Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН
Московская гимназия на Юго-западе № 1543

Регуляция локомоторной активности зародыша на стадии велигера нейромедиаторами апикального органа у катушки (*Helisoma trivolvis* (L, 1758)) и большого прудовика (*Lymnaea stagnalis* (Rafinesque, 1815))

Е. К. Секретова

Научный руководитель:
д. б. н. Е. Е. Воронежская

Москва 2016

ВВЕДЕНИЕ

Любое поведение организма зависит от активности его нервных клеток (нейронов) и нейромедиаторов (трансмиттеров), которые эти нейроны вырабатывают. Для изучения трансмиттер-зависимого поведения (Сахаров, 1990) часто обращаются к самым ранним этапам развития, так как на этих стадиях репертуар поведения зародыша ограничен и число нервных клеток невелико, что облегчает задачу исследователей.

Моллюски — классические объекты нейробиологии и биологии развития. Этапы их развития и влияние нейромедиаторов на темпы развития зародышей и поведение ювенильных и взрослых особей достаточно хорошо изучены (Мещеряков, 1975; Voronezhskaya et al., 2004). Известны нервные клетки, присутствующие у зародышей разных стадий развития, и вырабатываемые этими клетками трансмиттеры (Voronezhskaya et al., 1999; Goldberg et al., 2010). Именно поэтому для своих исследований регуляции локомоторной активности зародышей мы выбрали аквариумных улиток: большого прудовика *Lymnaea stagnalis* и аквариумную катушку *Helisoma trivolvis*.

Взрослые особи обоих видов хорошо содержатся в лабораторной культуре и регулярно откладывают кладки в течение всего года. Развитие зародышей и прудовика, и катушки происходит внутри яйца, находящегося в железистой кладке**.** Развитие синхронное **(**во всех яйцах в кладке зародыши находятся примерно на одной стадии развития**).** Каждой стадии развития соответствует набор морфологических признаков **(**формирование определенных органов**),** появление нейронов**,** содержащих специфические нейромедиаторы**.** На определенных стадиях развития у зародышей начинают проявляться разные поведенческие программы**:** вращение внутри яйца за счет биения ресничек на поверхности тела**,** вращение с ускорением**-**торможением**,** ползание по стенке яйца**,** жевательная активность**.**

Вращательная активность у зародыша моллюска внутри капсулярной жидкости чрезвычайно важна для выживания во время эмбрионального развития. С ее помощью зародыш «перемешивает» питательные вещества внутри капсулярной жидкости для того, чтобы они равномерно поступали через его покровы (Goldberg et al., 2008). Известно, что вращение зародыша зависит от биения ресничек, расположенных на разных участках тела зародыша, в основном на подошве ноги и в области велума. А биение ресничек, в свою очередь, регулируется двумя нейромедиаторами — серотонином и дофамином (Goldberg et al., 2010).

На ранних этапах развития у зародыша есть 2 транзиторных (исчезающих после определенной стадии развитии) нейрона апикального органа, которые вырабатывают эти моноамины. У зародышей большого прудовика в нейронах апикального органа содержится преимущественно дофамин, но есть и небольшое количество серотонина (Voronezhskaya et al., 2004), а у зародышей катушки только серотонин (Diefenbach et al., 1998). Действия этих моноаминов однонаправленное — стимуляция работы ресничек, но неизвестно, будет ли серотонин влиять на работу ресничек зародыша большого прудовика так же, как и дофамин. И в свою очередь у катушки – будет ли оказывать влияние на скорость вращения дофамин.

Таким образом, цель нашего исследования — изучить изменения локомоторной активности (скорость вращения) зародыша при фармакологическом повышении уровня нейромедиатора в апикальных нейронах, не свойственного им в норме.

Для достижения этой цели нам необходимо:

1) Выбрать оптимальную для экспериментальных манипуляций стадию развития зародыша
2) Проверить с помощью имунохимического маркирования, что инкубация в предшественнике нейромедиатора, отсутствующего в норме в нейронах зародыша, приводит к увеличению уровня этого моноамина в нейронах
3) Регистрировать вызванные изменения в локомоторной активности зародыша после экспериментального повышения уровня своего и противоположного нейромедиатора

С помощью полученных данных мы надеемся (или опровергнуть) присутствие в апикальных нейронах прудовика и катушки системы синтеза обоих моноаминов (серотонина и дофамина). Фармакологические манипуляции продемонстрируют, насколько определенный тип нейротрансмиттера важен для регуляции биения ресничек.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Объекты нашего исследования — классические объекты нейробиологии развития, личинки брюхоногих моллюсков большого прудовика *Lymnaea stagnalis* и аквариумной катушки *Helisoma trivolvis* (Мещеряков, 1975). Брюхоногие моллюски относятся к трохофорным животным, то есть в их развитии есть личинка трохофора. (Беклемишев, 1964).

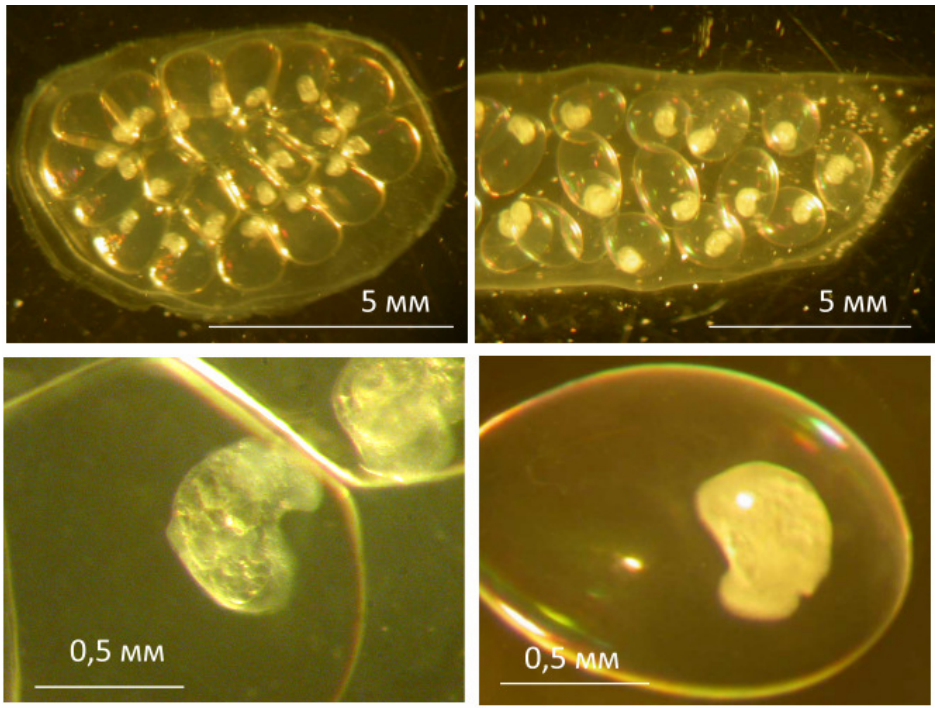


Рис. 2. Кладки (верхний ряд) и зародыши на стадии велигера в яйце (нижний ряд) брюхоногих моллюсков. Слева – большой прудовик, справа – аквариумная катушка. Собственные фотографии.

