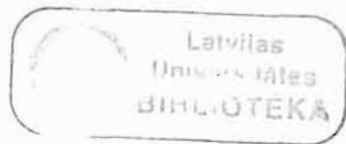


LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
Bioloģijas fakultāte

LĪGAS OZOLIŅAS

Promocijas darbs bioloģijas doktora grāda iegūšanai

VĪNGLIEMEŽA *HELIX POMATIA* (L.) TAUSTEKĻA  
MUSKULATŪRAS NEIRĀLĀS VADĪBAS MEHĀNISMI



RĪGA, 1999

**Fakultātes dekāns: prof. I. Muižnieks**

**Darba vadītāji:        prof. J.I.Aivars  
                                 Ph.D. T.Teyke**

**Recenzenti:            prof. N.Švinka  
                                 prof. E.Birģele  
                                 Ph.D. I.Ankoriņa-Stark**

**Disertācijas aizstāvēšanas diena: 1999. Gada 19. maijs**

## Saturs

1. Ievads.....	5
1.1. Molusku neuroetoloģija.....	5
1.2. Molusku nervu sistēma. Cerebrālie gangliji.....	7
1.3. Molusku muskuļu uzbūves īpatnības.....	8
1.4. Molusku neuro-muskulārās sinapses uzbūve.....	11
1.5. Neurotransmiteru izplatība molusku nervu sistēmā.....	12
1.5.1. Serotonīna neurofizioloģija.....	13
1.5.1.1. Serotonīna efekti.....	13
1.5.1.2. Serotonīna receptori.....	15
1.5.2. FMRF-amīda neurofizioloģija.....	17
1.6. Pētījuma mērķis un uzdevumi.....	18
2. Materiāls un metodes.....	19
2.1. Dzīvnieki un to turēšana.....	20
2.2. Nervu - muskuļa preparāta pagatavošana.....	20
2.3. Anatomiskie pētījumi.....	20
2.3.1. Nervu šķiedru retrogrādā krāsošana.....	21
2.3.2. Krāsu reakcijas ar smagajiem metāliem.....	21
2.3.3. Preparāta sagatavošana mikroskopēšanai.....	21
2.4. Elektrofizioloģiskie pētījumi.....	22
2.4.1. Ar elektrisku kairinājumu izsuktās muskuļu kontrakcijas.....	22
2.4.2. Ar ķīmiskajām vielām izsuktās taustekļa muskuļa kontrakcijas.....	23
2.4.3. Fizioloģiskais tests taustekļa kontrakciju virziena noteikšanai.....	24
2.5. Pētījumā izmantotās vielas.....	25
2.6. Rezultātu apstrāde un to izvērtējums.....	26
3. Rezultāti.....	27
3.1. Taustekļu motorā inervācija.....	27
3.1.1. Anatomiskie pētījumi.....	27
3.1.1.1. Nervu izejas vietas no cerebrālā ganglija noteikšana.....	27
3.1.1.2. Nervu topogrāfija taustekļa muskulī.....	28
3.1.2. Kustību nervu loma taustekļa kustībās.....	29
3.1.3. Kopsavilkums.....	29
3.2. Neurosekrētu - serotonīna un FMRF-amīda efekts uz taustekļa muskuļa kontrakcijām.....	30
3.2.1. Serotonīna efekti.....	30
3.2.2. FMRF-amīda efekti.....	32
3.2.3. Kopsavilkums.....	34
3.3. Taustekļa nerva - muskuļa sinapšu pētījumi.....	34
3.3.1. Holinērgisko sinapšu rakstura noteikšana.....	35
3.3.2. Serotonīna iedarbības vietas noteikšana taustekļa nerva-muskuļa sinapsē.....	35
3.3.3. Kopsavilkums.....	36
3.4. Serotonīna iedarbības molekulārie mehānismi.....	36
3.4.1. Serotonīns un acetilholīna receptori.....	37
3.4.2. Serotonīna receptoru tipa noskaidrošana.....	38

