

ПАТОГЕНЕЗ, ПАТОЛОГИЯ И ЭКОНОМИЧЕСКИЙ УЩЕРБ

УДК 595.132:577.175.82

DOI

Поступила в редакцию 04.04.2017

Принята в печать 19.09.2017

Для цитирования:

Малютина Т. А., Теренина Н. Б. Влияние эндогенных FMRFамид-подобных пептидов на мускулатуру дистального отдела репродуктивной системы самки нематоды *Ascaris suum* // Российский паразитологический журнал. – М., 2017. – Т.41. – Вып.3. – С.

For citation:

Malyutina T.A., Terenina N.B. Effects of endogenous FMRFamide-like peptides on muscles of distal section of reproductive system of *Ascaris suum* female // Russian Journal of Parasitology. 2017. V.41, Iss.3, pp.

ВЛИЯНИЕ ЭНДОГЕННЫХ FMRFАМИД-ПОДОБНЫХ ПЕПТИДОВ НА МУСКУЛАТУРУ ДИСТАЛЬНОГО ОТДЕЛА РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ САМКИ НЕМАТОДЫ *ASCARIS SUUM*.

Малютина Т. А., Теренина Н. Б.

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

Реферат

Возникновение устойчивости к лекарственным веществам у паразитических организмов, включая паразитических нематод, вызывает необходимость, с одной стороны, изучение молекулярных механизмов формирования этой устойчивости, а с другой стороны, поиска новых биологических мишеней для управляемого сдерживания распространения паразитарной инвазии. У паразитических нематод одной из таких мишеней может быть конечный отдел репродуктивной системы самок нематод - вагина или яйцеклетка (ovijector). Вагина является жизненно важным мышечным органом репродуктивной системы нематод, основной физиологической функцией которой является выделение половозрелых яиц в кишечник хозяина, а также захват спермы самца.

Цель - обзор и анализ данных литературы, описывающих воздействие ряда эндогенных нейропептидов (FMRFамид-подобных нейропептидов) на мускулатуру дистальной части вагины (vagina vera) паразитической нематоды *Ascaris suum*. В статье также рассматривается возможность использования конечного отдела репродуктивной системы самок паразитических нематод в качестве одной из биологических мишеней для воздействия потенциальных антигельминтиков, синтезируемых на основе структуры FMRFамид-подобных нейропептидов, для борьбы с нематодозами человека, животных и растений.

Ключевые слова: нематоды, репродуктивная система, вагина, FMRFамид – подобные нейропептиды.

Введение.

Возникновение лекарственной устойчивости паразитических организмов, в том числе нематод, вызывает необходимость изучения, с одной стороны, механизмов формирования этого феномена у паразитов, а с другой стороны, поиска новых биологических мишеней для управляемого сдерживания паразитарной инвазии путем

воздействия на эти мишени антигельминтными препаратами направленного действия. У паразитических нематод одной из таких мишеней может быть конечный отдел репродуктивной системы самок нематод - вагина или яйцеклетка (ovijector).

В статье представлен анализ данных литературы, посвященных описанию воздействия ряда эндогенных нейропептидов (FMRFамид-подобные нейропептиды) на мускулатуру дистальной части вагины (*vagina vera*) паразитической нематоды *Ascaris suum* и рассматривается возможность использования конечного отдела репродуктивной системы самок паразитических нематод в качестве биологической мишени для воздействия потенциальных антигельминтиков, синтезируемых на основе структуры FMRFамид-подобных нейропептидов, для борьбы с нематодной инвазией человека, животных и растений.

FMRFамид-подобные пептиды относятся к самому большому и наиболее разнообразному по структуре семейству нейропептидов, обнаруженных у беспозвоночных животных, включая нематод [19; 23]. FMRFамид-подобные пептиды имеют структурное сходство с FMRFамид – кардиоактивным тетрапептидом, выделенным из моллюска *Macrocallista nimbosa*, и общую формулу структуры C- терминального тетрапептидного мотива: $x - x_0 - \text{Arg} - \text{Phe} - \text{NH}_2$, где x – какая-либо аминокислота (кроме цистеина, поскольку цистеин не обнаружен в структуре молекул FMRFамид-подобных нейропептидов), x_0 - какая-либо гидрофобная аминокислота (за исключением цистеина) [19; 27].

Установлено, что FMRFамид-подобные пептиды вызывают сильные физиологические эффекты на соматической мускулатуре свободноживущих и паразитических нематод, мускулатуре фаринкса и репродуктивной системы этих организмов [14; 19; 23]. Эти сведения могут служить перспективой для разработки новых антигельминтиков на основе структуры FMRFамид-подобных нейропептидов, биологической мишенью для которых может быть хорошо развитая мускулатура репродуктивных органов самок нематод. Например, у самки *A. suum* такой биологической мишенью может быть дистальная часть вагины (*vagina vera*).

Морфологическое строение репродуктивных органов самки паразитических нематод и их иннервация довольно хорошо изучены [3; 5]. Вагина является наиболее развитым мышечным органом репродуктивной системы самок нематод, основными физиологическими функциями которого является выделение половозрелых яиц в кишечник хозяина, а также захват спермы самца [3].

Иммунореактивность к FMRFамид-подобным веществам широко распространена в центральных и периферических отделах нервной системы свободноживущих и паразитических нематод. Это свидетельствует об участии этих веществ в различных биологических процессах, обеспечивающих жизнедеятельность нематод, таких как локомоторная активность, пищевое поведение, сенсорное восприятие, активность репродуктивных органов, и др. [16; 25; 26].

Иммуноцитохимические исследования показали, что FMRFамид - иммунореактивность выявлена в нервном плексусе, состоящем из параллельно расположенных нервных волокон и покрывающем наружную поверхность дистальной и проксимальной частей вагины нематоды *A. suum*. Эти нервные волокна тесно связаны с мускулатурой *vagina vera* и могут модулировать ее спонтанную двигательную активность [4].

