

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ПРОЛАКТИНА И ПРОЛАКТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ У ТРЁХИГЛОЙ КОЛЮШКИ *G. ACULEATUS L.*: ЗАВИСИМОСТЬ ОТ ПОЛА И ПРЕСНОВОДНОЙ АДАПТАЦИИ

© 2024 г. Н. С. Павлова^{1, *}, Т. В. Неретина², О. В. Смирнова¹

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных, Москва, Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия
Беломорская биологическая станция им. Н.А. Перцова, Карельская республика, Россия

*e-mail: pav.nad.ser@gmail.com

Поступила в редакцию 13.06.2024 г.

После доработки 08.09.2024 г.

Принята к публикации 10.09.2024 г.

Данная работа фокусируется на половых различиях экспрессии гена пролактина (*Pr1*) в мозге и его рецепторов (*Pr1Ra* и *Pr1Rb*) в осморегуляторных органах (мозге, почках, жабрах и кишечнике) самок и самцов трёхиглой колюшки (*Gasterosteus aculeatus L.*) в ходе пресноводной адаптации. Особи морской морфы колюшки были отловлены в нерестовый период и в течение 72 ч адаптированы к условиям пресной воды. После этого экспрессия генов интереса была оценена с использованием метода РТ-ПЦР. За счёт повышения экспрессии гена *Pr1* в мозге самок в условиях пресноводной адаптации проявлялись половые различия, отсутствовавшие в условиях морской воды. Экспрессия гена *Pr1Ra* в мозге была ниже у самок по сравнению с самцами в условиях морской воды, однако после перехода в пресную воду достоверно повышалась, и после пресноводной адаптации этот параметр был сопоставим у особей обоих полов. Экспрессия гена *Pr1Rb* в мозге самок достоверно повышалась в ходе пресноводной адаптации. В почках экспрессия гена *Pr1Ra* не различалась у самок и самцов в контрольной группе, и снижалась у особей обоих полов в ходе адаптации к пресной воде. Экспрессия гена *Pr1Rb* в почках не зависела от пола особей контрольной группы, а после адаптации к пресной воде достоверно повышалась у самок, но снижалась у самцов, таким образом приводя к появлению половых различий после пресноводной адаптации. В жабрах экспрессия генов *Pr1Ra* и *Pr1Rb* не зависела ни от пола особей, ни от солёности среды содержания. Экспрессия гена *Pr1Ra* в кишечнике не зависела ни от пола особей, ни от солёности среды. Экспрессия гена *Pr1Rb* в кишечнике не зависела от пола и после пресноводной адаптации снижалась у самок и самцов. Таким образом, зависимость осморегуляторной функции пролактина от пола колюшек проявляется в половых различиях экспрессии самого гена пролактина в мозге и в сенсibilизации мозга и осморегуляторных органов к нему в ходе пресноводной адаптации.

Ключевые слова: пролактин, пролактиновый рецептор, трёхиглая колюшка, водно-солевой обмен, пресноводная адаптация, зависимость от пола

DOI: 10.31857/S0044452924050101, EDN: XOTCML

ВВЕДЕНИЕ

Пролактин — пептидный гормон, имеющий плейотропное действие: описано более сотни различных физиологических функций пролактина у позвоночных, включая лактацию, осморегуляцию, рост, репродукцию и иммунную функцию [1, 2]. Классически считается, что основной функцией пролактина у низших позвоночных является регуляция водно-солевого обмена. Адаптация организма эвригалинных видов рыб, таких как мозамбикская тиляпия *Oreochromis mossambicus*, азиатский паралихт *Paralichthys olivaceus*, антарктическая рогатка *Harpagifer antarcticus*, к пресной воде сопряжена с изменением осмолярности плазмы крови и

стимуляцией пролактиновой оси, что выражается в увеличении экспрессии хотя бы одного из двух генов пролактина в мозге и повышением концентрации хотя бы одного из двух пролактинов в плазме крови [3, 4]. Это часто сопровождается изменением чувствительности к пролактину осморегуляторных органов рыб, в частности, почек, жабр и кишечника, что выражается в изменении экспрессии генов пролактиновых рецепторов. Финальным эффектом осморегуляторной функции пролактина является изменение транскрипционной активности генов ионных транспортеров, таких как NCC, NKCC1a, NHE3, CFTR, AQP3, AQP8, NKAα1a, NKAα1b [4, 5]. Примечательно, что в подобных работах выборку рыб не разделяют по полу.

Репродуктивная функция пролактина у рыб была открыта позже и изучена хуже. Однако известно, что пролактиновая ось (уровни мРНК гена пролактина) меняется при половом созревании рыб: она приобретает зависимость от пола, становясь менее активной у самок *Takifugu rubripes*, оставаясь без изменений у самцов [6].

Интенсивность пролактинового сигналинга и, как следствие, эффекта, зависит не только от уровня центральной секреции гормона, но и от плотности рецепторов на тканях и органах-мишенях. Различия в локальной экспрессии генов рецепторов лежат в основе тканеспецифичной регуляции со стороны гормона.

Трёхиглая колюшка *Gasterosteus aculeatus* L. является эвригалинной и имеет сложное репродуктивное и родительское поведение, таким образом, обладая и высокой осморегуляторной пластичностью, и ярко выраженными половыми различиями [7]. Разными авторами была показана ключевая роль пролактина в родительском поведении у самцов колюшек, которое выражается в аэрации гнёзд с икрой плавниками [8–10]. У колюшек (без разделения по полу) гипофизарная секреция пролактина снижается при адаптации к морской воде, а изменение размеров клубочков почки в ответ на введение пролактина различалось между колюшками морской формы, адаптированными и не адаптированными к пресной воде [11, 12]. Таким образом, известно участие пролактина как в осморегуляторной, так и в репродуктивной функции колюшек, однако комплексный эффект пролактина в контексте зависимости от пола пресноводной адаптации до сих пор остается неизученным.

Ранее в нашей группе была показана неодинаковая у самок и самцов суточная динамика экспрессии генов *Prl1*, *PrlRa* и *PrlRb* в ткани мозга при острой 24-часовой пресноводной адаптации, а также зависимость от пола и пресноводной адаптации экспрессия генов опсинов в сетчатке глаза [13, 14]. Целью данной работы стало изучение сенсibilизации мозга и осморегуляторных органов к действию пролактина в модели хронической, 72-часовой, адаптации особей к условиям пресной воды. Выбор более долгого временного интервала эксперимента обусловлен предположением о том, что в течение трёх суток организм колюшек адаптируется к новым условиям не только на уровне экспрессии пролактина, но и на уровне изменения чувствительности к нему осморегуляторных тканей.

