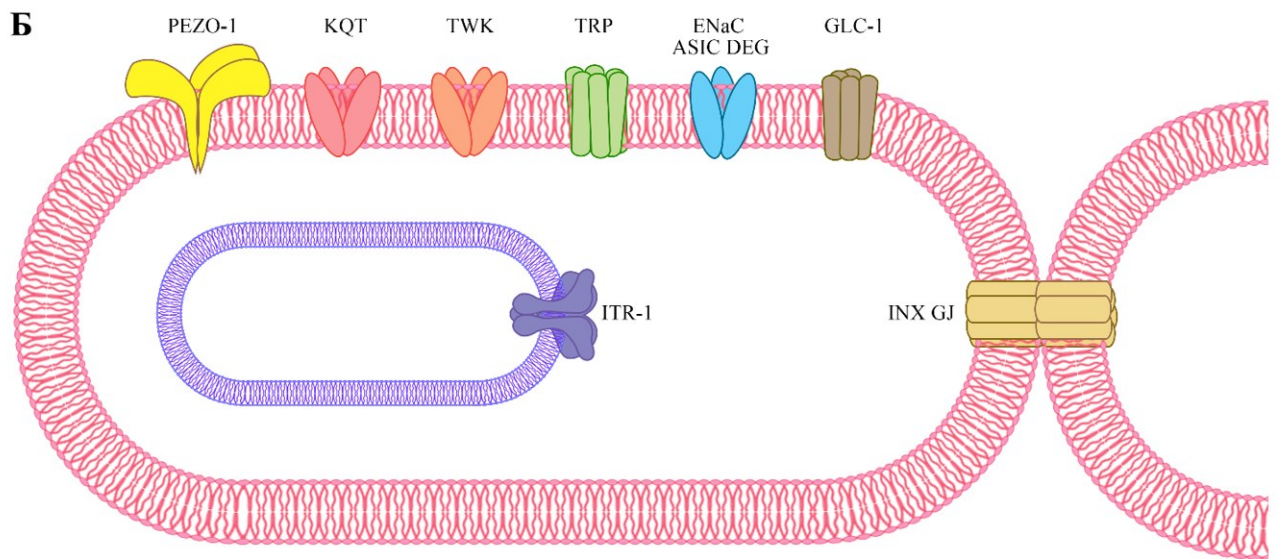
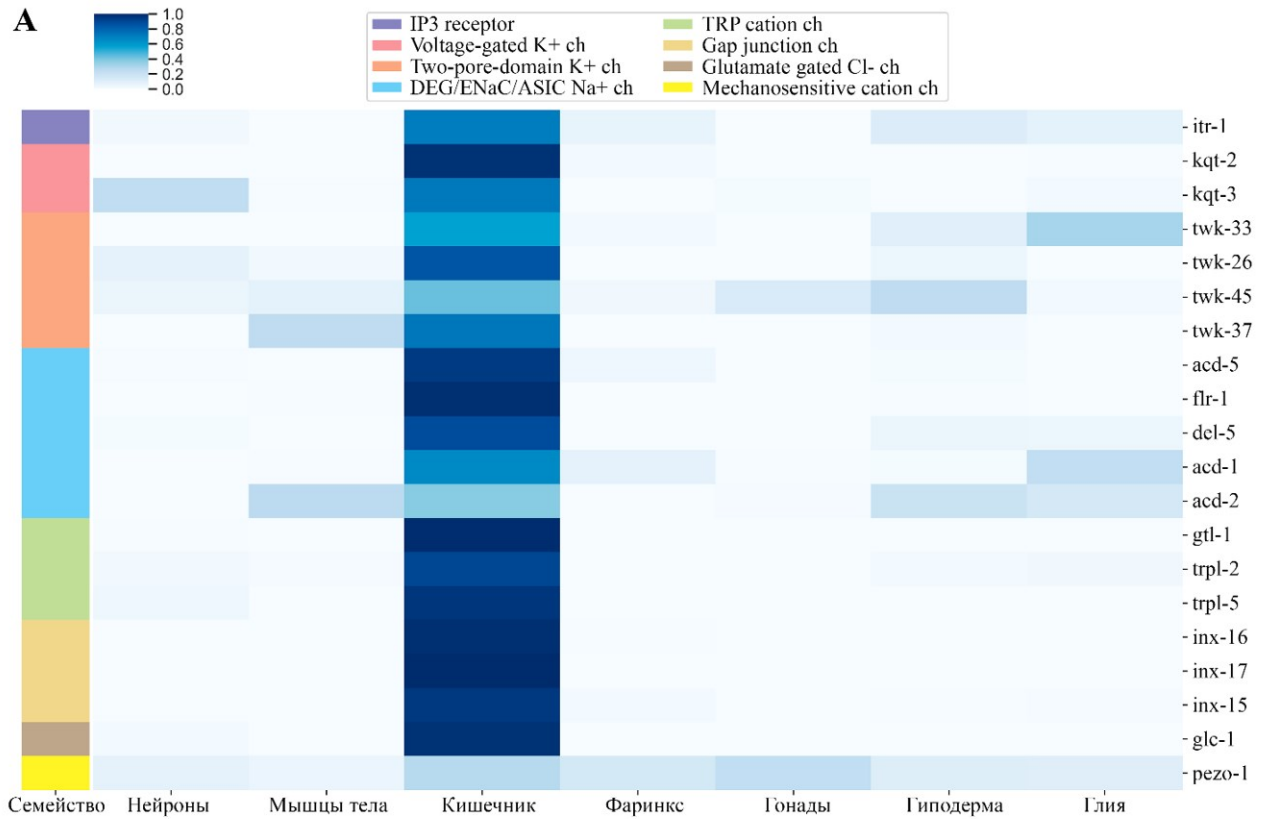


Рисунок 18 – Гены мембранных белков, преимущественно экспрессированные в клетках кишечника нематоды *Caenorhabditis elegans* А. Тепловая карта для 20 генов с максимальной относительной экспрессией в кишечнике нематоды. Для каждого такого гена рассчитано отношение экспрессии гена в ткани к общей экспрессии (значение экспрессии для каждого гена в каждой ткани разделено на сумму значений экспрессии гена в каждой ткани). Чем выше

экспрессия гена в конкретной ткани, тем выше насыщенность ячейки тепловой карты, а значение данных ближе к 1. Крайний левый столбец тепловой карты в зависимости от цвета представляет семейства генов, описанные в легенде Б. Различные семейства мембранных белков, представленные в клетках кишечника нематоды *C. elegans* согласно данным scRNA-seq. Цвета окраски ионных каналов соответствуют цветам семейств с тепловой карты А. Две клетки соединены посредством ЦК иннексина (INX-15, INX-16, INX-17). ЭПР имеет на своей мембране рецептор ITR-1 (фиолетовый). Клеточная мембрана клетки пронизана преимущественно шестью семействами мембранных белков. Два семейства K^+ каналов: KQT (KQT-2, KQT-3) и каналы TWK (TWK-26, TWK-33, TWK-37, TWK-45). Семейство DEG/ENaC/ASIC (ACD-5, FLR-1, DEL-5, ACD-1, ACD-2). Каналы TRP (GTL-1, TRPL-2, TRPL-5). Cys-петлевой рецептор GLC-1 и механосенсорный рецептор PEZO-1.

В геноме *C. elegans* идентифицировано 23 гена TRP, причем три из них — *gtl-1*, *trpl-2* и *trpl-5* — активно экспрессируются в клетках кишечника, в отличие от других тканей (Рисунок 18). Данные WormBase указывают на мутантный фенотип *gtl-1*, который связан с нарушениями в процессе дефекации. Изменения в ритмичности Ca^{2+} осцилляций у мутантов по *gon-2* и *gtl-1* объясняются их взаимодействием с компонентами кальциевого сигнального механизма [72]. В кишечнике *gtl-1* коэкспрессируется с *gon-2*, и, возможно, образуют гетеромерные каналы. Таким образом GON-2 и GTL-1 могут участвовать в генерации g_{a2} проводимости и в механизме ГПД, функционируя как Ca^{2+} каналы внешнего выпрямления.

4. 3. Гиперполяризующие ионные каналы нематоды *gb*, потенциально вовлечённые в генерацию ритмических изменений мембранного потенциала

В клетках кишечника нематод в ходе ритмического изменения МП наблюдается интересное явление: самоподдерживающаяся и усиливающаяся гиперполяризация плазматической мембраны под воздействием гиперполяризующего тока (Рисунок 6А). Это является одной из ключевых характеристик исследуемых электрических колебаний. Предполагается, что источником такой гиперполяризации является K^+ канал, показанный в модели как «*gb* проводимость» (Рисунок 16Б).

Отрицательный спайк в фаринксе нематоды *A. lumbricoides* представляет собой быструю реполяризацию в конце фазы плато ПД. Этот процесс напоминает исследуемую гиперполяризацию в *C. elegans* и *H. megidis*. Исследования на *A. lumbricoides* показали, что такой отрицательный спайк регулируется K^+ каналами [2–4]. Исходя из предположения схожего механизма первым кандидатом на роль белка, вовлеченного в генерацию ГПД нематод, выступил белок EXP-2.

Особенности канала EXP-2 могут объяснить наличие положительной обратной связи при гиперполяризующем потенциале. Так, ген *exp-2* кодирует субъединицу калиевого канала и относящуюся к семейству калиевых потенциал-зависимых Shab ($Kv2$)-подобных каналов [65–67]. У мутантов с отсутствующим *exp-2* наблюдаются аномально длительные сокращения фаринкса. Основная функция EXP-2 заключается в обеспечении быстрой реполяризации электрического потенциала по завершении фазы плато в фарингальной мышце.

Каналы EXP-2 активируются при гиперполяризации, при условии предшествующей деполяризации [65–67]. Такие характеристики, как медленная активация и очень быстрая инактивация в ответ на деполяризацию и быстрое восстановление после инактивации при реполяризации делают EXP-2 канал Kv -типа – калиевым каналом внутреннего выпрямления, подходящим для генерации

ГПД. Однако согласно данным секвенирования РНК ОК была выявлена значительная дифференциальная экспрессия гена *exp-2* только лишь в фаринксе *C. elegans*. Тем же исследованием было установлено, что экспрессия этого белка в клетках кишечника нематоды минимальна или отсутствует. Поскольку у *C. elegans* нет ортологов *exp-2*, то они не могут участвовать в механизме ГПД в кишечных клетках.

По данным секвенирования РНК ОК, два калиевых потенциал-зависимых ионных канала из семейства KQT K⁺ (KQT-2 и KQT-3) сверхэкспрессируются в клетках кишечника. Эти каналы гомологичны потенциал-зависимым K⁺ каналам KCNQ у млекопитающих, отвечающих за возникновение синдрома удлиненной фазы QT сердца. Они активируются при деполяризации и играют ключевую роль в реполяризионной фазе обычного спайка [68]. Можно предположить, что каналы KQT-2 и KQT-3, которые активно экспрессируются в кишечнике, могут играть ключевую роль в механизме ГПД *in vivo*, действуя аналогично каналам EXP-2 в фаринксе. Как уже говорилось, для K⁺ каналов EXP-2 открытие происходит при деполяризации и закрытие при гиперполяризации, и механизм инактивации-реактивации значительно вовлечен в генерацию K⁺ токов. Инактивация K⁺ канала наступает при деполяризации, когда канал все еще открыт, но перестает проводить ионы, и завершается при гиперполяризации.

О генах *kqt* нематод (включая специфичный для фаринкса *kqt-1*) известно не так много, они были подробно изучены с помощью гетерологичной экспрессии в ооцитах *Xenopus* [69]. Однако в подобных экспериментах белки *C. elegans* формировали каналы, которые не имели свойств внутреннего выпрямления, которые были ожидаемы для калиевого g_b-тока. Известно, что активность гомологов KQT у млекопитающих сильно модулируется вспомогательными белками, такими как бета-субъединица KCNE1. Поэтому свойства каналов KQT-2 и KQT-3 *in situ* могут отличаться от их свойств в системе гетерологичной экспрессии в ооцитах *Xenopus*, и все же проявлять внутреннее выпрямление.

Помимо этого, ранее было отмечено, что согласно литературным данным, каналы KQT участвуют в функционировании ДМП клеток кишечника *C. elegans* [75].

Нами было показано, что в клетках кишечника нематод МП поддерживается на необычном для других типов клеток деполяризованном уровне, близком к 0 мВ. Следовательно, при таком МП K^+ каналы могут быть открытыми, но инактивированными. Естественная или индуцированная гиперполяризация может временно реактивировать некоторые K^+ каналы, усиливая гиперполяризацию с последующей реактивацией большего количества K^+ каналов. Эта последовательность событий в сочетании с рефрактерными механизмами может вызывать осцилляции МП и ГПД. К сожалению, значимые эксперименты по одновременной инактивации как KQT-2, так и KQT-3 в процессе ДМП еще не были представлены.

Существует еще одно семейство калиевых каналов внутреннего выпрямления 2ТМ, потенциально генерирующих g_b -токи. Каналы этого семейства имеют два трансмембранных домена на субъединицу и один Р-домен. Три гена *C. elegans* имеют схожую структуру субъединиц, но до сих пор не было найдено мутантов, связанных с этими генами [64], и они не показывают повышенной экспрессии в клетках кишечника. Кроме того, 2ТМ калиевые каналы внутреннего выпрямления открываются только при гораздо более отрицательных потенциалах, чем наблюдается для g_b -токов ГПД.

Альтернативный механизм образования гиперполяризующего спайка может вовлекать кальций или натрий-активируемые калиевые каналы. Приток ионов Ca^{2+} или Na^+ в клетку, вызванный естественной или искусственной гиперполяризацией, может активировать K^+ канал в режиме положительной обратной связи. Известно, что такие каналы присутствуют в геноме нематод (семейства BK и SK) [64], однако они слабо экспрессируются в кишечных клетках.

Two-pore-domain калиевые каналы (ТВК) представляют собой наиболее представленное семейство калиевых каналов в *C. elegans*, состоящее из 46 генов.

Особое внимание заслуживают четыре из них, которые активно экспрессируются в кишечных клетках: *twk-26*, *twk-33*, *twk-37* и *twk-45* [63]. Однако текущие исследования не подтверждают их прямую связь с генерацией ГПД [64]. Эти каналы не являются потенциал-зависимыми, но их активность может регулироваться множеством факторов, влияющих на потенциал клеточной мембраны [70]. Некоторые из каналов TWK создают так называемые «каналы утечки», формирующие потенциал покоя плазматической мембраны. Клетки кишечника нематод имеют необычно деполяризованный исходный уровень МП, и предполагается, что каналы TWK играют роль в его поддержании. Кроме того, активность этих каналов может контролироваться различными механизмами, такими как концентрация Ca^{2+} , уровень рН, разнообразные сигнальные молекулы, насыщенность кислородом, механические воздействия и G-белки [18, 52]. Колебания уровней концентрации Ca^{2+} и изменения рН могут сопровождать наблюдаемые осцилляции МП, указывая на возможное сопряжение этих ионов с калиевыми токами.

4. 4. Иные потенциальные участники генерации и регуляции ритмических изменений мембранного потенциала

Еще начиная с исследований Ходжкина и Хаксли стало ясно, что деполяризационный ПД в значительной мере может быть описан и смоделирован в терминах потенциал-зависимых ионных каналов, расположенных на плазматической мембране. В попытках прояснить некоторые аспекты ритмических осцилляций и генерации ГПД изначально исследование было сфокусировано на ионных каналах, экспрессирующихся в кишечнике нематоды. Несмотря на это для создания более полной модели ДМП, нам кажется необходимым включать и другие молекулярные компоненты, такие как транспортеры, обменники и ЩК.

Транспортеры и ионные обменники

Транспортеры и обменники играют важную роль в процессе переноса ионов через клеточные мембраны. В отличие от ионных каналов, транспортеры работают медленнее и, как правило, вносят меньший вклад в быстрые изменения потенциала в нейронах и мышцах. Однако ультрадианные изменения МП в кишечнике нематод намного медленнее обычного ПД, и активность транспортеров/обменников может оказаться критической для подобных осцилляций.

Стоит отметить, что активность большинства транспортеров не является электрически нейтральной, что может непосредственно влиять на колебания потенциала клеточной мембраны. Кроме того, такие факторы как изменение рН или уровень концентрации Ca^{2+} при работе мембранных белков могут опосредованно воздействовать на свойства ионных каналов. Интересно, что данные секвенирования РНК ОК указывают на сильную дифференциальную экспрессию генов транспортеров и обменников в клетках кишечника.

Для создания полной модели ДМП вероятно потребуется также учет деятельности транспортеров и обменников, а также некоторых регуляторных генов, в дополнение к уже предложенным ранее ионным каналам.

Щелевые контакты

Щелевые контакты (ЩК) представляют собой комплексы, состоящие из молекул мембранных белков. Эти комплексы создают межклеточные каналы, которые позволяют прохождению ионов и небольших молекул, связывая цитоплазмы соседних клеток. У нематод, а также у большого числа беспозвоночных, ЩК формируются при участии белков семейства иннексинов/паннексинов. Роль иннексинов/паннексинов в кишечнике нематоды *C. elegans* была исследована при изучении распространения кальциевых волн [26], а наличие ЩК между кишечными клетками и роль ЩК в электрической синхронизации для нематоды *H. megidis* была подтверждена прямыми

физиологическими исследованиями как в опытах с инъекцией красителя, так и в экспериментах с электрофизиологической регистрацией наличия связи [20].

Геном *C. elegans* кодирует 25 таких белков. Анализ РНК ОК выявил, что три из этих генов (*inx-16*, *inx-17* и *inx-15*) особенно активно экспрессируются в кишечных клетках *C. elegans*. Это наблюдение согласуется с детализированным исследованием с высокой разрешающей способностью, основанным на экспрессии зеленого флуоресцентного белка под контролем промоторов иннексинов/паннексинов [25]. Кроме указанных генов, *inx-2* также активно экспрессируется в передней части кишечника и фаринксе.

