

ВЛИЯНИЕ АДЕНОЗИНА И ДОПАМИНА НА РЕГУЛЯЦИЮ ВОДНО-СОЛЕВОГО ОБМЕНА АМЕБЫ *АМОЕБА PROTEUS*

© Я. Ю. Багров,¹ Н. Б. Манусова

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: bagrov@iephb.ru

Исследовали влияние аденозина и допамина на спонтанную активность сократительной вакуоли *Amoeba proteus*. Аденозин и допамин известны как регуляторы транспорта хлористого натрия в почечных канальцах млекопитающих. Мы показали, что допамин и аденозин оказывают стимулирующее действие на сократительную вакуоль — орган, поддерживающий водно-солевой гомеостаз амёбы. Действие допамина подавляется ингибитором рецепторов типа D2 галоперидолом, но нечувствительно к блоктору рецепторов типа D1 веществу SCH 39166. Ингибитор аденилатциклазы (2,5-dideoxyadenosine) подавляет лишь действие допамина и не влияет на действие аденозина. Ингибитор протеинкиназы C стауроспорин, напротив, блокирует лишь действие аденозина. Обнаружены антагонистические отношения между допamiном и аденозином. Таким образом, внешне сходные эффекты допамина и аденозина могут иметь различные внутриклеточные механизмы.

Ключевые слова: простейшие, *Amoeba proteus*, сократительная вакуоль, водно-солевой гомеостаз, аденозин, допамин.

Принятые сокращения: АВП — аргинин-вазопрессин, АСВ — активность сократительной вакуоли, АЦ — аденилатциклаза, ПКС — протеинкиназа C, ФДЭ — фосфодиэстераза, цАМФ — циклический аденозинмонофосфат.

Аденозин — это нуклеозид, состоящий из аденина и рибозы. Он входит в состав таких веществ, как АТФ и циклический аденозинмонофосфат (цАМФ). Помимо этого, аденозин играет самостоятельную роль нейротрансмиттера ингибиторного типа у многоклеточных и является эволюционно древнейшим активатором транспорта ионов натрия и хлора в различных органах и системах (Di Sole, 2008; Vallon, Rieg, 2011).

Допамин, широко известный как нейромедиатор позвоночных, синтезируется и в почках и оказывает на транспорт ионов натрия в проксимальных канальцах влияние, противоположное влиянию аденозина (Cuk et al., 2004). В царстве животных допамин есть уже у некоторых простейших. Однако указаний о наличии у амёбы допамина мы не нашли.

Предшественником допамина является незаменимая аминокислота фенилаланин, которая уже в клетке превращается в L-тирозин, а он далее превращается в допамин. Этот путь превращения в клетке L-тирозина в допамин описан у всех классов животных. Однако у насекомых найден более короткий путь превращения L-тирозина: через тирамин в октопамин, которому и отвели роль нейромедиатора у насекомых (Roeder, 1999). Октопамин и в меньшей степени тирамин дозозависимым образом увеличивают образование цАМФ у насекомых (Wu et al., 2012). Допамин, как казалось, не играет у них самостоятельной роли. Однако в последние годы появ-

вились работы, которые заставляют пересмотреть точку зрения на роль допамина у насекомых (Burke et al., 2012). Согласно последним данным, образующийся из L-тирозина октопамин принимает участие только в краткосрочной пищевой памяти у насекомых, а допамин играет у них такую же роль, как и у других классов животных.

Ранее нами обнаружено, что в регуляции транспорта натрия и воды у *Amoeba proteus* принимают участие те же гормональные механизмы, что и у позвоночных (Bagrov et al., 2003). Речь идет об аргинин-вазопрессине (АВП), окситоцине и цАМФ. Мы упомянули цАМФ в этом ряду, потому что он играет у амёбы роль не только вторичного мессенджера при действии АВП, но и активатора наружных рецепторов аденозинового типа (Багров и др., 2002; Bagrov et al., 2003). Механизм передачи сигнала от рецепторов веществ, регулирующих транспорт натрия и воды у амёбы, включает в себя те же элементы, что и аналогичный транспорт у позвоночных, — аденилатциклазу (АЦ), протеинкиназу C (ПКС) и фосфодиэстеразу (ФДЭ) (Allen, Naitoh, 2002; Багров, Манусова, 2007).

