

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ В РАЗВИТИИ

УДК 591.88:591.046:594.38

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ НА РЕАЛИЗАЦИЮ МОТОРНЫХ ПРОГРАММ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ ЛЕГОЧНЫХ МОЛЛЮСКОВ *Lymnaea stagnalis* И *Helisoma trivolvis*¹

© 2007 г. Е. Е. Воронежская, М. Ю. Хабарова*, А. К. Чабан**, Л. П. Незлин

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

*Государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого

300026 Тула, пр-т Ленина, д. 125

**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

119992 Москва, ГСП-2, Ленинские горы

E-mail: lena_yor@mail.ru

Поступила в редакцию 24.10.06 г.

Ранее мы обнаружили, что пресноводные улитки *Helisoma trivolvis* и *Lymnaea stagnalis*, содержащиеся в условиях недостатка пищи, выделяют в воду химические сигналы, обратимо тормозящие развитие конспецифичных эмбрионов. В настоящей работе показано, что этот сигнал: 1) не строго видоспецифичен и действует также на эмбрионы близкородственного вида, занимающего схожую экологическую нишу; 2) влияет не только на эмбриональное развитие, но и на становление наиболее значимых моторных программ – локомоции, жевания и сердечной активности; 3) действует разнонаправленно на разные стадии развития: замедляет развитие и реализацию моторных программ на ранних этапах эмбриогенеза (стадии трохофоры–велигера), а также ускоряет их на поздних стадиях (от стадии позднего велигера до вылупления). Обсуждается возможное адаптивное значение обнаруженных феноменов химической сигнализации.

Ключевые слова: кондиционированная вода, личиночное развитие, регуляция, химическая стабилизация.

Жизненный цикл абсолютного большинства водных беспозвоночных и многих позвоночных включает в себя стадию свободноплавающей или инкапсулированной личинки, которая впоследствии проходит метаморфоз и превращается во взрослую особь. При этом личинка или снабжена собственным запасом питательных веществ (в случае инкапсулированных или свободноплавающих лецитотрофных личинок), или должна добывать себе пищу сама, но в любом случае занимаемая ею экологическая ниша разительно отличается от таковой взрослой особи.

Бифазный жизненный цикл считается первичным для многоклеточных животных, и его очевидным эволюционным преимуществом является повышенная выживаемость и лучшая расселяемость потомков (Беклемишев, 1964; Иванова-Казас, 1995; Nielsen, 1998). Известно, что эмбриональное и личиночное развитие водных животных зависит от множества абиотических факторов внешней среды, таких как температу-

ра, соленость воды или наличие в ней кислорода (см., например: Miller, Hadfield, 1990; Strathmann R., Strathmann M., 1995; Pechenik et al., 2003). При этом отклонение этих параметров от оптимального уровня в большинстве случаев приводит к остановке развития и/или возникновению необратимых морфологических нарушений. До последнего времени данные о влиянии биотических факторов на развитие личиночной фазы ограничивались влиянием пищевого рациона и индукцией оседания и метаморфоза личинок со стороны взрослых животных (Burke, 1984; Pawlik, 1992; Lambert, Todd, 1994; Pechenik et al., 1996). Априори считалось, что эмбриональное и личиночное развитие до метаморфоза – это программа, которая, будучи раз запущена, работает без корректировки со стороны имагинальной фазы, т.е. взрослые животные не могут направленно регулировать прохождение своими потомками личиночной фазы.

Недавно мы выяснили, что это не так, обнаружив новый регуляторный механизм в развитии пресноводных улиток *Lymnaea stagnalis* и *Heliso-*

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 06-04-49401).

ma trivolis. При недостатке пищи голодные взрослые животные начинают выделять в воду химический сигнал, который воспринимается ранними периферическими сенсорными нейронами инкапсулированных эмбрионов, возбуждает эти нейроны и обратимо замедляет развитие, давая личинкам возможность отсрочить вылупление и переждать неблагоприятные условия. Нейромедиатором, осуществляющим передачу сигнала от сенсорных нейронов к мишеням, которые непосредственно обеспечивают торможение развития, оказался серотонин (Voronezhskaya et al., 2004). Биологический фактор (или факторы), выделяемый взрослыми особями в определенных неблагоприятных условиях, который обладает специфическим тормозным действием на развитие и при этом не вызывает морфологических нарушений, был обнаружен нами впервые. Очевидно, что необходимо изучить механизмы действия этого фактора и особенности его влияния на личинок разных видов и разных стадий развития.

Известно, что моторные программы локомоции и поглощения пищи в совокупности с работой вегетативной системы кровообращения являются ключевыми в обеспечении выживаемости зародышей (Беклемишев, 1964; Иванова-Казас, 1995; Nielsen, 2001). К тому же известно, что у моллюсков серотонинергические нейроны участвуют в регуляции всех перечисленных программ (Sakharov, 1990). Можно предположить, что адаптивный механизм, позволяющий зародышам по химическим сигналам от взрослых особей “предсказывать” ожидающие их в будущем условия существования и оптимальным для выживания образом подстраивать под них развитие, включает в себя регуляцию не только темпа развития, но и реализации важнейших моторных программ. Экспериментальная проверка этого предположения представляется важной.

В нашей работе мы выясняем следующие вопросы: 1) является ли выделяемый взрослыми улитками в неблагоприятных условиях фактор строго консpezifичным, т.е. действующим на зародышей только своего вида, или он действует также на эмбрионы других видов; 2) влияет ли этот фактор только на темпы развития или же он действует также на реализацию различных моторных программ в процессе развития; 3) является ли действие фактора однонаправленным для зародышей разных стадий личиночного развития. Для ответа на эти вопросы мы получали воду, содержащую тормозящий фактор, выдерживая голодных улиток двух близкородственных видов (*L. stagnalis* и *H. trivolis*) в небольшом объеме воды в стандартных условиях (кондиционированная вода), и изучали особенности действия этой воды как на общую скорость развития зародышей своего и родственного видов, так и на проявление моторных программ: ресничное вращение на ранних

стадиях развития, ползание на более поздних стадиях, частота сердечных сокращений и жевательных движений соответственно.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объекты исследования. Объектами исследований были зародыши и ювенильные особи двух близкородственных видов легочных улиток отряда Basommatophora (Gastropoda, Mollusca) – большого прудовика *L. stagnalis* и аквариумной катушки *H. trivolis*. Кладки собирали от половозрелых особей, содержащихся в лабораторной культуре. Взрослых животных ($n = 15$ в каждой группе) содержали в аквариумах объемом 10 л в отстоянной фильтрованной аэрируемой водопроводной воде ($t = 23\text{--}25^\circ\text{C}$) при естественном освещении и кормили листьями салата. Смену воды производили еженедельно. Кладки помещали в чашки Петри диаметром 90 мм с фильтрованной водопроводной водой. Для экспериментов не использовали кладки с повреждениями, полиэмбрионией или с погибшими эмбрионами, а также кладки с несинхронно развивающимися зародышами.

