

УДК 612.82

А.В. СИДОРОВ

### **РН-ОПОСРЕДОВАННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПИЩЕВОГО ПОВЕДЕНИЯ МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS***

Correlation between haemolymph acid-base balance (pH) value and feeding in fresh-water pond snail *Lymnaea stagnalis* was studied. It was measured that haemolymph acidation (pH lower 7,0) associated with food consumption decrease in molluscs. Electrophysiological experiments on identified feeding network motoneurons (B1, B3, B4, B7) shows that changes of electrical properties in these cells underlie mentioned above behavioural alterations.

Различные типы поведенческой активности характеризуются определенной периодичностью и находятся под постоянным контролем со стороны нейронных сетей, известных как центральные генераторы ритма (ЦГР). К сожалению, сложность анатомической организации центральной нервной системы (ЦНС) высших млекопитающих, в том числе и человека, делает труднодоступным прямое электрофизиологическое исследование нейронов и межнейронных связей в пределах того или иного ЦГР. Использование в качестве объекта исследований животных, обладающих просто устроенной нервной системой, так называемых модельных нейробиологических объектов (кишечнополостные, черви, моллюски, ракообразные, насекомые и др.),

позволяет разрешить указанное затруднение. При этом помимо анализа работы нейронных сетей *in situ* открывается дополнительная возможность по исследованию контролируемых ими форм поведения животных. У пресноводного легочного моллюска *Lymnaea stagnalis* (прудовик обыкновенный) нейронные основы пищедобывательного поведения являются наиболее хорошо изученными [1].

Кислотно-основное равновесие (рН) внутренней среды - один из определяющих факторов регуляции и корректного протекания целого спектра поведенческих программ *Lymnaea stagnalis*: дыхательной [2] и локомоторной [3]. Не вызывает сомнения связь указанных активностей животного с поиском и потреблением им пищи. Общеизвестно, что нарушения кислотно-основного равновесия бывают двух видов [4]: дыхательные и метаболические. Ранее было показано, что величина рН гемолимфы у сытых и голодных животных различается примерно на 0,5 единицы. Кроме того, колебания уровня рН выражено меняют паттерн спонтанной активности ряда модуляторных нейронов пищевой сети *Lymnaea stagnalis* [2]. Тем не менее непосредственные перестройки в работе пищевого ЦГР при изменении рН гемолимфы изучены слабо.

Целью данной работы являлось выявление характера взаимосвязи между величиной рН гемолимфы и степенью пищедобывательной активности *Lymnaea stagnalis*, а также опосредующие ее изменения в работе нейронной сети.

#### Материал и методика

Работа выполнена на представителе пресноводных моллюсков прудовике обыкновенном - *Lymnaea stagnalis* (L). В летний период животные периодически собирались в мелких водоемах в окрестностях д. Негорелое (Дзержинский р-н Минской обл.). В лаборатории содержались в аквариуме при температуре 24÷26 °С, при этом на каждого моллюска приходилось не менее 1 л воды. Пищей служили молодые листья салата и одуванчика. В экспериментах использовались взрослые особи массой 3÷4 г (длина раковины 25÷35 мм).

Для исследования пищедобывательного поведения моллюсков в чашку Петри с находящимся там моллюском, подвергнутым пищевой депривации в течение 12 ч, помещали предварительно взвешенную пластинку, вырезанную из листа салата или одуванчика. Через 2 ч пластинку осушали фильтровальной бумагой, взвешивали и определяли количество потребленной пищи, отмечали количество пищевых отверстий и рассчитывали убыль пищи, приходящейся на одно пищевое отверстие.

С целью анализа гемолимфы на величину рН сильной тактильной стимуляцией подошвы ноги вызывали реакцию полного втягивания тела (whole-body withdrawal), сопровождающуюся выбросом значительной части гемолимфы [5]. Значение рН полученной пробы объемом 1÷2 мл определяли при помощи рН-метра РеррНесТ, Model 310 (ATI Orion, USA) при 25 °С.

Для изучения корреляционной связи между величиной рН гемолимфы и показателями пищедобывательного поведения рассчитывали коэффициент корреляции и составляли уравнение линейной регрессии.