Сведений о наличии аденозина и допамина у *A. proteus* мы не нашли. Между тем эти вещества играют важную роль в регуляции водно-солевого транспорта у позвоночных. Целью настоящей работы было исследование влияния аденозина и допамина на регуляцию водно-солевого равновесия амёбы *A. proteus*.

Материал и методика

Эксперименты проводили на культуре пресноводных свободноживущих амёб *A. proteus*. Амёб содержали в среде Прескотта (Prescott, Carrier, 1964) при 25 °С. Кормом для них служили *Tetrahymena pyriformis*. Активность сократительной вакуоли (АСВ) амёбы оценивали по времени ее одного сокращения. Ее выражали в усл. ед., которые рассчитывали как (1/время одного сокращения вакуоли) · 100.

Интересно проследить путь сократительной вакуоли в цитоплазме амёбы. Вакуоль, постепенно увеличиваясь, подходит к ядру, затем током цитоплазмы подносится к внутренней стороне мембраны амёбы. Наполненная жидкостью вакуоль встраивается в наружную мембрану амёбы при помощи «устья» и при сокращении протофибрилл изливает свое содержимое во внешнюю среду. Свои наблюдения мы проводили при увеличении амёбы в 25 раз, используя объектив 10×. Однако электронно-микроскопические данные уточняют наши наблюдения, говоря о том, что наружная мембрана амёбы и мембрана сократительной вакуоли не смешиваются при образовании «устья» (Nishihara et al., 2007).

Эксперименты проводили следующим образом. В первой группе амёб определяли время сокращения вакуоли амёб в среде Прескотта без добавления препаратов (контроль). Затем в среду этой же группы амёб добавляли одно из веществ, меняющих АСВ (допамин, аденозин или АВП), и вновь определяли время сокращения вакуоли.

Вторую группу амёб предварительно выдерживали в течение 60 мин в среде Прескотта, содержащей одно из следующих веществ: блокатор рецепторов допамина или рецепторов аденозина, ингибитор Na,K-АТФазы или ингибитор V-АТФазы (модификатор внутриклеточных путей передачи сигнала). Вещества добавляли в подпороговой концентрации, т. е. в дозе, которая еще не меняет времени сокращения вакуоли. Затем вновь определяли АСВ амёбы, чтобы убедиться в том, что в данных условиях при данной концентрации препарата время сокращения вакуоли амёбы еще не отличается от контрольного. Затем к этим же амёбам добавляли одно из веществ, протестированное в первой группе амёб.

В работе были использованы следующие препараты фирмы Sigma-Aldrich (США): аденозин, допамин, аргинин-вазопрессин, L-тирозин, октопамин (предшественники образования допамина), убаин (ингибитор Na,K-АТФазы), бафиломисин (bafilomycin A1, ингибитор V-АТ-

Фазы), вещество SCH 39166 (ингибитор допаминовых рецепторов типа D1), галоперидол (ингибитор допаминовых рецепторов типа D2), 2,5-дидеоксиаденозина (2,5-dideoxyadenosine, ингибитор АЦ) и стауроспорин (ингибитор ПКС).

Результаты обрабатывали статистически с использованием однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) и теста Newman—Keuls (программа GraphPad Prism 3).

