

На правах рукописи

Рошин Матвей Вадимович

**Роль серотонина и дофамина в регуляции обоняния и движения
щупалец у виноградной улитки**

Специальность
03.03.01- физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2012

Работа выполнена в лаборатории клеточной нейробиологии обучения (заведующий лабораторией – член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор Павел Милославович Балабан) Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (директор – член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор Павел Милославович Балабан).

Научный руководитель:

Член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор
Павел Милославович Балабан

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук Алексей Владимирович Богданов
Кандидат биологических наук Варвара Евгеньевна Дьяконова

Ведущая организация –

Биологический факультет Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова

Защита состоится 22 февраля 2012 г. в 14⁰⁰ на заседании диссертационного
совета Д 002.044.01 при Федеральном государственном бюджетном
учреждении науки Института высшей нервной деятельности и
нейрофизиологии РАН по адресу: 117485, Москва, ул. Бутлерова д. 5а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального
государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной
деятельности и нейрофизиологии РАН.

Автореферат разослан « ___ » января 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
Доктор биологических наук, профессор



В.В. Раевский

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Обоняние у виноградных улиток является основным способом получения информации об объектах окружающей среды, не контактирующих с поверхностью тела животного. Обонятельная система улиток хорошо развита и состоит из трех уровней: обонятельного эпителия, лежащего под ним тентакулярного ганглия и отдела церебрального ганглия, называемого процеребрумом (Зайцева, 1992; Chase and Tolloczko, 1993).

Участки специализированного обонятельного эпителия располагаются на кончиках двух пар щупалец, причем за восприятие запахов, распространяемых с потоками воздуха, отвечают преимущественно задние щупальца (Chase, 1986). Щупальца непрерывно совершают медленные сканирующие движения, а в ответ на запах могут изгибаться и изменять свою длину (Nikitin et al., 2005; Nikitin et al., 2008). Движения задних щупалец улитки играют важную роль в ориентации животного по запахам и являются компонентом разных форм поведения улитки – ориентировочно-исследовательского, пищедобывательного, оборонительного (Никитин и др., 2004; Chase, 1986).

Нейроны, контролирующие движения заднего щупальца, получают афферентные входы от периферического обонятельного органа (Захаров и др., 1982; Prescott et al., 1997), а также находятся под тормозным влиянием центральной обонятельной структуры – процеребрума (Nikitin et al., 2005). Основной вклад (до 85%) в центральную регуляцию движения задних щупалец вносит гигантский идентифицированный мотонейрон МтЦЗ (Prescott et al., 1997). Интенсивность реакции отдергивания щупальца в ответ на запах поддается точной количественной оценке, а активность как сенсорных (Chase, 1981; Ito et al., 2003, Delaney et al., 1994; Nikitin and Balaban, 2000; Murakami et al., 2004), так и моторных структур (Prescott et al., 1997; Nikitin et al., 2005),

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ: МтЦЗ – идентифицированный метациеребральный нейрон №3; ПД – потенциал действия; ТПСП – тормозный постсинаптический потенциал; ЦНС – центральная нервная система (окологлоточное нервное кольцо); L-ДОФА – 3,4-дигидрокси-L-фенилаланин

вовлеченных в формирование данного поведенческого акта, может быть зарегистрирована на полуинтактном препарате, в том числе во время предъявления запахов. Таким образом, виноградная улитка представляет собой удобный объект для изучения поведения, вызванного обонятельными стимулами.

Роль серотонина и дофамина в нервной системе моллюсков изучена достаточно подробно. Известно, что колебания концентрации этих медиаторов в нервной системе и тканях тела коррелируют с изменением общего уровня активности животного при изменении условий внешней среды, а также со степенью насыщения (Hernadi et al., 2008a,b). Показано модуляторное воздействие серотонина и дофамина на нейронные системы, обеспечивающие оборонительное (Чистякова, 1989; Zakharov et al., 1995) и пищевое (Галанина и др., 1986) поведение виноградной улитки. В ряде работ на моллюсках установлено, что изменение концентрации серотонина или дофамина приводит к скоординированным изменениям нейронной активности, которые понижают порог возникновения определенной формы поведения, или непосредственно вызывают её. В качестве примеров можно привести активизацию ориентировочно-исследовательского поведения у прудовика *Lymnaea stagnalis* под влиянием предшественника серотонина (Дьяконова и Сахаров, 1994б), запуск охотничьего поведения у хищного крылоногого моллюска *Clione limacina* при повышении концентрации серотонина (Kabotyanskii and Sakharov, 1991; Norekyan and Sutterlie, 1993) или ритмических движения ротового аппарата у аплизии *Aplysia californica* (Kabotyanski, 2000) и слизня *Limax maximus* (Wieland and Gelperin, 1983) под действием дофамина.

В литературе есть данные об эффектах серотонина и дофамина на активность центрального отдела обонятельного анализатора – процеребрума (Yamane et al., 1989; Gelperin et al., 1993; Rhines et al., 1993; Inoue et al., 2001), но эти сведения получены на слизнях *Limax*, тогда как данных по воздействию медиаторов на процеребрум виноградной улитки найти не удалось. Сведения о влиянии серотонина на активность периферических обонятельных структур

слизней носят отрывочный характер (Inoue et al., 2004). Влияние серотонина и дофамина на сокращение задних щупалец также остается малоизученным.

Можно предположить, что изменение уровней выделения серотонина и дофамина, связанное с состоянием улитки и внешними стимулами, модифицирует активность нейронов обонятельной системы и мотонейронов ретракции щупалец. Подобные эффекты медиаторов могли бы быть одним из механизмов выбора преобладающего в данный момент типа поведения улитки, например, пищедобывательного или оборонительного.

Цели и задачи исследования

Целью работы являлось сравнительное изучение вклада двух медиаторов, серотонина и дофамина, в регуляцию реакции на запах у виноградной улитки. Эксперименты по регистрации поведения животных сочетали с электрофизиологическими исследованиями на двух типах препаратов нервной системы и задних щупалец улитки. Были поставлены следующие задачи:

1. Проанализировать изменения реакции отдергивания заднего щупальца в ответ на запах у свободно подвижных улиток после инъекции предшественников серотонина или дофамина.

2. Изучить, каким образом электрофизиологическая реакция на запах в периферической и центральной части обонятельной системы улитки и спонтанная осцилляторная активность центральной части обонятельной системы изменяются при повышении концентрации серотонина или дофамина.

3. Исследовать изменения электрической активности гигантского идентифицированного мотонейрона заднего щупальца МтЦЗ под действием серотонина, дофамина и их предшественников.

Положения, выносимые на защиту

1. Инъекции предшественников серотонина и дофамина, увеличивающие выделение соответствующего нейромедиатора, вызывают противоположно направленные изменения в поведении улиток: предшественник серотонина снижает амплитуду отдергивания заднего щупальца в ответ на аверсивный

запах этилацетата, тогда как предшественник дофамина увеличивает амплитуду отдергивания щупальца в ответ на этот запах.

2. Увеличение концентрации серотонина или дофамина противоположным образом влияет на импульсную активность в обонятельном нерве и на мембранный потенциал мотонейрона МтЦЗ: серотонин уменьшает ответы на запах цинеола, регистрируемые в нерве, и гиперполяризует нейрон МтЦЗ, тогда как дофамин усиливает спонтанную активность и ответы на запах, регистрируемые в нерве, и повышает частоту потенциалов действия в нейроне МтЦЗ.

3. Изменения поведения улиток под действием серотонина и дофамина на обонятельную систему и нейрон МтЦЗ, предполагаемые на основании результатов опытов *in vitro*, совпадают с наблюдаемыми изменениями поведения свободно подвижных улиток после инъекции предшественников соответствующих медиаторов. Полученные результаты свидетельствуют, что в основе изменения ответов на запахи в экспериментах на свободно подвижных улитках лежит антагонистическое действие серотонина и дофамина на обонятельную систему и нейрон МтЦЗ.