3.4.3. Cikliskā adenozinmonofosfāta nozīme serotonīna efektu realizācijā. ....	39
3.4.4. Kalcija nozīmes noskaidrošana serotonīna efektu realizācijā...41	41
3.4.4.1. Kalcija nozīme taustekļa muskuļa kontrakciju norisē.....	41
3.4.4.2. Serotonīna efekti dažādu $[Ca^{2+}]_o$ vidēs.....	43
3.4.4.3. Serotonīna efekti kofeīna klātbūtnē. ....	44
3.4.4.4. Šūnas virsmas membrānas kalcija kanālu inaktivācija.....	47
3.4.4.5. Intracelulāro kalcija krātuvju kalcija kanālu inaktivācija.....	48
3.4.5. Ar G-proteīnu saistīto receptoru esamība taustekļa muskuļa šūnās.....	51
3.4.6. Litija iedarbība uz taustekļa muskuļa kontrakcijām.....	52
3.4.7. Kopsavilkums.....	54
3.5.1. Serotonīna metabolisma un serotonerģisko neironu summārās aktivitātes mainība.....	56
3.5.2. Kopsavilkums. ....	57
4. Rezultātu analīze. ....	58
4.1. <i>Nervus peritenticularis interna</i> un <i>externa</i> izvietojums taustekļa muskulatūrā un to nozīme taustekļa kustībās. ....	58
4.2. Neurosekrētu loma <i>Helix</i> taustekļa kustībās. ....	60
4.2.1. Serotonīna efekti molusku neuro-muskulārajās sistēmās.....	61
4.2.2. FMRF-amīda efekti molusku neuro-muskulārajās sistēmās.....	63
4.3. Taustekļa nerva-muskuļa sinapses fizioloģija.....	64
4.3.1. Holinērģiskās sinapses. ....	64
4.3.2. Serotonerģiskās sinapses. ....	65
4.4. Serotonīna darbības molekulārie mehānismi. ....	66
5. Secinājumi. ....	75
6. Hipotēzes.....	76
6. Literatūras saraksts. ....	77

## 1. IEVADS

Daba atrodas nepārtrauktā mainībā, un mēs visi (cilvēki un dzīvnieki) atrodamies šīs mainīgās apkārtējās vides ietekmē. Lai dzīvrais organisms spētu izdzīvot mainīgajā vidē, tam ir jāpielāgojas šīm vides pārmaiņām. Organisma fizioloģisko funkciju izmaiņas šai pielāgošanās procesā ir nevis pasīvs vides ietekmes rezultāts, bet gan aktīva, bioloģiski mērķtiecīga reakcija, kura ir tikai iespējama, vidi kontrolējot informatīvi. Un tikai pielāgošanās garantē katra indivīda spēju izdzīvot un pastāvēt konkurencē ar citiem īpatņiem un tādejādi nodrošināt dzīvības nepārtrauktību.

Apkārtējās vides pārmaiņas cilvēki un dzīvnieki (arī viensūņi) informatīvi kontrolē ar specifiskiem sensoriem mehānismiem. Dzīviem organismiem ar neuru sistēmu vides informatīvās kontroles funkciju galvenokārt veic nervu sistēmas elementi. Vides pārmaiņas darbojas uz organismu kā kairinātāji, kuri izraisītie nervu impulsi ierosina fizioloģisko funkciju izmaiņas organismā, kas ir atbildes reakcija uz vides pārmaiņām.

Jau kopš Aristoteļa un Hipokrāta laikiem cilvēku prātus ir nodarbinājusi doma par dzīvās būtnes rīcības modeli. Šī tēma, tikai jau nedaudz citā aspektā, ir aktuāla vēl joprojām. Tādēļ, lai noskaidrotu nervu sistēmas nozīmību dzīvā organisma uzvedības modelī, ir svarīgi izzināt, kādi procesi notiek ķēdītē : *apkārtējā vide - dzīvrais organisms - orgānu sistēma* un *fizioloģiskie procesi* tajā - *sinapse* un *molekulārie procesi* tajā. Šo procesu, kas norošina neirālās darbības un izpildsrtuktūru mijiedarbību, izzināšana ir svarīga, lai radītu priekšstatu par organismu kā vides integratīvu vienību, kura uzvedība nosaka viņa sekmes konkurencē ar citiem indivīdiem, viņa ekoloģisko nišu.