Результаты и обсуждение

Как видно на рис. 1, аденозин и допамин оказывают активизирующее дозозависимое влияние на сокращение вакуоли амёбы. Следует отметить, что характер обеих кривых одинаков. По этим кривым мы выбирали концентрацию веществ, которые использовали в дальнейшей работе. Следует обратить внимание, что мы не использовали вещества в концентрации больше 100 мкМ, так как в этом случае велика вероятность их неспецифического влияния. Дозозависимость определяли для всех препаратов, которые использовали в эксперименте (данные не приводятся). Как уже упоминалось, аденозин и допамин оказывают на транспорт электролитов в проксимальном канальце млекопитающих противоположное влияние (Cuk et al., 2004; Di Sole, 2008). В то же время их влияние на активность сократительной вакуоли амёбы оказалось односторонним (рис. 1).

Предшественником допамина у млекопитающих является L-тирозин (Daubneret et al., 2011; Krishna et al., 2012), а у насекомых из L-тирозина образуется еще и октопамин. Поэтому мы хотели выяснить, влияют ли сам L-тирозин и октопамин на частоту сокращений вакуоли *A. proteus*. L-тирозин в широком диапазоне концентраций (0.01—100 мкМ), добавленный в среду к амёбам, не изменяет времени сокращения вакуоли. Октопамин также не оказывает влияния на активность сократительной вакуоли *A. proteus* во всем диапазоне концентраций — от 0.01 до 100 мкМ (данные не показаны). Таким образом, *A. proteus* использует для регуляции своего водно-солевого гомеостаза из производных L-тирозина только допамин.

Данные об участии Na,K-АТФазы и V-АТФазы в водно-солевом гомеостазе амёбы *A. proteus* были получены *in vitro* с использованием различных методов — биохимического, электронно-микроскопического, флуоресцентного и при выделении сократительной вакуоли из тела

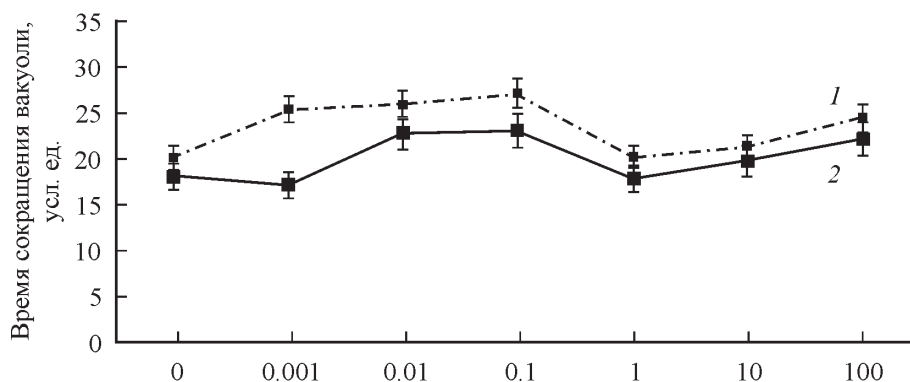


Рис. 1. Дозозависимое влияние допамина (1) и аденозина (2) на активность сокращений вакуоли (АСВ) амёбы *Amoeba proteus*.

Здесь и на всех рисунках вертикальные отрезки — ошибка среднего.