Наличие FMRFамид-иммунореактивности в нервных структурах конечного отдела репродуктивной системы паразитической нематоды *A. suum* свидетельствует об участии нейропептида FMRF-амида в регуляции физиологических функций вагины у аскариды.

Наряду с иммунореактивностью к FMRFамид-подобным веществам у нематод определены и охарактеризованы гены, кодирующие различные FMRFамид-подобные пептиды. Так, ген *flp -1* был первым геном, идентифицированным у свободноживущей нематоды *Caenorhabditis elegans* [28]. В дальнейшем у нематоды *C. elegans* было выявлено

более 30 flp- генов, кодирующих большое количество различных FMRФамид-подобных пептидов [18; 19].

У паразитической нематоды *Ascaris suum* идентифицированы 6 flp -генов [19; 7; 12; 20].

Каждый flp –ген, выявленный у нематод, кодирует различные FMRФамид-подобные пептиды, которые в большинстве случаев структурно охарактеризованы.

Установлено, что структурное разнообразие FMRФамид-подобных пептидов отражается в разнообразии физиологических ответов при воздействии этих пептидов на соматическую мускулатуру и мускулатуру внутренних органов (фаринкс, вагина) нематод, а также в разнообразии поведенческих реакций при воздействии пептидов на интактных нематод [19].

Известно, что большинство FMRФамид - подобных нейропептидов реализуют свои эффекты на эффекторные клетки нематод за счет связывания с трансмембранными рецепторами, сопряженными (связанными) с G- белком (GPCRs), и последующем развитием событий, приводящих к физиологическому ответу [11; 19]. У свободноживущей нематоды *C. elegans* в настоящее время идентифицировано 11 рецепторов(GPCRs) и предложена теоретическая схема взаимодействия этих рецепторов с некоторыми FMRФамид - подобными нейропептидами [19].

В отличие от свободноживущих нематод сведения о выявлении и идентификации рецепторов, сопряженных с G- белком (GPCRs) у паразитических нематод весьма ограничены. Так, экспериментально установлено, что рецептор на мышечной мембране стенки тела паразитической нематоды *Ascaris suum*, взаимодействующий с нейропептидом AF2 путем активации кальциевых каналов, является рецептором, сопряженным с G- белком [15; 29]. Недавно в литературе появились сведения об идентификации у 17 видов паразитических нематод генных гомологов FMRФамид - подобных пептидов и рецепторов, сопряженных с G- белком этих пептидов [18]. Полученные данные, по мнению авторов, могут облегчить поиск и подбор лигандов для орфанизации FLP-рецепторов у паразитических нематод в целях поиска новых мишеней для воздействия на паразитических нематод.

Для проведения фармакологических исследований практический интерес представляет дистальный отдел репродуктивной системы, включающий непарный канал – вагину и, в частности, ту часть, которая расположена дистально по отношению к матке. В литературе этот непарный канал обозначен как яйцеклад или яйцевыводящий проток (ovijector), в котором выделяют преддверие, прилегающее к вульве, сфинктер и непарную трубку, переходящую в матку [3].

Иностранные исследователи выделяют в вагине проксимальную часть, расположенную ближе к матке - *vagina uteri*, и дистальную часть - *vagina vera*, расположенную в конечной части вагины, из которой яйца за счет перистальтики вагины выделяются в просвет кишечника хозяина.

Дистальная часть вагины (*vagina vera*) крупной кишечной нематоды *Ascaris suum* представляет собой мышечную трубку около 5 мм в длину (длина варьирует у различных представителей нематод) с узким просветом и состоящую из трех слоев: внешнего мышечного слоя, промежуточного гиподермального слоя и внутреннего кутикулярного слоя, покрывающего просвет *vagina vera* с ее внутренней стороны [3; 5; 8].

Установлено, что большинство миофибрилл, составляющих мышечную ткань *vagina vera*, имеют кольцевую ориентацию, при этом некоторые из них разделяются и идут в продольном и диагональном направлениях. Сократительные элементы миофибрилл – миофиламенты также имеют разнообразную направленность.

Физиологические эффекты FMRФамид-подобных пептидов, выделенных из нематод, на мускулатуре *vagina vera* аскариды.

В большинстве работ фармакологические эксперименты по изучению физиологических эффектов FMRФамид-подобных пептидов, выделенных из нематод, проведены на дистальной части вагины (*vagina vera*). В экспериментах использовали взрослых самок *A. suum*, из конечного отдела репродуктивной системы которых выделяли часть - *vagina vera*, которую помещали в камеру для регистрации записи сократительной активности препарата. Экспериментальную камеру заполняли сбалансированным раствором Хэнкса при 37⁰С [10; 21]. Препараты *vagina vera* обладали ритмической сократительной активностью, которая могла сохраняться в течение 12 часов в условиях *in vitro* [9]. Для регистрации записи спонтанной двигательной активности препарата *vagina vera*, была использована фотооптическая преобразующая система. Изменения натяжения, записанные с помощью этой системы, отражали не только изменения в напряжении мышц, но могли включать и изменения длины ткани между прикрепленными электродами. Так, сокращение кольцевой мускулатуры могло удлинять препарат и уменьшать напряжение, измеренное между электродами, в то время как сокращение продольной мускулатуры приводило к сокращению препарата, увеличивая напряжение, фиксируемое между электродами, и наоборот.

На препаратах *vagina vera* исследована активность ряда эндогенных FMRФамид-подобных пептидов, выделенных из тканей паразитической нематоды *A. suum* и свободноживущих нематод *C. elegans* и *Panagrellus redivivus* [8; 9; 6; 17; 19; 22.; 24;].