Инъекцию гемолимфозамещающих растворов производили путем прокола ноги. Внутрь полости тела вводили 0,4-0,5 мл раствора Рингера (состав см. ниже) с рН 6,0 («кислый» раствор) и рН 9,0 («щелочной» раствор). Операцию проводили с максимальной возможной скоростью, чтобы минимизировать потери гемолимфы вследствие активации реакции полного втягивания тела. После инъекции моллюски находились в покое 5-10 мин, и только после начала их движения начинали опыты по изучению пищевого поведения.

Электрофизиологические эксперименты были выполнены на препаратах изолированной ЦНС. Ее выделение производили по описанной ранее методике [6]. Препараты для размягчения периневральной оболочки и облег-

ченного проникновения микроэлектродов в нейроны предварительно обрабатывали раствором проназы (Protease E, type XIV, Sigma, США) в концентрации 1 мг/мл, приготовленным на нормальном физиологическом растворе для *Lymnaea stagnalis* в течение 5 мин при температуре 20 °С. Электрическую активность нейронов регистрировали после промывки обработанного препарата свежим физиологическим раствором в течение 30 мин. Внутриклеточную регистрацию электрических параметров нейронов осуществляли с помощью Ag/AgCl-электродов. Микропипетки заполняли 2,5 М раствором KCl (сопротивление микроэлектрода 10-40 МОм). В качестве индифферентного электрода использовали хлорированную серебряную проволоку. Усиленные электрические сигналы фиксировались на ленте самописца НЗ27-3 и параллельно отражались на экране запоминающего осциллографа С1-74. Для перфузии (0,1 мл/мин постоянно и до 5 мл/мин при смене раствора с новым рН) препаратов изолированной нервной системы использовали нормальный физиологический раствор (концентрация указана в ммольях): NaCl – 44; KCl – 1,7; CaCl<sub>2</sub> – 4; MgCl<sub>2</sub> • 6 H<sub>2</sub>O – 1,5; HEPES – 10. Значение рН для внеклеточного раствора составляло: 6,5; 7,5; 8,5 ± 0,03 для каждого. Нейроны идентифицировали по размеру, расположению в пределах ЦНС, цвету, электрофизиологическим характеристикам потенциала действия, величине потенциала покоя, паттерну спонтанной активности. Работа выполнена на клетках ЦНС, вовлеченных в реализацию пищевого поведения *Lymnaea stagnalis*: мотонейронах из состава пищевого ЦГР - В1, В3, В4 и В7 [1, 7, 8].

Экспериментальные данные обрабатывали методами вариационной статистики [9]. Число наблюдений ( $n$ ) указано для каждой серии опытов отдельно. Данные представлены в виде  $\bar{x} \pm S_x$ . Достоверность полученных результатов оценивалась при помощи  $t$ -критерия Стьюдента. Достоверными считались результаты при уровне значимости  $P$ , меньшем 0,05.

### Результаты и их обсуждение

У *Lymnaea stagnalis* процесс питания происходит прежде всего благодаря ритмическим движениям радулы (терки), скребущие движения которой по пищевому субстрату обеспечивают захват пищи и последующее ее продвижение по пищевой трубке. Полный цикл движения радулы состоит из трех частей, примерно одинаковых по продолжительности: протракции (выдвижения), движения по пищевому субстрату (ретракция) и глотания (проталкивание пищевых частиц в пищевод). Каждый цикл занимает около 3 с [8]. Аналогичные периодические движения радулы наблюдаются и при анализе работы полуинтактных препаратов, состоящих из ЦНС и буккальной мускулатуры (фиктивное питание). Даже в случае использования одних изолированных нервных систем хорошо заметна периодическая импульсация нейронов пищевого аппарата, опосредующая указанные движения терки.