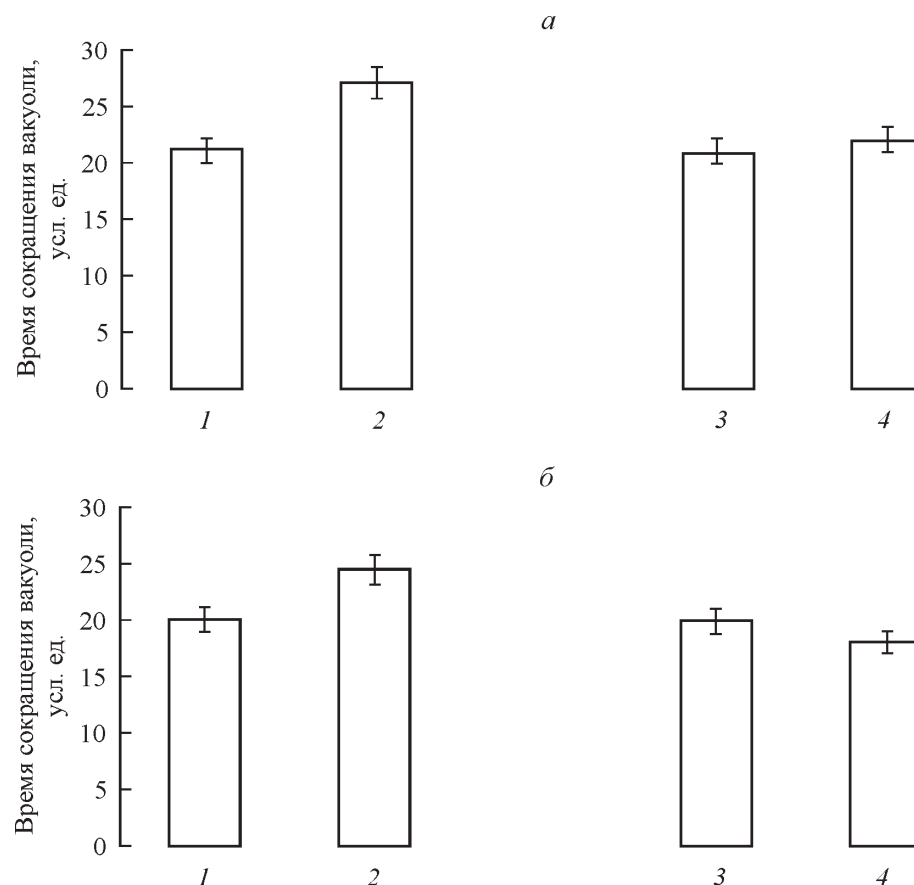


Рис. 2. Зависимость действия аргинин-вазопрессина (АВП, *a*) и аденозина (*б*) на АСВ *Amoeba proteus* от предварительной инкубации с ингибитором Na,K-АТФазы (уабаином) или V-АТФазы (бафиломицином).

Столбцы: 1 — контроль, 2 — 1 мкМ АВП (*a*) или 0.01 мкМ аденозина (*б*), 3 — то же после преинкубации с 0.01 мкМ бафиломицина, 4 — то же после преинкубации с 0.01 мкМ уабаина.

амёбы. В доступной нам литературе мы не нашли результатов экспериментов *in vivo* на свободноживущей амёбе. Поэтому нам показалось интересным обнаружить факт участия АТФаз различного типа в поддержании водно-солевого баланса у свободноживущих нативных амёб в условиях нашего эксперимента. На рис. 2, *a*, *б* представлены результаты влияния ингибиторов АТФаз на активность сократительной вакуоли амёбы, стимулированную аденозином или АВП. На рисунке видно, что и уабаин,

подавляющий Na,K-АТФазу, и бафиломицин А1, ингибитор V-АТФазы, снижают стимулированную АСВ амёбы. Следовательно, в действии АВП и аденозина участвуют оба типа АТФаз. Влияние допамина на активность этих типов АТФаз будет предметом дальнейших наших исследований.

У позвоночных животных влияние допамина на транспорт натрия и воды регулируется совместной работой рецепторов типов D1 и D2. Поэтому мы попытались

