

DOI: 10.7868/S0869813918060060

**РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СУБЪЕДИНИЦ GLUR1 И GLUR2  
AMPA-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В МОЗГЕ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ**

© Т. Г. Зачепило, Н. Г. Лопатина

Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: polosataya2@mail.ru

AMPA-рецепторы регулируют медиаторную функцию нейронов, участвуя в возбуждающей/тормозной нейротрансмиссии, в синаптической пластичности и когнитивных процессах. Ранее нашими поведенческо-фармакологическими исследованиями было показано, что в головном мозге пчелы присутствуют рецепторы, сходные с AMPA-рецепторами млекопитающих. Целью данной работы было изучить распределение субъединиц GluR1 и GluR2 AMPA-подобных рецепторов в мозге медоносной пчелы. С помощью иммунофлуоресцентного окрашивания срезов мозга пчелы впервые изучено распределение GluR1 и GluR2. Максимальное окрашивание имело место в нейропиле и нейронах грибовидных тел, в отдельных нейронах зрительных и обонятельных долей. Таким образом, AMPA-подобные рецепторы в мозге медоносной пчелы локализованы в регионах мозга, связанных с обработкой сенсорной информации и формированием ассоциативной памяти.

*Ключевые слова:* AMPA-рецепторы, GluR1- и GluR2-субъединицы, медоносная пчела.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 6. С. 654—658. 2018

*T. G. Zachepilo, N. G. Lopatina.* GLUR1 AND GLUR2 SUBUNITS OF AMPA-LIKE RECEPTORS IN THE HONEYBEE BRAIN. Pavlov Institute of Physiology of the RAS, St. Petersburg, Russia, e-mail: polosataya2@mail.ru.

AMPA receptors regulate neurotransmitter function by participating in excitatory / inhibitory neurotransmission, in synaptic plasticity and cognitive processes. Previously, our behavioral and pharmacological studies have shown that in the honeybrain there are receptors similar to AMPA receptors in mammals. The purpose of this work was to research the distribution of subunits of GluR1 and GluR2 AMPA-like receptors in the honeybee brain. Using the immunofluorescence staining of the honeybee brain sections, the distribution of GluR1 and GluR2 was studied for the first time. The maximum of staining took place in the neuropil and neurons of the mushroom bodies, in the visual and olfactory lobes. Thus, AMPA-like receptors in the honeybee brain are localized in regions of the brain associated with the processing of sensory information and the formation of associative memory.

*Key words:* AMPA receptors, GluR1 and GluR2 subunits, honeybee.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 6. P. 654—658. 2018

Способность к обучению общественных насекомых, в том числе медоносной пчелы, достигает высокой степени сложности [2, 6, 8]. Механизмы, лежащие в основе когнитивной деятельности медоносной пчелы, активно изучаются. В по-

следние два десятилетия доказано, что в процессах ассоциативного обучения важную роль играет гетерогенная популяция рецепторов глутамата — основного возбуждающего медиатора в ЦНС позвоночных [10] и беспозвоночных животных, в частности медоносной пчелы [5].

Особое место в этих процессах занимают ионотропные рецепторы глутамата AMPA-подтипа, широко экспрессирующиеся в ЦНС позвоночных животных. Глутаматные ионотропные AMPA-рецепторы характеризуются фазным действием и обеспечивают быструю деполяризацию мембран, участвуя в процессах нейротрансмиссии и внутриклеточной сигнализации. Каналы всех AMPA-рецепторов проницаемы для ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , некоторых — для  $\text{Ca}^{2+}$ . AMPA-рецепторы регулируют медиаторную функцию нейронов, участвуя в возбуждающей/тормозной нейротрансмиссии, в синаптической пластичности и когнитивных процессах.

AMPA-рецепторы позвоночных — тетрамеры — содержат субъединицы GluR1—GluR4 в разном соотношении. Каждая субъединица кодируется отдельным геном. Разнообразие вариантов белковых субъединиц увеличивается за счет сплайс-вариантов, редактирования мРНК и посттрансляционных модификаций [9]. Большинство нейрональных AMPA-рецепторов млекопитающих содержит GluR1- и GluR2-субъединицы. Нарушение экспрессии, локализации и функции указанных субъединиц наблюдается при многих нервных заболеваниях [10].

