

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Павлова Надежда Сергеевна

**Исследование роли элементов пролактиновой оси трёхиглой колюшки
Gasterosteus aculeatus L. в осморегуляции и репродукции**

1.5.5. Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2025

Работа выполнена на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

**Научный
руководитель:**

*Смирнова Ольга Вячеславовна, доктор биологических наук,
профессор*

**Официальные
оппоненты:**

Дзеранова Лариса Константиновна, доктор медицинских наук, профессор, Государственный научный центр Российской Федерации Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии имени академика И.И. Дедова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отделение нейроэндокринологии, главный научный сотрудник

Лопина Ольга Дмитриевна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, кафедра биохимии, ведущий научный сотрудник

Мюге Николай Сергеевич, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии», лаборатория молекулярной генетики, заведующий лабораторией.

Защита диссертации состоится «20» октября 2025 года, в 15 ч. 30 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.015.7 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12, ауд. М-1.

E-mail: belka.umarova.msu@gmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте Диссовет 2.0: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3529>

Автореферат разослан «__» сентября 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета МГУ.015.7,
доктор биологических наук

Б.А. Умарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы

Пролактин – пептидный гормон, центрально секретирующийся в гипофизе – является одним из наиболее многофункциональных гормонов позвоночных. Некоторые исследователи выделяют до 300 отдельных его функций, которые можно объединить в более крупные регуляторные тренды [Freeman и др., 2000]. Два мажорных регуляторных тренда пролактина – регуляция репродукции и водно-солевого обмена. Первая функция – репродуктивная – впервые показана и лучше изучена у млекопитающих и включает в себя участие в маммогенезе, лактогенезе, галактогенезе, сперматогенезе, регуляции менструального цикла, имплантации плода, формировании связи между матерью и ребёнком [Bachelot, Binart, 2007]. Вторая функция – осморегуляторная – впервые открыта у рыб, к ней относятся подавление активности остеокластов, увеличение экспрессии и активности транспортёров NCC , Ca^{2+} -АТФазы в жабрах, увеличение экспрессии NKCC2 и $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -обменника в кишечнике, регуляция экспрессии и активности Na^+/K^+ -АТФазы в жабрах и кишечнике. Классически пролактин называют ключевым гормоном пресноводной адаптации рыб [Sakamoto, McCormick, 2006]. Вместе с тем показано, что у млекопитающих в патологических процессах, которые сопровождаются гиперпролактинемией (таких, как холестаза) пролактин может оказывать эволюционно древние, осморегуляторные, эффекты, а у тех видов рыб, которые проявляют сложное репродуктивное и особенно родительское поведение, – участвовать в регуляции репродукции [Smirnova и др., 2024]. Исследования на рыбах позволяют моделировать эволюционно древние механизмы, связанные с пролактином, у млекопитающих. У млекопитающих пролактин может включаться в регуляцию водно-солевого обмена в условиях патологии, в частности, при холестазе. Так, при холестазе у самок крыс выявляется рост экспрессии изоформ рецептора пролактина в почках, сопровождающийся изменением активности и соотношения субъединиц Na^+/K^+ -АТФазы и усилением натрийуреза.

Таким образом, изучение пролактиновой оси у рыб позволяет не только лучше понять эволюционное становление функции пролактиновой оси позвоночных, но и вносит вклад в исследования эффектов пролактина в патологии млекопитающих и, в частности, человека.

Вместе с тем у низших позвоночных пролактиновая ось и её участие в осморегуляции и репродукции изучены недостаточно: в своём большинстве исследования проводятся на видах, которые обладают либо осморегуляторной пластичностью, либо родительским поведением. В первом случае в работах проводится анализ особей без учёта их пола, во втором случае не освещаются осморегуляторные эффекты пролактиновой оси [Whittington, Wilson, 2013].

Трёхиглая колюшка *Gasterosteus aculeatus* L. (сем. *Gasterosteidae*, подкласс *Actinopterygii*, класс *Osteichthyes*, надкласс *Pisces*) – небольшая рыба, обитающая в бассейнах Северного полушария, – представляет особенный интерес в изучении пролактиновой оси. С одной стороны, этот вид относится к 2% истинно эвригалинных рыб: при переносе из морской воды в пресную или из пресной воды в морскую выживаемость особей составляет 100%, – и обладает высокой пластичностью осморегуляторной функции [Зюганов, 1991; Takvam и др., 2021]. С другой стороны, трёхиглая колюшка отличается сложным репродуктивным и родительским поведением. В нерестовый период у самцов устанавливается иерархия, морфологически проявляющаяся в изменении окраса особей: чем выше положение самца в иерархии, тем больше выражен красно-синий окрас тела (Рис. 1). После фазы конкуренции самцы строят на дне водоёма гнездо из водорослей, скрепляя его белком спиггином, вырабатываемым в почках. Далее, после нереста с несколькими самками, самец переходит в родительскую фазу, в ходе которой охраняет гнездо и проветривает его плавниками, а после вылупления мальков в течение нескольких дней охраняет их.



Рис.1. Диморфизм колюшек, связанный с полом, а для самцов – с иерархией, выражающийся в различном окрасе

Вместе с этим репродуктивный цикл морской популяции колюшек сопряжён с осморегуляторной нагрузкой: часть популяции переходит из моря в пресноводные водоёмы [Зюганов, 1991]. Таким образом, оба мажорных тренда эффектов пролактина у трёхиглой колюшки выражены в сильной степени.

Ранее было показано стимулирующее влияние пролактина на проветривание гнезда у самцов колюшек [de Ruiter и др., 1986]. Однако на данный момент нет работ, в которых пролактиновая ось колюшек рассматривалась бы в контексте ассоциированного с репродукцией пресноводного перехода.

У колюшек, как и других рыб, ген пролактина *prl1* имеет паралог *prl2*, также как и ген пролактинового рецептора представлен двумя паралогами *prlra* и *prlrb*. В качестве ключевых ионных транспортёров для исследования были выбраны гены $\alpha 1a$, $\alpha 2a$, $\alpha 3a$ -субъединиц Na^+/K^+ -АТФазы (*atpla1*, *atpla2*, *atpla3*), транспортёров НКСС *nkcc1a*, *nkcc2*, NCC *ncc*, NHE (*nhe2*, *nhe3*), ECAC (*ecac*), как известные для других видов рыб транспортёры, экспрессия и активность которых меняется при пресноводной адаптации и зависит от пролактина [Richards и др., 2003; Katoh и др., 2008; Inokuchi и др., 2008]. В качестве одного из репродуктивных эффектов пролактина исследовали экспрессию генов опсинов в ткани сетчатки колюшек (*sws1*, *sws2*, *rh2*, *lws*, Рис. 2), поскольку чувствительность цветового зрения в разных областях спектра (особенно в длинноволновой) связана с распознаванием половых партнёров для самок и конкурентов для самцов, что непосредственно связано с размножением колюшек [Boulcott, Braithwaite, 2007].

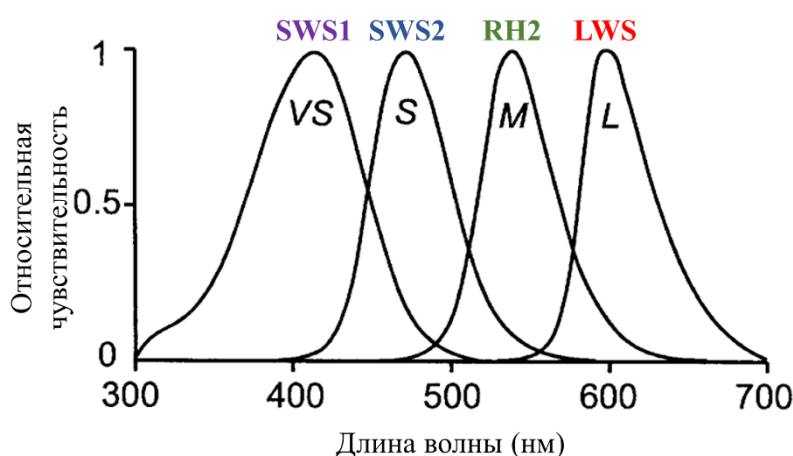


Рис.2. Типы колбочек колюшки, в каждом из которых экспрессируется один из опсинов:

SWS1 ($\lambda_{max}=365-382$ нм.),

SWS2 ($\lambda_{max}=434-441$ нм.),

RH2 ($\lambda_{max}=514-546$ нм.),

LWS ($\lambda_{max}=566-638$ нм.).

Рисунок составлен по Kelber и др., 2003

Целью данной работы стало исследование роли пролактина в адаптации к полу процессов осморегуляции и цветового зрения в брачный период трёхиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* L..

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи работы**:

1. Оценить динамику изменения элементов пролактиновой оси у самок и α -самцов трёхиглой колюшки в ходе пресноводной адаптации:

1а. Оценить динамику изменения экспрессии генов пролактина *prl1*, *prl2* в ткани мозга.

1б. Оценить изменение чувствительности к пролактину (по изменению экспрессии генов рецепторов пролактина *prlra*, *prlrb*) ткани мозга, почек, жабр и кишечника.

2. Оценить изменение осморегуляторной функции жабр и кишечника особей трёхиглой колюшки в ходе пресноводной адаптации и участие в ней пролактина:

2а. У самок и α -самцов оценить изменение экспрессии генов ионных транспортёров (α -субъединиц Na^+/K^+ -АТФазы *atpla1*, *atpla2*, *atpla3*; НКСС-обменника *nkcc1a*, *nkcc2*; НСС-транспортёра *ncc*; NHE-транспортёров *nhe2*, *nhe3*; ЕСАС-транспортёра *esac*).

2б. У самок и α -самцов изучить корреляции между экспрессией генов ионных транспортёров и экспрессией генов пролактиновых рецепторов.

2в. У α - и ω -самцов изучить влияние экзогенного овечьего пролактина на экспрессию генов ионных транспортёров в условиях морской воды.

3. Изучить участие пролактина в регуляции цветового зрения у самок и α -самцов трёхиглой колюшки:

3а. Оценить изменение экспрессии генов опсинов (*sws1*, *sws2*, *rh2*, *lws*) в сетчатке в модели пресноводной адаптации.

3б. Оценить изменение экспрессии генов опсинов при администрации экзогенного пролактина в условиях морской воды.