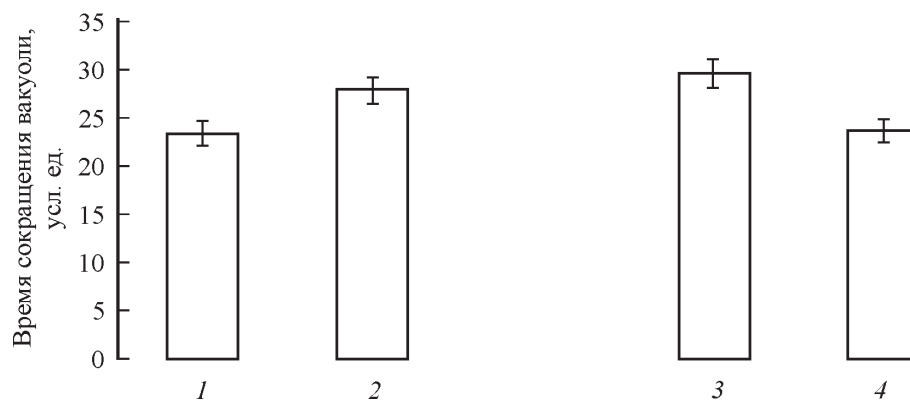


Рис. 3. Зависимость влияния допамина (0.01 мкМ) на АСВ *Amoeba proteus* от предварительного действия ингибитора рецепторов D1 (вещества SCH 39166) и D2 (галоперидола).

Столбцы: 1 — контроль, 2 — допамин, 3 и 4 — допамин после преинкубации соответственно с 0.01 мкМ SCH 39166 и 0.01 мкМ галоперидола.

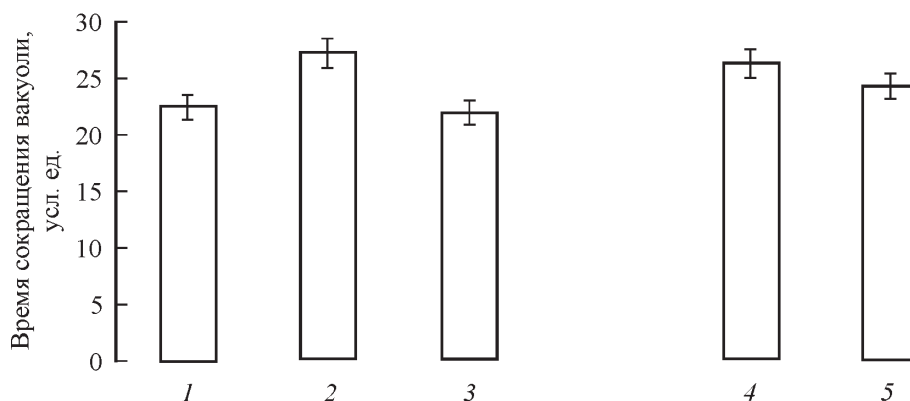


Рис. 4. Влияние ингибитора аденилатциклазы (АЦ; 2,5-дидеоксиаденозин, 0,01 мкМ) на частоту сокращений вакуоли, стимулированную допамином или аденозином.

Столбцы: 1 — контроль, 2 — 10 мкМ допамина, 3 — то же после преинкубации с ингибитором АЦ, 4 — 1 мкМ аденозина, 5 — то же после преинкубации с 0,01 мкМ ингибитора АЦ.

выяснить тип рецепторов, обеспечивающий водно-солевой баланс амёбы *A. proteus* in vivo. Для этого после предварительного действия на амёбы ингибитора этих рецепторов вновь определяли активность вакуоли под влиянием допамина. Ингибитор рецепторов типа D1 вещество SCH 39166 (0,01 мкМ) не влияло на эффект допамина. Однако ингибитор рецепторов типа D2 галоперидол (0,1 мкМ) снимал активирующее влияние допамина на АСВ (рис. 3). Это позволяет говорить о специфическом влиянии допамина на водно-солевой гомеостаз амёбы.

Следует отметить, что антагонистические отношения между допамином и аденозином, обнаруженные у млекопитающих, выявились и у амёбы. Нами было показано, что допамин в концентрации 1 мкМ снижает на 15 % влияние 1 мкМ аденозина на активацию АСВ *A. proteus* (с 26.8 ± 0.87 до 21.9 ± 0.96 , $P 0.009$). В более низких концентрациях (0,1 и 0,01 мкМ) допамин не оказывает влияния на стимулированную аденозином АСВ амёбы. Причина подобного антагонизма непонятна и требует дальнейшего исследования. Антагонистические отношения между аденозином и допамином в пределах одной мозговой структуры недавно были обнаружены у крысы (Trincavelli, 2012).