Сведения об особенностях функционирования и экспрессии AMPA-подобных рецепторов у беспозвоночных животных значительно скромнее. В геномах беспозвоночных найдены нуклеотидные последовательности, гомологичные последовательностям, кодирующим субъединицы AMPA-рецепторов позвоночных. В наших исследованиях [4], проведенных с использованием метода условных рефлексов, выявлено сходство фармакологических характеристик GluR2-рецепторов медоносной пчелы с позвоночными животными. Показано участие центральных AMPA-подобных рецепторов в ассоциативном обучении медоносной пчелы при однократной процедуре обучения [3], а также сходная с млекопитающими ко-активация рецепторов возбуждающих аминокислот AMPA- и NMDA-подтипов, необходимая для формирования кратковременной памяти [5].

Локализация AMPA-подобных рецепторов и особенности экспрессии отдельных субъединиц в мозге насекомых ранее не изучались. В связи с этим в данной работе мы исследовали распределение GluR1- и GluR2-субъединиц в мозге медоносной пчелы.

## МЕТОДИКА

Работа выполнена на рабочих особях медоносной пчелы *Apis mellifera* карпатской расы.

*Иммуногистохимия.* Насекомых подвергали холодовому наркозу. Охлажденным пчелам вскрывали головную капсулу и выделяли мозг. Фиксировали в забуференном растворе параформальдегида (4 %) 4 ч. Обезвоживали препараты в спиртах (40, 70, 96 и 100 %) по 30 мин в каждом. Далее помещали в метилбензоат (1 ч), после чего в метилбензоат/парафин (50:50) (1 ч). Парафинизировали препараты в течение 3 ч при 65 °С и заливали в парафиновые блоки. Из блоков готовили срезы (7 мкм). Срезы депарафинизировали и регидратировали (ксилол, спирты — 100, 96, 70 и 40 %) по 15 мин в каждом реагенте. Демаскировку антигенов проводили в цитратном буфере (рН 6) в микроволновой печи (при мощности 400 W 2 раза по 5 мин). Препараты обрабатывали 30 мин в 0.3%-ной  $\text{H}_2\text{O}_2$  для подавления аутофлуоресценции нервной ткани насекомых в зеленой части спектра. Инкубировали с нормальной блокирующей сывороткой козы (2.5 % Normal Goat Serum, ready-to-use, Vector) 1 ч при 25 °С. Проводили 2 отдельные иммунные реакции (специфичность антител предварительно проверяли с помощью вестерн-блоттинга): 1) с первичными антителами кролика к GluR1 (разведение 1:300 в фосфатном буфере, содержащем 0.1 % Triton X-100, AMPA Receptor

(GluA) Antibody Sampler Kit, Cell Signaling); 2) GluR2 (кролик, разведение 1:300, в фосфатном буфере, содержащем 0.1 % Triton X-100, AMPA Receptor (GluA) Antibody Sampler Kit, Cell Signaling) в течение ночи при 4 °С. Инкубацию с вторичными антителами козы, конъюгированными с флуоресцеином (Santa Cruz, разведение 1:1000 в фосфатном буфере, содержащем 0.1 % Triton X-100), проводили 1 ч при 25 °С. Заключали препараты в среду Vectashild (Vector). Ставили отрицательные контроли без первичных и вторичных антител. Все промывки осуществляли фосфатным буфером. Полученные препараты анализировали с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss) — спектр возбуждения 487—495 нм — и с программным обеспечением производителя.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью иммунофлуоресцентного окрашивания срезов мозга пчелы впервые был выявлен характер распределения GluR1- и GluR2-субъединиц (рис. 1 и 2 соответственно). О присутствии GluR1- и GluR2-субъединиц АМРА-подобных рецепторов в мозге медоносной пчелы судили по наличию окрашивания на срезах.