Известно, что у личинок трохофорных животных, в частности у большого прудовика и катушки, есть апикальный сенсорный орган (АО). Этот орган встречается не только у родственных видов большого прудовика и катушки, и даже не только у моллюсков, но и у аннелид, немертин и личинок морских ежей. Несмотря на широкое разнообразие видов, у личинок которых встречается апикальный орган, у всех личинок он имеет существенное сходство в строении и времени появления. Апикальный орган – самая ранняя нервная структура личинки, раньше её называли «личиночным мозгом». Располагается этот сенсорный орган всегда на апикальном полюсе личинки, включает в себя султанчик из длинных ресничек и нейроны, лежащие в основании этих ресничек (Беклемишев, 1964). Характерной чертой нейронов АО является то, что часть из них синтезирует моноамины.

Апикальный орган появляется у личинок на стадии трохофоры и исчезает после метаморфоза (Беклемишев, 1964; Мещеряков, 1975). Доказано, что сенсорные нейроны апикального органа участвуют в индукции метаморфоза у морских моллюсков (Haszprunar et al., 2000), а у пресноводных моллюсков регулируют темпы зародышевого развития (Voronezhskaya et al., 2004)

Локомоторная активность появляется у зародышей сразу, как только формируются локомоторные реснички прототроха и ноги. В развитии пресноводных моллюсков на стадии трохофоры формируются реснички прототроха, который затем

развивается в велум (у велигера). На ноге локомоторные реснички сначала появляются по центру, в виде срединной полоски. Затем появляются ещё два ресничных поля, симметрично по бокам в передней части ноги. У прудовика ещё дополнительно формируется ресничная площадка дорсальнее ротового отверстия (Goldberg et al., 2010). За счет биения ресничек всех локомоторных полей и происходит вращение зародыша внутри яйца. От нейронов апикального органа к локомоторным полям отходят длинные отростки, которые активно ветвятся непосредственно под ресничками (Nielsen, 2001). На основании такого строения многие исследователи считают, что медиаторы, синтезируемые в нейронах апикального органа, участвуют в регуляции биения ресничек (Goldberg et al., 2010). Чтобы это проверить, зародышей инкубировали в растворах, содержащих медиаторы, которые в норме синтезируются в клетках этих личинок (большого прудовика в дофамине и катушку в серотонине) и действительно увидели увеличение скорости вращения. (Diefenbach et al., 1991; Goldberg et al., 2010)

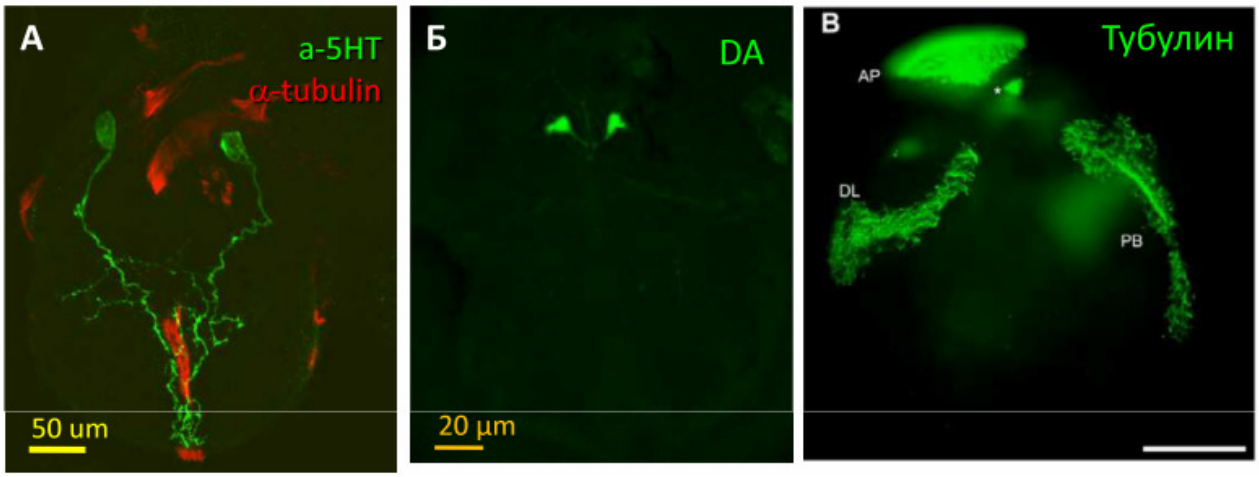


Рис. 3. Апикальные нейроны (А и Б), иннервирующие ресничные поля, и реснички (В), за счет биения которых происходит вращение зародыша внутри яйца. У катушки апикальные нейроны содержат серотонин (А), а у прудовика дофамин (Б). Из работ Voronezhskaya et al., 2004 и Goldberg et al., 2010.

Локомоторная активность внутри яйца усложняется вместе с развитием зародыша. Первая локомоторная активность зародыша внутри яйца заключается в равномерном вращении вокруг своей оси (в норме скорость вращения внутри яйца — 1,5-3 оборота в минуту, при повышении концентрации моноамина скорость вращения увеличивается в 3-5 раз); на стадии поздней трохофоры (23 стадия по Мещерякову) зародыш начинает вращаться с ускорением-замедлением, иногда касаясь стенки яйца и останавливаясь; после метаморфоза локомоторная активность эмбриона в основном представлена ползанием по внутренней стенке яйца; и, наконец, зародыш, находясь на стадии, во время которой он готовится к вылуплению, практически занимает весь объем яйца, в результате его локомоторная активность физически ограничивается, и он может только прогрызать

оболочку яйца с помощью движений радулы (мышечная локомоторная активность)(Мещеряков, 1975; Voronezhskaya et al., 2004).

У личинок большого прудовика и катушки на стадиях от трохофоры до среднего велигера в состав апикального органа входят только два нейрона. В нейронах большого прудовика, синтезируется преимущественно дофамин, хотя в небольших концентрациях присутствуют серотонин и пептид FMRFамид. А в нейронах катушки содержится исключительно серотонин (Voronezhskaya et al.,1999; Voronezhskaya et al., 2004).

Серотонин и дофамин относятся к биогенным моноаминам. Моноамины — это нейромедиаторы, синтезируемые из ароматических аминокислот (серотонин из триптофана и дофамин из фенилаланина).

В ходе синтеза дофамина из незаменимой аминокислоты фенилаланина синтезируется L-тирозин, который потом под действием тирозингидроксилазы превращается в предшественник дофамина — L-dopa, из которого затем под действием фермента декорбаксилазы ароматических аминокислот образуется дофамин.

При синтезе серотонина из триптофана (также незаменимая ароматическая аминокислота) под действием фермента 5-триптофангидроксилазы образуется 5-гидрокситриптофан (5-HTP). 5-HTP декарбоксилируется при помощи декарбоксилазы ароматических аминокислот и образуется 5-гидрокситриптамин (5-HT), он же серотонин.

