

12. Ткачук Н. В., Янченко В. О., Демченко А. М. Фітотоксичність деяких похідних 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолію // Фіторизноманіття прикордонних територій України, Росії, Білорусі у постчорнобильський період : матеріали Міжнар. наук. конф. (Чернігів, 17–18 грудня 2010 р.). Київ, 2010. С. 237–243.

13. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. М., 1988.

14. Плохинский Н. А. Биометрия. М., 1970.

Поступила в редакцию 16.06.2014.

Наталія Васильевна Ткачук – кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии и географии химико-биологического факультета Черниговского национального педагогического университета имени Т. Г. Шевченко (Украина).

Виктор Алексеевич Янченко – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры химии химико-биологического факультета Черниговского национального педагогического университета имени Т. Г. Шевченко (Украина).

Анатолій Михайлович Демченко – доктор фармацевтических наук, профессор кафедры химии химико-биологического факультета Черниговского национального педагогического университета имени Т. Г. Шевченко (Украина).

УДК 612.829.014.42

А. В. СИДОРОВ, А. ЭЛЬРАХАЛ (ЛИВИЯ), Г. Т. МАСЛОВА

КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ ЛЕГОЧНЫМ ДЫХАНИЕМ И АКТИВНОСТЬЮ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ У МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS* ПРИ НАУЧЕНИИ

Представлены результаты, подтверждающие взаимосвязь между системой антиокислительной защиты в клетках нервной ткани и условно-рефлекторной деятельностью. Установлено, что вызываемое при формировании инструментального навыка снижение выраженности легочного дыхания приводит к двукратному возрастанию активности супероксиддисмутазы (СОД) в нервной ткани у опытных моллюсков по сравнению с животными контрольной группы. Выявлено наличие отрицательной корреляции и рассчитаны коэффициенты корреляции (r) между активностью СОД и показателями легочного дыхания: частотой ($r = -0,58 \pm 0,14$) и общей длительностью ($r = -0,52 \pm 0,15$) респирации. Предполагается, что состояние антиокислительного баланса в нервной ткани – один из факторов, определяющих реализацию когнитивных процессов в мозге беспозвоночных.

Ключевые слова: инструментальный рефлекс; активные формы кислорода; дыхательное поведение; беспозвоночные.

Submitted data confirmed the idea of interaction between neuronal antioxidant defense system and conditioned reflex activity. Operant conditioning that is results in lung respiration decrease also leads to 2-fold rise of superoxide dismutase (SOD) activity in mollusc's CNS in comparison with the animals of control group. Negative correlation between SOD activity and some aspects of pulmonary respiration detected. Correlation coefficients (r) for respiratory rate and total amount of aerial respiration were measured as $-0,58 \pm 0,14$ and $-0,52 \pm 0,15$ respectively. We estimate that redox balance in nervous tissue is critical for cognitive processes within invertebrate brain.

Key words: operant conditioning; reactive oxygen species; respiratory behaviour; invertebrates.

Свободнорадикальная теория старения, связывающая угасание жизненных функций с накоплением в организме активных форм кислорода (АФК), достаточно давно утвердилась в научной среде [1, 2]. Принимая во внимание тот факт, что старение, как правило, ассоциируется с изменением когнитивных функций мозга [3, 4], можно предполагать участие свободных радикалов кислорода в регуляции функциональной активности нейронных ансамблей. Действительно, в последнее десятилетие различными группами исследователей были получены данные, позволяющие рассматривать АФК в качестве агентов межклеточных, в том числе и межнейронных, взаимодействий [5, 6]. Однако вклад свободнорадикальных форм кислорода в становление и поддержание таких процессов, как научение, память, остается не столь понятным прежде всего в силу отсутствия достаточного количества подходящих экспериментальных моделей, позволяющих проводить их исследование на клеточном уровне.

Пресноводный легочный моллюск *Lymnaea stagnalis* (прудовик обыкновенный) – один из классических нейробиологических объектов – обладает довольно подробно охарактеризованной на клеточном уровне центральной нервной системой (ЦНС), особенно в отношении нейронной сети, контролирующей легочное дыхание [7, 8]. Возможность использования данного вида для изучения клеточных механизмов формирования инструментального условного рефлекса была показана в [9, 10]. Вместе с тем данные по биохимическим особенностям мозга прудовика, в том числе и по системе антиокислительной защиты, крайне немногочисленны [11, 12]. Взаимосвязь между изменением дыхательного поведения *Lymnaea stagnalis*, вызванным тренировкой и уровнем антиоксидантной протекции в клетках его ЦНС, никогда прежде не исследовалась. Высказанная гипотеза экспериментально проверялась в настоящей работе.