### 1.1. Molusku neuroetoloģija.

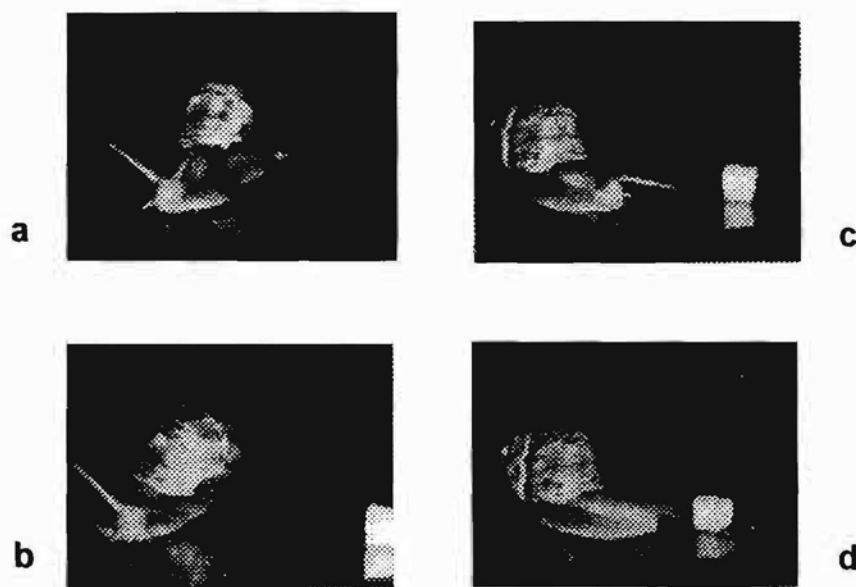
Savas relatīvi vienkāršās nervu sistēmas uzbūves dēļ dažādi *Mollusca* tipa pārstāvji plaši tiek izmantoti neuroetoloģiskajos pētījumos uzvedības modeļa noskaidrošanai. Salīdzinājumā ar mugurkaulniekiem, molusku nervu sistēma sastāv no nedaudziem ganglijiem ar lieliem, krāsas ziņā atšķirīgiem un viegli indetificējamiem neironiem. Tā piemēram, jūras zaķa *Aplysia californica* nervu sistēma veidota no apmēram 20 000 nervu šūnām (Kandel et al., 1991), Āfrikas

sauszemes gliemeža *Achatina fulica* - no apmēram 25 000 neironu (Chase & Tolloczko, 1993). Turpretī mugurkaulnieku, piemēram, peles lielo pusložu garoza vien satur ap 10 miljoniem nervu šūnu, bet cilvēkam šis skaitlis sniedzas pāri 10 miljardiem (Schmidt, 1995). Taču neskatoties uz šo relatīvi vienkārši veidoto nervu sistēmu, moluski uzrāda ļoti interesantas un sarežģītas uzvedības reakcijas, kuras saistītas ar barības meklēšanu un uzņemšanu, pašaizsardzību, pārošanos, ziemošanu un nelabvēlīgu apkārtējās vides apstākļu pārciešanu.

Jebkura dzīvā organisma uzvedība telpā ir mērķtiecīga, noteiktu motīvu virzīta. Un tikai paviršam vērotājam var likties, ka dzīvais organisms dabā pārvietojas haotiski bez sava mērķa. Taču tas tā nav un to pierāda arī daudzi neuroetoloģiskie pētījumi. Rīcības programmas veidošanā kādai noteiktai rīcībai ir svarīgas vairākas iekšējās un ārējās motivācijas. Taču kā viena no galvenajām ir informācijas uzņemšana no apkārtējās vides. Molusku tipa pārstāvjiem vienīgās sensorās modalitātes, kuras pieļauj informāciju uzņemt no attāluma, ir oža un redze (Chase, 1986; Kilius R., 1995). Oža un redze piedalās uzvedības modeļa veidošanā barības meklēšanas (Croll & Chase, 1980; Jacklet, 1980), pārošanās (Chase et al., 1978; Takeda & Tsuruoka, 1979) un nelabvēlīgu apkārtējās vides apstākļu pārciešanas laikā (Chase, 1986; Lind, 1989).