Надо отметить, что ферменты первой части синтеза: тирозингидроксилаза и триптофангидроксилаза являются специфическими и лимитирующими скорость синтеза, в то время как второй фермент — декарбоксилаза ароматических аминокислот – сходен в цепочке синтеза. Поэтому при наличии соответствующего предшественника в клетках могут синтезироваться оба нейромедиатора: и серотонин, и дофамин. Именно эту возможность мы использовали дальше в своих исследованиях.

В исследовании 2010 года (Goldberg et al., 2010) ученые инкубировали эмбрионов в нейромедиаторе, который есть в норме в нейронах АО у данного вида моллюска, и наблюдали увеличение скорости вращения. В нашем исследовании мы хотим увеличить синтез собственного нейромедиатора, добавляя соответствующий предшественник (5-HTP в случае катушки и L-DOPA в случае прудовика), тем самым увеличивая содержание медиатора внутри клеток, откуда он будет попадать к клеткам-мишеням (клеткам с локомоторными ресничками). Мы хотим также попробовать сменить медиаторную специфичность апикального нейрона: давать предшественник нейромедиатора, который в норме отсутствует в нейронах у данного вида моллюска (L-DOPA катушкам и 5-HTP прудовикам).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась на двух видах пресноводных моллюсков — *Lymnaea stagnalis* (большой прудовик) и *Helisoma trivolvis* (аквариумная катушка). Взрослые особи содержатся в аквариумах по 5-6 штук, в каждом аквариуме по 5 литров отстоянной воды постоянной температуры 22±2°C. Аквариумы освещались в постоянном режиме 16:8 (свет:темнота). Кормили животных в среднем два раза в неделю листьями салата, примерно раз в 4-5 дней моллюскам меняли воду в аквариуме. Большой прудовик и катушка — гермафродиты, осеменение происходит при копуляции. Моллюски откладывают коконы с кладками, содержащими отдельные яйца, в аквариуме на его стенку, при этом у большого прудовика кладки можно собрать, просто проведя рукой по стенке аквариума, а у катушки нужно аккуратно снимать кладки ножиком, так как они держатся на стенке аквариума очень крепко. Развитие зародыша от откладки до выхода из яйца составляет при 25°C 11,5-12 дней у катушки и 9,5-10 у прудовика (Мещеряков, 1975; Voronezhskaya et al., 2004).

Рис. 1. Содержание улиток: большого прудовика и катушки в условиях лабораторной культуры. Области, выделенные штрихованным кругом на рисунке, обозначают места с кладками большого прудовика на стенке аквариума.

После сбора кладок мы приступали к определению стадии развития зародыша. Стадии развития личинок определяли по совокупности морфологических, морфометрических и поведенческих признаков, как описано в процитированных выше работах. Краткая характеристика особенностей локомоторной активности зародыша и наличие нервных элементов представлены в таблице 1.

Выбрав нужную стадию, мы переходили к видеорегистрации ресничного вращения зародыша в норме. Для эксперимента использовали зародышей из одной кладки или кокона. У зародышей большого прудовика для видеорегистрации необходимо вынуть яйца из кокона. Для этого нужно разрезать кокон в нескольких местах пинцетом, не повредив

капсулы, затем надавить на край разрезанного кокона и выдавить капсулы, затем необходимо «прокатить» пинцетом яйцевые капсулы по бумаге для очистки их от слизи. Отдельные яйца по 9-10 штук помещаются с помощью пипетки на предметное стекло с лункой в 1 мл воды.

Для видеорегистрации зародышей катушки нет необходимости вытаскивать яйцевые капсулы из кокона. Отдельный кокон помещается также с помощью пипетки на покровное стекло с лункой в 1 мл воды.

За вращательной активностью мы следили под бинокуляром, **МБС-10** (Лыткарино, Россия) при увеличении 4, записывая ее при помощи окулярной камеры SkopeTec (Китай). Время записи одной партии зародышей (9-10 зародышей в яйце, помещенных на покровное стекло с лункой в 1 мл воды) составляло 1 минуту. После видеорегистрации зародышевого поведения мы вынимали зародышей из яйцевой капсулы при помощи препаровальной иглы для последующего проведения иммунохимического окрашивания и выявления нейронов (Voronezhskaya et al., 2004)..

Перед началом исследования мы подбирали стадию развития, наилучшим образом подходящую для экспериментов. Так, зародыши стадий 19 – 23 сходны по проявлению поведения (вращаются в яйце) и имеют только нейроны апикального органа.

Стадия, на которой мы проводили наши дальнейшие эксперименты, средний велигер соответствовала стадии 22 (согласно Мещерякову, 1975). На этой стадии зародыш вращается вокруг своей оси, у него закладываются церебральные ганглии и глаза, становится заметен отдел ноги, зародыш еще имеет бобовидную форму. Мы выбрали именно 22 стадию (таблица 1), так как на ней, с одной стороны, легче всего производить подсчет вращений, потому что личинка не совсем округлая. А с другой стороны, локомоторное вращение достаточно равномерное, зародыш не способен ускоряться и замедляться, но при этом не прикрепляется к стенке яйца (к примеру, на следующей, 23 стадии, личинки вращаются уже не только вокруг свои оси, но и по всему яйцу, что мешает подсчету частоты вращений). Кроме того, на стадии 22 у зародыша апикальный орган состоит из 2х хорошо дифференцированных нейронов, посылающих свои отростки к локомоторным ресничкам, находящимся на поверхности ноги. Согласно литературным данным (Goldberg et al., 2010), именно от активности этих нейронов зависит характер вращения.

Перед экспериментом мы проводили сначала видеорегистрацию в норме, затем инкубировали яйца (в случае прудовика), вытащив их из кокона или целиком коконы (в случае катушки) в растворе, содержащем нейромедиатор, который в норме отсутствует в нейронах. У зародышей катушки в нейронах содержится серотонин, а отсутствует дофамин. И наоборот, в нейронах у зародышей большого прудовика преимущественно присутствует

дофамин и в небольших количествах серотонин. Соответственно, в лунку покровного стекла с одной партией зародышей (9-10 особей) мы добавляли раствор предшественника серотонина — 5 HTP (если это зародыши большого прудовика) или предшественника дофамина — L-DOPA (если это зародыши катушки) в концентрации 10^{-4} М. Затем фиксировали изменение вращательного поведения зародышей через 20 минут 40 минут инкубирования, записывая его на камеру. Затем проводили контрольный эксперимент, в котором мы инкубировали эмбрионов в растворе нейромедиатора, который в норме присутствует в нейронах у этого вида.

Получив данные, мы посчитали число оборотов в минуту у каждого зародыша, затем провели статистический анализ. Статистическую обработку данных и построение графиков скорости вращения проводили в программе GraphPad. При статистической обработке применяли критерий Манна-Уитни.

Для морфологического контроля содержания и уровня серотонина в апикальных нейронах использовали метод иммунохимического маркирования, подробно описанный в работе Воронежской с соавторами (Voronezhskaya et al., 2004). Для этого зародышей извлекали из яйца, отмывали от яйцевой жидкости водопроводной водой и фиксировали в 4% параформальдегиде. После отмывки зародышей инкубировали в первичных антителах против серотонина (для выявления серотонин-содержащих нейронов) и тубулина (для выявления ресничных структур), а затем в растворе вторичных антител с флуоресцентными метками, позволяющими определить локализацию первичных антител. Анализ препаратов проводился под конфокальным микроскопом. Полученные сканы обрабатывались в оригинальной программе обработки изображений, прилагающейся к микроскопу. Картинки монтировались в программе Power Point.