Получение кондиционированной воды. Кондиционированную воду (КВ) получали от половозрелых особей *H. trivolis* (КВН) и *L. stagnalis* (КВЛ) в два этапа. На первом взрослых половозрелых моллюсков содержали в оптимальном для них объеме воды (1 л на животное) без пищи до достижения состояния голода. На втором этапе голодных моллюсков помещали в малый объем кипяченой фильтрованной аэрированной водопроводной воды для концентрирования выделяемых ими химических веществ. Соотношение времени голодания и кондиционирования варьировало следующим образом (голодание/кондиционирование, ч): 24/12, 24/24, 48/12, 48/24. Соотношение объема животных к объему воды (концентрация) также варьировало и составляло 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80 и 1 : 100. В кондиционировании участвовало по 30 особей каждого вида, которых кондиционировали группами по 15 штук. Интервал между кондиционированиями для каждой улитки составлял не менее 5 сут; в это время животных содержали в стандартных условиях (см. выше). Повышенной смертности улиток за время проведения экспериментов отмечено не было.

Полученную КВ фильтровали через миллиметровый фильтр с размером ячеек 0.2 мкм, фасовали герметично в шприцы объемом 20 мл и хранили в холодильнике при $t = 4\text{--}6^\circ\text{C}$; перед использованием температуру КВ доводили в термостате до 25°C .

Подбор условий кондиционирования. Для определения оптимальных условий кондиционирования подбирали, какое сочетание времени голодания/кондиционирования и концентрации

Влияние параметров кондиционирования на смертность и продолжительность развития зародышей *L. stagnalis*, % от контроля

Объем живот-ных/объем воды	Время голодания/кондиционирования, ч			
	24/12	24/24	48/12	48/24
Смертность				
1 : 20	9.2*	10.8*	18.4*	28.3*
1 : 40	0	0.3	1.2*	1.5*
1 : 80	0	0.4	1.2*	1.3*
1 : 100	0	0	0	0
Продолжительность развития				
1 : 40	112.6*	116.3*	122.4*	135*
1 : 80	110	114.2*	118.4*	128.3*
1 : 100	100	107.2	109.7	111.1

Примечание. *Статистически достоверное отличие от контроля, $p < 0.05$.

улиток вызывает максимальное торможение развития эмбрионов при минимальном увеличении смертности (исследовали только *L. stagnalis*). Результаты влияния КВ, полученной при разных условиях, на смертность эмбрионов и продолжительность развития со стадии трохофоры до вылупления представлены в таблице.

Поскольку при инкубации зародышей в КВ с концентрацией 1 : 20 была отмечена значительная смертность эмбрионов (от 9.2 до 28.3%), то такую воду в дальнейшем не использовали. В то же время КВ с концентрацией 1 : 100 вызывала статистически недостоверное торможение развития зародышей, поэтому в дальнейших экспериментах такую воду также не использовали.

Таким образом, наиболее подходящими оказались концентрации 1 : 40 и 1 : 80. Из всех вариантов условий получения КВ с этими концентрациями самое сильное отставание в развитии (135 и 128.3% соответственно) при допустимом уровне смертности эмбрионов (1.5 и 1.3% соответственно) вызывала КВ, полученная при голодании моллюсков в течение 48 ч и кондиционировании 24 ч. В связи с этим для последующих экспериментов использовали КВ, полученную по следующей схеме: голодание/кондиционирование – 48/24; концентрация – 1 : 40 или 1 : 80. Зародыши инкубировались как в конспецифичной (от своего вида), так и в интерспецифичной (от другого вида) КВ.

Инкубация зародышей в КВ. Эмбрионы обоих видов инкубировали начиная со стадий ранней трохофоры (ст. 19), позднего велигера (ст. 24) и перед вылуплением (ст. 29); стадии развития везде указаны по Мещерякову (1975). Кладки (в слу-

чае катушки – 1–2 кладки, по 15–25 яиц в каждой) или яйца, изолированные из кокона (в случае прудовиков – 20–30 яиц), с зародышами соответствующих стадий помещали в чашки Петри диаметром 35 мм, которые заполняли 2 мл тестируемого раствора и инкубировали в термостате при температуре 25°C. В качестве контрольного раствора использовали кипяченую фильтрованную аэрированную водопроводную воду. Во время эксперимента смену растворов не проводили.

Измерение параметров развития и моторных программ. Исследовали действие КВ на: 1) темпы развития эмбрионов, 2) их моторную активность (вращение в яйцевой капсуле и ресничная локомоция), 3) частоту сердечных сокращений и жевательных движений.

1) Определение стадии развития и измерение размера зародышей (морфометрию) проводили при помощи бинокулярной лупы МБС-10 с микрометрической линейкой. Реальные размеры зародыша в мм пересчитывали, определяя цену деления микрометрической шкалы при помощи стандартного объект-микрометра.

2) Вращение эмбрионов в яйцевой капсуле и скорость ресничной локомоции ювенильных особей после вылупления регистрировали при помощи видеокамеры, присоединенной к бинокуляр МБС-10. Видеосигнал в режиме on-line записывали с помощью компьютера и считали число оборотов за 5 мин. Скорость вращения эмбрионов определяли в оборотах в минуту (об/мин), а скорость ресничной локомоции ювенильных особей, – фиксируя время, за которое улитка проползает 4 мм по прямой поверхности, имеющей миллиметровую сетку.

3) Частоту сердечных сокращений и жевательных движений определяли визуально под бинокуляром МБС-10, подсчитывая число сердечных сокращений или жевательных движений за минуту. Под отдельным жевательным движением понимали один полный цикл движений радулы: выдвигание–скребок–втягивание.

Обработка результатов. Все измерения проводили один раз в сутки приблизительно в одно и то же время. При обработке полученных данных вычисляли среднее значение в группе в данный день эксперимента и выражали его в процентах относительно значения в контрольной группе. В случае, если при инкубации в КВ происходило расхождение в темпах развития опытной и контрольной групп, то данные, полученные для экспериментальной группы определенного возраста, сравнивали с данными контрольной группы соответствующей стадии развития. Статистическую обработку результатов и построение графиков проводили с использованием программ STATISTICA 6.0 и Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нормальное развитие. Зародышевое развитие *L. stagnalis* и *H. trivoltis* подробно изучено (Raven, 1966; Мещеряков, 1975; Morrill, 1982; Diefenbach et al., 1991; Marois, Croll, 1991; Voronezhskaya et al., 1999). У обоих видов сначала формируется трохофороподобная личинка (ст. 19), которая вращается внутри яйца за счет биения ресничек. Затем трохофора превращается в велигер (ст. 22), и вращательное движение дополняется поступательным. На ст. 27 развивается нога, зародыш прикрепляется к внутренней поверхности яйца и начинает ползать по ней, что соответствует оседанию и метаморфозу свободноплавающих личинок. Еще через 2–3 сут ювенильный моллюск прогрызает стенку яйца и вылупляется. Каждая стадия развития четко определяется по совокупности морфологических и поведенческих признаков, таких как степень развития раковины, щупалец и ноги, положение сердца, пигментация глаз ноги и щупалец, скорость вращения, активность буккальной мускулатуры, открывание и закрывание пневмостома, ползание и т.д. При этом у обоих видов наблюдается строгое соответствие линейного размера зародыша периоду его развития (рис. 1), что позволяет точно определить стадию развития простым измерением.

