

УДК 577.25

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ОПСИНОВ В СЕТЧАТКЕ ГЛАЗА САМОК И САМЦОВ ТРЁХИГЛОЙ КОЛЮШКИ *Gasterosteus aculeatus* L.: ЗАВИСИМОСТЬ ОТ ПРЕСНОВОДНОЙ АДАПТАЦИИ И ПРОЛАКТИНА

© 2022 Н.С. Павлова^{1*}, А.Р. Гизатулина², Т.В. Неретина³, О.В. Смирнова¹

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных, 119991 Москва, Россия; электронная почта: pav.nad.ser@gmail.com

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, кафедра физиологии и общей патологии, 119991 Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Беломорская биологическая станция им. Н.А. Перцова; 186671 пос. Приморский, Лоухский р-н, Карельская республика, Россия

Поступила в редакцию 01.01.2022

После доработки 24.01.2022

Принята к публикации 24.01.2022

Чувствительность цветового зрения играет важную роль в адаптивных процессах у рыб, в особенности — при миграциях и в репродуктивном цикле. В обоих этих процессах у рыб важную функцию выполняет гормон пролактин и его паралог, пролактин-подобный гормон. Для изучения возможного вклада пролактиновой оси в пресноводную адаптацию цветового зрения рыб проведено исследование влияния пресноводной адаптации в нерестовый период, а также введения пролактина на экспрессию генов опсинов (*SWS1*, *SWS2*, *RH2*, *LWS*) в сетчатке глаза самок и самцов трёхиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* L. Показано, что у самок, в отличие от самцов, при пресноводной адаптации растёт экспрессия гена пролактина-1 и также, как у самцов, падает экспрессия гена пролактин-подобного гормона в мозге. При пресноводной адаптации, а также при введении пролактина в условиях морской воды в сетчатке глаз самок и самцов снижается экспрессия гена опсина *SWS2*, чувствительного в синей области спектра. В сетчатке глаза самцов при введении пролактина в условиях морской воды, но не при пресноводной адаптации снижается также экспрессия гена опсина *SWS1*, чувствительного в ультрафиолетовой области спектра. Экспрессия других опсинов при пресноводной адаптации не является пролактинзависимой ни у самок, ни у самцов. Можно заключить, что экспрессия генов некоторых опсинов в сетчатке глаза трёхиглой колюшки регулируется пролактином и может пролактинзависимо меняться в условиях пресноводной адаптации, что расширяет понимание адаптивной значимости пролактиновой оси для организма рыб при пресноводных миграциях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пролактин, опсины, трёхиглая колюшка *Gasterosteus aculeatus* L., пресноводная адаптация, адаптация цветового зрения, зависимость от пола.

DOI: 10.31857/S0320972522020099

ВВЕДЕНИЕ

Цветовое зрение и его чувствительность в разных областях спектра у позвоночных, в том числе у рыб, опосредовано наличием и соотношением зрительных пигментов в колбочках сетчатки. В состав молекул-фоторецепторов входит опсин, ковалентно связанный с хромофорной

группой — 11-цис-изомером ретиналя, производным витамина А. Структура опсина определяет спектр поглощения колбочки — её спектральную чувствительность [1]. Опсины, ассоциированные с цветовым зрением, подразделяются на четыре группы: *SWS1* чувствителен в ультрафиолетово-синей области спектра, *SWS2* — в синей, *RH2* — в зелёной и *LWS* — в красной [2]. Изменение соотношения экспрессии генов различных опсинов сопровождается соответствующим изменением зрительной чувствительности в разных областях спектра [3, 4]. В сетчатке глаза рыб описаны опсины всех типов, при этом на их соотношение влияет ряд параметров, в особенности экология вида и стадия репродуктивного цикла [5]. Исследования цихлид показали, что виды, обитающие на большей глубине, более чувствительны к коротковолновому, нежели

Принятые сокращения: Prl1 — пролактин-1; Prl2 — пролактин-2 или пролактин-подобный гормон; oPrl — овечий пролактин; *SWS1* — опсин колбочек, чувствительных в коротковолновой ультрафиолетово-синей области спектра; *SWS2* — опсин колбочек, чувствительных в коротковолновой синей области спектра; *RH2* — опсин колбочек, чувствительных в средневолновой зелёной области спектра; *LWS* — опсин колбочек, чувствительных в длинноволновой красной области спектра.

* Адресат для корреспонденции.

к длинноволновому, излучению видимого спектра, что связано с превалированием соответствующей части спектра [6]. Интенсивность экспрессии опсинов также зависит от прозрачности воды: на флоридской лукании *Lucania goodei* показано, что у особей в прозрачной воде экспрессия генов опсинов *SWS1* и *SWS2* выше, а генов опсинов *RH2* и *LWS* — ниже, чем у особей в мутной воде. Эти данные воспроизводились в экспериментальных условиях [7]. В случае, если вид эвригалинный, то морская и пресноводная популяции также различаются по экспрессии генов опсинов. В работах, посвящённых чувствительности цветового зрения трёхиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* L. из морских и пресноводных популяций, показано, что у резидентных морских колюшек более высокие уровни экспрессии опсина *SWS1* и *LWS* (последнего — только в лабораторных условиях), и более низкие — опсина *RH2* по сравнению с резидентными пресноводными колюшками [8]. Однако данные по пластичности цветового зрения у проходных рыб, меняющих среду обитания с морской на пресноводную в ходе жизненного цикла, отсутствуют.

В условиях пресноводной миграции рыб, которая обычно связана с брачным периодом, адаптация цветового зрения может быть важным и даже необходимым условием для распознавания полового партнёра или конкурента, если для вида характерно приобретение брачного окраса, что чаще встречается у самцов. Влияние половых гормонов и репродуктивного периода на сетчатку показано для ряда рыб. Так, у самок цихлид, в частности *Astatotilapia burtoni*, в брачный период повышается пластичность и меняется чувствительность цветового зрения, опосредованная изменением экспрессии генов опсинов, с превалированием коротковолновых опсинов [9]. Для ряда видов рыб (трёхиглая колюшка *G. aculeatus*, золотая рыбка *Carassius auratus*, обыкновенная гамбузия *Gambusia affinis*) показано, что андрогены и эстрогены способны модулировать зрительную чувствительность к длинноволновому излучению [10–12].

Трёхиглая колюшка *G. aculeatus* L. является перспективным объектом для изучения зависимой от пресноводной адаптации и пола особи пластичности цветового зрения. Это связано, с одной стороны, с эвригалинностью вида, с другой — с наличием сложного репродуктивного цикла, который сопровождается приобретением самцами брачного окраса и миграцией части морской популяции в пресноводные водоёмы [13]. Для трёхиглой колюшки было показано влияние на цветовое зрение как экологических условий, так и некоторых гормонов, ассоцииро-

ванных с репродукцией, за исключением пролактина [8, 10]. В сетчатке трёхиглой колюшки присутствуют опсины всех четырёх типов, не имеющие паралога, в отличие от большинства других видов рыб, что приближает цветовое зрение колюшек по функциональным характеристикам к таковому у млекопитающих [14–16].