Научная новизна

Зарегистрированы поведенческие реакции на запах на фоне повышенного выделения серотонина или дофамина в нервной системе виноградной улитки. Впервые изучены предполагаемые физиологические механизмы наблюдаемых изменений поведения на разных уровнях обонятельной системы и на уровне единичного нейрона, участвующего в контроле движений задних щупалец. Показаны противоположные изменения ответов на запах в периферической части обонятельной системы виноградной улитки под действием серотонина и дофамина. Продемонстрировано уменьшение амплитуды спонтанных осцилляций суммарного электрического потенциала в процеребруме виноградной улитки под действием дофамина. Изучены противоположные эффекты двух медиаторов на электрическую активность мотонейронов МтЦЗ, контролирующей движения задних щупалец.

Научно-практическая ценность работы

Полученные данные об изменениях в активности обонятельных структур и идентифицированного мотонейрона ретракции щупалец под действием серотонина и дофамина дополняют представления современной физиологии о нейронных механизмах формирования поведения в простых нервных системах беспозвоночных животных. В частности, результаты исследования свидетельствуют, что увеличенное выделение определенного медиатора в нервной системе и периферических органах приводит к скоординированным изменениям их функционирования, вызывающим смену поведения животного. Полученные данные на примере виноградной улитки демонстрируют возможные механизмы формирования поведенческого ответа на запах в зависимости от состояния животного и условий окружающей среды.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на IX восточно-европейской конференции Международного общества нейробиологии беспозвоночных (Санкт-Петербург, 2009), на XII симпозиуме по нейробиологии беспозвоночных Международного общества нейробиологии беспозвоночных (Тихань, Венгрия, 2011), на конференции Общества Нейронаук (Вашингтон, США, 2011) и на конференциях молодых ученых ИВНДиНФ РАН (Москва, 2009, 2011).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, методики исследования, результатов, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 114 страницах машинописного текста, иллюстрирована 23 рисунками. Список литературы содержит 85 источников.

МЕТОДИКА

Животные

Эксперименты были выполнены на 132 взрослых улитках *Helix lucorum* L. крымской популяции: протестировано поведение 99 улиток и электрофизиологически исследованы 33 препарата нервной системы и задних щупалец. Перед тестированием поведения животных не кормили в течение 5-7 дней для поддержания их в активном состоянии.

Эксперименты по регистрации поведения улиток

Улиток помещали на стеклянную пластину размером 30x50 см через 30 мин после инъекции физиологического раствора (200 мкл) или растворов предшественника серотонина 5-гидрокситриптофана (расчетная конечная концентрация 10^{-4} М или 10^{-3} М в двух группах животных) или предшественника дофамина L-ДОФА (10^{-4} М). Улитки свободно ползали 2 мин, после чего на одно из задних щупалец с помощью ольфактометра (описание устройства в Nikitin et al., 2005) подавали запах цинеола в концентрации 5% (смесь из 100 мл/мин чистого и 5мл/мин насыщенного запахом воздуха) в течение 5 с. 46 из 79 улиток через 2 мин после цинеола давали запах этилацетата той же концентрации и длительности. Улитки воспринимают запах цинеола, но он не является для них аверсивным или привлекательным: животные, помещенные на стеклянную пластину, с одной стороны от которой находится источник запаха цинеола, выбирают направление движения в сторону запаха или от него в случайном порядке (Nikitin and Balaban, 2000). Запах этилацетата вызывает у улиток выраженную оборонительную реакцию (Voss, 2000). Поведение улиток регистрировали видеокамерой, вертикально размещенной над центром стеклянной пластины. Измеряли амплитуду максимального отдергивания щупальца в течение 5с подачи запаха (нормированную по отношению к длине щупальца до воздействия). Также регистрировали абсолютную длину щупальца до подачи запахов и амплитуду отдергивания щупальца в ответ на тактильное раздражение кожи. Гибким волоском касались кожи улитки за задним левым щупальцем (Балабан и др., 2011) трижды с интервалом в 1 мин начиная через 2

мин после подачи запахов. Эксперименты проводили в постоянно вентилируемой комнате, после каждого опыта стекло тщательно протирали от следов предыдущей улитки. Данные сравнивали попарно между группами с помощью критерия Манна-Уитни. Статистическая оценка полученных результатов проводилась в программе SigmaPlot 9.0 (Systat Software).

Электрофизиологические эксперименты

В экспериментах *in vitro* использовали два типа препаратов: центральная нервная система с задними щупальцами (Nikitin et al., 2005) и изолированное заднее щупальце.

Для предотвращения операционного шока животных анестезировали изотоническим раствором $MgCl_2$. Состав физиологического раствора, использованного в опытах (приведены концентрации в ммоль): $100 Na^+$, $8 Ca^{2+}$, $5 Mg^{2+}$, $4 K^+$, $130 Cl^-$, Trizma pH=7.5 (из Rhines et al., 1993, с изменениями).

Препарат изолированного заднего щупальца состоял из периферического обонятельного органа (обонятельный эпителий и тентакулярный ганглий) и отходящего от него обонятельного нерва, перерезанного у проксимального конца. Кожу и мускулатуру щупальца удаляли. Чтобы предотвратить высыхание обонятельного эпителия во время экспериментов, его помещали на возвышение, покрытом слоем физиологического раствора. Уровень раствора понижали за 30-40 с до подачи запаха цинеола (5%, 5с) и восстанавливали 1 минутой позже. Отрезок обонятельного нерва проходил через слой вазелина между двумя отсеками экспериментальной камеры, в которых располагались два хлорсеребряных проволочных электрода. Регистрировали потенциалы действия в обонятельном нерве в покое и во время подачи запаха цинеола (5%, 5с) по биполярной схеме с полосой пропускания 20-1000 Гц. В раствор, омывающий препарат, на 3-4 минуты добавляли растворы серотонина или дофамина в финальной концентрации $10^{-5}M$ и $10^{-6}M$. После этого препарат отмывали физиологическим раствором в течение 5-6 минут, пока регистрируемые показатели не возвращались к уровням, наблюдавшимся до добавления веществ.

При приготовлении препарата ЦНС с задними щупальцами, оба щупальца препарировали вышеописанным методом, но обонятельные нервы не перерезали – щупальца извлекали из тела улитки вместе с ганглиями окологлоточного нервного кольца. Соединительнотканые оболочки церебральных ганглиев удаляли после обработки протеазой (1 мг/мл, тип XIV, Sigma) в течение 2-5 мин и последующего отмывания препарата физиологическим раствором в течение 10-15 мин. С помощью экстраклеточного электрода-присоски, заполненного физиологическим раствором, регистрировали осцилляции суммарного электрического потенциала в дистальной части процеребрума (полоса пропускания аналоговых фильтров усилителя – 0.3-35 Гц, цифровых программных фильтров – 0.3-10 Гц). Внутриклеточно регистрировали мембранный потенциал идентифицированного нейрона МтЦЗ (электроды были заполнены 2М ацетатом калия, сопротивление 10-20 МОм). На препараты подавали запах цинеола (5%, 5с), а также воздействовали растворами серотонина (конечная концентрация 10^{-5} М), дофамина (10^{-5} М) и их предшественников (5-гидрокситриптофан – 10^{-4} М, L-ДОФА – 10^{-4} М и 10^{-3} М). Медиаторы добавляли на 3-4 минуты, после чего отмывали, предшественники – на 30 мин (L-ДОФА) или 40 минут (5-гидрокситриптофан).