Ритмические движения радулы управляются сетью мотонейронов, расположенных в буккальных ганглиях (В1 - В10) (рис. 1). В свою очередь, их активность находится под постоянным контролем интернейронов центрального генератора ритма питания. Выделяют три типа указанных нейронов: N1 ответственны за фазу протракции, N2 - за фазу ретракции и N3 - за фазу глотания. Все они образуют химические тормозные и возбуждающие, а в некоторых случаях и электротонические синапсы с соответствующими мотонейронами. Модуляторными элементами выступают интернейроны центрального кольца ганглиев (гигантские клетки (CGC) и клетки 1-го вентрального кластера (CV1) церебральных ганглиев) или самих буккальных ганглиев (нейроны медленного осциллятора, SO). Активация центрального генератора ритма питания происходит в результате поступающих с периферии, от сенсорных нейронов и сенсорных окончаний модуляторных нейронов пищевой сети, сигналов. Как правило, это различные химические стимулы [1,7, 10, 11].

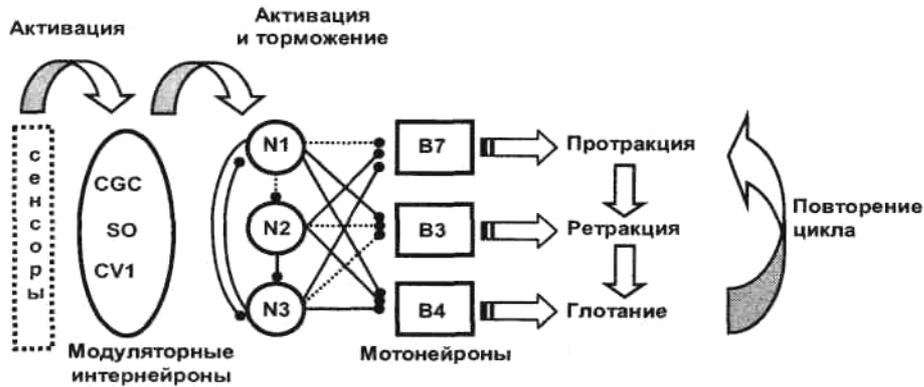


Рис. 1. Схема нейронной сети, контролирующей пищедобывательное поведение моллюска *Lymnaea stagnalis* (по [1], с изменениями и упрощением).

Сплошные линии – тормозные, прерывистые – возбуждающие химические синапсы; на схеме не указаны электротонические связи между N1 и B7, N3 и B4, а также характер взаимодействия между модуляторными, сенсорными нейронами и интернейронами центрального генератора (N1 – N3)

Была установлена положительная корреляционная связь (рис. 2 а) между величиной pH гемолимфы и общим количеством потребленной пищи ( $r = 0,46$ ,  $n = 49$ ,  $P < 0,05$ ; уравнение линейной регрессии:  $y = 0,1303x - 0,8735$ ). Значения группируются в двух областях диаграммы, соответствующих уровню pH гемолимфы 7,2 и 7,8 ед., что отражает отмеченные ранее [2] различия в кислотно-основном равновесии у сытых и голодных животных. Статистически достоверной корреляционной связи pH гемолимфы с количеством пищевых отверстий ( $r = -0,07$ ,  $n = 49$ ,  $P > 0,05$ ), а также убылью пищи, приходящейся на одно отверстие ( $r = 0,21$ ,  $n = 49$ ,  $P > 0,05$ ), выявлено не было.

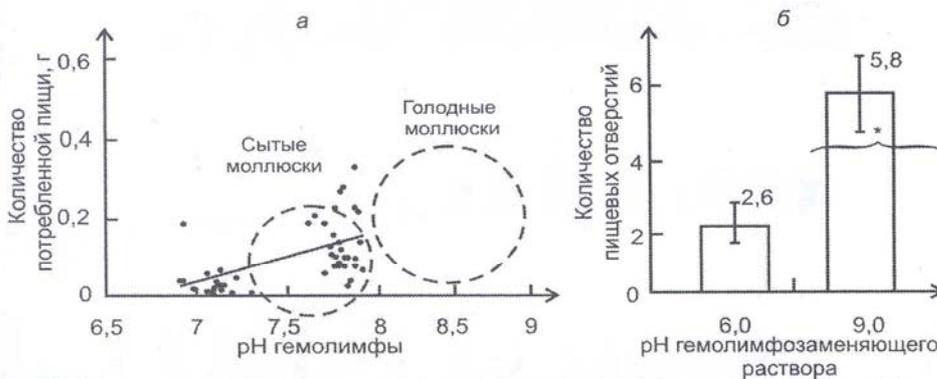


Рис. 2. Зависимость пищедобывательного поведения моллюска *Lymnaea stagnalis* от pH гемолимфы:

