

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра физиологии человека и животных

А. В. СИДОРОВ

**ОСОБЕННОСТИ
СТРОЕНИЯ И МЕТОДИКИ
ИЗУЧЕНИЯ ПОВЕДЕНИЯ
*LYMNÆA STAGNALIS***

Методические указания
по курсам

«Физиология межклеточной коммуникации»
для студентов специальности 1–31 01 01 «Биология»,
«Нейробиология» для студентов магистратуры
специальности 1-31 80 01 «Биология»



МИНСК
2017

УДК 591.044
ББК 28.66
С 34

Рекомендовано советом
биологического факультета
29 ноября 2017 г., протокол № 3

Р е ц е н з е н т
кандидат биологических наук, доцент
Ж. Е. Мелешко

Сидоров, А. В.
С 34 Особенности строения и методики изучения поведения
Lymnaea stagnalis : метод. указания / А. В. Сидоров. – Минск :
БГУ, 2017. – 15 с.

В данном издании изложены методики, применяемые для оценки поведенческой активности модельного нейробиологического объекта, пресноводного лёгочного моллюска *Lymnaea stagnalis* (прудовик обыкновенный). Предназначено для студентов, обучающихся по биологическим специальностям.

УДК 591.044
ББК 28.66

© БГУ, 2017

Одной из трудностей, открывшихся перед исследователями при анализе работы нейронных сетей высокоорганизованных животных (высшие позвоночные, включая человека), является их исключительная сложность. Зачастую нервные центры состоят из нескольких тысяч или даже миллионов клеток, а количество синаптических контактов при этом, по весьма приблизительным подсчетам, составляет как минимум величину на порядок большую. В такой ситуации составление полных карт связей между отдельными нейронами того или иного центра представляется весьма отдалённой перспективой, несмотря на предпринимаемые усилия (проект Connectome).

В отношении фундаментальных исследований в области нейробиологии одним из возможных решений указанных затруднений явилось широкое использование беспозвоночных животных с их относительно более просто организованной нервной системой в качестве модельных объектов. Очевидно, что изменения функциональной активности нервных клеток не могут не приводить к модификации поведенческой активности животных. Справедливо и обратное – изменение поведенческого репертуара незамедлительно сказывается на различных (электрических, морфологических) характеристиках нейронов. При этом под термином «поведение» следует понимать «все наблюдаемые процессы, посредством которых животное реагирует на воспринимаемые им изменения во внутреннем состоянии своего тела или во внешнем мире»¹. Очевидно, что оценка поведенческой активности является непрямым атрибутом работ нейрофизиологической направленности.

Одним из специфических требований, предъявляемых к модельным организмам, является доступность нейронов для электрофизиологического анализа. При этом большое значение приобретает размер нейроцитов – более крупные клетки удобнее для микроэлектродных методов исследования. Гигантские нейроны (размер сомы 100 мкм и более) описаны, преимущественно, в нервной системе беспозвоночных. Однако многие из них – морские организмы (*Aplysia californica*), что затрудняет их содержание в лаборатории, другие – не обладают достаточным разнообразием поведенческих реакций (*Caenorhabditis elegans*), третьи – организмы с малыми линейными размерами в сочетании со сложно организованным мозгом (*Drosophila melanogaster*). Очевидно, что для выбора объекта исследования необходимо сбалансированное решение. Одним из таких «идеальных» кандидатов, широко используемых в работах нейробиологической направленности, является пресноводный лёгочный моллюск – *Lymnaea stagnalis* (прудовик обыкновенный).

В этой связи, овладение методическими приемами, позволяющими провести анализ поведенческой активности данного организма, является важной задачей при подготовке специалистов-физиологов². При этом особую значимость приобретают, как умение регистрировать и анализировать те или иные формы поведения, так и выполнение различных экспериментальных процедур, направленных на модификацию поведенческого паттерна животного с целью последующего анализа нейрофизиологических коррелятов таких изменений.

¹ Цит. по кн.: Кэндел Э. Клеточные основы поведения. М., 1980. С. 37.

² Работа выполнена в рамках ГПНИ «Конвергенция–2020» (задание 3.10).

Моллюск *Lymnaea stagnalis* как модельный объект исследований по нейробиологии

Основное преимущество беспозвоночных в качестве объектов нейробиологических исследований состоит в возможности идентификации отдельных нервных клеток у любого представителя вида. Представление об *уникальности* нейронов закрепилось в обиходе нейрофизиологов в 50–60-х гг. XX века и применимо как к нервной системе беспозвоночных, так и позвоночных животных.