Нами было выдвинуто предположение о том, что в ходе пресноводной адаптации самок и самцов трёхиглой колюшки изменение экспрессии гена пролактина в мозге и генов его рецепторов в мозге, почках, жабрах и кишечнике может зависеть от пола и определенный вклад в это может вносить сам пролактин. Наша работа поможет оценить вза-

имосвязи механизмов пролактиновой регуляции водно-солевого обмена и репродуктивной системы. Таким образом, целью данного исследования стала оценка изменения экспрессии генов пролактина в мозге и генов пролактиновых рецепторов в мозге, жабрах, почках и кишечнике самок и самцов трёхиглой колюшки в модели пресноводной адаптации.

Поскольку у самок и самцов трёхиглой колюшки различается половое и родительское поведение, а у самцов в почках также при нересте синтезируется белок спиггин, необходимый для строительства гнезда, мы предполагаем зависимость функции этих органов от пола. Жабры и кишечник – ключевые органы осморегуляции рыб, контактирующие не только с внутренней средой организма, но и с внешней, следовательно, мы предполагаем большую независимость этих органов от факторов внутренней среды, включая эндокринные, и большую чувствительность к факторам внешней среды, таким как ее осмолярность.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная модель. Особи морской морфы *G. aculeatus* L. были отловлены в Кандалакшском заливе Белого моря в июне 2021 г. в период нереста. Длина тела самок 7 ± 0.3 см, самцов – 6.6 ± 0.4 см. Далее особей разделили по полу, разбили на контрольную и опытную группы и в течение суток адаптировали к условиям содержания (аквариумы объёмом 20 л., световой и температурный режим, соответствующие естественным условиям). Затем в течение трёх суток особи контрольной группы содержались в условиях морской воды (“Control”), а особи экспериментальной группы – в условиях пресной воды (“72h FA”). $n = 10$ для каждой группы. По завершении эксперимента у особей хирургическим путём извлекали ткань мозга, включая гипофиз (для контроля экспрессии гена пролактина), почки, жабры (жаберные лепестки), а также кишечник; образцы фиксировали в IntactRNA (“Евроген”, Россия). Также определяли морфометрические показатели: гепатосоматический (относительная масса печени) и реносоматический (относительная масса почек) индексы. Относительные уровни экспрессии генов интереса в тканях проводили с использованием методики, описанной в наших предыдущих исследованиях [13, 14]. Последовательности праймеров к генам интереса и референсным генам приведены в таблице 1.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ данных проводили в программе GraphPad Prism 9 с использованием двухфакторного дисперсионного анализа two-way ANOVA с поправкой Шидака. В качестве исследуемых факторов были выбраны пол и наличие или отсутствие пресноводной адаптации. На графиках для каждой груп-

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности прямого и обратного праймеров к генам интереса и референсным генам, а также длина ПЦР-продукта.

Ген	Нуклеотидная последовательность прямого (for) и обратного (rev) праймеров, 5'–3'	Длина ПЦР-продукта, п.н.
<i>Pr1</i>	for – ACCTGGACTCGCATTTGCCTCTC rev – AAGGTCCGACTCTGGTACTTGAAG	125
<i>Pr2</i>	for – TCCAATAAAGCCCTAGAGATGAG rev – AGGCTGCTGACGGTGTGCTTAT	113
<i>Pr1Ra</i>	for – CGGCGATCTGGGTCAACTAC rev – GGAGGATTAGGCTGAACGATGT	112
<i>Pr1Rb</i>	for – CGACGACAGCCCTCTACTT rev – GACGTGTACTCTGCCCACTT	132
<i>Rpl13a</i>	for – CACCTTGGTCAACTTGAACAGTG rev – TCCCTCCGCCCTACGAC	178
<i>Ubc</i>	for – AGACGGGCATAGCACTTGC rev – CAGGACAAGGAAGGCATCC	180

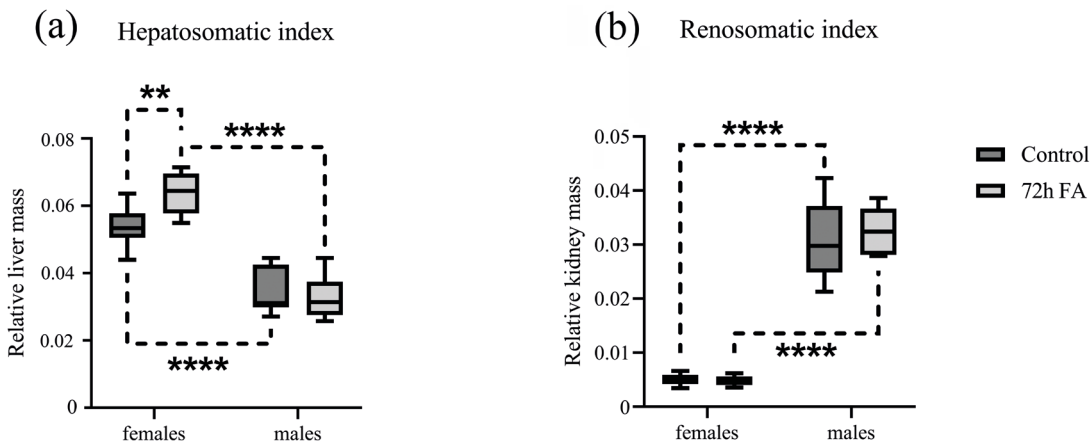


Рис. 1. Изменение гепатосоматического (a) и реносоматического (b) индексов в группах самок и самцов колюшек в зависимости от пола и адаптации к пресной воде. По оси Y: относительная масса печени (a) и почек (b). По оси X: группы самок (“females”) и самцов (“males”) трёхиглой колюшки в условиях морской воды (“control”, тёмно-серые ящики) и после 72-часовой пресноводной адаптации (“72h FA”, светло-серые ящики). Количество в каждой группе: $n = 10$. Пунктирная линия указывает группы, между которыми обнаружены статистически значимые различия (** – $p < 0.01$; **** – $p < 0.0001$, two-way ANOVA).

пы данные представлены в виде медианы, нижней и верхней квартили, а также минимального и максимального значений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние 72-часовой пресноводной адаптации на морфометрические показатели

Гепатосоматический индекс у самок был выше, чем у самцов за счет продукции их печенью вителлогенина и дополнительно повышался при переходе в пресную воду (рис. 1a), а у самцов остался без изменений. Реносоматический индекс ни у самок, ни у самцов не зависел от условий солёности среды (рис. 1b) и был существенно выше у самцов за счет продукции почками спигтина, необходимого для постройки гнезда.

Влияние 72-часовой пресноводной адаптации и пола на экспрессию генов пролактинов *Pr1*, *Pr2* и генов пролактиновых рецепторов *Pr1Ra*, *Pr1Rb* в ткани мозга колюшек

Достоверных различий в экспрессия гена пролактина *Pr1* в мозге самок и самцов контрольной группы обнаружено не было. После 72-часовой пресноводной адаптации выявлено достоверное повышение экспрессии гена *Pr1* в мозге самок по сравнению с контролем ($p = 0.03$, рис. 2a), при отсутствии изменений данного показателя в этих условиях у самцов. В результате при пресноводной адаптации стали выявляться половые различия уровня экспрессии данного гена: у самое она была выше, чем у самцов ($p = 0.002$, рис. 2a).