В условиях пресноводной миграции в нерестовый период пролактин участвует в адаптации водно-солевого обмена колюшек, как и других видов рыб, к пресной воде. При этом у рыб позднее был обнаружен паралог пролактина, которому присвоили название пролактин-подобный гормон или пролактин-2 (Pr12), в связи с чем обнаруженному ранее гормону присвоили название пролактин-1 (Pr11). Ранее нами показано, что при острой (24-часовой) пресноводной адаптации экспрессия генов пролактиновой оси в ткани мозга (вместе с гипофизом) самок и самцов трёхиглой колюшки меняется неодинаково, что свидетельствует о зависимой от пола пролактиновой регуляции у колюшек [17]. Описано влияние пролактина на сетчатку глаза млекопитающих, однако его эффекты обычно связывают со стимуляцией васкуляризации, в частности во время развития сетчатки, и антиоксидантным эффектом, смягчающим проявления старения организма [18, 19]. В ряде исследований показано наличие элементов пролактиновой оси в сетчатке рыб. Так, экспрессия пролактин-2 была обнаружена в ганглионарном, внутреннем и наружном ядерных слоях сетчатки *Danio rerio*, и были доказаны его паракринные эффекты на сетчатку при эмбриональном развитии. Наружный ядерный слой представлен телами клеток-фоторецепторов: палочек и колбочек. Таким образом, сетчатка рыб, как и прочих позвоночных, чувствительна к пролактину, и в ней известны паракринные эффекты пролактина-2 [20].

Нами была выдвинута гипотеза о возможном и зависимом от пола участии пролактинов в адаптации к пресной воде не только водно-солевого обмена, но и цветового зрения колюшек. Для её проверки мы проанализировали изменение экспрессии генов опсинов в сетчатке самок и самцов трёхиглой колюшки в условиях острой и хронической пресноводной адаптации, а также при введении пролактина в условиях морской воды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальная модель. Работа выполнена на группах половозрелых самок и самцов трёхиглой колюшки *G. aculeatus* L. морской популя-

ции, находящихся в нерестовом состоянии. Животных (длина тела самок составила $7 \pm 0,32$ см, самцов — $6,5 \pm 0,3$ см) отлавливали в Кандалакшском заливе Белого моря в июне 2020 г. Особи были разделены по полу, самцы также разделены по интенсивности окраски на альфа- и омега-самцов. Внутри этих групп были сформированы четыре экспериментальные группы: контрольная «К» (морская популяция), группа острой пресноводной адаптации «24 часа», группа хронической пресноводной адаптации «72 часа», группа с введением морской популяции овечьего пролактина «oPrl», $n = 6$ для каждой группы. Группы альфа- и омега-самцов в дальнейшем были объединены, поскольку ни по одному из изучаемых параметров между ними не было обнаружено статистически значимых различий, таким образом, для групп самцов $n = 12$. Перед началом эксперимента все особи были адаптированы к условиям содержания (аквариумы объёмом 20 литров с непрозрачными стенками, световой и температурный режим соответствовали естественным условиям) в течение 24 ч. Особи группы «К» находились в течение всего эксперимента в условиях морской воды. Особи группы «24 часа» были помещены на 24 ч в пресную воду. Особи группы «72 часа» были помещены в пресную воду на 72 ч. Особи группы «oPrl» находились в течение 72 ч в условиях морской воды, но один раз в сутки им производили внутрибрюшинную инъекцию 50 мкл физиологического раствора с овечьим пролактином («National hormone and peptide program», США) в концентрации 14 МЕ/мл. Овечий пролактин был выбран для применения в эксперименте, поскольку широко используется в работах по изучению влияния пролактина на осморегуляцию и репродукцию рыб и связывается с обоими рецепторами пролактина рыб с достаточно высоким сродством, хотя и меньшим, чем гомологичный пролактин [21–23]. Группу положительного контроля, которой вводили физиологический раствор в условиях морской воды, в эксперименте не использовали, так как наши предыдущие исследования показали, что по изучаемым параметрам особи не отличаются от контрольных. По завершении эксперимента у особей удаляли мозг вместе с гипофизом (для контроля экспрессии генов пролактинов), а также ткань сетчатки; образцы фиксировали в IntactRNA («Евроген», Россия).

Обработка материала. Из ткани мозга (с гипофизом) и сетчатки выделяли тотальную РНК фенол-хлороформным методом с полиакриламидным осаждением нуклеиновых кислот, используя набор ExtractRNA («Евроген»). Для синтеза кДНК использовали MMLV-ревертазу и

случайные праймеры («Евроген»). Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени использовали амплификатор Bio-Rad CFX96 («Bio-Rad», Канада) и набор реакционных смесей с красителем SYBRgreen и низкой концентрацией референсного красителя ROX («Евроген») и специфичные праймеры (таблица). Режим амплификации: $95\text{ }^\circ\text{C} - 5$ мин; $95\text{ }^\circ\text{C} - 15$ с, $60\text{ }^\circ\text{C} - 20$ с, $72\text{ }^\circ\text{C} - 20$ с, 40 циклов; кривая плавления $60 - 95\text{ }^\circ\text{C}$, инкремент $0,5\text{ }^\circ\text{C} - 5$ с. Каждую реакцию с использованием кДНК проводили в трёх независимых экспериментах; для каждого исследуемого гена также проводили безревертазные контроли амплификации фрагмента геномной ДНК. Если безревертазный контроль был отрицательным, значения ПЦР с матрицы кДНК использовали для расчётов. Подробно методика описана Pierce et al. [24]. При проведении ПЦР в реальном времени значения экспрессии генов интереса *Prl1* и *Prl2* нормировали на уровень экспрессии референсных генов *Rpl13a* и *Ubc* [25]. Значения экспрессии генов интереса (*SWS1*, *SWS2*, *RH2* и *LWS*) нормировали на уровень экспрессии референсных генов *Ubc* и *GNAT2* [26]. Для расчётов использовали формулу, применявшуюся в предыдущих работах [17].