4. Сравнить уровни экспрессии генов пролактиновой оси *prl1*, *prl2*, *prlra*, *prlrb* в мозге самцов в нерестовом периоде и во время демонстрации родительского поведения.

Научная новизна исследования

В настоящей работе впервые было проведено исследование половых различий изменения элементов пролактиновой оси трёхиглой колюшки при адаптации особей к пресной воде. Впервые для рыб было показано, что пролактиновая ось под влиянием пресноводной адаптации у самцов и самок модифицируется по-разному.

Получены приоритетные данные о неодинаковом у самцов и самок изменении осморегуляторной функции жабр и кишечника при пресноводной адаптации. Для колюшек доказано различное изменение осморегуляторной функции жабр и кишечника у α - и ω -самцов под влиянием экзогенного пролактина. Также впервые было показано, что одним из эффектов пролактина является изменение экспрессии генов опсинов в сетчатке. Таким образом, выявлена новая функция пролактина у рыб – адаптация цветового зрения при переходе особей в пресную воду – также по-разному реализующаяся у самцов и самок трёхиглой колюшки.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные позволяют расширить современные знания о пролактиновой оси у низших позвоночных и её эволюции. Взаимосвязь осморегуляторной и репродуктивной функций пролактина у рыб способствует лучшему пониманию взаимосвязи этих функций у млекопитающих.

Полученные результаты в дальнейшем, возможно, будут применимы в аквакультуре. Будучи достаточно простым и недорогим в содержании объектом, трёхиглая колюшка имеет перспективу стать модельным объектом для промысловых видов рыб, в изучении применения гормонов в аквакультуре. Основываясь на выявленных в работе данных об участии пролактина в осморегуляции и репродукции, возможно применение пролактиновой стимуляции в аквакультуре [Yada и др., 1999; Paredes и др., 2013].

Методология и методы исследования

В работе проводилось моделирование пресноводной адаптации на самках и самцах трёхиглой колюшки в репродуктивный период. Колюшек отлавливали в Белом море во время нереста, разделяли выборки по полу особей, после чего опытные группы переносили в аквариумы с пресной водой; контрольные группы содержали в аквариумах с морской водой. Для моделирования эффекта экзогенного пролактина в условиях морской воды особям, содержащимся в аквариумах с морской водой, делали внутрибрюшинные инъекции овечьего пролактина один раз в сутки в течение трёх суток; контрольным группам вводили физ. раствор. Для сравнения самцов во время нереста и в фазе родительского поведения ткани фиксировали сразу после отлова особей.

У особей измеряли морфометрические параметры, содержание ионов Na^+ и K^+ в плазме крови методом атомно-абсорбционной спектроскопии, а также экспрессию генов интереса в тканях с использованием метода ОТ-ПЦР в реальном времени.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Прولاктиновая ось самок и самцов *G. aculeatus* модифицируются по-разному при адаптации организма к пресной воде. При этом пролактинподобный гормон Prl2 может иметь большее значение для адаптации самцов трёхиглой колюшки, нежели самок.
2. Осморегуляторная функция *G. aculeatus* связана с пролактиновой осью и меняется неодинаково у самок и самцов. Элементы пролактиновой оси связаны с осморегуляторной функцией самок сильнее, чем самцов.
3. Выявлена новая функция пролактина для рыб – адаптация цветового зрения *G. aculeatus* при переходе в пресную воду – реализация которой также зависит от пола особей.

Степень достоверности результатов исследований

Полученные в рамках выполнения работы данные статистически достоверны и воспроизводимы. Набор используемых экспериментальных методик оптимален для решения поставленных задач. Обзор литературы и обсуждение подготовлены с использованием современной и актуальной литературы.

Апробация материалов диссертации. Результаты данной диссертационной работы были представлены на Одиннадцатой международной научно-практической конференции "Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине" (Санкт-Петербург, Россия, 2016); на Interdisciplinary Approaches in Fish Skeletal Biology (IAFSB) 5th Conference (Тавира, Альгарве, Португалия, 2018); на III молодежной школе-конференции "Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций" (Звенигородская биологическая станция, Россия, 2019); на VI Съезде физиологов СНГ (Дагомыс, Россия, 2019); на Ломоносовских чтениях 2021 (Москва, Россия, 2021); на X Международной научно-практической конференции «Морские исследования и образование. MARESEDU-2021» (Москва, Россия, 2021); на IV Всероссийской молодежной школе-конференции «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций» (Звенигородская биологическая станция, Россия, 2023); на XII Международной научно-практической конференции "Морские исследования и образование - MARESEDU 2023" (Москва, Россия, 2023); на конференции «Достижения и перспективы фундаментальной физиологии: к столетию кафедры физиологии человека и животных МГУ» (Москва, Россия, 2024). Диссертационная работа апробирована 17 июля 2025 года на заседании кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 печатных работы: 4 статьи в периодических изданиях, индексируемых аналитическими базами Scopus, Web of Science, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.015.7 по специальности 1.5.5. Физиология человека и животных, и 5 тезисов в сборниках докладов международных и всероссийских научных конференций.

Личный вклад автора. Личный вклад соискателя Павловой Н.С. присутствует на каждом этапе выполнения диссертационной работы и заключается в планировании и подготовке экспериментов, отлове особей трёхиглой колюшки, проведении экспериментов, заборе и фиксации материала, проведении атомно-абсорбционной спектрометрии и ОТ-ПЦР в реальном времени, статистической обработке данных, написании тезисов докладов и статей, представлении результатов работы на конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 152 страницах, содержит 43 рисунка и 18 таблиц. Список цитируемой литературы включает 283 источника, из них 276 на иностранном языке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные и группы. Работа проводилась на половозрелых особях трёхиглой колюшки *G. aculeatus L.*, отловленных в нерестовый период из прибрежной зоны Ругозёрской губы Белого моря у Беломорской биологической станции имени Н.А. Перцова в июне 2016, 2017, 2018 и 2019 гг. Ориентируясь на размер и окрас особей, их делили по полу и формировали контрольные и экспериментальные выборки самок и самцов. Особей содержали в одинаковых непрозрачных аквариумах объёмом 20 л., поддерживая естественный уровень освещения и температурный режим. До проведения экспериментов особей адаптировали к условиям в течение суток. По окончании эксперимента у рыб собирали плазму крови для определения концентрации ионов Na^+ и K^+ , измеряли морфометрические показатели (длина и масса тела, масса печени, гонад и почек), фиксировали материал (в зависимости от эксперимента) ткани мозга (вместе с гипофизом), жабр, кишечника, сетчатки для анализа экспрессии генов интереса в IntactRNA (Evrogen, Россия).

Модели пресноводной адаптации (задачи 1, 2а, 2б, 3а). В модели острой пресноводной адаптации (Рис. 3а) особей отлавливали в нерестовый период 18–20 июня 2018 года. Контрольные группы (группы «К», $n = 6$) самок и самцов колюшек содержали в условиях морской воды. Экспериментальные группы содержали в пресной воде в течение 3, 6, 12, 18 и 24 часов (группы «3», «6», «12», «18» и «24»

соответственно, $n = 6$). По окончании эксперимента у особей измеряли морфометрические показатели, забирали ткань мозга вместе с гипофизом и фиксировали в IntactRNA для определения уровней мРНК генов *prl1*, *prl2*, *prlra*, *prlrb*. В модели хронической пресноводной адаптации (Рис. 3б) особей отлавливали в нерестовый период 5–7 июня 2016 года. Контрольные группы (группы «К», $n = 6$) содержали в морской воде, экспериментальные группы содержали в пресной воде в течение 72 часов (группы «72», $n = 6$). По окончании эксперимента у особей измеряли морфометрические показатели, забирали ткань мозга вместе с гипофизом, ткань почек, жабр и кишечника и фиксировали в IntactRNA для определения уровней мРНК генов *prl1*, *prl2* (в мозге), *prlra*, *prlrb* (во всех исследуемых тканях). В модели сочетанной острой и хронической пресноводной адаптации (Рис. 3в) отлов особей производили в нерестовый период 15–17 июня 2019 года. Контрольные группы (группы «К», $n = 6$) содержали в морской воде, экспериментальные переносили в пресную воду на 24 (острая ПА, группы «24») и 72 (хроническая ПА, группы «72», $n = 6$) часа. По окончании эксперимента у особей измеряли морфометрические показатели, собирали плазму крови, забирали ткань мозга вместе с гипофизом, жабр, кишечника, сетчатки и фиксировали в IntactRNA для определения уровней мРНК генов *prl1*, *prl2* (в мозге), *prlra*, *prlrb* (в мозге, жабрах и кишечнике), *atp1a1*, *atp1a2*, *atp1a3*, *nkcc1a*, *nkcc2*, *ncc*, *nhe2*, *nhe3*, *ecac* (в жабрах и кишечнике), *sws1*, *sws2*, *rh2*, *lws* (в сетчатке).

Модель гиперпролактинемии в условиях морской воды (задачи 2в, 3б, Рис. 3г). Отлов особей производили в нерестовый период 15–17 июня 2019 года. Особей контрольных групп (группы «К», $n = 6$) содержали в условиях морской воды и в течение 3 суток раз в сутки им внутрибрюшинно вводили физиологический раствор для холоднокровных в объёме 50 мкл. Особей экспериментальных групп (группы «oPrl», $n = 6$) также содержали в условиях морской воды, и в течение 3 суток раз в сутки им внутрибрюшинно вводили раствор овечьего пролактина oPrl в объёме 50 мкл, концентрация 14 МЕ/мл. По окончании эксперимента у животных измеряли морфометрические показатели, плазму крови, отбирали ткань мозга вместе с гипофизом, жабр, кишечника, сетчатки и фиксировали в IntactRNA для определения уровней мРНК генов *prl1*, *prl2* (в мозге самок и α -самцов), *prlra*, *prlrb* (в мозге, жабрах и кишечнике самок и α -самцов), *sws1*, *sws2*, *rh2*, *lws* (в сетчатке самок и α -самцов), *atp1a1*, *atp1a2*, *atp1a3*, *nkcc1a*, *nkcc2*, *ncc*, *nhe2*, *nhe3*, *ecac* (в жабрах и кишечнике у α - и ω -самцов).