Остается открытым вопрос, почему другие высоко экспрессированные гены, такие как *inx-17* и *inx-15*, не могут компенсировать мутацию гена *inx-16*. Возможным объяснением может являться структура межклеточного канала. Каждый межклеточный канал состоит из двух паннексиновых молекул, каждая из которых предоставляется одной из соседних клеток. Эти паннексины могут формировать гетеромерные каналы, и все три белка (INX-16, INX-17 и INX-15) могут вносить вклад в такой канал. Однако также возможно, что *inx-17* и *inx-15* могут вообще не участвовать в создании ЩК, так как, иннексины/паннексины способны не только формировать межклеточные ЩК, но и функционировать в качестве полуканалов на плазматической и ER-мембранах [96, 98, 100].

Вполне вероятно, что INX-16 играет ключевую роль в электрической синхронизации между клетками кишечника. Это сходно с функцией иннексинов, которые экспрессируются в возбудимых клетках, таких как мышечные клетки или нейроны. Согласно исследованию, предполагается, что IP_3 может диффундировать между клетками через ЩК, состоящие из INX-16 [26]. IP_3 активирует рецептор IP_3 , инициируя таким образом механизм кальций-зависимого выброса кальция, что в свою очередь запускает ДМП. Исследования взаимосвязи паннексинов и распространения кальциевых волн в кишечнике, в частности, мутаций *inx-16* (*ox144*), при которых отмечался запорный фенотип, показали, что INX-16 имеет ключевое значение для синхронизации кишечных клеток.

Семейство Cys-loop и механорецепторы

Известно, что уничтожение нейрона AVL приводит к дефектам на этапе aBoc. И хотя AVL является ГАМК-ергическим нейроном, мутации, связанные с дисфункцией ГАМК, не влияют на этот процесс. Вопросы о том, как внешние стимулы модулируют ДМП, остаются открытыми. Данные секвенирования РНК ОК выявило высокую дифференциальную экспрессию необычных глутамат-связывающих хлорид-проницаемых Cys-loop рецепторов (*glc-1*), что может иметь отношение к внешней регуляции дефекации.

Мессенджерная РНК *glc-1* нематоды *C. elegans*, экспрессированная в ооцитах Xenopus, кодирует авермектин-чувствительный глутамат-связывающий хлоридный канал [77]. Таким образом, глутамат может быть сигнальной молекулой, которая способна модулировать активность клеток кишечника. Это наблюдение подчеркивает потенциальную роль глутамата в регуляции функций кишечника, предоставляя новые возможности для электрофизиологических исследований энтероцитов. Прямых синаптических проекций от глутаматергических нейронов к клеткам кишечника на данный момент не известно, и механизм вовлеченности этой сигнальной молекулы неясен. Как один из вариантов – рецепторы *glc-1* могут воспринимать глутамат, поступающий с пищей в просвете кишечника.

Стоит отметить и ген *pezo-1*, который также оказался активно экспрессируемым в клетках кишечника *C. elegans*. Белки PIEZO, консервативные в разных видах, формируют механочувствительные ионные каналы. Присутствие PIEZO в клетках кишечника может объяснить, как механическое воздействие (даже легкое прикосновение) способно перезапустить процесс дефекации, не вовлекая нервную систему.

Во многих случаях данные секвенирования РНК ОК согласуются с предыдущими наблюдениями, касающимися экспрессии и функций

специфических генов кишечника, одновременно выделяя новых потенциальных кандидатов для включения в модель ДМП. Сравнительный анализ данных экспрессии генов, связанных с мембранными белками, в том числе с ионными каналами, подчеркивает мощь и эффективность метода секвенирования РНК ОК как средства для анализа молекулярных механизмов, участвующих в ДМП.

ГЛАВА 5. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ ДЕФЕКАЦИОННОЙ МОТОРНОЙ ПРОГРАММЫ РАЗЛИЧНЫХ НЕМАТОД

5. 1. Электрофизиологические свойства изменения мембранного потенциала клеток кишечника нематоды *Enoplus brevis*

Вопрос о том, является ли обнаруженный механизм контроля дефекации специфичной особенностью нематод порядка Rhabditida появившейся в результате быстрой эволюцией или общей чертой всех нематод, остается открытым [131]. В связи с этим было проведено исследование на Enoplida, одной из эволюционно удаленных групп нематод от Rhabditida. Особое внимание в ходе исследования было уделено изменениям МП и электрофизиологическим свойствам клеток кишечника *E. brevis* (Рисунок 19А).



Рисунок 19 – Морфология и автофлуоресценция нематоды *Enoplus brevis*

А. Свободноживущая личинка *E. brevis* четвертой стадии, наблюдаемая в световом микроскопе. Б. Участок тела *E. brevis* in-vivo под флуоресцентным микроскопом под фильтрами для GFP. Размеры и количество клеток кишечника значительно отличается от *C. elegans* и *H. megidis*. Продемонстрирован контраст между ядрами клеток кишечника и яркой автофлуоресценцией цитоплазмы.

В исследованиях на *E. brevis*, нематоде, филогенетически отличающейся от семейства Rhabditida, также были обнаружены ритмические изменения уровня МП. Эти изменения напоминают осцилляции, зафиксированные у *H. megidis*. Более того, было выявлено, что клетки кишечника *E. brevis*, подобно *H. megidis*, связаны между собой электрически через ЩК. Эти результаты указывают на возможность того, что ритмический механизм генерации ДМП, который минимально задействует нервную систему, может быть общим для разных видов нематод, включая филогенетически далекие виды. Это дает основания предполагать, что описываемый механизм мог присутствовать у последнего общего предка всех нематод.

Для получения точных измерений коэффициента электрической связи между клетками обычно требуется одновременная регистрация каждой клетки двумя внутриклеточными микроэлектродами. Однако из-за малого размера клеток кишечника *E. brevis* возможно было установить только по одному электроду на клетку, что ограничивало исследование и получение количественных данных о межклеточной связи (Рисунок 19Б).

В рамках эксперимента две клетки, расположенные рядом или близко друг к другу, инъецировались микроэлектродами (Рисунок 20А). Один электрод применялся для введения положительного или отрицательного электрического тока в одну клетку, в то время как второй электрод использовался для регистрации изменений МП в другой клетке, что позволяло определить наличие электрической связи между клетками. Например, в регистрации на Рисунок 20Б видно, что при введении отрицательного импульса тока I_2 силой 20 нА в одну клетку, МП в соседней клетке изменялся на -5 мВ. Это указывает на наличие электрической связи между клетками. В контрольных экспериментах, когда один из электродов оставался во внеклеточной среде, такой связи не наблюдалось, подтверждая, что электрическая связь в *E. brevis*, вероятно, осуществляется через межклеточные контакты.

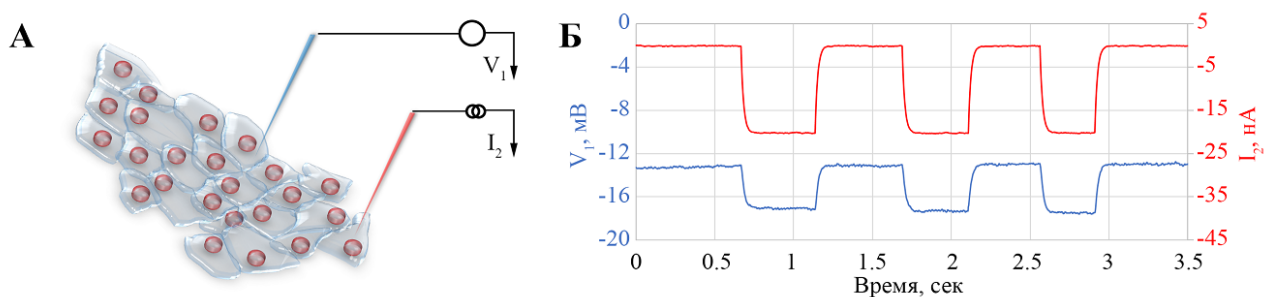


Рисунок 20 – Наличие электрической связи клеток кишечника нематоды *Enoplos brevis* А. Схематичное представление эксперимента с инъекцией двух микроэлектродов, вживленных в разные клетки кишечника. Электрод V_1 (синий) служит для измерения МП, в то время как электрод I_2 (красный) используется для внутриклеточной инъекции тока. Б. Отрицательный импульс тока в -20 нА, примененный к одной из клеток, передается, предположительно через ЩК и вызывая сдвиг МП на -5 мВ в одной из соседних клеток.

В ходе исследования было выполнено 15 экспериментов с изолированным кишечником *E. brevis*, общая продолжительность записей изменений МП которых составила около 30 часов. Эти записи показали регулярные колебания МП в клетках кишечника (Рисунок 21А). Амплитуда этих колебаний варьировалась от 15 до 25 мВ, а средний период колебаний составлял около 20 минут.

Наблюдаемые вариации паттернов осцилляций МП были представлены в различных препаратах *E. brevis*. Характеристики изменения МП (V) и его производной по времени (dV/dt) оказались схожими в двух разных препаратах, однако период колебаний отличался примерно в два раза (Рисунок 21В). Начальный уровень МП характеризовался небольшой деполяризацией, за которой следовала быстрая гиперполяризация, особый нематодный ГПД, а затем медленное возвращение к начальному уровню.

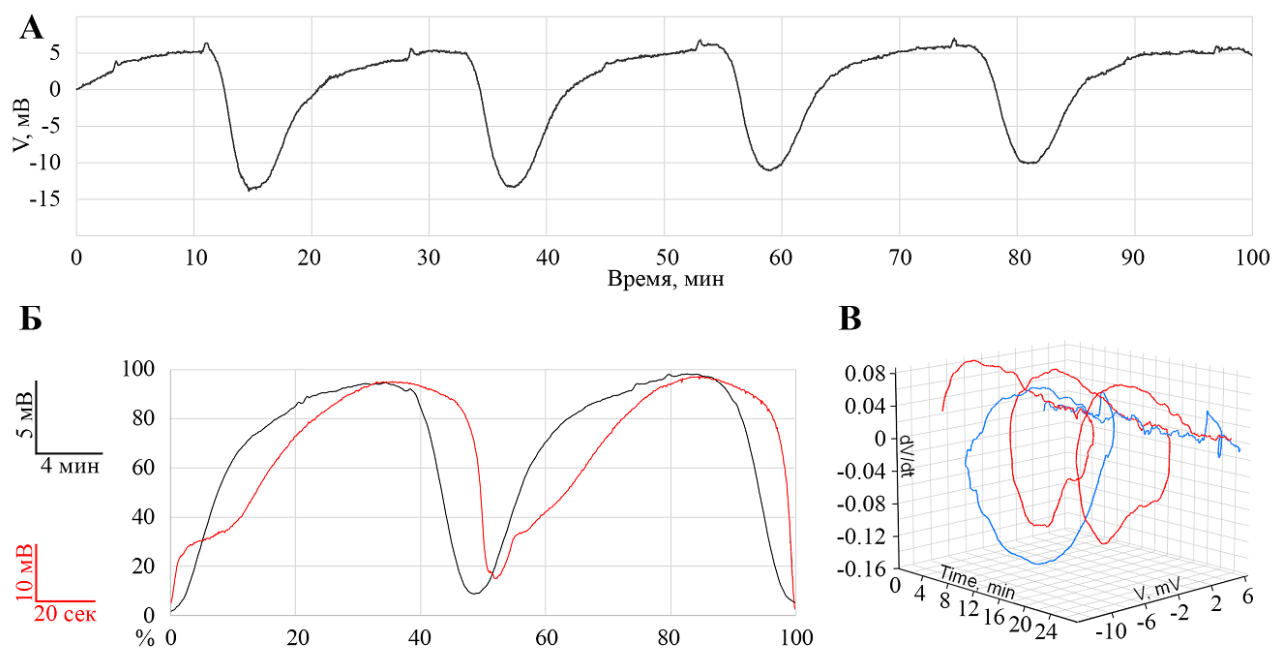


Рисунок 21 – Сравнение электрофизиологических характеристик осцилляций в клетках кишечника различных нематод А. Типичное изменение МП в клетках кишечника *E. brevis*. Б. Сравнение изменения МП клеток кишечника *E. brevis* (черный) и *H. megidis* (красный). Для сравнения проведена нормализация периода и амплитуды из нескольких циклов различных образцов. Горизонтальная ось – процент времени; вертикальная ось – процент изменения МП. Характер циклических изменений для обоих видов сходен. Фактическое время и потенциал представлены в легенде слева цветом, соответствующим цвету нормализованной кривой изменений МП. В: 3D график, показывающий динамику изменения МП t (время), V (потенциал), dV/dt (скорость изменения МП) для двух образцов *E. brevis*, имеющих схожий паттерн, но наибольшие различия в периоде колебаний.

Осцилляции МП в группах изолированных клеток кишечника *E. brevis* происходили без участия других типов клеток, включая нейроны. Такие осцилляции напоминали наблюдаемые изменения МП в клетках кишечника *H. megidis* [20], но отличались от них большим периодом и меньшей амплитудой (Рисунок 21Б). Нормализованные осцилляции МП обоих видов (два цикла), *E.*

brevis (черный) и *H. megidis* (красный), показали схожий паттерн, характеризующийся длинным деполяризационным «плато» и более короткой гиперполяризационной «ямой». Наличие тесной электрической связи между кишечными клетками обоих видов, вероятно, обеспечивающееся через ЦК позволяет синхронизировать описываемую активность.

5. 2. Сходства и различия паттернов изменений мембранного потенциала в ходе дефекационной моторной программы различных нематод

Наблюдаемое сходство в циклических изменениях МП между клетками кишечника *E. brevis* и *H. megidis* предполагает, что ДМП у обоих видов основана на аналогичном механизме. В исследованиях на *H. megidis* было установлено, что автономные циклы изменения МП в клетках кишечника тесно связаны с процессом дефекации, причем акты дефекации совпадают с гиперполяризационными спайками МП [20]. Подобный механизм регуляции наблюдается и у других видов филума Rhabditida, в частности у *C. elegans* [17, 18, 36]. Активность ЦГП у *C. elegans* связана с изменениями концентраций ионов Ca^{2+} и H^+ в цитоплазме и, предположительно, сопровождается осцилляциями электрического потенциала клеточной мембраны.

Осцилляции, отображенные на Рисунке 21А, показывают схожие колебания, с теми, что наблюдаются в изменениях МП у *H. megidis*. Это предполагает общий механизм действия ЦГП у всех видов нематод. Кроме того, известно, что ЦГП в отдельных клетках кишечника *C. elegans* так же синхронизируется через ЦК [26]. Учитывая эти схожести, можно предположить, что кишечник всех трех рассматриваемых ранее видов нематод содержит аналогичный ЦГП, и клетки могут быть синхронизированы через ЦК, обеспечивая единую регуляцию дефекации.

Кишечник *E. brevis* заметно отличается по размеру и количеству клеток кишечника от двух других изученных видов нематод: у *E. brevis* насчитывается около 6000 клеток, в то время как у *C. elegans* и *H. megidis* – 20 и 24-28 клеток соответственно 13А. Несмотря на эти различия, характеристики осцилляций МП в ходе ДМП у всех трех видов обладают определенным сходством.

Однако частота генерации ДМП различается. Это может указывать на адаптацию частоты ДМП к физическим характеристикам и механическим свойствам конкретного вида животного. Более крупные животные, как правило, движутся медленнее мелких. Примером такой адаптации является моллюск *Clione limacina*, у которого частота ЦПП и электрические свойства нейронов водителей ритма изменяются в зависимости от размера животного – с ростом размера частота становится ниже, а спайки более длительными [132, 133].

Можно предположить, что аналогичная адаптация частоты ДМП может иметь место и у нематод. Это предположение может быть проверено в последующих исследованиях на других видах нематод и на особях разных стадий развития в рамках одного вида. На основании описанных наблюдений мы считаем, что у разных видов нематод существует общий не нервный ритмический механизм генерации ДМП, вероятно, унаследованный от общего предка.

5. 3. Физиологический и генетический анализ сходства дефекационной моторной программы отдаленных видов нематод

В ходе исследования нематоды *H. megidis* оставался открытым вопрос о том, является ли механизм дефекации уникальной особенностью для представителей отряда Rhabditida или же он распространен и среди других видов нематод.

Нами было описано периодическое изменение МП в клетках кишечника нематоды *E. brevis*, принадлежащей к другому отряду – Enoplida [43]. Эти

наблюдения показывают сходство с осцилляциями МП, которые возникают в процессе дефекации у нематод *C. elegans* и *H. megidis*. Кроме того, было выявлено, что клетки кишечника *E. brevis*, подобно *C. elegans* и *H. megidis*, также связаны между собой электрически через ЩК. Это позволяет предположить, что механизмы, участвующие в ДМП, могут быть общими для различных видов нематод, включая филогенетически отдаленные от Rhabditida виды, такие как *E. brevis*. Для дальнейшего изучения этого явления предстоит сравнить молекулярные агенты, участвующие в ДМП, у различных видов нематод и рассмотреть эволюционное происхождение данного механизма.

На данный момент изучена роль нескольких десятков генов, участвующих в ДМП у *C. elegans* [21]. Благодаря доступности геномных последовательностей различных видов нематод, мы имеем возможность изучать эволюцию ДМП на уровне всего типа Нематоды, что значительно расширяет понимание механизмов регуляции и эволюции данного феномена.