Открытие идентифицируемых нейронов, т. е. клеток, которые имеют постоянную локализацию в нервной системе, приходится на вторую половину XIX века и связано с работами Ф. Лейдига и Г. Ретциуса по исследованию строения нервной системы кольчатых червей. В это же время были описаны инвариантные клетки у позвоночных – маунтеровские нейроны продолговатого мозга рыб. Функциональный критерий для идентификации нейронов был применен лишь А. Арванитаки (1958 г.) в ходе изучения нейронной архитектуры у моллюска *Aplysia*. В течение 60–70-х гг. XX века были составлены карты идентифицируемых клеток нервной системы либо ее частей для моллюсков (*Aplysia*, *Navanax*, *Tritonia*, *Helix*, *Helisoma*, *Limax* и др.), членистоногих (омар, речной рак, таракан, саранча), кольчатых червей (медицинская пиявка). Как правило, количество идентифицируемых индивидуальных нейронов составляет около 10 % от их общего числа, а примерно 50 % клеток относятся к специфическим скоплениям.

Пресноводный легочный моллюск *Lymnaea stagnalis* (прудовик обыкновенный) привлёк внимание нейрофизиологов в последние десятилетия XX века. Преимущества, предоставляемые его нервной системой для нейробиологических исследований, подытожены в статье J. Mills'a, W. Winlow'a с весьма символическим названием: «Мозг прудового моллюска – ответ на мольбу нейрофизиолога?» (1979). Среди прочего было указано на относительно небольшое количество соединительной ткани вокруг ганглиев, расположение тел ярко окрашенных нейронов на внешней поверхности ганглиев, незначительная степень концентрации узлов, возможность ионофоретических инъекций красителей, как в тела нервных клеток, так и ретроградное заполнение нервных стволов для последующей визуализации афферентных и эфферентных путей. Вдобавок, особи *Lymnaea stagnalis* хорошо переносят хирургические манипуляции, а их содержание в лабораторных условиях не требует особых материальных затрат.

Нервная система моллюсков относится к разбросанно-узловому типу. Концентрация нейронов в ганглиях, связанных нервными волокнами между собой, с сенсорной и моторной периферией, делает изоляцию ее отдельных частей в целях предварительной локализации функций относительно простой методической процедурой.

Наличие в составе нервной системы прудовика множества крупных (80–120 мкм), ярко, по-разному окрашенных клеток, зачастую с уникальными электрофизиологическими характеристиками, позволило определить основные составляющие целого ряда нейронных сетей, вовлеченных в реализацию соответствующих форм поведения моллюска (дыхательного, пищевого, оборонительного, локомоторного, полового и др.).

Внешнее строение и общий план тела

Прудовики характеризуется высокой степенью изменчивости. У взрослых особей варьируют размеры раковины (в среднем 30–50 мм), ее окраска (от прозрачной песочно-желтой до темно-зеленой и черной), форма, толщина, окраска туловища даже в пределах локальных популяций. Раковина правозавитая (обычно насчитывается 6–8 завитков вокруг ее центрального столбика – колюмеллы), конусовидной формы: острая вершина заканчивается книзу устьем овальной формы, ограничивающим последний завиток тела раковины.

Тело прудовика (рис. 1) асимметричное и подразделяется на туловище (*нога, висцеральный, или внутренностный, мешок и мантия*) и голову (иногда говорят о *голове-ноге*), способные втягиваться в раковину. Внутренностный мешок и мантия соединены с головой посредством дорсальной части головы-ноги – *колюмеллой, или ножкой*.

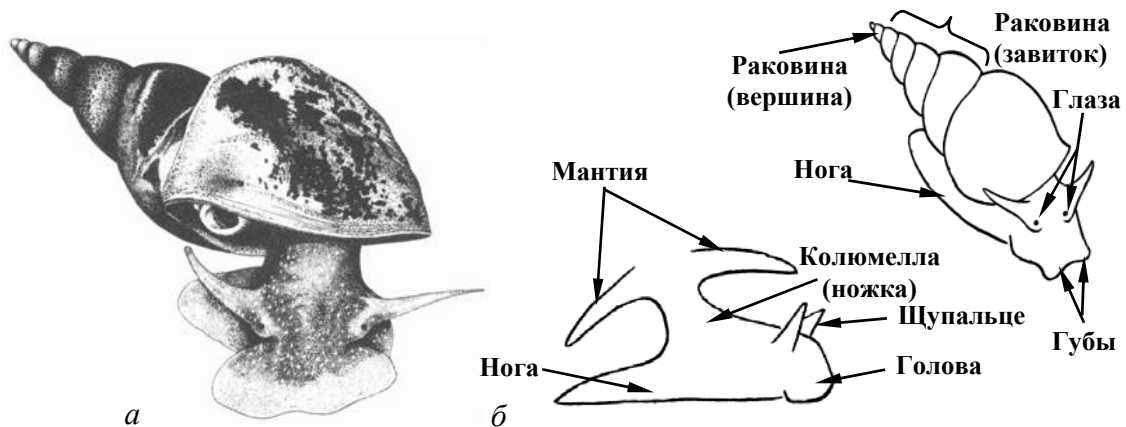


Рис. 1. Внешний вид моллюска *Lymnaea stagnalis* (а, по Wildering, 1992) и схемы фронтолатеральной (вверху) и латеральной (внизу, раковина удалена) проекций его тела (б, по Ноздрачев и др., 1999)

Ротовое отверстие расположено на вентральной стороне головы. С дорсальной стороны голова не ограничена от остального тела. Здесь она несет пару щупалец и расположенные у их основания, глаза. В области перехода на вентральную сторону находятся губы (нижняя и две боко-

вых). Нога с ползательной подошвой отделена от головы поперечным желобом, треугольной формы, суживающаяся к заднему концу.