Уровни экспрессии мРНК гена *Pr2* в ткани мозга самок и самцов в условиях морской воды, а также

после 72-часовой пресноводной адаптации были обнаружены на разрешающей границе метода ПЦР в реальном времени ($C_q > 32$).

В мозге самцов экспрессия гена *PrIRa* в условиях морской воды была выше, чем у самок ($p = 0.003$, рис. 2b). В ткани мозга самок после 72-часовой пресноводной адаптации экспрессия гена *PrIRa* росла по сравнению с контрольной группой ($p = 0.01$, рис. 2b). В группе самцов после пресноводной адаптации не было обнаружено достоверных различий экспрессии гена *PrIRa* по сравнению с контрольной группой. За счет этого половые различия экспрессии гена пролактинового рецептора а *PrIRa* в пресной воде перестали выявляться ($p > 0.1$).

Экспрессия гена *PrIRb* в ткани мозга наблюдалась на сопоставимом уровне при сравнении самок и самцов в условиях морской воды и после пресноводной адаптации. По сравнению с контрольной группой в ткани мозга самок после 72-часовой пресноводной адаптации экспрессия гена *PrIRb* была на достоверно более высоком уровне ($p = 0.04$, рис. 2c), не достигая достоверных различий с данным показателем у самцов в этих условиях.

Влияние 72-часовой пресноводной адаптации и пола на экспрессию генов пролактиновых рецепторов PrIRa и PrIRb в ткани почек колюшек

Уровни экспрессии гена пролактинового рецептора а *PrIRa* в ткани почек в условиях морской воды достоверно различались между группами самок и самцов с преобладанием у самок ($p < 0.0001$, рис. 3a). После 72-часовой пресноводной адаптации в ткани почек наблюдались сопоставимые статистически значимые половые различия экспрессии уровня мРНК гена *PrIRa* ($p = 0.0001$, рис. 3a). Как у самцов, так и у самок, группы после 72-часовой пресноводной адаптации имели сопоставимые уровни экспрессии гена *PrIRa* по сравнению с контрольными группами (рис. 3a).

Уровни экспрессии гена пролактинового рецептора б *PrIRb* в ткани почек в условиях морской воды не различались достоверно между группами самок и самцов. После 72-часовой пресноводной адаптации экспрессия гена *PrIRb* в ткани почек наблюдалась на более высоком уровне в группе самок по сравнению с группой самцов ($p < 0.0001$, рис. 3b). Это происходило за счет того, что в ткани почек самок после 72-часовой пресноводной адаптации, наблюдались статистически значимо более высокие уровни мРНК гена *PrIRb* по сравнению с контрольной группой ($p = 0.03$, рис. 3b), а в ткани почек самцов после 72-часовой пресноводной адаптации наблюдались статистически более низкие уровни мРНК гена *PrIRb* по сравнению с контрольной группой ($p < 0.0001$, рис. 3b).

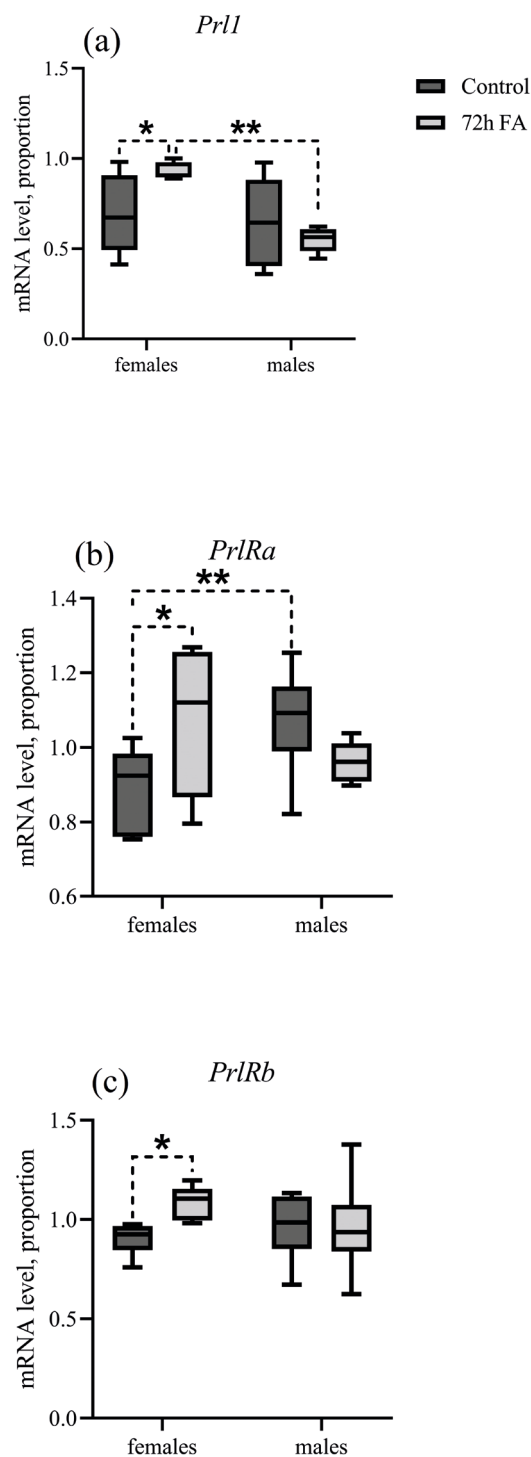


Рис. 2. Экспрессия генов *PrlI*, *PrIRa* и *PrIRb* в ткани мозга самок и самцов колюшек в зависимости от пола и адаптации к пресной воде. По оси Y: относительные уровни мРНК генов пролактина *PrlI* (a) и пролактиновых рецепторов *PrIRa* (b) и *PrIRb* (c) в ткани мозга. По оси X: группы самок ("females") и самцов ("males") трёхглай колюшки в условиях морской воды ("control", тёмно-серые ящики) и после 72-часовой пресноводной адаптации ("72h FA", светло-серые ящики). Количество в каждой группе: $n = 10$. Пунктирная линия указывает группы, между которыми обнаружены статистически значимые различия (* — $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$, two-way ANOVA).

*Влияние 72-часовой пресноводной адаптации и пола на экспрессию генов пролактиновых рецепторов *PrlRa* и *PrlRb* в ткани жабр колюшек*

Достоверные различия в экспрессии генов пролактиновых рецепторов *PrlRa* и *PrlRb* в ткани жабр между группами самок и самцов колюшек не были обнаружены ни в условиях морской, ни в условиях пресной воды (рис. 4а, 4б).

Также ни для группы самок, ни для группы самцов не были обнаружены значимые различия в экспрессии генов пролактиновых рецепторов *PrlRa* и *PrlRb* после 72-часовой пресноводной адаптации в сравнении с условиями морской воды (рис. 4а, 3б).