Статистический анализ данных. Статистическую обработку проводили в программе GraphPad Prism 8 с использованием one-way ANOVA (однофакторные сравнения) и two-way ANOVA (двухфакторные сравнения). В обоих случаях использовали тест Даннетта. На графиках для каждой группы данные представлены в виде медианы, нижней и верхней квартили, а также минимального и максимального значений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Влияние адаптации к пресной воде на экспрессию генов пролактинов в ткани мозга самок *G. aculeatus* L. Экспрессия гена пролактина-1 в ткани мозга самок трёхиглой колюшки повышалась в ходе адаптации к пресной воде: относительные количества мРНК гена *Prl1* были достоверно выше в мозге самок как после 24, так и после 72 ч адаптации по сравнению с контрольной группой (рис. 1, а). Экспрессия гена пролактина-2 в ткани мозга самок, напротив, снижалась: мРНК гена *Prl2* не была обнаружена в мозге самок ни после 24, ни после 72 ч адаптации к пресной воде, что статистически отличалось от данного параметра у контрольной группы (рис. 1, б).

Нуклеотидные последовательности прямого и обратного праймеров генов интереса и референсных генов, а также длина ПЦР-продукта

Ген	Нуклеотидная последовательность прямого (for) и обратного (rev) праймеров, 5'–3'	Длина ПЦР-продукта, п.н.
<i>Pr11</i>	for – ACCTGGACTCGCATTTGCCTCTC rev – AAGGTCCGACTCTGGTACTTGAAG	125
<i>Pr12</i>	for – TCCAATAAAGCCCTAGAGATGAG rev – AGGCTGCTGACGGTGTGCTTAT	113
<i>SWS1</i>	for – TGGAGCAGGTACATCCCTGA rev – GAGCTGCTACAGCTCGAAGA	184
<i>SWS2</i>	for – GCAAGCCGCTTGGTAACTTC rev – TCTGGGATGTACCTGCTCC	124
<i>RH2</i>	for – GTACCTTCCTGAGGGCATG rev – GGCTGCGGCAGCTTTGACT	135
<i>LWS</i>	for – GCTGCGGCTAACCCCTGGA rev – ACATGAACGGAAGTCCCGG	126
<i>Rpl13α</i>	for – CACCTTGGTCAACTTGAACAGTG rev – TCCCTCCGCCCTACGAC	178
<i>Ubc</i>	for – AGACGGGCATAGCACTTGC rev – CAGGACAAGGAAGGCATCC	180
<i>GNAT2</i>	for – GTTACTGCTTGGTGCTGGTG rev – CTTCTGTGCATTCTCCTGTGA	211

Влияние 24- и 72-часовой адаптации к пресной воде и экзогенного пролактина на экспрессию генов опсинов в ткани сетчатки самок *G. aculeatus* L. Экспрессия гена *SWS1*, кодирующего опсин, чувствительный в ультрафиолетово-синей области спектра, в ткани сетчатки глаз самок трёхиглой колюшки в ходе пресноводной адаптации менялась неодинаково. После 24-часовой адаптации к пресной воде экспрессия гена *SWS1* в сетчатке самок была достоверно вы-

ше по сравнению как с контрольной группой, так и с группой 72-часовой пресноводной адаптации. Относительные количества мРНК гена *SWS1* в контрольной группе и группе, перенёвшей пресноводную адаптацию в течение 72 ч, были на сопоставимом уровне (рис. 2, а). Ежедневное введение овечьего пролактина в течение 72 ч в условиях морской воды не оказало достоверного влияния на экспрессию гена *SWS1* в ткани сетчатки самок колюшек (рис. 2, б).

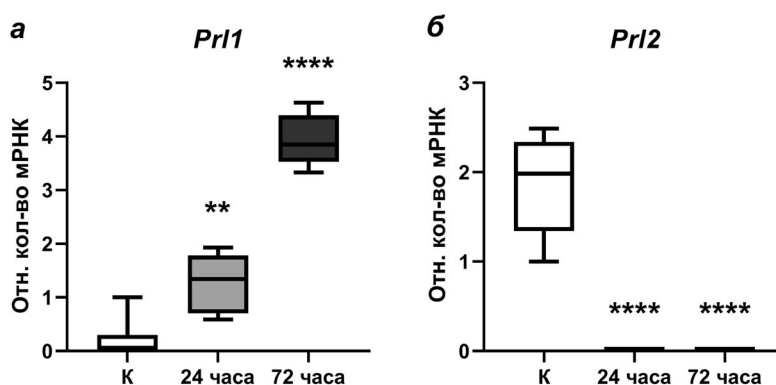


Рис. 1. Экспрессия мРНК генов *Pr11* (а) и *Pr12* (б) в ткани мозга самок трёхиглой колюшки в условиях морской воды (контроль «К» – незакрашенные боксы) и после 24- и 72-часовой адаптации к пресной воде (боксы серого и тёмно-серого цвета соответственно), ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ – статистически значимые различия по сравнению с группой «К» (one-way ANOVA; $n = 6$ в каждой из групп)

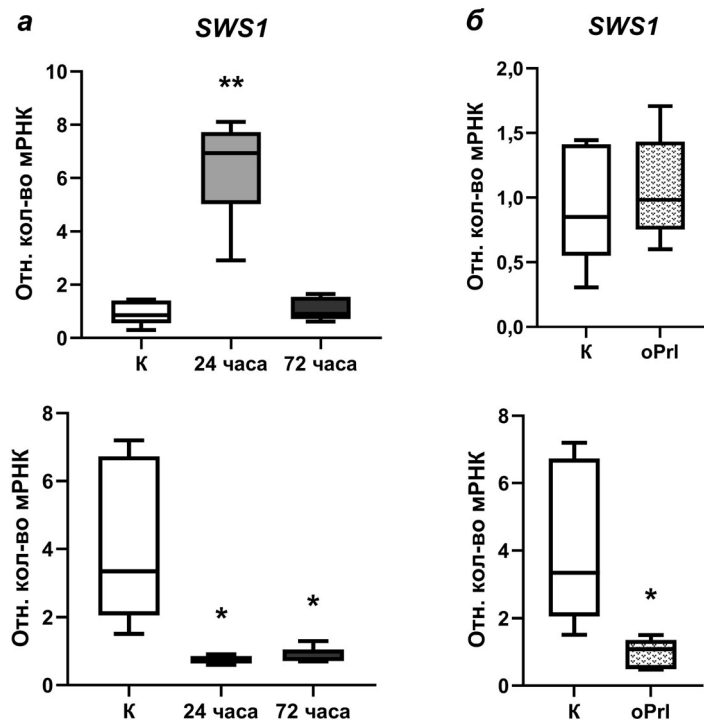


Рис. 2. Экспрессия мРНК генов опсинов, чувствительных в коротковолновой области спектра, в сетчатке глаз самок трёхиглой колюшки: *SWS1* (а, б), *SWS2* (в, г). а и в – В условиях морской воды в контроле «К» (незакрашенные боксы) и после 24- и 72-часовой адаптации к пресной воде (боксы серого и тёмно-серого цвета соответственно); б и г – в условиях морской воды в контроле «К» (незакрашенные боксы) и после внутрибрюшинных инъекций овечьего пролактина в течение 72 ч «oPrl» (пёстрые боксы), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ – статистически значимые различия по сравнению с группой «К» (one-way ANOVA; $n = 6$ в каждой из групп)

Экспрессия гена *SWS2*, кодирующего опсин, чувствительный в синей области спектра, в ткани сетчатки глаз самок трёхиглой колюшки в ходе пресноводной адаптации уменьшалась: относительные количества мРНК гена *SWS2* были достоверно ниже в группах 24- и 72-часовой пресноводной адаптации по сравнению с контрольной группой (рис. 2, в). В условиях морской воды на фоне введения пролактина экспрессия гена *SWS2* в сетчатке также была на более низком уровне по сравнению с контрольной группой (рис. 2, г).