К таким пептидам относятся нейропептиды AF1 (KNEFIRФамид), AF2/PF5 (KHEYLRFамид), AF3 (AVPGVLRФамид), AF4 (DVPGVLRФамид), AF5 (SGKPTFIRФамид), AF6 (FIRФамид), AF7(AGPRFIREамид), AF8/ PF3 (KSAYMRФамид), AF9 (GLGPRPLRFамид), PF1(SDPNFLRFамид), PF2(SADPNFLRFамид), PF4 (KPNFIRФамид), а также LRGEPIRФамид, SPREPIRФамид, SPLGTMRФамид, ASPSFIRФамид, AGAKFIRФамид, ARKPKFIRФамид, SPMERSAMVRFамид, KPSFVRFамид, QPKARSGYIRФамид, AMRNALVRFамид, NGAPQPFVRFамид, RNKFEFIRФамид, ASSAPLIRФамид, GPSGPLRFамид, GQTFVRFамид, KSQYIRФамид, SVPGVLRФамид, ASWASSVRFамид, WANGVRFамид, AMMRФамид, SPSAKWMRФамид, VPSAADMIRФамид, кодируемые различными flp-генами нематод.

Эффективность пептидов на препаратах *vagina vera* оценивалась по трем параметрам: базовому натяжению, частоте сокращения и амплитуде сокращения мышечного препарата *vagina vera*.

Все тестируемые пептиды вызывали разнообразные физиологические реакции мышечных препаратов *vagina vera*, среди которых было выделено 5 типов ответов: тип 1 – ингибирование двигательной активности препарата; тип 2 – возбуждение двигательной активности; тип 3 – кратковременное (переходящее) сокращение; тип 4 – двухфазный ответ: кратковременное (переходящее) сокращение, за которым следовал период прекращения активности (спастический (судорожный) паралич); тип 5 – двухфазный ответ: укорочение мускулатуры препарата, сочетающееся с увеличением частоты сокращений [19; 24]. Физиологические эффекты, вызываемые пептидами, были обратимы и зависели от концентрации добавляемых веществ [8; 9; 22]. Однако, механизм действия вышеперечисленных FMRФамид-подобных пептидов на мускулатуру препарата *vagina vera* к настоящему времени остается неизвестным.

Анализ эффективности тестируемых пептидов показал, что пептид AF1 вызывал сложный двухфазный эффект на мышечном препарате *vagina vera* аскариды. Этот эффект сопровождался уменьшением частоты и амплитуды сокращений при концентрациях, больших или равных 0,1μМ [9; 19]. Пороговой концентрацией пептида была концентрация 0,01 μМ. При концентрации AF1 равной 1μМ наблюдалось значительное уменьшение частоты сокращения препарата *vagina vera*. Эффект AF1 в концентрации 1μМ уменьшался после 10 минутного отмывания препарата *vagina vera* физиологическим раствором. Действие AF1 в концентрации 1 μМ вызывало значительное уменьшение

амплитуды сокращений. Похожими эффектами обладали пептиды AGAKFIRФамид , ARKPKFIRФамид и SPSAKWMRФамид [19].

Эффекты нейропептида AF8 на препарат *vagina vera* аскариды были качественно сходны с эффектами AF1 (кроме кратковременного удлинения препарата, возникающего после обработки нейропептидом AF1) [9]. Воздействие нейропептидом AF8 в концентрациях $\geq 0,1 \mu\text{M}$ AF8 приводило к уменьшению частоты и амплитуды сокращения. Эффекты AF8 на препарате *vagina vera* были обратимыми. Добавление $1 \mu\text{M}$ AF8 к препарату *vagina vera* вызывало прекращение сократительной активности, которое длилось в течение примерно 20 минут после отмывания. Значительные эффекты наблюдались также от воздействия AF8 в концентрации $0,1 \mu\text{M}$, которые заключались в уменьшении частоты сокращения препарата. Напротив, AF8 в концентрации $0,01 \mu\text{M}$ обратимо увеличивал частоту сокращения препарата *vagina vera*, а в концентрации $1 \mu\text{M}$ AF8 полностью ингибировал ритмические сокращения препарата, при этом амплитуда сокращения снижалась до нуля. AF8 в концентрациях $0,1 \mu\text{M}$ и $1 \mu\text{M}$ вызывал кратковременное увеличение исходного натяжения препарата *vagina vera*.

Нейропептид AF2 был менее сильным, чем AF1 и AF8, что касается его влияния на частоту сокращений препарата *vagina vera*. Так же как AF1 и AF8 нейропептид AF2 вызывал различные эффекты в зависимости от добавляемой концентрации пептида. Пороговая концентрация активности составляла $0,1 \mu\text{M}$ [9]. При концентрации равной $10 \mu\text{M}$ AF2 уменьшал частоту сокращения препарата. Сходный эффект наблюдался на некоторых препаратах при их обработке нейропептидом AF2 в концентрации $1 \mu\text{M}$. В концентрации $0,1 \mu\text{M}$ AF2 вызывал увеличение частоты сокращений препаратов. Эффекты нейропептида AF2 были обратимыми и воспроизводимыми.

Нейропептиды AF3 и AF4 вызывали сложные многофазные эффекты на препарате *vagina vera* [16]. При высоких концентрациях ($0,1 - 10 \mu\text{M}$) эффекты включали быстрое сокращение, сопровождающееся кратковременным периодом спастического (судорожного) паралича, длящегося от 20 до 120 секунд, и последующим возвращением сократительной активности.

При воздействии AF3 в концентрации $10 \mu\text{M}$ на препарат *vagina vera* за вышеописанным эффектом следовал устойчивый вялый паралич. Воздействие более низких концентраций ($1-10 \text{ nM}$) приводило к удлинению препарата и сопровождалось увеличением частоты сокращений и амплитуды. Пороговой концентрацией активности пептида AF3 являлась концентрация 1 nM .