Материал и методика эксперимента

Животные. Моллюсков (*Lymnaea stagnalis*) собирали осенью в мелких проточных водоемах (мелиоративные и водоотводные каналы). В лаборатории их содержали в аквариумах (на каждую особь приходилось не менее 1 л воды) при температуре 20 ± 1 °С. Пищей служили листья одуванчика и капусты (питание *ad libitum*). Воду в аквариумах меняли каждую неделю. В опытах использовали животных одинакового размера и веса.

Анализ легочного дыхания. Моллюсков помещали в сосуды с отстоявшейся водопроводной водой объемом 4,5 л и высотой 50 см (5 особей на сосуд). Пищу располагали на дне сосуда. Регистрировали количество респираторных циклов (открытие – закрытие пневмостома) за 1 ч наблюдения, а также длительность цикла отдельно у каждого моллюска. Рассчитывали среднюю длительность респираторного акта, суммарную длительность респирации за 1 ч наблюдения.

Обучение. Выработку инструментального условного рефлекса легочного дыхания в опытной группе ($n = 16$) проводили по модифицированной методике К. Lukowiak и др. [9]. Животных с нанесенными на раковину индивидуальными метками помещали в аквариумы объемом 1 л, наполненные 0,5 л отстоявшейся водопроводной воды, и оставляли в покое на 15 мин для акклиматизации. Затем в течение 45 мин проводили тренировочную сессию. Как только моллюск достигал поверхности воды и приступал к дыханию атмосферным воздухом (открывал дыхательное отверстие), при помощи заостренного аппликатора осуществляли тактильное раздражение области пневмостома, что приводило к прекращению легочной респирации. Тренировочные сессии проводили в течение трех дней – по три сессии ежедневно с перерывом 1 ч между ними. После тренировочной сессии моллюсков перемещали в аквариумы, в которых они содержались постоянно. Регистрировали количество попыток легочного дыхания в каждой тренировочной сессии, рассчитывая их среднее число за один тренировочный день для каждого из моллюсков. Оценку вызванных обучением изменений дыхательной активности проводили индивидуально на следующий день после окончания последней тренировочной сессии (четвертый день эксперимента). Особей контрольной группы ($n = 28$) не подвергали тактильной стимуляции в области пневмостома при дыхательных попытках.

Определение активности СОД. Для приготовления гомогената нервной ткани использовали препарат ЦНС (кольцо центральных и буккальные нервные ганглии). ЦНС для биохимического исследования отбирали индивидуально от каждого моллюска на четвертый день эксперимента после оценки вызванных обучением изменений дыхательной активности. Пробы замораживали и хранили при -70 °С не более двух месяцев. На одну пробу, взвешенную на аналитических весах ВЛР-200 с точностью 0,05 мг, приходилась одна ЦНС. При помощи стеклянного гомогенизатора материал пробы измельчали в 0,4 мл холодного (4 °С) раствора Рингера для *Lymnaea* (концентрации указаны в ммольях): NaCl – 44; KCl – 1,7; CaCl₂ – 4; MgCl₂ · 6H₂O – 1,5; HEPES – 10, pH – 7,5. Активность СОД (КФ 1.15.1.1) определяли спектрофотометрическим методом путем оценки скорости аутоокисления флавоноида кверцетина [13] в двух повторах по каждой пробе. Количество белка находили по методу Бредфорд [14]. Биохимические исследования выполнены с использованием спектрофотометра Cary 50 (Variant Inc., Австралия).

Статистика. Экспериментальные данные обрабатывали при использовании статистических возможностей программы MS Excel 2003, программы Statistica 6.0 [15]. Число наблюдений (n) указано для каждой серии опытов отдельно. Все данные представлены в виде $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$. Достоверность полученных результатов оценивали при помощи t -критерия Стьюдента. Достоверными считались результаты при уровне значимости (P) меньше 0,05.

Результаты эксперимента и их обсуждение

Инструментальный условный рефлекс вырабатывается уже ко второму тренировочному дню, т. е. после первых трех тренировочных сессий. Об этом свидетельствует статистически достоверное ($P < 0,05$) снижение в 1,3 раза среднего количества попыток осуществления легочного дыхания на второй день эксперимента (рис. 1). Выработанный навык сохранялся и на третий день эксперимента, когда среднее число попыток дыхания по-прежнему продолжало оставаться отличным (статистически достоверно, $P < 0,05$) от такового в сравнении с первым тренировочным днем.