Динамика вращения в яйцевой капсуле эмбрионов *L. stagnalis* и *H. trivoltis* представлена на рис. 2, а. Зародыши прудовика наиболее подвижны на стадии средней трохофоры (2.3 ± 0.08 об/мин). Уже к стадии поздней трохофоры подвижность личинки начинает заметно снижаться (1.35 ± 0.06 об/мин) и к ст. 26–28 достигает минимума (0.7 ± 0.02 об/мин). У эмбрионов катушки скорость вращения минимальна на стадии средней трохофоры (0.26 ± 0.05 об/мин), затем она возрастает и к ст. 25–26 достигает максимального значения (1.79 ± 0.2 об/мин), после чего снова снижается и на ст. 28 составляет 0.88 ± 0.13 об/мин.

В первые 3 сут после вылупления у ювенильных моллюсков обоих видов скорость ресничной локомоции постепенно снижается (рис. 2, б). В 1-е сут она составляет: у *H. trivoltis* – 0.18 ± 0.02 , а у *L. stagnalis* – 0.19 ± 0.03 мм/с. На 2-е сут скорости движения у обоих видов совпадают – 0.14 ± 0.02 мм/с, а на 3-и сут *L. stagnalis* ползает несколько быстрее, чем *H. trivoltis*, – 0.14 ± 0.02 и 0.09 ± 0.01 мм/с соответственно.

Частоту сердечных сокращений регистрировали с момента начала биения сердца, т.е. со ст. 24, и до 3-х сут вылупления (рис. 2, в). У эмбрионов *H. trivoltis* частота сердечных сокращений с момента начала сердцебиения (ст. 24) составляет 57 ± 2 ударов/мин, растет и достигает максимума на ст. 26 (82 ± 2 ударов/мин), а затем снижается и на ст. 28 достигает исходного значения (57 ± 3 ударов/мин). После этого она еще 4 сут остается при-

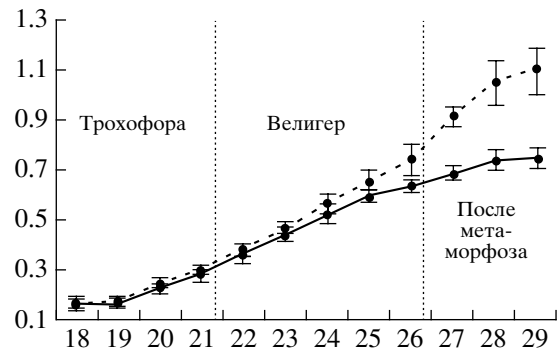


Рис. 1. Соответствие стадий развития* (по оси абсцисс) линейным размерам зародышей (по оси ординат, мм) *H. trivoltis* (—) и *L. stagnalis* (---).

*Определены по: Мещеряков, 1975.

мерно на том же уровне и лишь к 3-м сут после вылупления немного падает (49 ± 2 ударов/мин). У эмбрионов *L. stagnalis* динамика изменения частоты сердечных сокращений несколько иная. Она равномерно растет со ст. 24 (115 ± 3 ударов/мин), достигая максимума на ст. 29 (145 ± 2 ударов/мин), а затем равномерно снижается и к 3-м сут после вылупления становится даже меньше исходной (92 ± 3 ударов/мин).

Частоту жевательных движений, как и скорость ресничной локомоции, измеряли в течение первых 3 сут после вылупления моллюсков (рис. 2, г). У обоих видов она постепенно снижается: с 62 ± 2 до 47 ± 2 – у *L. stagnalis* и с 57 ± 3 до 42 ± 2 движений/мин – у *H. trivoltis*.

Влияние КВ на темпы развития. При инкубации зародышей *H. trivoltis* и *L. stagnalis* начиная со стадии ранней трохофоры (ст. 19) КВ вызывала отставание в развитии эмбрионов как своего, так и другого вида (рис. 3, а, б). Концентрированная КВ (1 : 40) оказывала более выраженное действие; при этом на зародышей *L. stagnalis* вода от своего вида (KBL) влияла сильнее, в то время как на зародышей *H. trivoltis* вода и от своего (KBH), и от другого вида (KBL) действовала практически одинаково. Так, размер эмбрионов *H. trivoltis* опытной группы на 3-и сут после начала инкубации составил в процентах от контроля: 67 ± 1 (KBH, 1 : 40), 86 ± 4 (KBH, 1 : 80); 72 ± 1 (KBL, 1 : 40); 94 ± 6 (KBL, 1 : 80). На зародышей *L. stagnalis* наиболее сильное замедляющее действие оказывала KBL, 1 : 40; размер зародышей опытной группы составил $82 \pm 2\%$ от контроля. KBL, 1 : 80, KBH, 1 : 40 и KBH, 1 : 80 оказывали практически одинаковое действие – 88 ± 2 , 89 ± 2 и $88 \pm 2\%$ соответственно.

Инкубация в КВ начиная со стадии позднего велигера (ст. 24), напротив, приводила к ускорению развития эмбрионов всех опытных групп (рис. 3, в, г); при этом более выраженное ускоря-

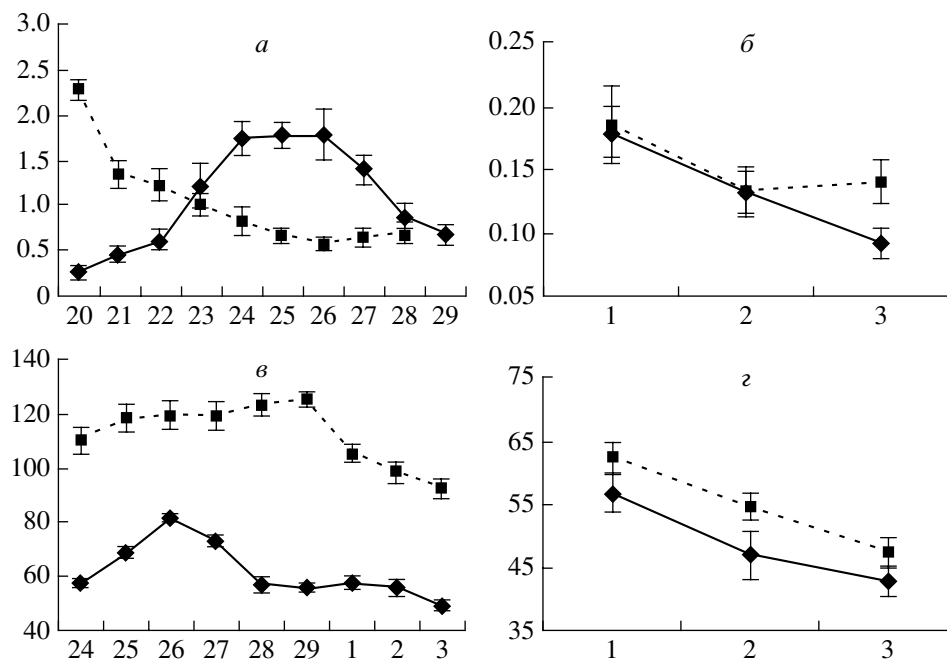


Рис. 2. Динамика изменений моторной активности при нормальном развитии *H. trivolis* (—) и *L. stagnalis* (---). По оси абсцисс: а, в – стадии развития; б, г – время после вылупления, сут.