Эффекты пептида AF4 на препарат *vagina vera* были сходны с эффектами от воздействия AF3, а пороговой концентрацией активности была концентрация 3 nM .

Эндогенные пептиды PF1, PF2 и PF4, выделенные из тканей свободноживущей нематоды *P. redivivus*, вызывали более однозначные ответы мускулатуры *vagina vera* по сравнению с ответами на нейропептиды, выделенные и тканей нематод *A. suum* и *C. elegans* [8].

Пептид PF1 проявлял тормозной эффект, вызывая укорочение мышц за счет расслабления кольцевой мускулатуры *vagina vera*, и вялый паралич при высоких концентрациях ($1 \mu\text{M}$). При более низких концентрациях (менее $0,1 \mu\text{M}$) PF1 вызывал кратковременную остановку спонтанных сокращений, которые быстро восстанавливались после добавления пептида. Пороговой концентрацией активности PF1 в этом случае являлась концентрация вещества, равная 3 nM .

Пептид PF2 вызывал сходный с PF1 тормозной ответ, однако был более эффективным, чем пептид PF1 и имел пороговую концентрацию, равную 1 nM . Воздействие пептидом PF2 в концентрациях между $1 \mu\text{M}$ и 10 nM вызывало уменьшение или остановку спонтанной сократительной активности мускулатуры *vagina vera*. Добавление в экспериментальную камеру, где находился препарат *vagina vera*, PF2 в концентрации 1 nM приводило к значительному уменьшению частоты сокращения мускулатуры. Пептид PF4 вызывал глубокое угнетение сократительной активности

препарата *vagina vera* в концентрациях 1 – 10 μM . Хотя пептид PF4 имел более высокий порог активности (10 nM) по сравнению с пептидами PF1 или PF2, однако его эффекты были более глубокими при концентрациях 1 – 10 μM и вызывали полный паралич у большинства исследуемых препаратов *vagina vera*.

Нейропептид KPSFVRFамид, выделенный из тканей нематоды *C. elegans* и имеющий структурную гомологию с пептидом PF4, в концентрации 10 μM , так же, как и PF4, вызывал ингибиторные эффекты на препарате *vagina vera*, сопровождающиеся значительным уменьшением частоты и амплитуды мышечных сокращений [22]. Пороговой концентрацией для активности этого нейропептида была концентрация 0,1 μM .

Эффекты, аналогичные эффектам PF1, PF2 и PF4 были получены при обработке препаратов *vagina vera* нейропептидами SPLGTMRФамида (0,1 – 10 μM), ASPSFIRФамида (0,01 μM), ASSAPLIRФамида (1 μM), SPMERSAMVRFамида (0,1 μM), QPKARSGYIRФамида (1 μM), RNKFEFIRФамида, GPSGPLRFамида (0, 1 μM), GQTFVRFамида (0, 1 μM), KSQYIRФамида (0,1 μM), AMMRФамида (10 μM), VPSAADMMIRФамида [22; 24; 2; 19; 17].

Обсуждение.

Анализ реакции мышечных фрагментов *vagina vera* свиной аскариды на воздействие ряда эндогенных FMRФамид-подобных пептидов показал, что все тестируемые FMRФамид-подобные пептиды изменяют (модулируют) спонтанную сократительную активность препарата *vagina vera* аскариды, мускулатура которого представлена, главным образом, кольцевыми мышечными волокнами. Эти данные свидетельствуют о важной роли эндогенных нейропептидов в механизмах регуляции спонтанной сократительной активности мускулатуры *vagina vera* нематоды.

В литературе представлены подробные данные о воздействии нейропептидов AF1, AF2, AF3, AF 4, AF8/ PF3, а также PF1, PF2 и PF4 и ряда других эндогенных FMRФамид-подобных пептидов на спонтанную сократительную активность мышечного препарата *vagina vera* [17; 19; 8; 9; 22; 24;]. Показано, что все исследованные нейропептиды в довольно низких (физиологических) концентрациях (≤ 1 nM - 10 μM) оказывают разнообразное и сильное воздействие на спонтанную сократительную активность мускулатуры препарата *vagina vera*, вызывая изменения мышечного напряжения или тонуса, частоты и амплитуды сокращений. Все эффекты нейропептидов были обратимыми, так как после отмывания препарата от вещества повторное добавление пептида в экспериментальную камеру вызывало эффект схожий с предыдущим его действием.

Нейропептиды AF1, AF2, AF3, AF4 и AF8 в концентрациях 0,01 – 10 μM вызывали качественно и количественно различимые эффекты на сократительную активность препарата *vagina vera* [8; 9].

Нейропептид AF1 вызывал двухфазный эффект, который сопровождался кратковременным удлинением препарата, за которым следовало его укорочение и последующее прекращение сократительной активности в состоянии спастического паралича. Предполагается, что удлинение препарата в данном случае, могло быть вызвано сокращением кольцевой мускулатуры, которая наиболее развита в *vagina vera*. Однако, это не исключает расслабления продольной мускулатуры, которая, хотя и в меньшей степени развита, но присутствует в мышечной стенке этого отдела репродуктивной системы нематоды. Высказывается предположение о том, что двухфазный эффект нейропептида AF1 может быть обусловлен взаимодействием вещества с разными рецепторами на мускулатуре *vagina vera* [9].

Нейропептид AF2 вызывал два различных типа ответов мускулатуры *vagina vera* в зависимости от действующей концентрации. Так, добавление пептида AF2 в концентрациях ≥ 10 μM в экспериментальную камеру приводило к ингибированию спонтанной сократительной активности препарата, а более низкие концентрации, например, такие как $\leq 0,1$ μM , вызывали значительное увеличение частоты сокращения и

соответствующее уменьшение амплитуды сокращения мускулатуры. В связи с такими различными эффектами AF2 предполагается, что этот пептид может взаимодействовать с разными подтипами FMRFамид-подобного рецептора [9].

