ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

УДК 591.181; 591.041; 591.513 + 612.829

**ЭЛЬРАХАЛ**

**Али Альхашми Юсеф**

# НЕЙРОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ВОЗРАСТНЫХ И ПЛАСТИЧЕСКИХ ПЕРЕСТРОЕК ДЫХАТЕЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ *LYMNAEA STAGNALIS*

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности 03.03.01 – физиология

**Минск, 2017**

Работа выполнена в Белорусском государственном университете

| | |
|---|---|
| **Научный руководитель:** | **Сидоров Александр Викторович**<br>доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры физиологии человека и животных Белорусского государственного университета |
| **Официальные оппоненты:** | **Калюнов Владимир Николаевич**<br>доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории нейрофизиологии ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» |
| | **Федорович Сергей Викторович**<br>кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории биофизики и инженерии клетки ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси» |
| **Оппонирующая организация:** | Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет» |

Защита состоится 15 декабря 2017 года в $11^{00}$ на заседании совета по защите диссертаций Д 01.36.01 при ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» (220072, г. Минск, ул. Академическая, 28, тел. +375 17 284-16-30, факс +375 17 284-16-30, E-mail: pavlova@fizio.bas-net.by).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси».

Автореферат разослан 15 ноября 2017 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций
кандидат биологических наук Н.Ф. Павлова

Изменение деятельности функциональных систем организма с течением времени является неизбежной характеристикой онтогенеза. Оно реализуется как за счёт морфологических, так и функциональных перестроек на молекулярном, клеточном, тканевом и органном уровнях организации. С возрастом, в центральной нервной системе, как правило, наблюдаются альтерации в процессах обучения и памяти [Hedden & Gabrieli, 2004], а также нарушения двигательного контроля [Mattay e.a., 2002]. Традиционно считается, что в их основе лежат два базовых механизма – непосредственная потеря (гибель) нейронов [Pakkenberg & Gundersen, 1997] и возрастное снижение эффективности синаптической передачи, часто связываемые с развитием окислительного стресса в мозге [Beckman, 1998; Venkateshappa e.a., 2011].

Продолжительное время представления о физиологической роли свободных радикалов, в том числе и активных форм кислорода (АФК), сводились к инициации и поддержанию патологических процессов. Изменения содержания биорадикалов во внутренней среде отмечены при нейродегенеративных заболеваний, нарушениях кровоснабжения мозга, воспалительных процессах [Beal, 1995; Beckman, 1998]. Свободно-радикальная гипотеза, связывающая процессы постепенного угасания жизненных функций с накоплением АФК [Stadtman, 1992; Sohal, 1996], является ключевой для объяснения механизмов старения организма. Начиная с середины 90-х гг. XX века высказывались предположения об АФК, как внутриклеточных передатчиках сигнала и агентах межклеточной коммуникации [Скулачёв, 1994; Finkel, 1998; Auerbach, 1997, Костюк и Потапович, 2004] и было сформулировано представление о редокс-гомеостазисе клеток [Мартинович и Черенкевич, 2008]. В последующем была показана их вовлечённость в реализацию когнитивных функций мозга, однако выводы разных исследовательских групп часто носят противоречивый характер [Hidalgo e.a., 2007; Kishida & Klann, 2007].

Существует относительно небольшое число нейробиологических объектов, организация нервной системы которых позволяет соотнести реакции на уровне отдельных, идентифицированных клеток с наблюдаемыми перестройками поведенческой активности. Одним из них является пресноводный лёгочный моллюск *Lymnaea stagnalis* (прудовик обыкновенный), лёгочное дыхание которого и контролирующая его нейронная сеть были весьма детально охарактеризованы в работах 70–90-х гг. XX века. В свою очередь, это дало возможность провести работы по изучению клеточных и субклеточных механизмов определяющих реакцию нейронной сети при действии чрезвычайных раздражителей [Sidorov, 2005; Сидоров, 2013] и/или в ходе обучения [Lukowiak e.a., 1996; Spencer e.a., 1999; McComb e.a., 2003, 2005; Watson e.a., 2012].

Вместе с тем, возрастные изменения нервных клеток могут быть обусловлены модификацией внутриклеточных регуляторных систем, в частности $Ca^{2+}$

гомеостазиса [Nikoletopoulou & Tavernarakis, 2012], имеющего основополагающее значение для всех аспектов нормального функционирования нейронов [Neher & Sakaba, 2008]. Поскольку потенциал-чувствительные и лиганд-управляемые ионные каналы обеспечивают основной поток $Ca^{2+}$ внутрь клетки [Kostyuk, 1989; Catterall e.a., 1990], именно электрические характеристики мембраны становятся определяющими для поддержания внутриклеточной концентрации ионов кальция. Известно, что различные нервные функции в неравной мере подвержены старению [Yeomann e.a., 2012]. Можно предположить, что это является следствием неодинаковой устойчивости и/или сохранности электрических свойств мембраны клеток соответствующих нейронных сетей мозга.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Связь работы с научными программами (проектами), темами**

Диссертация выполнена в рамках научно-исследовательских работ, проводимых на кафедре физиологии человека и животных Белорусского государственного университета. Тема исследования соответствует приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь: на 2011–2015 годы (утверждены постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 12.08.2010, № 1196) – «3.1. Биохимия, биофизика и физиология растительной, животной и микробной клетки, ее надмолекулярных структур, биологических макромолекул и низкомолекулярных биорегуляторов, в том числе ферментов и гормонов», «12.6. Когнитивные технологии, изучение проблем сознания и функционирования человеческого мозга»; на 2016–2020 годы (утверждены постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 12.03.2015, № 190) – «4. Медицина и фармация».

Работа выполнена в рамках научно-исследовательских проектов «Исследование нейрофизиологических механизмов обучения при изменении уровня биорадикалов в мозге» (ГПНИ «Междисциплинарные научные исследования, новые зарождающиеся технологии как основа устойчивого инновационного развития («Конвергенция»)», 2011–2015 гг., № ГР 20114361) и «Мембранные механизмы возрастных изменений нейронов разной эргичности» (ГПНИ «Фундаментальные и прикладные науки – медицине», 2016–2018 гг., № ГР 20161315).

**Цель и задачи исследования**

Цель работы – выявить клеточные механизмы, определяющие формирование дыхательного ритма в центральной нервной системе модельного нейробиологического объекта, моллюска *Lymnaea stagnalis*, у животных разного возраста и при обучении.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи – у животных разных возрастных групп и у особей с выработанным инструментальным условным рефлексом лёгочного дыхания:

1. Изучить характеристики дыхательного поведения.

2. Выявить показатели спонтанной электрической активности входящего в состав центрального генератора дыхательного ритма гигантского дофаминергического нейрона правого педального ганглия (R.Pe.D.1).

3. Оценить временны́е и амплитудные характеристики спонтанных потенциалов действия нейрона R.Pe.D.1.

**Научная новизна**

Впервые у животных разных возрастных групп модельного нейробиологического объекта моллюска *Lymnaea stagnalis* выявлены показатели респираторного поведения и установлены особенности его лёгочного дыхания при старении. Определены и оценены изменения электрических характеристик мембраны гигантского дофаминергического нейрона из состава дыхательной сети ЦНС *Lymnaea* (R.Pe.D.1) с возрастом и при обучении. Установлено, что с возрастом отмечается прогрессивное возрастание, а формирование инструментального навыка, наоборот, вызывает снижение возбудимости R.Pe.D.1, что опосредует соответствующие изменения (усиление и ослабление) лёгочного дыхания у моллюсков.

Впервые доказана взаимосвязь показателей спонтанной электрической активности R.Pe.D.1 и параметров дыхательного поведения у животных разных возрастных групп и при обучении. Установлены особенности изменения временны́х и амплитудных характеристик спонтанных потенциалов действия R.Pe.D.1 с возрастом и при обучении, а также их взаимосвязь с показателями дыхательного поведения моллюска.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Возрастные перестройки лёгочного дыхания *Lymnaea* связаны с его интенсификацией, происходящей на фоне линейного увеличения как частоты, так и коэффициента заполнения дыхательного цикла, а пластические – со снижением лишь частотной составляющей цикла;

2. Возрастные изменения электрической активности гигантского дофаминергического нейрона (R.Pe.D.1) респираторной сети *Lymnaea* приводят к возрастанию его собственной возбудимости, а пластические – к её снижению, обусловленному внешними синаптическими входами;

3. С возрастном и при пластических перестройках дыхательного поведения отмечается изменение временны́х, но не амплитудных характеристик спонтанных потенциалов действия в гигантском дофаминергическом нейроне (R.Pe.D.1) респираторной сети *Lymnaea*.

*Объект исследования*: *Lymnaea stagnalis* (прудовик обыкновенный) – пресноводный легочный моллюск, препараты изолированной ЦНС.

*Предмет исследования*: лёгочное дыхание, спонтанная электрическая активность нейронов.