По оси ординат: а – скорость ресничного вращения зародышей, об/мин; б – скорость ресничной локомоции ювенильных особей в первые 3 сут после вылупления, мм/с; в – частота сердечных сокращений зародышей с момента начала биения сердца (ст. 24) и до 3-х сут после вылупления, удар/мин; г – частота жевательных движений в минуту у ювенильных особей в первые 3 сут после вылупления.

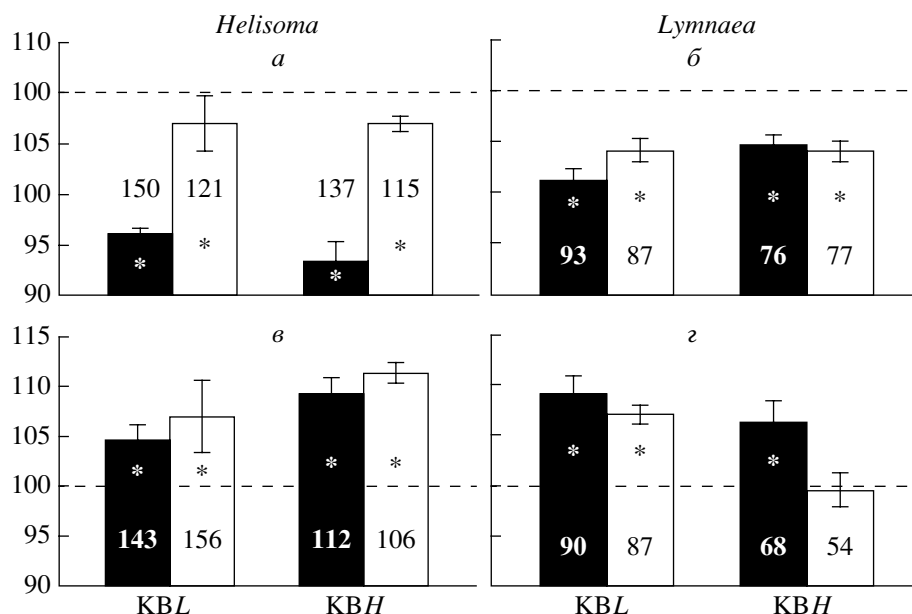


Рис. 3. Относительные размеры зародышей *H. trivolis* и *L. stagnalis* на 3-и сут инкубации в кондиционированной воде, полученной от *H. trivolis* (KBH) или *L. stagnalis* (KBL). а, б – инкубация со стадии ранней трохофоры (ст. 19); в, г – инкубация со стадии позднего велигера (ст. 24).

По оси ординат – размер зародышей, % относительно контроля. Числа на графиках – число зародышей в опыте. Здесь и на рис. 4–6: концентрация воды: (■) – 1 : 40, (□) – 1 : 80; * статистически достоверное отличие от контроля, $p < 0.05$.

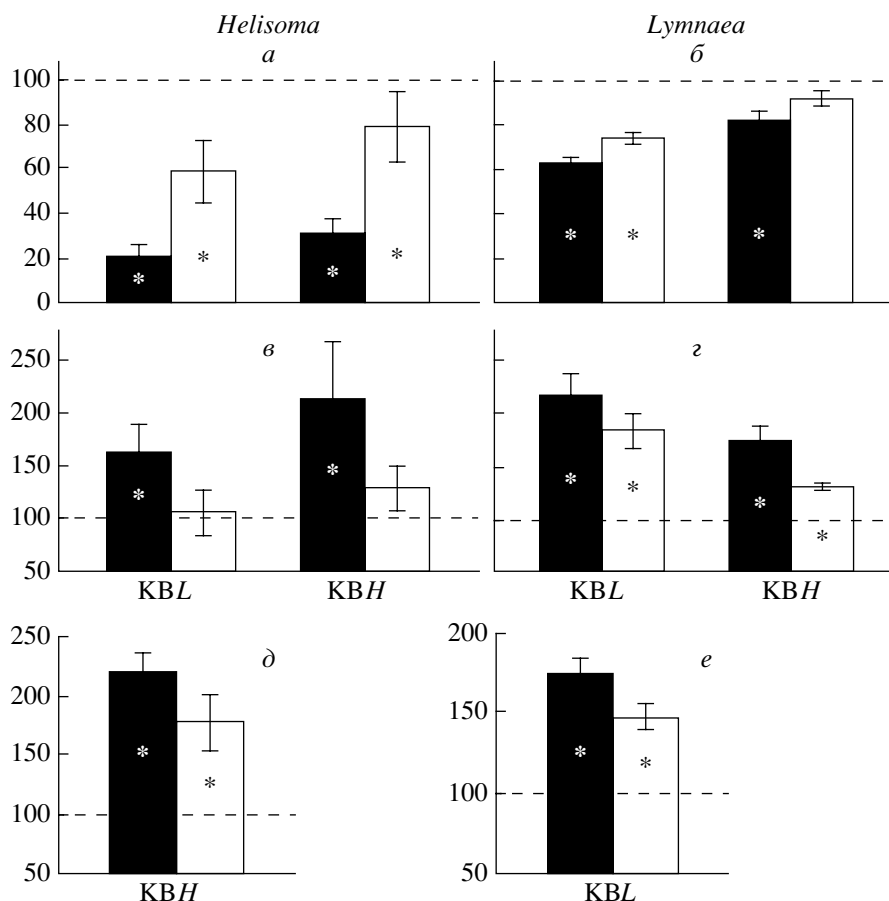


Рис. 4. Относительная скорость движения эмбрионов *H. trivolvris* и *L. stagnalis* после инкубации в кондиционированной воде, полученной от *H. trivolvris* (KBH) или *L. stagnalis* (KBL). Инкубация: а, б – со стадии ранней трохофоры (ст. 19), регистрация через 3 сут на ст. 24; в, г – со стадии позднего велигера (ст. 24), регистрация через 3 сут на ст. 26; д, е – со стадии вылупления (ст. 29), регистрация через 48 ч на 2-е сут после вылупления.

По оси ординат – скорость ресничной локомоции, % относительно контроля. Во всех опытах $n = 50$.