Электрофизиологические данные записывали с помощью экстраклеточного усилителя DL302 (NBLab, Россия) и внутриклеточного усилителя BRAMP-01R (NPI, Германия) или IX-2 700 (DAGAN, США). Сигнал с усилителей поступал на аналого-цифровой преобразователь Digidata 1200 (Axon Instruments, США) и далее на персональный компьютер с программой AxoScore 9 (Axon Instruments, США). Данные анализировали в программах Spike 2 5.0 (CED), Origin Pro 7.5 (OriginLab) и SigmaPlot 9.0 (Systat Software). Повторные измерения параметров в течение одного опыта сравнивали с помощью рангового теста Вилкоксона или ANOVA (для трех изменений), две разные группы препаратов – по критерию Манна-Уитни. Данные в работе представлены в виде средних значений со стандартными ошибками.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изменение поведения улиток под действием предшественников серотонина и дофамина

В серии экспериментов по изучению поведения свободно подвижных улиток были исследованы изменения реакции на запахи при повышении выброса серотонина или дофамина в нервной системе после инъекции предшественника соответствующего медиатора. Из литературы известно, что у брюхоногих моллюсков как 5-гидрокситриптофан, так и L-ДОФА захватываются серотонинергическими и дофаминергическими нейронами с последующим увеличением концентрации соответствующего медиатора в нейронах и его выделением (Kerkut et al., 1966; McCaman et al., 1984; Fickbohm et al., 2005; Dyakonova et al., 2009).

Улитки из контрольной группы (N=25) отвечали на запах цинеола (5% в течение 5с) отдергиванием щупальца со средней амплитудой $41.7 \pm 5.4\%$ (Рис. 1А). Согласно литературным данным, первоначальное отдергивание щупальца наблюдается у улиток в ответ как на пищевые или аверсивные, так и на нейтральные запахи, включая запах цинеола (Nikitin et al., 2005; Nikitin et al., 2008). Животные, которым перед тестированием вводили L-ДОФА (10^{-4}M), демонстрировали достоверно более сильную реакцию на запах – $57.8 \pm 4.9\%$ (N=18, $P < 0.05$ при сравнении с контрольной группой, критерий Манна-Уитни, Рис. 1А). Ответ на запах цинеола после инъекции 5-гидрокситриптофана в концентрации 10^{-4}M не отличался от контроля ($42.8 \pm 5.7\%$, N=18, $P = 0.758$). В десять раз большая концентрация вещества вызывала небольшое снижение реакции на запах, но оно также было недостоверным ($35.7 \pm 3.8\%$, N=18, $P = 0.389$). Таким образом, предшественники серотонина и дофамина изменяли реакцию улиток на запах в противоположных направлениях, хотя эффект 5-гидрокситриптофана не был статистически значим (Рис. 1А).

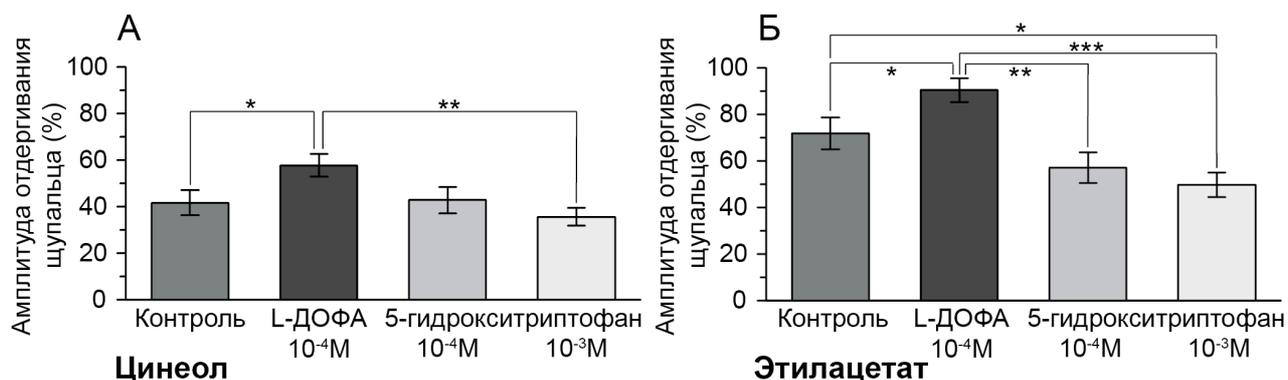


Рис. 1. Амплитуда отдергивания заднего щупальца в ответ на запах цинеола (А) и этилацетата (Б) в контроле и после инъекции L-ДОФА или 5-гидрокситриптофана.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, критерий Манна-Уитни. Для контрольной группы и групп улиток, которым вводили L-ДОФА (10^{-4} М) или 5-гидрокситриптофан (в одной из двух концентраций - 10^{-4} М или 10^{-3} М) $N=25/18/18/18$ в опытах с цинеолом и $N=14/11/11/10$ в опытах с этилацетатом.

Можно было предположить, что в случае более интенсивной обонятельной стимуляции, которая сама по себе приводит к выраженной реакции сокращения щупалец, различия между эффектами двух медиаторов проявятся заметнее. В качестве пахучего вещества, вызывающего интенсивное отдергивание щупальца, использовали этилацетат. В высоких концентрациях он вызывает быстрое втягивание улитки в раковину (Voss, 2000). В пилотной серии экспериментов выбрали концентрацию запаха, равную 5% (из 1%, 5% и 10%), которая вызывала сильное, но не полное втягивание щупалец. Запах этилацетата (5%, 5с) предъявляли 46 улиткам из 79 через 2 мин после запаха цинеола. В контрольной группе ($N=14$) амплитуда отдергивания щупальца в ответ на запах этилацетата составила в среднем $71.9 \pm 6.8\%$ (Рис. 1Б). Реакции на запах у животных, которым вводили 5-гидрокситриптофан (10^{-3} М) или L-ДОФА (10^{-4} М) достоверно отличались от контроля в противоположных направлениях. Инъекция 5-гидрокситриптофана в концентрации 10^{-3} М приводила к значительному уменьшению ответа на запах этилацетата до $49.8 \pm 5.2\%$ ($P < 0.05$ при сравнении с контрольной группой, критерий Манна-Уитни, Рис. 1Б). В десять раз меньшая концентрация вещества не вызывала достоверного снижения реакции на запах ($57.2 \pm 6.5\%$). Под действием

L-ДОФА ответ на запах возрастал до $90.5 \pm 5.1\%$ ($P < 0.05$ при сравнении с контролем, Рис. 1Б).

Инъекции предшественников серотонина и дофамина вызывали заметные изменения в общем состоянии улиток. После введения L-ДОФА (10^{-4} М) животные медленнее ползли, их щупальца были менее вытянутыми по сравнению с контрольными животными. 5-гидрокситриптофан (10^{-3} М) вызывал более активную локомоцию с длинными, полностью вытянутыми щупальцами. Эти наблюдения согласуются с литературными данными о том, что серотонин ускоряет, а дофамин замедляет скорость локомоции улиток (Sakharov and Salanki, 1982; Pavlova, 2001). Для того, чтобы оценить изменения в общем состоянии животных под действием предшественников медиаторов, проанализировали абсолютную длину щупалец у улиток разных групп, а также интенсивность отдергивания левого заднего щупальца в ответ на тактильную стимуляцию кожи (на левой стороне головы улитки за щупальцами). Реакция отдергивания щупальца в ответ на тактильную стимуляцию широко используется как показатель выраженности оборонительного поведения у улиток (Балабан и др., 2011; Balaban, 2002).

Абсолютная длина заднего щупальца достоверно отличалась при попарном сравнении всех групп, за исключением пары контроль – 5-гидрокситриптофан в концентрации 10^{-4} М (Рис. 2Б). В контроле (N=25) длина щупалец составляла в среднем 14.5 ± 0.8 мм. Под действием L-ДОФА щупальца укорачивались до 9.1 ± 0.85 мм (N=18, $P < 0.001$ при сравнении с контролем, критерий Манна-Уитни). 5-гидрокситриптофан в концентрации 10^{-3} М вызывал удлинение щупалец до 18.0 ± 0.8 мм (N=18, $P < 0.01$). Средняя амплитуда ответа на тактильное раздражение в контрольной группе составляла $42.6 \pm 5.9\%$ (N=25; Рис. 2А). После инъекции L-ДОФА или 5-гидрокситриптофана в концентрации 10^{-4} М интенсивность реакции не изменялась (N=18, $P > 0.05$). В более высокой концентрации 5-гидрокситриптофан снижал ответ на тактильную стимуляцию до $18.7 \pm 3.4\%$. (N=18, $P < 0.01$).