Сравнение пролактиновой оси самцов во фазе нереста и в фазе демонстрации родительского поведения. Особей отлавливали 25–30 июня 2017 года. Группу самцов во время нереста (группа «Нерест», $n = 8$) набрали во время

нерестового периода, после чего отдельно отловили самцов, находящиеся неподвижно над гнездом и проветривающих их плавниками (группа «Гнездо», n = 6). У особей отбирали ткань мозга вместе с гипофизом сразу после отлова и фиксировали в IntactRNA для определения уровней мРНК генов *prl1*, *prl2*, *prlra*, *prlrb*.

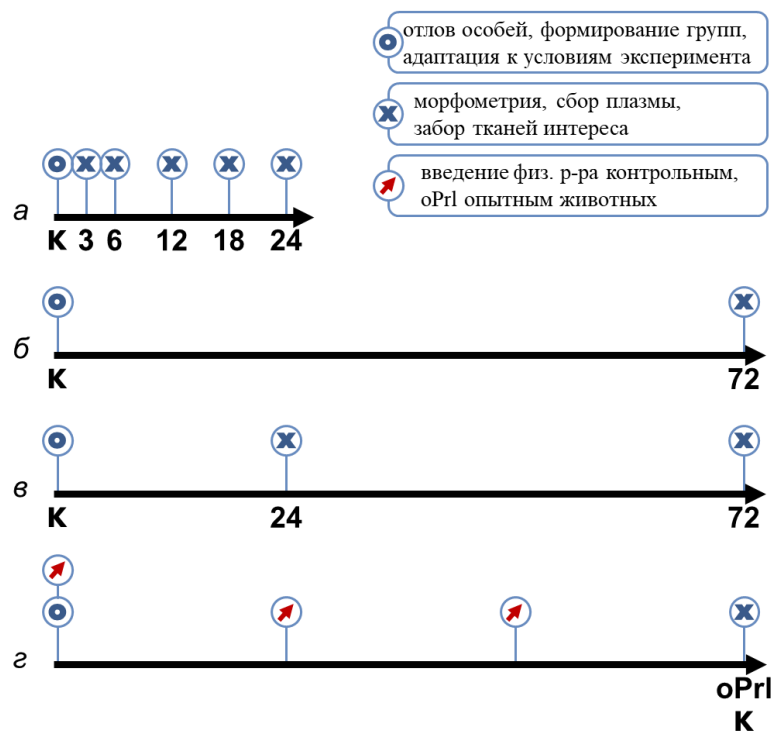


Рис.3. Дизайн экспериментов для задач 1, 2а, 2б, 3а (эксперименты а, б, в), 2в, 3б (эксперимент г).

а – модель острой адаптации, суточная динамика;

б – модель хронической пресноводной адаптации;

в – модель сочетанной острой и хронической пресноводной адаптации;

г – модель гиперпролактинемии в условиях морской воды

Данные морфометрии. Собранные данные морфометрии (длина и масса тела, масса печени, почек, гонад) использовали для расчёта показателей эстрогенной активности – гепатосоматического индекса ($\frac{m_{печени}}{m_{тела}}$), андрогенной активности – нефросоматического индекса ($\frac{m_{почек}}{m_{тела}}$), относительной массы гонад ($\frac{m_{гонад}}{m_{тела}}$).

Определение концентрации Na^+ и K^+ в плазме крови. Для определения концентрации ионов Na^+ и K^+ в плазме крови использовали метод атомно-абсорбционной спектрометрии. Плазму крови разводили в 5% ТХУ в разведениях 1:200, 1:100, 1:50 и измеряли концентрации ионов в воздушно-пропановой смеси в анализаторе Квант-2м1 (Кортэк, Россия) при длине волны 589,6 нм для Na^+ , 766,5 нм для K^+ .

Молекулярно-биологические методы: выделение РНК из тканей, ОТ-ПЦР. Выделение РНК ткани мозга, жабр, почек, кишечника проводили фенол-хлороформным методом с помощью реагента ExtractRNA (Evrogen, Россия) согласно инструкции производителя. Выделение РНК из ткани сетчатки проводили с помощью системы QIAcube (Quiagen, Германия) согласно инструкции производителя. Контроль качества выделения РНК осуществляли методом

электрофореза в 1,5% агарозном геле. Обратную транскрипцию проводили с помощью транскриптазы MMLV (Evrogen, Россия) согласно инструкции производителя. Синтезированную кДНК использовали как матрицу для проведения ОТ-ПЦР на амплификаторах Real-time StepOnePlus (Applied Biosystems, США, задачи 1, 3) и Bio-rad CFX96 («Bio-Rad», Канада, задача 2) с набором реактивов, включающим интеркалирующий краситель SYBRGreen+LowRox (Evrogen, Россия), в соответствии с методикой, рекомендованной производителем. Уровень экспрессии мРНК целевых генов рассчитывался с учетом экспрессии референсных генов *rpl13a* и *ubc* для тканей мозга, почек, жабр, кишечника, референсных генов *gnat2* и *ubc* для ткани сетчатки. Данные нормировали на геометрическое среднее пороговых циклов референсных генов с учётом констант эффективности амплификации генов по формуле:

$$R = \frac{\sqrt{(E_{\text{Реф.ген 1}})^{Ct_{\text{Реф.ген 1}}} \cdot (E_{\text{Реф.ген 2}})^{Ct_{\text{Реф.ген 2}}}}{(E_{\text{Измеряемый ген}})^{Ct_{\text{Измеряемый ген}}}},$$

где R – условные единицы экспрессии мРНК, E – эффективность амплификации, Ct – соответствующий пороговый цикл.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе GraphPad Prizm 9 («GraphPad Software Inc.», США). Выборки проверяли на нормальность с использованием теста Шапиро-Уилка. Влияние пола и пресноводной адаптации или гиперпролактинемии оценивали с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA) с поправкой Тьюки на множественные сравнения. Парные сравнения (самцов в фазе нереста с самцами в фазе родительского поведения, а также морфометрических параметров у самок и самцов по отдельности в модели хронической пресноводной адаптации) проводили с использованием теста Манна-Уитни. Корреляции между исследуемыми параметрами проводили с использованием критерия Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфометрические показатели и концентрация ионов Na⁺ и K⁺

Средняя длина тела особей составила для самок 7.42 ± 0.3 см, для α -самцов 6.55 ± 0.28 см. Средняя масса самок составила 4.94 ± 0.85 г., α -самцов – 2.73 ± 0.77 г.

Гепатосоматический индекс используется в качестве оценки эстрогенной активности самок, поскольку эстрогены стимулируют выработку печенью вителлогенина, предшественника желтка в икре, и как следствие, оценки репродуктивного статуса самок [Ryffel, 1978]. Нефросоматический индекс

используется в качестве оценки андрогенной активности самцов, поскольку андрогены стимулируют выработку почками спиггина – клейкого белка, который используется при построении гнёзд, и как следствие, оценки репродуктивного статуса самцов [Jones и др., 2001]. В ходе пресноводной адаптации (далее – ПА), как острой, так и хронической, гепатосоматический индекс самок значительно повышался (Рис. 4а, 4б). Этот эффект также валидирован в модели гиперпролактинемии в условиях морской воды (Рис. 4в). Таким образом, при пресноводной адаптации организм самок колюшек становится более готовым к созреванию икры, и данный эффект индуцируется пролактином.

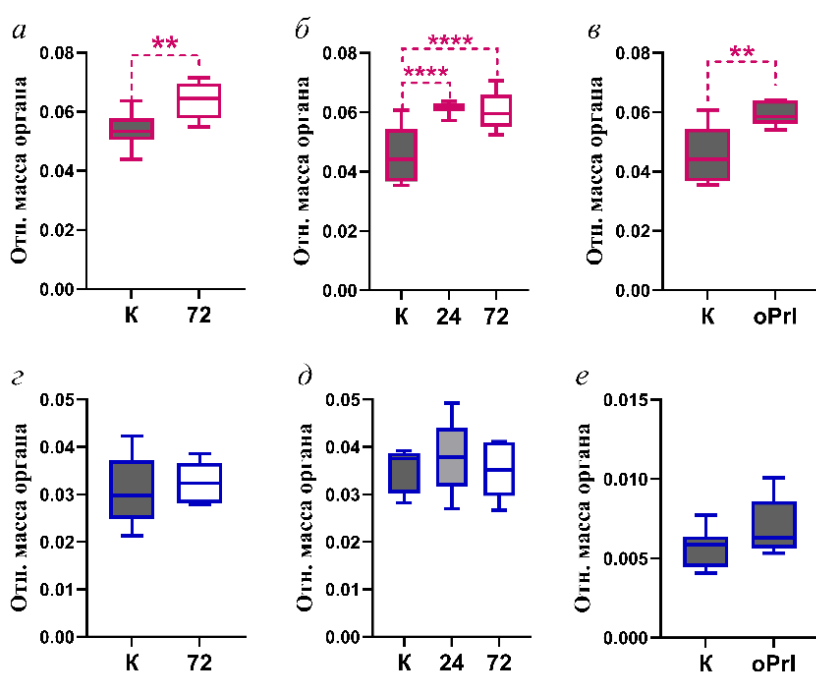


Рис.4. Изменение гепатосоматического индекса у самок (а, б, в) и нефросоматического индекса у α -самцов (г, д, е) в модели хронической ПА (а, г), острой и хронической ПА (б, д) и гиперпролактинемии в условиях морской воды (в, е). Критерий Манна-Уитни (а, в, г, е), one-way ANOVA (б, д); ** – $p < 0,01$; **** – $p < 0,0001$.

Здесь и далее: самки обозначены красным контуром, самцы – синим. Условия морской воды обозначены тёмно-серым цветом ящиков, 24-часовой ПА – светло-серым цветом ящиков, 72-часовой ПА – белым цветом ящиков

Нефросоматический индекс α -самцов не менялся в моделях пресноводной адаптации и в модели гиперпролактинемии в условиях морской воды (рис. 4г, 4д, 4е). Относительная масса гонад самок и α -самцов не менялась ни в моделях пресноводной адаптации, ни в модели гиперпролактинемии в условиях морской воды.