Нейропептид AF8 в концентрациях $\geq 0,1 \mu\text{M}$ вызывал ответы мышечного препарата *vagina vera*, сходные с воздействием нейропептида AF1, за исключением кратковременного удлинения, характерного для действия AF1. Высокие концентрации нейропептида AF8 ($1 \mu\text{M}$) вызывали остановку сократительной активности препарата *vagina vera*. Установлено, что нейропептид AF8 является более сильным пептидом по своим эффектам на мускулатуру *vagina vera* по сравнению с AF1, поскольку вызывает свои эффекты на препарате *vagina vera* в концентрациях, которые в 100 раз ниже, чем у пептида AF1.

В связи со сходством физиологических ответов мускулатуры *vagina vera* на воздействие нейропептидов AF1 и AF8, высказывается предположение о том, что оба пептида могут взаимодействовать с одним и тем же эндогенным рецептором на мускулатуре *vagina vera*. Однако, учитывая сложную организацию мышечной структуры стенки *vagina vera* (наличие кольцевых и в значительно меньшей степени продольных мышечных слоев), более объективная оценка эффективности исследуемых нейропептидов, вероятно, может быть получена при проведении экспериментов на отдельных мышечных волокнах *vagina vera* [9].

Анализ физиологических реакции мышечного препарата *vagina vera A. suum* на эндогенные нейропептиды, выделенные из свободноживущей нематоды, PF1, PF2 и PF4 показал, что эти пептиды являются ингибиторами сократительной активности мускулатуры *vagina vera*, вызывая расслабление кольцевой мускулатуры, уменьшение частоты и амплитуды сокращения или остановку сократительной активности, и повышение напряжения (тонуса) мускулатуры [8].

Нейропептиды PF1 и PF2, будучи структурно сходными, вызывали ингибиторные эффекты на сократительную активность препарата и имели пороговые концентрации активности, равные 1 nM и 3 nM соответственно. Эти данные позволяют предположить, что пептиды PF1 и PF2 взаимодействуют с одним и тем же рецептором на мускулатуре *vagina vera*.

Нейропептид PF4 так же, как и пептиды PF1 и PF2, вызывал ингибиторное действие на сократительную активность препарата *vagina vera*. Порог активности этого пептида был выше, чем у пептидов PF1 и PF2 и составлял 10 nM . Однако эффекты нейропептида PF4 были более выраженными при воздействии концентрации выше 10 nM по сравнению с пептидами PF1 и PF2. Предполагается, что такой выраженный эффект PF4 может быть связан с уменьшением скорости метаболизма этого нейропептида за счет присутствия в его структуре определенной аминокислотной последовательности, тормозящей скорость метаболизма нейропептида PF4 по сравнению с пептидами PF1 и PF2, у которых эта последовательность отсутствует [8].

Анализ разнообразных эффектов всех тестированных нейропептидов на мышечном препарате *vagina vera* нематоды *A. suum* указывает на вероятность взаимодействия этих биологически активных веществ либо с одним, либо с несколькими рецепторами и/или их подтипами на мускулатуре *vagina vera* и различных механизмах взаимодействия рецепторов с тестируемыми нейропептидами [8; 9; 19; 22; 24].

В то же время отмечается, что механизм действия тестируемых эндогенных пептидов на мускулатуру *vagina vera* остается еще не выясненным [8].

Можно предположить, что разнообразие сложных физиологических эффектов ряда эндогенных FMRFамид-подобных пептидов, выявленное при их воздействии на мышечный препарат *vagina vera* паразитической нематоды *A. suum*, может быть обусловлено многими факторами. К таким факторам можно, вероятно, отнести взаимодействие тестируемых нейропептидов с одним и тем же рецептором (предположительно, GPCR и/или его подтипами) на мускулатуре *vagina vera*,

взаимодействие с различными рецепторами, вызывающее разнообразные ответы эффекторной клетки, а также взаимодействие с неспецифическими рецепторами, находящимися на мускулатуре *vagina vera* (8; 9; 17; 19; 22; 24;].

Кроме того, разнообразие сложных физиологических эффектов эндогенных FMRFамид-подобных пептидов на мускулатуре *vagina vera* нематоды *A. suum* может быть связано с полифункциональностью нейропептидов, заключающейся в способности этих веществ выполнять в тех или иных случаях различные функции - передатчиков нервного импульса, модуляторов или нейрогормонов, которая ранее была выявлена и описана у других животных [2; 26].

Немаловажным фактором, способствующем развитию сложных и разнообразных ответов мускулатуры *vagina vera* аскариды на воздействие FMRFамид-подобных пептидов, может быть выявленная особенность протеолитического распада нейропептидов. Так, показано, что в результате протеолитического распада нейропептидов часто происходит образование нового биологически активного соединения (или соединений), активность которого может не совпадать с активностью исходного нейропептида [1; 8; 13].

Таким образом, данные литературы о наличии иммунореактивности к FMRFамид-подобным веществам в нервной системе и нервных структурах конечного отдела репродуктивной системы паразитической нематоды *A. suum* наряду с молекулярными данными о выявлении у нематод генов, кодирующих различные FMRFамид-подобные пептиды, а также сведениями о наличии рецепторов (GPCR) у нематод, взаимодействующих с FMRFамид-подобными пептидами, могут прямо или косвенно свидетельствовать об участии FMRF-амидергической системы в регуляции различных физиологических функций конечного отдела репродуктивной системы у аскариды.

Выводы.