Экспрессия гена *RH2*, кодирующего опсин, чувствительный в зелёной области спектра, в ткани сетчатки глаз самок трёхиглой колюшки в ходе пресноводной адаптации повышалась: относительные количества мРНК гена *RH2* были достоверно выше в группах 24- и 72-часовой пресноводной адаптации по сравнению с контрольной группой (рис. 3, а). В условиях морской воды на фоне введения пролактина уровень экспрессии гена *RH2* в сетчатке был сопоставим с контрольной группой (рис. 3, б).

Экспрессия гена *LWS*, кодирующего опсин, чувствительный в красной области спектра, в ткани сетчатки глаз самок трёхиглой колюшки в

ходе пресноводной адаптации повышалась: относительные количества мРНК гена *LWS* были достоверно выше в группах 24- и 72-часовой пресноводной адаптации по сравнению с контрольной группой (рис. 3, в). В условиях морской воды после введения экзогенного пролактина экспрессия гена *LWS* в сетчатке росла недостоверно (рис. 3, г).

Сравнение экспрессии исследуемых генов у α - и ω -самцов *G. aculeatus* L. в контрольной и экспериментальных группах. По экспрессии всех генов интереса (*Prl1* и *Prl2* в ткани мозга с гипофизом, *SWS1*, *SWS2*, *RH2* и *LWS* в ткани сетчатки) непарный *t*-test не выявил достоверных различий между α - и ω -самцами ни в группе контроля «К», ни в группах 24-часовой «24 часа» и 72-часовой «72 часа» пресноводной адаптации, ни в группах особей, которым в условиях морской воды вводили овечий пролактин (oPrl) ($p > 0,1$). Поэтому группы α - и ω -самцов объединены, и таким образом, в группах самцов размер выборки составил 12 особей.

Влияние адаптации к пресной воде на экспрессию генов пролактинов в ткани мозга самцов *G. aculeatus* L. Экспрессия гена пролактина-1 в ткани мозга самцов трёхиглой колюшки не ме-

нялась в ходе адаптации к пресной воде (рис. 4, а). Экспрессия гена пролактина-2 в ткани мозга самцов достоверно снижалась как после 24-, так и после 72-часовой адаптации к пресной воде (рис. 4, б).

Влияние 24- и 72-часовой адаптации к пресной воде и экзогенного пролактина на экспрессию генов опсинов в ткани сетчатки самцов *G. aculeatus* L. Экспрессия гена *SWS1*, кодирующего опсин, чувствительный в ультрафиолетово-синей

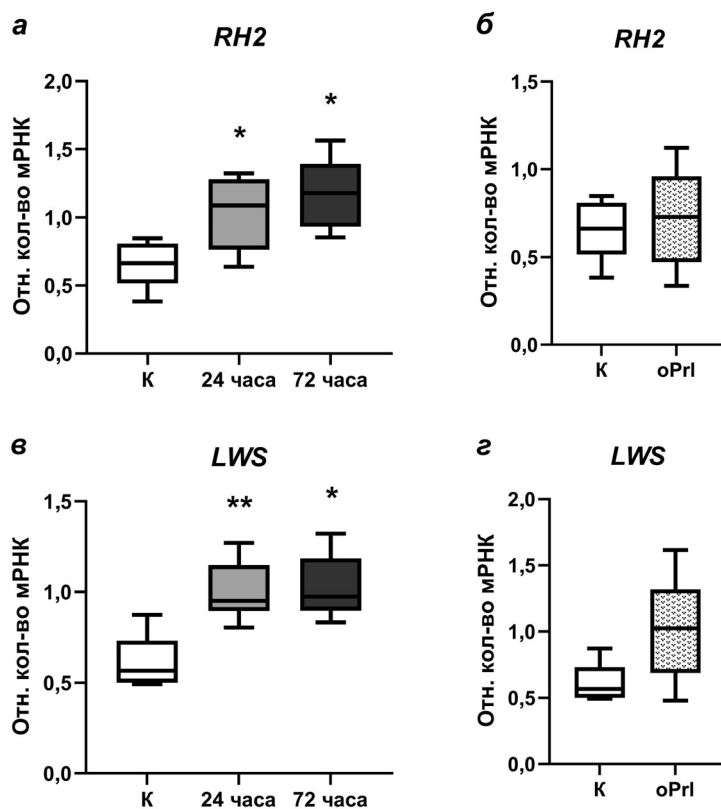


Рис. 3. Экспрессия мРНК генов опсинов, чувствительных в длинноволновой области спектра, в сетчатке глаз самок трёхиглой колюшки: *RH2* (а, б), *LWS* (в, г). а и в – В условиях морской воды в контроле «К» (незакрашенные боксы) и после 24- и 72-часовой адаптации к пресной воде (боксы серого и тёмно-серого цвета соответственно); б и г – в условиях морской воды в контроле «К» (незакрашенные боксы) и после внутрибрюшинных инъекций овечьего пролактина в течение 72 ч «oPrI» (пёстрые боксы), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ – статистически значимые различия по сравнению с группой «К» (one-way ANOVA; $n = 6$ в каждой из групп)

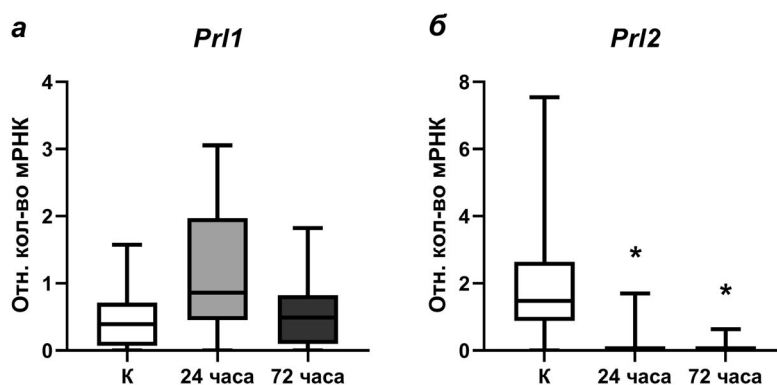


Рис. 4. Экспрессия мРНК генов *Prl1* (а) и *Prl2* (б) в ткани мозга самцов трёхиглой колюшки в условиях морской воды «К» (незакрашенные боксы) и после 24- и 72-часовой адаптации к пресной воде (боксы серого и тёмно-серого цвета соответственно), * $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с группой «К» (one-way ANOVA; $n = 12$ в каждой из групп)