Ožas sensorās šūnas molusku tipa pārstāvjiem atrodas izklaidētas pa visu ķermeņa virsmu, taču to lielākā daļa ir koncentrēta ožas epitēlijā, kas atrodas lielo taustekļu galos (Hanström, 1925; Schulz, 1938). Arī vīngliemeža lēcveidīgās acis atrodas to pašu lielo, bieži sauktu, acu, taustekļu galos. Tādejādi vīngliemežim lielajos taustekļos atrodas abu veidu svarīgākie sensorie orgāni, kas nodrošina informācijas uzņemšanu no apkārtējās vides. (Turpmākajā tekstā apzīmējums "*taustekļi*" tiks attiecināts tikai uz lielajiem - acu - taustekļiem. Bez acu taustekļiem moluskiem ir arī mazie - lūpu taustekļi.) Pārvietojoties telpā, molusks ar taustekļiem meklē pazīstamas sensorās modalitātes, un meklēšanas laikā moluska taustekļi ir uz virzīti uz augšu (1.att. a,b). Taču, ja gliemezis savā tuvumā ir uztvēris zināmu objektu, taustekļi tiek virzīti un fiksēti šī objekta virzienā (1. att. c). Ar šādi uz objektu virzītiem taustekļiem gliemezis pārvietojas šīs zināmās sensorās modalitātes virzienā (1. att. d). Ja taustekļu fiksācija uz objektu tiek kavēta, gliemeža pārvietošanās telpā kļūst haotiska un neorientēta, un meklēto objektu gliemezis atrod pēc ilgas maldīšanās (Kilius, 1995). Taustekļu kustību kvalitatīva analīze ir parādījusi, ka virziens, kādā

gliemezis noliec savus taustekļus, ir rādītājs tam, ka dzīvnieks ir uztvēris, apzinājis un identificējis signāla avotu telpā (Chase & Croll, 1981; Peschel, 1998).



**1. att. Vīngliemeža pārvietošanās telpā uz zināmas barības avotu (pēc Peschel, 1998).**  
Pārvietojoties telpā, vīngliemezis ar taustekļiem meklē pazīstamas sensorās modalitātes.  
Virziens, kurā tiek noliekti taustekļi, ir tiešs rādītājs tam, kādā virzienā pārvietosies pats gliemezis.

Smaržas atšķiršanas sliekšnis atsevišķām sauszemes molusku sugām ir tiešām vērā ņemams. Piemēram, *Achatina fulica* spēj atšķirt amila acetāta smaržu, ja tā koncentrācija gaisā ir  $10^{-7}$  M (Chase, 1982), kas ir salīdzināms ar šīs smaržas atšķiršanas sliekšni cilvēkam -  $10^{-9}$  M. Kā liecina daži literatūrs dati, vīngliemezis atsevišķas smaržvielas spēj uztvert no 40 cm attāluma (Kilias, 1995; Teyke, 1995), bet vizuālo informāciju ar acīm tikai no 7-8 cm attāluma (Kilias, 1995).

## 1.2. Molusku nervu sistēma. Cerebrālie gangliji.

Molusku tipa pārstāvjiem ir raksturīga gangliju tipa nervu sistēma. Vīngliemeža nervu sistēmu veido 5 galvenie gangliju pāri un viens atsevišķs ganglijs: *cerebrālie gangliji*, kurus galvenokārt veido aferentie neironi no sensorajiem orgāniem (ožas epitēlija, acīm, statocistām), kā arī taustekļu motoneironi; *pedālie gangliji*, kuri nodrošina gliemeža pēdas muskulatūras motoro inervāciju; *bukālie gangliji*, kuri inervē gremošanas traktu; *pleirālie gangliji*, kuru neironi inervē mantiju; *parietālie gangliji* un liels *viscerālais ganglijs*, kuru neironi inervē daļu gremošanas

trakta, nieri, sirdi, kā arī dzimumorgānus. Pēdējie 5 gangliji ir saplūduši un veido *iekšējo orgānu maisa gangliju kompleksu*, kas nodrošina visu iekšējo orgānu inervāciju (Kerkur & Walker, 1975; Kilijs, 1995).