таблица 1

Название и краткая характеристика стадий развития зародышей

номер стадии	**название стадии**	Характер локомоции	нейроны
16	ранняя гаструла	нет	нет
17	средняя гаструла	нет	нет
18	поздняя гаструла	нет	нет
19	ранняя трохофора	Ресничное вращение	тела нейронов АО

номер стадии	**название стадии**	Характер локомоции	нейроны
20	средняя трохофора	Ресничное вращение	Тела нейронов
21	поздняя трохофора	Ресничное вращение	Тела нейронов АО с отростками
22	ранний велигер	Ресничное вращение	Тела нейронов АО с отростками
23	средний велигер	Ресничное вращение с замедлениями-ускорениями	Тела нейронов АО с отростками, периферические нейроны
24	поздний велигер	Ресничное вращение с замедлениями-ускорениями	Тела нейронов с отростками, периферические нейроны
25	великонха	Ресничное вращение с замедлениями-ускорениями, крепление к стенке яйца	Тела нейронов с отростками, периферические нейроны, нейроны в ганглиях
26	После метаморфоза	Ресничное вращение с замедлениями-ускорениями, крепление к стенке яйца. Ресничное ползание по стенке яйца	Нейроны АО, периферические нейроны, нейроны в ганглиях

номер стадии	**название стадии**	Характер локомоции	нейроны
27	После метаморфоза	Ресничное вращение с замедлениями-ускорениями, крепление к стенке яйца. Ресничное ползание по стенке яйца	Нейроны АО, периферические нейроны, нейроны в ганглиях
28	После метаморфоза	Ресничное ползание по стенке яйца	Нейроны АО, периферические нейроны, нейроны в ганглиях
29	вылупление	Ресничное ползание по стенке яйца	Периферические нейроны, нейроны в ганглиях

РЕЗУЛЬТАТЫ

Подбирая стадию развития зародышей для экспериментов, мы основывались на удобстве при подсчете вращений и морфологии апикальных нейронов, иннервирующих локомоторные реснички.

Морфология ресничных и локомоторных структур и ранних нейронов на разных стадиях развития зародышей

На стадии 20 у зародыша катушки развит прототрох и только начинают формироваться реснички на подошве. Начинают закладываться тела нейронов апикального органа, содержание серотонина в которых ещё очень низкое. Отростков нейронов не видно. (рис 1 А).

На стадии 21 формируется медиальная ресничная полоска. От каждого апикального нейрона отходит длинный отросток, который ветвится под ресничками медиальной полоски (рис1 Б).

На стадии 22 помимо медиальной полоски, появляются два симметричных поля ресничек на ноге: латеральные ресничные поля. К этим полям также подходят веточки отростков апикальных нейронов (рис 1 В).

На стадии 23-24, помимо тел нейронов апикального органа, видны еще и другие нейроны, находящиеся в формирующихся педальных ганглиях. Их отростки также иннервируют все ресничные поля (рис 1 Г).

В норме у зародышей большого прудовика имеются те же самые структуры, что и у зародышей катушки. А именно: медиальная ресничная полоска. латеральные ресничные поля, прототрох. Кроме этого, на голове видно апикальное ресничное поле (в отличие от зародышей катушки). Однако, на аналогичных стадиях развития (20-22) в апикальных нейронах прудовика серотонин не выявляется. Нейроны, содержащие серотонин, выявляются только на стадиях 23-24 в формирующихся педальных ганглиях (Рис 2).

Для наших экспериментов мы выбрали именно стадию 22, поскольку апикальные нейроны уже достаточно развиты, но никаких других нейронов еще нет. Кроме того, на стадии 22 удобнее всего производить подсчеты частоты вращений зародышей, поскольку уже появляются обособленные нога и голова, но при этом зародыш вращается вокруг своей оси без ускорений и замедлений На рисунке 2, на котором более подробно представлены морфологические особенности стадии 22 видно, что отростки апикальных нейронов охватывают все ресничные зоны локомоторных ресничек, расположенных на ноге.