Выбор объекта и предмета исследования обусловлен высокой степенью

изученности структурных элементов нейронной сети (межклеточные связи, нейромедиаторная специфичность), контролирующих лёгочную респирацию моллюска, возможностью проведения микроэлектродных исследований для изучения электрических характеристик *идентифицируемых* нервных клеток удобством регистрации и последующего анализа дыхательного поведения животных.

**Личный вклад соискателя**

Выбор темы исследования, изложение выносимых на защиту положений, общей характеристики работы, формулировка выводов осуществлялись совместно с научным руководителем. Диссертантом полностью самостоятельно выполнены исследования по изучению поведения моллюсков. Методическая помощь со стороны научного руководителя была оказана при регистрации и анализе спонтанной электрической активности нервных клеток. Основная доля текста диссертации (аналитический обзор литературы, фактическая часть экспериментальных глав) написаны соискателем самостоятельно. Разделы глав, посвящённые анализу полученных данных – после консультаций с научным руководителем. Научным руководителем проведена смысловая и редакторская коррекция текста диссертационной работы. В научных статьях, опубликованных в соавторстве, личный вклад соискателя составил 80 [2, 3], 70 [1] и 15 [4] % соответственно. В материалах конференций [5] вклад соискателя составил 60, в тезисах докладов 90 [7], 80 [8, 10], 70 [6], 60 [9, 11, 12] и 40 [13] % соответственно. В диссертацию не были включены результаты исследований соавторов научных работ.

**Апробация результатов диссертации**

Результаты работы доложены автором (лично или в соавторстве) и обсуждены в ходе проведения ряда международных и республиканских конференций: «Кровообращение в норме и при патологии – от Гарвея до трансплантации сердца» (Минск, Беларусь, 2014); «Free Radicals in Chemistry and Life» (Minsk, Belarus, 2015); «13$^{th}$ Symposium on Invertebrate Neurobiology» (Tihany, Hungary, 2015); «Нейрофизиология боли в эксперименте и клинике» (Минск, Беларусь, 2015); «Нейроэндокринология – 2015: IX Всероссийская конференция, посвящается 90-летию А.Л. Поленова (1925–1996)» (Ст.-Петербург, Россия, 2015); «Simpler Nervous Systems: XI East European Conference of the International Society for Invertebrate Neurobiology» (Moscow–Zvenigorod, Russia, 2016).

**Опубликованность результатов диссертации**

По материалам диссертации опубликовано 13 работ: 4 статьи в журналах из перечня научных изданий Республики Беларусь для опубликования диссертационных исследований, 1 материалы конференции и 8 тезисов докладов (4 за рубежом). Общий объём опубликованных материалов – 3,34 авт. л. (2,14 авт. л. подготовлено лично соискателем).

**Структура и объём диссертации**

Диссертация представлена на 130 страницах (85 из них приходится на долю

основной части) и состоит из введения, общей характеристики работы, аналитического обзора литературы, описания использованных методов и материалов исследования, собственных результатов исследований (3 главы), их обсуждения (1 глава), заключения, библиографического списка, включающего 318 источников (29 на русском и 289 на английском языках) и 13 публикаций соискателя, приложения. Работа иллюстрирована 35 рисунками, содержит 33 таблицы.

# ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

## Материалы и методы исследования

Работа выполнена на представителе пресноводных моллюсков прудовике обыкновенном – *Lymnaea stagnalis* ($n$ = 205). Животных периодически собирали в мелких водоемах в окрестностях п. Негорелое (Дзержинский район, Минской области) в весенне-осенний период года. В лаборатории их содержали в аквариумах, при этом на каждого моллюска приходилось не менее 1 литра воды. Пищей служили молодые листья салата, капусты и одуванчика. Температура воды составляла 20±1 $^{o}$C. В летний период (июль–август) электрофизиологические и поведенческие эксперименты не проводились. На раковину всех экспериментальных животных наносили индивидуальную метку, фиксировали высоту их раковины и массу.

*Экспериментальные группы моллюсков*. Для оценки возрастных изменений лёгочного дыхания экспериментальные животные были разделены на три условные возрастные группы на основании высоты раковины и массы тела (таблица). Расчёт возраста был произведен по аллометрическим уравнениям Берталанфи [Bertalanffy, 1960], на основании коэффициентов индивидуального роста для *Lymnaea* [Zotin, 2009] раздельно по данным о массе тела и высоте раковины. В исследованиях по изучению нейронных механизмов обучения использовали животных одинакового размера (высоты раковины) и массы.

*Лёгочное дыхание и его анализ*. Моллюсков помещали в аквариумы объемом 4,5 л и высотой 50 см из расчёта 5 особей/аквариум. Регистрировали количество респираторных циклов, определяемых как открытие–закрытие дыхательного отверстия (пневмостома), за 1 ч наблюдения, а также при помощи секундомера фиксировали время нахождения пневмостома в открытом состоянии отдельно по каждому моллюску. На основании измеренных временны́х интервалов рассчитывали среднюю длительность респираторного акта и суммарную длительность легочного дыхания за 1 ч наблюдения, отмечали распределение дыхательных актов по длительности. Эксперименты по изучению дыхания проведены при температуре постоянного содержания животных (20±1 $^{o}$C).

*Выработка инструментального условного рефлекса*. Её проводили по модифицированной методике [Lukowiak e.a., 1996]. Животных помещали в 1 л аквариумы, наполненные на 0,5 л водой, оставляя на 15 мин для акклиматизации.

Таблица. – Характеристика экспериментальных групп моллюсков

| **Возрастные и экспериментальные группы** | **Показатель** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Высота раковины, см | Масса тела, г | Возраст, нед (по высоте раковины) | Возраст, нед (по массе тела) |
| *Возрастные группы моллюсков для анализа изменений легочного дыхания* | | | | |
| Молодые ($n$ = 45) | 3,2±0,02 | 2,32±0,08 | 34,7±0,6 | 32,3±0,8 |
| Зрелые ($n$ = 45) | 4,2±0,03 | 5,14±0,14 | 48,2±1,5 | 48,4±2,1 |
| Старые ($n$ = 30) | 5,4±0,06 | 10,76±0,34 | 82,5±0,2 | 81,8±0,6 |
| One-way ANOVA | $F$ = 920.64 $P$ < 0.0001 | $F$ = 497.39 $P$ < 0.0001 | $F$ = 489.52 $P$ < 0.0001 | $F$ = 249.43 $P$ < 0.0001 |
| *Возрастные группы моллюсков для анализа изменений спонтанной электрической активности нейрона R.Pe.D.1* | | | | |
| Молодые ($n$ = 11) | 3,3±0,11 | 2,33±0,23 | 39,1±2,6 | 32,7±2,2 |
| Зрелые ($n$ = 15) | 4,1±0,07 | 5,11±0,27 | 43,5±2,5 | 46,2±3,9 |
| Старые ($n$ = 15) | 4,9±0,06 | 8,93±0,27 | 48,9±2,7 | 52,9±3,8 |
| One-way ANOVA | $F$ = 107.45 $P$ < 0.0001 | $F$ = 152.39 $P$ < 0.0001 | $F$ = 3.34 $P$ < 0.0500 | $F$ = 7.36 $P$ < 0.0020 |
| *Группы моллюсков для изучения пластических перестроек лёгочного дыхания* | | | | |
| Обучение ($n$ = 16) | 4,5±0,06 | 6,33±0,31 | 48,6±2,7 | 43,1±2,7 |
| Контроль ($n$ = 28) | 4,5±0,06 | 6,89±0,35 | 48,1±2,2 | 48,4±2,1 |
| $t$-критерий Стьюдента (для независимых групп) | $t$ = 0.32 $P$ = 0.7481 | $t$ = 1.07 $P$ = 0.2908 | $t$ = 0.13 $P$ = 0.8964 | $t$ = 1.54 $P$ = 0.1313 |

В течение 45 мин проводили тренировочную сессию – как только моллюск приступал к лёгочному дыханию, при помощи заострённого аппликатора проводили тактильное раздражение области пневмостома, вызывающее прекращение респирации. Контрольную группу не подвергали тактильной стимуляции. После тренировочной сессии моллюсков перемещали в аквариумы, в которых они содержались постоянно. В 1-й день проводили три сессии (№№ 1–3), разделённые часовым перерывом. Сессии во 2-й (№№ 4–6) и 3-й (№№ 7–9) дни осуществляли по схеме для 1-го дня. Регистрировали количество попыток лёгочного дыхания в каждой сессии. До начала сессий №№ 1–3 регистрировали показатели лёгочного дыхания в опытной и контрольной группах. Оценку вызванных обучением изменений дыхательной активности проводили индивидуально по каждому моллюску на следующий день после окончания сессий №№ 7–9 (4-й день эксперимента). Параллельно отмечали параметры лёгочной респирации у животных контрольной группы. Критериями формирования инструментального навыка служили: снижение числа попыток лёгочного дыхания по ходу тренировочных сессий для опытной группы и различия по общей длительности и частоте дыхания до и после проведения тренировочных сессий у опытной группы в сочетании с отсутствием таковых для контроля.