Cerebrālajos ganglijos pēc neironu veida, izvietojuma un nervu izejas vietām no ganglijiem katrā var izšķirt trīs moroloģiski atšķirīgus apvidus: *protocerebrum* (priekšsmadzenes), *mesocerebrum* (vidussmadzenes) un *metocerebrum* (pakaļējās smadzenes). Cerebrālajos ganglijos ienāk plaša informācija no gliemeža sensorajiem orgāniem, un ganglijos arī tiek analizēta, apstrādāta un veidota rīcības programma tālākai darbībai. Cerebrālajos ganglijos atrodas arī motoneironi, kuru izaugumi inervē taustekļa muskulatūru un nodrošina taustekļu kustības. Tādejādi, olfaktoriskā un vizuālā informācija no sensorajiem orgāniem, kuri atrodas gliemeža taustekļos, pa sensorajiem un starpneironiem nonāk cerebrālajos ganglijos. Turpat cerebrālajos ganglijos notiek programmas izveide un komandu nodošana izpildorgāniem - taustekļu muskuļiem. Tādejādi cerebrālie gangliji nodrošina atgriezenisko saiti starp ienākušo informāciju un taustekļu kustību aktivitāti. Taustekļu kustību aktivitāte nosaka arī lielā mērā paša dzīvnieka uzvedības aktivitāti, un taustekļu orientācija telpā vairumā gadījumu sakrīt ar paša dzīvnieka pārvietošanās virzienu dabā (Peschel, 1998).

### 1.3. Molusku muskuļu uzbūves īpatnības.

Bezmugurkaulnieku, tai skaitā molusku, muskuļaudus nevar strikti pieskaitīt šķērsvītrotajiem vai gludajiem muskuļiem, kā šo nosacīto iedalījumu izmanto, raksturojot mugurkaulnieku muskuļaudus. Molusku muskuļu salīdzinājums ar mugurkaulnieku muskuļiem var sniegt ieskatu muskuļaudu dažādo struktūru nozīmībā, kā arī atsevišķo muskuļu grupu funkcionālajās spējās.

Lielākā daļa visu molusku muskuļaudu ir veidota no nelielām (diametrā līdz 7  $\mu$ ) vienkodolu šūnām, kuras neveido sincītiju un vairāk līdzinās mugurkaulnieku gludo muskuļu šūnām. Dažām molusku sugām ir atrasti arī šķērsvītrotā muskuļu tipa audi, kā piemēram, atsevišķas muskuļu grupas *Pecten un Chlamys*. Šie muskuļi līdzinās mugurkaulnieku skeleta muskuļiem, ar skaidri izteiktu sakromēra struktūru. Tie nesatur arī citiem molusku muskuļiem raksturīgo paramiozīnu, bet gan aktīnu un miozīnu, kas nodrošina muskuļu kontrakcijas (Hoyle, 1964).



Molusku muskuļaudu moro-funkcionālā struktūra, manuprāt, ir raksturojama pēc sekojošiem kritērijiem: 1) pēc miofilamentu organizācijas muskuļa šūnā; 2) pēc organoīdu daudzuma un specializācijas.

**Miofilamentu organizācija.** Gluži tāpat kā mugurkaulnieku muskuļos, arī molusku muskuļos var identificēt divu veidu miofilamentus - tievos un resnos. Mugurkaulnieku tievo filamentu pamatstruktūru veido olbaltumvielas - aktīna - molekula, pie kuras ir piesaistījušās regulatorās olbaltumvielas - troponīns un tropomiozīns. Šo regulatoro olbaltumvielu sasaiste ar kalcija joniem izraisa miozīna molekulu fermentatīvo aktivitāti un šķērstiltnu kustību, kas nodrošina sarkomēra saraušanos. Daudzu autoru pētījumos ir pierādīts, ka molusku muskuļos atrastais aktīns līdzinās aktīnam, kas sastopams arī mugurkaulnieku muskuļos, kā piemēram, truša (Kendrick-Jones et al., 1970) un vardes (Lowy & Vibert, 1967) muskuļos. Atšķirībā no mugurkaulnieku skeleta muskuļiem, molusku muskuļi nesatur regulatorās olbaltumvielas - troponīnu un tropomiozīnu (Kendrick-Jones et al., 1970). Literatūrā ir atrodamas arī norādes, ka molusku muskuļu tievo filamentu struktūrā bez aktīna pavedieniem var būt sastopama arī kāda cita līdzīgas struktūras olbaltumviela -  $\beta$ -aktinīns (Suzuki et al., 1971).