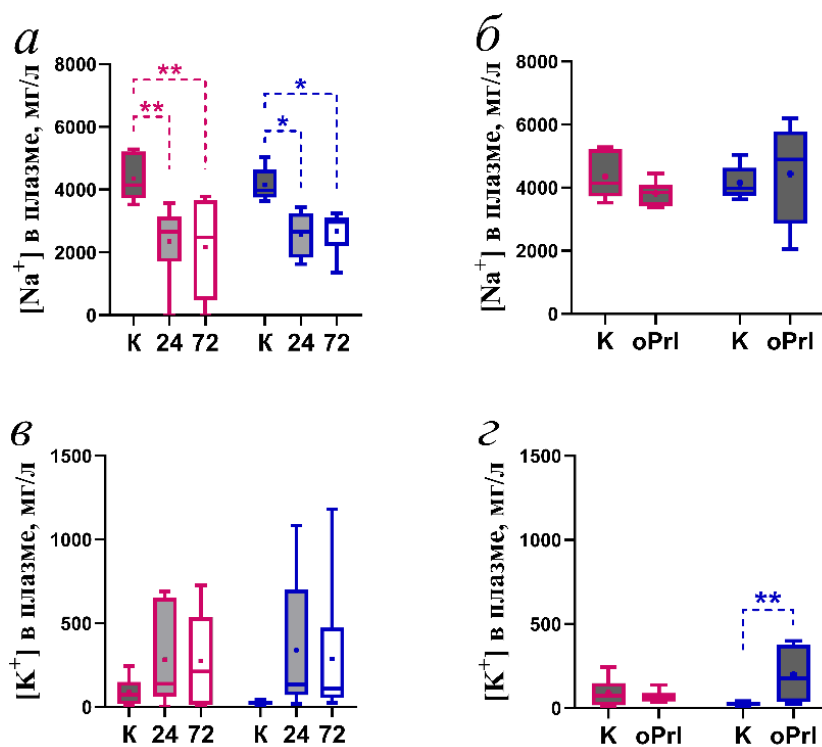


Рис.5. Изменение концентрации ионов Na^+ и K^+ в плазме крови самок и α -самцов в модели острой и хронической ПА (а, в) и гиперпролактинемии в условиях морской воды (б, г). two-way ANOVA, значимость указана относительно контрольной группы того же пола, * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Здесь и далее: медианы обозначены горизонтальной линией, средние – точкой

Пресноводная адаптация как самок, так и α -самцов колюшек сопровождалась значимым снижением $[\text{Na}^+]$ в плазме крови (Рис. 5а), $[\text{K}^+]$ не менялась (Рис. 5в). После введения овечьего пролактина $[\text{Na}^+]$ ни у самок, ни у α -самцов не изменилась (Рис. 5б), но $[\text{K}^+]$ значимо увеличилась у α -самцов (Рис. 5г). Таким образом, и пресноводная адаптация, и пролактин в условиях морской воды влияют на осморегуляторную функцию колюшек, что выражается в изменении разных показателей.

Изменение экспрессии генов *prl1* и *prl2* в мозге

Во всех моделях пресноводной адаптации, как острой, так и хронической, экспрессия гена *prl1* в мозге самок повышалась относительно контроля начиная с 24 часов после переноса в пресную воду (Рис. 6а, 6б, 6в). У α -самцов ген *prl1* экспрессировался в ткани мозга, однако в моделях пресноводной адаптации его экспрессия значимо не менялась (Рис. 6г, 6д, 6е).

Интересно отметить, что экспрессия гена *prl2* в мозге α -самцов детектировалась на разрешающей границе метода в условиях морской воды и на 24 и 72 час пресноводной адаптации, однако в модели суточной динамики наблюдалось повышение его экспрессии на 12 и 18 час пресноводной адаптации (Рис. 7).

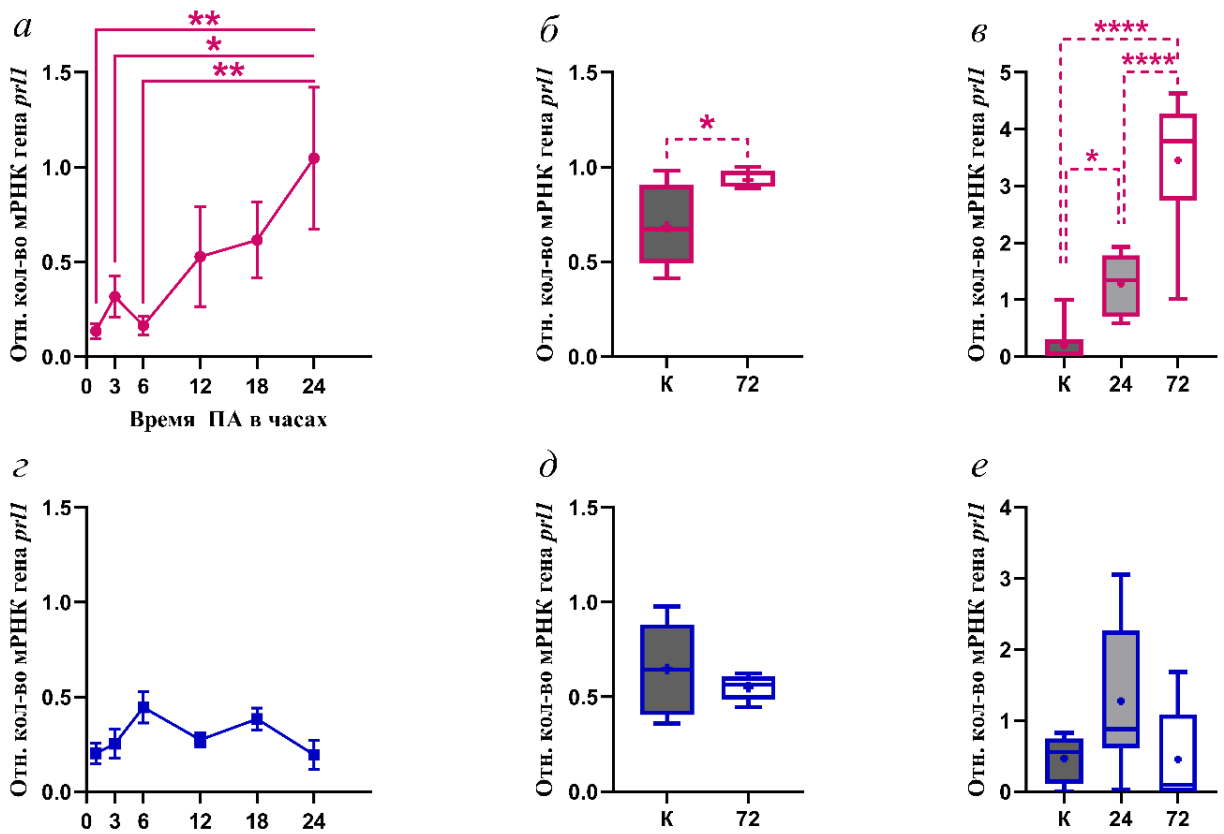


Рис.6. Изменение экспрессии гена *prl1* в мозге самок (а, б, в) и α -самцов (з, д, е) в моделях острой (а, з), хронической (б, д) и сочетанной (в, е) ПА. two-way ANOVA, значимость указана относительно контрольной группы того же пола, * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; **** – $p < 0,0001$

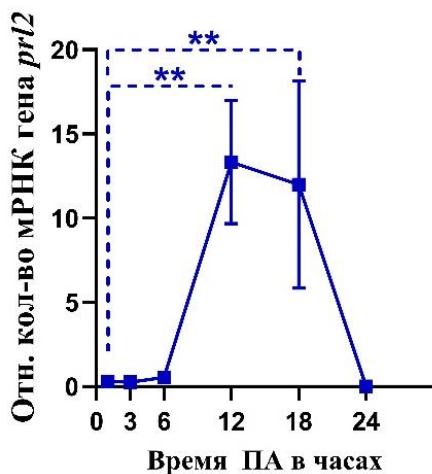


Рис.7. Изменение экспрессии гена *prl2* в мозге α -самцов в модели острой ПА в динамике. one-way ANOVA, значимость указана относительно контрольной группы, ** – $p < 0,01$

В условиях морской воды экспрессия гена *prl1* в мозге самок и α -самцов наблюдалась на сопоставимом уровне, однако начиная с 24 часов ПА за счёт роста экспрессии этого параметра у самок выявлялись половые различия: у самок этот показатель значимо выше, чем у α -самцов, в условиях пресной воды (Рис. 8а, 8б). Эти различия сохранялись вплоть до 3 суток ПА.

Для рыб показано, что динамика изменения экспрессии генов пролактина и его паралога в мозге в ходе пресноводной адаптации видоспецифична, как и соотношение уровней мРНК генов *prl1* и *prl2* [Breves и др., 2011; Yuan и др., 2017].

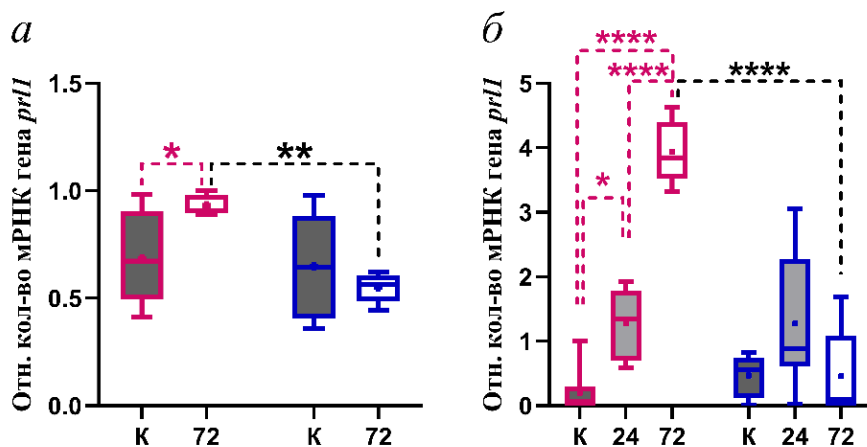


Рис.8. Сравнение изменения экспрессии гена *prl1* в мозге самок и α -самцов в моделях хронической (а), острой и хронической (б) ПА. two-way ANOVA, * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; **** – $p < 0,0001$.