В рамках исследования мы сосредоточились на анализе четырех ключевых генов – *aex-2*, *nlp-40*, *pbo-5/6* и *exp-1*, которые считаются критически важными для функционирования ДМП у *C. elegans*. Обнаружение истинных ортологов этих генов у других видов нематод может свидетельствовать о существовании похожих механизмов ДМП. Мы провели ВВН [134] для этих генов среди 18 доступных в настоящее время полных геномов представителей типа Нематоды, а также филогенетический анализ большого суперсемейства Cys-loop лиганд-связанных ионных каналов, в который входят белки РВО-5/6 и EXP-1 [135].

Используя BLAST для поиска ортологов у *C. elegans*, мы обнаружили, что два из четырех исследуемых генов ДМП – *aex-2* и *nlp-40* – присутствуют только среди нематод (с E-value < 10^{-87}), и отсутствуют у других видов вне филума Nematoda (с E-value > 10^{-10}). Два других гена – *pbo-5* и *exp-1* – имеют гомологи внутри и вне филума Nematoda. Метод ВВН подтвердил наличие *pbo-5* и *exp-1* у нескольких видов нематод, однако известно, что такой подход в некоторых случаях

может приводить к неверным интерпретациям и требует дополнительной проверки через филогенетический анализ [136].

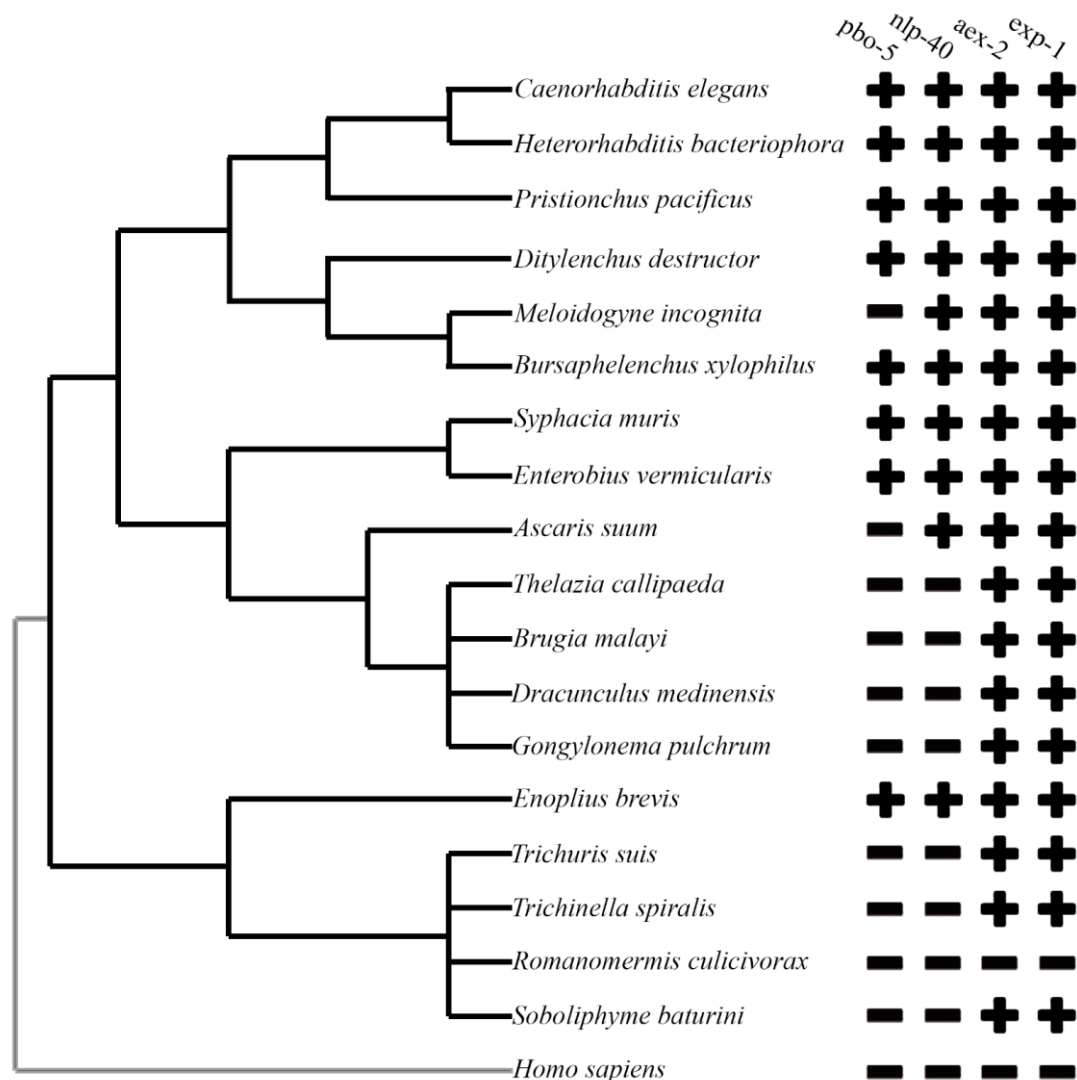


Рисунок 22 – Кладограмма нематод [131] показывающая наличие четырех характерных белков участвующих в процессе дефекации нематод у различных видов Вид *Homo sapiens* отобран как аутгруппа. Наличие характерного белка отмечено плюсом, а отсутствие минусом.

Гены *pbo-5* и *exp-1* принадлежат к широко распространенному классу Cys-loop лиганд-связанных ионных каналов, включающих разнообразные типы ионотропных рецепторов, таких как никотиновые ацетилхолиновые, ГАМК,

глициновые, глутаматные и серотониновые ионотропные рецепторы. EXP-1 кодирует необычные возбуждающие ГАМК-рецепторы [41]. На филогенетическом дереве Cys-loop рецептор *exp-1* у *C. elegans* объединяется со своими предполагаемыми ортологами, найденными у всех изученных нематод, кроме одного вида *R. culicivora* (Рисунок 22). Это же дерево подтверждает наличие гомологов *pbo-5* у *C. elegans* у восьми видов нематод, в том числе у *E. brevis*.

Поиск генов ДМП у 18 видов нематод с секвенированными геномами показал интересные результаты, отраженные на Рисунке 22. Было обнаружено, что восемь видов нематод обладают всеми четырьмя исследуемыми генами – *aex-2*, *nlp-40*, *pbo-5* и *exp-1*. Еще два вида имеют ген *nlp-40*, но у них отсутствует *pbo-5*. Семь видов лишены как *pbo-5*, так и *nlp-40*. Особо примечательным является один вид, у которого не обнаружены все четыре гена, необходимые для ДМП.

Тот факт, что эти гены были найдены у филогенетически разнообразных видов, включая *E. brevis*, который занимает важное место в корне филогенетического дерева Nematoda [131], позволяет предположить, что их общий предок, вероятно, обладал всеми четырьмя характерными генами ДМП. В процессе эволюции некоторые виды потеряли часть этих генов. Особо отличается нематода *R. culicivora*, паразитическая мермитида с дегенерировавшей пищеварительной системой и отсутствием сквозного кишечника, которая потеряла все четыре гена. Эти данные подчеркивают важность эволюционного анализа для понимания генетических механизмов, лежащих в основе физиологических процессов, таких как ДМП у нематод.

Обнаружение ортологов гена *pbo-5/6* *C. elegans* в *E. brevis* предполагает, что мышечные клетки этого вида чувствительны к изменениям pH и способны сокращаться в ответ на подкисление окружающей среды. В отличие от этого, у *R. culicivora*, у которой отсутствуют гены *pbo-5/6*, мышечные клетки, не должны реагировать на колебания pH. Однако мышечные клетки обоих этих видов должны реагировать на введение ацетилхолина, учитывая сохранение никотиновых

ацетилхолиновых рецепторов у всех исследованных видов нематод, как показано на Рисунках 22 и 23.

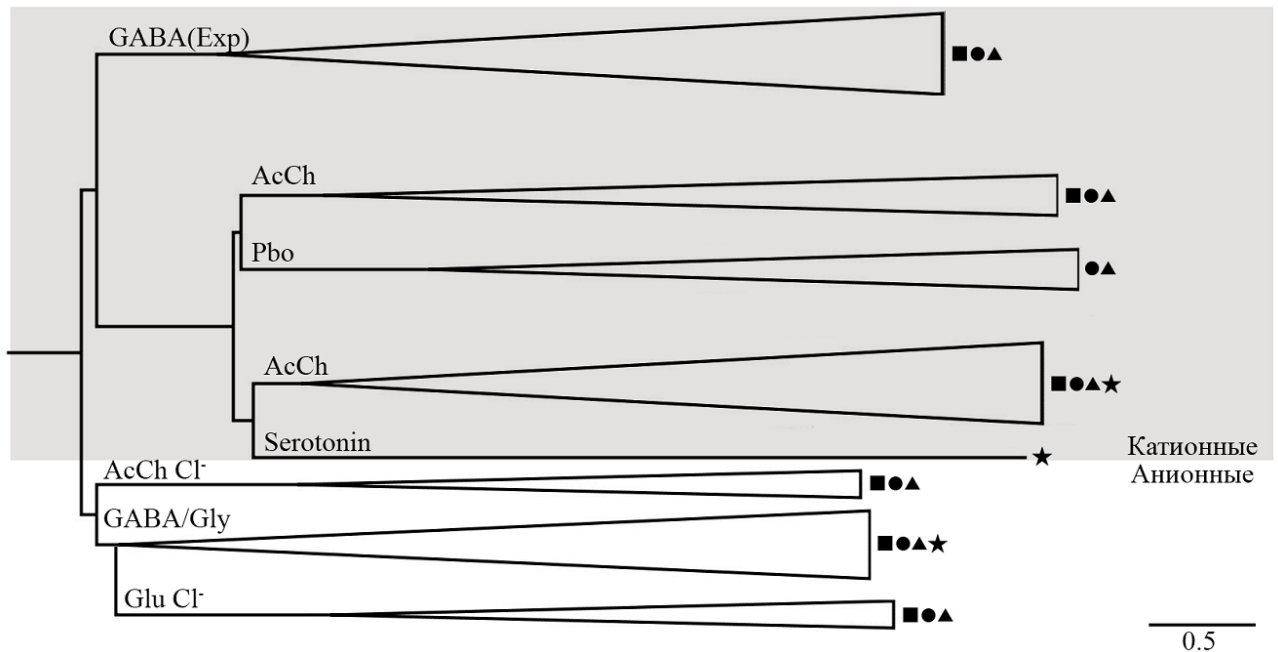


Рисунок 23 – Филогенетическое древо представленности Cys-loop рецепторов у различных видов нематод Рецепторы разделены на анионные и катионные, шкала генетических изменений представлена внизу рисунка. Вид *Homo sapiens* отобран как аутгруппа. В выборку попали только нематоды с наличием одного из белков *exp-1* или *pbo-5*. Наличие белков у видов отмечено условными обозначениями. Звезда – *Homo sapiens*. Круг – *Caenorhabditis elegans*. Треугольник – *Heterorhabditis bacteriophora*, *Pristionchus pacificus*, *Ditylenchus destructor*, *Bursaphelenchus xylophilus*, *Syphacia muris*, *Enterobius vermicularis*, *Enoplus brevis* (имеют как *pbo-5*, так и *exp-1*). Квадрат – *Meloidogyne incognita*, *Ascaris suum*, *Thelazia callipaeda*, *Brugia malayi*, *Dracunculus medinensis*, *Gongylonema pulchrum*, *Trichuris suis*, *Trichinella spiralis*, *Soboliphyme baturini* (имеют *exp-1*, но отсутствует *pbo-5*).

Нами был разработан препарат, в котором кутикулу и гиподерму удаляли с поверхности нематод, позволяя мышечным клеткам контактировать с физиологическим раствором. Мышечные сокращения фиксировались при помощи видеокамеры. В экспериментах, представленных на Рисунке 24, подкисление среды вокруг задних мышц тела вызывало их сокращение для *E. brevis* (Рисунок 24Б), в то время как для *R. culicivorax* такой реакции не наблюдалось (Рисунок 24Д). Введение ацетилхолина вызывало сокращение мышц у обоих видов: как у *E. brevis*, так и у *R. culicivorax* (Рисунок 24В, Е). Контрольные эксперименты, в которых среда заменялась буферным раствором, не приводили к сокращениям, что исключает механический эффект сокращения мышц при замене среды (Рисунок 24А, Г). Процедуру Контроль, +рН6, +АЦХ с промежуточными промывками повторяли 4 раза с одинаковыми итоговыми результатами.

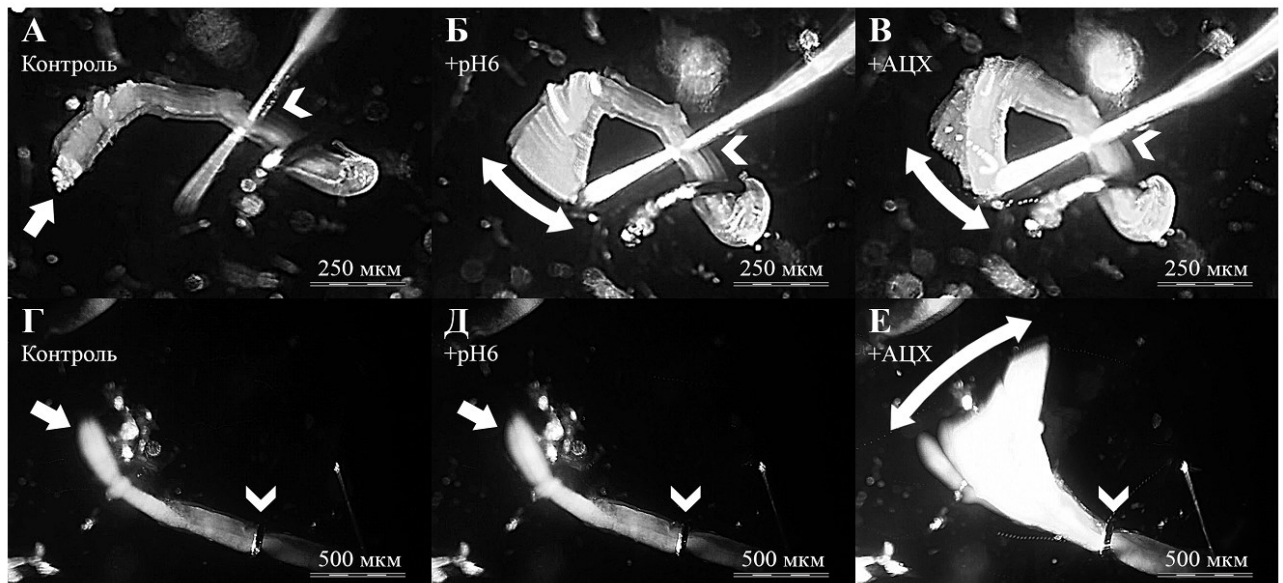


Рисунок 24 – Сокращение мышц тела нематод на различные химические агенты Временные проекции по максимальной интенсивности, показывающие влияние подкисления (+рН6 Б, Д) и ацетилхолина (+АЦХ В, Г) на сокращение мышц тела нематод *E. brevis* (А-В) и *R. culicivorax* (Г-Е). Препараты задней части тела с обнаженными мышцами закрепляли на подложке тонкими металлическими иглами или скобками (белый наконечник стрелы), фиксируя одну точку и позволяя

свободному концу (белая стрелка) свободно перемещаться. Между добавлением химических агентов проводилась отмывка. В течение всего эксперимента непрерывно проводилась видеозапись препарата; 30-секундные фрагменты после добавления химических агентов были разделены на кадры, и стопки изображений загружены в инструмент анализа изображений FIJI в систему Z-проекции, где за z было выбрано время или номер кадра с параметром максимальной интенсивности. При наличии сокращения или расслабления мышц вся траектория движения складывается (показано двойными стрелками). Добавление среды в контрольных экспериментах (Контроль А, Г), не дало эффекта. Применение подкисленной среды (+рН 6 Б, Д) активировало работу мышцы *E. brevis*, но не имело эффекта на *R. culicivora*. В положительном контроле при применении АЦХ (10^{-6} М) наличие сокращения наблюдалось у обоих видов (В, Е).

Эти физиологические эксперименты подтверждают наши биоинформатические предсказания о генах, связанных с ДМП у нематод. Таким образом, наше биоинформатическое и физиологическое исследование показывает, что сложный механизм ДМП, впервые обнаруженный у *C. elegans*, не является уникальным только для этого вида, а представляет собой характерное биологическое явление для нематод, возникшее у их общего предка.

ГЛАВА 6. НЕЙРОННЫЕ ФУНКЦИИ КЛЕТОК КИШЕЧНИКА НЕМАТОД

6. 1. Сходство нейронов и кишечных клеток нематоды *Caenorhabditis elegans*

Клетки кишечника нематод выполняют множество функций, сравнимых с работой нейронов (Рисунок 25). Цикл дефекации у нематод является уникальным биологическим часовым механизмом, который удивительно стабилен в широком диапазоне разнообразных экологических условиях, включая изменения температуры и количества пищи [34, 42, 129]. Интересно, что этот механизм может приостанавливаться при отсутствии пищи, но возвращается к своему регулярному ритму, как только условия становятся благоприятными [22, 111].

Известно, что периодическая моторная программа *C. elegans* может быть перезапущена двумя способами: через механическое воздействие или прямую электрическую стимуляцию клеток кишечника [20, 109]. Такая способность реагировать на внешние стимулы, напоминает функции афферентных сенсорных клеток в нервной системе. Наличие механочувствительного ионного канала PIEZO1 в кишечных клетках подтверждает эту гипотезу и демонстрирует, как клетки кишечника нематод могут выполнять функции, традиционно приписываемые нейронам.