Анализ дыхательной активности показал, что в результате формирования инструментального навыка суммарная длительность легочного дыхания уменьшается в 2,5 раза по сравнению с контрольной группой ($P < 0,01$) (рис. 2, а). При этом указанное подавление легочной респирации реализуется за счет снижения частоты дыхания, поскольку средняя продолжительность единичного дыхательного акта остается статистически неизменной в обеих группах животных: 141 ± 15 с ($n = 16$, обучение) и 153 ± 17 с ($n = 28$, контроль).

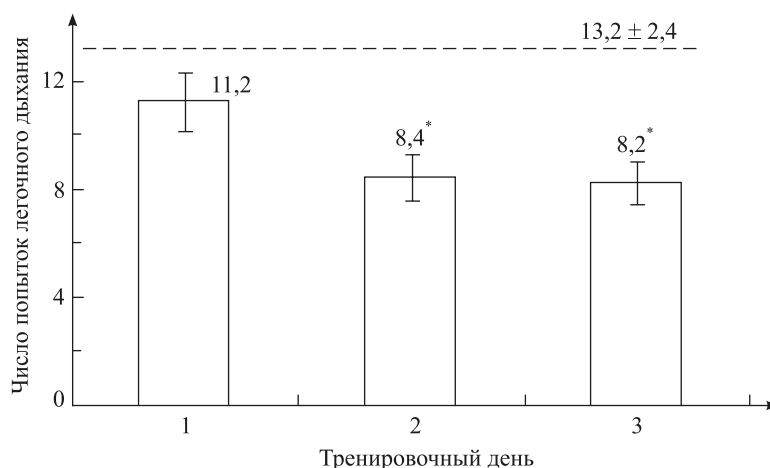


Рис. 1. Число попыток легочного дыхания у *Lymnaea stagnalis* в ходе выработки инструментального навыка. Пунктирная линия – число попыток дыхания в первую тренировочную сессию.

*Различия статистически достоверны ($P < 0,05$) по сравнению с первым тренировочным днем

Установлено двукратное увеличение ($P < 0,01$) активности СОД у животных опытной группы по сравнению с контролем (рис. 2, б). При этом различий в содержании общего белка в препарате изолированной ЦНС выявлено не было: $45,9 \pm 2,2$ мг/мл ($n = 16$, научение) и $47,7 \pm 2,3$ мг/мл ($n = 24$, контроль). Как следствие, активность СОД в пересчете на 1 мг белка также статистически достоверно ($P < 0,01$) различалась в обеих экспериментальных группах: $0,69 \pm 0,07$ ед. акт./мг ($n = 16$, научение) и $0,34 \pm 0,03$ ед. акт./мг ($n = 24$, контроль).

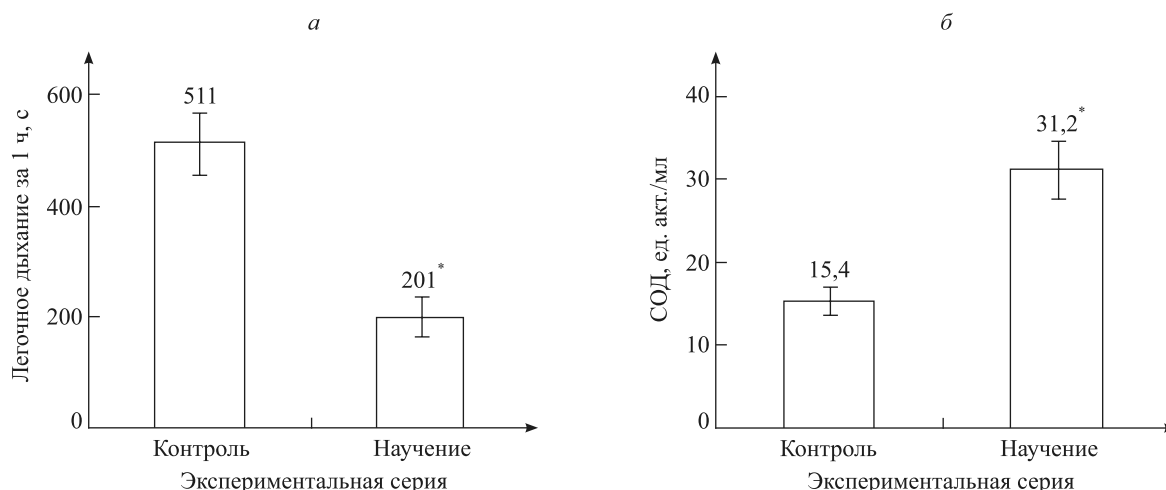


Рис. 2. Изменение общей длительности легочного дыхания (а) и активности СОД в ЦНС (б) у *Lymnaea stagnalis* после формирования инструментального навыка.