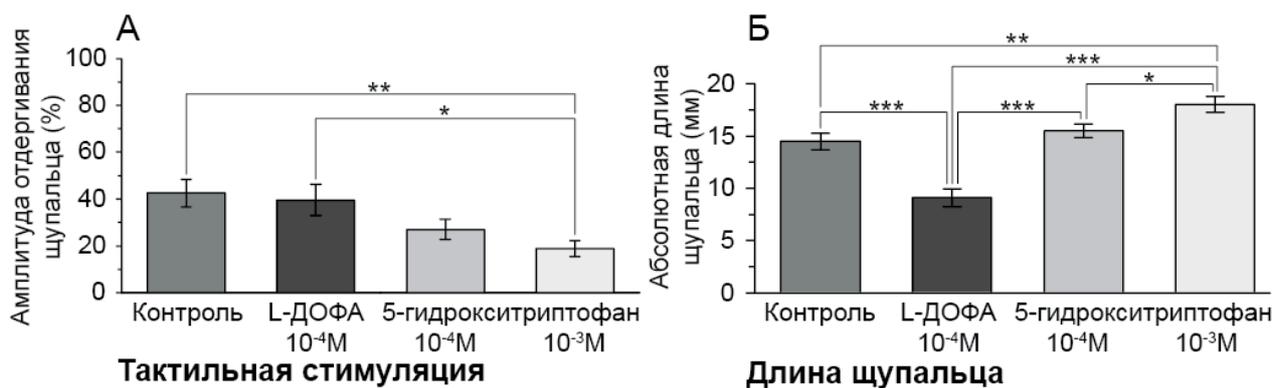


Рис. 2. (А) Амплитуда отдергивания заднего щупальца в ответ на тактильное раздражение у свободно подвижных улиток. (Б) Абсолютная длина заднего щупальца до обонятельной и тактильной стимуляции.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, критерий Манна-Уитни. Четырём группам улиток вводили физиологический раствор (контроль, $N=25$), L-ДОФА (10^{-4} М; $N=18$) или 5-гидрокситриптофан в концентрации 10^{-3} М ($N=18$) или 10^{-4} М ($N=18$).

Таким образом, инъекции 5-гидрокситриптофана и L-ДОФА изменяли поведение улиток, в частности, реакции на запахи, в противоположном направлении. Введение 5-гидрокситриптофана приводило к тому, что животные были более подвижны, держали задние щупальца в максимально вытянутом состоянии, слабее реагировали на аверсивный запах этилацетата и на тактильную стимуляцию. При этом реакция на нейтральный запах цинеола достоверно не менялась. Введение L-ДОФА вызывало укорочение задних щупалец и увеличение амплитуды их сокращения в ответ на оба использованных в работе запаха.

Изменение электрической активности в структурах обонятельной системы улиток под действием серотонина и дофамина

В экспериментах *in vitro* были исследованы возможные механизмы изменений реакций на запахи, наблюдаемых в поведении при повышении концентрации серотонина или дофамина в нервной системе улитки. Для этого были проанализированы эффекты, вызываемые серотонином и дофамином на двух уровнях обонятельной системы – периферическом (обонятельный эпителий и тентакулярный ганглий) и центральном (процеребрум). Кроме того,

было изучено действие медиаторов и их предшественников на парные мотонейроны МтЦЗ, иннервирующие мускулатуру задних щупалец.

Изменение ответов на запах, регистрируемых в обонятельном нерве, под действием серотонина и дофамина.

Периферические обонятельные органы улитки иннервированы отростками серотонинергических и дофаминергических нейронов церебральных ганглиев, проходящими через обонятельный нерв (Иерусалимский и др., 1997; Hernadi and Elekes, 1999; Hernadi, 2000), что позволяет предположить участие серотонина и дофамина в регуляции восприятия запахов. До настоящего времени эффекты данных медиаторов на электрическую активность нейронов периферической обонятельной системы улитки оставались неизученными, хотя литературные данные косвенно свидетельствуют о том, что серотонин может уменьшать число потенциалов действия, регистрируемых в ответ на запах в обонятельном нерве у слизней (Inokuma et al. 2002; Ito et al. 2003).

Для исследования изменений электрической активности в периферических обонятельных структурах, были зарегистрированы потенциалы действия в обонятельном нерве (который соединяет обонятельный эпителий и тентакулярный ганглий с центральными ганглиями) на препарате изолированного щупальца. Удаление ЦНС позволило исключить из записей потенциалы действия в центрифугальных волокнах.

Добавление серотонина или дофамина (в конечной концентрации 10^{-5} М) в физиологический раствор, омывающий препарат, приводило к противоположным изменениям частоты потенциалов действия в обонятельном нерве, возникающих при предъявлении запаха цинеола. На фоне действия серотонина (Рис. 3Б) реакция на запах была меньше и короче по времени по сравнению с контролем (Рис. 3А), тогда как добавление дофамина (Рис. 3В) приводило к усилению как фоновой активности (во временном интервале между понижением уровня жидкости над обонятельным эпителием и подачей запаха),