*Влияние 72-часовой пресноводной адаптации и пола на экспрессию генов пролактиновых рецепторов *PrlRa* и *PrlRb* в ткани кишечника колюшек*

Уровни экспрессии гена пролактинового рецептора а *PrlRa* в ткани кишечника не различались достоверно между группами самок и самцов ни в условиях морской воды, ни после пресноводной адаптации. Также ни в группе самок, ни в группе самцов не было выявлено достоверных изменений относительных количеств мРНК гена *PrlRa* при сравнении контрольной и опытной группы (рис. 5а).

Относительные количества мРНК гена *PrlRb* в ткани кишечника не различались между группами

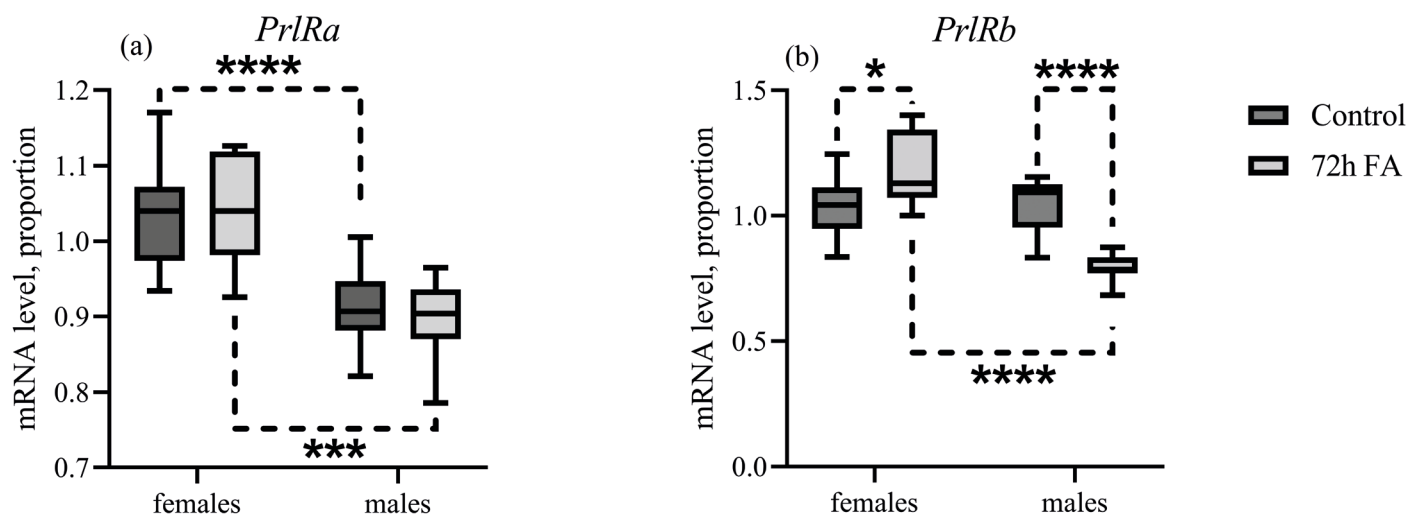


Рис. 3. Экспрессия генов *PrlRa* и *PrlRb* в ткани почек самок и самцов колюшек в зависимости от пола и адаптации к пресной воде. По оси Y: относительные уровни мРНК генов пролактиновых рецепторов *PrlRa* (а) и *PrlRb* (б) в ткани почек. По оси X: группы самок ("females") и самцов ("males") трёхиглой колюшки в условиях морской воды ("control", тёмно-серые ящики) и после 72-часовой пресноводной адаптации ("72h FA", светло-серые ящики). Количество в каждой группе: $n = 10$. Пунктирная линия указывает группы, между которыми обнаружены статистически значимые различия (* – $p < 0.05$; *** – $p < 0.001$, **** – $p < 0.0001$, two-way ANOVA).

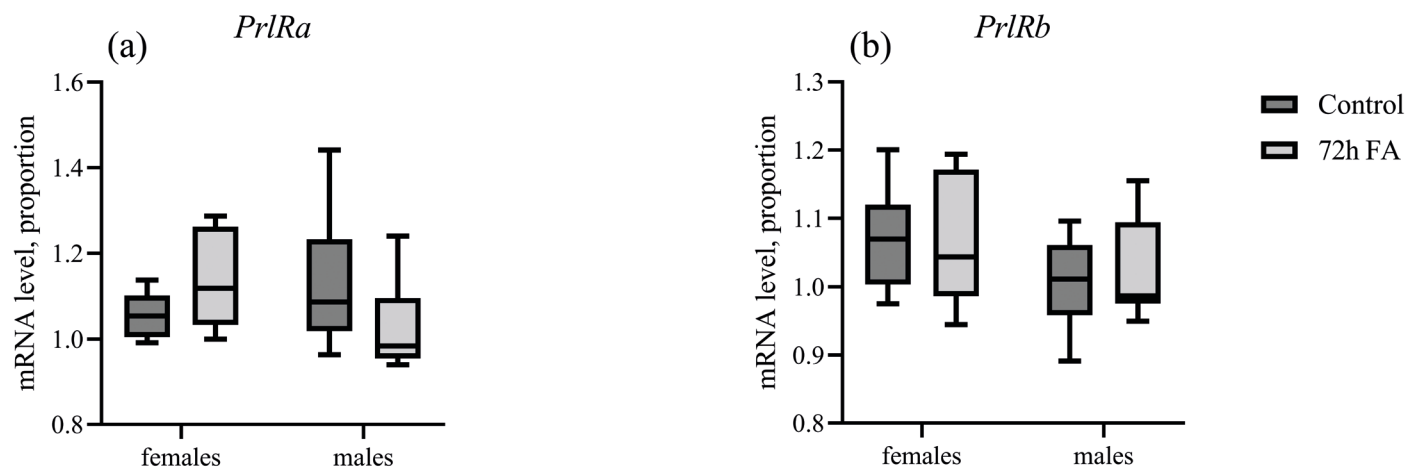


Рис. 4. Экспрессия генов *PrlRa* и *PrlRb* в ткани жабр самок и самцов колюшек в зависимости от пола и адаптации к пресной воде. По оси Y: относительные уровни мРНК генов пролактиновых рецепторов *PrlRa* (а) и *PrlRb* (б) в ткани жабр. По оси X: группы самок ("females") и самцов ("males") трёхиглой колюшки в условиях морской воды ("control", тёмно-серые ящики) и после 72-часовой пресноводной адаптации ("72h FA", светло-серые ящики). Количество в каждой группе: $n = 10$.