*Различия статистически достоверны ($P < 0,01$) по сравнению с контрольной группой

Статистический анализ выявил наличие умеренной отрицательной корреляции между показателями легочного дыхания и активностью СОД у моллюсков исследованных групп (рис. 3). Значения r составили: для частоты респирации $-0,58 \pm 0,14$ ($t = 4,11$, $P < 0,01$), для общей длительности легочного дыхания $-0,52 \pm 0,15$ ($t = 3,59$, $P < 0,01$) при числе пар сравнения $n = 33$. Взаимосвязи между средней длительностью единичного дыхательного акта и активностью СОД выявлено не было ($r = -0,05 \pm 0,15$, $t = 0,29$, $P > 0,05$).

Характер изменения дыхательной активности при научении свидетельствует о том, что основному модифицирующему влиянию подвержена именно частота респирации. Следовательно, итоговой мишенью действия безусловного тактильного стимула на клеточном уровне будет нейронный ансамбль центрального генератора дыхательного ритма [16]. Представленные данные позволяют говорить о сохранности приобретенного в ходе тренировки инструментального навыка в течение по меньшей мере 24 ч после завершения последней тренировочной сессии, что вполне согласуется с имеющимися литературными

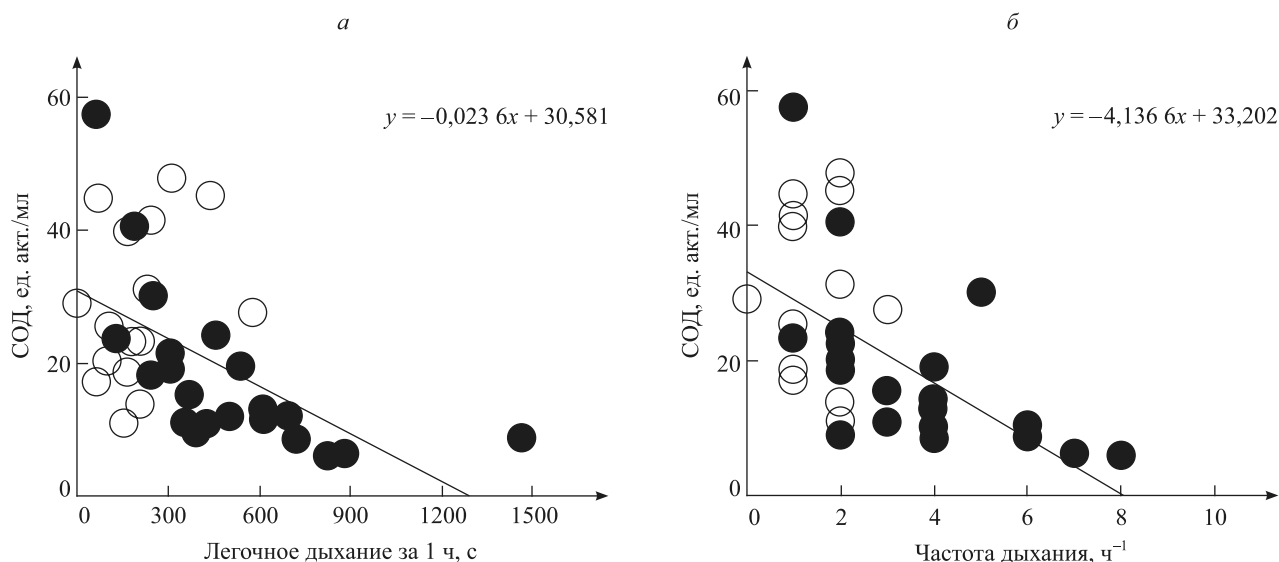


Рис. 3. Корреляционная зависимость между общей длительностью (а) и частотой (б) легочного дыхания и активностью СОД в ЦНС у *Lymnaea stagnalis*. Каждый круг – данные по одному моллюску: светлые круги – моллюски после выработки инструментального навыка, темные – контрольная группа. Представлены линии тренда и уравнение линейной регрессии