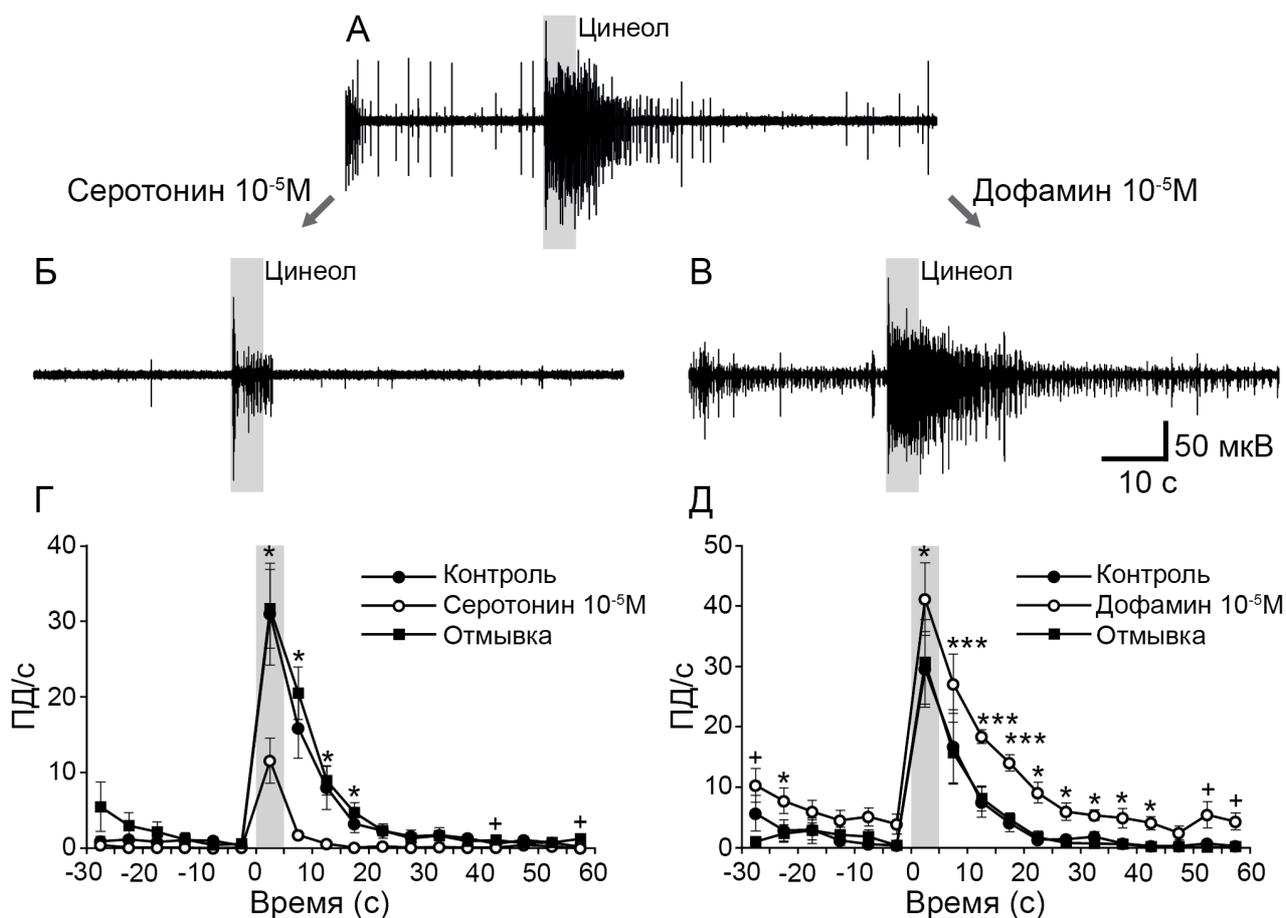


Рис. 3. Изменение числа потенциалов действия, регистрируемых в обонятельном нерве в ответ на запах цинеола (5%, 5с), на фоне действия серотонина или дофамина ($10^{-5}M$).

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ при сравнении действия медиатора как с контролем, так и с отмытием препарата, + $P < 0.05$ при сравнении эффекта медиатора только с отмытием (ANOVA). $N=5$ для обоих графиков.

так и ответа на запах. Реакции на запах цинеола достоверно отличались в контроле, на фоне действия серотонина и после отмытия препарата физиологическим раствором во временном промежутке 0-20 с от начала подачи запаха ($N=5$, $P < 0.05$, ANOVA; Рис. 3Г). Непосредственно во время подачи запаха (0-5 с) частота потенциалов действия в обонятельном нерве была равна 31.00 ± 6.75 ПД/с до добавления медиатора, 11.56 ± 2.98 ПД/с под действием серотонина и 31.68 ± 5.25 ПД/с после отмытия препарата физиологическим раствором. Ответы на запах на фоне действия дофамина достоверно отличались от контрольных записей до добавления и после отмытия медиатора в интервале 0-45 с от начала подачи запаха ($N=5$, $P < 0.001$ в интервале 5-20 с, $P < 0.05$ для других интервалов, ANOVA; Рис. 3Д). Во время подачи запаха (0-5

с) частота потенциалов действия в контроле составляла 29.52 ± 6.28 ПД/с, под действием дофамина – 41.12 ± 5.99 ПД/с, после отмывания – 30.72 ± 7.00 ПД/с. Необходимо отметить, что дофамин также достоверно увеличивал частоту спонтанных потенциалов действия (30-20 с до подачи запаха цинеола; $N=5$, $P < 0.05$).

Изменение ответов на запахи в периферическом обонятельном органе под действием двух медиаторов должно влиять на силу возбуждения периферических и центральных мотонейронов, иннервирующих мускулатуру щупалец. Это, в свою очередь, может приводить к усилению или ослаблению реакций отдергивания заднего щупальца в ответ на запах. Кроме того, изменение интенсивности ответов на запахи может быть непосредственно связано с регуляцией восприятия запахов. Ослабление ответа на запах сильнее выражено после окончания подачи запаха (Рис. 3Г), то есть общая продолжительность ответа снижается. Возможно, что индуцированное серотонином снижение силы и продолжительности ответов на запах помогает животному ориентироваться в окружающей среде, уменьшая наложение во времени ответов на разные запахи и ослабляя ответы на слишком сильные запахи. Сходное явление – вызванное серотонином снижение возбуждения обонятельных сенсорных нейронов при повышении уровня активности животного – наблюдается у млекопитающих (Petzold et al., 2009).

Изменение спонтанных осцилляций суммарного электрического потенциала в процеребруме под действием дофамина

У виноградных улиток и слизней в центральном отделе обонятельной системы, процеребруме, наблюдаются медленные колебания суммарного электрического потенциала (Nikitin and Balaban, 2000; Gelperin et al. 1993). Из исследований на слизнях рода *Limax* известно, что эти колебания отражают активность двух типов нейронов. В В-клетках периодически на фоне деполяризации мембраны возникает залп импульсной активности, который вызывает ТПСП в NB-клетках. Синхронные ТПСП во множестве NB-клеток регистрируются в виде колебаний локального потенциала процеребрума

(Kleinfeld et al., 1994). Серотонин и дофамин влияют на амплитуду и частоту осцилляций у слизней (Gelperin et al. 1993, Inoue et al. 2001, Rhines et al. 1993). Сходство осцилляций, наблюдаемых в процеребруме слизней и улиток, а также присутствие в церебральных ганглиях нескольких кластеров серотонинергических и дофаминергических нейронов (Иерусалимский и др., 1997; Hernadi and Elekes, 1999; Hernadi, 2000) позволило предположить, что данные медиаторы могут участвовать в регуляции активности нейронов процеребрума виноградных улиток. Для проверки этого предположения экстраклеточно регистрировали осцилляции суммарного электрического потенциала в процеребруме на фоне действия серотонина и дофамина (в конечной концентрации 10^{-5} М). Эту серию экспериментов проводили на препарате центральной нервной системы улитки с задними щупальцами.

Добавление дофамина в раствор, омывающий препарат, вызывало снижение амплитуды осцилляций (Рис. 4А). В течение первой минуты после добавления дофамина она составляла $74.78 \pm 7.93\%$ от первоначальной величины ($N=7$, $P<0.05$, тест Вилкоксона). Серотонин также приводил к небольшому снижению амплитуды осцилляций, но эффект не был статистически значим ($87.77 \pm 6.40\%$, $N=9$, $P=0.13$, тест Вилкоксона). Частота осцилляций до добавления медиаторов в среднем была равна 0.90 ± 0.05 Гц, при добавлении дофамина или серотонина она достоверно не изменялась.

Согласно литературным данным, аппликация дофамина и серотонина вызывает двухфазные или мультифазные изменения частоты и амплитуды колебаний в процеребруме слизней. При этом в первые несколько десятков секунд после добавления дофамина наблюдается снижение амплитуды осцилляций (Gelperin et al. 1993). Аппликация дофамина на нейроны процеребрума в культуре приводит к короткому периоду подавления импульсной активности нейронов, за которым следует период генерации залпов потенциалов действия (Rhines et al. 1993). Возможно, что добавление дофамина в наших экспериментах приводило к частичной инактивации В-клеток, что

вызывало снижение величины ТПСИ в NB-клетках и, как следствие, уменьшение амплитуды колебаний.

Выделение серотонина в процеребруме слизней необходимо для возникновения осцилляций суммарного электрического потенциала: антагонисты рецепторов к серотонину подавляют медленные колебания мембранного потенциала в В-клетках, что приводит к исчезновению осцилляций (Inoue et al. 2001). Аппликация серотонина учащает потенциалы действия в процеребральных нейронах в культуре (Rhines et al. 1993) и повышает амплитуду медленных колебаний мембранного потенциала в В-клетках изолированного процеребрума (Inoue et al. 2001). Возможно, что у виноградных улиток серотонин не участвует в регуляции активности клеток процеребрума, как у слизней, или же что уровня выброса серотонина в нервной системе достаточно для связывания с основной частью рецепторов к серотонину и дополнительное увеличение концентрации серотонина не оказывает заметного эффекта.