Изменение спонтанной сократительной активности мускулатуры *vagina vera* нематоды *Ascaris suum* под воздействием эндогенных нейропептидов, выделенных из тканей паразитических (*A. suum*) и свободноживущих (*Caenorhabditis elegans*, *Panagrellus redivivus*) нематод, предполагает, что эти нейропептиды играют важную интегрирующую роль в функции репродуктивной системы самок нематод, участвуя в регуляции выделения зрелых яиц в просвет кишечника хозяина и копуляции.

Способность эндогенных нейропептидов PF1, PF2 и PF4, выделенных из тканей свободноживущей нематоды *P. redivivus*, вызывать в низких концентрациях глубокое ингибирование спонтанной сократительной активности мышечных структур конечного отдела половой системы *A. suum* в результате расслабления кольцевой мускулатуры *vagina vera*, может представлять интерес для практической ветеринарии при разработке эффективных антигельминтиков, например, структурных аналогов нейропептидов PF1, PF2 и PF4, которые будут вмешиваться в регуляцию выделения яиц самками нематод в просвет кишечника хозяина и тем самым сдерживать распространение нематодной инвазии в окружающей среде.

Литература.

1. Ашмарин И.П., Каменская М.А., 1988. Нейропептиды в синаптической передаче. Итоги науки и техники. Сер. Физиология человека и животных. М. Изд-во Ин-та биомед. химии РАМН. - 1996. - 469 с.
2. Малютина Т.А., Теренина Н.Б., Крещенко Н.Д. Нейропептиды у нематод: наличие, локализация, влияние на локомоторное поведение.//Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. – 2015. - Т. 157, - кн. 2. - С. 35 – 48.
3. Шульц Р.С., Е.В. Гвоздев. Основы общей гельминтологии. М: Наука.- 1970. -Т. 1.- 491 с.

4. Brownlee D.J.A., Fairweather I., Johnston C.F... Immunocytochemical demonstration of neuropeptides in the peripheral nervous system of the roundworm *Ascaris suum* (Nematoda, Ascarioidea). *Parasitol. Res.*, 1993, vol. 79, pp. 302-308.
5. Chitwood B.G., Chitwood M.B. The reproductive system. *Introduction to nematology*. Baltimore, University Park Press, 1974, pp. 136-152,
6. Day T.A., Maule A. G. Parasitic peptides! The structure and function of neuropeptides in parasitic worms. *Peptides*, 1999, vol. 20, pp. 999-1019.
7. Edison A.F., Messinger L.A., Stretton A.O.W. Afp-1: A gene encoding multiple transcripts of a new class of FMRFamide-like neuropeptides in the nematode *Ascaris suum*. *Peptides*, 1997, vol. 18, pp. 929-935.
8. Fellowes R.A., Maule A. G., Marks N.J., Geary T.G., Thompson D.P., Halton D.W. Nematode neuropeptide modulation of vagina vera of *Ascaris suum*: in vitro effects of PF1, PF2, PF4, AF3 and AF4. *Parasitology*, 2000, vol. 120, pp. 79-89.
9. Fellowes R.A., Maule A.G., Marks N.J., Geary T.G., Thompson D.P., Shaw C., Halton D.W. Modulation of the motility of the vagina vera of *Ascaris suum* in vitro by FMRFamide-related peptides. *Parasitology*, 1998, vol. 116, pp. 277-287.
10. Fetterer R.H., Pax R.A., Bennett J.L. *Schistosoma mansoni*: direct method for simultaneous recordings of the electrical and motor activity. *Experimental Parasitology*, 1977, vol. 43, pp. 286-294.
11. Geary T.G., Kubiak T.M. Neuropeptide G-protein-coupled receptors, their cognate ligands and behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2005, vol. 26, pp. 56-58.
12. Gowden C., Stretton A.O.W. FMRFamide-like neuropeptides isolated from the nematode *Ascaris suum*. *Peptides*, 1995, vol. 16, pp. 491-500.
13. Isaac R.E., MacGregor D., Coates D. Metabolism and inactivation of neurotransmitters in nematodes. *Parasitology*, 1996, vol. 113, Suppl., pp. S137-S173.
14. Johnston M.J.G., McVeigh P., McMaster S., Fleming C.C. FMRFamide-like peptides in root knot nematodes and their role in nematode Physiology. *Journal of Helminthology*, 2010, vol. 84, i 3, pp. 253-265.
15. Kubiak T.M., Larsen M.J., Davis J.P., Zantello M.R., Bowman J.W. AF2 interaction with *Ascaris suum* body wall muscle membranes involves G-protein activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, vol. 301, no. 2, pp. 456 – 459.
16. Li C., Kim K. Neuropeptides. *Worm Book: The C. elegans Research Community*, 2008.
17. Li Ch., Kim K. Family of FLP Peptides in *Caenorhabditis elegans* and Related Nematodes. *Front Endocrinol.*, 2014, no 5, p. 150.
18. McCoy C.J., Atkinson L.E., Zamanian M., McVeigh P., Day T.A., Kimber M.J., Marks N.J., Maule A.G., Mousley A. New insights into the FLP complement of parasitic nematodes: Informing deorphanisation approaches. *Eu Pa Open Proteomics*, 2014, vol. 3, pp. 262-272.
19. McVeigh P., Geary T.G., Marks N.J., Maule A.G. The FLP-side of nematodes. *TRENDS in Parasitology*, 2006, vol. 22, pp. 385-396.
20. McVeigh P., Leech S., Mair G. R., Marks N.J., Geary T.G., Maule A. G. 2005. Analysis of FMRFamide-like peptide (FLP) diversity in phylum Nematoda. *Int. J. Parasitology*, 2005, vol. 35, pp. 1043-1060.
21. Marks N.J., Johnson S., Maule A.G., Halton D.W., Shaw C., Geary T.G., Moore S., Thompson D.P. Physiological effects of platyhelminths RFamide peptides on muscle-strip preparations of *Fasciola hepatica* (trematoda: Digenea). *Parasitology*, 1996, vol. 113, pp. S119-S136.
22. Marks N.J., Maule A. G., Li C., Nelson L.S., Thompson D.P., Alexander-Bowman S., Geary T.G., Halton D.W., Verhaert P., Shaw C. Isolation, pharmacology and gene organization of KPSFVRamide: A neuropeptide from *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and Biophysical research*. 1999, vol. 254, i. 1, pp. 222- 230.