Висцеральный мешок и мантия, представляющая вырост стенки тела и формирующая мантийную юбку (складку вокруг тела), покрыты раковиной. Внутренностный мешок содержит органы пищеварительной (желудок, печень), выделительной (почка и мочеточник), половой (овотестис, система протоков и желез) систем, сердце и перикард, лёгкое (внутренняя поверхность мантийной полости) и т. д. (рис. 2).

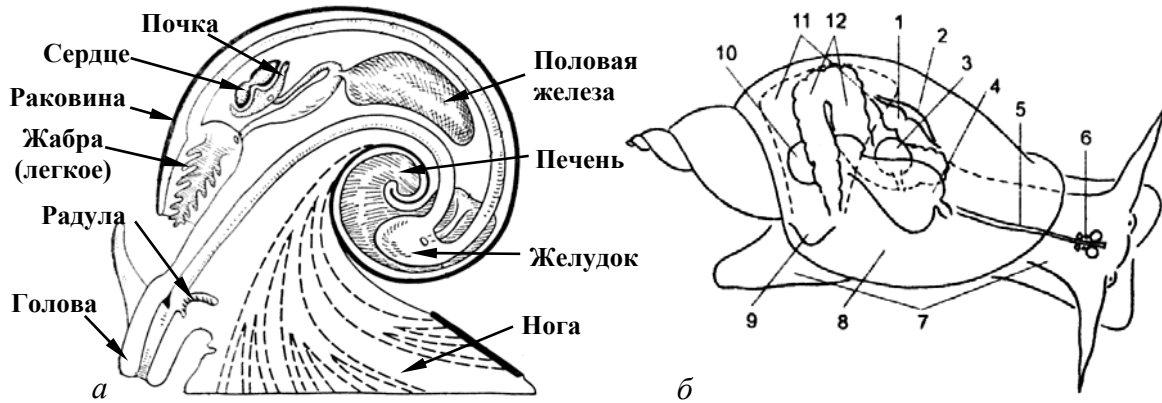


Рис. 2. Схема организации тела брюхоногого моллюска (а, по Гиляров и др, 1989) и расположения внутренних органов у *Lymnaea stagnalis* (б, по Ноздрачёву и др., 1999):

- 1 – сердце; 2 – перикард; 3 – семяприёмник; 4 – передняя часть простаты; 5 – пищевод; 6 – центральное кольцо ганглиев; 7 – голова-нога; 8 – мантия; 9 – клапан пневмостома; 10 – матка; 11 – легочная полость; 12 – почка

Легочная полость условно подразделяет полость тела на две части: *цефалопедальный синус* в голове-ноге с находящимися там буккальной массой и центральными нервными ганглиями и *висцеральный синус* внутренностного мешка. Оба содержат гемолимфу.

У прудовика мускулатура стенки тела состоит из 6-ти разных мышц. Части тела, не покрытые раковиной, обладают повышенной подвижностью, т.к. содержат дополнительные мышечные волокна. *Колюмеллярная мышца*, представляющая собой основу мягкого скелета тела прудовика. Она соединяет область мантии и ногу, обеспечивая разнообразные движения и/или перемещения прудовика. Волокна *диагональной, продольной* и *круговой* мышц встречаются преимущественно в участках тела, формирующих стенку внутренностного мешка и мантийной полости, и вместе со *щупальцевыми ретракторами* (вентральным и дорсальным) обеспечивают движения соответствующих участков тела. Нога (ключевой орган локомоции) дополнительно снабжена горизонтальной мышцей, формирующей сеть волокон в продольном и поперечном направлениях.

Особенности экологии и содержание моллюсков в условиях лаборатории

Прудовик является обычным обитателем пресноводных водоемов (мелкие реки и озера, пруды, другие стоячие естественные и искусственные водоемы и т. п.). Представители семейства распространены почти повсеместно на территории Европы, в том числе и Беларуси. Занимают, как правило, прибрежную зону водоемов, богатую водной растительностью. Предпочитают области мелких глубин (до 1–1,5 м) с рН воды 6,0–7,0. Плотность популяции сильно варьирует (от 20 до 2000 особей на 1 м²) и напрямую зависит от количества пищи, содержания кислорода в воде, возможности отвода продуктов жизнедеятельности, прежде всего аммиака.

Прудовики достаточно легко адаптируются к различным температурным режимам содержания в аквариумах, хотя оптимальным для их жизнедеятельности является диапазон 15–25 °С. Средняя продолжительность жизни прудовика – около 2 лет.