ющее действие оказывала KB своего вида. Так, зародыши *H. trivolvris* на 3-и сут после начала инкубации в KBH, 1 : 40 достигли $109 \pm 2\%$ от размера контроля, а в KBH, 1 : 80 – $111 \pm 1\%$. При инкубации *H. trivolvris* в KBL, 1 : 40 размер эмбрионов составлял 105 ± 2 , а в KBL, 1 : 80 – $107 \pm 4\%$ от контрольных. В опытной группе зародышей *L. stagnalis* наибольший ускоряющий эффект наблюдали в KBL, 1 : 40 ($109 \pm 2\%$ от размера контрольных зародышей, $n = 90$), за ней следовала KBL, 1 : 80 ($107 \pm 1\%$). KBH, 1 : 40 оказывала небольшое ускоряющее действие ($106 \pm 2\%$), а в KBH, 1 : 80 размер зародышей не отличался от таковых контрольной группы ($100 \pm 1\%$).

Влияние KB на движение зародышей. У зародышей обоих видов на 3-и сут после начала инкубации со ст. 19 скорость ресничной локомоции снижалась относительно контроля (рис. 4, а, б). В случае *H. trivolvris* наибольший эффект оказывала KB как от своего, так и от другого вида в концентрации 1 : 40. Так, в KBH, 1 : 40 скорость вращения зародышей составляла 32 ± 6 , а в KBL, 1 : 40 –

$21 \pm 5\%$ от контроля. KB в концентрации 1 : 80 оказывала менее выраженный замедляющий эффект: в KBH, 1 : 80 скорость вращения составляла 79 ± 37 , а в KBL, 1 : 80 – $59 \pm 16\%$ от контроля. В случае *L. stagnalis* наиболее выраженный эффект наблюдался при инкубации в воде от своего вида – в KBL, 1 : 40 скорость вращения составила 63 ± 2 , а в KBL, 1 : 80 – $74 \pm 3\%$ от контроля соответственно. KB, полученная от *H. trivolvris*, оказывала менее выраженное действие: в KBH, 1 : 40 скорость вращения эмбрионов уменьшалась до $82 \pm 4\%$ относительно контроля, а в KBH, 1 : 80 до $93 \pm 4\%$.

При инкубации зародышей в KB со стадии позднего велигера скорость их движения через 3 сут, напротив, возрастала (рис. 4, в, г). Выраженность эффекта была аналогична описанному выше эффекту торможения, т.е. на зародышей *H. trivolvris* наиболее сильное действие оказывала KB от обоих видов в концентрации 1 : 40 (KBH, 1 : 40 – $213 \pm 52\%$, KBL, 1 : 40 – $164 \pm 27\%$). KB в концентрации 1 : 80 оказывала значительно более слабое воздействие: KBL, 1 : 80 лишь слегка уве-

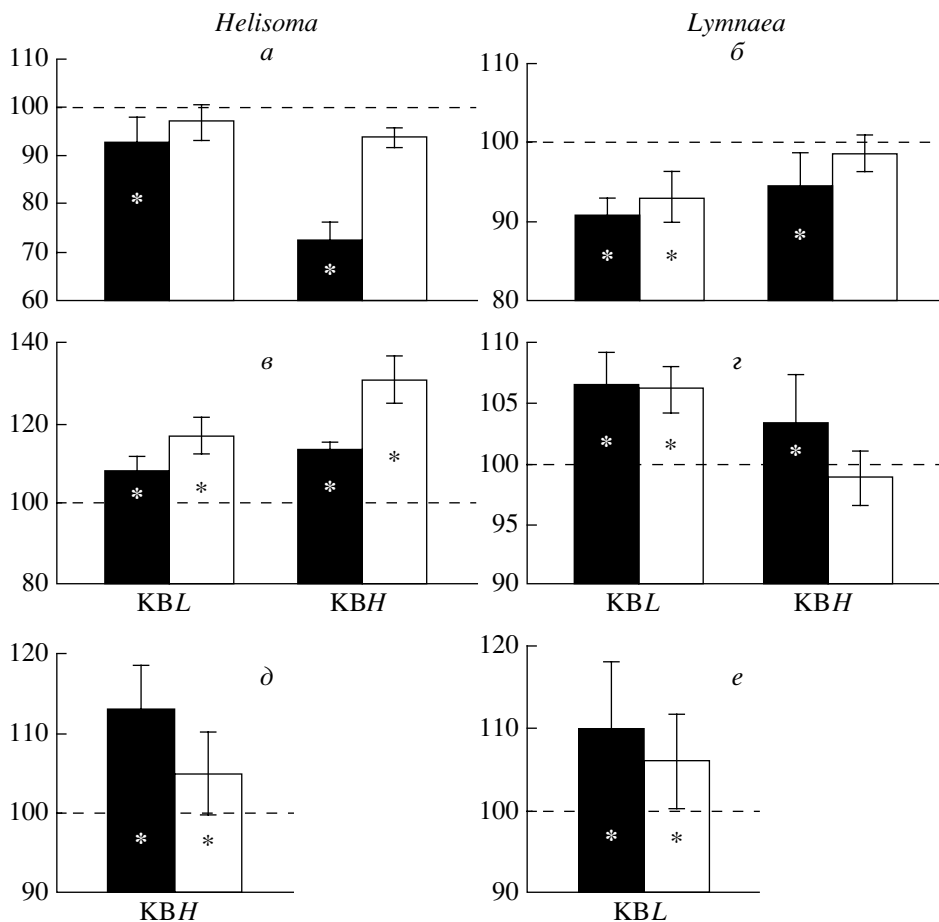


Рис. 5. Относительная частота сердечных сокращений эмбрионов *H. trivolvis* и *L. stagnalis* после инкубации в кондиционированной воде, полученной от *H. trivolvis* (KBH) или *L. stagnalis* (KBL); а–е – см. на рис. 4.

По оси ординат – частота сердечных сокращений, %. Во всех опытах $n = 45$.

личивала скорость вращения зародышей ($106 \pm \pm 22\%$ относительно контроля), а KBH, 1 : 80 ускоряла движение зародышей до $128 \pm 20\%$ от контрольного значения. Наибольшее влияние на зародыши *L. stagnalis* оказывала KB своего вида: в KBL, 1 : 40 скорость движения зародышей опытной группы составляла $218 \pm 20\%$ от контроля, а в KBL, 1 : 80 – $184 \pm 16\%$. KB, полученная от *H. trivolvis*, также вызывала ускорение движения зародышей *L. stagnalis*, но не такое значительное. Так, при инкубации в KBH, 1 : 40 эмбрионы опытной группы двигались со скоростью $174 \pm 16\%$, а в KBH, 1 : 80 – $130 \pm 4\%$ от контроля соответственно.

Скорость ресничной локомоции особей *L. stagnalis* и *H. trivolvis* через 48 ч после инкубации, начатой перед вылуплением, в KB, полученной от своего вида, была выше, чем в контрольной группе (рис. 4, д, е). Эффект был концентрационно зависимым. Так, ювенильные особи катушки при инкубации в KBH, 1 : 40 ползали со скоростью, равной 220 ± 17 , а в KBH, 1 : 80 – $177 \pm$

$\pm 23\%$ от контроля. Аналогично скорость ресничной локомоции ювенильных прудовиков при инкубации в KBL, 1 : 40 составила 173 ± 2 , а в KBL, 1 : 80 – $146 \pm 5\%$ от контроля соответственно.