Данные субъединицы локализованы сходным образом. Окрашивание наблюдали как в нейропиле, так и в нейрональных областях. Интенсивное окрашива-

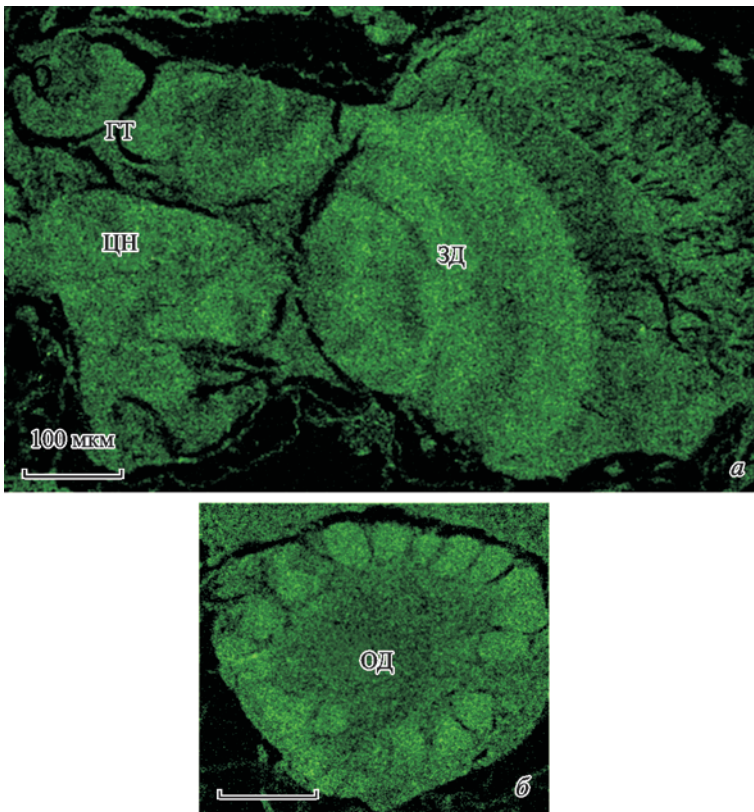


Рис. 1. Распределение GluR1 субъединицы АМРА-подобных рецепторов в мозге медоносной пчелы: *a* — центральный нейропил (ЦН), грибовидные тела (ГТ) зрительные доли (ЗД); *b* — обонятельные доли (ОД).

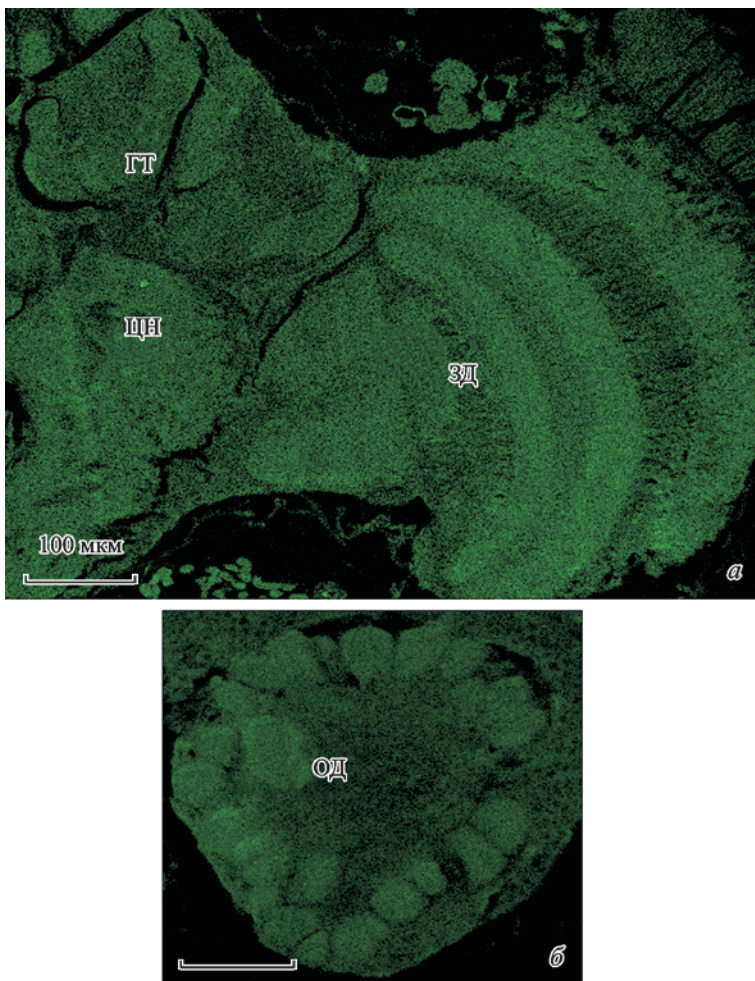


Рис. 2. Распределение GluR2 субъединицы AMPA-подобных рецепторов в мозге медоносной пчелы: *a* — ЦН, ГТ, ЗД; *б* — обонятельные доли (ОД).