Как мы увидим при описании внутриклеточных механизмов действия аденозина и допамина, они обладают различной чувствительностью к модификаторам клеточ-

ного обмена. Для анализа путей передачи внутриклеточных сигналов действие допамина или аденозина исследовали в присутствии ингибитора АЦ (2,5-дидеоксиаденозина, 0,01 мкМ) (Lokhandwala, Amenta, 1991; Citarella et al., 2009; Yu et al., 2011; Fernandez et al., 2012). В результате этих экспериментов мы выяснили, что блокада АЦ амёбы *A. proteus* специфическим ингибитором АЦ тормозила действие лишь допамина и не влияла на действие аденозина (рис. 4).

Ранее нами было показано, что ПКС у амёбы участвует в активации сократительной вакуоли, хотя может играть и тормозную роль (Багров, Манусова, 2005). Известно, что ПКС участвует в активации транспорта электролитов в почечных канальцах млекопитающих, стимулированных аденозином (Kuczeriszka, 2013). В настоящей работе было показано, что ингибитор ПКС стауроспорин в концентрации 0,001 мкМ подавляет стимулирующее действие аденозина, не влияя на эффект допамина (рис. 5).

Таким образом, нам удалось показать, что для поддержания водно-солевого баланса *A. proteus* использует допамин, как и млекопитающие. Следует отметить, что эта регуляция у амёбы происходит через рецепторы допамина типа D2, что указывает на специфичность этого эффекта. Было показано также, что при низких концентрациях (0,01 мкМ) аденозин вступает в антагонистические

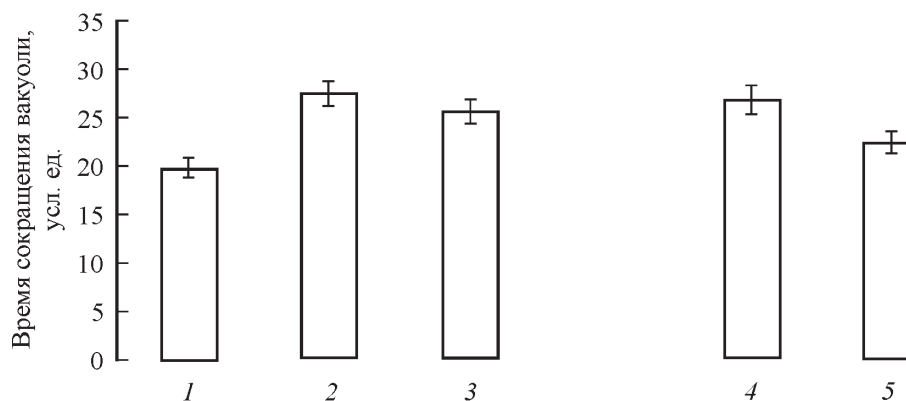


Рис. 5. Влияние ингибитора ПКС стауроспорина на частоту сокращений вакуоли, стимулированную допамином или аденозином.

Столбцы: 1 — контроль, 2 — 10 мкМ допамина, 3 — то же после преинкубации с 0,01 мкМ стауроспорина, 4 — 1 мкМ аденозина, 5 — то же после преинкубации с 0,01 мкМ стауроспорина.

отношения с допамином, подавляя его стимулирующее влияние на АСВ амёбы *A. proteus*. В литературе неоднократно указывалось, что аденозин является древнейшим регулятором транспорта электролитов (Burnstock, Verkh-ratsky, 2009). Полученные нами данные позволяют распространить эту характеристику и на допамин.

Наши данные позволяют прийти к выводу о том, что допамин и аденозин, обладающие антагонистическим влиянием на транспорт электролитов в почечных канальцах млекопитающих (Cuk et al., 2004; Di Sole, 2008), оказывают однонаправленное влияние на активность сократительной вакуоли амёбы *A. proteus*. Однако в основе активирующего действия обоих препаратов на сократительную вакуоль лежат различные внутриклеточные механизмы. Об этом свидетельствует различная чувствительность эффектов допамина и аденозина к ингибиторам АЦ и ПКС.