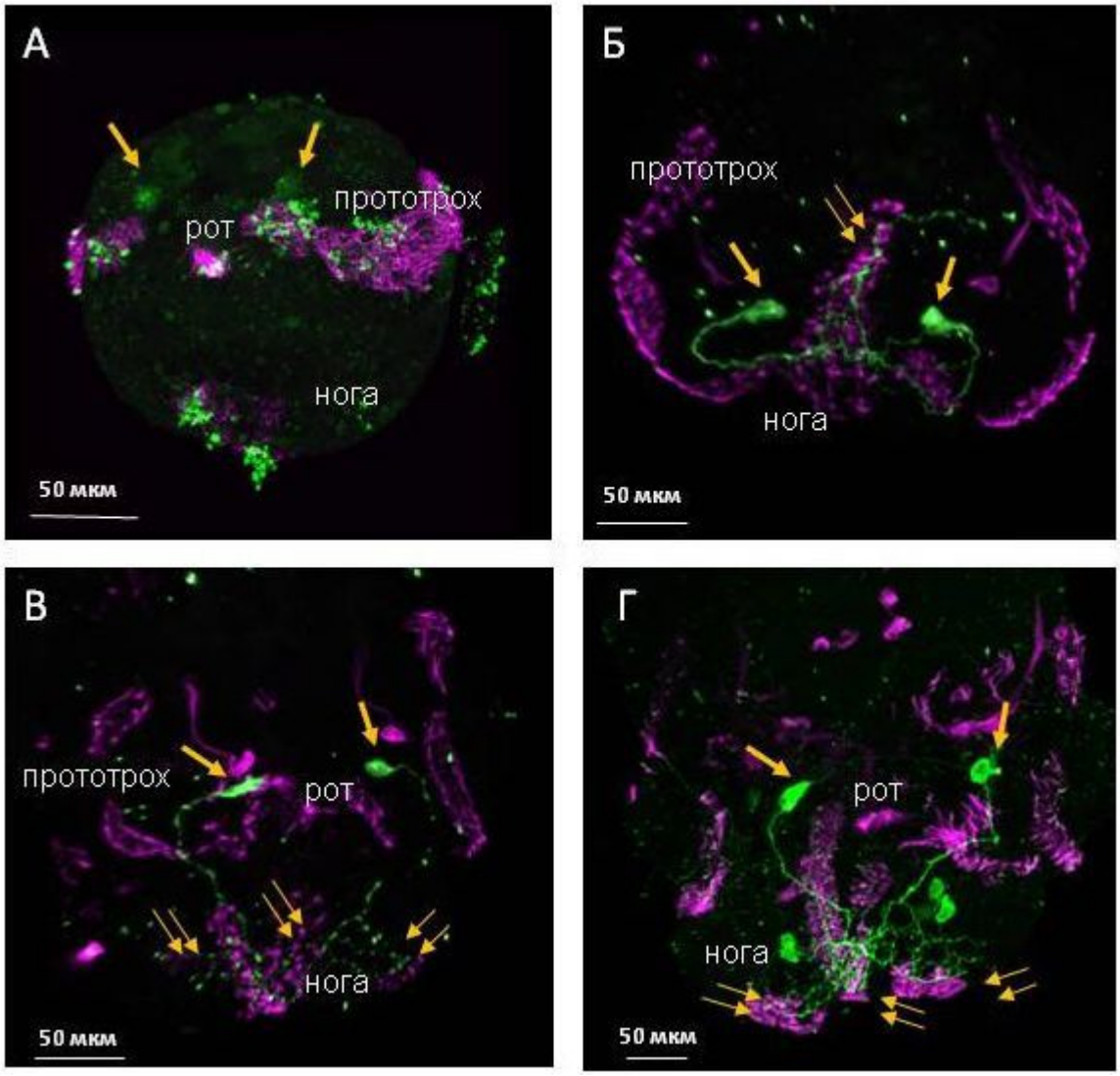


Рис. 1. Зародыши катушки под конфокальным микроскопом (фронтальный вид зародыша). Нейроны промаркированы антителами к серотонину, реснички – антителами к тубулину. А — стадия 20 по Мещерякову (средняя трохофора), Б — стадия 21 (поздняя трохофора), В — стадия 22 (ранний велигер), Г — стадия 23-24 (вступление в метаморфоз). Одиночной стрелкой указаны апикальные нейроны, двойной стрелкой указаны ресничные поля, иннервируемые отростками апикальных нейронов.

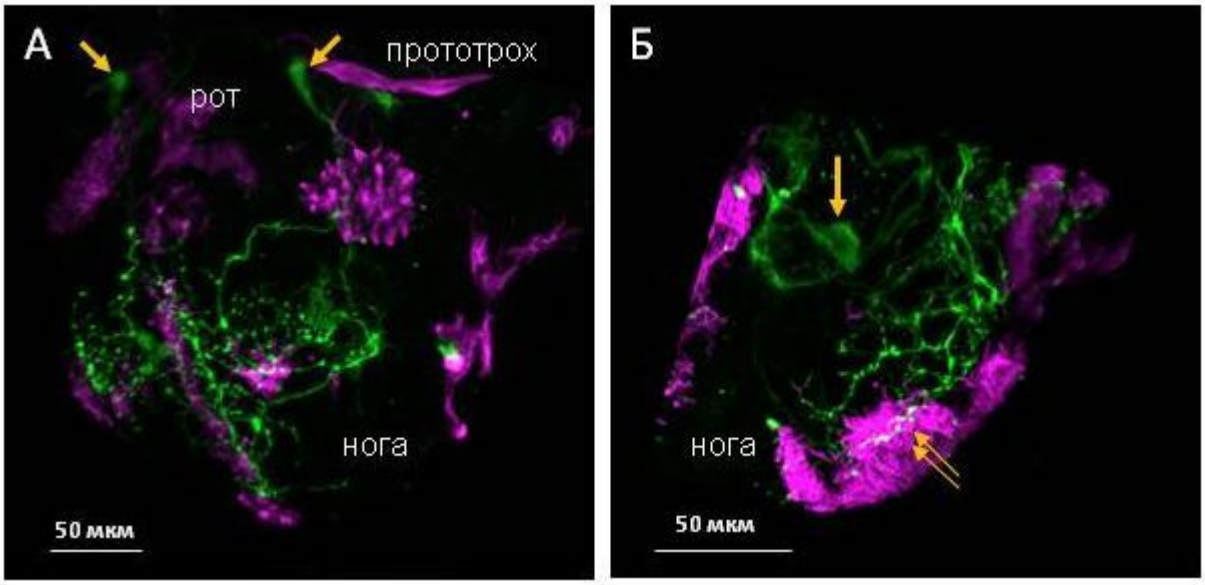


Рис 2. Зародыши катушки стадии 22 под конфокальным микроскопом. Нейроны промаркированы антителами к серотонину, реснички – антителами к тубулину. Одиночной стрелкой указаны нейроны, двойной стрелкой указаны ресничный поля, иннервируемые отростками нейронов.

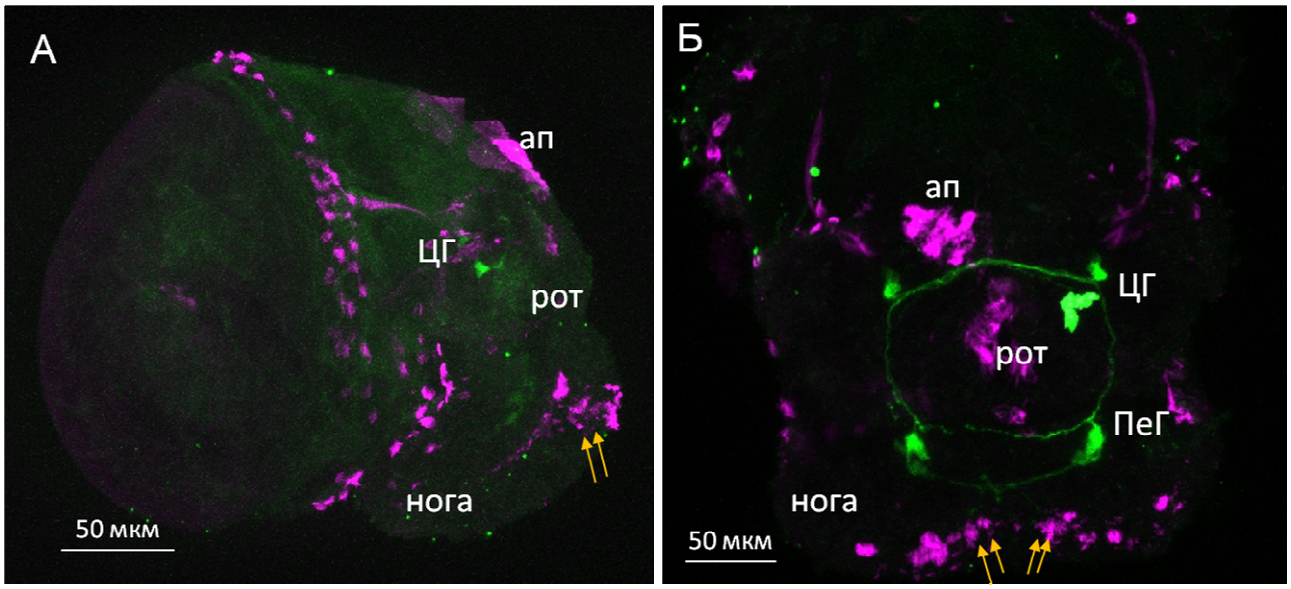


Рис 3. Зародыши большого прудовика, под конфокальным микроскопом. Нейроны промаркированы антителами к серотонину, реснички – антителами к тубулину. А — стадия 23. Б — стадия 25. Двойной стрелкой указана иннервация. Ап – апикальное ресничное поле, ЦГ – церебральные ганглии, ПеГ – педальные ганглии.