*Приготовление препаратов изолированной нервной системы*. Животных наркотизировали (5 мин в 0,2 М растворе $MgCl_2$) и фиксировали на дне препаративной ванночки. Вскрывали висцеральный синус, пинцетом и иглами удаляли основную массу покрывающих ЦНС соединительно-тканных оболочек, пе-

перерезали все нервы, связывающие центральное кольцо ганглиев с периферией. Изолированную ЦНС обрабатывали раствором проназы (Protease E, type XIV, Sigma, США) – 1 мг/мл в течение 5 мин при 20 $^{o}$C. К регистрации электрической активности нейронов приступали после отмывки препарата ЦНС свежим физиологическим раствором (время отмывки – не менее 30 мин). Подготовленные препараты переносили в экспериментальную термостатируемую камеру (объём 200 мкл), обеспечивающую поддержание температурного режима, соответствующего температуре содержания животных в аквариумах (20 ± 1 $^{o}$C).

Для работы с препаратами нервной системы использовали нормальный физиологический раствор (раствор Рингера) для *Lymnaea stagnalis* следующего состава (мМ): NaCl – 44; KCl – 1,7; $CaCl_2$ – 4; $MgCl_2 \times 6\ H_2O$ – 1,5; HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'2-этансульфоновая кислота) – 10, pH 7,6 ± 0,02. Для блокады химической синаптической передачи использовали безкальциевый/высокомагниевый физиологический раствор Рингера (не содержит $Ca^{2+}$, а концентрация $Mg^{2+}$ увеличена в 6 раз по сравнению с нормальным раствором).

*Идентификация и регистрация электрической активности нервных клеток*. Гигантский дофаминергический нейрон правого педального ганглия (R.Pe.D.1) идентифицировали по его расположению, размеру, цвету, электрофизиологическим показателям [Benjamin & Winlow, 1981]. Регистрацию спонтанной электрической активности R.Pe.D.1 осуществляли при помощи внутриклеточных микроэлектродов. Микропипетки изготавливали, используя печь для вытягивания микроэлектродов KOPF Vertical pipette puller, Model 720 (David Kopf Instruments, USA). Их заполняли 2,5 М раствором KCl (сопротивление 10–20 MΩ), связывая при помощи агарового мостика с Ag/AgCl-электродами. Усиление внутриклеточных сигналов, подача де- или гиперполяризующих импульсов тока осуществляли с помощью микроэлектродного усилителя МС-01М (Линтех, Беларусь). Электрические сигналы нейронов после предварительной оцифровки записывали на жесткий диск компьютера. Текущий мониторинг, запись и последующий обсчёт сигналов осуществляли при помощи программы электронного осциллографа InputWin [Солтанов и Бурко, 2005].

*Анализируемые показатели электрической активности R.Pe.D.1*. Оценивали значения потенциала покоя и частоты импульсации (как среднее по 4-м временным интервалам по 30 с каждый при анализе записи длительностью 2 мин). Временны́е и амплитудные характеристики спонтанных потенциалов действия (ПД) определяли как среднее для 3-х произвольно выбранных спайков нейронограммы. Оценивали длительность и амплитуду потенциала действия и отдельных его фаз (см. рисунок 1). Для построения кривой вольт-амперной характеристики (ВАХ) мембраны последовательно подавали импульсы гипер- и деполяризующего тока (от минус 2 до плюс 2 нА, с шагом 0,5 нА) и длительностью 3 с, одновременно фиксируя значение мембранного потенциала R.Pe.D.1.

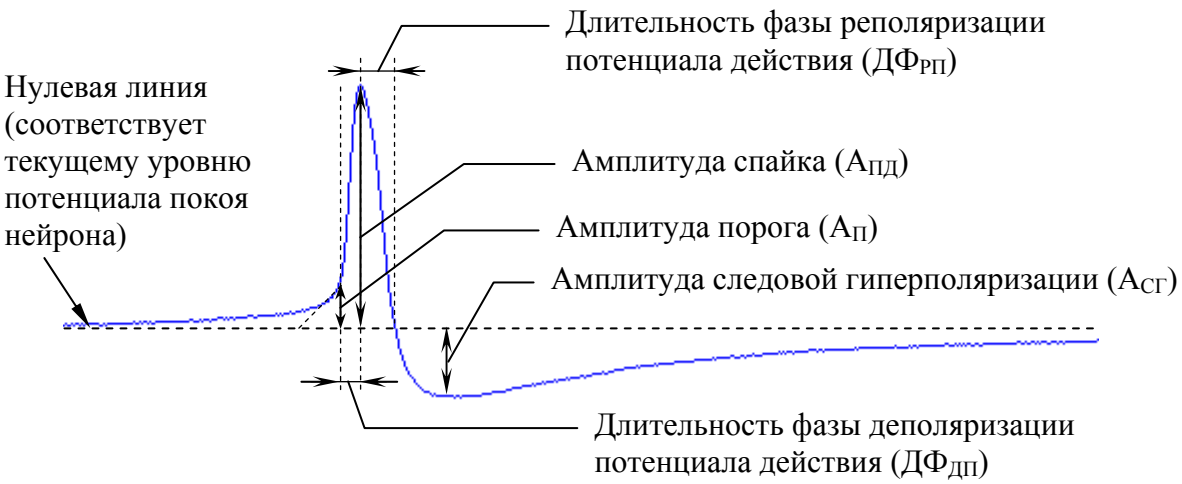



**Рисунок 1. – Временны́е и амплитудные характеристики R.Pe.D.1**

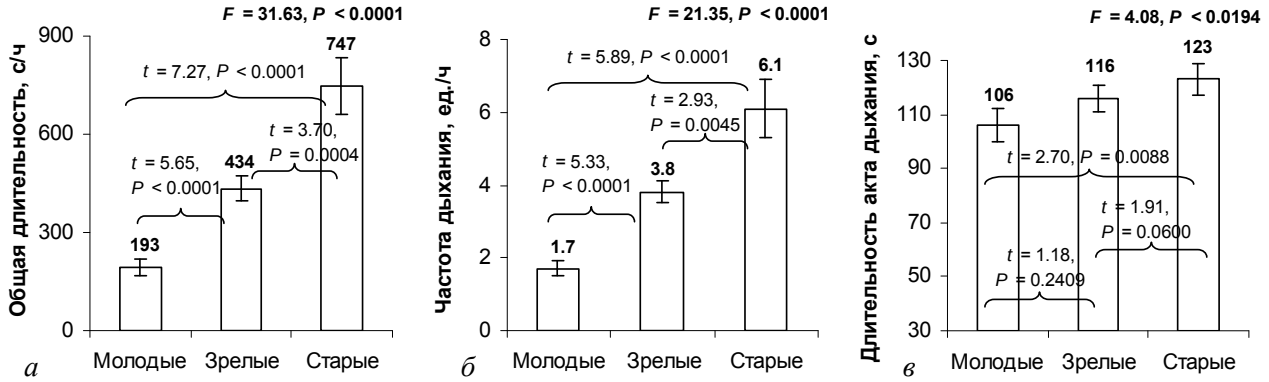
*Анализ активности супероксиддисмутазы*. После проведения электрофизиологического тестирования центральное кольцо и буккальные ганглии замораживали и хранили (не более 2-х месяцев) при минус 70 $^{o}$C до использования. Гомогенат пробы готовили на основе холодного (4 $^{o}$C) раствора Рингера. Активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1.) определяли спектрофотометрически, на основании оценке скорости аутоокисления флавоноида кверцетина [Kostyuk & Potapovich, 1989]. Определение количества белка проводили по методу Бредфорд [Bradford, 1976]. Биохимические исследования выполнены с использованием спектрофотометра Cary 50 (Variant Inc., Австралия).

*Статистическая обработка данных*. Экспериментальные данные обрабатывались общепринятыми методами медико-биологической статистики [Рокицкий, 1973; Гланц, 1998]. Нормальность распределения предварительно оценивали при помощи *W*-теста Шапиро–Уилка. Число наблюдений (*n*) указано для каждой серии отдельно. Данные представлены в виде $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$. Достоверность оценивали при помощи *t*-критерия Стьюдента для зависимых или независимых пар (сравнение 2-х выборок), критерия соответствия $\chi^2$ (сравнение 2-х эмпирических распределений), *F*-критерия Фишера (дисперсионный анализ по однофакторной схеме, one-way ANOVA, или для повторных измерений, repeated measures ANOVA, при сравнении нескольких групп). Данные обрабатывали посредством статистических возможностей программ MS Excel 2003 и Statistica 6.0. Достоверными считались результаты при уровне значимости (*P*) меньшем 0,05.

## Возрастные и пластические перестройки лёгочного дыхания моллюска *Lymnaea stagnalis*

Классический дыхательный цикл прудовика – это комплекс стереотипных движений, начиная от перемещения к поверхности воды, поворота раковины, торможения локомоции, открытия пневмостома, приводящего к вентиляции лёгкого, его закрытия и оставления водной глади [Syed, e.a., 1991; Moroz, 1991].