Реакция на запах цинеола, наблюдавшаяся в процеребруме, заключалась в снижении амплитуды осцилляций в интервале 5-20 с от начала подачи запаха. В том же временном интервале происходило небольшое уменьшение средней

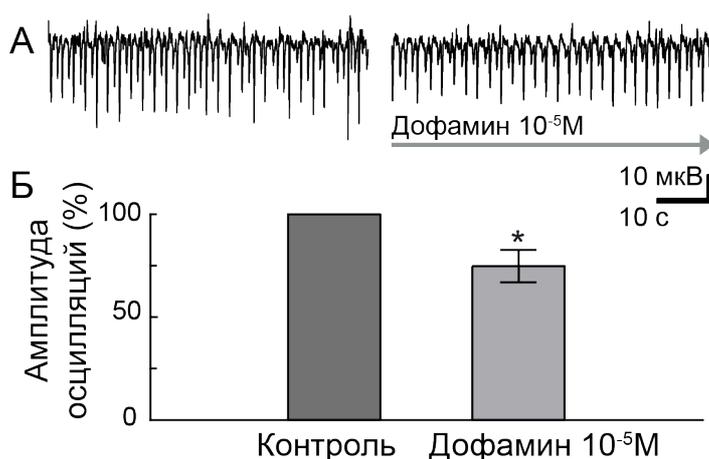


Рис. 4. Снижение амплитуды спонтанных осцилляций суммарного потенциала процеребрума под действием дофамина (10^{-5} М).

(А) Фрагменты исходной записи осцилляций в течение 1 мин до и 1 мин после добавления вещества. (Б) Усредненные данные. N=7, P<0.05, тест Вилкоксона

частоты осцилляций. Ни дофамин, ни серотонин не вызывали каких-либо статистически значимых изменений ответа на запах в процеребруме. Вероятно, данные медиаторы, участвуя в регуляции спонтанной активности нейронов процеребрума, не влияют на механизмы возникновения и распространения ответа на запах. Реакции на запахи в процеребруме слизней выражаются в увеличении или снижении числа потенциалов действия в NB-клетках (Murakami et al., 2004). При этом спонтанные осцилляции в процеребруме отражают не потенциалы действия, а ТПСП в NB-клетках (Kleinfeld et al., 1994).

Изменение спонтанной активности нейрона МтЦЗ под влиянием серотонина, дофамина и их предшественников

Обонятельный эпителий и лежащий под ним тентакулярный ганглий расположены на вершине заднего щупальца. Движения щупалец, такие как изгибание, укорочение и втягивание, играют важную роль в восприятии запахов и ориентации животного в окружающей среде с помощью обоняния (Chase, 1986; Nikitin et al., 2005; Nikitin et al., 2008).

В опытах по регистрации поведения улиток было показано, что повышение концентрации серотонина или дофамина изменяет реакцию отдергивания заднего щупальца на запах противоположным образом. Одним из механизмов подобных изменений может являться регуляция активности мотонейронов, отвечающих за движения заднего щупальца. Для проверки данного предположения был внутриклеточно зарегистрирован мембранный потенциал гигантского идентифицированного мотонейрона МтЦЗ на препарате центральной нервной системы улитки с задними щупальцами. Известно, что МтЦЗ обеспечивает наибольший вклад в регуляцию движений заднего щупальца из всех центральных мотонейронов (Захаров и др., 1982; Prescott et al., 1997). Были изучены эффекты серотонина, дофамина и их предшественников на спонтанную активность нейрона МтЦЗ и регистрируемые в нем ответы на запах цинеола.

Добавление серотонина (10^{-5}M) в раствор, омывающий препарат, приводило к гиперполяризации нейрона, сопровождавшейся резким уменьшением числа потенциалов действия (Рис. 5А). В 13 из 16 экспериментов потенциалы действия полностью исчезали в течение 5-10 секунд после добавления медиатора. На фоне гиперполяризованного мембранного потенциала нейрона наблюдалось большое количество постсинаптических потенциалов, что свидетельствует о постсинаптическом действии медиатора. Частота потенциалов действия в течение 1 минуты до добавления медиатора составляла в среднем 1.66 ± 0.32 ПД/с, 1 минуты после – 0.29 ± 0.08 ПД/с ($N=16$, $P<0.001$, тест Вилкоксона; Рис. 5В).

Дофамин в концентрации 10^{-5}M вызывал противоположный эффект – деполяризацию МтЦЗ, которая сопровождалась значительным увеличением частоты потенциалов действия (Рис. 5Б). В течение 1 минуты перед добавлением дофамина частота потенциалов действия была равна 1.50 ± 0.28

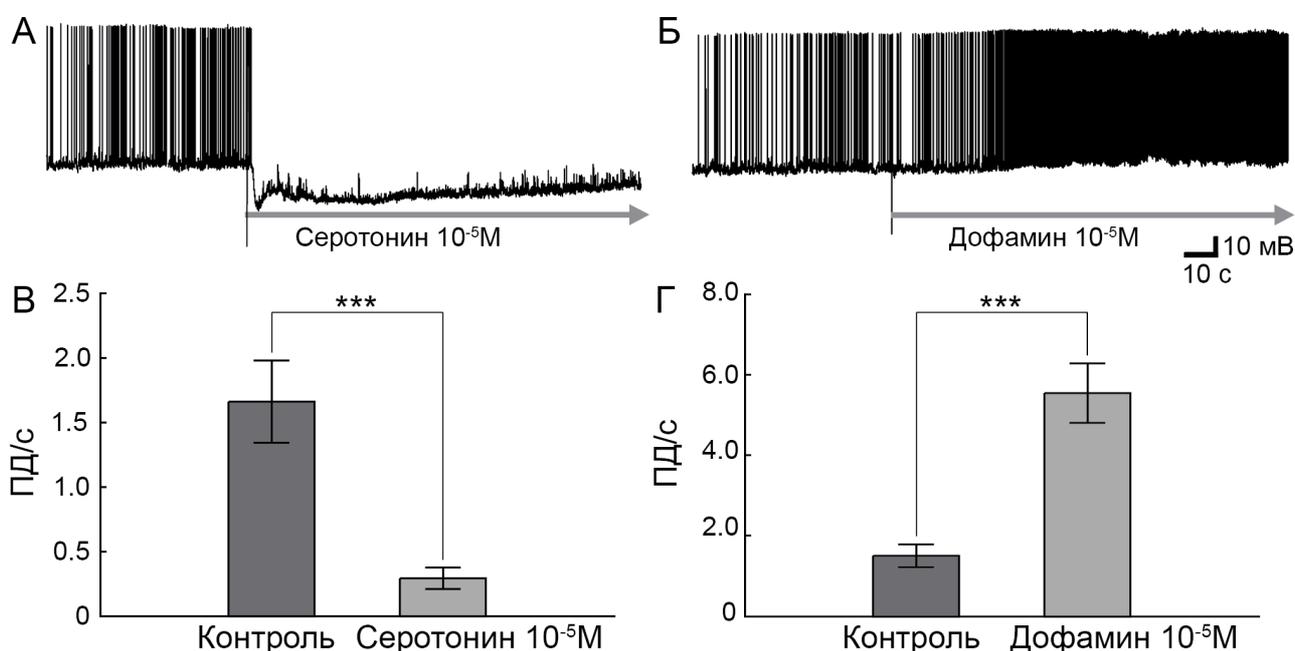


Рис. 5. Влияние серотонина и дофамина (10^{-5}M) на электрическую активность нейрона МтЦЗ.

(А) и (Б) Фрагменты исходных записей, (В) и (Г) Усредненные данные (сравнение 1 мин до и 1 мин после добавления веществ). $N=16$ для серотонина, $N=15$ для дофамина, *** $P<0.001$, тест Вилкоксона.

ПД/с , после него частота возрастала до 5.54 ± 0.74 ПД/с (N=15, P<0.001, тест Вилкоксона; Рис. 5Г).