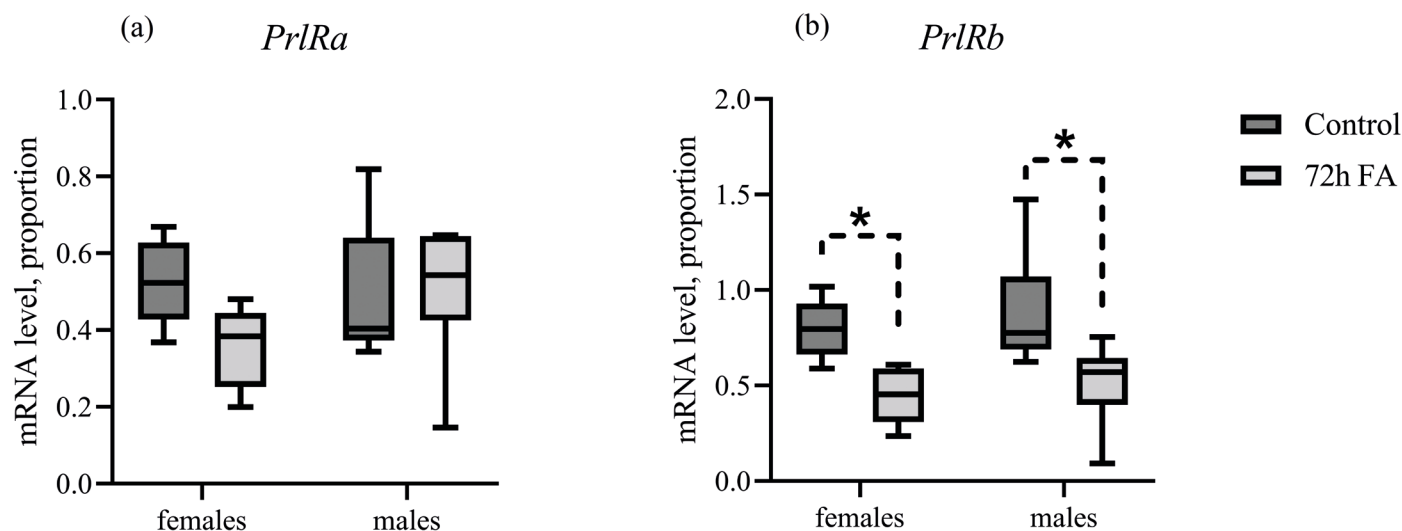


Рис. 5. Экспрессия генов *PrlRa* и *PrlRb* в ткани кишечника самок и самцов колюшек в зависимости от пола и адаптации к пресной воде. По оси Y: относительные уровни мРНК генов пролактиновых рецепторов *PrlRa* (a) и *PrlRb* (b) в ткани кишечника. По оси X: группы самок (“females”) и самцов (“males”) трёхиглой колюшки в условиях морской воды (“control”, тёмно-серые ящики) и после 72-часовой пресноводной адаптации (“72h FA”, светло-серые ящики). Количество в каждой группе: $n = 10$. Пунктирная линия указывает группы, между которыми обнаружены статистически значимые различия (* — $p < 0.05$, two-way ANOVA).

самок и самцов ни в условиях морской воды, ни после пресноводной адаптации. Тем не менее, и у самок, и у самцов наблюдались достоверные различия в экспрессии гена *PrlRb* в кишечнике при сравнении контрольной и опытной групп ($p = 0.022$ для самок, $p = 0.017$ для самцов, рис. 5b).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Влияние пресноводной адаптации на экспрессию гена Prl1 в мозге и PrlRa и PrlRb в мозге, жабрах, почках и кишечнике самок и самцов трёхиглой колюшки

В результате пресноводной адаптации достоверно увеличилась экспрессия гена *Prl1* в мозге самок, но не самцов трёхиглой колюшки (рис. 2a). Эти результаты согласуются с результатами предыдущих наших исследований, посвящённых половым различиям пролактиновой оси трёхиглой колюшки [13, 14]. Для ряда других видов рыб (*Argyrosomus regius*, *Danio rerio*, *Oreochromis mossambicus*, *Scophthalmus maximus*, *Paralichthys olivaceus*) также характерна стимуляция экспрессии гена пролактина в условиях пресноводной адаптации, однако стоит учитывать, что данные исследования были выполнены для общих выборок, включающих в себя особей обоих полов без разделения [3, 4, 15–18]. Таким образом, экспрессия гена *Prl1* у самок колюшек, как и у других эвригалинных видов рыб, положительно

зависит от гипоосмолярности внутренней среды, которая, судя по литературным данным, может напрямую влиять на экспрессионную и секреторную активность лактотрофов гипофиза [19].

Сонаправленно под действием 72-часовой пресноводной адаптации в ткани мозга самок колюшек изменяется и экспрессия генов обоих пролактиновых рецепторов (рис. 2b, 2c). На основании этих результатов можно предположить участие пролактина в регуляции транскрипции генов *PrlRa* и *PrlRb* в мозге самок трёхиглой колюшки, либо возможную сонаправленную регуляцию генов *Prl1*, *PrlRa* и *PrlRb* в ткани мозга. Известно, что у млекопитающих экспрессия пролактиновых рецепторов положительно зависит в том числе от самого пролактина [20]. В сравнении, у мозамбикской тилапии *Oreochromis mossambicus* в условиях пресной воды экспрессия гена *PrlR2* в гипофизе ниже, чем в условиях морской воды, а экспрессия гена *PrlR1* не зависит от солёности воды [4, 21]. Следовательно, односторонняя регуляция экспрессии генов пролактина и его рецепторов в мозге может зависеть не только от пола особи, но и от вида рыб, и может быть связана с видоспецифическими особенностями репродукции.

В ткани почек колюшек от солёности среды зависела экспрессия гена *PrlRb*, достоверно повышаясь у самок, но снижаясь у самцов под влиянием пресноводной адаптации (рис. 3b). Противоположный эффект у особей разного пола может быть связан

с эффектом половых стероидов. Так, для человека была показана положительная регуляция экспрессии гена пролактинового рецептора со стороны эстрадиола [20, 22, 23]. Переход в гипоосмолярную среду сопровождается выбросом кортизола и сравним с кратковременной стрессовой реакцией, следовательно, логично предположить необходимость устанавливать заново иерархию среди особей мужского пола. Это может быть сопряжено с усилением андрогенных эффектов у самцов, классически антагонистичных эстрогенным эффектам.