Известны случаи вмерзания моллюсков в лед и сохранения ими жизнеспособности после оттаивания. Летом на поверхности воды или листьях растительности они обитают при температурах окружающей среды около 40 °С (на солнце), правда, в течение очень короткого промежутка времени. Периоды высыхания водоема *Лутнаеа* может пережить, зарываясь во влажный ил, или в местах, где имеется достаточное для сохранения водного баланса количество воды. Зимний период года прудовик проводит зарываясь в грунт, впадая в торпидное состояние. Это своего рода гипобиоз, когда резко замедляется скорость обменных процессов (легочное дыхание сменяется кожным, отмечается более чем 10-кратное урежение сердцебиений и т. п.).

Для учебных и научных целей моллюсков собирают в мелких проточных водоемах (мелиоративные и водоотводные каналы) в весенне-осенний период года. Сообразно потребности, одновременно можно было собрать до 200–300 особей. Перед началом экспериментов животных выдерживают в лабораторных условиях не менее 2-х недель для развития адаптаций разного рода. Моллюсков располагают в аквариумах (высотой до 50 см), наполненных отстоявшейся (24 ч) водопроводной водой из расчёта не менее 0,5 л на особь (лучше 1 л / особь). При наличии системы термостатирования аквариума рекомендуется поддерживать постоянную температуру на уровне 20 ± 1 °С. В случае отсутствия системы аэрации, циркуляции и фильтрации воды в аквариуме, рекомендуется еженедельно производить частичную смену воды (1/3 от её общего количества) в сочетании с очисткой грунта (дна). В аквариумы для постоянного содержания животных, помещают листья водной растительности (рогоз, элодея). При наличии источников освещения аквариумов рекомендуется стандартный 12:12 ч цикл освещение–темнота.

В зимний период года, когда собрать новую партию животных в природе крайне затруднительно, часть моллюсков можно хранить в холодильнике, при температуре воды 5 ± 1 °С из расчета 5 особей / л, без пищи. Смену воды при этом проводят раз в месяц. Чтобы избежать замора моллюсков, к поверхности аквариума должен быть обеспечен доступ атмосферного воздуха. Содержавшиеся таким образом животные, перед проведением экспериментов подвергаются предварительной 2-х недельной адаптации при нормальных температурах, если не предполагается иное.

Пищей животным служат молодые листья салата, одуванчика, капусты (питание *ad libitum*). Благодаря скользящим движениям радулы, *Lymnaea stagnalis* способен потреблять налет из бактерий и сине-зеленых водорослей, формирующийся на листьях аквариумных растений или стенках аквариума. Поэтому временные «перебои» (1–2 дня) с едой не сказываются на жизнеспособности особей.

Двигательная активность

Транслокация *Lymnaea stagnalis* в пространстве обеспечивается по крайней мере двумя типами локомоторной активности: ресничной и мышечной. Животные переходят к мышечной локомоции, когда появляется необходимость в дополнительных усилиях – при передвижении по твердому субстрату вне воды или в воде по вертикальной опоре вверх. В остальных случаях моллюски используют ресничную локомоцию, обеспечиваемую биением ресничек цилиомоторного аппарата подошвы ноги. Мышечная локомоция представляет собой следующие друг за другом циклы протракции-ретракции ноги, координированные с сокращением колумеллярного комплекса мышц, ответственного за подтягивание раковины и сокращение мышц стенки тела.

Практическая часть. Анализ локомоторного поведения проводят под визуальным контролем. При оценке мышечной локомоции животных переносят в центр кристаллизатора (диаметр не менее 20 см), стоящего на миллиметровой бумаге и наполненного отстоявшейся водопроводной водой. Через 10 мин после помещения улиток в новые условия с помощью секундомера фиксируют время, необходимое для преодоления 3 или 5 квадратов 1×1 см (в зависимости от условий опыта). При оценке ресничной локомоции измеряют расстояние, пройденное моллюском по стенке аквариума, в котором они содержатся (рекомендуется использовать высокие (до 50 см) аквариумы цилиндрической формы (диаметр до 15 см)), за фиксированный отрезок времени (1 мин). Траекторию движения аккуратно отмечают маркером на внешней стороне стенки аквариума, измеряя длину получившейся кривой при помощи курвиметра.

Защитные реакции

Для пресноводных легочных моллюсков характерно *пассивно-оборонительное поведение* – при опасности животное прикрывает тело раковиной. При этом степень прикрытия прямо пропорциональна силе внешнего воздействия. В случае очень сильной и/или длительно повторяющейся тактильной стимуляции у моллюсков запускается реакция полного втягивания тела (*whole-body withdrawal*), сопровождающаяся выбросом гемолимфы. При этом плавучесть животного становится отрицательной, и оно падает на дно водоема, спасаясь таким образом от раздражающего воздействия (при нахождении в водной среде) или еще больше втягивается в раковину (при нахождении на суше).