Авторы приносят глубокую благодарность Ю. И. Подлипаевой (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) за предоставленную культуру амёб.

Список литературы

- Багров Я. Ю., Манусова Н. Б. 2003. Об участии опиоидов и аргинин-вазопрессина в регуляции водно-солевого обмена у амёбы *A. proteus*. Докл. РАН. 203 (2) : 269—272. (Багров Я. Ю., Манусова Н. Б. 2003. Involvement of opioid peptides and arginine-vasopressin in the regulation of water-electrolyte exchange in the amoeba *Amoeba proteus*. Dokl. Biol. Sci. 393 : 481—484.)
- Багров Я. Ю., Манусова Н. Б. 2005. Особенности передачи сигнала от рецепторов аргинин-вазопрессина, расположенных на апикальной поверхности клеток эпителия мочевого пузыря лягушки *R. temporaria* L. и наружной мембраны амёбы *A. proteus*. Журн. эволюц. биохим. физиол. 41 (6) : 564—567. (Багров Я. Ю., Манусова Н. Б. 2005. Peculiarities of signal transduction from arginine-vasopressin receptors located on the apical surface of epithelial cells of the frog urinary bladder and on the amoeba. J. Evol. Biochem. Physiol. 41 (6) : 700—705.)
- Багров Я. Ю., Манусова Н. Б. 2007. Гормональная регуляция сократительной вакуоли *A. proteus*: роль циклических нуклеотидов фосфодиэстераз. Докл. РАН. 414 (1) : 177—179. (Багров Я. Ю., Манусова Н. Б. 2009. Hormonal regulation of the contractile vacuole in *Amoeba proteus*: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. Dokl. Biol. Sci. 427 : 316—318.)
- Багров Я. Ю., Манусова Н. Б., Никитина Е. Р. 2002. Действие аргинин-вазопрессина на *Amoeba proteus*: особенности передачи сигнала. ДАН. 386 (4) : 559—561. (Багров Я. Ю., Манусова Н. Б., Никитина Е. Р. 2002. Effect of arginine-vasopressin on *Amoeba proteus*: specific features of signal transmission. Dokl. Biol. Sci. 386 (4) : 415—417.)
- Allen R. D., Naitoh Y. 2002. Osmoregulation and contractile vacuoles of protozoa. Int. Rev. Cytol. 215 : 351—394.
- Багров Я. Ю., Манусова Н. Б., Никитина Е. Р. 2003. Effects of arginine-vasopressin and its functional analogs on contractile vacuole of *Amoeba proteus*: possible mechanisms of signal transduction. Protistology. 3 : 4—8.
- Burke C. J., Huetteroth W., Oswald D., Perisse E., Kra-shes M. J., Das G., Gohl D., Silies M., Certel S., Waddell S. 2012. Layered reward signalling through octopamine and dopamine in *Drosophila*. Nature. 492 : 433—437.
- Burnstock G., Verkh-ratsky A. 2009. Evolutionary origins of the purinergic signalling system. Acta Physiol. 195 : 415—447.
- Citarella M. R., Choi M. R., Gironacci M. M., Medici C., Correa A. H., Fernandez B. E. 2009. Urodilatin and dopamine: a new interaction in the kidney. Regul. Pept. 153 : 19—24.
- Cuk M., Cuk D., Dvornik S., Mamula O., Manestar M. M. 2004. Recent findings regarding physiological characteristics and effects of renal dopamine. Lijec. Vjesn. 126 : 147—155.
- Daubner S., Tiffany L., Shanzhi W. 2011. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. Arch. Biochem. Biophys. 508 : 1—12.
- Di Sole F. 2008. Adenosine and renal tubular function. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 17 : 399—407.
- Fernandez M. M., Gonzalez D., Williams J. M., Roman R. J., Nowicki S. 2012. Inhibitors of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) formation attenuate the natriuretic effect of dopamine. Eur. J. Pharmacol. 686 : 97—103.