В ткани жабр экспрессия обоих генов пролактиновых рецепторов достоверно не изменилась под влиянием пресноводной адаптации ни у самок, ни у самцов (рис. 4а, 4б). Схожие результаты были получены в эксперименте по изучению механизмов активной и пассивной адаптации к пресной воде на смешанной по полу выборке азиатского паралихты *Paralichthys olivaceus*. Вне зависимости от поведенческого типа адаптации, экспрессия рецептора пролактина в ткани жабр *P. olivaceus* достоверно не менялась [24]. В жабрах тилапии *Oreochromis mossambicus* экспрессия гена пролактинового рецептора *PrlR1* наблюдалась на более высоком уровне у особей, содержащихся в условиях пресной воды по сравнению с морским контролем, в то время как экспрессия гена *PrlR2* достоверно не различалась между особями обеих групп [4]. В другом исследовании было показано, что при адаптации и *O. mossambicus*, и *O. niloticus* к морской воде, уже в первые сутки у особей обоих видов экспрессия гена второго пролактинового рецептора достоверно снижается [25]. Подобные видовые различия могут быть связаны с тем, что тилапии обычно обитают в среде с динамично меняющейся солёностью, и чувствительность их жабр к пролактину, а также экспрессия ионных транспортёров обладают большей пластичностью [26]. В жабрах *Scophthalmus maximus*, *Paralichthys olivaceus* и *Acanthopagrus schlegelii* в условиях пресноводной адаптации экспрессия гена единственного известного для этих видов пролактинового рецептора *PrlR* также повышалась [3, 18, 27]. Тем не менее, учитывая достоверное повышение экспрессии гена пролактина *Prl1* в мозге у самок трёхиглой колюшки, мы предполагаем больший вклад пролактина в регуляцию ткани жабр самок в условиях пресной воды, несмотря на отсутствие изменения содержания в ткани мРНК *PrlRa* и *PrlRb* при адаптации к пресной воде.

В ткани кишечника экспрессия гена *PrlRb* достоверно снизилась как у самок, так и у самцов (рис. 5б). Похожие данные были получены на мозамбикской тилапии, в кишечнике которой при адаптации к морской воде достоверно растёт экс-

прессия гена *PrlR2*. Следовательно, у мозамбикской тилапии в условиях пресной воды экспрессия *PrlR2* в кишечнике ниже [28, 29]. Один из эффектов пролактина в кишечнике рыб — уменьшение захвата Na^+ , поэтому снижение экспрессии гена *PrlRb* в ходе пресноводной адаптации может рассматриваться как компенсаторный механизм для повышения захвата ионов Na^+ из просвета кишечника [30].

Интересно отметить, что экспрессия гена *PrlRa* в жабрах, почках и кишечнике не изменилась достоверно в ходе 72-часовой пресноводной адаптации ни у самок, ни у самцов (рис. 3а, 4а, 5а). Это позволяет выдвинуть предположение о том, что пролактиновый рецептор b, но не a, является ключевым в регуляции водно-солевого баланса.

Различия, связанные с полом особей трёхиглой колюшки, в условиях морской воды и пресноводной адаптации

В условиях морской воды различия, связанные с полом особей, наблюдались в экспрессии гена *PrlRa* в мозге и почках (рис. 2б, 3а). И мозг, и почки принимают участие в репродукции у колюшек: мозг по причине наличия у колюшек сложного репродуктивного и родительского поведения, а в почках у самцов под влиянием андрогенов синтезируется белок спиггин, который они используют для построения гнёзд. Реносоматический индекс самцов (рис. 1б) при пресноводной адаптации остался столь же высоким, как и в условиях морской воды, поскольку самцы так же остались на этапе установления иерархии. Возможно, репродуктивная функция пролактина реализуется преимущественно через пролактиновый рецептор a, однако данное предположение требует дополнительных доказательств. Так, по данным литературы, пролактин стимулирует экспрессию гена *Egr-1* в гипоталамусе крыс, в то время как этот ген повышается в мозге самцов колюшек в период заботы о потомстве [31, 32].

После пресноводной адаптации различия, связанные с полом особей, наблюдались в экспрессии гена *Prl1* в мозге, что подтверждает его ключевую роль для организма самок (рис. 2а). Более того, гепатосоматический индекс самок после перехода в пресную воду достоверно повысился (рис. 1а). Гепатосоматический индекс отражает продукцию печенью зависимо от эстрогенов белка вителлогенина, являющимся основным компонента желтка. Резонно предположить, что эстрогены могут стимулировать продукцию вителлогенина не только прямо, но через пролактин, являясь основными стимуляторами его продукции. Экспрессия гена

Prl1 в мозге самок при пресноводной адаптации соответствует классическим представлениям о пролактине рыб как гормоне пресноводной адаптации, в то время как у самцов она может находиться под влиянием более сложных и многокомпонентных регуляторных систем [33]. Сохранились различия в экспрессии гена *PrlRa* в почке с преобладанием у самок по сравнению с самцами (рис. 3а). Мы предполагаем, что транскрипция гена *PrlRa* в ткани почек регулируется преимущественно половыми гормонами, включая половые стероиды, и в меньшей степени зависит непосредственно от пролактина и условий солёности воды. Экспрессия гена *PrlRb* в почках, которая в условиях морской воды у самок и самцов наблюдалась на сопоставимом уровне, после пресноводной адаптации была достоверно выше у самок (рис. 3б). Известно, что в условиях пресноводной адаптации в почках *Scophthalmus maximus*, *Paralichthys olivaceus* и *Acanthopagrus schlegelii* экспрессия гена единственного известного для этих видов рыб пролактинового рецептора *PrlR* достоверно повышалась по сравнению с контролем [3, 18, 27]. Таким образом, эффект адаптации к условиям пресной воды, оказываемый на экспрессию гена пролактинового рецептора *b* в почках самок колюшек согласуется с литературными данными, полученными на других видах рыб без разделения выборки по полу.

Наличие половых различий в экспрессии гена пролактина в пресной воде, предположительно, связано с эффектом половых стероидов, в первую очередь, эстрадиола. Эстрогены стимулируют секрецию пролактина не только у млекопитающих, но также у рыб как *in vitro*, так и *in vivo* на примере *Oreochromis mossambicus* и *Clarias batrachus* [20, 34, 35]. На *O. niloticus* было показано, что экспрессия гена пролактинового рецептора 2 *PrlR2* в ткани яичников положительно регулируется эстрадиолом [36]. Эффекты андрогенов и пролактина в репродуктивном периоде рыб противопоставляются: андрогены принимают участие в опосредовании фазы конкуренции между самцами и ухаживания за самками, а пролактин — последующую заботу о потомстве у таких видов, как *Lepomis macrochirus* и *Gasterosteus aculeatus* [10, 37]. Следовательно, условия пресной воды и стимуляция пролактиновой оси у самок при пресноводной адаптации могут вовлекать гонадотропную ось в потенцирование эффекта пролактина, оказываемого на почки, в то время как у самцов вклад пролактина в регуляцию этого органа снижается. В результате данной работы можно выдвинуть предположение о наличии регуляции эстрогенами экспрессии не только гена пролактина, но и генов пролактиновых рецепторов в мозге и почке.

Интересно отметить, что различия, связанные с полом, наблюдаются только в мозге и почках трёхколюшки. Мозг и почки являются органами, зависящими от внутренних факторов, и их чувствительность к пролактину в условиях адаптации к пресной воде уже проявляет зависимость от пола. Более того, оба органа непосредственно участвуют в репродукции колюшек либо в плане поведения (мозг), либо в плане продукции ползависимых белков (синтез спиггина в почках самцов). Различная чувствительность мозга и почек к пролактину у особей разного пола способствует соответствующим репродуктивным функциям.