Влияние KB на частоту сердечных сокращений. Инкубация зародышей начиная со стадии ранней трохофоры во всей тестируемой KB воде приводила к снижению частоты сердечных сокращений (рис. 5, а, б). При этом наибольший замедляющий эффект оказывала более концентрированная KB, полученная от своего вида. Частота сердечных сокращений зародышей *H. trivolvis* после инкубации в KBH, 1 : 40 составляла $72 \pm 4\%$ от контрольного значения, в то время как после инкубации в KBL, 1 : 40 – лишь $93 \pm 5\%$. Частота сердечных сокращений зародышей *L. stagnalis* была минимальной после инкубации в KBL, 1 : 40 – $91 \pm 2\%$ от контроля.

Влияние KB на частоту сердечных сокращений при инкубации эмбрионов начиная со стадии позднего велигера было, напротив, ускоряющим (рис. 5, в, г). Максимальное учащение у зароды-

шей *H. trivolvis* наблюдалось после менее концентрированной КВ от своего вида (КВН 1 : 80 – $131 \pm 6\%$), а у зародышей *L. stagnalis* после инкубации в любой КВ от своего вида (КВЛ, 1 : 40 – $106 \pm 3\%$; КВЛ, 1 : 80 – $106 \pm 2\%$). Следует отметить, что, хотя действие КВ на зародыши обоих видов было однонаправленным, она значительно сильнее модулировала частоту сердечных сокращений у зародышей *H. trivolvis*, чем у зародышей *L. stagnalis*.

Через 48 ч после начала инкубации моллюсков в КВ перед вылуплением наблюдалось учащение частоты сердечных сокращений в среднем на 10% (рис. 5, д, е). У обоих видов максимальное учащение вызывала КВ своего вида: у *H. trivolvis* в КВН, 1 : 40 оно достигало 110 ± 8 , у *L. stagnalis* в КВЛ, 1 : 40 – $113 \pm 4\%$ от контроля.

Влияние КВ на частоту жевательных движений. Частота жевательных движений моллюсков при инкубации, начатой перед вылуплением, в КВ от своего вида через 48 ч после начала инкубации возрастала (рис. 6), причем вода разной концентрации оказывала практически одинаковый эффект. Частота жевательных движений ювенильных *H. trivolvis* при инкубации в КВН, 1 : 40 составляла $133 \pm 6\%$ от контроля, а в КВН, 1 : 80 – $127 \pm 5\%$. Для ювенильных *L. stagnalis* в КВЛ, 1 : 40 частота жевательных движений составляла 140 ± 8 , а в КВЛ, 1 : 80 – $137 \pm 6\%$ от контроля.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наши данные показывают, что выделяемый голодными улитками *L. stagnalis* и *H. trivolvis* химический фактор влияет не только на темпы развития зародышей как своего, так и родственного вида, но и на реализацию моторных программ, которые закономерно возникают в процессе нормального личиночного развития. И на зародыши катушки, и на зародыши прудовика оказывала действие вода, кондиционированная взрослыми голодными особями обоих видов. При этом зародыши *H. trivolvis* оказались более чувствительными к содержащемуся в КВ сигнальному веществу, особенно на ранних стадиях развития. Так, при инкубации со стадии трохофоры наблюдалось замедление развития более чем на 30%, снижение локомоторной активности на 80% и замедление частоты сердечных сокращений на 30%. Для прудовиков же соответствующие показатели были в полтора–два раза меньше.

Неожиданным для нас явился тот факт, что воздействие одной и той же КВ, содержащей выделяемый голодными улитками фактор, на зародыши разных стадий развития было разнонаправленным. Так, инкубация со стадии ранней трохофоры приводила к выраженному отставанию в развитии, достоверному уменьшению локомотор-

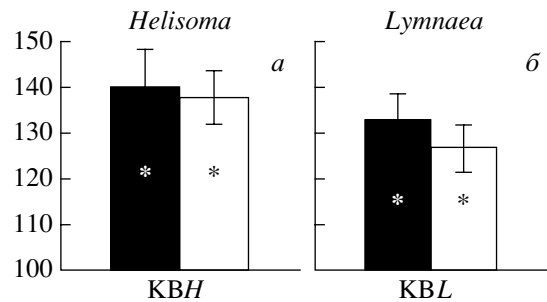


Рис. 6. Частота жевательных движений эмбрионов *H. trivolvis* и *L. stagnalis* (по оси ординат, % относительно контроля) после инкубации в кондиционированной воде, полученной от своего вида. Инкубация со стадии вылупления (ст. 29); регистрация через 48 ч на 2-е сут после вылупления. Во всех опытах $n = 50$.

ной и пищевой активности зародышей и замедлению сердечного ритма. Напротив, если инкубация начиналась на стадии вхождения в метаморфоз или непосредственно перед вылуплением, то рост зародышей ускорялся, усиливалась их локомоторная и пищевая активность, а сердцебиение учащалось.

При инкубации на средних (поздний велигер) и поздних стадиях развития (перед вылуплением) наиболее выраженным было ускорение ресничной локомоции: более чем в два раза в воде от своего вида и в полтора раза – в воде от другого вида. Частота жевательных движений возрастала у обоих видов до 130–140% от контрольного значения. Частота сердечных сокращений значительно модулировалась у катушек (до 130%), чем у прудовиков (107%). Однако следует учитывать, что средняя частота биения сердца в норме у прудовиков почти в два раза выше, чем у катушек. Так что, по всей видимости, под действием внешнего сигнального вещества частота биения сердца у зародышей обоих видов достигала максимально возможного. Таким образом, можно заключить, что активное вещество, выделяемое улитками в неблагоприятных условиях, является интерспецифичным как минимум в пределах близкой таксономической и экологической группы.

Ранее мы предположили, что в случае свободноплавающих личинок адаптивное торможение развития, в результате которого зародыш сможет переждать ожидающие его после метаморфоза неблагоприятные условия, должно сопровождаться одновременным ускорением биения ресничек, что позволит личинке быстрее покинуть зону с неблагоприятными условиями (Voronezhskaya et al., 2004). В случае инкапсулированных личинок пресноводных улиток это не так. Если действие фактора, содержащегося в КВ, начина-

лось на стадии трохофоры (т.е. задолго до метаморфоза), то происходило синергичное замедление как процесса развития, так и моторной, и вегетативной активности. И, наоборот, на стадиях, когда метаморфоз начался или уже прошел, тот же самый фактор активировал все вышеперечисленные процессы.

Действительно, зародыши пресноводных улиток не могут покинуть капсулу на ранних стадиях развития ни при каких условиях. В таком случае шансы на выживание повышаются у зародышей, не только замедливших развитие, но и уменьшивших потребление энергии и питательных веществ капсулярной жидкости за счет общего снижения активности. Когда же метаморфоз начался или завершился, зародыш пресноводной улитки уже может существовать без яйцевой капсулы и оставшихся в ней запасов питательных веществ. В этом случае шансы на выживание возрастают у тех особей, которые смогут как можно скорее достичь вылупления и, активно передвигаясь, покинуть неблагоприятную зону.