Здесь и далее: значимость отличий в группах самок и самцов обозначена цветом группы; значимость отличий между самками и самцами обозначена чёрным цветом

Полученные нами данные позволяют оценить как скорость изменения экспрессии генов пролактина (у самок различия обнаруживаются к 24 часу ПА), так и различия, связанные с полом: в отличие от α -самцов, у самок экспрессия гена *prl1* меняется в ходе ПА, и таким образом, их пролактиновая ось стимулируется сильнее в ходе адаптации к гипоосмотическим условиям среды. Вместе с тем у α -самцов, в отличие от самок, отдельную роль в адаптации к пресной воде может играть пролактинподобный гормон, кодируемый геном *prl2*. Эти результаты подтверждают нашу гипотезу о том, что несмотря на то, что у колюшек, как и у других видов рыб пролактин является гормоном пресноводной адаптации, он может выполнять свои функции в зависимости от пола. Следовательно, мы предполагаем, что исследования функций пролактина у низших позвоночных вне зависимости от вида стоит проводить на выборках, разделённых по полу и исследовать его осморегуляторную роль у самок и самцов по отдельности.

Изменение экспрессии генов пролактиновых рецепторов *prlra* и *prlrb* в ткани мозга, почек, жабр и кишечника

В качестве основных органов для оценки изменения чувствительности к пролактину в ходе ПА были выбраны мозг, почки, жабры и кишечник. Поскольку фазы нереста и родительской заботы у колюшек связаны с изменением поведенческих паттернов, а у самцов в почках вырабатывается белок спиггин для построения гнезда, мозг и почки были выбраны как ткани, больше ассоциированные с репродукцией. Жабры и кишечник у рыб являются ключевыми органами

осморегуляции, и основные механизмы, направленные на поддержание водно-солевого гомеостаза, реализуются посредством модуляции их функции.

Стимуляция пролактиновой оси самок сопровождалась также значимым повышением экспрессии генов обоих рецепторов пролактина в мозге (Рис. 9а, 9б). У α -самцов не были обнаружены значимые различия после переноса в пресную воду экспрессии генов пролактиновых рецепторов в мозге. Тем не менее, в условиях морской воды наблюдались различия между самками и α -самцами в экспрессии гена *prlra* (с преобладанием у α -самцов), которые исчезали в ходе ПА (Рис. 9а).

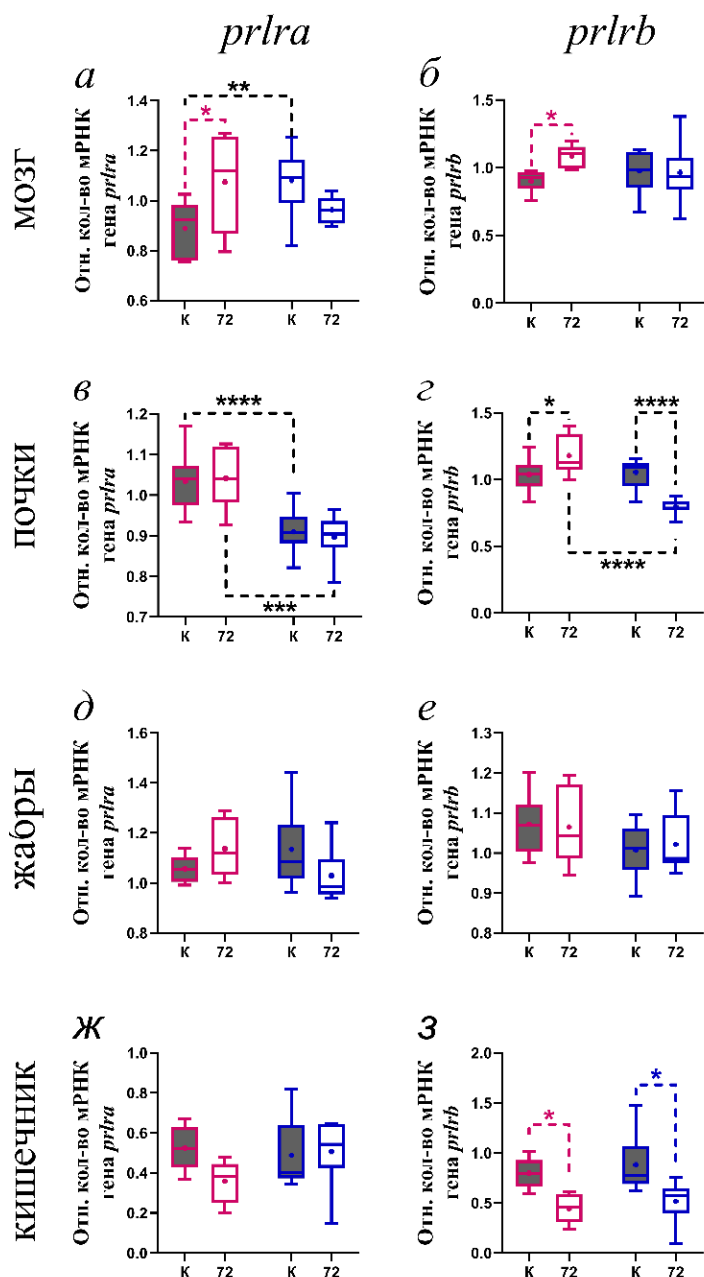


Рис.9. Изменение экспрессии генов пролактиновых рецепторов *prlra* (а, в, д, ж) и *prlrb* (б, г, е, з) в тканях мозга (а, б), почек (в, г), жабр (д, е) и кишечника (ж, з) самок и α -самцов в модели хронической ПА. two-way ANOVA, значимость указана относительно контрольной группы того же пола, * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$

(Рис. 9в). Экспрессия гена *prlrb* в почках в условиях морской воды у самок и α -самцов наблюдалась на сопоставимом уровне. В ходе пресноводной адаптации этот параметр значимо повысился у самок и значимо снизился у α -самцов, что привело к появлению половых различий к 72 часу ПА (Рис. 9г).

Экспрессия генов обоих пролактиновых рецепторов в ткани почек оказалась наиболее зависимой от пола особей в ходе ПА (Рис. 9в, 9г). Экспрессия гена *prlra* и в условиях морской воды, и после пресноводного переноса была значимо выше у самок по сравнению с α -самцами. При этом сам пресноводный перенос не повлиял значимо на экспрессию *prlra* ни у самок, ни у α -самцов

Экспрессия генов *prlra* и *prlrb* в ткани жабр самок и α -самцов не зависела ни от пола особей, ни от пресноводной адаптации (Рис. 9д, 9е). Однако мы предполагаем более сильный сигналинг через пролактиновые рецепторы ткани жабр у самок, чем у α -самцов, за счёт более сильной экспрессии гена пролактина в мозге.

В ткани кишечника экспрессия гена *prlra* не зависела ни от пола, ни от пресноводной адаптации (Рис. 9ж). Экспрессия гена *prlrb* зависела от пресноводной адаптации, но не пола особей, и значимо снижалась к 72 часу ПА и у самок, и у α -самцов (Рис. 9з).

Эти данные согласуются с нашей гипотезой о том, что мозг, как и почки, больше ассоциированы с полом особей и, предположительно, репродукцией, в то время как жабры и кишечник выполняют ключевую осморегуляторную роль. В то же время мозг и почки – органы, которые контактируют только с внутренней средой организма, а жабры и кишечник и с внутренней, и с внешней средой, поэтому изменения в этих органах могут определяться сочетанием эндогенных и экзогенных факторов.

Таким образом, в ходе ПА меняется не только экспрессия гена самого пролактина, но и его рецепторов в тканях-мишенях в зависимости от пола особей и ПА. Это подтверждает нашу гипотезу о неодинаковом изменении элементов пролактиновой оси у самок и α -самцов во время пресноводного перехода.

Изменение экспрессии генов ионных транспортёров жабр и кишечника у самок и α -самцов в модели пресноводной адаптации

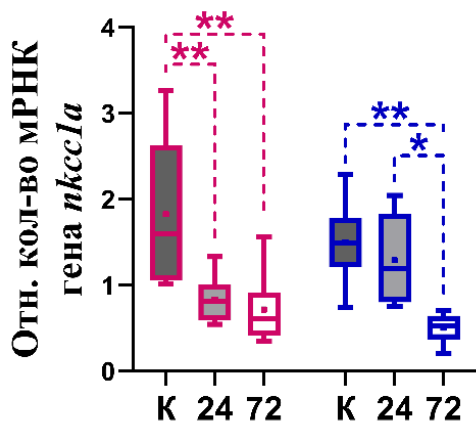


Рис.10. Изменение экспрессии гена *nkcc1a* в ткани жабр у самок и α -самцов в модели острой и хронической ПА. two-way ANOVA, * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$

В ткани жабр единственный из изученных генов ионных транспортёров, экспрессия которого менялась в модели сочетанной острой и хронической ПА – ген *nkcc1a*. Его экспрессия и у самок, и у α -самцов значимо снижалась при пресноводной адаптации, у самок начиная с 24 часов, у α -самцов – к 72 часу ПА (Рис. 10). Это согласуется с данными литературы, где для других видов рыб отмечено, что именно НКСС1а в жабрах рыб наиболее чувствителен к пресноводному переходу [Breves и др., 2010]. Различий, связанных с полом особей, обнаружено не было.

На других видах рыб показано, что в условиях морской воды НКСС1а обнаруживается на базолатеральной мембране ионоцитов [Inokuchi и др., 2008; Katoh и др., 2008]. С учётом этих данных, снижение экспрессии гена *nkcc1a* в ткани жабр направлено на уменьшение потери ионов, что адаптивно в условиях морской, но неадаптивно в условиях пресной воды.