Изменение активности нейрона МтЦЗ в ответ на прямое добавление медиаторов высокой концентрации в раствор, омывающий препарат, может отличаться от физиологических эффектов этих же медиаторов, выделяемых клетками нервной системы улитки. Для того, чтобы приблизить условия эксперимента к естественным последствиям повышенного выброса медиаторов, использовали 5-гидрокситриптофан (в конечной концентрации 10^{-4} М, N=10) и L-ДОФА (10^{-4} М, N=11 и 10^{-3} М, N=5). Тестировали ответ на запах цинеола, вслед за этим добавляли одно из веществ и регистрировали фоновую активность нейрона в течение 30 (L-ДОФА) или 40 (5-гидрокситриптофан) минут. После этого проводили повторное тестирование реакции на запах (см. схему опыта на рис. 6). В контроле (вещества не добавляли) частота потенциалов действия оставалась на одном и том же уровне с небольшими колебаниями в течение 30 минут записи (Рис. 6А). В первые 5-10 мин после добавления 5-гидрокситриптофана частота фоновой активности нейрона недостоверно уменьшалась и оставалась пониженной на протяжении всей записи (N=10, P=0.084, тест Вилкоксона; Рис. 6Б). Аппликация L-ДОФА (10^{-4} М) приводила к постепенному возрастанию частоты фоновой активности нейрона (N=11, P<0.05; Рис. 6В). L-ДОФА в концентрации 10^{-3} М вызывала дальнейшее увеличение частоты спонтанной активности нейрона (N=5, P=0.063).

Ответы на запах цинеола на фоне действия 5-гидрокситриптофана были достоверно слабее, чем до добавления вещества (Рис. 6Г,Д): во время подачи запаха (интервал 0-5с на рис. 6Д) средняя частота потенциалов действия составляла 10.36 ± 0.91 ПД/с в контроле и 8.98 ± 0.92 ПД/с под действием 5-гидрокситриптофана (N=11, P<0.05, тест Вилкоксона). Сильнее всего ослаблялась поздняя компонента ответа (интервал 15-20с на рис. 6Д, P<0.001). L-ДОФА в обеих концентрациях не вызывала достоверных изменений реакции на запах в нейроне МтЦЗ (N=11, P>0.05).

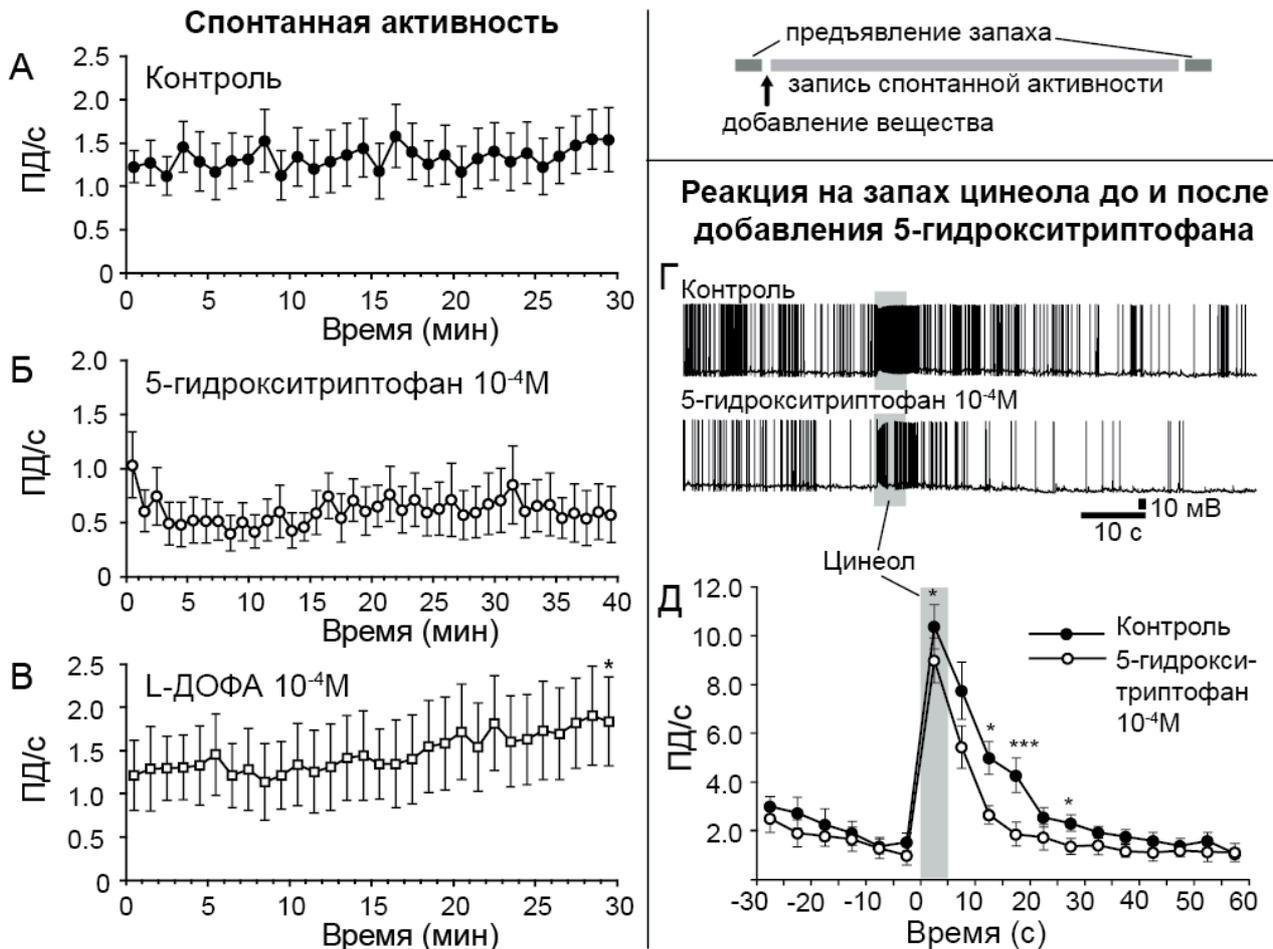


Рис. 6. Влияние предшественников серотонина и дофамина на частоту спонтанных и вызванных запахом потенциалов действия в нейроне МтЦЗ. Слева – изменение частоты потенциалов действия в нейроне: (А) в течение 30 мин без добавления веществ, (Б) в течение 40 мин после добавления 5-гидрокситриптофана 10^{-4} М или (В) 30 мин после добавления L-ДОФА 10^{-4} М. N=11/10/11 для графиков (А), (Б) и (В), соответственно. Добавление веществ происходило в нулевой момент времени на графиках. Справа – ответы на запах цинеола (5%, 5с) в нейроне МтЦЗ до добавления 5-гидрокситриптофана и через 40 минут после. (Г) Примеры исходной записи (Д) Усредненные данные. N=11. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, тест Вилкоксона.

Длина щупалец улитки определяется соотношением гидравлического давления гемолимфы, заполняющей щупальца (Dale, 1973), и силы сокращения мускулатуры щупальца (Cotrell et al., 1983b; Prescott et al., 1997). Повышение частоты потенциалов действия в нейроне МтЦЗ (после добавления дофамина или L-ДОФА) приводит к более сильному сокращению мышцы-ретрактора и, следовательно, к укорочению щупалец. Снижение частоты потенциалов

действия (после добавления серотонина или 5-гидрокситриптофана) вызывает расслабление мускулатуры щупалец и их удлинение. Кроме того, гиперполяризация нейрона МтЦЗ под действием серотонина подавляет ответ на запах в нейроне, что приводит к более слабому отдергиванию щупальца. Литературные данные о влиянии серотонина и дофамина на мотонейроны мускулатуры щупалец у улиток отсутствуют, но на слизнях показано подавление ответов на запах в мотонейроне, отвечающем за сокращение мантии, при стимуляции серотонинергического нейрона (Inoue et al. 2004). Возможно, что сокращение щупалец (которое сопровождает сокращение мантии) у слизней тоже ослабляется под действием серотонина.

ОБСУЖДЕНИЕ

Суммируя данные, полученные в нашей работе, можно утверждать, что серотонин и дофамин регулируют активность нейронов периферической и центральной частей обонятельной системы улитки, а также мотонейрона МтЦЗ, причем эффекты медиаторов противоположны по направлению вызываемых изменений. Возникает вопрос о роли данных физиологических механизмов действия медиаторов в формировании разных типов поведения улитки.

Выявленные в опытах эффекты серотонина, скорее всего, не связаны с контролем оборонительного поведения. Во-первых, наиболее вероятным источником серотонина в обонятельной системе являются церебральные серотонинергические нейроны (Иерусалимский и др., 1997; Hernadi and Elekes, 1999; Hernadi and Elekes, 2000), а не педальные, модулирующие работу командных нейронов оборонительного поведения (Zakharov et al., 1995). Во-вторых, уменьшение электрофизиологических ответов на запах под действием серотонина не согласуется с ранее показанным увеличением амплитуды ВПСП в командных нейронах под действием серотонина (Balaban, 2002). В третьих, изменение поведения улиток при повышении концентрации серотонина в наших опытах прямо противоположно оборонительной реакции

улитки, которая заключается во втягивании сначала щупалец, а потом и всего тела в раковину в ответ на аверсивный стимул (Захаров, 1992).

В работах на разных видах брюхоногих моллюсков, включая виноградную улитку, было показано, что изменение концентрации серотонина в нервной системе и тканях тела коррелирует с повышенной активностью животного (Hernadi et al., 2008b), которая заключается в увеличении скорости локомоции (Pavlova et al., 2001), усилении сократительной активности сердца (S.-Rozsa and Perenui, 1966), удлинении тела улитки, вызванном расслаблением мускулатуры (Hernadi et al., 2005), уменьшении числа аверсивных реакций на новые стимулы и увеличении числа поворотов животных в направлении стимулов (Дьяконова и Сахаров, 1994а,б). У хищного крылоногого моллюска *Clione limacina* повышение концентрации серотонина запускает охотничье поведение – быстрое плавание в поисках пищи (Kabotyanskii and Sakharov, 1991; Norekyan and Sutterlie, 1993). Серотонин снижает порог возникновения ритмических движений ротового аппарата у улиток (Галанина и др., 1986), слизи (Wieland and Gelperin, 1983) и аплизий (Kabotyanski, 2000). Обнаруженные в нашей работе эффекты серотонина приводят к увеличению сканируемого щупальцами воздушного пространства за счет их удлинения и ослаблению амплитуды отдергивания щупалец в ответ на неприятный запах и тактильную стимуляцию. На основании литературных данных и полученных результатов можно предположить, что действие серотонина на обонятельную систему и мотонейрон ретракции щупалец виноградной улитки может быть связано с увеличением общего уровня активности животного. Подобное увеличение активности может иметь место во время поиска пищи голодной улиткой, когда она ползает по субстрату с вытянутыми щупальцами.

Повышение концентрации дофамина вызывает у виноградной улитки укорочение щупалец и усиливает их отдергивание в ответ на запахи. Известно, что дофамин запускает ритмические движения ротового аппарата при поедании пищи у многих видов брюхоногих моллюсков, включая виноградную улитку (Галанина, 1986; Wieland and Gelperin, 1983; Kabotyanski et al., 2000).

Повышение концентрации дофамина у голодных улиток снижает латентность начала поедания пищи, а у сытых – увеличивает ее (Hernadi et al., 2008a). Распределение мелких дофаминергических нейронов, сосредоточенных в стенке тела улиток в передней части головы, вокруг рта и в стенке пищевода (Croll et al., 1999; Voronezhskaya et al., 1999), позволяет предположить участие этих клеток в хемо- или механорецепции пищевых объектов. Помимо участия дофамина в контроле пищедобывательного поведения, показано снижение скорости локомоции (Pavlova, 2001) и сокращение мышц тела улитки (Hernadi et al., 2005) под действием дофамина.

Вызванное дофамином укорочение щупалец, показанное в нашей работе, может приводить к двум различным состояниям животного. При умеренном повышении концентрации дофамина в области щупалец и в церебральных ганглиях щупальца укоротятся без вворачивания их кончиков внутрь, а сила отдергивания щупалец в ответ на запахи возрастет. Возможно, что у интактных животных дофамин оказывает подобное действие во время поедания пищи, во время которого часто происходит изгибание и укорочение щупалец. В случае сильного повышения концентрации дофамина щупальца окажутся полностью втянуты в тело животного и контакт обонятельного эпителия с атмосферой будет прерван. Можно предположить, что подобный эффект дофамина соответствует втягиванию щупалец в процессе перехода улитки в неактивное состояние (прекращение локомоции и частичное или полное втягиванию тела в раковину) при понижении влажности окружающей среды или при насыщении.

Подводя итог обсуждению полученных результатов, можно сказать, что влияние серотонина и дофамина на функционирование клеток обонятельной системы и мотонейрона мускулатуры заднего щупальца является частью комплексных эффектов этих медиаторов, которые предположительно связаны с переходом улиток из неактивного состояния в активное и наоборот, а также с разными этапами пищедобывательного поведения.

ВЫВОДЫ

1. Инъекция предшественника серотонина свободно подвижной улитке вызывает увеличение абсолютной длины щупалец и уменьшение амплитуды отдергивания заднего щупальца в ответ на аверсивный запах этилацетата или тактильную стимуляцию.

2. Введение предшественника дофамина приводит к снижению абсолютной длины щупалец и увеличению амплитуды реакции отдергивания заднего щупальца в ответ на предъявление нейтрального запаха цинеола и аверсивного запаха этилацетата.

3. Реакция отдергивания заднего щупальца в ответ на запах наблюдается у свободно подвижных животных после перерезки обонятельного нерва, что свидетельствует о наличии периферических механизмов контроля длины заднего щупальца.

4. Серотонин значительно снижает число потенциалов действия, регистрируемых в обонятельном нерве изолированного заднего щупальца, в ответ на предъявление запаха цинеола. Дофамин увеличивает частоту потенциалов действия в отсутствие стимуляции и во время ответа на запах цинеола.

5. Серотонин гиперполяризует мотонейрон МтЦЗ и резко снижает частоту потенциалов действия в клетке, тогда как дофамин вызывает противоположные изменения активности данного нейрона.

6. Предшественник серотонина вызывает слабое снижение частоты спонтанной импульсной активности нейрона МтЦЗ, при этом наблюдается уменьшение ответа на запах цинеола. Предшественник дофамина увеличивает частоту спонтанных потенциалов действия в нейроне МтЦЗ, но не изменяет реакцию на запах.

7. Изменения активности периферических обонятельных нейронов и мотонейрона МтЦЗ под действием серотонина и дофамина соответствуют изменениям в поведении свободно подвижных улиток после инъекции предшественников данных медиаторов. По-видимому, в основе изменения

реакции отдергивания заднего щупальца улиток лежат механизмы, аналогичные наблюдавшимся *in vitro* эффектам серотонина и дофамина.

8. На основании полученных данных можно предположить, что влияние серотонина на физиологию обонятельной системы и мотонейрона мускулатуры заднего щупальца является частью комплексного действия серотонина, лежащего в основе повышения активности улиток, в частности, при поиске пищи голодными животными. Эффекты дофамина могут быть связаны с положением щупалец во время поедания пищи, а также с процессом перехода улитки в неактивное состояние при снижении влажности среды или при насыщении.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Roshchin M., Balaban P.M. Neural control of olfaction and tentacle movements by serotonin and dopamine in terrestrial snail // J. Comp. Physiol. A. 2011. DOI 10.1007/s00359-011-0695-9
2. Roshchin M.V. Influence of serotonin and dopamine on the olfactory system of Helix snail. St. Petersburg. 2009. Simpler Nervous Systems – IX East European Conference of the International Society for Invertebrate Neurobiology.
3. Roshchin M.V., Balaban P.M. Influence of serotonin and dopamine on functioning of neural network involved in olfaction and tentacle movements in Helix snail. Tihany. 2011. 12th Symposium on Invertebrate Neurobiology of the International Society for Invertebrate Neurobiology. P. 63.
4. Balaban P.M., Roshchin M.V. Changes in serotonin and dopamine concentrations affect olfaction and withdrawal in terrestrial snail. Washington. 2011. Society for Neuroscience meeting. Program № 475.25.2011.