ние имело место: 1) в чашечках и нейронах грибовидных тел (рис. 1, *a*; 2, *a*) — парной структуре, отвечающей у насекомых за формирование и хранение ассоциативной памяти, 2) в нейроне и отдельных нейронах зрительных (рис. 1, *a*; 2, *a*) и обонятельных долей (рис. 1, *б*; 2, *б*).

Интересно отметить, что похожее распределение в мозге пчелы имеет и NMDA-подобный рецептор глутамата: иммунопозитивными являются нейроны грибовидных тел, зрительные и обонятельные доли [1]. Известно, что обонятельные доли вместе с грибовидными телами составляют морфологический субстрат обонятельной памяти у пчелы [7]. Высокая экспрессия глутаматных ионотропных рецепторов в зрительных долях, по-видимому, связана с интенсивной обработкой информации в этой зоне.

В совокупности с ранее полученными данные настоящие свидетельствуют о присутствии в головном мозге медоносной пчелы AMPA-подобных рецепторов, содержащих GluR1- и GluR-2 субъединицы. Таким образом, AMPA-подобные рецепторы пчелы локализованы в регионах мозга, связанных с обработкой сенсорной информации и формированием ассоциативной памяти.



Работа проведена на животных из ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН», поддержана программой ФАНО России по сохранению и развитию биоресурсных коллекций.

Исследования выполнялись на оборудовании ЦКП «Конфокальная микроскопия» Института физиологии им. И. П. Павлова РАН.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] Зачепило Т. Г., Ильиных Ю. Ф., Лопатина Н. Г., Молотков Д. А., Попов А. В., Савватеева-Попова Е. В., Вайдо А. И., Чеснокова Е. Г. Сравнительный анализ особенностей локализации субъединиц рецептора NMDA — NR1 и NR2 — в структурах головного ганглия медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) и дрозофилы (*Drosophila melanogaster*, линия дикого типа Canton-S). Морфология. 131(2) : 59—64. 2007.

[2] Лопатина Н. Г. Сигнальная деятельность в семье медоносной пчелы. Л. 1971.

[3] Лопатина Н. Г., Зачепило Т. Г., Рыжова И. В., Смирнов В. Б., Чеснокова Е. Г. Дифференциальное участие центральных рецепторов L-глутамата не-NMDA-подтипа в ассоциативном обучении медоносной пчелы *Apis mellifera*. Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 40(3) : 220—224. 2004.

[4] Лопатина Н. Г., Рыжова И. В., Чеснокова Е. Г. Роль не-NMDA-рецепторов в процессе ассоциативного обучения медоносной пчелы *Apis mellifera*. Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 38(2) : 163—168. 2002.

[5] Рыжова И. В., Лопатина Н. Г., Чеснокова Е. Г. Рецепторы возбуждающих аминокислот в ассоциативном обучении медоносной пчелы *Apis mellifera* L. Тр. Рус. энтомол. об-ва. СПб. 74 : 17—32. 2003.

[6] Фриш К. Из жизни пчел. М. 1966.

[7] Швецов А. В., Зачепило Т. Г. Морфологическая основа условного рефлекса у медоносной пчелы *Apis mellifera* L. Журн. высш. нерв. деятельности. 62 (6) : 654—663. 2012.

[8] Menzel R. Honeybee neurobiology and behavior. London, New York. 2012.

[9] Peng S., Zhang Y., Zhang J., Wang H., Ren B. Glutamate receptors and signal transduction in learning and memory. Mol. Biol. Rep. 38(1) : 453—460. 2011.

[10] Riedel G., Platt B., Micheau J. Glutamate receptor function in learning and memory. Behav. Brain Res. 140 : 1—47. 2003.

Поступила 23 IV 2018