Морфологический контроль повышения уровня серотонина в ранних нейронах

Чтобы проверить, что инкубация в предшественнике серотонина действительно увеличивает количество серотонина в апикальных нейронах, мы провели иммунохимическое

маркирование нейронов зародышей, инкубированных в предшественнике серотонина и нейронов зародышей в норме. Существенно, что сканирование проводилось при одинаковых настройках, поэтому яркость иммунохимического окрашивания указывает на относительное количество выявляемого медиатора: чем ярче окрашивание, тем выше уровень медиатора в клетке. На рис 4 видно, что нейроны и их отростки у инкубированных в предшественнике серотонина зародышей (рис 4Б) ярче, чем нейроны зародышей в норме (рис. 4А). Поэтому мы считаем, что в телах и отростках нейронов после инкубации действительно содержится большее количество серотонина.

На стадии 22 у зародышей прудовика в норме апикальные нейроны и их отростки не содержат серотонин, а после инкубации в предшественнике серотонина он в них способен синтезироваться. В результате иммунохимическое окрашивание на серотонин выявляет тела нейронов и их отростки (Рис 5). На рисунке 5А не видно тел нейронов и их отростков, так как этот зародыш не был инкубирован в предшественнике серотонина, на рисунке 5Б тела неронов и их отростки уже видны.

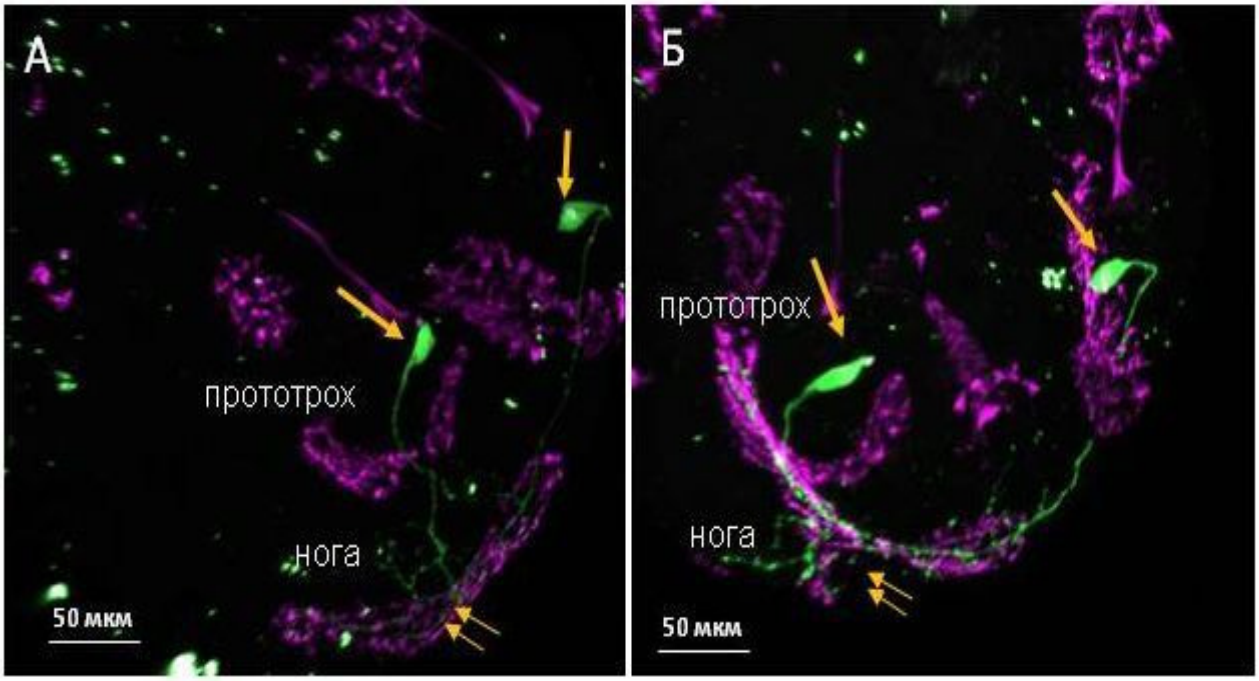


Рис 4. Зародыши катушки стадии 22 под конфокальным микроскопом. Двойной стрелкой указана иннервация, одиночной нейроны. Нейроны промаркированы антителами к серотонину, реснички – антителами к тубулину. А – зародыши катушки стадии 22 в норме, Б – зародыши катушки, инкубированные в предшественнике серотонина.

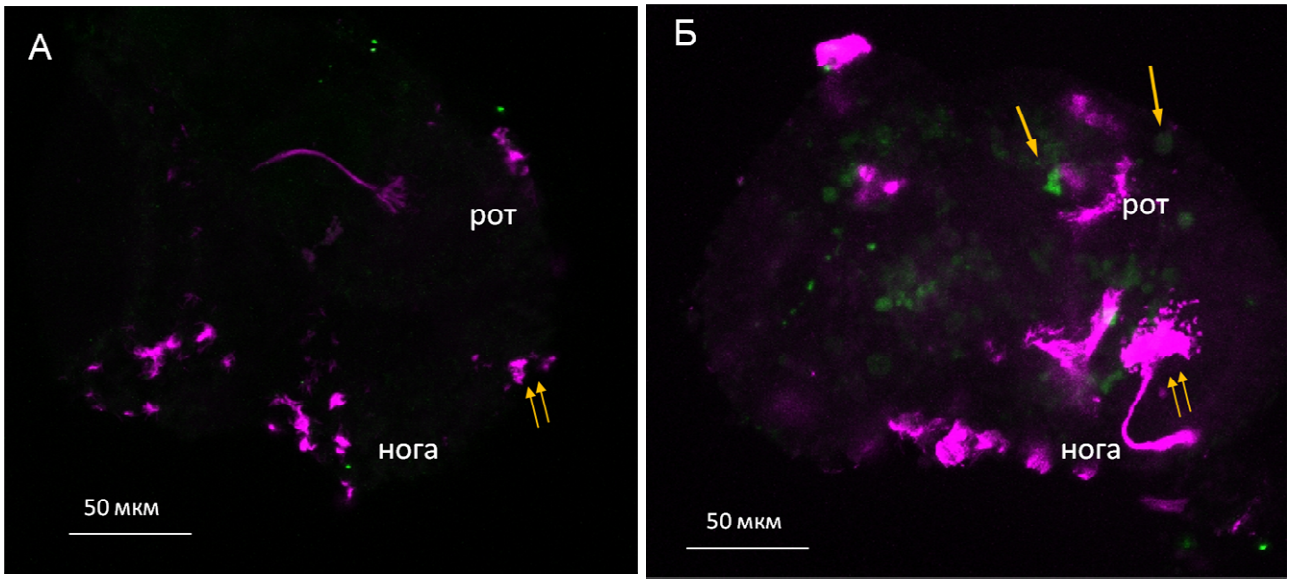


Рис 5. Зародыши большого стадии 22 прудовика под конфокальным микроскопом. Нейроны промаркированы антителами к серотонину, реснички – антителами к тубулину. Двойной стрелкой указана иннервация ресничных зон, одиночной нейроны. А – зародыши большого прудовика в норме. Б – зародыши большого прудовика через 40 минут инкубации в предшественнике серотонина.