Нейроны обмениваются информацией друг с другом и с другими клетками организма через синапсы, которые бывают двух типов: химические и электрические. Электрические синапсы основаны на прямой передаче сигнала через ЩК, что представляет собой относительно простой механизм. Так, в кишечнике нематоды особые электрические синапсы играют ключевую роль в координации связи между клетками и распространении сигналов о времени. Химический же синапс, напротив, может представлять собой сложную структуру с отдельными пресинаптическими и постсинаптическими аппаратами и его наличие в клетках кишечника нематоды остается открытым.

Для *C. elegans* не было обнаружено функциональных или анатомических синапсов между нервной системой и кишечником. Однако в клетках кишечника экспрессируются различные рецепторы нейротрансмиттеров, что является ключевой частью постсинаптического аппарата. Это предполагает, что передача сигналов посредством нейротрансмиттеров может происходить через экstrasинаптические рецепторы без синаптической структуры. Такой механизм основан на высвобождении нейротрансмиттера и его диффузии во внеклеточной жидкости.

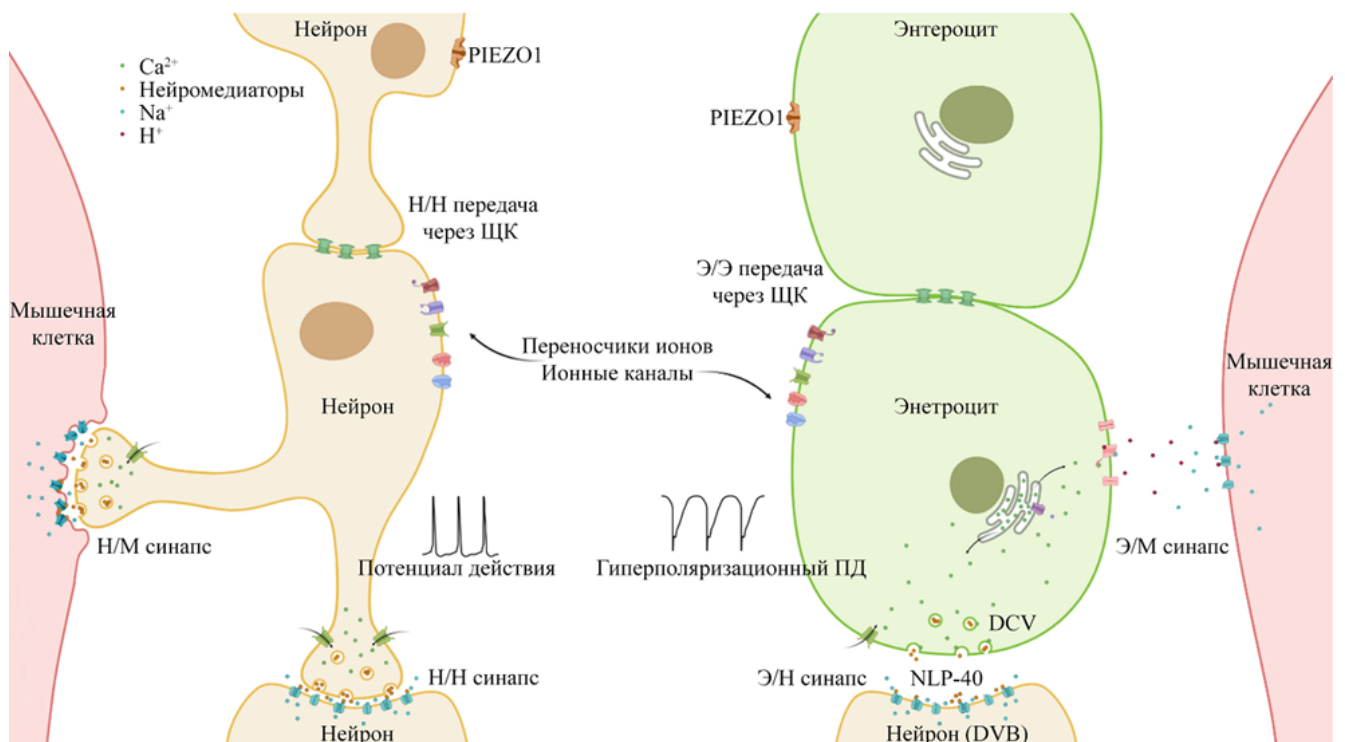


Рисунок 25 – Сравнение работы классического нейрона (бежевая, слева) и энтероцита кишечника нематоды (зеленый, справа) Оба типа клеток разделяют схожие механизмы передачи сигналов. После получения сигнала от внешних стимулов (например, от механочувствительного ионного канала PIEZO1), сенсорный нейрон передает сигнал другому нейрону посредством электрического синапса посредством ЩК (зеленые бочонки; Н/Н передача через ЩК) или посредством химического синапса (Н/Н синапс). Передача сигнала от нейронов к мышцам также включает химический синапс (Н/М синапс). Потенциал-зависимые

ионные каналы нейронов участвуют в генерации быстрого деполяризационного изменения МП, работающего по принципу всё-или-ничего (ПД). Аналогичный паттерн распространения сигнала прослеживается и для энтероцитов кишечника нематод. После получения сигнала от внешних стимулов (например, механочувствительного ионного канала PIEZO1), энтероцит передает сигнал дальше другому энтероциту посредством электрического синапса через ЩК (зеленые бочонки; Э/Э передача через ЩК). Передача сигнала к другим возбудимым тканям, включая нейроны, подразумевает формирование синапсов со сложным постсинаптическим аппаратом, зависимым от ионов Ca^{2+} . Э/Н синапс между энтероцитом и нейроном осуществляется при помощи медиатора NLP-40, а Э/М синапс между энтероцитом и мышечной клеткой посредством прямой ацидификации псевдоцеломического пространства и работой протонных рецепторов PBO-5/PBO-6. Сигнал, генерируемый энтероцитами нематоды является гиперполяризационным ПД – быстрым гиперполяризационным изменением МП, работающего по принципу всё-или-ничего. Оба типа клеток электрически активны и имеют множество различных ионных каналов на своих мембранах [75, 127, 128, 137]. Ионы Ca^{2+} и каналы Ca^{2+} окрашены в зеленый цвет. Нейромедиаторы окрашены в оранжевый цвет. Ионы Na^{+} и каналы Na^{+} (в основном рецепторы нейромедиаторов) окрашены в синий цвет. Ионы H^{+} и транспортеры H^{+} окрашены в малиновый цвет. ЭПР в энтероцитах кишечника, служащий основным хранилищем Ca^{2+} , окрашен зелено-белым, а IP_3R – пурпурным.

Таким образом, кишечник нематод потенциально может функционировать как приемник сигналов, передаваемых через нейротрансмиттеры. Механизмы передачи сигналов от клеток кишечника к другим клеткам в нематодах можно сравнивать с синаптическими функциями нейронов. Энтероциты кишечника, возбуждая мышечные клетки, функционально действуют подобно моторным нейронам. Выброс протонов как сигнальной молекулы не имеет аналогов в нейронных синапсах, однако протонные рецепторы мышечных клеток PBO-5/PBO-

б, вероятно, эволюционно произошли от обычных постсинаптических N-ацетилхолиновых рецепторов. Таким образом, клетки кишечника нематод обладают уникальным набором функций, которые делают их похожими на многозадачные нейроны.

6. 2. Исследование пресинаптического аппарата кишечника нематоды

В нашем исследовании мы использовали открытые данные секвенирования РНК ОК *C. elegans* для изучения генов, традиционно связанных с процессом передачи сигналов нейронами. Кишечник нематоды включает элементы пресинаптических механизмов, характерных для нейронов. Это открытие добавляет новые данные к сходству между клетками кишечника нематод и истинно нервными клетками, расширяя наше понимание сложности их функций.

Пресинаптический аппарат в клетках кишечника нематод, хотя и отличается от традиционных нейронных структур, выполняет схожие функции. В типичном нейроне электрический импульс (ПД) деполяризует мембрану и стимулирует поступление кальция из внеклеточного пространства, что, в свою очередь, активирует высвобождение нейротрансмиттера из синаптических везикул в синаптическую щель. У нематод ПД в ходе ДМП в клетках кишечника вызывает гиперполяризацию МП. И хотя полярность противоположна типичному нейронному или мышечному спайку, этот ГПД ДМП также приводит к увеличению концентрации кальция в клетке.

Гиперполяризация может быть вызвана открытием калиевых каналов, тогда как кальций втягивается в клетку через кальциевые каналы утечки возникающим градиентом потенциала. В этом смысле, кишечный пресинапс может функционировать аналогично обычному пресинапсу, где повышение концентрации кальция стимулирует высвобождение медиатора. Процесс высвобождения медиатора в обычном пресинапсе является вариантом экзоцитоза

или слияния везикул с плазматической мембраной клетки. Экзоцитоз или слияние везикул с плазматической мембраной является универсальными функциями клеток, однако современные данные показывают, что набор и относительные концентрации РНК, экспрессируемые генами, связанными с этим процессом, отличаются в нейронах по сравнению с другими типами клеток. Конкретные молекулярные механизмы, включая SNARE комплекс, играют ключевую роль в пресинаптической функции нейронов. Основная роль белков SNARE заключается в осуществлении слияния везикул с мембраной-мишенью.

Комплекс SNARE у млекопитающих состоит из четырех альфа-спиралей, образованных синаптобrevином, синтаксином и двумя альфа-спиралями SNAP (Sutton et al., 2013). Синаптотагмин служит кальций-зависимым пусковым механизмом экзоцитоза и основным триггером высвобождения нейротрансмиттера в синапсе (Рисунок 26).

Все перечисленные участники SNARE-комплекса, присутствующие у млекопитающих, имеют свои ортологи среди белков нематод [138, 139], что указывает на консервативность этих молекулярных механизмов в эволюции. Данные секвенирования РНК ОК генов, участвующих в процессе слияния везикул с плазматической мембраной у *C. elegans*, предоставляют ценную информацию о потенциальном SNARE-комплексе нематоды. Анализ данных секвенирования РНК ОК позволяет выявить относительную экспрессию этих генов в различных типах тканей, включая возбудимые и невозбудимые (Рисунок 27).

Синаптотагмины SNT-1 до SNT-7 в нематодах являются ортологами различных синаптотагминов человека, причем каждый из них выполняет уникальные функции, включая связывание с Ca^{2+} , фосфолипидами, SNARE и синтаксином. Эти белки активно участвуют в процессах, таких как дефекация, регуляция некротической смерти клеток и функционирование фаринкса, с высокой экспрессией в гонадах, нейронах, фаринксе и кишечнике.

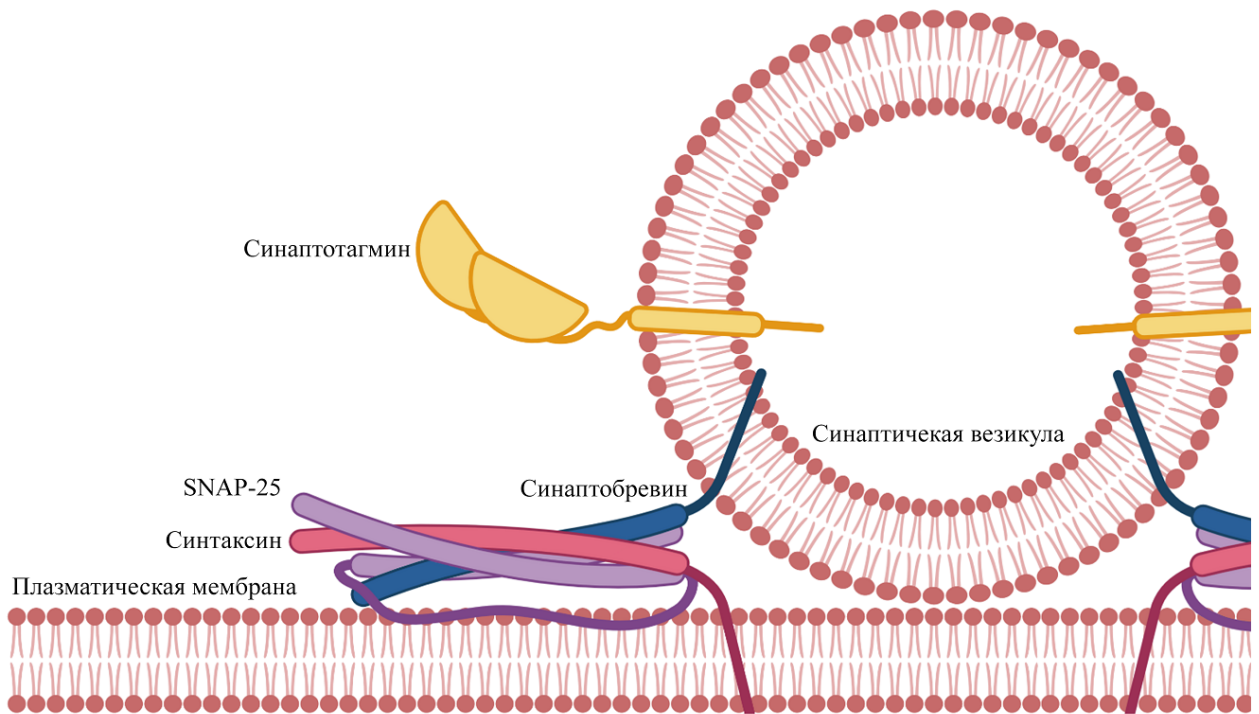


Рисунок 26 – Молекулярный механизм SNARE Комплекс из четырех альфа-спиралей: синаптобревина (синий), синтаксина (розовый) и двух альфа-спиралей SNAP (фиолетовый) связывающий плазматическую мембрану и синаптическую везикулу. Синаптотагмин (желтый) выступает в роли кальциевого сенсора, регулирует Ca^{2+} -зависимое слияние синаптических везикул с плазматической мембраной.

Синтаксины нематод, такие как SYX-2, SYX-3, SYX-4, SYX-5, SYX-6, SYX-16, SYX-17, SYX-18 и UNC-64, представляют собой ортологи различных синтаксинов человека и предположительно обладают SNAP-рецепторной и SNARE-связывающей активностью. Они задействованы в множестве процессов, включая экзоцитоз в химической синаптической передаче, цитокинез и развитие нервной системы. Самыми экспрессируемыми синтаксинами в кишечнике являются *sux-3* и *sux-2*, в то время как другие синтаксины имеют низкий уровень экспрессии.

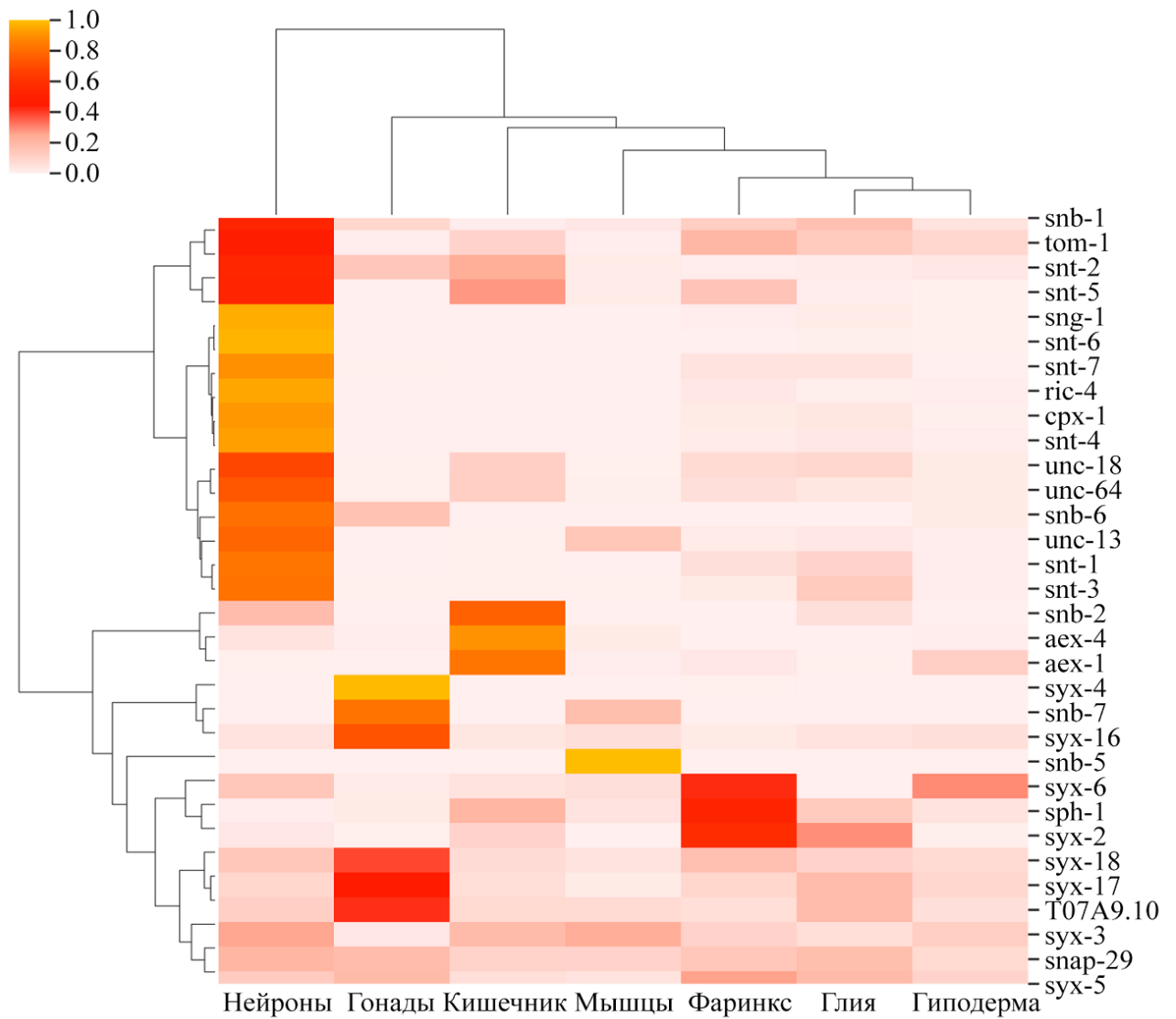


Рисунок 27 – Дифференциальная экспрессия генов пресинаптического комплекса *Caenorhabditis elegans* Кластерная карта с дендрограммой генов, связанных со слиянием везикул с плазматической мембраной (правая легенда), основанная на данных секвенирования РНК ОК. Для каждого гена в наборе было рассчитано соотношение экспрессии ткань/общее количество (относительная экспрессия) для сравнения уровней экспрессии генов между различными типами тканей (нейроны, гонады, гиподерма, фаринкс, мышцы, глия и кишечник [28]). Значение экспрессии для каждого гена в каждой ткани делилось на сумму значений экспрессии гена во всех тканях. Это значение варьируют от 0 до 1, а сумма значений для каждого гена равна 1. Более высокая интенсивность цвета

представляет более высокую экспрессию. Данные были кластеризованы и сопоставлены с помощью метода Уорда [125].