сведениями [17]. При этом указанный временной период (сутки) является достаточным для реализации эффектов обучения на биохимическом уровне, связанных с возрастанием активности ферментативных, в частности антиоксидантной, систем мозга. Можно было бы предполагать, что усиление супероксид-дисмутазной активности – следствие изменения количества потребленного кислорода и последующей модификации уровня продукции АФК в митохондриях. Однако легочные моллюски поглощают 50 % необходимого кислорода через легкие, а остальные 50 % – через кожные покровы (кислород, растворенный в воде) [18]. Фактически при научении меняются соотношения между этими двумя формами дыхания, а, следовательно, изменение активности СОД не может быть связано с дефицитом кислорода в организме.

Ранее, в исследованиях с млекопитающими, было отмечено, что сверхэкспрессия внеклеточной формы СОД приводит к усилению долговременной потенциации в гиппокампе [19, 20] и улучшает мозжечокзависимые формы обучения у взрослых трансгенных мышей по сравнению с животными дикого типа [19], что связано с итоговым падением концентрации супероксид-аниона. Известно, что реакция на приложение ингибиторов митохондриального комплекса I, сопровождаемая возрастанием свободнорадикальной нагрузки в цитозоле, отличается у молодых и старых мышей. Для последней группы отмечено резкое увеличение уровня АФК [21]. Другими словами, изменение активности ферментов антиоксидантной защиты сказывается на когнитивных функциях мозга. Это позволяет рассматривать АФК в качестве активных участников межклеточных взаимодействий, вовлеченных в регуляцию функциональной активности нейронных сетей мозга у моллюсков и реализующих свои эффекты на синаптическом уровне [22–24]. При этом состояние антиокислительного баланса в нервной ткани является одним из факторов, определяющих осуществление когнитивных процессов в мозге беспозвоночных.

Работа выполнена в рамках ГПНИ «Конвергенция» (задание 3.3.03.4).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Beckman K. B., Ames B. N. The free radical theory of aging matures // *Physiol. Rev.* 1998. Vol. 78, № 2. P. 547–581.
2. Stadtman E. R. Protein oxidation and aging // *Free Radic. Res.* 2006. Vol. 40, № 12. P. 1250–1258.
3. Beal M. F. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases // *Ann. Neurol.* 1995. Vol. 38, № 3. P. 357–366.
4. A role for reactive oxygen/nitrogen species and iron on neuronal synaptic plasticity / C. Hidalgo [et al.] // *Antioxid. Redox. Signal.* 2007. Vol. 9, № 2. P. 245–255.
5. Kishida K. T., Klann E. Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory // *Antioxid. Redox. Signal.* 2007. Vol. 9, № 2. P. 233–244.
6. Auerbach J. M., Segal M. Peroxide modulation of slow onset potentiation in rat hippocampus // *J. Neurosci.* 1997. Vol. 17, № 22. P. 8695–8701.
7. Syed N. I., Harrison D., Winlow W. Respiratory behavior in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. I. Behavioral analyses and the identification of motor neurons // *J. Comp. Physiol.* 1991. Vol. 169A, № 5. P. 541–555.
8. Syed N. I., Winlow W. Respiratory behavior in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. II. Neural elements of the central pattern generator (CPG) // *J. Comp. Physiol.* 1991. Vol. 169A, № 5. P. 557–568.
9. Operant conditioning of aerial respiratory behaviour in *Lymnaea stagnalis* / K. Lukowiak [et al.] // *J. Exp. Biol.* 1996. Vol. 199, № 3. P. 683–691.