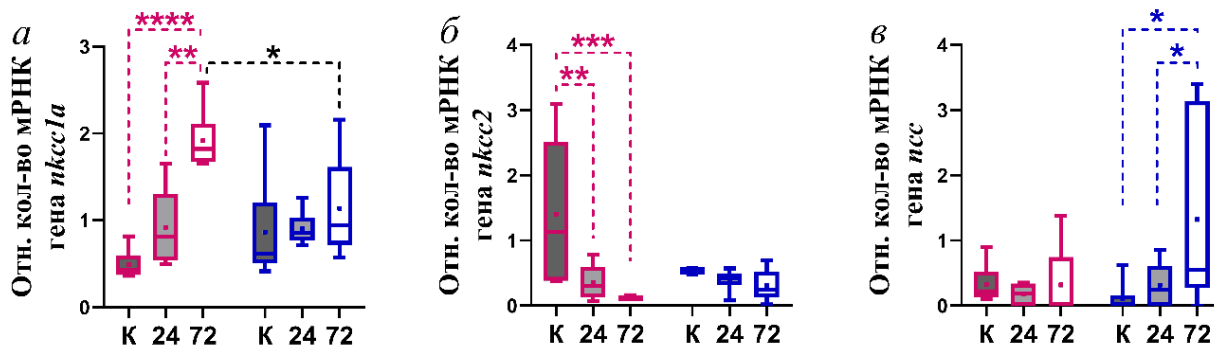


Рис.11. Изменение экспрессии генов *nkcc1a* (а), *nkcc2* (б), *ncc* (в) в ткани кишечника у самок и α -самцов в модели острой и хронической ПА. two-way ANOVA, различия, связанные с ПА, отмечены цветом согласно полу особей, различия, связанные с полом, отмечены чёрным цветом, * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$

Ткань кишечника, напротив, сильнее реагировала на условия пресной воды, с более сильными изменениями экспрессии генов ионных транспортёров у самок по сравнению с самцами. Так, в ткани кишечника самок, значительно повышается экспрессия гена *nkcc1a*. У α -самцов этот параметр не менялся в зависимости от пресноводного перехода, но к 72 часу ПА экспрессия гена *nkcc1a* в ткани кишечника самок значимо выше по сравнению с α -самцами (Рис. 11а). Мы предполагаем, что в клетках эпителия кишечника НКСС1а, по сравнению с тканью жабр, может находиться на апикальной мембране. Таким образом, в условиях морской воды низкая экспрессия гена *nkcc1a* согласуется с низкой потребностью в захвате ионов Na^+ , K^+ и Cl^- из просвета кишечника, а после перехода в пресную воду наоборот, повышается для активного захвата этих ионов и поддержания водно-солевого гомеостаза. Интересно отметить наличие этого эффекта только у самок и отсутствие у α -самцов.

Экспрессия гена *nkcc2* в ткани кишечника снижалась у самок, но не α -самцов, при ПА (Рис. 11б). Это согласуется с данными литературы: на других видах рыб показано, что НКСС2 является ключевым транспортёром семейства НКСС в ткани кишечника рыб [Cutler и др., 2008]. Мы предполагаем, что НКСС2 экспрессируется

на базолатеральной мембране клеток эпителия кишечника, и уменьшение экспрессии его гена у самок согласуется со снижением потери ионов.

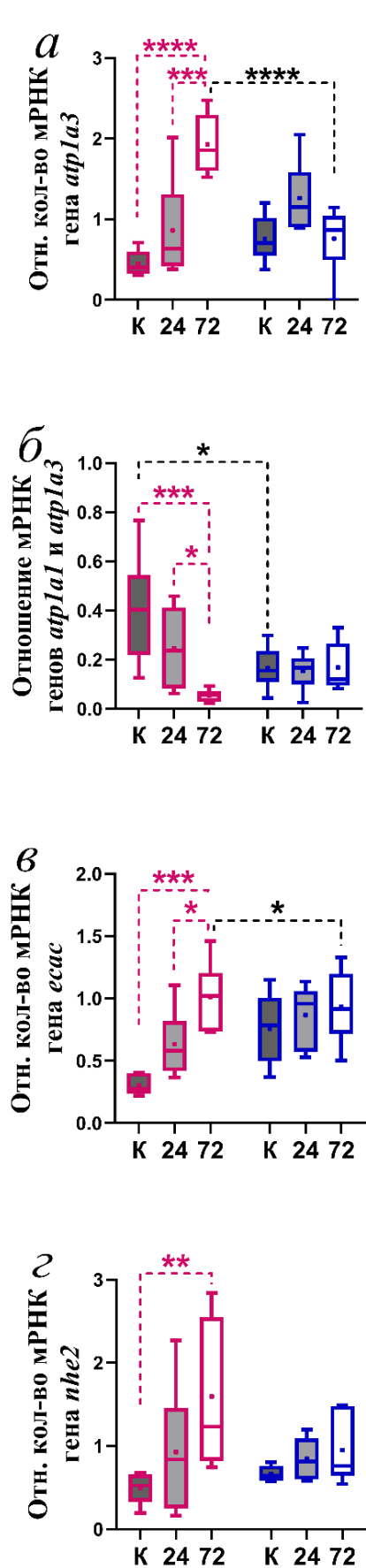


Рис.12. Изменение экспрессии генов *atp1a3* (а), *esac* (б), *nhe2* (в), отношения экспрессии генов *atp1a1* / *atp1a3* в ткани кишечника у самок и α -самцов в модели острой и хронической ПА. two-way ANOVA, различия, связанные с ПА, отмечены цветом согласно полу особей, различия, связанные с полом, отмечены чёрным цветом, * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$

У α -самцов, но не у самок, в ходе ПА увеличивалась экспрессия гена *nsc* в ткани кишечника (Рис. 11в). Эти данные согласуются с литературными: у тилапии также в условиях пресной воды представленность данного транспортёра в кишечнике выше, чем в условиях морской воды [Watanabe и др., 2016].

У самок в ходе ПА в кишечнике увеличивалась экспрессия гена *atp1a3*, который кодирует α 3a-субъединицу Na^+/K^+ -АТФазы (Рис. 12а). В результате этого к 72 часу ПА обнаруживались половые различия по этому параметру: у самок экспрессия этого гена наблюдалась на более высоком по сравнению с самцами уровне. Также за счёт увеличения экспрессии гена *atp1a3* у самок значимо снижалось отношение экспрессии генов *atp1a1* / *atp1a3*, таким образом, в ткани кишечника самок в условиях пресной воды относительная роль этого паралога выше по сравнению с α 1a-субъединицей (Рис. 12б).

Также в кишечнике самок, но не α -самцов, в результате ПА увеличивалась экспрессия генов *esac* и *nhe2* (Рис. 12в, 12г). Литературные данные по экспрессии этих транспортёров в кишечнике рыб в условиях пресноводного перехода слабо согласуются с нашими результатами и между собой,

в связи с чем мы можем предположить, что регуляция ЕСАС и NHE2 в ткани кишечника рыб видоспецифична.

Экспрессия большинства изученных генов ионных транспортёров в ткани кишечника и жабр коррелировала с экспрессией генов пролактиновых рецепторов у самок (Табл. 1). У α -самцов значимая корреляция обнаруживалась только для экспрессии генов *prlrb* и *atp1a3* в ткани жабр ($r = 0,68$, $p = 0,003$ по критерию Спирмена). Таким образом, у самок по сравнению с α -самцами не только сильнее в ходе ПА меняется экспрессия генов ионных транспортёров в жабрах и кишечнике, но и сильнее они сорегулируются с генами рецепторов пролактина.

Табл. 1. Корреляция экспрессии генов пролактиновых рецепторов и генов ионных транспортёров в жабрах и кишечнике самок колюшек (контрольная и экспериментальные группы объединены). R и p указаны для критерия Спирмена

Ткань	Ген 1	Ген 2	r	p
Жабры	<i>prlra</i>	<i>prlrb</i>	0.93	< 0.0001
Жабры	<i>prlra</i>	<i>atp1a3</i>	0.76	0.0002
Жабры	<i>prlrb</i>	<i>atp1a3</i>	0.86	< 0.0001
Жабры	<i>prlra</i>	<i>nkcc1a</i>	0.75	0.0004
Жабры	<i>prlrb</i>	<i>nkcc1a</i>	0.87	< 0.0001
Жабры	<i>prlra</i>	<i>nhe2</i>	0.95	< 0.0001
Жабры	<i>prlrb</i>	<i>nhe2</i>	0.96	< 0.0001
Кишечник	<i>prlra</i>	<i>prlrb</i>	0.63	0.005
Кишечник	<i>prlra</i>	<i>atp1a3</i>	-0.715	0.0009
Кишечник	<i>prlrb</i>	<i>atp1a3</i>	-0.65	0.004
Кишечник	<i>prlra</i>	<i>atp1a3 / atp1a1</i>	0.61	0.007
Кишечник	<i>prlrb</i>	<i>nkcc1a</i>	-0.72	0.0008

Изменение экспрессии генов ионных транспортёров жабр и кишечника у α - и ω -самцов в модели гиперпролактинемии в условиях морской воды

Поскольку у самцов в ходе ПА пролактиновая ось стимулируется в гораздо меньшей степени, чем у самок, оценку влияния пролактина на осморегуляторную функцию самцов провели, измеряя интенсивность экспрессии генов пролактиновых рецепторов и ионных транспортёров в модели гиперпролактинемии в условиях морской воды, сравнивая α - и ω -самцов. У α -самцов, в отличие от ω , введение пролактина сопровождалось повышением концентрации ионов K^+ в плазме крови (Рис. 13).

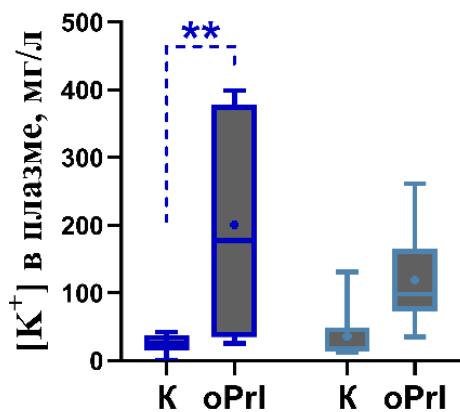


Рис.13. Изменение концентрации ионов K^+ в плазме крови α -самцов (синий контур) и ω -самцов (серый контур) контрольных групп и группы после введения пролактина. two-way ANOVA, ** – $p < 0,01$

В ткани жабр после введения пролактина увеличилась экспрессия генов *prlra*, *prlrb* и *atp1a3* у α -самцов (Рис. 14а, 14б, 14в). У ω -самцов на фоне пролактина снизилась экспрессия гена *esac* в жабрах (Рис. 14г). В ткани кишечника у α -самцов экспрессия генов *prlra*, *atp1a1* и *nkcc2* повышалась, гена *prlrb* – снижалась (Рис. 15а, 15б, 15в, 15г). Экспрессия генов остальных изученных ионных транспортёров не менялась. Также были выявлены корреляции между этими параметрами (Табл. 2). Согласно полученным данным об изменении экспрессии генов и корреляциям, для α - и ω -самцов были составлены схемы, отражающие эффект пролактина на осморегуляторную функцию самцов различного положения в иерархии (Рис. 16).