Белки SNB-1, SNB-2 и SNB-5, SNB-6, SNB-7 являются ортологами синаптобrevинов человека и предположительно также участвуют в процессах SNAP-рецепторной и синтаксин-связывающей активности. Они локализованы в аксонах нейронов, цитоплазматических везикулах и пресинаптических активных зонах. Высокая экспрессия *snb-2* в клетках кишечника нематод подчеркивает важность связывания везикул для этой ткани. Белки RIC-4, AEX-4, SNAP-29 нематод являются ортологами человеческих SNAP-23 и SNAP-25 и наряду с синтаксинами, предположительно обладают SNAP рецепторной и синтаксин связывающей активностью.

Наибольшие уровни экспрессии генов, связанных с этими процессами, также отмечается в нейронах. Однако в клетках кишечника нематод выявлены три гена с сильно дифференцированной экспрессией, связанными со слиянием везикул с плазматической мембраной: *snb-2*, *aex-4* и *aex-1*. Белки SNB-2 и AEX-4, предположительно, обладают SNAP-рецепторной и синтаксин-связывающей активностью. AEX-4 участвует в регуляции процессов, специфичных для кишечника, таких как дефекация и секреция белка AEX-5, и играет роль в восходящей системе ГАМКэргической сигнализации GPCR [121]. AEX-1 задействован в процессе дефекации и сокращения мышц передней стенки тела, а также контролирует локализацию UNC-13, что важно для слияния синаптических везикул с мембраной. SNB-2, по-видимому, является единственным синаптобrevином с высокой экспрессией в клетках кишечника. SNT-2 и SNT-5, возможно, являются функциональными синаптотагминами в кишечном «синапсе», особенно учитывая, что SNT-2 и SNT-5, как было показано, способствуют высвобождению нейропептидоподобного белка NLP-40 в энтероцитах [39, 140].

SNG-1 и SPH-1 у нематод являются ортологами человеческих белков синаптогирина и синаптофизина соответственно. SNG-1, интегральный мембранный белок, ассоциированный с пресинаптическими везикулами в нейронах, предположительно выполняет функцию синаптической пластичности. SPH-1, обладающий синтаксин-связывающей активностью, локализуется на цитоплазматических везикулах.

Важными участниками процесса слияния везикул с плазматической мембраной являются белки UNC-18, TOM-1, T07A9.10, UNC-13, и CPX-1. UNC-18, ортолог человеческого STXBP1 и гомолог *munc-18* млекопитающих, принадлежит к семейству SEC1/MUNC-18 белков. Он играет ключевую роль в слиянии везикул с плазматической мембраной и аксональном транспорте, влияя на синтез и поддержание нормального уровня ацетилхолина. Высокая экспрессия гена *unc-18* в нервной ткани и кишечнике нематод подчеркивает его значимость в процессах экзоцитоза в обоих типах клеток.

TOM-1 и T07A9.10 также функционируют как синтаксин-связывающие белки. Предсказано, что TOM-1 выполняет множество функций, включая связывание синтаксина, Rab GTPase, регуляцию экзоцитоза и прайминг синаптических везикул. UNC-13, ортолог человеческих UNC13A и UNC13B, обладает кальмодулин-связывающей и синтаксин-связывающей активностью. Он участвует в экзоцитозе синаптических везикул, формирует комплекс с RIM и играет роль в развитии ооцитов и регуляции фаринкса. Активация UNC-13 DAG-ом необходима для поддержания высокой скорости синаптической передачи в условиях длительной повторяющейся стимуляции.

unc-18, *unc-64*, *tom-1*, *t07a9.10* и *sph-1* имеют значительный уровень экспрессии в клетках кишечника и также могут быть частью синаптического аппарата.

CPX-1, ортолог человеческого комплексина, играет ключевую роль в позднем этапе экзоцитоза синаптических везикул. В присутствии Ca^{2+} CPX-1

замещается синаптотагмином. CPX-1 позволяет белковому комплексу SNARE связывать синаптическую везикулу с пресинаптической мембраной. В одной конформации комплексин ингибирует слияние везикул с плазматической мембраной, перехватывая SNARE комплексы, а в другой конформации он высвобождает SNARE, способствуя активации синаптотагмина и запуску процесса слияния синаптических пузырьков с плазматической мембраной и высвобождения нейротрансмиттеров.

В ходе эволюции кишечник нематоды, являющийся одним из ключевых органов, развил ряд необычных функций. Эти функции включают управление сокращением мышц тела и инициацию системного некроза целого организма, требующие быстрой и надежной передачи сигналов. В этом контексте клетки кишечника адаптировались к выполнению функций, схожих с теми, что выполняют сенсорные нейроны, собирая стимулы из окружающей среды, и интернейроны, распространяя внутренние или внешние сигналы на другие энтероциты или нейроны. Кроме того, они могут имитировать функции мотонейронов, передавая сигналы мышцам.

Даже сложные синаптические механизмы в той или иной степени представлены в энтодермальных клетках кишечника нематод. Исследования, основанные на данных секвенирования РНК ОК, показывают, что гены, необходимые для функционирования постсинаптического аппарата и процессов экзоцитоза, присутствуют в клетках кишечника нематод, хотя и не так многочисленно и с не таким высоким уровнем экспрессии, как в нервной ткани.

Таким образом, находки позволяют провести параллель между клетками кишечника нематод и возбудимыми клетками, такими как нейроны или мышечные клетки. Они открывают новый взгляд на эволюцию нейронов и стимулируют к переосмыслению того, что мы понимаем под возбудимыми клетками, расширяя традиционные представления о функциях и возможностях различных клеточных типов.

ГЛАВА 7. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

7. 1. Культуры нематод

Heterorhabditis megidis

Нематод данного вида, использованных во всех описанных выше исследованиях, содержали при комнатной температуре (22-23°C). Нематодная культура взрослых гермафродитов энтомопатогенной нематоды было предоставлена Центром паразитологии Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, лабораторией д.б.н С.Е. Спиридонова. Нематоды были получены выращиванием внутри организма хозяина – пчелиной огневки *Galleria mellonella*. Вскрытие личинки пчелиной огневки для получения взрослой особи происходит на 3-5 дней после заражения L1 стадией. Исследования проводили в растворе Хенкса (137 мМ NaCl, 5,4 мМ KCl, 0,25 мМ, Na₂HPO₄, 0,44 мМ KH₂PO₄, 1,3 мМ CaCl₂, 1,0 мМ MgSO₄, 4,2 мМ NaHCO₃; 1 мМ HEPES; pH = 7,4) при 22-23 °С. В экспериментах использовались особи с длиной тела от 1 до 4 мм, статистических данных по выборке, за исключением экспериментов по длительности периода ритма, не проводилось. Нематоды подходящего размера случайным образом отбирались из группы животных, содержащихся в одинаковых условиях культивирования.

Enoplus brevis

Нематод данного вида, использованных как в поведенческо-физиологических, так и в электрофизиологических исследованиях, содержали в морской воде соленостью 20 ‰ при температуре 4°C. Эксперименты проводились при температуре 15-17°C. Нематоды *E. brevis* и морская вода были получены с песчаной литорали на Беломорской биологической станции РАН «Картеш» летом 2017 и 2018 гг. Исследования проводили в фильтрованной Millipore стерильной

морской воде (буфер 1 мМ HEPES pH 7). Исследовались крупные представители: взрослые особи и молодь четвертой стадии, длиной 6-8мм, статистических данных по выборке не проводилось. Нематоды подходящего размера случайным образом отбирались из группы животных, содержащихся в одинаковых условиях культивирования.

Romanormis culicivorax

Нематод данного вида, использованных в физиологических экспериментах, содержали при комнатной температуре (22-23°C). Взрослые особи были собраны из личинок хирономид (комары-звонцы или озерные мухи), полученных зоомагазине летом 2018г. Исследования проводили в растворе Хенкса (137 мМ NaCl, 5,4 мМ KCl, 0,25 мМ, Na₂HPO₄, 0,44 мМ KH₂PO, 1,3 мМ CaCl₂, 1,0 мМ MgSO₄, 4,2 мМ NaHCO₃; 1 мМ HEPES; pH = 7,4) при 22-23 °C. Исследовались крупные взрослые особи, длиннее 8мм, статистических данных по выборке не проводилось. Нематоды подходящего размера случайным образом отбирались из группы животных, содержащихся в одинаковых условиях культивирования.

7. 2. Препарирование и микрохирургия

Препарирование *H. megidis* для электрофизиологических экспериментов проводили при комнатной температуре (22-23°C) под стереомикроскопом МБС-1, оснащенный объективом 4x и 12,5x окулярами. Кишечник нематод *H. megidis* составляет примерно 90% длины тела. Количество кишечных клеток оценивалось как 24-28. Кишечник выделяли с помощью набора микроножниц WPI или режущего лезвия WPI в чашке Петри с твердой 1,5% агарозой на основе раствора Хенкса. Для предотвращения высыхания препарат заливали 1 мм слоем раствора Хенкса. Для минимального повреждения клеток кишечника нематоды

производился аксиальный разрез. Таким образом под действием внутреннего гидростатического давления происходил выброс кишечника и гонад. Остатки кутикулы удалялись при помощи микропинцетов WPI и DUMONT #55. В зависимости от типа эксперимента выбиралась передняя, задняя часть кишечника нематоды или только небольшая группа кишечных клеток. Получившийся препарат при помощи микропипеток Sarstedt Transfer pipette 1ml, обработанных БСА перемещали в чистую чашку Петри с твердой 1,5% агарозой на основе раствора Хенкса и 1 мм слоем раствора Хенкса. Только около четверти препарированных нематод, демонстрируют колебания МП, регистрируемые на микроэлектродной установке.

При подготовке препаратов *E. brevis* для электрофизиологических экспериментов, препарирование проводилось при температуре 15-17°C под стереомикроскопом МБС-1, оснащенным объективом 4x и 12,5x окулярами. Препарирование осуществлялось при помощи набора микроножниц WPI или режущего лезвия WPI и микропинцетов WPI и DUMONT #55 посредством аксиального разреза. Под действием внутреннего гидростатического давления и дополнительных рассечений заточенными вольфрамовыми иглами осуществлялся доступ к клеткам кишечника нематоды. Препарат помещался в чашку Петри, дно которой покрыто твердой 1% агарозой на основе фильтрованной Millipore стерильной морской воды (буфер 1 мМ HEPES pH 7). Для предотвращения засыхания чашка Петри заливалась фильтрованной буферизированной (pH = 7,4) морской водой соленостью 20 ‰.

При подготовке препаратов *E. brevis* и *R. culicivora* для физиологических экспериментов, препарирование проводилось при комнатной температуре (22-23°C) под стереомикроскопом МБС-1, оснащенным объективом 4x и 12,5x окулярами. Заднюю часть тела нематоды, полученную при помощи аксиального разреза и содержащую мышцы тела, продольно рассекали с помощью набора микроножниц WPI или режущего лезвия WPI и микропинцетов WPI и DUMONT #55 в чашке Петри, дно которой покрыто силиконовой резиной Sylgard (Sylgard

184, Dow Corning). Препарат, в том числе мышцы закрепляли тонкими металлическими иглами и скобами, фиксируя одну точку ближе к хвосту нематоды и позволяя свободно двигаться рассечённой части тела. Для предотвращения засыхания чашка Петри заливалась раствором Хенкса для *R. culicivora* и фильтрованной буферизированной (pH = 7,4) морской водой соленостью 20 ‰ для *E. brevis*.

7. 3. Электрофизиология

Для нематод *H. megidis* все электрофизиологические регистрации проводились в чашках Петри или ванне при комнатной температуре (22-23°C) под стереомикроскопом МБС-1, оснащенный объективом 4x и 12,5x окулярами. Electrodes с сопротивлением 20-40 МОм изготавливали из тонкостенных стеклянных капилляров (TW120F-3; WPI) с использованием магнитного пуллера с нагревателем (ЭМИБ МЭ-3). В установке использовались ручные микроманипуляторы для управления электродами, заполненными 2М раствором KCl или ацетата К. Стандартным внеклеточным раствором являлся раствор Хенкса (137 мМ NaCl, 5,4 мМ KCl, 0,25 мМ, Na₂HPO₄, 0,44 мМ KH₂PO, 1,3 мМ CaCl₂, 1,0 мМ MgSO₄, 4,2 мМ NaHCO₃; 1 мМ HEPES), доведенный с помощью NaOH до pH=7,4. Химические вещества были получены от компании Sigma-Aldrich. Потенциалы растворов были рассчитаны и скорректированы перед каждой регистрацией. Для проведения экспериментов *in-vivo* на нематодах *H. megidis* препарат целого животного заливался тонким плотным слоем агарозного геля температурой 30°C, что сдерживало движения животного. В таких экспериментах неизбежен некоторый шум из-за остаточного движения нематоды.

Для регистрации использовалась микроэлектродная установка, состоящая из амплификатора Axoclamp 2B (Axon Instruments) и амплификатора Oocyte clamp OC-725C (при необходимости четырех электродной регистрации) соединенного с

головками HS-2A-x1LU и HS-2A-x0.1LU и держателями микроэлектродов. Емкостная компенсация была оптимизирована в состоянии покоя. При необходимости инъекции тока, разница потенциалов регистрировалась через другой – регистрирующий электрод. Для проверки качества отведения могли производиться кратковременные импульсы тока силой до -10мВ. Получаемые аналоговые данные фильтровались от возникающих шумов для каждого сигнала индивидуально и оцифровывались посредством АЦП DigiData 1200 series на частоте от 1 до 10 кГц в зависимости от эксперимента. Регистрация и наблюдение обеспечивались программным обеспечением pCLAMP (Molecular Devices, США).

Регистрация коэффициента связи клеток проводится тремя и более электродами. Два электрода токовый и регистрирующий помещаются в одну клетку, третий регистрирующий электрод отводится от соседней клетки. Через токовый электрод подается импульс тока. В ответ происходит отклонение МП как в инъецируемой клетке, так и в соседних, регистрируемое вторым и третьим электродами. Коэффициент связи клеток высчитывается как отношение изменения МП соседних клеток к инъецируемой. Большое количество электродов позволяет сравнить регистрируемый коэффициент связи удаленных клеток и коэффициент связи, высчитанный при помощи возведения в степень коэффициента, регистрируемого для соседних клеток. Регистрация изменений МП без инъекции тока, гиперполяризация и деполяризация различной длительности и величины были осуществлены при помощи встроенных в амплификатор Axoclamp 2B функций.

Эксперименты с фиксацией потенциала были проведены при помощи амплификатора Axoclamp 2B с использованием встроенного ручного управления фиксацией. При помощи амплификатора Axoclamp и стимулятора Alvar Physiovar для измерения сопротивления клеточной мембраны и проводимости, как обратной величины к сопротивлению, подавали короткие (0,5 сек.) повторяющиеся импульсы тока каждые 1,5 сек. (Рисунок 28). Исходя из регистрируемых данных изменения МП и подаваемого импульса тока, сопротивление и проводимость

клеточной мембраны рассчитывались по закону Ома. Для получения более точных результатов при сильных искривлениях кривой выборка точек производилась максимально близко к интервалу времени, соответствующему искусственному импульсу тока.

Электрофизиологические эксперименты на нематодах *E. brevis* проводились при температуре 15-17°C. Препарат клеток кишечника помещался в чашку Петри с дном, покрытым 1% агарозным гелем, приготовленным на морской воде и залитым слоем фильтрованной буферизованной морской воды под стереомикроскоп МБС-1, оснащенный объективом 4x и 12,5x окулярами. Отведения от клеток кишечника осуществлялись стеклянными электродами с сопротивлением 20-40 МОм, заполненных 2,5М КСl (сопротивление 20-60 МОм), полученных из тонкостенных стеклянных капилляров (TW120F-3; WPI) с использованием магнитного пуллера с нагревателем (ЭМИБ МЭ-3). В установке использовались ручные микроманипуляторы для управления электродами, заполненными 2,5М раствором КСl. Химические вещества были получены от компании Sigma-Aldrich. Для регистрации использовалась микроэлектродная установка, состоящая из амплификатора Axoclamp 2B (Axon Instruments) соединенного с головками HS-2A-x1LU и HS-2A-x0.1LU и держателями микроэлектродов. Емкостная компенсация была оптимизирована в состоянии покоя. При необходимости инъекции тока, разница потенциалов регистрировалась через другой – регистрирующий электрод. Для проверки качества отведения могли производиться кратковременные импульсы тока силой до -5мВ. Получаемые аналоговые данные фильтровались от возникающих шумов для каждого сигнала индивидуально и оцифровывались посредством АЦП LCard E-154, предоставляющем цифровые данные в программу записи и обработки LGraph2 (URL: www.lcard.ru) на частоте от 1 до 10 кГц в зависимости от эксперимента.