- Krishna E. T., Denis C., Kuzhikandathil E. 2012. MicroRNA 142-3p mediates post-transcriptional regulation of d1 dopamine receptor expression. PLoS One. 7 : e49288.
- Kuczeriszka M., Dobrowolski L., Walkowska A., Sadowski J., Kompanowska-Jezierska E. 2013. Adenosine effects on renal function in the rat: role of sodium intake and cytochrome p450. Nephron Physiol. 123 : 1—5.
- Lokhandwala M. F., Amenta F. 1991. Anatomical distribution and function of dopamine receptors in the kidney. FASEB J. 5 : 3023—3030.
- Nishihara E., Yokota E., Tazaki A., Orii H., Katsuhara M., Kataoka K., Igarashi H., Moriyama Y., Shimmen T., Sonobe S. 2008. Presence of aquaporin and V-ATPase on the contractile vacuole of *Amoeba proteus*. Biol. Cell. 100 : 179—188.
- Prescott D. M., Carrier R. F. 1964. Experimental procedures and cultural methods for *Euplotes eurystomus* and *Amoeba proteus*. Meth. Cell Physiol. New York; London: Acad. Press. 85—95.
- Roeder T. 1999. Octopamine in invertebrates. Prog. Neurobiol. 59 : 533—561.
- Trincavelli M. L., Daniele S., Orlandini E., Navarro G., Casadó V., Giacomelli C., Nencetti S., Nuti E., Macchia M., Huebner H., Gmeiner P., Rossello A., Lluís C., Martini C. 2012. A new D2 dopamine receptor agonist allosterically modulates A(2A) adenosine receptor signalling by interacting with the A(2A)/D2 receptor heteromer. Cell Signal. 24 : 951—960.
- Vallon V., Rieg T. 2011. Regulation of renal NaCl and water transport by the ATP/UTP/P2Y2 receptor system. Amer. J. Physiol. Renal. Physiol. 301 : F463—F475.
- Wu S. F., Yao Y., Huang J., Ye G. Y. 2012. Characterization of a β -adrenergic-like octopamine receptor from the rice stem borer (*Chilo suppressalis*). J. Exp. Biol. 215 : 2646—2652.
- Yu P., Han W., Villar V. A., Li H., Arnaldo F. B., Concepcion G. P., Felder R. A., Quinn M. T., Jose P. A. 2011. Dopamine D1 receptor-mediated inhibition of NADPH oxidase activity in human kidney cells occurs via protein kinase A-protein kinase C cross talk. Free Rad. Biol. Med. 50 : 832—840.

Поступила 24 I 2014

EFFECTS OF DOPAMINE AND ADENOSINE ON REGULATION OF WATER-ELECTROLYTE EXCHANGE IN *AMOEBА PROTEUS*Ya. Yu. Bagrov,¹ N. B. Manusova

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: bagrov@iephb.ru

Dopamine and adenosine both regulate transport of sodium chloride in the renal tubules in mammals. We have studied the effect of dopamine and adenosine on spontaneous activity of contractile vacuole of *Amoeba proteus*. Both substances stimulated contractile vacuole. The effect of dopamine was suppressed by D2 receptor antagonist, haloperidol, but not by D1 antagonist, SCH 39166. Adenylate cyclase inhibitor, 2,5-dideoxyadenosine, suppressed the effect of dopamine, but not of adenosine. Inhibitor of protein kinase C, staurosporine, in contrast, blocked the effect of adenosine, but not dopamine. Notably, dopamine opposed effect of adenosine and vice versa. These results suggest that similar effects of dopamine and adenosine could be mediated by different intracellular mechanisms.

Key words: protozoa, *Amoeba proteus*, contractile vacuole, water-salt homeostasis, adenosine, dopamine.