На стадии трохофоры у личинки пресноводных моллюсков есть всего два моноаминергических сенсорных нейрона. Мы доказали, что именно эти нейроны воспринимают сигнал от голодных улиток, возбуждаются и выделяют внутрь эмбриона биогенные моноамины (серотонин или дофамин), которые замедляют эмбриональное развитие, воздействуя на пока не идентифицированные нами эргометринчувствительные моноаминовые рецепторы (Voronezhskaya et al., 2004). Логично предположить, что те же самые нейротрансмиттеры участвуют в регуляции локомоции и висцеральных функций. Однако в таком случае возникают противоречия с имеющимися данными о стимулирующей роли серотонина на частоту сердечных биений (Rozsa, Perenyi, 1966; Cottrell, Osborne, 1969; Kiss, Rozsa, 1978; Buckett et al., 1990) и ресничной локомоции у личинок моллюсков (Koshtoyants et al., 1961; Diefenbach et al., 1991; Beiras, Widdows, 1995).

На наш взгляд, возможным объяснением этого противоречия является то, что серотонин вызывает активацию разных серотониновых рецепторов на разных стадиях развития. Этим же, возможно, объясняется и зарегистрированная нами разнонаправленность эффектов КВ на разных стадиях развития, т.е. на ранних и поздних стадиях экспрессируется разный набор серотониновых рецепторов. Таким образом, используя одну и ту же передающую субстанцию, мы получаем разный эффект в зависимости от суммы имеющихся у зародыша на данный момент активных рецепторов. Альтернативным объяснением этого может быть то, что на поздних стадиях развития в опосредовании действия КВ участвуют не идентифицированные нами апикальные моноаминергиче-

ские нейроны (Voronezhskaya et al., 2004), а другие сенсорные клетки с иной медиаторной специфичностью (хотя апикальные нейроны все еще сохраняют свое действие). Оба высказанных предположения нуждаются в дальнейшей экспериментальной проверке.

Феномен торможения личиночного развития хемосенсорными нейронами был впервые описан у нематоды *C. elegans* (Bargman, Horvitz, 1991; Thomas, 1993). Личинки второй генерации непрерывно выделяют в окружающую среду вещество (названное дауеровским феромоном), которое улавливается хемосенсорными нейронами личинок. Одновременно другие сенсорные нейроны воспринимают запах пищи. Взаимодействие между этими двумя стимулами приводит к выбору дальнейшей программы развития: в благоприятных условиях (сигнал от пищи доминирует над сигналом о скученности) личинка продолжает развитие, в неблагоприятных (пищевой сигнал отсутствует или перекрывается сигналом скученности) превращается в так называемую дауеровскую личинку – альтернативную личиночную форму, которая не развивается, не питается и является стойкой к неблагоприятным внешним воздействиям (Schackwitz et al., 1996). Задействованные в этом процессе сенсорные нейроны были идентифицированы, и было показано, что некоторые из них также являются серотонинергическими (Sze et al., 2000). Было предположено, что похожие механизмы, возможно, используются и другими животными, чтобы оценивать сигналы извне и соответственно регулировать свое развитие (Bargman, Horvitz, 1991).

Описанный нами феномен – это второй пример регуляции развития, когда внутривидовые химические передатчики, сигнализирующие о перенаселенности и/или отсутствии пищи, улавливаются личиночными сенсорными клетками и тормозят развитие. Однако необходимо отметить несколько принципиальных отличий в самой природе описанных феноменов. Первым и, на наш взгляд, самым главным отличием является то, что у нематод регуляция развития происходит внутри одной возрастной группы – у личинок второй генерации, в то время как у пресноводных улиток химическая коммуникация осуществляется между взрослыми особями и личинками; т.е. в первом случае сигнализация осуществляется среди особей, конкурирующих за пищу, а во втором – донор и акцептор химического сигнала занимают разные экологические ниши и за пищу не конкурируют.

Вторым принципиальным отличием является интерспецифичность химического сигнала, обнаруженная нами у пресноводных улиток. Если в случае нематод выделяемый одним видом феромон никоим образом не влияет на развитие друго-

го вида, то у пресноводных улиток вещества, сигнализирующие об отсутствии пищи для взрослых особей, улавливаются и являются значимыми для личинок не только своего вида, но и как минимум для организмов в пределах близкородственной таксономической и экологической группы.

Третьим принципиальным отличием является то, что под действием одного и того же химического сигнала личиночное развитие может не только замедляться, но и ускоряться в зависимости от того, на какой стадии развития находится особь. При этом очевидно адаптивное значение такой смены направленности сигнала для повышения выживаемости личинок. Ничего подобного ранее ни у нематод, ни у других животных обнаружено не было.

Другой известный из литературы пример участия химической коммуникации в развитии – это индукция оседания и метаморфоза у морских беспозвоночных. Однако у них индуктором для запуска программы метаморфоза является либо улавливаемый сенсорными нейронами сигнал от взрослых особей только своего вида, либо растворенный в воде запах будущей пищи (Settlement ..., 1978). Как и в случае изученных нами пресноводных улиток, сигналы улавливаются сенсорными нейронами апикального органа (Hadfield et al., 2000), который вообще считается одной из самых консервативных структур у личинок беспозвоночных животных (Беклемишев, 1964; Иванова-Казас, 1995; Nielsen, 2001). Однако у морских беспозвоночных эти сигналы, во-первых, строго видоспецифичны, а во-вторых, они действуют только на компетентных к метаморфозу личинок, т.е. на определенной поздней стадии развития, и их действие является строго однонаправленным и необратимым (Crisp, 1974; Hadfield, 1978, 1998; Burke, 1984; Pawlik, 1992; Lambert, Todd, 1994).

Таким образом, мы обнаружили, что описанный нами ранее феномен химической регуляции эмбрионального развития пресноводных улиток взрослыми особями является многофакторным. Испускаемое голодными улитками вещество действует не только на развитие, но и на реализацию моторных программ, и его действие меняется в зависимости от стадии развития, на которой находятся воспринимающие его личинки. Кроме того, выделяемый фактор не строго видоспецифичен, а значит, инкапсулированные зародыши получают сигнал об ожидающем их отсутствии пищи даже в отсутствие поблизости взрослых особей своего вида. В жизненном цикле животных описанный нами многофакторный механизм обеспечивает оптимальную реализацию адаптивных приспособительных программ личинок, на которых и основываются эволюционные преимущества би-