области спектра, в ткани сетчатки глаз самцов трёхиглой колюшки в ходе пресноводной адаптации менялась неодинаково. После 24-часовой адаптации к пресной воде экспрессия гена *SWS1* в сетчатке самцов была достоверно ниже по сравнению как с контрольной группой, так и с группой 72-часовой пресноводной адаптации. Относительные количества мРНК гена *SWS1* в контрольной группе и группе, претерпевшей пресноводную адаптацию в течение 72 ч, были на сопоставимом уровне (рис. 5, а). После ежедневного введения пролактина в течение 72 ч относительные количества мРНК гена *SWS1* в сетчатке самцов были достоверно ниже по сравнению с контрольной группой (рис. 5, б).

Экспрессия гена *SWS2*, кодирующего опсин, чувствительный в синей области спектра, в ткани сетчатки глаз самцов трёхиглой колюшки в ходе пресноводной адаптации уменьшалась: относительные количества мРНК гена *SWS2* были достоверно ниже в группах 24- и 72-часовой пресноводной адаптации по сравнению с контрольной группой (рис. 5, в). В условиях

морской воды после введения экзогенного пролактина экспрессия гена *SWS2* в сетчатке самцов также была на более низком уровне по сравнению с контрольной группой (рис. 5, г).

Экспрессия генов *RH2* и *LWS*, кодирующих опсины, чувствительные в зелёной и красной области спектра соответственно, в ткани сетчатки глаз самцов трёхиглой колюшки в ходе пресноводной адаптации не менялась (рис. 6, а и в). В условиях морской воды после введения пролактина экспрессия генов *RH2* и *LWS* в сетчатке была сопоставима с их экспрессией в контрольной группе (рис. 6, б и г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изменения уровней экспрессии генов *Pr11* и *Pr12* в мозге трёхиглой колюшки в условиях пресноводной адаптации зависят от пола. Известно, что при пресноводной адаптации пролактиновая ось рыб стимулируется, однако эти эффекты были обнаружены и изучены на смешанных выборках, без разделения особей по

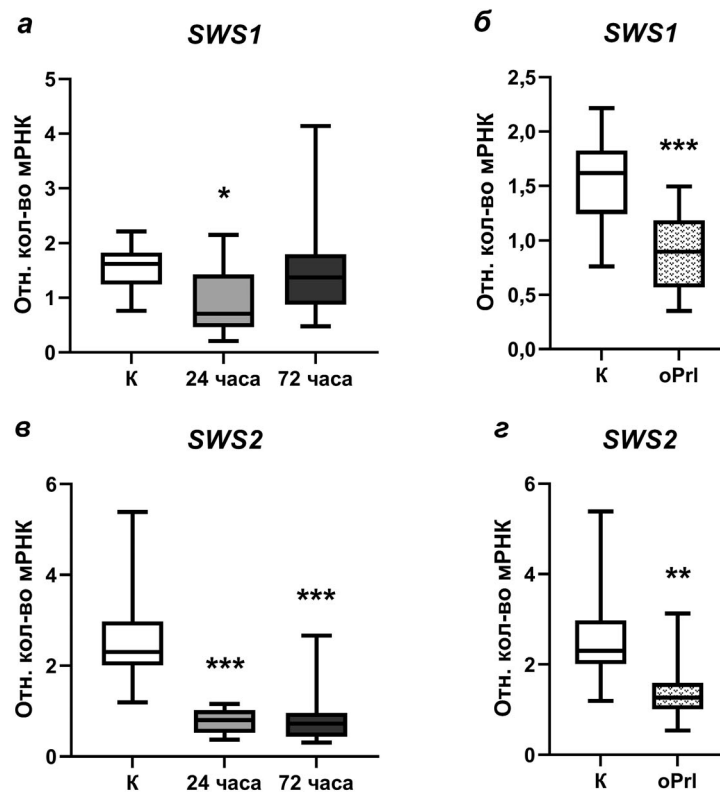


Рис. 5. Экспрессия мРНК генов опсинов, чувствительных в коротковолновой области спектра, в сетчатке глаз самцов трёхиглой колюшки: *SWS1* (а, б), *SWS2* (в, г). а и в – В условиях морской воды в контроле «К» (незакрашенные боксы) и после 24- и 72-часовой адаптации к пресной воде (боксы серого и тёмно-серого цвета соответственно); б и г – в условиях морской воды в контроле «К» (незакрашенные боксы) и после внутрибрюшинных инъекций овечьего пролактина в течение 72 ч «oPr» (пёстрые боксы), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – статистически значимые различия по сравнению с группой «К» (one-way ANOVA; $n = 12$ в каждой из групп)