Mugurkaulnieku resno miofilamentu pamatstruktūru veido liela izmēra, polimerizētas kontraktilās olbaltumvielas - miozīna - molekulas. Savkārt, molusku resno miofilamentu pamatsruktūru veido miozīna un/vai paramiozīna molekulas, kuru diametrs variē plašās robežās no 100 Å līdz pat 1500 Å (Heyer et al., 1973). *In vitro* pētījumi rāda, ka paramiozīns veido resno filamentu serdi, bet miozīns izvietojas tās ārpusē (Szent-Györgyi et al., 1971). Šādi novietotam miozīnam ir ļoti liela spēja saistīt kalciju un tādejādi tieši bez regulatorproteīnu starpniecības regulēt tievā un resnā filamenta sasaiti un muskuļa šūnas saraušanos (Kendrick-Jones et al., 1970).

No tievo un resno filamentu savstarpējā novietojuma daudzējādā ziņā ir atkarīgs arī kontrakcijas mehānisms. Molusku muskuļos var izšķirt divu veidu miofilamentu organizāciju: neregulāro un regulāro. Muskuļiem ar neregulāru miofilamentu organizāciju nav konstants tievo un resno filamentu skaits un filamentu attiecība viena muskuļa dažādās šūnās. Šāda muskuļu struktūra ir, piemēram, *Heliosoma trivolvaris* (latviski) (Heyer et al., 1973) un *Mytilus* .

(Fielder & Lieder, 1994) mantijas savilcējmuskuļiem. Regulārās

miofilamentu organizācijas muskuļiem, ir stingri izteikts heksagonāls, simetrisks abu veidu miofilamentu novietojums šūnā, kā tas ir, piemēram, *Cryptomphallus aspersa* (latviski) pēdas muskuļos (Abadila-Fenoll F. et al., 1982), kā arī *Helix* taustekļu muskuļos (pēc Hoyle, 1964). Miofilamentu virziens šādās šūnās visbiežāk ir perpendikulārs vai ieslīps attiecībā pret garenisko asi (Schipp & Schäfer, 1969), un tām ir analogija ar mugurkaulnieku skeleta muskuļu šūnu kontraktīlo vienību - sarkomēru.

Atbilstoši miofilamentu organizācijai muskuļu šūnā, kontrakcijas mehānisms molusku muskuļos arī var būt atšķirīgs. Neregulārās miofilamentu struktūras muskuļos kontrakcija notiek salīdzinoši īslaicīgi, pārvietojoties kontraktīlajām vienībām vienai attiecībā pret otru. Rosenbluts (Rosenbluth, 1968) šāda veida kontrakcijas ir nosaucis par cirpes ("*shearing*") kontrakcijām, jo miofilamentu pārvietošanās ir īslaicīga un nepilnīga, it kā neļaujot kontrakcijai notikt līdz galam. Regulārās miofilamentu organizācijas muskuļos kontrakcija notiek analogiski slīdošo pavedienu mehānismam mugurkaulnieku šķērsvītrotajos muskuļos, un tievo un resno miofilamentu pārvietošanās notiek robežās starp divām piestiprināšanās plātnītēm (Wilburg & Yonge, 1964).