23. Maule A.G., Mousley A., Marks N.J., Day T.A., Thompson D.P., Geary T.G., Halton D.W. Neuropeptide signalling systems – potential drug targets for parasite and pest control. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2002, vol. 2, pp. 733 – 758.
24. Moffett C.L., Beckett A.M., Mousley A., Geary T.G., Marks N.J., Halton D. W., Thompson D.P., Maule A. The ovijector of *Ascaris suum*: multiple response types revealed by *Caenorhabditis elegans* FMRFamide – related peptides. *Int. J. Parasitol.*, 2003, vol. 33, pp. 859-876.
25. Papaioannou S., Marsden D., Franks C.J., Walker R.J., Holden-Dye L. Role of a FMRFamide-like family of neuropeptides in the pharyngeal nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurobiol.*, 2005, vol. 65, no. 3, pp. 304-319.
26. Peymen K., Watteyne J., Froominckx L., Schoofs L., Beets I. The FMRFamide-like peptide family in nematodes. *Frontiers in endocrinology*, 2014, vol. 5, Art. 90, pp. 1-21.
27. Price D.A., Greenberg M.J. 1977. Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science*, 1977, vol. 197, pp. 670-671.
28. Rosoff M.L., Burglin T.R., Li C. Alternatively spliced transcripts of the *flp- 1* gene encode distinct FMRFamide- like peptides in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.*, 1992, vol. 12, pp. 2356-2361.
29. Verma S., Robertson A.P., Martin R.J. The nematode neuropeptide, AF2 (KHEYLRF-NH 2), increases voltage-activated calcium currents in *Ascaris suum* muscle. *British J. Pharmacology*, 2007, vol. 151, pp. 888-899.

References

1. Ashmarin I.P., Kamenskaya M.A., 1988. Neuropeptidy v sinapticheskoy peredache. Ser. Fiziologiya cheloveka i zivotnykh. Itogi nauki i tekhniki [Neuropeptides in the synaptic transmission. Ser. Physiology of human and animals], M., Inst. of Biomed. Chemistry RAMS, 1996. 469 p. (in Russian).
2. Malyutina T.A., Terenina N.B., Kreshchenko N.D. Neuropeptides in nematodes: presence, localization, effect on locomotor behavior. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Seriya: Estestvennye nauki. [Scientific Papers of Kazan University, Ser. Natural Sciences]*, 2015, vol. 157, Book 2, pp. 35 – 48 (in Russian).
3. Shul'ts R.S., Gvozdev E.V. Osnovy obshchey gel'mintologii [Essentials of general helminthology]. M. , Nauka, 1970, vol. 1. 491 p. (in Russian).
4. Brownlee D.J.A., Fairweather I., Johnston C.F. Immunocytochemical demonstration of neuropeptides in the peripheral nervous system of the roundworm *Ascaris suum* (Nematoda, Ascarioidea). *Parasitol. Res.*, 1993, vol. 79, pp. 302-308.
5. Chitwood B.G., Chitwood M.B. The reproductive system. *Introduction to nematology*. Baltimore, University Park Press, 1974, pp. 136-152.
6. Day T.A., Maule A. G. Parasitic peptides! The structure and function of neuropeptides in parasitic worms. *Peptides*, 1999, vol. 20, pp. 999-1019.
7. Edison A.F., Messinger L.A., Stretton A.O.W. *Afp-1*: A gene encoding multiple transcripts of a new class of FMRFamide- like neuropeptides in the nematode *Ascaris suum*. *Peptides*, 1997, vol. 18, pp. 929-935.
8. Fellowes R.A., Maule A. G., Marks N.J., Geary T.G., Thompson D.P., Halton D.W. Nematode neuropeptide modulation of vagina vera of *Ascaris suum*: in vitro effects of PF1, PF2, PF4, AF3 and AF4. *Parasitology*, 2000, vol. 120, pp. 79-89.
9. Fellowes R.A., Maule A.G., Marks N.J., Geary T.G., Thompson D.P., Shaw C., Halton D.W. Modulation of the motility of the vagina vera of *Ascaris suum* in vitro by FMRFamide-related peptides. *Parasitology*, 1998, vol. 116, pp. 277-287.
10. Fetterer R.H., Pax R.A., Bennett J.L. *Schistosoma mansoni*: direct method for simultaneous recordings of the electrical and motor activity. *Experimental Parasitology*, 1977, vol. 43, pp. 286-294.
11. Geary T.G., Kubiak T.M. Neuropeptide G-protein-coupled receptors, their cognate ligands and behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2005, vol. 26, pp. 56-58.