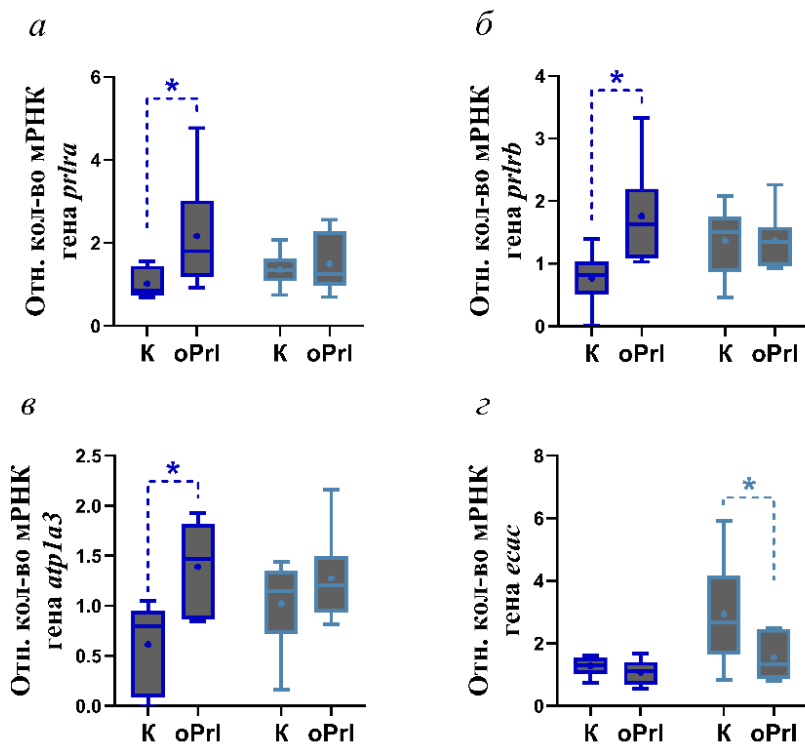


Рис.14. Изменение экспрессии генов *prlra* (а), *prlrb* (б), *atp1a3* (в) и *esac* (г) в жабрах α -самцов (синий контур) и ω -самцов (голубой контур) контрольных групп и группы на фоне введения пролактина. two-way ANOVA, * – $p < 0,05$

Таким образом, на фоне введения пролактина осморегуляторная функция α -самцов меняется пролактинзависимо и сильнее по сравнению с ω -самцами.

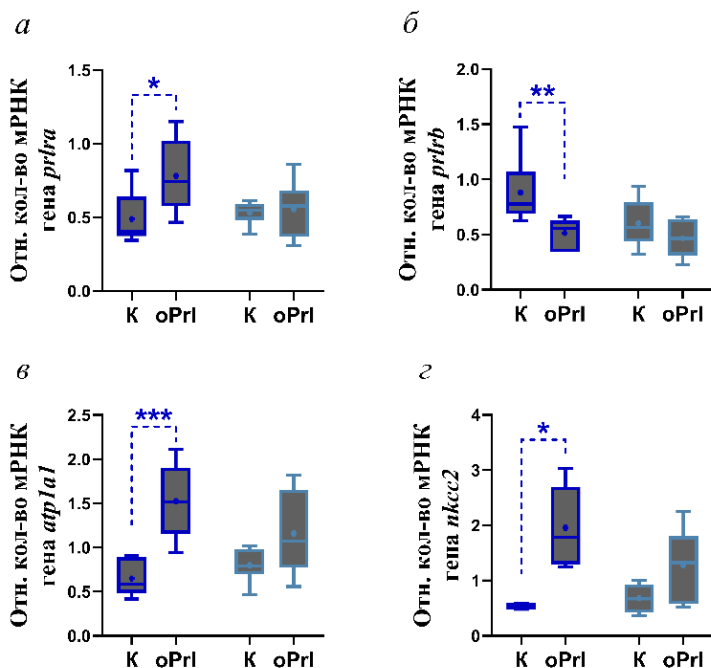


Рис.15. Изменение экспрессии генов *prlra* (а), *prlrb* (б), *atp1a1* (в) и *nkcc2* (г) в кишечнике α -самцов (синий контур) и ω -самцов (серый контур) контрольных групп и группы после введения пролактина. two-way ANOVA, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

Табл. 2. Корреляция экспрессии генов пролактиновых рецепторов и генов ионных транспортёров в жабрах и кишечнике α - и ω -самцов колюшек (контрольная и экспериментальные группы объединены). R и p указаны для критерия Спирмена

Группа	Ткань	Ген1	Ген 2	r	p
α -самцы	Жабры	<i>prlra</i>	<i>prlrb</i>	0.98	< 0.0001
α -самцы	Жабры	<i>prlra</i>	<i>atp1a3</i>	0,68	0,02
α -самцы	Жабры	<i>prlrb</i>	<i>atp1a3</i>	0,7	0,018
α -самцы	Кишечник	<i>prlra</i>	<i>nkcc2</i>	0.92	0.0003
α -самцы	Кишечник	<i>prlrb</i>	<i>nkcc2</i>	-0.71	0.034
α -самцы	Кишечник	<i>prlrb</i>	<i>atp1a1</i>	-0.6	0.04
ω -самцы	Жабры	<i>prlra</i>	<i>prlrb</i>	0.73	0.007
ω -самцы	Жабры	<i>prlrb</i>	<i>ecac</i>	0.7	0.01

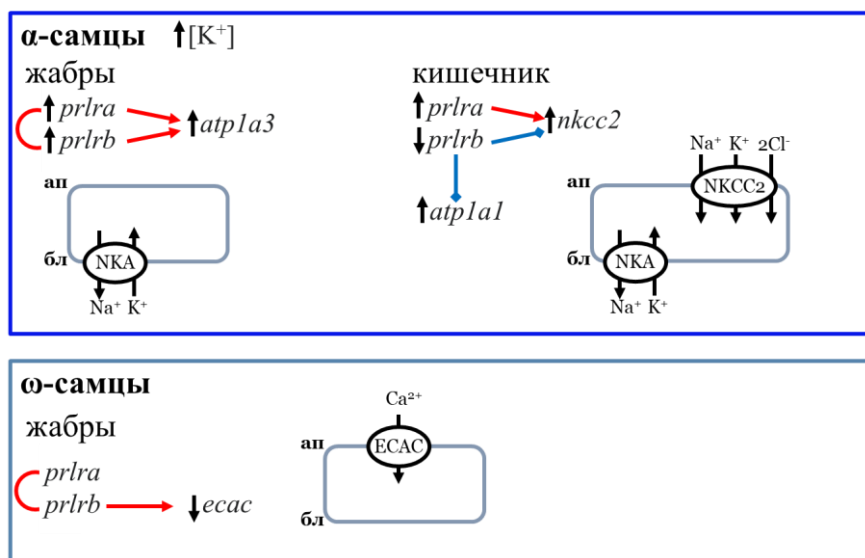


Рис.16. Сводная схема изменения экспрессии генов ионных транспортёров α - и ω -самцов на фоне введения пролактина

Изменение экспрессии генов опсинов в сетчатке самок и самцов в модели острой и хронической пресноводной адаптации и гиперпролактинемии

Экспрессия генов опсинов и в контрольной, и во всех экспериментальных группах не различалась между группами α - и ω -самцов, поэтому их объединили.

Экспрессия гена *sws1*, кодирующий опсин колбочек, чувствительных в ультрафиолетовой области спектра, повышалась в сетчатке самок на 24 час, но снижалась до уровня контрольной группы к 72 часу ПА. Через 24 часа ПА также выявлены различия, зависящие от пола с преобладанием экспрессии гена *sws1* у самок по сравнению с самцами (Рис. 17а). У самцов, несмотря на отсутствие влияния ПА на экспрессию гена *sws1*, интересно отметить снижение его экспрессии в модели гиперпролактинемии в условиях морской воды (Рис. 18а). Мы предполагаем, что экспрессия гена *sws1* в сетчатке самцов была стабильна в модели ПА в связи со слабым уровнем стимуляции пролактиновой оси самцов при переходе в пресную воду, что было обсуждено выше.

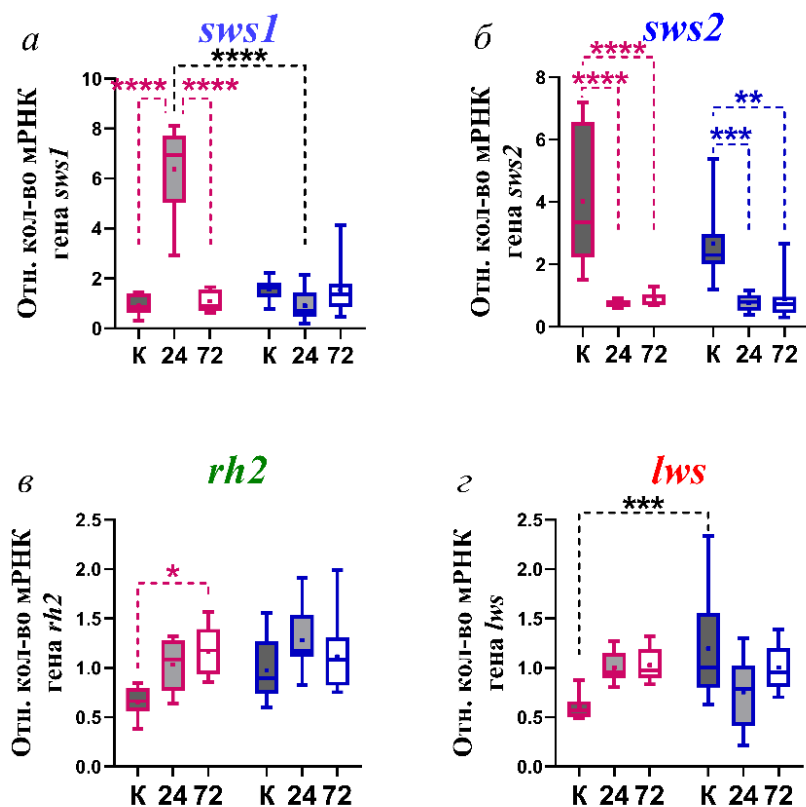


Рис.17. Изменение экспрессии генов опсинов *sws1* (а), *sws2* (б), *rh2* (в) и *lws* (г) в сетчатке самок и самцов в модели острой и хронической ПА. two-way ANOVA, различия, связанные с ПА, отмечены цветом согласно полу особей, различия, связанные с полом, отмечены чёрным цветом, * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$

Экспрессия гена *sws2*, кодирующего опсин колбочек, чувствительных в синей области спектра, зависела от ПА и снижалась начиная с 24 часа ПА и у самок, и у самцов (Рис. 17б). Этот эффект также воспроизводился у самок в модели гиперпролактинемии в условиях морской воды (Рис. 18б). Поэтому снижение экспрессии гена *sws2* при переходе в пресную воду можно считать наиболее зависимым от пролактина.