**Organoīdu organizācija muskuļu šūnās.** Molusku muskuļu šķiedrās ir atrodama virkne dažādu membranālas dabas struktūru, kurām ir būtiska loma kontrakcijas mehānisma nodrošināšanā. Tā piemēram, molusku muskuļiem raksturīga struktūra ir, t.s., piestiprināšanās plātnītes, kurām līdzīga struktūra ir sastopama mugurkaulnieku gludajos muskuļos, bet nav - skeleta muskuļos (Rogers, 1969; Heyer & Kater, 1973). Šīs plātnītes ir sarkolemmas iekšējās virsmas ieliekumi, pie kuriem piesaistās tievie filamenti (Rogers, 1968; 1969). Piestiprināšanās plātnītēm analoga struktūra mugurkaulnieku skeleta muskuļos ir Z-līnijas, kas abpusēji norobežo sarkomēru. Ir sastopams arī cits sarkolemmas ieliekumu veids, kurš iesniedzas dziļi sarkoplazmā, kā arī atsevišķu vezikulāru struktūru veidā izkaisīts starp miofilamentiem pa visu sarkoplazmu (Sanger, 1971). Šo vezikulu lokalizācija molusku muskuļu šūnās ir salīdzināma ar mugurkaulnieku muskuļos esošo sarkoplazmatisko tīklu, kuram ir būtiska loma kā intracelulārā kalcija krātuvēm šūnā. Membranālo struktūru daudzums un izvietojums variē diezgan plašās robežās un nav atrasta korelācija starp miofilamentu organizāciju un vezikulu daudzumu

muskuļu šūnās. Tā piemēram, *Heliosoma trivolvis* mantijas savilcējmuskuļos miofilamentiem ir neregulāra organizācija un neliels vezikulu skaits (Heyer et al., 1973), bet dažām vēderkāju muskuļu grupām ir regulārs miofilamentu sakārtojums ar plašu vezikulāro tīklu ( Sanger & Hill, 1972). Literatūrā ir atrodamas arī norādes par atsevišķiem vēderkāju muskuļiem, kuros praktiski nav sarkolemmas veidojumu, taču ir augsti organizēta miofilamentu struktūra ( Hill et al., 1970).

#### 1.4. Molusku neuro-muskulārās sinapses uzbūve

Signāla pārnese un neuro-muskulārās sinapses uzbūve molusku neuro-muskulārajā sistēmā ir atšķirīga no signāla transmisijas un sinapses uzbūves mugurkaulnieku šķērsvītrotajos muskuļos un vairāk līdzinās tam signāla pārnesei veidam, kāds raksturīgs mugurkaulnieku gludajā muskulatūrā. *Helix* neuro-muskulārajam kontaktam ir raksturīgs: 1) nervgala presinaptisks veidojums, kurš satur dažāda lieluma vezikulas; 2) šaura sinaptiskā sprauga (150 - 300 Å); 3) relatīvi nespecializēta postsinaptiskā membrāna (Heyer et al., 1973). Pie tam, viens neirons var veidot sinapses ar vairākām muskuļu šķiedrām, kā arī ir iespējama polineirāla inervācija, kad vienu muskuļu šķiedru inervē vairāki neironi (Gilloteaux, 1972).

Vairāki pētījumi liecina, ka no neirona izdalītais transmitters spēj iedarboties ne tikai postsinaptiskās membrānas apvidū, bet arī salīdzinoši lielā attālumā, kas vairākkārt pārsniedz sinapses izmērus (Heyer et al., 1973). Tādejādi šāda iedarbība, zināmā mērā, līdzinās neurohumorālai iedarbībai. Transmittera distantās iedarbības piemēri ir zināmi arī citu molusku neuro-muskulārajās sistēmās, kā piemēram, jūras moluska *Aplysia* neuro-muskulārajā sistēmā (Colleshall, 1972).

Kā mediators, kurš izraisa molusku dažādu muskuļu kontrakcijas, vairumā gadījumu ir zināms acetilholīns. Taču interesants ir fakts, ka vienam muskulim var būt jaukta tipa holinērgiskie receptori, proti, gan nikotīna (N), gan muskarīna (M) tipa holinērgiskie receptori (Ram et al., 1994), kas neļauj molusku muskuļus strikti pieskaitīt šķērsvītrotajiem vai gludajiem muskuļiem. Kā zināms, mugurkaulnieku neiromuskulārajā sistēmā N un M holinoreceptoru atrašanās ir vairāk noteikta, un N

holinoreceptori atrodas skeleta muskuļos, taču M holinoreceptori gludajā muskulatūrā.

Zinātnieku vidū nepastāv pilnīga vienprātība par pētījumā izmantotā vīngliemeža *Helix pomatia* taustekļu muskulatūru, kuru regulārās miofilamentu organizācijas un kontrakcijas mehānisma dēļ G.Hoyle (pēc Wilbug & Yongle, 1964) dēvē par nepilnīgi šķērsvītrotu muskuli, taču pēc neirālās inervācijas veida un šūnu struktūras tas vairāk līdzinās gludajiem muskuļiem (Rogers, 1968; Heyer et al., 1973).