Практическая часть. При анализе оборонительного поведения моллюсков помещают в наполненные отстоявшейся водопроводной водой чашки Петри (по 3 или 5 особей в каждой, в зависимости от размера особей). Отмечают характер реакции животного в ответ на тактильное раздражение щупальца волоском Фрея (сила воздействия может быть подобрана индивидуально для каждой серии опытов, составляя, как правило, 10^{-2} – 10^{-3} Н). Выделяют следующие типы ответов (в порядке усиления оборонительной реакции): 1 – поворот головы в сторону стимула (по сути это ориентировочная, а не оборонительная реакция); 2 – игнорирование стимула; 3 – ретракция (втягивание) щупальца; 4 – надвигание раковины на передний конец тела; 5 – полное прикрытие тела раковиной. На основании полученных данных строят кривые распределения ответов для той или иной экспериментальной группы.

Ещё одним показателем оборонительного поведения является *латентный период протракции*, определяемый как время, прошедшее с момента помещения моллюска в новые условия (из аквариума в чашку Петри) до начала его выдвижения из раковины и последующей локомоции.

Дополнительно определяют соотношение числа подвижных и неподвижных моллюсков. Длину щупальцев и участка тела, не прикрытого раковиной, регистрируют с помощью измерителя и линейки, не касаясь при этом тела моллюска. Тестирование проводят при верхнем равномерном освещении.

Рекомендуется, также, осуществить забор гемолимфы у некоторых моллюсков. Для этого может быть использован заострённый металлический или деревянный аппликатор. Тактильной стимуляции подвергается подошва ноги. Гемолимфу собирают в 1,5 мл эппендорфы (её объем, как правило, составляет 1 мл). В последующем эту пробу можно использовать для биохимического анализа (например, для оценки уровня глюкозы).

Дыхательное поведение

Легочные моллюски 50 % необходимого кислорода поглощают через наружные покровы и 50 % – через легкие. Представители семейства *Lymnaea* поднимаются на поверхность, когда в легких остается 6–13 % кислорода. Во время их пребывания под водой кислород расходуется значительно быстрее, чем накапливается углекислота, которая, вероятно, выделяется через покровы тела. Чем больше наружная концентрация кислорода, тем дольше моллюск может оставаться под водой. Потребление кислорода у *Lymnaea* при 15 °С составляет 0,24 мл/(г×ч).

Непарное легкое (диффузионного типа) прудовика представляет видоизмененную мантийную полость, выстланную эпителием. Его стенка содержит соединительную и мышечную ткани (формирует диафрагму и поперечную мембрану или переднюю и заднюю стенки легкого, так называемые мышцы мантийной полости) и пронизана многочисленными кровеносными сосудами, предполагая интенсивный обмен кислорода между легкими и кровью. Контакт полости легкого с атмосферой опосредуется *пневмостомом*, представляющим собой клапан (пневматопоральная лопасть), который, благодаря складкам на своей внутренней поверхности, может плотно запирать вход в легкое. Формирование временного сифона из пневматопоральной лопасти (эрекция пневмостома) обеспечивает газообмен (путем простой диффузии) в ходе легочного дыхания. Движения лопасти опосредуются работой двух групп мышц: поверхностного и глубокого слоев. Первая из них отвечает за открытие, а вторая участвует в закрытии пневмостома.

Нормальный респираторный акт состоит из комплекса стереотипных движений (рис. 3). Он начинается с перемещения особи в сторону водной поверхности.

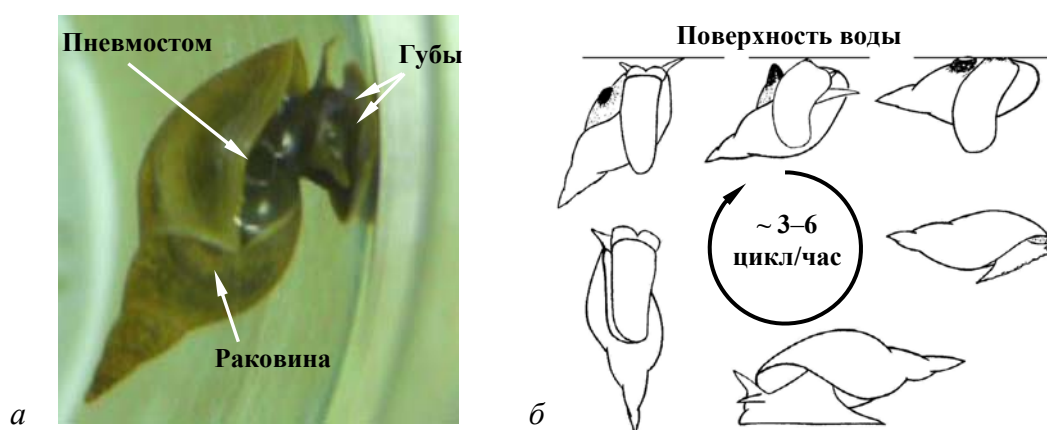


Рис. 3. Легочное дыхание у *Lymnaea stagnalis*:
а – внешний вид; б – схема дыхательного цикла (по Мороз, 1991)