Наоборот, несмотря на различную степень активации пролактиновой оси со стороны центральной секреции у самок и самцов колюшек, чувствительность жабр и кишечника к пролактину не зависит от пола. Поскольку и жабры, и кишечник контактируют не только с внутренней, но и с внешней средой, их ответ может во многом определяться влияниями со стороны внешней среды. Опосредованные пресноводной адаптацией влияния пролактиновой оси со стороны внутренней среды могут вносить минорную роль. Тем не менее, поскольку у самок экспрессия гена *Prl1* достоверно выше, чем у самцов, после пресноводной адаптации, даже при одинаковой чувствительности жабр и кишечника, у самок и самцов итоговый эффект может различаться. Таким образом, пролактин может способствовать пресноводной адаптации в соответствии с полом особей.

Различия в ответе элементов пролактиновой оси самок и самцов в условиях пресноводной адаптации могут быть обусловлены принципиально разными репродуктивными стратегиями самок и самцов колюшек. В то время как репродуктивная стратегия самок сводится исключительно к выбору наиболее подходящего партнёра и нересту, половое поведение самцов включает в себя фазы, требующие различных поведенческих реакций, и предполагает поочерёдную смену конкурентного, полового и родительского поведения. Таким образом, в работе установлена зависимость осморегуляторной функции пролактина от пола рыб, по-разному проявляющаяся в условиях разной солёности.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках научного проекта государственного задания Московского государственного университета № 121032300075-6 и при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-34-00734). В работе использовано оборудование, предоставленное федеральным проектом

“Развитие инфраструктуры для науки и образования” (Соглашение №161).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>). Протоколы с использованием животных были одобрены комиссией МГУ по биоэтике; № протокола 98а; № собрания комиссии 108-о. (Animal-related experiments were conducted in accordance with the NIH Guidelines for the care and use of laboratory animals (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>). Animal protocols were approved by the MSU Bioethics Commission, protocol number 98а; № of Commission 108-о).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Авторы П.Н.С., С.О.В, Н.Т.В.), сбор данных (П.Н.С.), обработка данных (П.Н.С.), написание и редактирование манускрипта (П.Н.С., С.О.В, Н.Т.В.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Grattan DR, Kokay IC* (2008) Prolactin: a pleiotropic neuroendocrine hormone. *J Neuroendocrinol* 20: 752–763. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01736.x>
2. *Bernard V, Young J, Binart N* (2019) Prolactin – a pleiotropic factor in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 15: 356–365. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0194-6>
3. *Yuan M, Jia Q, Wang T, Lu Q, Tang L, Wang Y, Lu W* (2017) Dynamic responses of prolactin, growth hormone and their receptors to hypotonic acclimation in the olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Gen Comp Endocrinol* 254: 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.09.005>
4. *Moorman BP, Inokuchi M, Yamaguchi Y, Lerner DT, Grau EG, Seale AP* (2014) The osmoregulatory effects of rearing Mozambique tilapia in a tidally changing salinity. *Gen Comp Endocrinol* 207: 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.03.013>
5. *Vargas-Chacoff L, Dann F, Paschke K, Oyarzún-Salazar R, Nualart D, Martínez D, Wilson JM, Guerreiro PM, Navarro JM* (2021) Freshening effect on the osmotic response of the Antarctic spiny plunderfish *Harpagifer antarcticus*. *J Fish Biol* 98: 1558–1571. <https://doi.org/10.1111/jfb.14676>
6. *Zahangir MM, Matsubara H, Ogiso S, Suzuki N, Ueda H, Ando H* (2021) Expression dynamics of the genes for the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in tiger puffer (*Takifugu rubripes*) at different reproductive stages. *Gen Comp Endocrinol* 301: 113660. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113660>
7. *Wootton RJ* (1984) A functional biology of sticklebacks. Univ of California Press
8. *Slijkhuis H, de Ruiter AJ, Baggerman B, Wendelaar Bonga SE* (1984) Parental fanning behavior and prolactin cell activity in the male three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. *Gen Comp Endocrinol* 54: 297–307. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(84\)90184-9](https://doi.org/10.1016/0016-6480(84)90184-9)
9. *de Ruiter AJ, Wendelaar Bonga SE, Slijkhuis H, Baggerman B* (1986) The effect of prolactin on fanning behavior in the male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. *Gen Comp Endocrinol* 64: 273–283. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(86\)90014-6](https://doi.org/10.1016/0016-6480(86)90014-6)
10. *Páll MK, Mayer I, Borg B* (2002) Androgen and behavior in the male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. II. Castration and 11-ketoandrostenedione effects on courtship and parental care during the nesting cycle. *Horm Behav* 42: 337–344. <https://doi.org/10.1006/hbeh.2002.1820>
11. *Lam TJ, Leatherland JF* (1969) Effects of prolactin on the glomerulus of the marine threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L., from trachurus, after transfer from seawater to fresh water, during the late autumn and early winter. *Can J Zool* 47: 245–250.
12. *Benjamin M* (1980) The Response of Prolactin, ACTH, and Growth Hormone Cells in the Pituitary Gland of the Three-Spined Stickleback: *Gasterosteus aculeatus* L. form leiurus, to Increased Environmental Salinities. *Acta Zool* 61: 1–7.
13. *Pavlova NS, Gizatulina AR, Neretina TV, Smirnova OV* (2022) Expression of Opsin Genes in the Retina of Female and Male Three-Spined Sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* L.: Effect of Freshwater Adaptation and Prolactin Administration. *Biochem* 87: 215–224.
14. *Pavlova NS, Neretina TV, Smirnova OV* (2020) Dynamics of prolactin axis genes in the brain of male and female three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* (*Gasterostidae*) during short-term freshwater adaptation. *J Ichthyol* 60: 299–304.
15. *Mohammed-Geba K, González AA, Suárez RA, Galal-Khalaf A, Martos-Sitcha JA, Ibrahim HM, Martínez-Rodríguez G, Mancera JM* (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.
16. *Shu Y, Lou Q, Dai Z, Dai X, He J, Hu W, Yin Z* (2016) The basal function of teleost prolactin as a key regulator on ion uptake identified with zebrafish knockout models. *Sci Rep* 6: 1–12.
17. *Watanabe S, Itoh K, 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.
18. *Liu Z, Ma A, Zhang J, Yang S, Cui W, Xia D, Qu J* (2020) Cloning and molecular characterization of PRL and PRLR from turbot (*Scophthalmus maximus*) and their expressions in response to short-term and long-term low salt stress. *Fish Physiol Biochem* 46: 501–517. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00699-2>
 19. *Dobolyi A, Oláh S, Keller D, Kumari R, Fazekas EA, Csikós V, Renner É, Cservenák M* (2020) Secretion and Function of Pituitary Prolactin in Evolutionary Perspective. *Front Neurosci* 14: 621. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2020.00621>
 20. *Kavarthapu R, Dufau ML* (2022) Prolactin receptor gene transcriptional control, regulatory modalities relevant to breast cancer resistance and invasiveness. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13: 949396.
 21. *Hewage TMG, Woo DW, Celino-Brady FT, Seale AP* (2023) Temperature modulates the osmosensitivity of tilapia prolactin cells. *Sci Rep* 13: 20217. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-47044-5>
 22. *Leondires MP, Hu ZZ, Dong J, Tsai-Morris CH, Dufau ML* (2002) Estradiol stimulates expression of two human prolactin receptor isoforms with alternative exons-1 in T47D breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 82: 263–268. [https://doi.org/10.1016/s0960-0760\(02\)00184-x](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(02)00184-x)
 23. *Banks CM, Trott JF, Hovey RC* (2024) The prolactin receptor: A cross-species comparison of gene structure, transcriptional regulation, tissue-specificity, and genetic variation. *J Neuroendocrinol* e13385.
 24. *Zeng J, Li J, Yang K, Yan J, Xu T, Lu W* (2022) Differential branchial response of low salinity challenge induced prolactin in active and passive coping style olive flounder. *Front Physiol* 13: 913233.
 25. *Yamaguchi Y, Breves JP, Haws MC, Lerner DT, Grau EG, Seale AP* (2018) Acute salinity tolerance and the control of two prolactins and their receptors in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Mozambique tilapia (*O. mossambicus*): A comparative study. *Gen Comp Endocrinol* 257: 168–176.
 26. *Seale AP, Pavlosky KK, Celino-Brady FT, Yamaguchi Y, Breves JP, Lerner DT* (2019) Systemic versus tissue-level prolactin signaling in a teleost during a tidal cycle. *J Comp Physiol B, Biochem Syst Environ Physiol* 189: 581–594. <https://doi.org/10.1007/s00360-019-01233-9>
 27. *Nagarajan G, Aruna A, Chang Y-M, Alkhamis YA, Mathew RT, Chang C-F* (2023) Effects of Osmotic Stress on the mRNA Expression of prl, prlr, gr, gh, and ghr in the Pituitary and Osmoregulatory Organs of Black Porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. *Int J Mol Sci* 24(6): 5318. <https://doi.org/10.3390/ijms24065318>
 28. *Seale AP, Stagg JJ, Yamaguchi Y, Breves JP, Soma S, Watanabe S, Kaneko T, Cnaan A, Harpaz S, Lerner DT, Grau EG* (2014) Effects of salinity and prolactin on gene transcript levels of ion transporters, ion pumps and prolactin receptors in Mozambique tilapia intestine. *Gen Comp Endocrinol* 206: 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.07.020>
 29. *Takahashi H, Prunet P, Kitahashi T, Kajimura S, Hirano T, Grau EG, Sakamoto T* (2007) Prolactin receptor and proliferating/apoptotic cells in esophagus of the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) in fresh water and in seawater. *Gen Comp Endocrinol* 152: 326–331.
 30. *Manzon LA* (2002) The role of prolactin in fish osmoregulation: a review. *Gen Comp Endocrinol* 125: 291–310.
 31. *Kent M, Bell AM* (2018) Changes in behavior and brain immediate early gene expression in male threespined sticklebacks as they become fathers. *Horm Behav* 97: 102–111.
 32. *Blume A, Torner L, Liu Y, Subburaju S, Aguilera G, Neumann ID* (2009) Prolactin induces Egr-1 gene expression in cultured hypothalamic cells and in the rat hypothalamus. *Brain Res* 1302: 34–41.
 33. *Dobolyi A, Oláh S, Keller D, Kumari R, Fazekas EA, Csikós V, Renner É, Cservenák M* (2020) Secretion and Function of Pituitary Prolactin in Evolutionary Perspective. *Front Neurosci* 14: 621. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00621>
 34. *Saha I, Chakraborty A, Das S* (2021) Prolactin Influences Different Aspects of Fish Biology. *Asian J Biol Life Sci* 10: 51.
 35. *Singh SP, Singh TP* (1981) Effect of sex steroids on pituitary and serum prolactin level in ovariectomized catfish, *Clarias batrachus*. In: *Annales D'endocrinologie*. pp 57–62.
 36. *Zhang Y, Long Z, Li Y, Yi S, Shi Y, Ma X, Huang W, Lu D, Zhu P, Liu X, Meng Z, Huang X, Cheng CHK, Lin H* (2010) The second prolactin receptor in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): molecular characterization, tissue distribution and gene expression. *Fish Physiol Biochem* 36: 283–295. <https://doi.org/10.1007/s10695-009-9355-1>
 37. *Cunha AAP, Partridge CG, Knapp R, Neff BD* (2019) Androgen and prolactin manipulation induces changes in aggressive and nurturing behavior in a fish with male parental care. *Horm Behav* 116: 104582.