Из-за методических сложностей, мы не проводили аналогичный морфологический анализ для предшественника дофамина. Однако, поскольку оба моноамина имеют сходные пути биохимического синтеза и фермент декорбаксилаза ароматических аминокислот сходным образом активен и в серотонинэргических и в дофаминэргических нейронах, мы предполагаем, что инкубация в предшественнике дофамина будет аналогичным образом повышать уровень дофамина в апикальных нейронах и их отростках. Таким образом, и в нейронах зародыша прудовика, и в нейронах зародышей катушки будет увеличиваться синтез того медиатора, предшественник которого будет дан во время эксперимента.

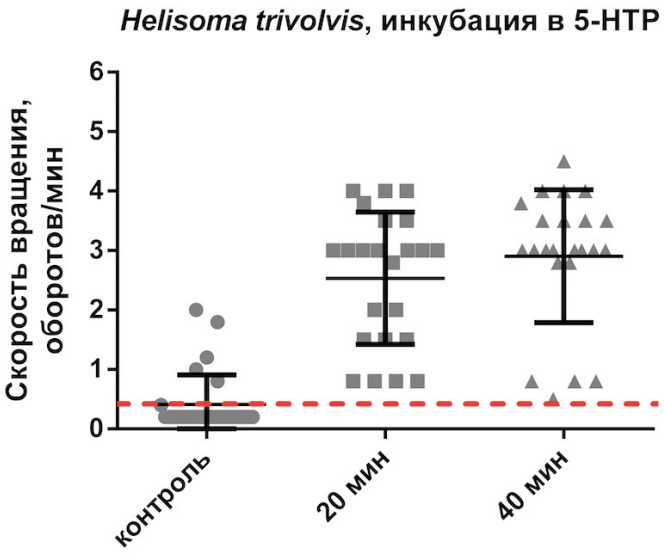
Локомоторная активность зародышей в норме и после фармакалогической модуляции уровня моноаминов в ранних нейронах

Удостоверившись, что инкубация в экспериментальной концентрации предшественников медиаторов увеличивает уровень медиатора в апикальных неронах и их отростках, мы перешли к подсчету частоты вращений контрольных и экспериментальных зародышей.

Мы провели видеорегистрацию 33 зародышей большого прудовика и 38 зародышей катушки с последующей инкубацией зародышей в L-DOPA (предшественник дофамина), а

также 57 зародышей большого прудовика и 50 зародышей катушки с последующей инкубацией в 5-HTP (предшественник серотонина).

Средняя скорость вращения катушек до инкубации в предшественнике серотонина и дофамина составляла 0,4 оборота в минуту. После 40 минут инкубации в предшественнике серотонина скорость увеличилась до 2,8 оборотов в минуту; а после 40 минут инкубации в предшественнике дофамина до 2,5 оборотов в минуту. Зародыши катушки достоверно увеличивали скорость вращения после инкубации в 5-HTP (p-value=0,000252) и после инкубации в L-DOPA (p-value=0,00015). Достоверного различия между скоростью вращения зародышей катушки после 40 минут инкубации в L-DOPA и 40 минут инкубации в 5-HTP нет (p-value=0,15).



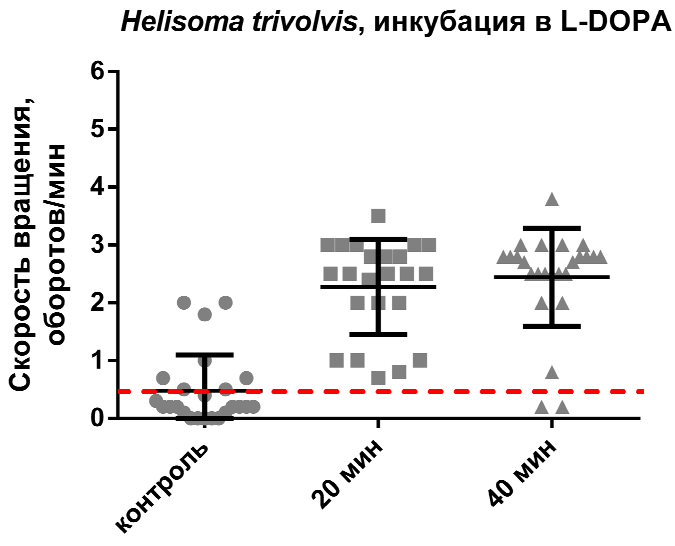
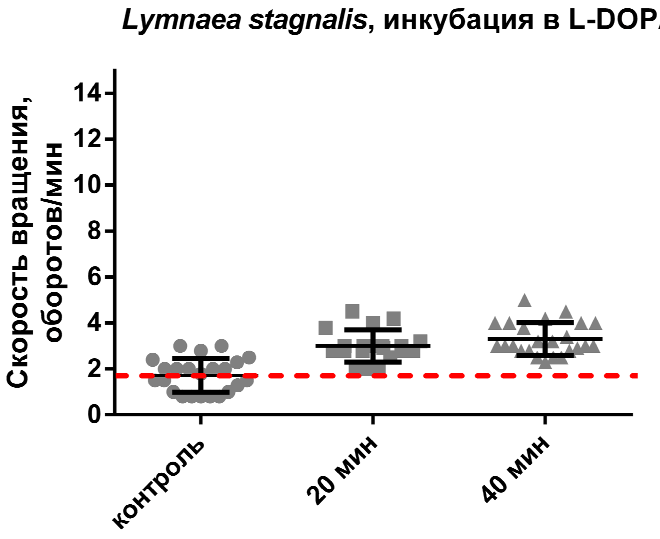


График 1. Скорость вращения зародышей катушки до инкубации в 5-HTP (предшественнике серототнина) и через 20 и 40 мин.

График 2. Скорость вращения зародышей катушки до инкубации в L-DOPA (предшественнике дофамина) и через 20 и 40 мин.

Средняя скорость вращения зародышей большого прудовика до инкубации в предшественнике серотонина составила 2,2 оборота в минуту. Через 40 минут инкубации в 5-HTP скорость возрастала до 7,8 оборотов в минуту. Средняя скорость вращения зародышей прудовика до инкубации в L-DOPA была равна 1,9 оборотов в минуту, а через 40 минут инкубации в L-DOPA она возрастала до 3,6 оборотов в минуту. Зародыши большого прудовика достоверно увеличивали скорость вращения через 40 минут инкубации в

предшественнике серотонина (p-value=0,0000562) и дофамина (p-value=0,0001). Есть статистически значимая разница между скоростью вращения зародышей большого прудовика через 40 минут инкубации в 5-HTP и L-DOPA (p-value=0,000643).