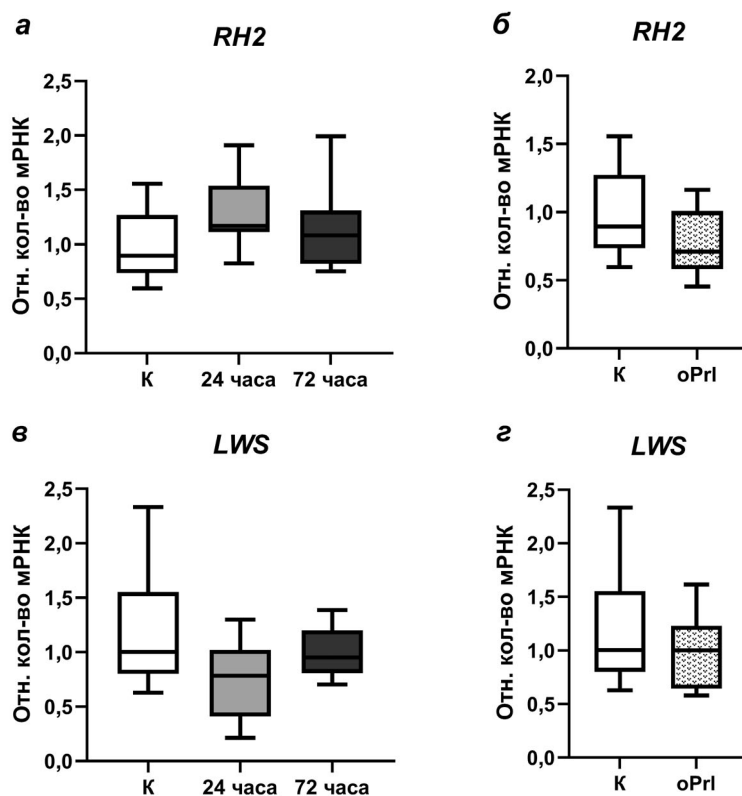


Рис. 6. Экспрессия мРНК генов опсинов, чувствительных в длинноволновой области спектра, в сетчатке глаз самцов трёхиглой колюшки: *RH2* (а, б), *LWS* (в, д). а и в – В условиях морской воды в контроле «К» (незакрашенные боксы) и после 24- и 72-часовой адаптации к пресной воде (боксы серого и тёмно-серого цвета соответственно); б и г – в условиях морской воды в контроле «К» (незакрашенные боксы) и после внутрибрюшинных инъекций овечьего пролактина в течение 72 ч «oPrI» (пестрые боксы). $n = 12$ в каждой из групп

полу [27–29]. Мы обнаружили различия в модификации экспрессии генов пролактинов в условиях пресноводной адаптации у самок и самцов. Ранее нами были обнаружены модификации пролактиновой оси колюшек в условиях пресноводной адаптации, различные у самок и самцов [17]. В этой связи влияние пресноводной адаптации, а также эффекты вводимого пролактина на сетчатку глаза описаны для самок и самцов по отдельности. Поскольку у самок, в отличие от самцов, экспрессия гена *Prl1* в ткани мозга росла как при острой (24 ч), так и при хронической (72 ч) адаптации к пресной воде, мы предполагаем больший вклад пролактина-1 в адаптацию организма самок, но не самцов к пресноводным условиям (рис. 1, а и 4, а). Таким образом, пролактиновая ось самок трёхиглой колюшки стимулировалась при пресноводной адаптации сходным с другими видами рыб образом при исследованиях без разделения по полу (зебрафиш *Danio rerio*, мозамбикская тилапия *Oreochromis mossambicus* и серебристый горбыль *Argyrosomus regius*) [30–32]. Одновременно с этим и у самок, и у самцов мы

наблюдали снижение экспрессии гена *Prl2* в мозге (рис. 1, б и 4, б). Следовательно, изменения экспрессии *Prl1* (повышение) и *Prl2* (снижение) в мозге самок трёхиглой колюшки были разнонаправленными в условиях как острой, так и хронической пресноводной адаптации, а в мозге самцов в этих условиях менялась только экспрессия *Prl2* (снижение).

Известно, что оценку чувствительности цветового зрения можно проводить, измеряя соотношения экспрессии генов различных опсинов [3, 4]. Для проверки гипотезы о пролактин-зависимом изменении чувствительности зрения в условиях пресноводной адаптации мы сравнили относительные уровни мРНК генов опсинов у самок и самцов трёхиглой колюшки в условиях острой и хронической пресноводной адаптации с введением им пролактина в условиях морской воды. Используемый овечий пролактин имитирует эффекты обоих пролактинов рыб, что было показано на тилапии *O. mossambicus*: оба пролактина тилапии, как и овечий пролактин, связывались пролактинчувствительными тканями [33].

Экспрессия гена *SWS1* у самок трёхиглой колюшки в условиях пресноводной адаптации не находится под контролем пролактина, в отличие от самцов. Различный ответ пролактинов (*Prl1* и *Prl2*) самок и самцов трёхиглой колюшки на острую и хроническую пресноводную адаптацию частично подтверждается отсутствием у самок и наличием у самцов пролактин-индуцированного ингибирования экспрессии гена *SWS1*, кодирующего коротковолновый опсин *SWS1*, чувствительный в ультрафиолетово-синей области спектра, в ткани сетчатки (рис. 2, б и 5, б). Что примечательно, в сетчатке глаза самок колюшек после острой адаптации к пресной воде экспрессия гена *SWS1* повышалась, но в группе хронической адаптации этот показатель был на уровне, сопоставимом с контрольной группой. Введение пролактина не оказывало влияния на экспрессию гена *SWS1* (рис. 2, а и б). Мы связываем подобный эффект с возможной регуляцией экспрессии опсина *SWS1* в сетчатке глаз самок колюшек со стороны кортизола, являющегося ключевым гормоном острой пресноводной адаптации у рыб [31]. В ряде работ на млекопитающих описано влияние кортизола на большинство структур глаза, включая сетчатку и фоторецепторные клетки [34]. Однако подобное предположение требует дальнейшего более детального изучения. В сетчатке глаза самцов острая пресноводная адаптация сопровождалась снижением экспрессии гена *SWS1*, в отличие от самок, у которых наблюдалось повышение его экспрессии (рис. 2, а и 5, а). Изменение экспрессии гена *SWS1* у самцов частично согласуется с литературными данными для общей популяции: по данным других исследователей экспрессия гена *SWS1* в ткани сетчатки была выше у резидентных морских колюшек в сравнении с резидентными пресноводными [8]. Одновременно с этим при хронической пресноводной адаптации экспрессия гена *SWS1* в сетчатке самцов колюшек не отличалась от таковой в контрольной группе. Поскольку эффект пресноводной адаптации на экспрессию данного гена наблюдается только в первые 24 ч, мы предполагаем его пролактиннезависимый характер в модели пресноводной адаптации и возможное влияние кортизола на экспрессию гена *SWS1* у самцов. Несмотря на отсутствие эффекта 72-часовой пресноводной адаптации на экспрессию гена *SWS1* в сетчатке глаза самцов колюшек, введение экзогенного пролактина в течение 72 ч приводило к её снижению (рис. 5, б). Подобный эффект может быть объяснён тем, что при переходе в пресную воду экспрессия генов *Prl1* и *Prl2* у самцов не повышалась, и, следовательно, в модели пресновод-

ной адаптации отсутствие эффектов, оказываемых на сетчатку пролактином, может быть объяснено отсутствием увеличения пролактиновой регуляции сетчатки (рис. 4, а и б). Таким образом, ген *SWS1*, кодирующий коротковолновый опсин *SWS1*, в сетчатке глаза регулируется пролактином у самцов, но не у самок трёхиглой колюшки.