Когда края губ касаются поверхностной пленки, отмечается движение раковины против часовой стрелки, временное прекращение локомоции и выдвигание пневмостома. Затем дыхательное отверстие открывается, выпускается пузырек воздуха, прорывающий пленку водной поверхности. Непосредственно процесс самого дыхания занимает 45–60 с. Однако в ряде случаев могут наблюдаться отдельные акты длительностью до 2 мин и больше. После этого дыхательное отверстие закрывается и моллюск, как правило, покидает поверхность воды.

Практическая часть. При анализе дыхательного поведения моллюсков помещают в аквариумы с отстоявшейся водопроводной водой объемом 4,5 л и высотой 50 см (5 особей на сосуд). Пищу располагают на дне сосуда, фиксируя при помощи груза, или вообще не оставляют её в аквариуме. Регистрируют количество респираторных циклов (открытие–закрытие пневмостома) за 1 ч наблюдения, длительность каждого цикла отдельно у каждого моллюска. Рассчитывают среднюю длительность акта, суммарную длительность респирации за 1 ч наблюдения.

Можно использовать и сосуды объемом 0,5 л (1 особь на 1 сосуд), хотя в указанном случае исходные характеристики легочной респирации будут несколько отличны (дыхательная активность определяется, в том числе, и временем нахождения на поверхности воды, которое выше в случае использования более мелких сосудов).

Дополнительно строят кривую распределения дыхательных актов по их длительности. Как правило выделяют следующие условные группы: 0–30 с, 31–60 с, 61–90 с, 91–120 с, 121–150 с, 151–180 с, 181–210 с, 211–240 с, 241 с и больше (всего 9) или 0–60 с, 61–120 с, 121–180 с, 180–240 с, 241–300 с, свыше 300 с (всего 6). Подсчитывают число респираторных актов той или иной длительности в пределах отмеченных групп.

Выбор предпочтительной методики определяется характеристиками экспериментальных животных – для более крупных особей (более возрастные моллюски) характерна усиленная дыхательная активность с пролонгированными дыхательными актами. В то время как мелкие моллюски (более молодые особи) проявляют умеренное лёгочное дыхание с короткими и редкими дыхательными актами.

Пищевое поведение

Прудовики относятся к растительноядным организмам, но могут поедать и останки погибших водных животных. Пищеварительный тракт начинается ротовым отверстием, расположенным на вентральной стороне головы, ведущим в буккальную полость (сюда открываются протоки слюнных желез). Ее мышечные стенки составляют основу *буккальной массы*, основного органа, осуществляющего ритмические движения

одонтофора у *Lymnaea stagnalis*. Пищевой цикл (рис. 4) занимает около 3-х секунд и состоит из одинаковых по длительности частей: выдвижение радулы наружу (протракция), скребущего движения радулы по пищевому субстрату (ретракция) и глотания (втягивание радулы в буккальную полость (проталкивание пищевых частиц в пищевод).

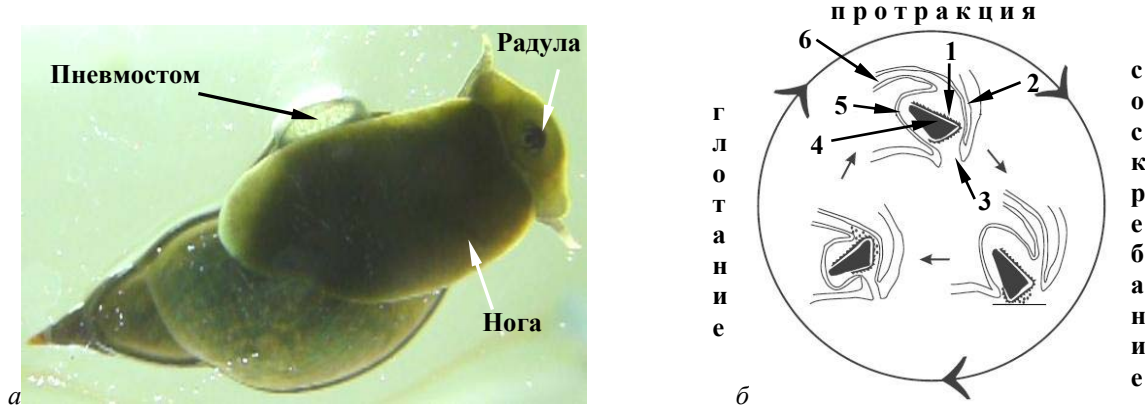


Рис. 4. Питание у *Lymnaea stagnalis*: а – вид снизу; б – пищевой цикл (по Elliott, 2002)
 1 – радула; 2 – передняя скула; 3 – рот; 4 – одонтофор;
 5 – задняя скула и тензор радулы; 6 – пищевод

Поступающая в пищевод еда через зоб попадает в мышечный желудок, где происходит ее размельчение и переваривание. Перемещение химуса происходит благодаря движениям привратника (пилоруса), обеспечивающего ее доставку в кишку, заканчивающуюся анусом (расположен справа от легкого). Протоки крупной пищеварительной железы (печени) открываются в полость кишки.