фазного жизненного цикла – повышенная выживаемость и лучшая расселяемость потомков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Беклемишев В.Н. Основы сравнительной анатомии беспозвоночных: В 2 т. М.: Наука, 1964. Т. 1. 432 с.; Т. 2. 446 с.
- Иванова-Казас О.М. Эволюционная эмбриология животных. СПб.: Наука, 1995. 565 с.
- Мещераков В.Н. Прудовик *Lymnaea stagnalis* L. // Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975. С. 53–92.
- Bargmann C.I., Horvitz H.R. Control of larval development by chemosensory neurons in *Caenorhabditis elegans* // Science. 1991. V. 251. С. 1243–1246.
- Beiras R., Widdows J. Effects of the neurotransmitters dopamine, serotonin, and norepinephrine on the ciliary activity of mussel (*Mytilus edulis*) larvae // Mar. Biol. 1995. V. 122. P. 597–603.
- Buckett K.J., Peters M., Benjamin P.R. Excitation and inhibition of the heart of the snail, *Lymnaea*, by non-FMRFamidergic motoneurons // J. Neurophysiol. 1990. V. 63. P. 1436–1447.
- Burke R.D. Pheromonal control of metamorphosis in the Pacific sand dollar, *Dendraster excentricus* // Science. 1984. V. 225. P. 442–443.
- Cottrell G.A., Osborne N.N. Localization and mode of action of cardioexcitatory agents in molluscan hearts // Experientia. Suppl. 1969. V. 15. P. 220–231.
- Crisp D.J. Factors influencing the settlement of marine invertebrate larvae // Chemoreception in marine organisms / Eds Grant P.T., Mackie A.M. N. Y.: Academic Press, 1974. P. 177–265.
- Diefenbach T.J., Koehncke N.K., Goldberg J.I. Characterization and development of rotational behavior in *Helisoma* embryos: role of endogenous serotonin // J. Neurobiol. 1991. V. 22. P. 922–934.
- Hadfield M.G. Metamorphosis in marine molluscan larvae: an analysis of stimulus and response // Settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae / Eds Chia F.-S., Rice M.E. N. Y.: Elsevier, 1978. P. 165–175.
- Hadfield M.G. The D.P. Wilson Lecture: research on settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae: past, present and future // Biofouling. 1998. V. 12. P. 9–29.
- Hadfield M.G., Meleshkevitch E.A., Boudko D.Y. The apical sensory organ of a gastropod veliger is a receptor for settlement cues // Biol. Bull. 2000. V. 198. P. 67–76.
- Kiss T., Rozsa K.S. Pharmacological properties of 5-HT-receptors of the *Helix pomatia* (Gastropoda) heart muscle cells // Comp. Biochem. Physiol. C. 1978. V. 61. P. 41–46.
- Koshtoyants K.S., Buznikov G.A., Manukhin B.N. The possible role of 5-hydroxy-tryptamine in the motor activity of embryos of some marine gastropods // Ibid. 1961. V. 3. P. 20–26.
- Lambert W.J., Todd C.D. Evidence for a water-borne cue inducing metamorphosis in the dorid nudibranch mollusc *Adalaria proxima* (Gastropoda: Nudibranchia) // Mar. Biol. 1994. V. 120. P. 265–271.

- Marois R., Croll R.P. Hatching asynchrony within the egg mass of the pond snail, *Lymnaea stagnalis* // Invertebr. Reprod. Devel. 1991. V. 19. P. 139–146.
- Miller S.E., Hadfield M.G. Developmental arrest during larval life and life-span extension in a marine mollusc // Science. 1990. V. 248. P. 356–358.
- Morrill J.B. Development of the pulmonate gastropod, *Lymnaea* // Developmental biology of the freshwater invertebrates / Eds Harrison F.W., Cowden R.R. N. Y.: Alan Liss, 1982. P. 399–483.
- Nielsen C. Origin and evolution of animal life cycles // Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. 1998. V. 73. P. 125–155.
- Nielsen C. Animal evolution: interrelations of living phyla. Oxford: Univer. Press, 2001. 563 p.
- Pawlik J.R. Chemical ecology of the settlement of benthic marine invertebrates // Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev. 1992. V. 30. P. 273–335.
- Pechenik J.A., Hammer K., Weise C. The effect of starvation on acquisition of competence and post-metamorphic performance in the marine prosobranch gastropod *Crepidula fornicata* (L.) // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1996. V. 199. P. 137–152.
- Pechenik J.A., Marsden I.D., Pechenik O. Effects of temperature, salinity, and air exposure on development of the estuarine pulmonate gastropod *Amphibola crenata* // Ibid. 2003. V. 292. P. 159–176.
- Raven C.P. Morphogenesis: the analysis of molluscan development. Oxford: Pergamon Press, 1966. 365 p.
- Rozsa K., Perenyi L. Chemical identification of the excitatory substance released in *Helix* heart during stimulation of the extracardial nerve // Comp. Biochem. Physiol. 1966. V. 19. P. 105–113.
- Sakharov D.A. Integrative function of serotonin common to distantly related invertebrate animals // Early Brain / Eds Gustafsson M., Reuter M. Abo: Abo Akademi Press, 1990. P. 73–88.
- Schackwitz W.S., Inoue T., Thomas J.H. Chemosensory neurons function in parallel to mediate a pheromone response in *C. elegans* // Neuron. 1996. V. 17. P. 719–728.
- Settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae / Eds Chia F.S., Rice M.E. N. Y.: Elsevier, 1978. 311 p.
- Strathmann R.R., Strathmann M.F. Oxygen supply and limits on aggregation of embryos // J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 1995. V. 75. P. 413–428.
- Sze J.Y., Victor M., Loer C. et al. Food and metabolic signaling defects in a *Caenorhabditis elegans* serotonin-synthesis mutant // Nature. 2000. V. 403. P. 560–564.
- Thomas J.H. Chemosensory regulation of development in *C. elegans* // BioEssays. 1993. V. 15. P. 791–797.
- Voronezhskaya E.E., Hiripi L., Elekes K. et al. Development of catecholaminergic neurons in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. I. Embryonic development of dopamine-containing neurons and dopamine-dependent behaviors // J. Comp. Neurol. 1999. V. 404. P. 285–296.
- Voronezhskaya E.E., Khabarova M.Yu., Nezlin L.P. Apical sensory neurons mediate developmental retardation induced by conspecific environmental stimuli in freshwater pulmonate snails // Development. 2004. V. 131. P. 3671–3680.

Role of Chemical Signalling in Release of Motor Programs during Embryogenesis of Freshwater Snails *Lymnaea stagnalis* and *Helisoma trivolvis*

E. E. Voronezhskaya¹, M. Yu. Khabarova², A. K. Chaban³, and L. P. Nezlin¹

¹ Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

² Tula State Pedagogical University, pr. Lenina 125, Tula, 300026 Russia

³ Moscow State University, Leninskie gory, Moscow 119992 Russia

E-mail: lena_vor@mail.ru

Received October 24, 2006

Abstract—We have earlier found that freshwater pond snails *Helisoma trivolvis* and *Lymnaea stagnalis*, when reared under conditions of starvation, release chemical signals that reversibly suppress larval development of conspecific embryos. Here, we report that (i) these signals are not strictly conspecific and affect also embryos of a closely related species, which occupies a similar environmental niche; (ii) besides the development of embryos, the signals also affect the release of main motor programs, such as locomotion, feeding, and cardiac activity; (iii) action of the signals is bidirectional: they retard the development and release of motor programs at the early larval stages (trochophore to veliger) and accelerate them at later stages (late veliger to hatching). A possible adaptive significance of the described phenomena is discussed.

Key words: conditioned water, larval development, regulation, chemical signalling.