EXPRESSION OF PROLACTIN AXIS GENES IN THE BRAIN, GILLS, AND KIDNEYS OF THE THREE-SPINED STICKLEBACK *G. ACULEATUS* L.: DEPENDENCY ON FRESHWATER ADAPTATION AND SEX

N. S. Pavlova^{a, #}, T. V. Neretina^b and O. V. Smirnova^a

^a*Department of Human and Animal Physiology, Biological Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

^b*N.A. Pertsov White Sea Biological Station, Biological faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University*

[#]*e-mail: pav.nad.ser@gmail.com*

The dependence of prolactin gene (Prl1) expression on sex in the brain and its receptors (PrlRa and PrlRb) in the brain, kidneys, gills, and intestine of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) was studied in the context of freshwater adaptation. Males and females of the marine morph were adapted to freshwater for 72 hours, and the expression levels of Prl1 in the brain and PrlRa and PrlRb in the examined organs were assessed using RT-PCR. In seawater, no sex differences in Prl1 gene expression in the brain were observed; however, after freshwater adaptation, significant sex differences were detected due to increased Prl1 expression in females. In the brains of females, PrlRa gene expression was significantly lower in seawater compared to males but increased significantly after freshwater adaptation, eliminating sex differences. PrlRb gene expression in the brain increased significantly in females following freshwater adaptation. In the kidneys, no sex differences in PrlRa gene expression were found in either seawater or freshwater, although expression significantly decreased after freshwater adaptation in both sexes. PrlRb gene expression in the kidneys showed no sex differences in seawater but did so under freshwater conditions due to a significant increase in females and a decrease in males. In the gills, the expression of PrlRa and PrlRb genes was independent of both sex and salinity. In the intestine, neither sex nor salinity influenced the expression of the PrlRa gene. PrlRb gene expression in the intestine showed no sex differences and decreased in both sexes after transitioning to freshwater. It is concluded that the osmoregulatory function of prolactin's dependence on sex is manifested in the sex differences in the expression of the prolactin gene itself and in the sensitization of the brain and osmoregulatory organs to it during freshwater adaptation.

Keywords: prolactin, prolactin receptor, threespined stickleback, osmoregulation, freshwater adaptation, sex dependency