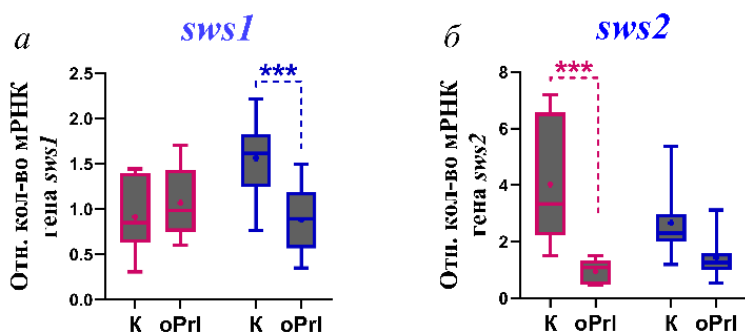


Рис.18. Изменение экспрессии генов опсинов *sws1* (а) и *sws2* (б) в сетчатке самок и самцов в модели гиперпролактинемии в условиях морской воды. two-way ANOVA, *** – $p < 0,001$

Экспрессия гена *rh2*, кодирующего опсин колбочек, чувствительных в зелёной области спектра, значительно росла только в сетчатке самок, повышаясь к 72 часу ПА (Рис. 17в). Экспрессия гена *lws*, кодирующего опсин колбочек, чувствительных в красной области спектра, не менялась ни у самок, ни у самцов в зависимости от ПА, но в условиях морской воды была выше у самцов (Рис. 17г).

Важно отметить, что чувствительность цветового зрения модулируется пролактином как у самок, так и у самцов (Рис. 18), таким образом впервые у рыб выявлена новая функция пролактина, ассоциированная с репродукцией.

Изменение экспрессии генов пролактинов и пролактиновых рецепторов в мозге α -самцов в фазе нереста и самцов в фазе родительского поведения

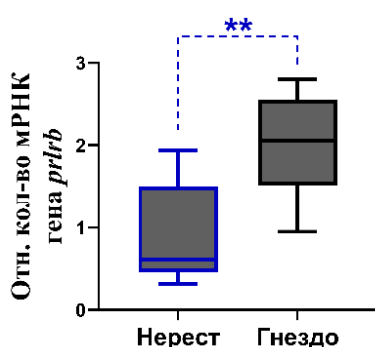


Рис.19. Экспрессия гена *prlrb* в ткани мозга самцов в фазе нереста («Нерест») и в фазе родительского поведения («Гнездо»). Тест Манна-Уитни, ** – $p < 0,01$

Из изученных генов – *prl1*, *prl2*, *prlra*, *prlrb* – в ткани мозга самцов в разных репродуктивных стадиях значимые различия были выявлены только в экспрессии гена *prlrb*. Его экспрессия наблюдалась на более высоком уровне в мозге самцов в фазе родительского поведения по сравнению с α -самцами в фазе конкуренции за самок (Рис. 19). В ранних работах показан стимулирующий эффект пролактина на фаннинг – элемент родительского поведения самцов колюшек, проявляющийся в вентилировании гнезда с икринками плавниками. На основании наших данных можно выдвинуть предположение о ключевой роли пролактинового рецептора б в родительском поведении самцов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе впервые для рыб пролактиновая ось была рассмотрена в контексте и осморегуляторных, и репродуктивных эффектов. Установлено, что у самок основной гомолог пролактина кодируется геном *prl1*. У самцов в первые 12-18 часов ПА происходит увеличение экспрессии гена другого гомолога пролактина *prl2*. Показано, что в ходе ПА у самок по сравнению с самцами меняется экспрессия большего количества элементов пролактиновой оси. Чувствительность к пролактину мозга и почек более сильно и зависимо от пола меняется в ходе ПА по сравнению с тканью жабр и кишечника, для которых не обнаружено половых различий. У самок при ПА осморегуляторная функция также меняется сильнее, чем у самцов, и изменение экспрессии генов ионных транспортёров в жабрах и кишечнике сорегулируется с пролактиновыми рецепторами. Вместе с тем, при стимуляции экзогенным пролактином у самцов было показано наличие эффекта на экспрессию генов ионных транспортёров жабр и кишечника, зависимый от положения самца в иерархии. Для самцов предположено участие пролактинового рецептора в родительском поведении.

Впервые для рыб изучено влияние пресноводной адаптации и пролактина на экспрессию генов опсинов в сетчатке и адаптацию цветового зрения, также зависимую от пола особей. Полученные данные позволяют заключить о влиянии пролактина на цветовое зрение колюшек, проявляющееся по-разному в зависимости от пола. Глобальный тренд – снижение чувствительности цветового зрения в коротковолновой области спектра при пресноводной адаптации – может быть объяснён более низкой прозрачностью пресной воды по сравнению с морской и в результате, более быстрым рассеянием света коротковолновой области спектра. Как следствие, в пресной воде зрение в синей области спектра неадаптивно.

Данная работа первая, в которой продемонстрированы различные для рыб разного пола эффекты пролактина во время пресноводного перехода на осморегуляцию и чувствительность цветового зрения. Предполагается, что пролактин адаптирует организм трёхиглых колюшек к условиям пресной воды в зависимости от пола, а у самцов ещё в зависимости от положения в иерархии. Таким образом, репродуктивные эффекты пролактина могут проявляться ещё у низших позвоночных.

ВЫВОДЫ

1. При адаптации особей трёхиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* L. к пресной воде пролактиновая ось стимулируется сильнее у самок по сравнению с самцами, что приводит к появлению в условиях пресной воды различий в пролактиновой оси, связанных с полом особи.
2. Осморегуляторная функция жабр и кишечника *G. aculeatus* при пресноводной адаптации также модифицируется неодинаково: у самок по сравнению с самцами экспрессия большего количества генов ионных транспортёров в ткани жабр и кишечника меняется и коррелирует с экспрессией генов пролактиновых рецепторов.
3. Снижение экспрессии гена *nkcc1a* жабрах при адаптации к пресной воде происходит независимо от пола особи *G. aculeatus*.
4. Положение в иерархии самцов *G. aculeatus* ассоциировано с пролактиновой осью и регуляцией водно-солевого обмена: при введении пролактина в условиях морской воды экспрессия генов пролактиновых рецепторов и ионных транспортёров в ткани жабр и кишечника α -самцов модифицируется сильнее по сравнению с ω -самцами.
5. Выявлена новая функция пролактина рыб – адаптация цветового зрения *G. aculeatus* к пресной воде при снижении солёности – реализация которой также зависит от пола особи.
6. Установлено, что при реализации родительского поведения мозг самцов становится более чувствителен к пролактину за счёт роста экспрессии гена пролактинового рецептора *b*.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, Web of Science (WoS), RSCI и в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.015.7 по специальности 1.5.5. Физиология человека и животных:

1. Павлова Н.С., Неретина Т.В., Смирнова О.В. Динамика экспрессии генов пролактиновой оси в мозгу самок и самцов трёхиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* (*Gasterosteidae*) при кратковременной адаптации к пресной воде // Вопросы ихтиологии. 2020. Т. 60. № 2. С. 202–208. (IF=0,719, РИНЦ) (0,5/0,4)*
2. Павлова Н.С., Гизатулина А.Р., Неретина Т.В., Смирнова О.В. Экспрессия генов опсинов в сетчатке глаза самок и самцов трёхиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* L.: зависимость от пресноводной адаптации и пролактина // Биохимия. 2022. Т. 87. № 2. С. 278–288. (IF=2,908, РИНЦ) (0,96/0,77)*

3. Смирнова О.В., Абрамичева П.А., **Павлова Н.С.** Осморегуляция и репродукция: эволюционные тренды функций пролактина от рыб к млекопитающим // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2024. Т. 79. № 2S. С. 46–54. (IF=0,677, РИНЦ) (0,99/0,2)*

4. **Павлова Н.С.**, Неретина Т.В., Смирнова О.В. Экспрессия генов пролактина и пролактиновых рецепторов у трёхиглой колюшки *G. aculeatus L.*: зависимость от пола и пресноводной адаптации // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2024. Т. 60. № 5. С. 562–572. (IF=0,673, РИНЦ) (0,98/0,78)*

* – Объём в условных печатных листах/вклад автора в условных печатных листах

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

МЕ – международная единица

ПА – пресноводная адаптация

ТХУ – трихлоруксусная кислота

atp1a1 – ген $\alpha 1a$ -субъединицы

Na^+/K^+ -АТФазы

atp1a2 – ген $\alpha 2a$ -субъединицы

Na^+/K^+ -АТФазы

atp1a3 – ген $\alpha 3a$ -субъединицы

Na^+/K^+ -АТФазы

esac – ген канала ЕСАС рыб

ЕСАС – эпителиальный Ca^{2+} -канал

ncc – ген NCC-транспортёра рыб

NCC – Na^+/Cl^- -котранспортёр

nkcc1a – ген NKCC1a-транспортёра рыб

nkcc2 – ген NKCC2-транспортёра рыб

NKCC – $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ -котранспортёр

nhe2 – ген NHE2-обменника рыб

nhe3 – ген NHE3-обменника рыб

NHE – Na^+/H^+ -обменник

oPrl – овечий пролактин

prl1 – ген пролактина рыб

Prl1 – пролактин рыб

prl2 – ген пролактинподобного гормона рыб

Prl2 – пролактинподобный гормон рыб

prlra – ген пролактинового рецептора а рыб

prlrb – ген пролактинового рецептора b рыб

lws – ген опсина LWS рыб

rh2 – ген опсина RH2 рыб

sws1 – ген опсина SWS1 рыб

sws2 – ген опсина SWS2 рыб