а – корреляционная связь между pH гемолимфы и количеством потребленной пищи. Каждая точка соответствует пробе гемолимфы, полученной от одного моллюска;

б – влияние инъекции гемолимфозаменяющих растворов с разным pH на количество пищевых отверстий. Приведены значения исследуемого показателя; \* – различия достоверны при  $P < 0,01$  ( $t = 3,20$ )

Внутри полостная инъекция «кислого» гемолимфозаменяющего раствора не вызывает статистически достоверного ( $P > 0,05$ ,  $t = 1,03$ ) уменьшения количества потребленной пищи по сравнению с введением «щелочного» раствора:  $38,0 \pm 5,39$  мг/2 ч,  $n = 10$  против  $49,0 \pm 3,70$  мг/2 ч,  $n = 10$ . Тем не менее отмечается заметное снижение (в 2,2 раза) количества пищевых отверстий при использовании гемолимфозаменяющих растворов с низким значением pH (рис. 2 б). Расчет убыли пищи, приходящейся на одно отверстие, также не выявил статистически достоверных ( $P > 0,05$ ,  $t = 1,62$ ) различий между экспериментальными группами моллюсков:  $16,9 \pm 3,50$  мг/2 ч/отверстие,  $n = 10$  при введении «кислого» и  $10,3 \pm 2,09$  мг/2 ч/отверстие,  $n = 10$  при инъекции «щелочного» физиологического раствора.