Установлено, что с возрастом наблюдается интенсификация легочной респирации (рисунок 2), выражающаяся в равновеликом (в 2,2 раза) увеличении частоты дыхания и общей длительности лёгочной респирации у зрелых особей по сравнению с их молодыми сородичами. Различия в длительности отдельного респираторного акта были не столь заметны. Структура дыхательной активности (распределение дыхательных актов по длительности) с возрастом оставалась неизменной – мода во временном интервале от 1 до 2 мин.

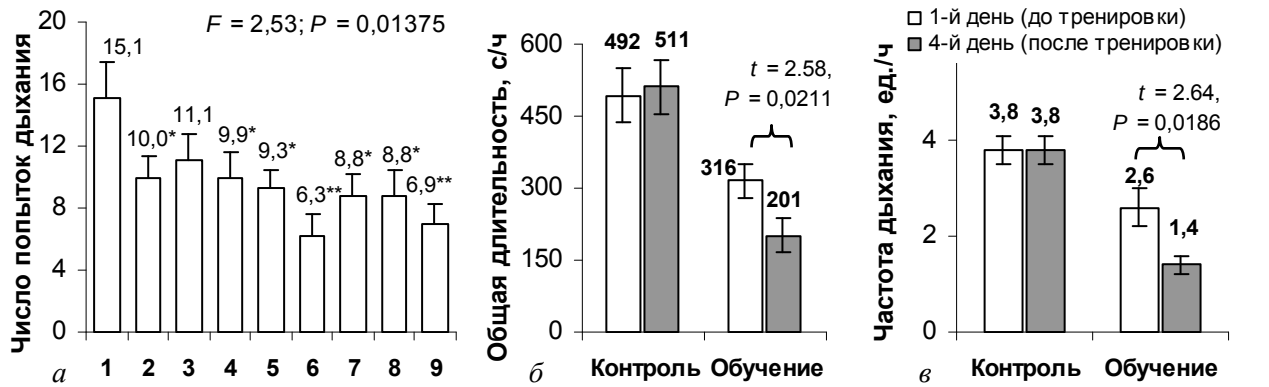



Числа над столбиками диаграммы – значение показателя. Фигурные скобки даны для пар сравнения. Приведены данные (*F*-критерий и *P*) по дисперсионному анализу (one-way ANOVA).
*а* – общая длительность, *б* – частота, *в* – длительность отдельного респираторного акта

**Рисунок 2. – Показатели лёгочного дыхания у моллюсков разных возрастных групп**

Положительная корреляция между общей длительностью и частотой лёгочного дыхания сохранялась у моллюсков всех возрастов, а между общей длительностью и продолжительностью респираторного акта уменьшалась, исчезая в старшей возрастной группе. С другой стороны, для этой возрастной группы отмечено наличие отрицательной взаимосвязи между частотой и длительностью респираторного акта, отсутствующей у молодых и зрелых особей.

Стойкая выработка инструментального навыка происходит ко 2-м сут (4-й тренировочной сессии) после начала обучения, сохраняясь на протяжении всех последующих сессий (рисунок 3).

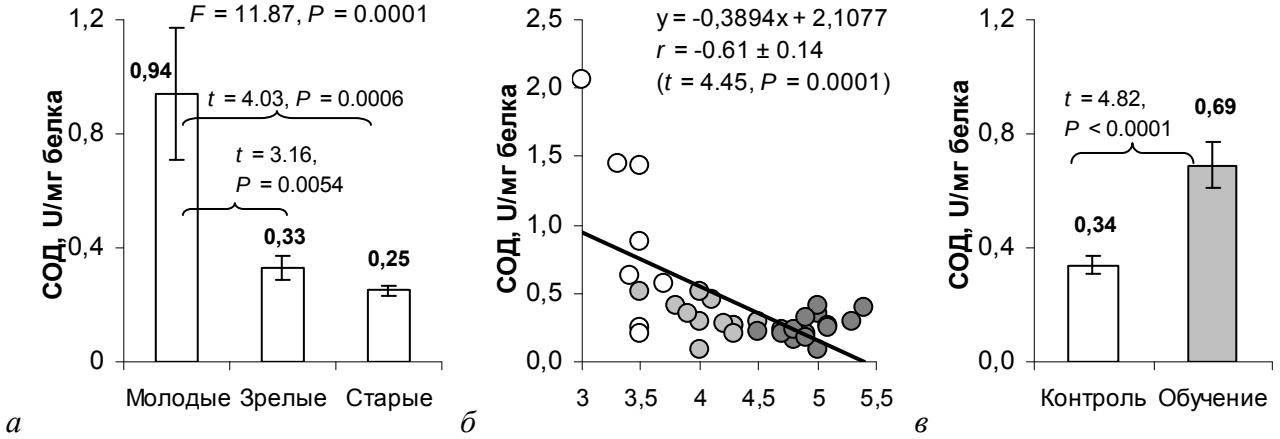



Числа над столбиками диаграммы – значение показателя. * – ($P < 0,05$), ** – ($P < 0,01$) различия статистически достоверны (*t*-критерий) по сравнению с показателем 1-й тренировочной сессии (*а*).
*а* – динамика обучения, *б* – общая длительность, *в* – частота дыхания

**Рисунок 3. – Лёгочное дыхание при формировании инструментального навыка**

По сравнению с начальными условиями, у животных опытной (обучение) группы отмечено падение (в 1,9 раза) частоты и снижение (в 1,6 раза) общей длительности легочного дыхания. Различий в распределении дыхательных актов по их длительности, а также продолжительности отдельного респираторного акта отмечено не было. Изменений в характере взаимосвязи между показателями лёгочного дыхания у опытной и контрольной группы не было выявлено.

С возрастом отмечается статистически достоверное снижение, а обучение приводит к 2-кратному возрастанию активности СОД в нервной системе (рисунок 4). Для животных младшей возрастной группы значения были в 2,8 и 3,8 раза выше в сравнении с группами зрелых и старых моллюсков соответственно. Достоверных отличий между зрелыми и старыми особями отмечено не было.




Числа над столбиками диаграммы – значение показателя (*а*, *в*). Светлые круги – молодые, светло-серые – зрелые, тёмно-серые – старые особи (*б* – взаимосвязь между активностью СОД и возрастом (высотой раковины, см) животного). Каждый круг – данные по одному моллюску. Представлены линия тренда и уравнение линейной регрессии (*y*), число пар сравнения (*n*) = 35.

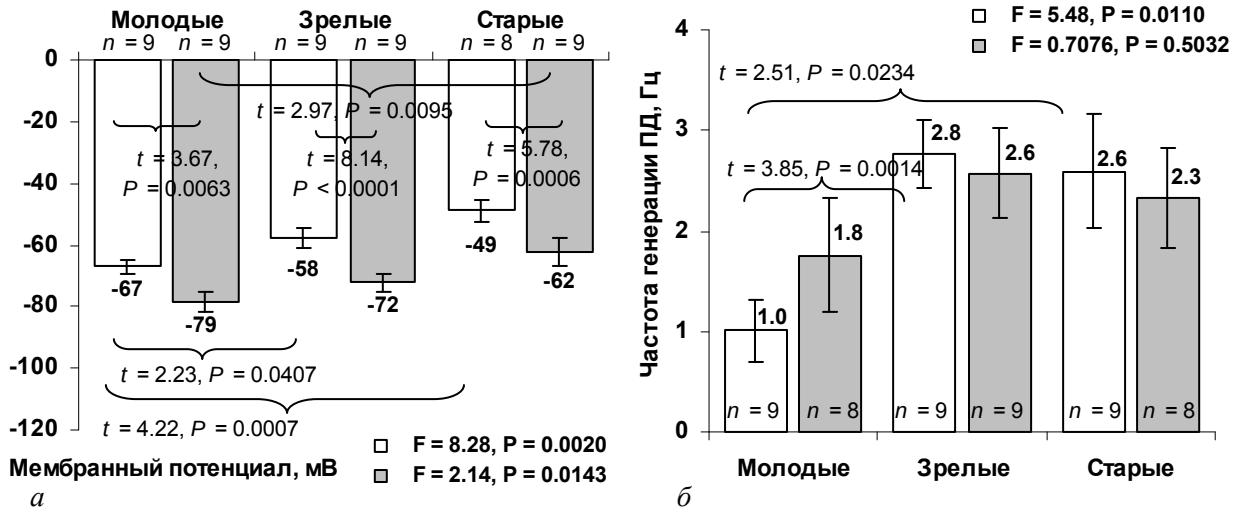
**Рисунок 4. – Активность СОД в ЦНС *Lymnaea* у животных разных возрастов (*а*, *б*) и при формировании инструментального навыка (*в*)**

Таким образом, возрастные перестройки лёгочного дыхания связаны с изменением как частотных, так и временны́х характеристик дыхательного цикла, а пластические – ассоциируются лишь с изменением частоты лёгочного дыхания. Повышение активности СОД у моллюсков младших возрастов и у животных с сформированным инструментальным навыком может говорить о том, что АФК являются одними из регуляторов, определяющих поведение нейронных сетей мозга беспозвоночных.