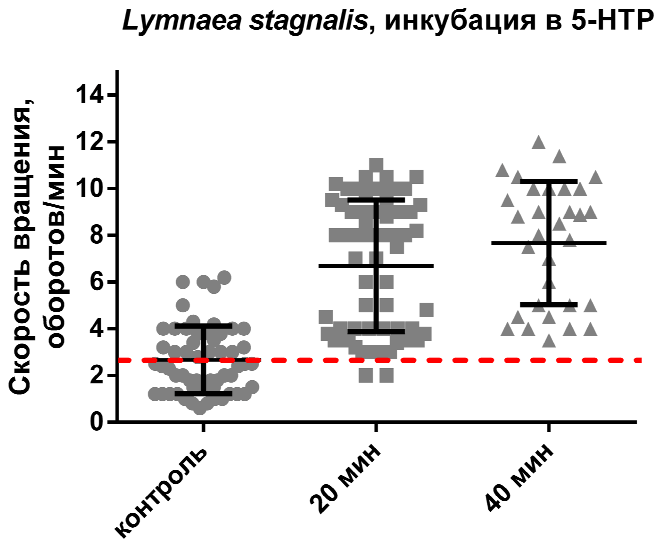


График 3 Скорость вращения зародышей большого прудовика до инкубации в L-DOPA (предшественнике дофамина) и через 20 и 40 мин.

График 4 Скорость вращения зародышей большого прудовика до инкубации в 5-HTP (предшественнике серототнина) и через 20 и 40 мин.

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем исследовании мы инкубировали зародышей большого прудовика и катушки в предшественниках серотонина и дофамина, при этом наблюдая увеличение скорости вращения зародышей.

Полученные нами морфологические данные по иммунохимическому маркированию серотонина после инкубации в его биохимическом предшественнике показывают, что в апикальных нейронах обоих видов исследованных моллюсков синтезируется серотонин. Это согласуется с литературными данными, указывающими, что и в серотонинэргических и в дофаминэргических нейронах присутствует фермент, необходимый для такого синтеза – декарбоксилаза ароматических аминокислот. А также с морфологическими данными

полученными ранее для зародышей катушки (Voronezhskaya et al., 2004). Однако, наши исследования существенно дополнили имеющуюся информацию. Мы впервые показали, что дофаминэргические апикальные нейроны зародыша прудовика способны синтезировать серотонин, несвойственный им в норме медиатор, из его биохимического предшественника.

Интересно, что увеличение скорости вращения происходило по-разному у катушки и большого прудовика под действиями разных нейромедиаторов, в отличие от исследования 2010 года (Goldberg et al., 2010), в котором ученые инкубировали зародышей большого прудовика не в предшественниках серотонина и дофамина, как это делали мы, а в самих нейромедиаторах (т.е серотонине и дофамине).

В нашем же исследовании катушки реагировали практически одинаково на инкубацию в 5-HTP и L-DOPA (через 40 минут инкубации в предшественнике серотонина скорость вращения увеличилась в 7 раз, а через 40 минут в предшественнике дофамина скорость вращения увеличилась в 6,25 раз). Синтез дофамина и серотонина в зародышах катушки шел нормальный: через 20 минут инкубации скорость вращения резко поднималась, а затем выходила на плато и оставалась постоянной.

В случае большого прудовика ситуация была несколько другой. Синтез и дофамина и серотонина так же, как и в случае катушки был нормальный: через 20 минут инкубации скорость вращения резко поднималась, а затем выходила на плато и оставалась постоянной. Оказалось, что инкубация в предшественнике серотонина увеличивает скорость вращения во много раз больше, чем инкубация в предшественнике дофамина (через 40 минут инкубации в предшественнике серотонина скорость вращения увеличилась в 3,5 раз, а через 40 минут инкубации в предшественнике дофамина скорость вращения увеличилась в 1,8 раз). Это довольно-таки неожиданный результат, так как в ранних нейронах большого прудовика превалирует дофамина, и ожидалось, что инкубация в предшественнике дофамина должна подействовать на скорость вращения значительно сильнее, чем инкубация в предшественнике серотнина.

Таким образом, оказалось, что оба нейромедиатора: и серотонин и дофамин регулируют локомоторную активность зародышей прудовика и катушки. Причем эффект нейромедиаторов однонаправленный – ускорение локомоторной активности. Неожиданным для нас оказался обнаруженный факт, что серотонин оказывает более выраженное действие на оба вида моллюсков, независимо от медиаторной специфичности нейронов апикального органа у данного вида.

Из полученных результатов очевидно, что на ресничках структурах большого прудовика и катушки есть рецепторы к нейромедиатору, которого в норме нет в этих нейронов.

Возможно, эти структуры возникли как «система страховки» на тот случай, если, например, в среде не будет предшественника одного нейромедиатора, то, возможно в среде будет предшественник другого, и, таким образом зародыш сможет вращаться.

ВЫВОДЫ

1) Была выбрана стадия развития, на которой присутствует только нейроны апикального органа, обеспечивающие регуляцию локомоторной активности зародыша
2) Выяснено с помощью иммунохимического маркирования, что инкубация в предшественнике серотонина приводит к увеличению количества серотонина в апикальных нейронах и их отростках у зародышей обоих видов исследованных моллюсков
3) Повышение уровня серотонина в апикальных нейрона приводит к существенному ускорению скорости вращения зародышей внутри капсулярной жидкости
4) В то время как у зародышей катушки повышение уровня и серотонина (свойственного этому виду медиатора) и дофамина приводит к одинаковому ускорению локомоторной активности, у зародышей прудовика повышение уровня дофамина (свойственного этому виду медиатора) не приводит к такому ускорению локомоторной активности, как повышение уровня серотонина (несвойственного этому виду медиатора).

ЛИТЕРАТУРА

1) Мещеряков В.Н. Объекты биологии развития. М., Наука, 1975. 458 с.

2) Беклемишев В.Н. Основы сравнительной анатомии беспозвоночных. Т.1., М., Наука, 1964., 433 с.

3) Сахаров Д.А. Множественность нейротрансмиттеров: функциональное значение. Журнал эволюционной биохимии и физиологии, 1990, т. 26, № 5, с. 733-740.

3) Goldberg Jeffrey I., Rich Darren R., Muruganathan Siva P., Liu Maple B., Pon Julia R., Tam Rose, Diefenbach Thomas J. and Kuang Shihuan. Identification and evolutionary implications of neurotransmitter–ciliary interactions underlying the behavioral response to

hypoxia in *Lymnaea stagnalis* embryos. The Journal of Experimental Biology, 2010, v. 214, № 15, p. 2660-2670.

4) Diefenbach Thomas J., Koss Ron, Goldberg Jeffrey I, Early development of identified serotonergic neuron in *Helisoma trivovis* embryos: serotonin expression, de-expression, and uptake. Journal of neurobiology, 1998, v. 34, № 4, p. 361-376.

5) Haszprunar G., Friedrich S., Wanninger A., Ruthensteiner B. Fine structure and immunochemistry of a new chemosensory system in the chiton lavra (Mollusca: Polyplacophora). Journal of Morphology, 2002, v. 251, № 2, p. 210-218.

6) Voronezhskaya E.E, Hiripi L., Elekes K., Croll R.P. Development of catecholaminergic neurons in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*: I. Embryonic development of dopamine-containing neurons and dopamine-dependent behaviors. Journal of comparative neurology, 1999, v. 404, № 3, p. 297-307.

7) Voronezhskaya E.E., Khabarova M.Yu., Nezlin L.P. Apical sensory neurons mediatedevelopmental retardation induced by conspecific environmental stimuli in freshwater pulmonate snails. Development, 2004, v.131, № 15, p. 3671–3680.