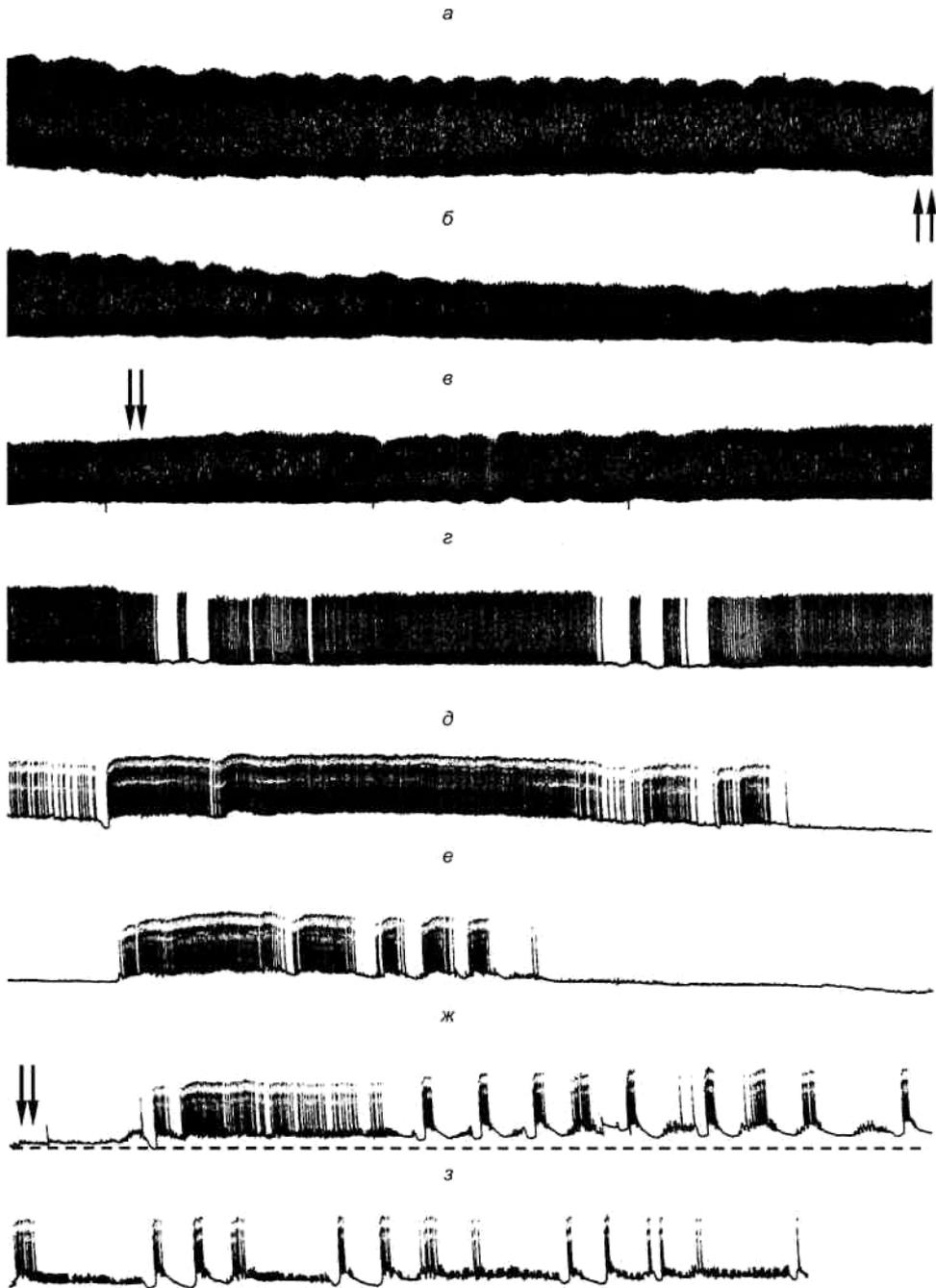


Рис. 3. Спонтанная электрическая активность мотонейронов пищедобывательной сети моллюска *Lymnaea stagnalis* при разных pH:

а - г - непрерывная запись электрической активности мотонейрона В3.  
Начало смены раствора с pH 6,5 на раствор с pH 7,5 отмечено прямой двойной стрелкой, повторная смена раствора (с pH 7,5 на 6,5) отмечена обратной двойной стрелкой. Калибровка:  $\frac{7 \text{ с}}{90 \text{ мВ}}$ ;  
д - з - непрерывная запись электрической активности мотонейрона В1.  
Начало смены раствора с pH 7,5 на раствор с pH 6,5 отмечено обратной двойной стрелкой. Пунктирная линия наглядно демонстрирует изменения уровня мембранного потенциала мембраны нейрона В1. Калибровка:  $\frac{9 \text{ с}}{60 \text{ мВ}}$

Защелчение внеклеточной среды приводит к угнетению спонтанной импульсации мотонейронов ретракции (В3) на фоне практически не изменяющегося мембранного потенциала (рис. 3 а - в). При этом хорошо заметно выраженное увеличение амплитуды потенциалов действия - в среднем на

30% с  $58,3 \pm 8,92$  мВ до  $91,1 \pm 8,92$  мВ ( $P < 0,05$ ,  $n = 4$ ). Продолжительная (более 1 мин) экспозиция препаратов нервной системы при pH 6,5 приводит к ярко выраженной трансформации паттерна спонтанной активности - фазический характер импульсации сменяет тонический. Появляются продолжительные, длительностью около 10 с, периоды, когда спонтанная импульсация отсутствует. Схожие изменения характерны и для мотонейронов, ответственных за фазу глотания (B4).

Для мотонейронов протракции (B1, B7) также отмечена трансформация ритма при закислении (рис. 3 д - з). В результате развития фазической активности посттормозная деполяризация приводит к резкому кратковременному усилению спонтанной импульсации. Указанные изменения наблюдаются на фоне общей деполяризации (на  $21,3 \pm 4,62$  мВ,  $n = 4$ ) мембраны клетки. Хорошо заметно постепенное уменьшение длительности межпачечных интервалов и количества импульсов в пачке при использовании физиологического раствора с pH 6,5.

Защелачивание (pH 8,5) не вызывает выраженных изменений спонтанной электрической активности нейронов пищевого мотонейронной сети моллюска *Lymnaea stagnalis*.