## Возрастные и пластические перестройки электрических характеристик мембраны идентифицированного нейрона (R.Pe.D.1) дыхательной сети *Lymnaea stagnalis*

Полимодальный нейрон правого педального ганглия (R.Pe.D.1) содержит до 50 % от общего количества дофамина в ЦНС [Hetherington e.a., 1994] и вовлечён в регуляцию нескольких моторных форм поведения – дыхательного [Syed e.a., 1991], локомоторного [Цыганов, 2000], оборонительного [Sakharov, 1991].

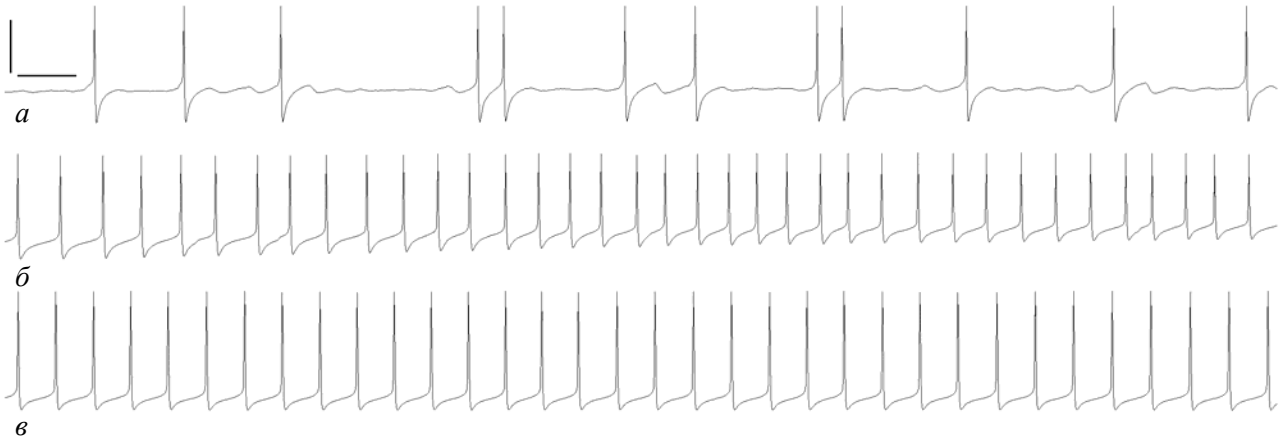
С возрастом отмечается статистически достоверное уменьшение трансмембранной разности потенциалов (деполяризация на величину около 10 мВ для каждой старшей возрастной группы по отношению к младшей), сопровождаемой возрастанием частоты спонтанной импульсации R.Pe.D.1 (рисунки 5, 6).




Числа под столбиками диаграммы – значение показателя. Фигурные скобки даны для статистически достоверных пар сравнения. Приведены данные (*F*-критерий и *P*) по дисперсионному анализу по однофакторной схеме (one-way ANOVA) и количество исследованных нейронов (*n*). Светлые столбики – нормальный, светло-серые – безкальциевый /высокомагниевый раствор Рингера.

**Рисунок 5. – Потенциал покоя (*а*) и спайковая активность (*б*) нейрона R.Pe.D.1 у моллюсков разных возрастных групп**

Наибольшие различия отмечены при парном сравнении данных по группам молодых и зрелых и/или старых моллюсков. В безкальциевых условиях инкубации препаратов ЦНС отмечается гиперполяризация R.Pe.D.1 у животных всех возрастных групп. При этом статистических различий, по данным дисперсионного анализа, в отношении частоты спонтанных потенциалов действия у моллюсков разных возрастов отмечено не было.

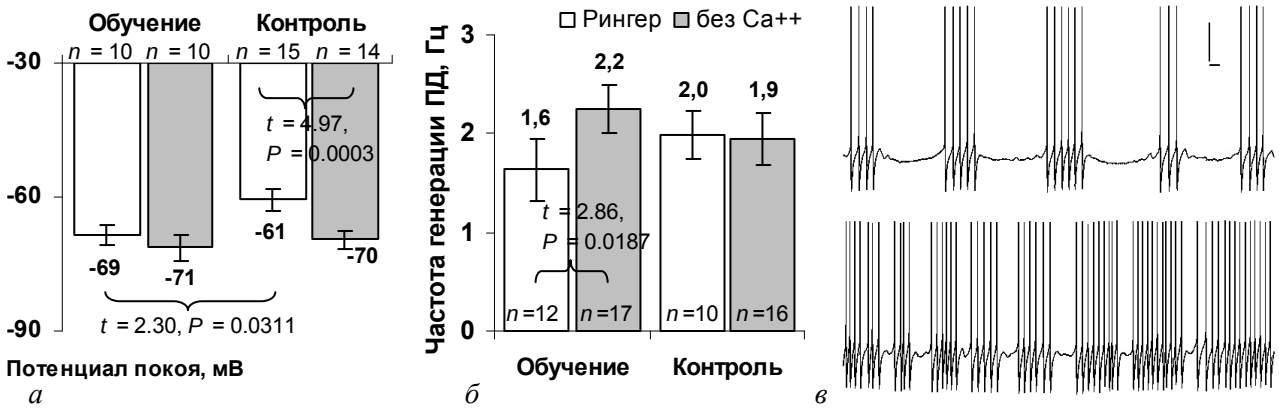



Калибровка: 0,5 с (по времени), 40 мВ (по амплитуде). Регистрации *а–в* – разные препараты ЦНС. *а* – молодые, *б* – зрелые, *в* – старые особи

**Рисунок 6. – Нейронограммы спонтанной электрической активности R.Pe.D.1 у животных разных возрастных групп**

Корреляционный анализ выявил взаимосвязь потенциала покоя и частоты генерации потенциала действия R.Pe.D.1 с высотой раковины (возрастом) животного ($r$ = –0,54±0,17, $t$ = 3,14, $P$ = 0,0044 и $r$ = 0,39±0,18, $t$ = 2,09, $P$ = 0,0469 соответственно) и общей активностью СОД в ЦНС ($r$ = –0,46±0,20, $t$ = 2,33, $P$ = 0,0301 и $r$ = –0,39±0,20, $t$ = 2,01, $P$ = 0,0573 соответственно). Статистически достоверной корреляции с показателями лёгочного дыхания *Lymnaea*, для всей исследованной выборки, отмечено не было.

Обучение приводит к гиперполяризации R.Pe.D.1 на величину порядка 10 мВ по сравнению со значением у животных контрольной группы (рисунок 7 *а*). В условиях блокады химической синаптической передачи в препаратах ЦНС животных контрольной группы отмечено возрастание уровня мембранного потенциала, а у моллюсков опытной группы (обучение) он остаётся неизменным. Как следствие, – различия в потенциале покоя у животных двух групп не были статистически достоверными ($t$ = 0,47, $P$ = 0,6447). Формирование инструментального навыка не приводит к статистически достоверному изменению частоты спонтанной импульсации R.Pe.D.1, однако в безкальциевой среде отмечается возрастание (в 1,4 раза) частоты генерации потенциалов действия по сравнению с нормальными условиями инкубации препаратов ЦНС (рисунок 7 *б*, *в*).




Числа под столбиками диаграммы – значение показателя. Фигурные скобки даны для статистически достоверных пар сравнения. Приведено количество исследованных нейронов (*n*). Калибровка (*в*): 0,5 с (по времени), 20 мВ (по амплитуде). Верхняя линия регистрации – нормальный, нижняя – безкальциевый/высокомагниевый раствор Рингера (для одного и того же препарата). *а* – потенциал покоя, *б* – частота потенциала действия, *в* – нейронограмма спонтанной активности

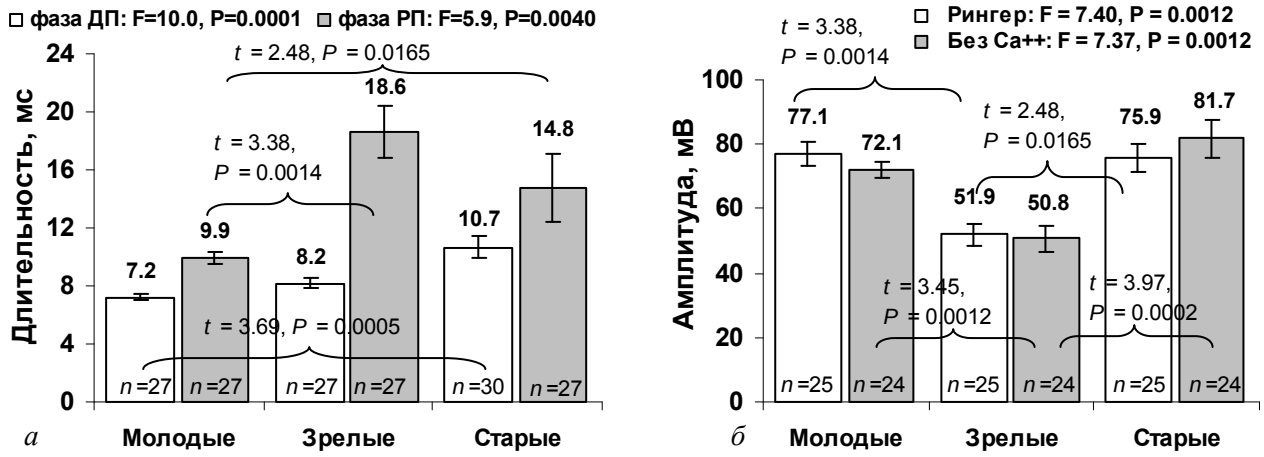
**Рисунок 7. – Электрическая активность нейрона R.Pe.D.1 после выработки инструментального условного рефлекса**

Для моллюсков старшей возрастной группы отмечен статистически достоверный сдвиг кривой вольт-амперной характеристики мембраны R.Pe.D.1 вправо в области отрицательных токов по сравнению с молодыми особями ($F$ = 2,75, $P$ = 0,0362). Обучение не приводит к смещению кривой ВАХ по сравнению с контролем ни в нормальных ($F$ = 0,28, $P$ = 0,9730), ни в безкальциевых ($F$ = 0,75, $P$ = 0,6509) условиях инкубации препаратов ЦНС.