Практическая часть. Для анализа пищедобывательной активности используют моллюсков, предварительно подвергнутых пищевой депривации в течение 12–24 (лето) или 48 (осень–весна) часов. В чашку Петри с находящимся там моллюском помещают заранее взвешенную пластинку, вырезанную из листа салата или одуванчика и предварительно вымоченную в воде. По прошествии 2 ч пластинку осушают фильтровальной бумагой, взвешивают и определяют массу потребленной пищи, отмечают количество пищевых отверстий и рассчитывают убыль пищи, приходящейся на одно пищевое отверстие.

Если поместить моллюска в смоченную водой чашку Петри, приподнятую над поверхностью стола таким образом, что под неё можно свободно поместить зеркало, оставив несколько сантиметров зазора между ним и дном чашки, то становится возможным наблюдать (подсчитывать и т.п.) спонтанные скользящие движения радулы по субстрату (если они имеются изначально). В случае их отсутствия, движения радулы можно инициировать кристалликом сахарозы, помещённым у основания губ моллюска.

Висцеральные системы

Кровеносная система у прудовика открытого типа. Состоит из двухкамерного *сердца* (предсердие и желудочек отделены друг от друга двустворчатым клапаном, регулирующим ток крови), *артерий* (сосуды, имеющие собственную стенку и транспортирующие кровь от сердца к органам) и *вен* (афферентных и эфферентных). В системе открытого типа капилляры открываются непосредственно в венозные щели – пространства без отчетливых стенок, где и происходит основной газообмен между гемолимфой и омываемой ею тканями. Затем кровь попадает в венозные синусы и оттуда по афферентным венам поступает к органам, мало обеспеченным артериями. Из эфферентных вен кровь поступает к третьим органам и тканям (у прудовика имеется несколько участков поглощения кислорода). В предсердие кровь поступает из *почечно-легочной вены*, собирающей гемолимфу от головы-ноги (цефалопедальная вена) и внутреннего мешка (висцеральная вена).

Кожные покровы прудовика легко проницаемы для воды. За выведение ее избытка из организма отвечает **реноперикардальная система**. Стенка предсердия обладает способностью к ультрафильтрации гемолимфы. Попадая в перикардальную полость, ультрафильтрат через реноперикардальный проток поступает в почку (собственно почка и первичный мочеточник), контактирующую с заполненными кровью лакунами. На последнем этапе выделения жидкость выводится из организма по мочеточнику, заканчивающемуся почечным отверстием, расположенным около пневмостома.

Прудовик является гермафродитом, т. е. его половая гонада (*овотестис*) способна продуцировать как мужские, так и женские половые клетки. От нее отходит сперматидный проток (гермафродитный проток), распадающийся в области *каррефоура* на мужской и женский протоки. *Мужской проток* начинается спермоводом и служит для транспортировки семенной жидкости (спермы), в формировании которой принимает участие трубчатая железа простата. Посредством семяпровода она соединена с комплексом пениса. *Женский проток* принимает сперму полового партнера и транспортирует ее в зону оплодотворения (каррефоур). Его участками являются: извитая область, матка (предвагина), влагалище (вагина) и семяприёмник. Целый ряд желез (белковая, слизевая и оотекальная) участвуют в формировании как яиц, так и яйцевых кладок.

Практическая часть. Оценить частоту сердечных сокращений (ЧСС) наиболее удобно у моллюсков лабораторного разведения со слабопигментированной раковиной. Для этого прудовика аккуратно удерживают за конус раковины и при помощи бинокулярной лупы или увеличительного стекла подсчитывают ЧСС, визуально наблюдая биение сердца.

Введение веществ при изучении поведенческой активности

Существует два базовых подхода:

- **инъекция растворов** непосредственно в полость тела при помощи шприца. Вещества вводят из расчета 2–4 мкг/г веса животного, в объеме 0,1 мл нормального физиологического раствора (с учетом объема гемолимфы моллюска в 1 мл, т. е. итогового разведения препарата в 10 раз). Контрольным особям вводят 0,1 мл физиологического раствора.

Нормальный физиологический раствор для *Lymnaea stagnalis* имеет следующий состав (концентрации указаны в мМ): NaCl – 44; KCl – 1,7; CaCl₂ – 4; MgCl₂ × 6 H₂O – 1,5; HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'2-этансульфоновая кислота) – 10. Значение pH составляет 7,5 (доводят до нужного значения, добавляя 5 М раствор NaOH).