12. Gowden C., Stretton A.O.W. FMRFamide-like neuropeptides isolated from the nematode *Ascaris suum*. *Peptides*, 1995, vol. 16, pp. 491-500.
13. Isaac R.E., MacGregor D., Coates D. Metabolism and inactivation of neurotransmitters in nematodes. *Parasitology*, 1996, vol. 113, Suppl., pp. S137-S173.
14. Johnston M.J.G., McVeigh P., McMaster S., Fleming C.C. FMRFamide-like peptides in root knot nematodes and their role in nematode Physiology. *Journal of Helminthology*, 2010, vol. 84, i 3, pp. 253-265.
15. Kubiak T.M., Larsen M.J., Davis J.P., Zantello M.R., Bowman J.W. AF2 interaction with *Ascaris suum* body wall muscle membranes involves G-protein activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, vol. 301, no. 2, pp. 456 – 459.
16. Li C., Kim K. *Neuropeptides. Worm Book: The C. elegans Research Community*, 2008.
17. Li Ch., Kim K. Family of FLP Peptides in *Caenorhabditis elegans* and Related Nematodes. *Front Endocrinol.*, 2014, no 5, p. 150.
18. McCoy C.J., Atkinson L.E., Zamanian M., McVeigh P., Day T.A., Kimber M.J., Marks N.J., Maule A.G., Mousley A. New insights into the FLPergic complements of parasitic nematodes: Informing deorphanisation approaches. *Eu Pa Open Proteomics*, 2014, vol. 3, pp. 262-272.
19. McVeigh P., Geary T.G., Marks N.J., Maule A.G. The FLP-side of nematodes. *TRENDS in Parasitology*, 2006, vol. 22, pp. 385-396.
20. McVeigh P., Leech S., Mair G. R., Marks N.J., Geary T.G., Maule A. G. 2005. Analysis of FMRFamide-like peptide (FLP) diversity in phylum Nematoda. *Int. J. Parasitology*, 2005, vol. 35, pp. 1043-1060.
21. Marks N.J., Johnson S., Maule A.G., Halton D.W., Shaw C., Geary T.G., Moore S., Thompson D.P. Physiological effects of platyhelminths RFamide peptides on muscle-strip preparations of *Fasciola hepatica* (trematoda: Digenea). *Parasitology*, 1996, vol. 113, pp. S119-S136.
22. Marks N.J., Maule A. G., Li C., Nelson L.S., Thompson D.P., Alexander-Bowman S., Geary T.G., Halton D.W., Verhaert P., Shaw C. Isolation, pharmacology and gene organization of KPSFVRFamide: A neuropeptide from *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and Biophysical research*. 1999, vol. 254, i. 1, pp. 222- 230.
23. Maule A.G., Mousley A., Marks N.J., Day T.A., Thompson D.P., Geary T.G., Halton D.W. Neuropeptide signalling systems – potential drug targets for parasite and pest control. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2002, vol. 2, pp. 733 – 758.
24. Moffett C.L., Beckett A.M., Mousley A., Geary T.G., Marks N.J., Halton D. W., Thompson D.P., Maule A. The ovijector of *Ascaris suum*: multiple response types revealed by *Caenorhabditis elegans* FMRFamide – related peptides. *Int. J. Parasitol.*, 2003, vol. 33, pp. 859-876.
25. Papaioannou S., Marsden D., Franks C.J., Walker R.J., Holden-Dye L. Role of a FMRFamide-like family of neuropeptides in the pharyngeal nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurobiol.*, 2005, vol. 65, no. 3, pp. 304-319.
26. Peymen K., Watteyne J., Frooninckx L., Schoofs L., Beets I. The FMRFamide-like peptide family in nematodes. *Frontiers in endocrinology*, 2014, vol. 5, Art. 90, pp. 1-21.
27. Price D.A., Greenberg M.J. 1977. Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science*, 1977, vol. 197, pp. 670-671.
28. Rosoff M.L., Burglin T.R., Li C. Alternatively spliced transcripts of the *flp- 1* gene encode distinct FMRFamide- like peptides in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.*, 1992, vol. 12, pp. 2356-2361.
29. Verma S., Robertson A.P., Martin R.J. The nematode neuropeptide, AF2 (KHEYLR^F-NH₂), increases voltage-activated calcium currents in *Ascaris suum* muscle. *British J. Pharmacology*, 2007, vol. 151, pp. 888-899.

Russian Journal of Parasitology, 2017, V.41, Iss.3

DOI:

Received 04.04.2017

Accepted 19.09.2017

**EFFECTS OF ENDOGENOUS FMRFAMIDE-LIKE PEPTIDES ON MUSCLES OF
DISTAL PART OF ASCARIS SUUM FEMALE REPRODUCTIVE SYSTEM**

Malyutina T.A., Terenina N.B.

Center of Parasitology, A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, 119071, Moscow, 33 Leninsky pr., e-mail: maliytina@mail.ru; terenina_n@mail.ru.

Abstract

Development of drug resistance in parasitic organisms, including nematodes, makes it necessary, on one side to study molecular mechanisms of such resistance formation, on the other side, to find new biological targets to reduce the spread of infections.

One of such targets in parasitic nematodes may be a distal section of nematode female reproductive system – vagina or ovijector. It is a critically important muscle organ of nematodes reproductive system with main physiological functions of ejecting infective eggs into host intestine and catching male sperm.

The goal of the article is review and analysis of literature data on effects of some endogenous neuropeptides (FMRF-like peptides) on muscles of distal part of vagina vera of *Ascaris suum* parasitic nematode.

The article also considered possibilities for using a distal part of reproductive system of female nematodes as one of biological targets for potential anthelmintics synthesized on the basis of FMRFamide-like neuropeptides to fight against nematodosis of humans, animals and plants.

Keywords: nematodes, reproductive system, vagina vera, FMRFamide-like neuropeptides.

© 2017 The Author(s). Published by All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants named after K.I. Skryabin. This is an open access article under the Agreement of 02.07.2014 (Russian Science Citation Index (RSCI)http://elibrary.ru/projects/citation/cit_index.asp) and the Agreement of 12.06.2014 (CABI.org/Human Sciences section: <http://www.cabi.org/Uploads/CABI/publishing/fulltext-products/cabi-fulltext-material-from-journals-by-subject-area.pdf>)