## Возрастные и пластические перестройки временны́х и амплитудных характеристик спонтанных потенциалов действия идентифицированного нейрона (R.Pe.D.1) дыхательной сети *Lymnaea stagnalis*

Нейрон R.Pe.D.1 относится к клеткам пейсмейкерного типа, формирование ритмической активности которых определяется двумя классическими механизмами. Первый из них обусловлен поддержанием уровня потенциала покоя и определяется потоками $K^+$ [Hodgkin & Huxley, 1947], а второй – скоростью деполяризации мембраны, предполагающий вовлечение $Na^+$ [Tazerart e.a., 2008].

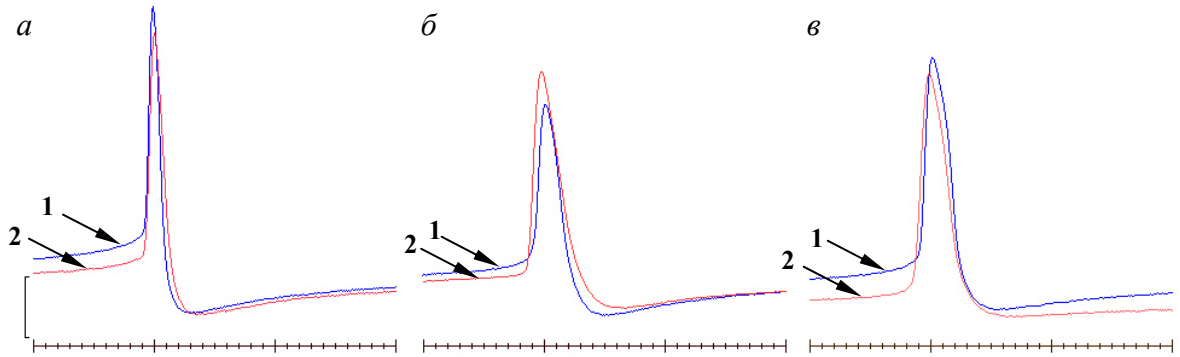
С возрастом отмечается статистически достоверное возрастание длительности фаз деполяризации (ДП) и реполяризации (РП) спонтанных потенциалов действия (ПД) R.Pe.D.1 (рисунки 8 *а*, 9).




Числа над столбиками диаграммы – значение показателя. Фигурные скобки даны для статистически достоверных пар сравнения. Число нейронов для анализа: 9 (молодые), 9 (зрелые) и 10 (старые). *а* – длительность фаз потенциала действия, *б* – амплитуда потенциала действия

**Рисунок 8. – Длительность фаз де- и реполяризации потенциала действия нейрона R.Pe.D.1 у моллюсков разных возрастных групп**

В безкальциевых условиях возрастание длительности фазы ДП отмечено у зрелых, а фазы РП – у молодых и старых моллюсков (рисунок 9).

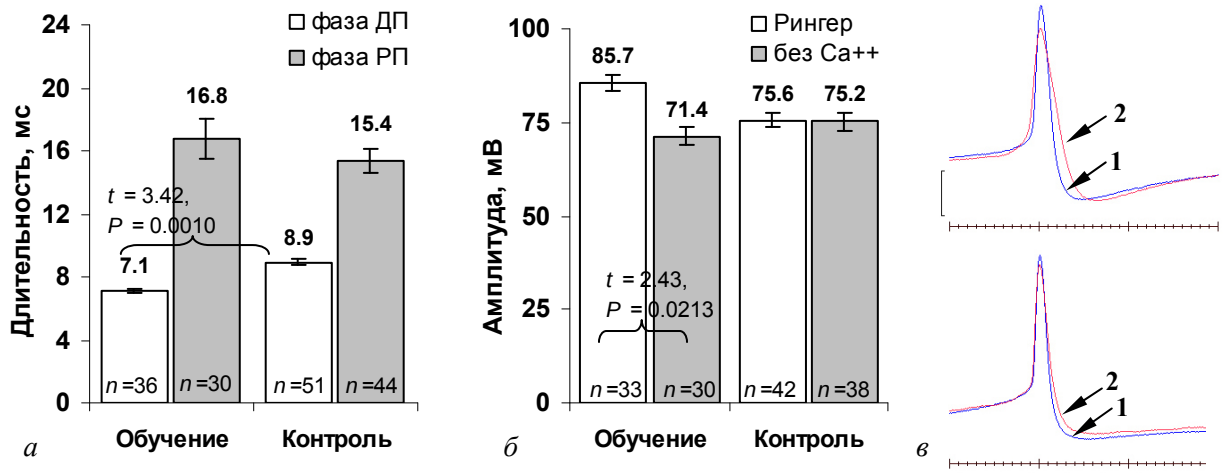



Калибровка: 50 мс (по времени, большие деления), 15 мВ (по амплитуде). Наложение двух потенциалов (1 – нормальный, 2 – безкальциевый раствор). Регистрации *а–в* – разные препараты ЦНС. *а* – молодые, *б* – зрелые, *в* – старые особи

**Рисунок 9. – Спонтанные потенциалы действия R.Pe.D.1 у животных разного возраста**

Возрастные изменения амплитудных показателей ПД нейрона R.Pe.D.1 не носили линейного характера – наименьшие значения амплитуд ПД, следовой гиперполяризации и порога отмечено для зрелых особей (рисунки 8 *б*, 9).

Обучение приводит к уменьшению (в 1,3 раза) длительности фазы ДП нейрона R.Pe.D.1, оставляя неизменной длительность фазы РП (рисунок 10). В безкальциевой среде, различия в длительности фазы ДП у животных опытной и контрольной групп не были статистически достоверными ($t$ = 0,47, $P$ = 0,6447).




Калибровка: 50 мс (по времени, большие деления), 15 мВ (по амплитуде). Наложение 2-х спайков: 1 – нормальный, 2 – безкальциевый раствор; вверху – обучение, внизу – контроль (разные препараты). *а* – длительность потенциала действия, *б* – амплитуда ПД, *в* – нейронограмма спайка

**Рисунок 10. – Спонтанные потенциалы действия R.Pe.D.1 у животных после выработки инструментального условного рефлекса**

Обучение не приводит к статистически достоверному изменению амплитуд потенциала действия (ПД) ($t$ = 1,93, $P$ = 0,0573), следовой гиперполяризации (СГ) ($t$ = 0,57, $P$ = 0,5997) и порога генерации ПД ($t$ = 0,43, $P$ = 0,6656).

## Возрастные и пластические перестройки нейронной сети лёгочного дыхания *Lymnaea stagnalis*

С возрастом отмечается изменение лёгочного дыхания *Lymnaea* и эти перестройки ассоциируются с соответствующей модификацией свойств одного из нейронов дыхательной сети (R.Pe.D.1). Старение нервных клеток может рассматриваться как установление их нового функционального состояния, а, следовательно, возрастные изменения нейронных функций могут быть скорректированы поведенческим репертуаром особи. Кроме того, действенная модификация электрических характеристик мембраны нейрона наблюдается и в ходе тренировки того или иного навыка. Фактически, реакции со стороны R.Pe.D.1 направлены на достижение оптимального приспособительного результата для организма *Lymnaea*, в соответствии с положением теории функциональных систем П.К. Анохина. В этом контексте, изменение электрофизиологических характеристик нейрона R.Pe.D.1 представляет собой *функциональную* адаптацию со стороны ЦНС (дыхательной сети) к новым условиям существования.

# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**Основные научные результаты диссертации**

1. По мере старения, у моллюска *Lymnaea stagnalis* отмечается прогрессивное возрастание общей длительности лёгочного дыхания ($r = 0{,}56$), выражающееся в увеличении как его частоты ($r = 0{,}50$), так и протяжённости отдельного респираторного акта ($r = 0{,}23$). Снижение суммарной длительности лёгочного дыхания (в 1,6 раза) в результате формирования инструментального навыка реализуется лишь за счёт уменьшения (в 1,9 раза) частоты лёгочного дыхания. С возрастом меняется и характер взаимосвязи между показателями дыхания. Положительная корреляция между общей длительностью и частотой отмечена у животных всех возрастов, а между длительностями отдельного респираторного акта и легочного дыхания – у младшей и средней возрастных групп. Для моллюсков старшей возрастной группы характерно наличие отрицательной взаимосвязи между частотой дыхания и длительностью респираторного акта. Обучение не приводит к изменению характера взаимосвязи между показателями лёгочного дыхания. С возрастом отмечается снижение ($r = –0{,}61$), а обучение, напротив, ассоциируется с возрастанием (в 2 раза) активности СОД в ЦНС *Lymnaea* [1, 3, 5–9].

2. С возрастом отмечается деполяризация мембраны ($r = –0{,}54 \pm 0{,}17$) гигантского дофаминергического нейрона дыхательной сети ЦНС *Lymnaea* (R.Pe.D.1) на фоне возрастания частоты его спонтанной импульсации ($r = –0{,}39$). Для моллюсков младшей возрастной группы отмечен сдвиг кривой вольт-амперной характеристики влево, в области отрицательных токов, что способствует поддержанию тормозного контроля в отношении «молодых» нейронов R.Pe.D.1 со стороны других клеток сети посредством активации тормозных синаптических входов. В условиях блокады химической синаптической передачи, при использовании безкальциевого/высокомагниевого раствора Рингера, указанный характер возрастных изменений электрической активности R.Pe.D.1 сохранялся лишь в отношении потенциала покоя ($r = –0{,}45$), но не частоты генерации потенциала действия ($r = 0{,}06$). Указанные перестройки обусловлены как внутриклеточными механизмами (в отношении мембранного потенциала), так и характером межнейронных взаимодействия (в отношении частотных характеристик нейрона) [2, 4, 6, 9, 13].

3. Формирование инструментального навыка вызывает снижение возбудимости R.Pe.D.1, выражающееся в гиперполяризации клетки на фоне остающихся неизменными частоты спонтанной импульсации и вольт-амперной характеристики мембраны. В условиях блокады химической синаптической передачи у животных опытной (обучение) группы отмечается возрастание частоты генерации потенциала действия (в 1,4 раза) R.Pe.D.1. Уровень мембранного по-

тенциала R.Pe.D.1 остаётся неизменным по сравнению с таковым для контрольных особей. В совокупности, эти данные свидетельствуют о синаптическом характере отмеченных изменений показателей электрической активности R.Pe.D.1 при обучении [2, 11, 12].

4. С возрастом отмечается увеличение длительности фаз де- и реполяризации спонтанных потенциалов действия R.Pe.D.1. Амплитудные характеристики спайка (общая амплитуда, амплитуды порога и следовой гиперполяризации) статистически достоверно не различались у животных «крайних» возрастных групп. Формирование инструментального навыка приводит к уменьшению (в 1,3 раза) длительности фазы деполяризации на фоне остающихся неизменными других изученных временны́х и амплитудных характеристик потенциала действия. Рассмотренные изменения могут быть связаны с модуляцией свойств трансмембранных белков (ионных каналов), ответственных за формирование и генерацию электрических сигналов нервными клетками [2, 6, 9, 11, 12].

5. Наблюдаемые в ходе возрастных и пластических перестроек изменения электрической активности нейрона R.Pe.D.1 служат реализации стереотипного комплекса дыхательного поведения *Lymnaea stagnalis* с новоприобретёнными характеристиками, обеспечивая, тем самым, *оптимальный* приспособительный результат, направленный на удовлетворение потребностей организма моллюска в кислороде. Итоговый паттерн активности нейронной сети лёгочной респирации в ЦНС прудовика с возрастом и при обучении, связан с формирующимся окислительно-восстановительным балансом в нервной ткани, определяющим уровень АФК в мозге [1, 2, 4, 5, 8–12].

**Рекомендации по практическому использованию результатов**

Разработанная модель оценки электрических свойств мембраны дофаминсодержащих клеток мозга беспозвоночных позволяет выявить характер их изменения с возрастом, а также определить взаимосвязь с перестройками поведенческой активности животных. Экспериментальные подходы для анализа временны́х и амплитудных показателей спайка в идентифицированных клетках мозга прудовика, дают возможность провести первоначальную оценку влияния различных раздражителей на транспортные системы мембраны, определяющие развитие спайка. Доступность модели (препараты изолированной нервной системы) позволяет рекомендовать её для решения научно-практических задач нейрофизиологии и нейрофармакологии, в том числе для первоначального скрининга препаратов, обладающих потенциальной ноотропной активностью, а также нейропротекторным действием в отношении дофаминергических клеток мозга.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры физиологии человека и животных БГУ (акт № 0304/620). Они могут найти применение в учреждениях образования, обеспечивающих подготовку специалистов по био-

логическим и экологическим специальностям, быть использованными при чтении курсов «Физиология человека и животных», «Биофизика», курсам цикла наук о мозге («Нейрофизиология», «Нейрохимия», «Нейроиммунология», «Фармакология»), выполнении курсовых, дипломных, магистерских проектов, подготовки специалистов высшей научной квалификации.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Статьи в научных журналах:**

1. Сидоров, А.В. Корреляция между лёгочным дыханием и активностью супероксиддисмутазы в центральной нервной системе у моллюска Lymnaea stagnalis при научении / А.В. Сидоров, **А. ЭльРахал**, Г.Т. Маслова // Вестн. БГУ. Сер.2. Химия, Биология, География. – 2015. – № 1. – С. 43–47.

2. **ЭльРахал, А.** Взаимосвязь между показателями лёгочного дыхания и электрическими характеристиками идентифицированного нейрона респираторной сети моллюска Lymnaea stagnalis / А. ЭльРахал, А.В. Сидоров // Новости мед.-биол. наук (News of Biomed. Sci). – 2015. – Т. 11, № 1. – С. 5–8.

3. **ЭльРахал, А.** Взаимосвязь между показателями лёгочного дыхания моллюска Lymnaea stagnalis у животных разных возрастных групп / А. ЭльРахал, А.В. Сидоров // Вестн. БГУ. Сер.2. Химия, Биология, География. – 2015. – № 3. – С. 23–26.

4. Современные тенденции в научной деятельности кафедры физиологии человека и животных биологического факультета: клеточный и системный подходы / В.А. Костюк, А.И. Потапович, А. Албухайдар, С.А. Руткевич, Х.-А. Хруш, К.М. Люзина, А.В. Сидоров, М. Шахрани, **А. ЭльРахал**, А.Г. Чумак // Вестн. БГУ. Сер.2. Химия, Биология, География. – 2016. – № 3. – С. 3–12.

**Материалы конференций:**

5. **Эль Рахал, А.** Научение повышает супероксиддисмутазную активность в центральной нервной системе моллюска Lymnaea stagnalis / А. Эль Рахал, Г.Т. Маслова, А.В. Сидоров // Кислород и свободные радикалы: материалы республик. науч.-практ. конф. (13–14 мая 2014 г., Гродно, Беларусь) / под ред. В.В. Зинчука. – Гродно: ГрГМУ, 2014. – С. 214–217.

**Тезисы докладов:**

6. **Эль-Рахал, А.** Возрастные изменения электрических характеристик идентифицированного дофаминергического нейрона ЦНС и легочного дыхания моллюска Lymnaea stagnalis / А. Эль-Рахал, А.В. Сидоров // VI International Congress of the Ukrainian Society for Neuroscience: Program & Abstracts, Kyiv, June 4–8, 2014 / NAS of Ukraine, Bogomoletz Institute of Physiology. – Kyiv, 2014. – С. 122.

7. **Эль-Рахал, А.** Возрастные особенности лёгочного дыхания моллюска Lymnaea stagnalis / А. Эль-Рахал, А.В. Сидоров // Кровообращение в норме и при патологии – от Гарвея до трансплантации сердца: мат-лы межд. конф-и, Минск, 16–17 окт. 2014 / Новости мед.-биол. наук (News of Biomed. Sci). – 2014. – Т. 10, № 3. – С. 56.

8. **Эль-Рахал, А.** Возрастные изменения активности супероксиддисмутазы в центральной нервной системе моллюска Lymnaea stagnalis / А. Эль-Рахал, Г.Т. Маслова, А.В. Сидоров // Свободные радикалы в химии и жизни: сб. тез. докл. Междунар. конф., Минск, 25–26 июня 2015 г. Free Radicals in Chemistry and Life : Book of Abstracts of the International Conference, Minsk, June 25–26, 2015. – Минск : Изд. Центр БГУ, 2015. – С. 162–163.

9. Sidorov, A.V. Age-associated changes in electrical properties of identified neuron (RPeD1) and respiratory network function in Lymnaea / A.V. Sidorov, **A. ElRahal**, G.T. Maslova // 13th Symposium on Invertebrate Neurobiology. August, 26-30, Tihany, Hungary. Program and Abstracts / Tihany: Balaton Limnological Institute, Hungarian Academy of Sciences, 2015. – P. 63.