Полученные экспериментальные данные позволяют сделать вывод о модулирующих влияниях физиологических сдвигов pH гемолимфы на функционирование пищевого генератора *Lymnaea*. Изменение паттерна спонтанной импульсации мотонейронов B1, B3, B4 и B7 (переход с тонической активности на фазическую), имеющее место при колебаниях pH внутренней среды (закислении), может ассоциироваться с модуляцией ритмики скребущих движений радулы по субстрату, т. е. с увеличением длительности фазы ретракции и удлинением всего цикла протракции - ретракции - глотания. Указанные перестройки в нейронной активности хорошо коррелируют с наблюдаемым изменением показателей пищевого поведения *Lymnaea*. Так, именно усиление скребущих движений радулы по субстрату приводит к тому, что моллюск прогрызает длинные «дорожки» в пищевом субстрате, а количество пищевых отверстий снижается, как это отмечается при внутриполостной инъекции «кислого» гемолимфозамещающего раствора. В то же время при защелачивании количество единичных пищевых отверстий, напротив, возрастает. По всей видимости, не только истинные нейроны пищевого ЦГР способны реагировать на изменение уровня pH гемолимфы. Ранее подобная возможность была продемонстрирована и для модуляторных нейронов пищевого мотонейронной сети, в частности для гигантских клеток (CGC) церебральных ганглиев [2]. Отмеченные изменения уровня мембранного потенциала нейронов, частоты и амплитуды потенциалов действия могут быть объяснены за счет модуляции работы  $\text{Na}^+$ - [12] и  $\text{K}^+$ -каналов [13], а также активности  $\text{Na}^+$ -  $\text{K}^+$ -АТФазы [12] при колебаниях кислотно-основного равновесия в межклеточном пространстве. Отдельно подчеркнем факт уменьшения общего количества импульсов, особенно при залповой активности нейронов в случае снижения pH. Этот факт может косвенно свидетельствовать об изменении (уменьшении) эффективности синаптической передачи, прежде всего между нейронами пищевой сети. При этом одной из причин, опосредующих данное явление, может быть инактивация  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов пресинаптических терминалей при низких (ниже 7,0) pH [14] и, как следствие, - нарушение процесса высвобождения медиатора в синаптическую щель.

Таким образом, величина pH внутренней среды является действующим началом, вовлеченным в регуляцию пищевого поведения у моллюсков. На клеточном уровне ее влияние реализуется посредством моду-

ляции электрической активности нейронов и эффективности синапсов в пределах соответствующего центрального генератора ритма.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (проекты Б02М-045, Б05М-055).

1. Benjamin P.R., Staras K., Kemenes G. // Learning and Memory. 2000. Vol. 7. P. 124.
2. Sidorov A.V., Polyamina I.P. // J. Evol. Biochem. Physiol. 2003. Vol. 39. № 5. P. 555.
3. Сидоров А.В. // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 2006. Т. 42. № 1. С. 36.
4. Сравнительная физиология животных: в 3 т. / Под ред. К. Проссера. М., 1977. Т. 2. С. 68.
5. Sakharov D.A. / Eds. W. Winlow, O.S. Vinogradova and D.A. Sakharov. Manchester, 1991. P. 124.
6. Сидоров А. В. // Дис. ... канд. биол. наук. 03.00.13 / БГУ. Мн., 2001. С. 25.
7. Rose R.M., Benjamin P. // J. Exp. Biol. 1981. Vol. 92. P. 203.
8. Kemenes G., Elliott C., Benjamin P. // J. Exp. Biol. 1986. Vol. 122. P. 113.
9. Рокицкий П.Ф. // Биологическая статистика. Мн., 1967. С. 114.
10. McCrohan C.R. // J. Exp. Biol. 1984. Vol. 113. P. 351.
11. McCrohan C.R., Benjamin P. // J. Exp. Biol. 1980. Vol. 85. P. 169.
12. Коробкова А.М., Мищенко А. А. // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 1998. Т. 84. № 9. С. 949.
13. Alekseev S.I., Zaykin A. V. // Biochim. Biophys. Acta. 1993. Vol. 1148. № 1. P. 97.
14. Morad M. // Ciba Found. Symp. 1988. Vol. 139. P. 187.

Поступила в редакцию 22.12.06.

**Александр Викторович Сидоров** - кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных.