

УДК: 593+611.8:616-092.4

## **Тема: Моделирование работы нервной системы у моллюсков при различных паттернах поведения**

**Вечкитов Р.С., Доронина Е.В., Махринов Д.Д., Квятосинский Д.В.**

ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава Российской Федерации - Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Волгоградский государственный медицинский университет” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Волгоград, e-mail: [rodion.sergeewich@gmail.com](mailto:rodion.sergeewich@gmail.com)

### **Аннотация**

Работа нервной системы, клеточные основы поведения, взаимосвязь между поведенческими паттернами и взаимодействием нейронов, все это давно интересовало человека. В последние 50 лет наука как никогда приблизилась к пониманию и осознанию этих процессов. С возникновением микроэлектродов появилась возможность воздействовать на скопления нервных клеток или на отдельные нейроны, что дает возможность управлять их деятельностью и соответственно смоделировать их работу при определенных условиях. Это привело к возникновению таких разделов как нейрофизиологии и нейроэтиологии. В данной работе описана простейшая методика изучения и моделирования работы нервной системы у моллюсков, которые используются в этих направлениях науки.

Ключевые слова: Идентифицируемые нейроны, *Clione limacina*, *Tritonia diomedea*, моделирование нервной системы, экспериментальное моделирование, моллюски

## **Modeling of the nervous system in mollusks with different patterns of behavior**

**Vechkitov R.S., Doronina E.V., Makhrinov D.D., Kvyatosinsky D.V.**

FGBOU IN VolGMU of the Ministry of Health of the Russian Federation - Federal State Budgetary educational Institution of Higher Education “Volgogradsky State Medical University” Ministry of Health of the Russian Federation, the direction of training “Biology”, Russia, Volgograd, e-mail: [rodion.sergeewich@gmail.com](mailto:rodion.sergeewich@gmail.com)

### **Annotation**

The work of the nervous system, the cellular foundations of behavior, the relationship between behavioral patterns and the interaction of neurons, all this has long interested a person. In the last 50

years, science has come closer than ever to understanding and understanding these processes. With the advent of microelectrodes, it became possible to influence clusters of nerve cells or individual neurons, which makes it possible to control their activity and, accordingly, simulate their work under certain conditions. This led to the emergence of such sections as neurophysiology and neuroethology. This paper describes the simplest method of studying and modeling the work of the nervous system in mollusks, which are used in these areas of science.

Keywords: Identifiable neurons, *Clione limacina*, *Tritonia diomedea*, modeling of the nervous system

## Введение

Управляемое движение организмов является одной из важнейших функций в жизни любого животного, одной из главных черт, которые отличают животных от растений. Оно является тем признаком, который характерен абсолютно для всех типов, от червей до высших позвоночных. Различные ритмические движения, типы поведения, сложные поведенческие акции (память, мышление), имеют под собой клеточную и молекулярную основу. Все это управляется нервной системой. В начале 20 века Шерингтоном были сформулированы понятия “генаратора ритмики” и “управляющего центра” для системы ритмических действий, таких как шагание и чесание. Такие системы подробно изучались на протяжении долгого времени для всех организмов, но полное устройство подобных систем все еще неизвестно. Связано это с тем, что подобные управляющие нейронные структуры ответственные за осуществление движений, и уж тем более различной когнитивной активности, сильно разнятся в зависимости от вида. В большинстве из организмов, в любом типе поведенческой активности, конкретно в участке нервной системы, ответственной за нее участвуют огромное число нейронов, схожих между собой, что затрудняет их дифференцировку и соответственно понимание схемы их взаимодействия, чтобы связать их активность с движением или поведением.

Исследования над нервной системой, головным мозгом животных организмов и клеточными основами их поведения начали активно проводить 50-х годах. Началось это после детального изучения нервной системы беспозвоночных, в частности моллюсков и круглых червей. Так интересно получилось, что у этих типов организмов сравнительно малое, по сравнению с другими, число нервных клеток, а также среди них выделяется существование особо крупных клеток, активность и вовлеченность которых в процессы гораздо выше других своих родственниц, около 1 мм. Благодаря тому, что они легко отличимы от других и тому, что их легко можно идентифицировать из опыта в опыт,

возникла идея “идентифицируемых” нейронов над которыми и ведется работа по моделированию деятельности нервной системы при различных условиях[1][2][3].

## Моделирование

Моделирование работы нервной системы можно разделить на несколько этапов. Один из которых необходим для локализации участков ответственных за какое либо действие, а второй для конкретизации нейронов и выяснения точной локализации нейрона и его функции. Во время первого и второго этапа проводится фиксация биоэлектрического потенциала с помощью микроэлектродов.

Первый этап - это исследование на закрепленном модельном организме. Так, например, при работе с морским моллюском, *Clione limacina*, объект иммобилизуется с помощью игл, воткнутых в четырех точках, не задевая плавники.

Затем производится препарация, в ходе которой ткань в области pedalного ганглия разрезают и отделяют от внутреннего слоя клеток. В таком состоянии моллюск сохраняет жизнеспособность и продолжает реагировать на раздражители. При осуществлении каких либо действий со стороны моллюска имеется возможность определить точную локализацию нейронов при УФ микрокопировании. Для этого в нервные волокна расположенные в контакте с плавниковыми мышцами, обрабатываются флюорисцентным красителем Lucifer yellow, который через контакты попадает уже в ганглий. При микрокопировании можно заметить определенные нервные клетки, помеченные этим красителем, в pedalном ганглии[1][3].

Вторым этапом проведения микроэлектродной методики по работе с нервными клетками является приготовление нейронного микропрепарата. Существует достаточное количество методов для приготовления препарата для изучения электрической активности нейронов, их взаимодействия. Один из таких методов, например, был использован Аршавским, Панчиным и Орловским. Они использовали для своей работы нейроны, добытые из морского брюхоного моллюска *Clione limacina*, которые обладают ярко выраженным гигантизмом( около 1 мм ), что значительно облегчает работу с ними и манипуляции с микроэлектродами. Для выяснения механизма работы маховых движений крыльями у моллюска вырезалась часть pedalного ганглия. Вырезанный участок был выдержан в течении 5-10 минут в 1% растворе проназы для размягчения эпинеуральной оболочки. Затем он помещался в камеру из агарозного геля. Затем на ганглий капали каплю жидкого агарозного геля для

его изоляции, а участок нерва, находящийся в крыле захватывался записывающим микроэлектродом. Затем на ганглий наносили несколько капель морской воды. В результате слой воды и агара над ганглием не превышал 0.3-0.4 мм. Регистрацию активности нейронов проводили во время иммобилизованной препарации и в изолированных педальных ганглиях с помощью стеклянных микроэлектродов, заполненных 2,5-3 М КС1 или КАС (сопротивление наконечника 20-60 Мф~). Два или три нейрона были пронзены одновременно. Для внутриклеточного окрашивания использовали микроэлектроды, заполненные 5% люциферным желтым или 20% флуоресцеином. Нейронам вводили краситель путем пропускания гиперполяризующего тока (1-10 нА) в течение 5-30 секунд[1].

Участки были соединены между собой отростками, остальные же отростки не соединяющие целевые нейроны были удалены. Между каплей воды и фильтровальной бумагой проходил постоянный электрический ток ( 5-10 мА ) на протяжении получаса. Помимо этого работы по моделированию активности нервных клеток проводились и на других модельных организмах. Один из таких организмов, тоже является моллюском, это *Tritonia diomedea*. Тритония относится к голожаберным моллюскам и ее отличие от клиона заключается в отсутствии “крыльев”, поэтому ее передвижение ограничено дном. Во всех остальных параметрах тритония и клион достаточно схожи, что также позволяет проводить на них нейрофизиологические исследования. В работах Виллоуза тритония занимает ключевую роль. В ходе своих исследований Виллоуз сумел выяснить у тритонии нейронный механизм поедания пищи. Метод который он использовал не сильно отличался от такового у команды Аршавского. Его исследование заключалось в последовательных типах препарации в ходе которой он измерял электрический потенциал нейронов с помощью микроэлектродов, заполненных 3М КС1. Объект, как и в случае с клионом, предварительно иммобилизовался, а затем помещался в камеру с морской водой. Препарирование проводилось в камере. Само исследование проводилось в 4 этапа[4][5]:

- 1)препарирование иммобилизованной тритонии;
- 2)полная препарация, при которой только голова, мозг ( церебрально-плевральный педальный ганглий), буккальный ганглий и буккальная ткань не были повреждены;
- 3)частичная препарация при которой не были повреждены выше названные ганглии;
- 4)изоляция целевых нейронов на подложке;

Для стимулирования питательных рефлексов к ротовой полости моллюска подносился кусочек “морского хлыста”, также известного, как *Leptogorgia virgulata*. Поглощение коралла продолжалось в течении 1-2 часов, за время которых и проводились измерения. В результате были получены данные, что нейронная схема, ответственная за пищевой рефлекс локализована в скоплении клеток мозго-буккального ганглия. Затем проводилась препарация участка и точное определение нейронов, ответственных за обеспечение этого паттерна поведения. В результате было получено, что за обеспечение пищевого рефлекса ответственны 5 нейронов буккального ганглия, названных SW1, SW3, SW4, SW5, SW6, локализованных возле срединной линии ганглия. Опыт повторялся на 20 образцах, что подтвердило постоянство локализации нейронной схемы[5]

## Заключение

В результате различных работ, которые проводились над моллюсками и червями, были опознаны схемы и получено детальное описание таких процессов как поглощение пищи, втягивание мантийных органов, выделение чернильной жидкости, ритмических движений, таких как махание и ползание[6][7][8]. Но выше описанные методы использовались на однотипных организмах, количество нейронов у которых исчисляется тысячами, в то время как у насекомых и млекопитающих количество нейронов измеряется в сотнях тысячах, а то и миллионах. Это накладывает свою специфику работы с такими образцами нервной системы. В связи с чем были созданы другие методы исследований и открыты новые направления науки, например, оптогенетика показывает невероятные результаты на данный момент, что является прекрасной темой для обзора и новых работ

## Литература

1. Arshavsky, Y. I., Beloozerova, I. N., Orlovsky, G. N., Panchin, Y. V., & Pavlova, G. A. (1985). Control of locomotion in marine mollusc *Clione limacina* I. Efferent activity during actual and fictitious swimming. *Experimental Brain Research*, 58(2). doi:10.1007/bf00235307

2. KATZ, P. S. (1998). Neuromodulation Intrinsic to the Central Pattern Generator for Escape Swimming in Tritonia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 860(1 NEURONAL MECH), 181–188. doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb09048.x
3. Panchin, Y. V., Popova, L. B., Deliagina, T. G., Orlovsky, G. N., & Arshavsky, Y. I. (1995). Control of locomotion in marine mollusk *Clione limacina*. VIII. Cerebro pedal neurons. *Journal of Neurophysiology*, 73(5), 1912–1923. doi:10.1152/jn.1995.73.5.1912
4. Kita, J. M., & Wightman, R. M. (2008). Microelectrodes for studying neurobiology. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(5), 491–496. doi:10.1016/j.cbpa.2008.06.035
5. Willows, A. O. (1980). Physiological basis of feeding behavior in *Tritonia diomedea*. II. Neuronal mechanisms. *Journal of Neurophysiology*, 44(5), 849–861. doi:10.1152/jn.1980.44.5.849
6. KATZ, P. S. & W. N. FROST. 1995. Intrinsic neuromodulation in the *Tritonia* swim CPG: The serotonergic dorsal swim interneurons act presynaptically to enhance transmitter release from interneuron C2. *J. Neurosci.* 15: 6035–6045.
7. HARRIS-WARRICK, R. M. & E. MARDER. 1991. Modulation of neural networks for behavior. *Annu. Rev. Neurosci.* 14: 39–57
8. GETTING, P. A. 1976. Afferent neurons mediating escape swimming of the marine mollusc, *Tritonia*. *J. Comp. Physiol.* 110: 271–286.