10. **Эль-Рахал, А.** Возрастание интенсивности перекисного окисления липидов в ЦНС моллюска Lymnaea stagnalis с возрастом / А. Эль-Рахал , Г.Т. Маслова, А.В. Сидоров // Нейрофизиология боли в эксперименте и клинике: мат-лы межд. конф-и, Минск, 16 окт. 2015 / Новости мед.-биол. наук (News of Biomed. Sci). – 2015. – Т. 12, № 3. – С. 65–66.

11. Сидоров, А.В. Изменение электрических характеристик дофаминсодержащего нейрона нервной системы моллюска Lymnaea stagnalis при формировании инструментального условного рефлекса / А.В. Сидоров, **А. Эль-Рахал** // Нейроэндокринология – 2015. IX Всероссийская конференция, посвящается 90-летию А.Л. Поленова (1925–1996): Мат-лы конф-и, Ст.-Петербург, 27–29 окт. 2015 / С.-Пб.: ИД Петрополис, 2015. – С. 126–127.

12. Sidorov, A.V. Electrical properties of identified neuron (RPED1) after operant conditioning of aerial respiration in Lymnaea / A.V. Sidorov, **A. ElRahal** // Simpler Nervous Systems: XI East European Conference of the International Society for Invertebrate Neurobiology Abstracts. Zvenigorod, 15–19 May, 2016 / Moscow: Institute of Highest Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, 2016. – P. 76.

13. Шахрани, М. Вольт-амперная характеристика мембраны центрального дофаминергического нейрона модельного нейробиологического объекта при различных видах стресса / М. Шахрани, **А. ЭльРахал**, А.В. Сидоров // Стресс как этиологический фактор болезней человека: Мат-лы межд. конф-и, Минск, 14 окт. 2016 / Новости мед.-биол. наук (News of Biomed. Sci). – 2016. – Т. 14., № 3. – С. 99–100.

# РЕЗЮМЕ

**ЭльРахал Али Альхашми Юсеф**

## Нейронные механизмы дофаминергического контроля возрастных и пластических перестроек дыхательного поведения *Lymnaea stagnalis*

**Ключевые слова:** нейрон, старение, инструментальный рефлекс, лёгочное дыхание, электрические характеристики мембраны, активные формы кислорода (АФК), моллюск.

**Цель исследования:** выявить клеточные механизмы, определяющие формирование дыхательного ритма в ЦНС модельного нейробиологического объекта, моллюска *Lymnaea stagnalis* с возрастом и при обучении.

**Методы исследования:** физиологические, биохимические, статистические.

**Использованная аппаратура:** компьютеризированная электрофизиологическая установка (усилитель МС-01М, программа электронного осциллографа InputWin), спектрофотометр Cary-50.

**Полученные результаты и их новизна:** впервые, у животных разных возрастных групп, исследованы показатели дыхательного поведения *Lymnaea stagnalis* и установлены особенности его лёгочного дыхания при старении. Выявлены и оценены изменения электрических характеристик мембраны, временны́х и амплитудных характеристик спонтанных потенциалов действия гигантского дофаминергического нейрона из состава дыхательной сети ЦНС *Lymnaea* (R.Pe.D.1) с возрастом и при обучении. Установлено, что с возрастом отмечается прогрессивное возрастание, а формирование инструментального навыка, наоборот, вызывает снижение возбудимости R.Pe.D.1, что опосредует соответствующие изменения (усиление и ослабление) лёгочного дыхания у моллюсков.

**Рекомендации по использованию:** разработанная модель оценки электрических свойств мембраны дофамин-содержащих клеток мозга беспозвоночных позволяет выявить характер их изменения с возрастом, а также определить взаимосвязь с перестройками поведенческой активности животных. Доступность модели позволяют рекомендовать её для первоначального скрининга препаратов, обладающих потенциальной ноотропной активностью, а также нейропротекторным действием в отношении дофаминергических клеток мозга.

**Область применения:** научно-исследовательские лаборатории по нейробиологии, фармакологии, биофизике, экологической, сравнительной и возрастной физиологии, учреждения образования биологического профиля.

# РЭЗЮМЭ

**ЭльРахал Алі Альхашмі Юсеф**

**Нейронныя механізмы дафамінэргічнага кантролю ўзростных і пластычных перабудоў дыхальных паводзін *Lymnaea stagnalis***

**Ключавыя словы:** нейрон, старэнне, інструментальны рэфлекс, лёгачнае дыханне, электрычныя характарыстыкі мембраны, актыўныя формы кісларода (АФК), малюск.

**Мэта даследавання:** выявіць клеткавыя механізмы, якія вызначаюць фарміраванне дыхальнага рытму у ЦНС мадэльнага нейрабіялагічнага аб'екта малюска *Lymnaea stagnalis* з узростам і пры навучанні.

**Метады даследавання:** фізіялагічныя, біяхімічныя, статыстычныя.

**Выкарыстаная апаратура:** кампутарызаваная электрафізіялагічная ўстаноўка (ўзмацняльнік МС-01М, праграма электроннага асцілографа Input-Win), спектрафатометр Cary-50.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна:** упершыню ў жывел розных узростных груп даследаваны паказальнікі дыхальных паводзін *Lymnaea stagnalis* і вызначаны асаблівасці яго лёгачнага дыхання пры старэнні. Выяўлены і адзначаны змяненні электрычных характарыстык мембраны, часовых і амплітудных характарыстык спантанных патэнцыялаў дзеяння гіганскага дафамінэргічнага нейрона з склада дыхальнай сеткі ЦНС *Lymnaea* (R.Pe.D.1) з узростам і пры навучанні. Устаноўлена, што з узростам адзначаецца прагрэсіўнае ўзрастанне, а фарміраванне інструментальнага навыка, наадварот, вызывае зніжэнне ўзбуджальнасці R.Pe.D.1, што ляжыць ў аснове адпавядаючых змяненняў (узмацнення або паслаблення) лёгачнага дыхання ў малюска.

**Рэкамендацыі па выкарыстанню:** распрацаваная мадэль ацэнкі электрычных асаблівасцей мембраны дафамінэргічных клетак мозга беспазваночных дазваляе выявіць характар іх змянення з узростам, а так сама вызначыць узаімасувязь з перабудовай паводзінавай актыўнасці жывел. Даступнасць мадэлі дае магчымасць рэкамендаваць яе для першапачатковага скрынінгу прэпаратаў, якія маяюць патэнцыяльна наатропную актыўнасць у адносінах дафамінэргічных клетак мозга.

**Галіна выкарыстання:** навукова-даследчыя лабараторыі па нейрабіялогіі, фармакалогіі, біяфізіцы, экалагічнай, параўнальнай і узроставай фізіялогіі, навучальныя ўстановы біялагічнага профілю.

# SUMMARY

**ElRahal Ali Alhashmi Yusef**

## Neuronal mechanisms of dopaminergic control of age-dependent and conditioning changes of respiratory behaviour of *Lymnaea stagnalis*

**Key words:** neuron, aging, operant conditioning, lung respiration, electrical properties of membrane, reactive oxygen species (ROS), mollusk

**Aim of research:** to identify the cellular basis underlies respiratory pattern generation in the CNS of the model neurobiological object, mollusk *Lymnaea stagnalis*, during aging and operant conditioning.

**Methods of research:** physiological, biochemical, statistical.

**Equipment used:** computerised electrophysiological setup (amplifier MC-01M, electron oscilloscope program InputWin ), spectrophotometer Cary-50.

**Results and their novelty:** for the first time, on three different age groups respiratory behaviour of *Lymnaea stagnalis* was analyzed. Membrane electrical properties, duration and amplitudes of different phases of spontaneous action potentials of giant identified dopamine-containing neuron of respiratory network within *Lymnaea* CNS (R.Pe.D.1) were detect and estimate. It was revealing that aging is associated with increase of R.Pe.D.1 excitability, while operant conditioning of lung respiration is accompanying by the decrease of excitability of mentioned above neuron. In these case, changes which occur on the neuronal level mediate the respiratory behavior pattern in mollusk.

**Recommendation for application:** developed model for the analysis of electrical properties of dopamine-containing neurons of invertebrate brain enable studying of age-dependent changes and their correlation with animal's behavioural pattern. Simplicity of this model allows it to be recommending for the initial drug screening with prospective nootropic and neuroprotective action within brain dopamine-containing cells.

**Field of application:** research laboratories in neurobiology, pharmacology, biophysics, ecological, comparative and general physiology, Institutes of higher education in Biology.

---

Подписано в печать 14.11.2017 Формат 60x84 1/16 Бумага офсетная
Гарнитура Roman Печать цифровая Усл.печ.л.1,3 Уч.изд.л. 1,4 Тираж 60 экз. Заказ № 2500
ИООО «Право и экономика» 220072 Минск Сурганова 1, корп. 2
Тел. 284 18 66, 8 029 684 18 66
E-mail: pravo-v@tut.by; pravo642@gmail.com Отпечатано на издательской системе
KONICA MINOLTA в ИООО «Право и экономика»
Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий, выданное
Министерством информации Республики Беларусь 17 февраля 2014 г.
в качестве издателя печатных изданий за № 1/185