10. Benjamin P. R., Staras K., Kemenes G. A systems approach to the cellular analysis of associative learning in the pond snail *Lymnaea* // *Learn. Mem.* 2000. Vol. 7, № 3. P. 124–131.
11. Сидоров А. В., Маслова Г. Т. Состояние антиокислительной защиты в центральных нервных ганглиях моллюска *Lymnaea stagnalis* при модуляции активности NO-ергической системы // *Журн. эволюц. биохимии и физиологии.* 2008. Т. 44, № 5. С. 453–458.
12. Сидоров А. В., Маслова Г. Т. Система антиокислительной защиты в центральных нервных ганглиях моллюска *Lymnaea stagnalis* // *Вестн. НАН Беларуси. Сер. біял. навук.* 2009. № 2. С. 90–94.
13. Kostyuk V. A., Potapovich A. I. Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple assay for determination of superoxide dismutase // *Biochem. Int.* 1989. Vol. 19, № 5. P. 1117–1124.
14. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72, № 1/2. P. 248–254.
15. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. Минск, 1973.
16. Spencer G. E., Syed N. I., Lukowiak K. Neural changes after operant conditioning of the aerial respiratory behavior in *Lymnaea stagnalis* // *J. Neurosci.* 1999. Vol. 19, № 5. P. 1836–1843.
17. Operant conditioning in *Lymnaea*: evidence for intermediate- and long-term memory / K. Lukowiak [et al.] // *Learn. Mem.* 2000. Vol. 7, № 3. P. 140–150.
18. Jones J. D. Aspects of respiration in *Planorbis corneus* L. and *Lymnaea stagnalis* L. (Gastropoda: Pulmonata) // *Comp. Biochem. Physiol.* 1961. Vol. 4, № 1. P. 1–29.
19. Aging-dependent alterations in synaptic plasticity and memory in mice that overexpress extracellular superoxide dismutase / D. Hu [et al.] // *J. Neurosci.* 2006. Vol. 26, № 15. P. 3933–3941.
20. Thiels E., Klann E. Hippocampal memory and plasticity in superoxide dismutase mutant mice // *Physiol. Behav.* 2002. Vol. 77, № 4/5. P. 601–605.
21. MPTP-induced oxidative stress and neurotoxicity are age-dependent: evidence from measures of reactive oxygen species and striatal dopamine levels / S. F. Ali [et al.] // *Synapse.* 1994. Vol. 18, № 1. P. 27–34.
22. Sidorov A. V. Effect of hydrogen peroxide on electrical coupling between identified *Lymnaea* neurons // *Invert. Neurosci.* 2012. Vol. 12, № 1. P. 63–68.
23. Giniatullin A. R., Giniatullin R. A. Dual action of hydrogen peroxide on synaptic transmission at the frog neuromuscular junction // *J. Physiol.* 2003. Vol. 552, № 1. P. 283–293.
24. Kamler A., Segal M. Hydrogen peroxide as a diffusible signal molecule in synaptic plasticity // *Mol. Neurobiol.* 2004. Vol. 29, № 2. P. 167–178.

Поступила в редакцию 18.09.2014.

Александр Викторович Сидоров – доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета БГУ.

Али ЭльРахал – аспирант кафедры физиологии человека и животных биологического факультета БГУ. Научный руководитель – А. В. Сидоров.

Галина Трофимовна Маслова – кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных биологического факультета БГУ.

УДК 595(476.5)

Г. Г. СУШКО

ИСТОРИЯ ФОРМИРОВАНИЯ ЭНТОМОКОМПЛЕКСОВ ВЕРХОВОГО БОЛОТА ЕЛЬНЯ

Предложен вероятный сценарий формирования энтомокомплексов верхового болота Ельня на основе оригинальных материалов по их таксономической структуре, сведений о современном географическом распространении и трофической специализации насекомых, а также выполненных ранее специалистами реконструкций процессов эволюции растительного покрова и формирования верховых болот Поозерского региона. Отмечается, что в раннем голоцене (пребореал и бореал) в состав энтомокомплексов вошли фитофаги осоковых и сосны, в течение атлантического оптимума они пополнились представителями перигляциальной фауны, в суббореальном периоде завершилось оформление энтомокомплексов грядово-мочажинных участков. В течение субатлантики к составу энтомокомплексов добавились обитатели верещатников. Подчеркивается, что на современном этапе происходит пополнение комплекса теплолюбивыми формами, а также мигрирующими из агроценозов вредителями сельскохозяйственных культур.

Ключевые слова: верховое болото; насекомые; реконструкция; история формирования; голоцен; ботанический состав торфа; ледник; Ельня; Белорусское Поозерье.

We attempted reconstruction of genesis of faunal assemblages of insects in Holocene one of largest in Europe peat bog Elnya. Used for this botanical composition of different layers of peat, today geographical distribution and trophic preferences peat bogs insects. In the early stages of succession (preboreal and boreal of early Holocene) raised bog inhabited by species associated with cotton grass and sphagnum mosses. Warm and humid atlantic period was the most important for the genesis of biodiversity of Elnya. At this time, perhaps, moved many cold-adapted species and insects with trophic relations with heather shrubs. Currently heather shrubs with cotton grass dominate the oligotrophic bogs.

Key words: raised bog; insects; reconstruction; genesis story; Holocene; botanical composition of peat; glacier; Elnya; Belarusian Lakeland.