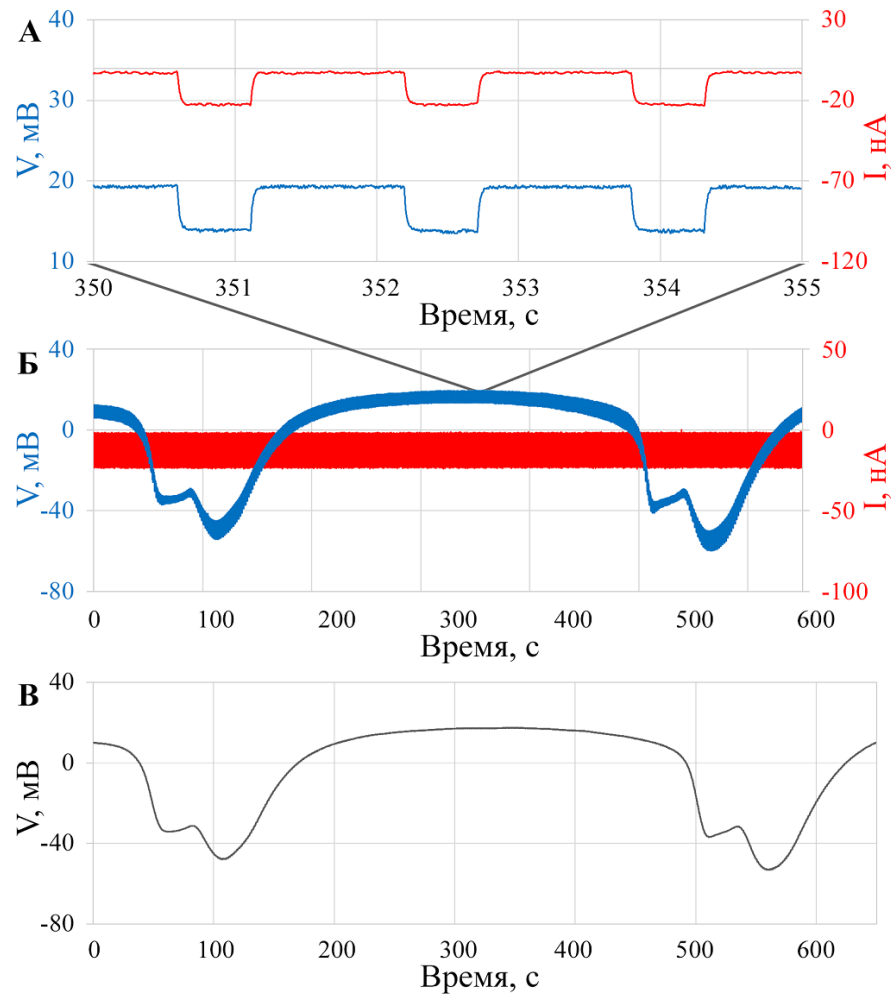


Рисунок 28 – Измерение проводимости мембраны клеток кишечника нематод. А. Пятисекундный фрагмент полного графика зависимостей тока от времени и изменения потенциала от времени. Небольшие искусственные импульсы тока приводят к изменению МП в клетках препаратов изолированного кишечника. Б. Исходный график зависимостей тока от времени и изменения потенциала от времени длительностью в 1 цикл. В. Сглаженный график зависимостей тока от времени и изменения потенциала от времени длительностью в 1 цикл. Данные с токового электрода – красного цвета, с электрода измеряющего МП – синего цвета.

7. 4. Видеодетекция поведения и микроскопия

Для наблюдения за поведением нематоды *H. megidis*, а именно за рВос, использовалась система, состоящая из микроскопа Olympus BX-51, оснащенного различными объективами, увеличением от 4х до 100х, окулярами 10х и камеры Olympus XC10 с возможностью 10х кратного оптического увеличения. Отдельные нематоды на стадиях L4 или взрослые особи, размером 2-3мм, были перенесены при помощи микропипеток Sarstedt Transfer pipette 1ml, обработанных БСА, на индивидуальные предметные стекла в капле раствора Хенкса (137 мМ NaCl, 5,4 мМ KCl, 0,25 мМ, Na₂HPO₄, 0,44 мМ KH₂PO, 1,3 мМ CaCl₂, 1,0 мМ MgSO₄, 4,2 мМ NaHCO₃; 1 мМ HEPES), рН=7,4. Для уменьшения передвижения нематоды пространство ограничивалось парафином, при необходимости длительных записей и предотвращения высыхания препарат накрывался покровным стеклом с высокими ножками. Запись производилась в разрешении 640х480 пикселей в оттенках серого с частотой кадров равной 10. Обработка записанных видеоданных на наличие рВос проводилась вручную. При проведении экспериментов in-vivo на нематодах *H. megidis* запись видео на микроскопе МБС-1 не проводилась, регистрация рВос осуществлялась визуально в режиме реального времени.

Для введения флуоресцентных красителей в клетки кишечника нематоды использовалась микроэлектродная установка, состоящая из амплификатора Axoclamp 2B (Axon Instruments) соединенного с головками HS-2A-x1LU и HS-2A-x0.1LU и держателями микроэлектродов. проводились в чашках Петри или ванне при комнатной температуре (22-23°C) Инъекции проводились под стереомикроскопом МБС-1, оснащенный объективом 4х и 12,5х окулярами. Электроды изготавливали из тонкостенных стеклянных капилляров (TW120-3; WPI) с использованием магнитного пуллера с нагревателем (ЭМИБ МЭ-3). Один из электродов заполнялся разведенным флуоресцентным красителем: 0,1М раствором KCl, содержащим 3% карбоксифлуоресцеина, или 0,1М раствором LiCl, содержащим 3% люцифер желтый СН. Инъекцию красителя в клетку кишечника

проводили с помощью длительной искусственной гиперполяризации током в -10нА в течение 5 минут. За это время краситель преимущественно оказывался только в инъецируемой клетке. Последующее распространение красителя между клетками было пассивным. Клетки кишечника, инъецированные флуоресцентными красителями, изучали с помощью микроскопа Olympus BX-51, оснащенного различными объективами, увеличением от 4х до 100х, окулярами 10х и камеры Olympus XC10 с возможностью 10х кратного оптического увеличения. Объекты исследования были перенесены на общее предметное стекло при помощи микропипеток Sarstedt Transfer pipette 1ml, обработанных БСА, в капле раствора Хенкса (137 мМ NaCl, 5,4 мМ KCl, 0,25 мМ, Na₂HPO₄, 0,44 мМ KH₂PO, 1,3 мМ CaCl₂, 1,0 мМ MgSO₄, 4,2 мМ NaHCO₃; 1 мМ HEPES), pH=7,4. Для предотвращения высыхания препарат накрывался покровным стеклом с высокими ножками. В системе используется флуоресцентный контроллер Olympus U-RFL-T набором фильтров WIB, WG, GFP, DAPI. Как для карбоксифлуоресцеина с пиками возбуждения и испускания около 492 нм и 517 нм соответственно, так и для люцифер желтый CN с возбуждением около 425 нм и испусканием около 528 нм использовался фильтр GFP. Наблюдения за распространением люцифер желтый CN проводились в течение каждой минуты первые пять минут после инъекции. Наблюдения за распространением карбоксифлуоресцеина проводились в течение каждой минуты первые пять минут после инъекции, а далее на 10й, 30й, 60й и 120й минутах после инъекции. Все реагенты, используемые в эксперименте, были получены в компании Sigma-Aldrich.

Регистрация ответной реакции на фармакологическое воздействие на мышцы задней части тела нематод *E. brevis* и *R. culicivora* происходило на веб-камеру Logitech HD Pro C920 посредством оригинального программного обеспечения Logitech Capture. Камера, закрепленная на системе штативов, подводилась к 12,5х окулярам стереомикроскопа МБС-1, оснащенного объективом 4х. Параметры контрастности и резкости были увеличены, запись производилась в оттенках серого с частотой 30 кадров в секунду и разрешением 1920x1080. В опытах по

изучению действия ацетилхолина (АЦХ) на мышцы задней части тела, АЦХ с конечной концентрацией 10^{-6} М добавляли при помощи микропипеток Sarstedt Transfer pipette 1ml в общий объем раствора чашки Петри. При изучении влияния изменения рН, при помощи микропипеток Sarstedt Transfer pipette 1ml среду в чашке Петри заменяли на аналогичную среду, забуференную до рН 6. Наличие или отсутствие сокращений мышц записывали на видео. Все реагенты, используемые в эксперименте, были получены в компании Sigma-Aldrich.

Фотографии отдельных особей нематод *H. megidis* и *E. brevis* были сделаны на микроскопе Olympus BX-51 с различными объективами, увеличением от 4x до 100x, окулярами 10x и камерой Olympus XC10 с возможностью 10x кратного оптического увеличения. Для подсчета количества клеток кишечника нематод и анализа их размера производилась окраска бромистым этидием. Ткани нематод и особенно их кутикула сильно флуоресцируют в зелёной области спектра, поэтому популярные красители на ДНК вроде DAPI и Hoechst 33258 не подходят, так как их не видно на ярком автофлуоресцентном фоне. Подготовка препаратов происходит по протоколу. Нематод 30 минут фиксируют в 4% формальдегиде на фосфатном буфере и 30 минут окрашивают 0,001% раствором бромистого этидия. Красящий раствор содержит 1% неионного детергента Triton X-100, необходимый для облегчения проникновения красителя через мембрану клетки. Для анализа флуоресценции используется флуоресцентный контроллер Olympus U-RFL-T набором фильтров WIB.

При получении изображений и видеоматериалов нематод для дальнейшего анализа наблюдались только те моменты времени, в течение которых червь находился в поле зрения и не находился в полностью свернутом виде.

7. 5. Биоинформатика

Кладограмма и филогенетическое дерево

Кладограмма с разметкой наличия ортологичных к *C. elegans* генов ДМП была построена на основе кладогаммы URL: <https://www.nature.com/articles/32160> и идентификации белков нематод, гомологичных белкам генов, вовлеченных в ДМП нематоды *C. elegans*. Идентификацию проводили путем анализа последовательностей с помощью программы BLASTP и баз данных белков WormBase ParaSite (URL: <https://parasite.wormbase.org>) и NCBI (URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Белки, найденные в результате анализа BLASTP с использованием генов, вовлеченных в ДМП *C. elegans*, были проверены на ортологичность методом ВВН [134], определяющим пары генов в двух разных геномах, более похожие друг на друга, чем на любой другой ген в противоположном геноме. Полученные таким образом лучшие пары считались ортологичными. Процедура была использована для четырех значимых для ДМП белков, найденных у 18 различных видов. В случае нематоды *E. brevis* имеющиеся транскриптомные данные (ERR660661 из NCBI BioProject PRJEB7588) были собраны с помощью программы Trinity [141], а транслированные открытые рамки считывания извлечены из транскриптов с помощью TransDecoder [142]. Вид *Homo sapiens* отобран как аутгруппа.

Филогенетическое дерево нематод было построено на выборке генов никотиновых ацетилхолиновых, ГАМК, глициновых, глутаматных, серотониновых и других Cys-loop рецепторов. Вид *Homo sapiens* отобран как аутгруппа. В выборку попали только нематоды с наличием одного из белков EXP-1 или PBO-5. Полученная белковая коллекция была выровнена программой MUSCLE [143], а итоговое филогенетическое дерево было построено на основе алгоритма neighbour-joining.

UMAP

UMAP [124] на данных экспрессии генов на ткань взяты из публикации [28]. Протокол анализа данных и построения UMAP доступен по ссылке (URL: <https://scanpy.readthedocs.io/en/stable/tutorials/basics/clustering-2017.html>).

Аннотация от клетки к ткани была получена из исходного набора данных. Для построения UMAP использовались первые шесть главных компонент анализируемого пространства; количество соседей для каждой точки в расчетах установлено было равным 15. Анализ был проведен с помощью библиотек SCANPY и SEABORN [126] (URL: <https://zenodo.org/record/883859#.Xc1b-1czaHs>) для Python 3.

Кластерная карта с дендрограммой

Таблицы UMI на клетку и экспрессии генов на ткань были взяты из [28]. Для построения кластерной карты с для каждого гена было рассчитано соотношение экспрессии гена в специфичной ткани к общей экспрессии этого гена. Значение экспрессии для каждого гена в каждой ткани делилось на сумму всех значений экспрессии гена для каждой ткани. Полученные значения варьируются от 0 до 1, сумма для каждого гена равна 1. Дендрограмма построена на основе кластеризации по методу Уорда [125].

7. 6. Анализ данных

Электрофизиология

Статистика, и построение графиков проводились с использованием OriginPro 9.1 (OriginLab), Microsoft Excel 2019 и SimInTech (simintech.ru). Характеристики периодического процесса усреднялись без учета начала (момент отведения) и конца (ухудшение отведения или состояния клеток кишечника) эксперимента.

При анализе электрофизиологических данных, записанных с высокой частотой данных, могла происходить децимация с коэффициентами 10 и 100, необходимая для уменьшения размера файла и скорости обработки сигнала.

Видеодетекция поведения

Анализ поведения был выполнен с использованием скриптов программы анализа изображений FIJI [144]. Для выполнения анализа исследуемый 30-секундный видеофрагмент изначально покадрово разбивался на серию изображений. Итоговые изображения загружались в программу FIJI и формировались в стек. На основе алгоритма Z-projection (проекция по оси z – время или в нашем случае номер кадра) с параметром максимальная интенсивность получалось итоговое изображение. Таким образом, все варианты расположения нематоды отражались на финальной проекции и наличие сокращений, а также их амплитуда оказывались легко детектируемы.

Статистика и воспроизводимость

Размеры выборок в экспериментах не подбирались на основе статистических методов. Подопытные организмы были случайным образом отобраны из группы животных, содержащихся в одинаковых условиях. Исследователи не были слепы к распределению во время экспериментов и оценке результатов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследований было выявлено наличие необычного изменения МП в клетках кишки нематоды *Heterorhabditis megidis*, представленного как модельный организм. Были зарегистрированы и проанализированы базовые характеристики ритма и сопоставлено реальное поведение с наблюдаемыми клеточными процессами. Была построена простейшая модель наблюдаемых осцилляций и представлены потенциальные молекулярные участники механизма.

Проведено эволюционное исследование, в ходе которого было показано, что наблюдаемые изменения присущи всему филуму Nematoda и, вероятно появились у общего предка. Физиологические эксперименты подтверждают биоинформатические предсказания о генах, связанных с ДМП.

Хотя эндодерма обычно не считается возбудимой тканью, электрические волны в кишечнике нематод напоминают потенциалы действия в возбудимых клетках. Исследование демонстрирует параллели между клетками кишечника нематод и возбудимыми клетками, такими как нейроны или мышечные клетки, расширяя традиционные представления о функциях различных клеток.

Дальнейшие исследования могут быть направлены на использование различных химических агентов и специфичных сред для получения более детальной информации о вовлеченности и свойствах предсказанных белков.

Выводы

1. Обнаружен новый тип ритмического изменения МП в новой модельной системе, нематоды – *Heterorhabditis megidis*. Обнаруженные изменения удивительно схожи с классическим ПД возбудимых клеток, имеют обратную полярность, схожую амплитуду и намного больший период колебаний. Синхронизация процесса и передача сигнала от клетки к клетке в исследуемой

системе происходит посредством ШК, обеспечивающих высокий коэффициент электрической связи.

2. Механизм исследуемого ритмического поведения показывает двоякую природу. Некоторые характеристики работы ЦГП являются потенциал-зависимыми, как например, возможность перезапуска при сильной краткосрочной гиперполяризации или замедление/ускорение ритма продолжительной деполяризации/гиперполяризации соответственно. Помимо этого, есть и потенциал-независимый аспект. Осцилляции продолжаются даже в экспериментах с продолжительной фиксацией потенциала на различных уровнях. Наблюдаемые колебания МП синхронизованы с кальциевой волной в клетках кишечника и наблюдались как в целом организме, зафиксированном в агарозном геле, так и в системе из нескольких изолированных клеток, так и в фрагментах передней или задней части нематоды.

3. На основании изменения базовых характеристик ритмического процесса с течением времени, исследуемый процесс был поделен на 6 фаз. Опираясь на эти данные для энтодермальных клетках нематоды *H. megidis*, была создана простейшая модель, включающая три типа проводимости (три типа ионных каналов). Для каждого типа проводимости были представлены возможные участники данного процесса, предсказанные учитывая известные литературные данные и биоинформатический анализ баз данных и данных scRNA-seq. Учитывая литературные данные и проведенные исследования, было показано, что ДМП является более комплексным процессом, чем генерация внутриклеточных колебаний МП и показана схожесть исследуемого процесса с процессами в классических возбудимых тканях. Сгенерированный в энтодермальных клетках потенциал способен передаваться от клетки к клетке. Передача осуществляется как за счет электрических связей между клетками, обусловленных ШК, так и при помощи выброса медиаторов из клеток кишечника.

4. На основе анализа наличия белков, вовлеченных в ДМП сделано предсказание наличия и разнообразия механизма у эволюционно отдаленных видов

нематод и проведено фармакологическое физиологическое исследование, подтверждающее полученные в ходе анализа данные. Показано наличие схожего ультрадианного ритма и подсчитаны базовые характеристики осцилляций для изменения МП нематоды *E. brevis*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Дефекационная моторная программа – ДМП

Центральный генератор паттернов – ЦГП

Гиперполяризационный потенциал действия – ГПД

Деполаризационный потенциал действия – ДПД

Мембранный потенциал - МП

Потенциал действия – ПД

Щелевые контакты – ЩК

Метод двунаправленного поиска лучших совпадений – ВВН

Первая фаза ДМП, сокращение дорзальных и вентральных мышц задней части тела – рВос

Вторая фаза ДМП, сокращение дорзальных и вентральных мышц передней части тела – аВос

Третья фаза ДМП, сокращение энтеральных и кишечных мышц – Ехр

ОК – одиночные клетки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hodgkin A.L., Huxley A.F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve // *The Journal of Physiology*. — 1952. — No. 117. — P. 500-544.
2. Del Castillo J., De Mello W.C., Morales T. Hyperpolarizing action potentials recorded from the oesophagus of *Ascaris lumbricoides* // *Nature*. — 1964. — Vol. 203. — P. 530-531.
3. Byerly L., Masuda M.O. Voltage-clamp analysis of the potassium current that produces a negative-going action potential in *Ascaris* muscle. // *The Journal of Physiology*. — 1979. — Vol. 288. — No. 1. — P. 263-284.
4. Del Castillo J., Morales T. The electrical and mechanical activity of the esophageal cell of *Ascaris lumbricoides* // *The Journal of General Physiology*. — 1967. — Vol. 50. — No. 3. — P. 603-629.
5. Miller J.L., Sheridan J.D., White J.G. Electrical responses by guinea pig megakaryocytes // *Nature*. — 1978. — Vol. 272. — No. 5654. — P. 643-648.
6. Gibbins J.M., Mahaut-Smith M.P., Martyn P. Platelets and Megakaryocytes. — Springer Nature. — 2004.
7. Okada Y., Tsuchiya W., Yada T. Calcium channel and calcium pump involved in oscillatory hyperpolarizing responses of L-strain mouse fibroblasts // *The Journal of Physiology*. — 1982. — Vol. 327. — No. 1. — P. 449-461.
8. Crane G.J., Neild T.O., Segal S.S. Contribution of active membrane processes to conducted hyperpolarization in arterioles of hamster cheek pouch // *Microcirculation*. — 2004. — Vol. 11. — No. 5. — P. 427-435.
9. Domeier T.L., Segal S.S. Electromechanical and pharmacomechanical signalling pathways for conducted vasodilatation along endothelium of hamster feed arteries // *The Journal of Physiology*. — 2007. — Vol. 579. — No. 1. — P. 175-186.
10. Emerson G.G., Segal S.S. Endothelial cell pathway for conduction of hyperpolarization and vasodilation along hamster feed artery // *Circulation Research*. — 2000. — Vol. 86. — No. 1. — P. 94-100.
11. Socha M.J., Behringer E.J., Segal S.S. Calcium and electrical signalling along endothelium of the resistance vasculature // *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. — 2012. — Vol. 110. — No. 1. — P. 80-86.
12. Uhrenholt T.R., Domeier T.L., Segal S.S. Propagation of calcium waves along endothelium of hamster feed arteries // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. — 2007. — Vol. 292. — No. 3. — P. 1634-1640.
13. Huang W., Ramsey K.M., Marcheiva B., Bass J. Circadian rhythms, sleep, and metabolism // *Journal of Clinical Investigation*. — 2011. — Vol. 121. — No. 6. — P. 2133-2141.
14. Rosenwasser A.M., Turek F.W. Neurobiology of circadian rhythm regulation // *Sleep Medicine Clinics*. — 2015. — Vol. 10. — No. 4. — P. 403-412.
15. Arshavsky Y.I., Deliagina T.G., Orlovsky G.N. Pattern generation // *Current Opinion in Neurobiology*. — 1997. — Vol. 7. — P. 781-789.

16. Brodsky V.Ya. Direct cell–cell communication: a new approach derived from recent data on the nature and self-organisation of ultradian (circahoralian) intracellular rhythms // *Biological Reviews*. — 2005. — Vol. 81. — Direct cell–cell communication. — No. 01. — P. 143.
17. Dal Santo P., Logan M.A., Chisholm A.D., Jorgensen E.M. The inositol trisphosphate receptor regulates a 50-second behavioral rhythm in *C. elegans* // *Cell*. — 1999. — Vol. 98. — No. 6. — P. 757-767.
18. Pfeiffer J., Johnson D., Nehrke K. Oscillatory transepithelial H⁺ flux regulates a rhythmic behavior in *C. elegans* // *Current Biology*. — 2008. — Vol. 18. — No. 4. — P. 297-302.
19. Beg A.A., Ernstrom G.G., Nix P., Davis M.W., Jorgensen E.M. Protons act as a transmitter for muscle contraction in *C. elegans* // *Cell*. — 2008. — Vol. 132. — No. 1. — P. 149-160.
20. Kuznetsov V.P., Slivko-Koltchik G.A., Voronov D.A., Panchin Y.V. Electrophysiology of the rhythmic defecation program in nematode *Heterorhabditis megidis* // *Scientific Reports*. — 2017. — Vol. 7. — No. 1. — P. 17834.
21. Branicky R., Hekimi S. What keeps *C. elegans* regular: the genetics of defecation // *Trends in Genetics*. — 2006. — Vol. 22. — What keeps *C. elegans* regular. — No. 10. — P. 571-579.
22. Liu D.W., Thomas J.H. Regulation of a periodic motor program in *C. elegans* // *The Journal of Neuroscience*. — 1994. — Vol. 14. — No. 4. — P. 1953-1962.
23. Thomas J.H. Genetic analysis of defecation in *Caenorhabditis elegans* // *Genetics*. — 1990. — No. 124(4). — P. 855-872.
24. Espelt M.V., Estevez A.Y., Yin X., Strange K. Oscillatory Ca²⁺ signaling in the isolated *Caenorhabditis elegans* intestine // *The Journal of General Physiology*. — 2005. — Vol. 126. — No. 4. — P. 379-392.
25. Altun Z.F., Chen B., Wang Z., Hall D.H. High resolution map of *Caenorhabditis elegans* gap junction proteins // *Developmental Dynamics*. — 2009. — Vol. 238. — No. 8. — P. 1936-1950.
26. Peters M.A., Teramoto T., White J.Q., Iwasaki K., Jorgensen E.M. A calcium wave mediated by gap junctions coordinates a rhythmic behavior in *C. elegans* // *Current Biology*. — 2007. — Vol. 17. — No. 18. — P. 1601-1608.
27. Coburn C., Allman E., Mahanti P., Benedetto A., Cabreiro F., Pincus Z., Matthijssens F., Araiz C., Mandel A., Vlachos M., Edwards S.-A., Fischer G., Davidson A., Pryor R.E., Stevens A., Slack F.J., Tavernarakis N., Braeckman B.P., Schroeder F.C., Nehrke K., Gems D. Anthranilate fluorescence marks a calcium-propagated necrotic wave that promotes organismal death in *C. elegans* // *PLoS Biology*. — 2013. — Vol. 11. — No. 7. — P. e1001613.
28. Cao J., Packer J.S., Ramani V., Cusanovich D.A., Huynh C., Daza R., Qiu X., Lee C., Furlan S.N., Steemers F.J., Adey A., Waterston R.H., Trapnell C., Shendure J. Comprehensive single-cell transcriptional profiling of a multicellular organism // *Science*. — 2017. — Vol. 357. — No. 6352. — P. 661-667.
29. Hirsch L.J., Fong M.W.K., Leitinger M., LaRoche S.M., Beniczky S., Abend N.S., Lee J.W., Wusthoff C.J., Hahn C.D., Westover M.B., Gerard E.E., Herman S.T., Haider H.A., Osman G., Rodriguez-Ruiz A., Maciel C.B., Gilmore E.J., Fernandez A., Rosenthal E.S., Claassen J., Husain A.M., Yoo J.Y., So E.L., Kaplan P.W., Nuwer M.R., Van Putten M., Sutter R., Drislane F.W., Trinka E., Gaspard N. American clinical neurophysiology society's standardized critical care EEG terminology: 2021 version // *Journal of Clinical Neurophysiology*. — 2021. — Vol. 38. — American Clinical Neurophysiology Society's Standardized Critical Care EEG Terminology. — No. 1. — P. 1-29.
30. Jadeja N.M. How to read an EEG. Vol. Repetitive Abnormalities. — Cambridge University Press, 2021. — 134-148 p.

31. Halberg F. Chronobiology // *Annu Rev Physiol.* — 1969. — No. 31. — P. 675-725.
32. Marder E., Calabrese R.L. Principles of rhythmic motor pattern generation // *Physiological Reviews.* — 1996. — Vol. 76. — No. 3. — P. 687-717.
33. Avery L., Thomas J.H. *C. elegans*. Vol. Feeding and Defecation. — 2nd edition. — Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. — 24.
34. Teramoto T., Iwasaki K. Intestinal calcium waves coordinate a behavioral motor program in *C. elegans* // *Cell Calcium.* — 2006. — Vol. 40. — No. 3. — P. 319-327.
35. Baylis H.A., Vázquez-Manrique R.P. Genetic analysis of IP₃ and calcium signalling pathways in *C. elegans* // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* — 2012. — Vol. 1820. — No. 8. — P. 1253-1268.
36. Nehrke K., Denton J., Mowrey W. Intestinal Ca²⁺ wave dynamics in freely moving *C. elegans* coordinate execution of a rhythmic motor program // *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* — 2008. — Vol. 294. — No. 1. — P. 333-344.
37. Xing J., Strange K. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and loss of PLC γ activity inhibit TRPM channels required for oscillatory Ca²⁺ signaling // *American Journal of Physiology - Cell Physiology.* — 2010. — Vol. 298. — No. 2. — P. 274-282.
38. Foskett J.K., White C., Cheung K.-H., Mak D.-O.D. Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels // *Physiological Reviews.* — 2007. — Vol. 87. — No. 2. — P. 593-658.
39. Wang H., Girskis K., Janssen T., Chan J.P., Dasgupta K., Knowles J.A., Schoofs L., Sieburth D. Neuropeptide Secreted from a Pacemaker Activates Neurons to Control a Rhythmic Behavior // *Current Biology.* — 2013. — Vol. 23. — No. 9. — P. 746-754.
40. Liu P., Chen B., Altun Z.F., Gross M.J., Shan A., Schuman B., Hall D.H., Wang Z.-W. Six Innexins contribute to electrical coupling of *C. elegans* body-wall muscle // *PLoS ONE.* — 2013. — Vol. 8. — No. 10. — P. e76877.
41. Beg A.A., Jorgensen E.M. EXP-1 is an excitatory GABA-gated cation channel // *Nature Neuroscience.* — 2003. — Vol. 6. — No. 11. — P. 1145-1152.
42. McIntire S.L., Jorgensen E., Kaplan J., Horvitz H.R. The GABAergic nervous system of *Caenorhabditis elegans* // *Nature.* — 1993. — Vol. 364. — No. 6435. — P. 337-341.
43. Slivko-Koltchik G.A., Kuznetsov V.P., Voronov D.A., Panchin Y.V. Cyclic electrical activity in the intestine of marine nematode *Enoplus brevis* // *Russian Journal of Nematology.* — 2018.
44. Maryon E.B., Coronado R., Anderson P. *unc-68* encodes a ryanodine receptor involved in regulating *C. elegans* body-wall muscle contraction // *The Journal of Cell Biology.* — 1996. — Vol. 134. — No. 4. — P. 885-893.
45. Liu Q., Chen B., Yankova M., Morest D.K., Maryon E., Hand A.R., Nonet M.L., Wang Z.-W. Presynaptic ryanodine receptors are required for normal quantal size at the *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junction // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience.* — 2005. — Vol. 25. — No. 29. — P. 6745-6754.
46. Baylis H.A., Furuichi T., Yoshikawa F., Mikoshiba K., Sattelle D.B. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are strongly expressed in the nervous system, pharynx, intestine, gonad and excretory cell of *Caenorhabditis elegans* and are encoded by a single gene (*itr-1*) // *Journal of Molecular Biology.* — 1999. — Vol. 294. — No. 2. — P. 467-476.
47. Bezprozvanny I., Watras J., Ehrlich B.E. Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum // *Nature.* — 1991. — Vol. 351. — No. 6329. — P. 751-754.

48. Bagur R., Hajnóczky G. Intracellular Ca^{2+} sensing: Its role in calcium homeostasis and signaling // *Molecular Cell*. — 2017. — Vol. 66. — Intracellular Ca^{2+} Sensing. — No. 6. — P. 780-788.
49. Leybaert L., Sanderson M.J. Intercellular Ca^{2+} waves: mechanisms and function // *Physiological Reviews*. — 2012. — Vol. 92. — Intercellular Ca^{2+} Waves. — No. 3. — P. 1359-1392.
50. Ross W.N. Understanding calcium waves and sparks in central neurons // *Nature Reviews Neuroscience*. — 2012. — Vol. 13. — No. 3. — P. 157-168.
51. Jiang J., Su Y., Zhang R., Li H., Tao L., Liu Q. *C. elegans* enteric motor neurons fire synchronized action potentials underlying the defecation motor program // *Nature Communications*. — 2022. — Vol. 13. — No. 1. — P. 2783.
52. Allman E., Johnson D., Nehrke K. Loss of the apical V-ATPase α -subunit VHA-6 prevents acidification of the intestinal lumen during a rhythmic behavior in *C. elegans* // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. — 2009. — Vol. 297. — No. 5. — P. 1071-1081.
53. Purves D., Augustine G., Fitzpatrick D., Hall W.C., LaMantia A., Mooney R., White L.E. *Neuroscience*. — Sinauer, 2018. — 800 p.
54. Kandel E.R. *Principles of neural science*. — 5th Edition. — McGraw Hill Professional, 2013. — 1761 p.
55. Johnston D., Wu S.M.S. *Foundations of cellular neurophysiology*. — Mit Press, 1995. — 676 p.
56. Hodgkin A.L., Huxley A.F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo* // *The Journal of Physiology*. — 1952. — Vol. 116. — No. 4. — P. 449-472.
57. Hodgkin A.L., Huxley A.F. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo* // *The Journal of Physiology*. — 1952. — Vol. 116. — No. 4. — P. 473-496.
58. Hodgkin A.L., Huxley A.F. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo* // *The Journal of Physiology*. — 1952. — Vol. 116. — No. 4. — P. 497-506.
59. Hodgkin A.L., Huxley A.F., Katz B. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo* // *The Journal of Physiology*. — 1952. — Vol. 116. — No. 4. — P. 424-448.
60. Packer J.S., Zhu Q., Huynh C., Sivaramakrishnan P., Preston E., Dueck H., Stefanik D., Tan K., Trapnell C., Kim J., Waterston R.H., Murray J.I. A lineage-resolved molecular atlas of *C. elegans* embryogenesis at single-cell resolution // *Science (New York, N.Y.)*. — 2019. — Vol. 365. — No. 6459. — P. eaax1971.
61. Goldin A. Evolution of voltage-gated Na^+ channels // *The Journal of experimental biology*. — 2002. — Vol. 205. — P. 575-84.
62. Kaulich E., Grundy L.J., Schafer W.R., Walker D.S. The diverse functions of the DEG/ENaC family: linking genetic and physiological insights // *The Journal of Physiology*. — 2023. — Vol. 601. — The diverse functions of the DEG/ENaC family. — No. 9. — P. 1521-1542.
63. Nehrke K. Membrane ion transport in non-excitable tissues // *WormBook: The Online Review of C. Elegans Biology*. — 2014. — P. 1-22.
64. Salkoff L., Wei A.D., Baban B., Butler A., Fawcett G., Ferreira G., Santi C.M. Potassium channels in *C. elegans* // *WormBook: The Online Review of C. Elegans Biology*. — 2005. — P. 1-15.

65. Davis M.W., Fleischhauer R., Dent J.A., Joho R.H., Avery L. A mutation in the *C. elegans* EXP-2 potassium channel that alters feeding behavior // *Science* (New York, N.Y.). — 1999. — Vol. 286. — No. 5449. — P. 2501-2504.
66. Fleischhauer R., Davis M.W., Dzhura I., Neely A., Avery L., Joho R.H. Ultrafast Inactivation Causes Inward Rectification in a Voltage-Gated K⁺ Channel from *Caenorhabditis elegans* // *The Journal of Neuroscience*. — 2000. — Vol. 20. — No. 2. — P. 511-520.
67. Shtonda B., Avery L. CCA-1, EGL-19 and EXP-2 currents shape action potentials in the *Caenorhabditis elegans* pharynx // *Journal of Experimental Biology*. — 2005. — Vol. 208. — No. 11. — P. 2177-2190.
68. Jan L.Y., Jan Y.N. Voltage-gated potassium channels and the diversity of electrical signalling // *The Journal of Physiology*. — 2012. — Vol. 590. — No. 11. — P. 2591-2599.
69. Wei A.D., Butler A., Salkoff L. KCNQ-like potassium channels in *Caenorhabditis elegans*. Conserved properties and modulation // *The Journal of Biological Chemistry*. — 2005. — Vol. 280. — No. 22. — P. 21337-21345.
70. Czirják G., Tóth Z.E., Enyedi P. The two-pore domain K⁺ channel, TRESK, is activated by the cytoplasmic calcium signal through calcineurin // *The Journal of Biological Chemistry*. — 2004. — Vol. 279. — No. 18. — P. 18550-18558.
71. Walker D.S., Ly S., Gower N.J.D., Baylis H.A. IRI-1, a LIN-15B Homologue, Interacts with Inositol-1,4,5-Triphosphate Receptors and Regulates Gonadogenesis, Defecation, and Pharyngeal Pumping in *Caenorhabditis elegans* // *Molecular Biology of the Cell*. — 2004. — Vol. 15. — No. 7. — P. 3073-3082.
72. Xing J., Yan X., Estevez A., Strange K. Highly Ca²⁺-selective TRPM channels regulate IP₃-dependent oscillatory Ca²⁺ signaling in the *C. elegans* intestine // *The Journal of General Physiology*. — 2008. — Vol. 131. — No. 3. — P. 245-255.
73. Kadowaki T. Evolutionary dynamics of metazoan TRP channels // *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*. — 2015. — Vol. 467. — No. 10. — P. 2043-2053.
74. Williams P.D.E., Kashyap S.S., McHugh M.A., Brewer M.T., Robertson A.P., Martin R.J. Diethylcarbamazine, TRP channels and Ca²⁺ signaling in cells of the *Ascaris* intestine // *Scientific Reports*. — 2022. — Vol. 12. — No. 1. — P. 21317.
75. Kwan C.S.M., Vázquez-Manrique R.P., Ly S., Goyal K., Baylis H.A. TRPM channels are required for rhythmicity in the ultradian defecation rhythm of *C. elegans* // *BMC physiology*. — 2008. — Vol. 8. — P. 11.
76. Teramoto T., Lambie E.J., Iwasaki K. Differential regulation of TRPM channels governs electrolyte homeostasis in the *C. elegans* intestine // *Cell Metabolism*. — 2005. — Vol. 1. — No. 5. — P. 343-354.
77. Cully D.F., Vassilatis D.K., Liu K.K., Paress P.S., Van der Ploeg L.H., Schaeffer J.M., Arena J.P. Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans* // *Nature*. — 1994. — Vol. 371. — No. 6499. — P. 707-711.
78. Bagriantsev S.N., Gracheva E.O., Gallagher P.G. Piezo proteins: regulators of mechanosensation and other cellular processes // *The Journal of Biological Chemistry*. — 2014. — Vol. 289. — Piezo proteins. — No. 46. — P. 673-681.
79. Bruzzone R., White T.W., Goodenough D.A. The cellular Internet: on-line with connexins // *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*. — 1996. — Vol. 18. — The cellular Internet. — No. 9. — P. 709-718.

80. Levin M. Isolation and community: a review of the role of gap-junctional communication in embryonic patterning // *Journal of Membrane Biology*. — 2002. — Vol. 185. — Isolation and Community. — No. 3. — P. 177-192.
81. Phelan P., Starich T.A. Innexins get into the gap // *BioEssays*. — 2001. — Vol. 23. — No. 5. — P. 388-396.
82. Paul D.L. Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. // *The Journal of cell biology*. — 1986. — Vol. 103. — No. 1. — P. 123-134.
83. Barnes T.M. OPUS: a growing family of gap junction proteins? // *Trends in genetics: TIG*. — 1994. — Vol. 10. — OPUS. — No. 9. — P. 303-305.
84. *C. elegans* Sequencing Consortium Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology // *Science (New York, N.Y.)*. — 1998. — Vol. 282. — Genome sequence of the nematode *C. elegans*. — No. 5396. — P. 2012-2018.
85. Phelan P., Nakagawa M., Wilkin M., Moffat K., O’Kane C., Davies J., Bacon J. Mutations in shaking-B prevent electrical synapse formation in the *Drosophila* giant fiber system // *The Journal of Neuroscience*. — 1996. — Vol. 16. — No. 3. — P. 1101-1113.
86. Starich T.A., Lee R.Y., Panzarella C., Avery L., Shaw J.E. *eat-5* and *unc-7* represent a multigene family in *Caenorhabditis elegans* involved in cell-cell coupling. // *The Journal of cell biology*. — 1996. — Vol. 134. — No. 2. — P. 537-548.
87. Starich T.A., Herman R.K., Shaw J.E. Molecular and genetic analysis of *unc-7*, a *Caenorhabditis elegans* gene required for coordinated locomotion. // *Genetics*. — 1993. — Vol. 133. — No. 3. — P. 527-541.
88. Landesman Y., White T.W., Starich T.A., Shaw J.E., Goodenough D.A., Paul D.L. Innexin-3 forms connexin-like intercellular channels // *Journal of Cell Science*. — 1999. — Vol. 112. — No. 14. — P. 2391-2396.
89. Phelan P., Stebbings L.A., Baines R.A., Bacon J.P., Davies J.A., Ford C. *Drosophila* Shaking-B protein forms gap junctions in paired *Xenopus* oocytes // *Nature*. — 1998. — Vol. 391. — No. 6663. — P. 181-184.
90. Stebbings L.A., Todman M.G., Phelan P., Bacon J.P., Davies J.A. Two *Drosophila* Innexins Are Expressed in Overlapping Domains and Cooperate to Form Gap-Junction Channels // *Molecular Biology of the Cell*. — 2000. — Vol. 11. — No. 7. — P. 2459-2470.
91. Phelan P., Bacon J.P., A. Davies J., Stebbings L.A., Todman M.G. Innexins: a family of invertebrate gap-junction proteins // *Trends in Genetics*. — 1998. — Vol. 14. — Innexins. — No. 9. — P. 348-349.
92. Panchin Y., Kelmanson I., Matz M., Lukyanov K., Usman N., Lukyanov S. A ubiquitous family of putative gap junction molecules // *Current biology: CB*. — 2000. — Vol. 10. — No. 13. — P. R473-474.
93. Maeda S., Nakagawa S., Suga M., Yamashita E., Oshima A., Fujiyoshi Y., Tsukihara T. Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution // *Nature*. — 2009. — Vol. 458. — No. 7238. — P. 597-602.
94. Oshima A., Matsuzawa T., Nishikawa K., Fujiyoshi Y. Oligomeric structure and functional characterization of *Caenorhabditis elegans* innexin-6 gap junction protein // *Journal of Biological Chemistry*. — 2013. — Vol. 288. — No. 15. — P. 10513-10521.
95. Oshima A., Matsuzawa T., Murata K., Tani K., Fujiyoshi Y. Hexadameric structure of an invertebrate gap junction channel // *Journal of Molecular Biology*. — 2016. — Vol. 428. — No. 6. — P. 1227-1236.

96. Dahl G., Locovei S. Pannexin: To gap or not to gap, is that a question? // IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life). — 2006. — Vol. 58. — Pannexin. — No. 7. — P. 409-419.
97. Ishikawa M., Iwamoto T., Nakamura T., Doyle A., Fukumoto S., Yamada Y. Pannexin 3 functions as an ER Ca²⁺ channel, hemichannel, and gap junction to promote osteoblast differentiation // Journal of Cell Biology. — 2011. — Vol. 193. — No. 7. — P. 1257-1274.
98. Vanden Abeele F., Bidaux G., Gordienko D., Beck B., Panchin Y.V., Baranova A.V., Ivanov D.V., Skryma R., Prevarskaya N. Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1 // The Journal of Cell Biology. — 2006. — Vol. 174. — No. 4. — P. 535-546.
99. Bao L., Samuels S., Locovei S., Macagno E.R., Muller K.J., Dahl G. Innexins form two types of channels // FEBS Letters. — 2007. — Vol. 581. — No. 29. — P. 5703-5708.
100. Sangaletti R., Dahl G., Bianchi L. Mechanosensitive unpaired innexin channels in *C. elegans* touch neurons // American Journal of Physiology-Cell Physiology. — 2014. — Vol. 307. — No. 10. — P. C966-C977.
101. White J.G., Southgate E., Thomson J.N., Brenner S. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans* // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. — 1986. — Vol. 314. — No. 1165. — P. 1-340.
102. Li S., Dent J.A., Roy R. Regulation of intermuscular electrical coupling by the *Caenorhabditis elegans* innexin *inx-6* // Molecular Biology of the Cell. — 2003. — Vol. 14. — No. 7. — P. 2630-2644.
103. Simonsen K.T., Moerman D.G., Naus C.C. Gap junctions in *C. elegans* // Frontiers in Physiology. — 2014. — Vol. 5.
104. Liu P., Chen B., Wang Z.-W. Gap junctions synchronize action potentials and Ca²⁺ transients in *Caenorhabditis elegans* body wall muscle // Journal of Biological Chemistry. — 2011. — Vol. 286. — No. 51. — P. 44285-44293.
105. Kawano T., Po M.D., Gao S., Leung G., Ryu W.S., Zhen M. An imbalancing act: gap junctions reduce the backward motor circuit activity to bias *C. elegans* for forward locomotion // Neuron. — 2011. — Vol. 72. — An Imbalancing Act. — No. 4. — P. 572-586.
106. Sherrington S.C.S. The Integrative Action of the Nervous System. — A. Constable, 1906. — 438 p.
107. Chalfie M., Sulston J., White J., Southgate E., Thomson J., Brenner S. The neural circuit for touch sensitivity in *Caenorhabditis elegans* // The Journal of Neuroscience. — 1985. — Vol. 5. — No. 4. — P. 956-964.
108. Wicks S.R., Roehrig C.J., Rankin C.H. A Dynamic Network Simulation of the Nematode Tap Withdrawal Circuit: Predictions Concerning Synaptic Function Using Behavioral Criteria // The Journal of Neuroscience. — 1996. — Vol. 16. — A Dynamic Network Simulation of the Nematode Tap Withdrawal Circuit. — No. 12. — P. 4017-4031.
109. Croll N.A., Smith J.M. Integrated behaviour in the feeding phase of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) // Journal of Zoology. — 1978. — Vol. 184. — No. 4. — P. 507-517.
110. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* // Genetics. — 1974. — Vol. 77. — No. 1. — P. 71-94.
111. Mori I., Ohshima Y. Neural regulation of thermotaxis in *Caenorhabditis elegans* // Nature. — 1995. — Vol. 376. — No. 6538. — P. 344-348.

112. Nagy S., Huang Y.-C., Alkema M.J., Biron D. *Caenorhabditis elegans* exhibit a coupling between the defecation motor program and directed locomotion // *Scientific Reports*. — 2015. — Vol. 5. — No. 1. — P. 17174.
113. Singh R.N., Sulston J.E. Some Observations On Moulting in *Caenorhabditis Elegans* // *Nematologica*. — 1978. — Vol. 24. — No. 1. — P. 63-71.
114. Poinar G.O., Jackson T., Klein M. *Heterorhabditis megidis* sp. n. (Heterorhabditidae: Rhabditida), parasitic in the Japanese beetle, *Popillia japonica* (Scarabaeidae: Coleoptera), in Ohio. 54, 53-59. // *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*. — 1987. — Vol. 54. — P. 53-59.
115. Forst S., Dowds B., Boemare N., Stackebrandt E. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs // *Annual Review of Microbiology*. — 1997. — Vol. 51. — *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. — P. 47-72.
116. Kuznetsov V.P., Slivko-Koltchik G.A., Popova L.B., Panchin Y.V. Gap junctions in nematodes // *Russian Journal of Nematology*. — 2016. — Vol. 24. — No. 1. — P. 1-16.
117. Hosokawa H., Ishii N., Ishida H., Ichimori K., Nakazawa H., Suzuki K. Rapid accumulation of fluorescent material with aging in an oxygen-sensitive mutant *mev-1* of *Caenorhabditis elegans* // *Mechanisms of Ageing and Development*. — 1994. — Vol. 74. — No. 3. — P. 161-170.
118. Luke C.J., Pak S.C., Askew Y.S., Naviglia T.L., Askew D.J., Nobar S.M., Vetica A.C., Long O.S., Watkins S.C., Stolz D.B., Barstead R.J., Moulder G.L., Brömme D., Silverman G.A. An intracellular serpin regulates necrosis by inhibiting the induction and sequelae of lysosomal injury // *Cell*. — 2007. — Vol. 130. — No. 6. — P. 1108.
119. Xu K., Tavernarakis N., Driscoll M. Necrotic cell death in *C. elegans* requires the function of calreticulin and regulators of Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum // *Neuron*. — 2001. — Vol. 31. — No. 6. — P. 957-971.
120. McCulloch D., Gems D. Evolution of male longevity bias in nematodes // *Aging Cell*. — 2003. — Vol. 2. — No. 3. — P. 165-173.
121. Mahoney T.R., Luo S., Round E.K., Brauner M., Gottschalk A., Thomas J.H., Nonet M.L. Intestinal signaling to GABAergic neurons regulates a rhythmic behavior in *Caenorhabditis elegans* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2008. — Vol. 105. — No. 42. — P. 16350-16355.
122. Estevez A.Y., Strange K. Calcium feedback mechanisms regulate oscillatory activity of a TRP-like Ca^{2+} conductance in *C. elegans* intestinal cells // *The Journal of Physiology*. — 2005. — Vol. 567. — No. 1. — P. 239-251.
123. McGhee J.D. The *C. elegans* intestine // *Wormbook*. — 2007. — P. 1-36.
124. McInnes L., Healy J., Melville J. UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for dimension reduction. — 2020. — UMAP.
125. Müllner D. Modern hierarchical, agglomerative clustering algorithms. — 2011.
126. Wolf F.A., Angerer P., Theis F.J. SCANPY: large-scale single-cell gene expression data analysis // *Genome Biology*. — 2018. — Vol. 19. — SCANPY. — No. 1. — P. 15.
127. Iwasaki K., Liu D.W., Thomas J.H. Genes that control a temperature-compensated ultradian clock in *Caenorhabditis elegans*. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 1995. — Vol. 92. — No. 22. — P. 10317-10321.
128. Take-uchi M., Kawakami M., Ishihara T., Amano T., Kondo K., Katsura I. An ion channel of the degenerin/epithelial sodium channel superfamily controls the defecation rhythm in

Caenorhabditis elegans // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 1998. — Vol. 95. — No. 20. — P. 11775-11780.

129. Kobayashi Y., Kimura K.D., Katsura I. Ultradian rhythm in the intestine of *Caenorhabditis elegans* is controlled by the C-terminal region of the FLR-1 ion channel and the hydrophobic domain of the FLR-4 protein kinase // Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms. — 2011. — Vol. 16. — No. 5. — P. 565-575.

130. Verkhratsky A., Parpura V. Store-operated calcium entry in neuroglia // Neuroscience Bulletin. — 2014. — Vol. 30. — No. 1. — P. 125-133.

131. Blaxter M.L., De Ley P., Garey J.R., Liu L.X., Scheldeman P., Vierstraete A., Vanfleteren J.R., Mackey L.Y., Dorris M., Frisse L.M., Vida J.T., Thomas W.K. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda // Nature. — 1998. — Vol. 392. — No. 6671. — P. 71-75.

132. Arshavsky Yu.I., Deliagina T.G., Gelfand I.M., Orlovsky G.N., Panchin Yu.V., Pavlova G.A., Popova L.B. Neural control of heart beat in the pteropod mollusc *Clione limacina*: coordination of circulatory and locomotor systems // Journal of Experimental Biology. — 1990. — Vol. 148. — Neural Control of Heart Beat in the Pteropod Mollusc *Clione Limacina*. — No. 1. — P. 461-475.

133. Panchin Y.V., Popova L.B., Deliagina T.G., Orlovsky G.N., Arshavsky Y.I. Control of locomotion in marine mollusk *Clione limacina*. VIII. Cerebropedal neurons // Journal of Neurophysiology. — 1995. — Vol. 73. — No. 5. — P. 1912-1923.

134. Overbeek R., Fonstein M., D'Souza M., Pusch G.D., Maltsev N. The use of gene clusters to infer functional coupling // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 1999. — Vol. 96. — No. 6. — P. 2896-2901.

135. Jaiteh M., Taly A., Hénin J. Evolution of pentameric ligand-gated ion channels: pro-loop receptors // PloS One. — 2016. — Vol. 11. — Evolution of Pentameric Ligand-Gated Ion Channels. — No. 3. — P. e0151934.

136. Dick A.A., Harlow T.J., Gogarten J.P. Short branches lead to systematic artifacts when BLAST searches are used as surrogate for phylogenetic reconstruction // Molecular Phylogenetics and Evolution. — 2017. — Vol. 107. — P. 338-344.

137. Kuznetsov V.P., Slivko-Koltchik G.A., Isaev S.V., Voronov D.A., Panchin Y.V. Ion channels of the intestinal hyperpolarizing action potential in nematodes. — 2019.

138. Kim W., Underwood R.S., Greenwald I., Shaye D.D. OrthoList 2: A NEW COMPARATIVE GENOMIC ANALYSIS OF Human and *Caenorhabditis elegans* genes // Genetics. — 2018. — Vol. 210. — OrthoList 2. — No. 2. — P. 445-461.

139. Li L., Liu H., Wang W., Chandra M., Collins B.M., Hu Z. SNT-1 functions as the Ca²⁺ sensor for tonic and evoked neurotransmitter release in *Caenorhabditis Elegans* // The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience. — 2018. — Vol. 38. — No. 23. — P. 5313-5324.

140. Zhao B., Schafer W.R. Neuropeptide signaling: from the gut // Current biology: CB. — 2013. — Vol. 23. — Neuropeptide signaling. — No. 11. — P. R481-483.

141. Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M., Levin J.Z., Thompson D.A., Amit I., Adiconis X., Fan L., Raychowdhury R., Zeng Q., Chen Z., Mauceli E., Hacohen N., Gnirke A., Rhind N., di Palma F., Birren B.W., Nusbaum C., Lindblad-Toh K., Friedman N., Regev A. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data // Nature biotechnology. — 2011. — Vol. 29. — Trinity. — No. 7. — P. 644-652.

142. Haas B.J., Papanicolaou A., Yassour M., Grabherr M., Blood P.D., Bowden J., Couger M.B., Eccles D., Li B., Lieber M., MacManes M.D., Ott M., Orvis J., Pochet N., Strozzi F., Weeks N., Westerman R., William T., Dewey C.N., Henschel R., LeDuc R.D., Friedman N., Regev A. De novo

transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis // *Nature Protocols*. — 2013. — Vol. 8. — No. 8. — P. 1494-1512.

143. Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // *Nucleic Acids Research*. — 2004. — Vol. 32. — MUSCLE. — No. 5. — P. 1792-1797.

144. Dobretsov M., Petkau G., Hayar A., Petkau E. Clock scan protocol for image analysis: ImageJ plugins // *Journal of Visualized Experiments*. — 2017. — Vol. 2017. — Clock Scan Protocol for Image Analysis.