Снижение экспрессии гена *SWS2* у самок и самцов трёхиглой колюшки в условиях пресноводной адаптации может индуцироваться пролактином. Экспрессия гена *SWS2*, кодирующего опсин, чувствительный в синей области спектра, в сетчатке глаза трёхиглой колюшки менялась схожим образом у самок и самцов как в модели пресноводной адаптации, так и после введения пролактина (рис. 2, в и г; 5, в и г). Как у самок, так и у самцов при острой и хронической пресноводной адаптации экспрессия гена *SWS2* в сетчатке глаза снижалась. Аналогичный эффект оказало введение пролактина в условиях морской воды. Таким образом, можно с высокой долей вероятности утверждать, что снижение чувствительности цветового зрения самок и самцов трёхиглой колюшки к синей области спектра в условиях пресноводной адаптации опосредовано пролактином. Также нельзя исключать возможный эффект кортизола, который также классически ассоциируют с пресноводной адаптацией рыб [31]. Однако данное предположение требует более подробного изучения.

Повышение экспрессии генов *RH2* и *LWS* у самок и самцов трёхиглой колюшки в условиях пресноводной адаптации не опосредовано пролактином. Экспрессия генов *RH2* и *LWS*, кодирующих длинноволновые опсины *RH2* и *LWS*, чувствительные в зелёной и красной областях спектра соответственно, в сетчатке глаз самок трёхиглой колюшки повышалась при острой и хронической пресноводной адаптации (рис. 3, а и в), что говорит в пользу повышения чувствительности цветового зрения к длинноволновому излучению. Однако, поскольку этот эффект не воспроизводился при введении пролактина в условиях морской воды (рис. 3, б и г), мы предполагаем пролактиннезависимый характер изменения экспрессии данных опсинов. Изменение экспрессии данных опсинов при пресноводной адаптации может быть результатом влияния эстрогенов, для которых ранее был показан стимулирующий эффект на экспрессию *RH2* и *LWS* в сетчатке обыкновенной гамбузии *Gambusia affinis* [11]. У самцов, в отличие от самок колюшек, экспрессия генов *RH2* и *LWS* в сетчатке глаз не менялась при адаптации к пресной воде, и, как и у

самок, не менялась в условиях морской воды после введения пролактина (рис. 6). С одной стороны, это доказывает пролактиннезависимый характер регуляции длинноволновых опсинов у самок и самцов трёхиглой колюшки, с другой — может подтверждать гипотезу о возможном положительном влиянии эстрогенов на эти опсины у самок, но оставляет открытым вопрос об опосредованном половыми гормонами, а не пролактином, изменении цветового зрения рыб в условиях пресноводной адаптации.

Таким образом, цветовое зрение у самок и самцов трёхиглой колюшки в условиях пресноводной адаптации меняется неодинаково. Для самок при хронической пресноводной адаптации показано пролактинзависимое снижение экспрессии гена *SWS2* и пролактиннезависимое повышение экспрессии генов *RH2* и *LWS*. Сочетанное повышение чувствительности зрения самок к длинноволновой области спектра и снижение чувствительности в коротковолновой способствуют лучшему распознаванию красного и зелёного цвета, что может иметь ключевое значение для распознавания полового партнёра во время нереста. Изменение цветового зрения самцов при пресноводной адаптации сопряжено с уменьшением чувствительности в коротковолновой части спектра, опосредованным пролактинзависимым снижением экспрессии ге-

на *SWS2*, в то время как экспрессия генов остальных опсинов не меняется. Тем не менее подобное изменение транскрипционной активности сетчатки самцов также может способствовать итоговому повышению чувствительности к длинноволновой части спектра.

Можно заключить, что адаптивные эффекты пролактина при пресноводных миграциях трёхиглой колюшки проявляются не только в регуляции водно-солевого обмена, но также цветового зрения, и они могут различаться у самок и самцов.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032300075-6 и при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-34-00734).

Благодарности. Авторы выражают благодарность Николаю Сергеевичу Мюге за плодотворное обсуждение данной работы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры были одобрены комиссией МГУ по биоэтике (№ протокола 98а; № собрания комиссии 108-о).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nathans, J. (1989) The genes for color vision, *Sci. Am.*, **260**, 42-49.
- Fernald, R. D. (1993) Vision, in *The Physiology of Fishes* (Evans, D. H., ed.) CRC Press Inc, USA, Florida, pp. 161-189.
- Carleton, K. L., and Kocher, T. D. (2001) Cone opsin genes of African cichlid fishes: tuning spectral sensitivity by differential gene expression, *Mol. Biol. Evol.*, **18**, 1540-1550.
- Parry, J. W., Carleton, K. L., Spady, T., Carboo, A., Hunt, D. M., et al. (2005) Mix and match color vision: Tuning spectral sensitivity by differential opsin gene expression in Lake Malawi cichlids, *Curr. Biol.*, **15**, 1734-1739.
- Cortesi, F., Mitchell, L. J., Tettamanti, V., Fogg, L. G., de Busserolles, F., et al. (2020) Visual system diversity in coral reef fishes, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **106**, 31-42.
- Terai, Y., Miyagi, R., Aibara, M., Mizoiri, S., Imai, H., et al. (2017) Visual adaptation in Lake Victoria cichlid fishes: Depth-related variation of color and scotopic opsins in species from sand/mud bottoms, *BMC Evol. Biol.*, **17**, 200.
- Fuller, R. C., Carleton, K. L., Fadool, J. M., Spady, T. C., and Travis, J. (2005) Genetic and environmental variation in the visual properties of bluefin killifish, *Lucania goodei*, *J. Evol. Biol.*, **18**, 516-523.
- Rennison, D. J., Owens, G. L., Heckman, N., Schluter, D., and Veen, T. (2016) Rapid adaptive evolution of colour vision in the threespine stickleback radiation, *Proc. Biol. Sci.*, **283**, 20160242.
- Butler, J. M., and Maruska, K. P. (2021) Opsin expression varies with Reproductive state in the cichlid fish *Astatotilapia burtoni*, *Integr. Comp. Biol.*, **61**, 240-248.
- Shao, Y. T., Wang, F. Y., Fu, W. C., Yan, H. Y., Anraku, K., et al. (2014) Androgens increase lws opsin expression and red sensitivity in male three-spined sticklebacks, *PLoS One*, **9**, e100330.
- Friesen, C. N., Ramsey, M. E., and Cummings, M. E. (2017) Differential sensitivity to estrogen-induced opsin expression in two poeciliid freshwater fish species, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **246**, 200-210.
- Yue, S., Wadia, V., Sekula, N., Dickinson, P. S., and Thompson, R. R. (2018) Acute effects of sex steroids on visual processing in male goldfish, *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.*, **204**, 17-29.
- Bell, M. A., and Foster, S. A. (1994) Introduction to the evolutionary biology of the threespine stickleback, *Evol. Biol. Threespine Stickleback*, **1**, 27.
- Rennison, D. J., Owens, G. L., and Taylor, J. S. (2012) Opsin gene duplication and divergence in ray-finned fish, *Mol. Phylogenet. Evol.*, **62**, 986-1008.
- Flamarique, I. N., Cheng, C. L., Bergstrom, C., and Reimchen, T. E. (2013) Pronounced heritable variation and limited phenotypic plasticity in visual pigments and opsin expression of threespine stickleback photoreceptors, *J. Exp. Biol.*, **216**, 656-667.
- Cortesi, F., Musilová, Z., Stieb, S. M., Hart, N. S., Siebeck, U. E., et al. (2015) Ancestral duplications and