Инъекции в полость цефалопедального синуса осуществляют путем прокола ноги. Уменьшение травматизма подобной операции достигалось за счёт использования игл малого диаметра (инсулиновый шприц). Ещё одно место для прокола – ножка (колломелла). Инъекцию следует делать максимально быстро, для минимизации раздражающего действия иглы. Тестирование начинают спустя 20 мин после инъекции. Недостатки данной методики очевидны – артефакты, связанные с внутривещной инъекцией (всегда есть риск повреждения внутренних структур, в том числе центральных нервных ганглиев, а также активация защитных реакций моллюска в том числе частичного *whole-body withdrawal*) и вымывание препарата из организма при нахождении моллюска в воде. Известно, что скорость оборота воды у *Lymnaea stagnalis* составляет 5-кратный объем тела за один час.

- **инкубация моллюсков** в растворе, содержащем используемый препарат (в силу свободной проницаемости покровов моллюска для воды). Все растворы веществ, обычно в концентрации 0,1–1 мМ, готовят на отстоявшейся водопроводной воде. Животных помещают в такой раствор на срок от 1 до 2 ч, а затем приступают к тестированию. В случаях, когда эксперимент занимает длительное время (свыше 30 мин), моллюсков оставляют в воде, содержащей действующее вещество.

Контрольные вопросы

1. Внешнее строение тела прудовика.
2. Организация внутренностных систем прудовика.
3. Мышечная и ресничная локомоция прудовика и их анализ.
4. Пассивно-оборонительное поведение прудовика и его анализ.
5. Лёгочное дыхание прудовика и его анализ.
6. Пищевое поведение прудовика и его анализ.
7. Способы фармакологической модификации поведения прудовика.

ЛИТЕРАТУРА

Основная

- Кэндел, Э. Клеточные основы поведения / Э. Кэндел. – М.: Мир, 1980. – 599 с.
- Ноздрачев, А.Д. Анатомия беспозвоночных: пиявка, прудовик, дрозофила, таракан, рак (Лабораторные животные) / А.Д. Ноздрачев [и др.]. – СПб.: Издательство «Лань», 1999. – 320 с.
- Сидоров, А.В. Функциональная активность нервных центров беспозвоночных / А.В. Сидоров. – Минск: БГУ, 2010. – 255 с.

Дополнительная

- Биологический энциклопедический словарь / гл. ред. М.С. Гиляров. – М.: Сов. энциклопедия, 1989. – 864 с.
- Властов, Б.В. Класс Брюхоногие моллюски (Gastropoda) / Б.В. Властов, П.В. Матеев // Жизнь животных. В 7 т. – М., 1988. Т. 2. – С. 20–64.
- Дьяконова, В.Е. Регуляторные функции эндогенной опиоидной системы моллюска: автореф. дис. ... канд. биол. наук / В.Е. Дьяконова; Ин-т биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. – М., 1996. – 25 с.
- Сидоров, А.В. Влияние температуры на легочное дыхание, оборонительные реакции и локомоторное поведение пресноводного легочного моллюска *Lymnaea stagnalis* // А.В. Сидоров / Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова. – 2003. – Т. 53, № 4. – Р. 513–517.
- Цыганов, В.В. Нейрональные корреляты серотонин-зависимого моторного поведения прудовика *Lymnaea stagnalis*: автореф. дис. ... канд. биол. наук / В.В. Цыганов; Ин-т биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. – М., 2001. – 28 с.

СОДЕРЖАНИЕ

Моллюск <i>Lymnaea stagnalis</i> как модельный объект исследований по нейробиологии.....	3
Внешнее строение и общий план тела	5
Особенности экологии и содержание моллюсков в условиях лаборатории.....	7
Двигательная активность.....	8
Защитные реакции.....	9
Дыхательное поведение.....	10
Пищевое поведение.....	11
Висцеральные системы.....	13
Введение веществ при изучении поведенческой активности..	14
Контрольные вопросы.....	14
Литература.....	15

Учебное издание

Сидоров Александр Викторович

**ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ И МЕТОДИКИ
ИЗУЧЕНИЯ ПОВЕДЕНИЯ *LYMNAEA STAGNALIS***

**Методические указания
по курсам «Физиология межклеточной коммуникации»
для студентов специальности 1–31 01 01 «Биология»,
«Нейробиология» для студентов магистратуры
специальности 1-31 80 01 «Биология»**

В авторской редакции

Ответственный за выпуск
А. В. Сидоров

Подписано в печать 06.12.2017. Формат 60x84/16. Бумага офсетная.
Усл. печ. л. 0,93. Уч.-изд. л. 0,85. Тираж 50 экз. Заказ

Белорусский государственный университет.
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/270 от 03.04.2014.
Пр. Независимости, 4, 220030, Минск.

Отпечатано с оригинал-макета заказчика
на копировально-множительной технике
биологического факультета
Белорусского государственного университета.
Ул. Курчатова, 10, 220064, Минск.