- highly dynamic opsin gene evolution in percomorph fishes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 1493-1498.
17. Pavlova, N. S., Neretina, T. V., and Smirnova, O. V. (2020) Dynamics of prolactin axis genes in the brain of male and female three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* (Gasterostaidae) during short-term freshwater adaptation, *J. Ichthyol.*, **60**, 299-304.
 18. Clapp, C., Thebault, S., Macotela, Y., Moreno-Carranza, B., Triebel, J., et al. (2015) Regulation of blood vessels by prolactin and vasoinhibins, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **846**, 83-95.
 19. Thébault, S. (2017) Potential mechanisms behind the antioxidant actions of prolactin in the retina, *Exp. Eye Res.*, **160**, 56-61.
 20. Huang, X., Hui, M. N., Liu, Y., Yuen, D. S., Zhang, Y., et al. (2009) Discovery of a novel prolactin in non-mammalian vertebrates: evolutionary perspectives and its involvement in teleost retina development, *PLoS One*, **4**, e6163.
 21. Inokuchi, M., Breves, J. P., Moriyama, S., Watanabe, S., Kaneko, T., et al. (2015) Prolactin 177, prolactin 188, and extracellular osmolality independently regulate the gene expression of ion transport effectors in gill of Mozambique tilapia, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **309**, R1251-R1263.
 22. Bollinger, R. J., Ellis, L. V., Bossus, M. C., and Tipsmark, C. K. (2018) Prolactin controls Na⁺, Cl⁻ cotransporter via Stat5 pathway in the teleost gill, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **477**, 163-171.
 23. Franco-Belussi, L., De Oliveira, C., and Sköld, H. N. (2018) Regulation of eye and jaw colouration in three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*, *J. Fish Biol.*, **92**, 1788-1804.
 24. Pierce, A. L., Fox, B. K., Davis, L. K., Visitacion, N., Kitahashi, T., et al. (2007) Prolactin receptor, growth hormone receptor, and putative somatolactin receptor in Mozambique tilapia: tissue specific expression and differential regulation by salinity and fasting, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **154**, 31-40.
 25. Hibbeler, S., Scharsack, J. P., and Becker, S. (2008) Housekeeping genes for quantitative expression studies in the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*, *BMC Mol. Biol.*, **9**, 18.
 26. Dalton, B. E., Lu, J., Leips, J., Cronin, T. W., and Carleton, K. L. (2015) Variable light environments induce plastic spectral tuning by regional opsin coexpression in the African cichlid fish, *Metriaclima zebra*, *Mol. Ecol.*, **24**, 4193-4204.
 27. Manzon L. A. (2002) The role of prolactin in fish osmoregulation: A review, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **125**, 291-310.
 28. Lee, K. M., Kaneko, T., Katoh, F., and Aida, K. (2006) Prolactin gene expression and gill chloride cell activity in fugu *Takifugu rubripes* exposed to a hypoosmotic environment, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **149**, 285-293.
 29. Sakamoto, T., and McCormick, S. D. (2006) Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **147**, 24-30.
 30. Shu, Y., Lou, Q., Dai, Z., Dai, X., He, J., et al. (2016) The basal function of teleost prolactin as a key regulator on ion uptake identified with zebrafish knockout models, *Sci. Rep.*, **6**, 18597.
 31. Watanabe, S., Itoh, K., and Kaneko, T. (2016) Prolactin and cortisol mediate the maintenance of hyperosmoregulatory ionocytes in gills of Mozambique tilapia: exploring with an improved gill incubation system, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **232**, 151-159.
 32. Mohammed-Geba, K., González, A. A., Suárez, R. A., Galal-Khallaf, A., Martos-Sitcha, J. A., et al. (2017) Molecular performance of Prl and Gh/Igf1 axis in the Mediterranean meager, *Argyrosomus regius*, acclimated to different rearing salinities, *Fish Physiol. Biochem.*, **43**, 203-216.
 33. Dauder, S., Young, G., and Bern, H. A. (1990) Effect of hypophysectomy, replacement therapy with ovine prolactin, and cortisol and triiodothyronine treatment on prolactin receptors of the tilapia (*Oreochromis mossambicus*), *Gen. Comp. Endocrinol.*, **77**, 378-385.
 34. Sulaiman, R. S., Kadmiel, M., and Cidlowski, J. A. (2018) Glucocorticoid receptor signaling in the eye, *Steroids*, **133**, 60-66.

OPSINE GENES EXPRESSION IN EYE RETINA OF FEMALE AND MALE THREESPINED STICKLEBACKS *Gasterosteus aculeatus* L. DEPENDS ON FRESHWATER ADAPTATION AND PROLACTIN

N. S. Pavlova^{1*}, A. R. Gizatulina², T. V. Neretina³, and O. V. Smirnova¹

¹ Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: pav.nad.ser@gmail.com

² Department of Physiology and General Pathology, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

³ Pertsov White Sea Biological Station, Moscow State University, 186671 poselok Seaside, Loukhsky District, Republic Karelia, Russia

Color vision sensitivity is crucial for fish adaptation during migration and reproduction. Prolactin and prolactinlike hormone are important hormonal regulators in both these processes. We hypothesized that prolactin might influence color vision sensitivity during freshwater migrations in fish. We studied the effects of prolactin and freshwater adaptation during spawning period on opsin gene expression (*SWS1*, *SWS2*, *RH2*, *LWS*) in the retina of female and male threespined sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* L. Prolactin gene expression elevates in the brain of female, but not male, and prolactinlike hormone gene expression decreases in the brain of both male and female sticklebacks during freshwater adaptation. Opsin *SWS2* gene expression decreases in female and male retina during freshwater adaptation and after prolactin administration. In the retina of male sticklebacks opsin *SWS1* gene expression decreases after prolactin administration but not freshwater adaptation. Opsins *RH2* and *LWS* gene expression did not depend on prolactin administration in male and female sticklebacks. We conclude that some opsin genes retinal expression is regulated by prolactin in sticklebacks and could depend on sex and freshwater adaptation. This expands the knowledge of adaptive effects of prolactin on fish during freshwater migrations.

Keywords: prolactin, opsins, threespined stickleback *Gasterosteus aculeatus* L., freshwater adaptation, color vision adaptation, sex dependant effects