### 1.5. Neurotransmiteru izplatība molusku nervu sistēmā

Daudzajos pētījumos ar moluskiem ir atrasts, ka to nervu sistēma satur virkni regulatoro neurosekrētu, kuri ir plaši izplatīti arī mugurkaulnieku nervu sistēmā. Tādi neuropeptīdi un biogēnie amīdi kā serotonīns, dopamīns (Dahl et al., 1966; Osborne and Cottrell, 1971), miomodulīns (Schütt et al., 1992; Scott et al., 1997), histamīns, glutamīns,  $\gamma$ -amino-sviestskābe (pēc Kerkut & Walker, 1975), dažādi enkefalīni (Elekes et al., 1993) un FMRF-veida amīdi (Lehman & Greenberg, 1987) ir atrasti dažādās molusku sugās. Šo bioloģiski aktīvo vielu - neurotransmiteru - darbība ir plaši pētīta, taču vēl pilnībā neizzināta. (Ar jēdzienu "*neurotransmitters*" tiek apzīmētas bioloģiski aktīvas, regulatoras vielas, kas sintezējas un izdalās no presinaptiskā neirona un izraisa aktivējošas vai kavējošas pārmaiņas postsinaptiskajā šūnā. Neurotransmiters nodrošina informatīvo mijiedarbību starp šūnām (kalpo informatīva signāla pārnesei starp šūnām), un tas var veikt gan *mediatora*, gan *modulatora* funkcijas. *Neiromediators* - postsinaptiskajā membrānā saistās pie specifiskajiem receptoriem un aktivē vai kavē fermentatīvos procesus šūnā, kuru rezultātā notiek šūnas polaritātes izmaiņas (un aktivēta vai kavēta specifiskā darba funkcija). *Neiromodulators* - modulē mediatora efektu, saistoties pie specifiskajiem receptoriem, vai arī pie primārā mediatora receptoriem, izmainot postsinaptiskās šūnas jūtību pret šo mediatoru vai vispārēju vielmaiņas uzliesmojumu).

## 1.5.1. Serotonīna neurofizioloģija

### 1.5.1.1. Serotonīna efekti

90-gados zinātnieku lielu ievērību ir ieguvis biogēnais amīds - serotonīns. Serotonīns cilvēka nervu sistēmā tika atklāts 20. gs. vidū, un sevišķu interesi tas izraisa savas psihomimētiskās darbības dēļ. Serotonīns plaši ir izplatīts arī bezmugurkaulniekos un augu valstī (pēc Borne, 1998). Dzīvnieku valstī serotonīns ir zināms kā neiromediatora, tas var veikt arī neiromodulatora un neurohormona funkcijas (Kravitz, 1991; Katz, 1995; Katz & Frost, 1996). Serotonīna darbības molekulārā mehānisma izziņāšana var sniegt ieskatu tā darbības efektu izprašanā un būt nozīmīga arī praktiskajā medicīnā.

Kā neiromediatora serotonīns ir atrasts arī vīngliemeža *Helix pomatia* nervu sistēmā (Kemenes & S.-Rozsa, 1987). Maincas Universitātes Zooloģijas Institūta Neuroetoloģijas laboratorijas uzmanību HD Dr. T.Teykes vadībā ir piesaistījis vīngliemeža cerebrālo gangliju neironos deponētais serotonīns. Ar immūncitoloģisko krāsošanas metodi ir pierādīta serotonīnu saturošo šūnu lokalizācija cerebrālo gangliju ventrālajā virsmā un bagātīga serotonīna klātbūtne taustekļa muskulatūru inervējošajās nervu šķiedrās. Liels serotonergo šūnu daudzums ir identificēts arī centrālajā komisūrā, kura savieno abus cerebrālos ganglijus (Fuss, 1997). Ar retrogrādās krāsošanas metodi un serotonīnu saturošo neironu imunocitoķīmisko krāsošanas metodi ir pierādīta atsevišķu cerebrālā ganglija serotonergo neironu klātbūtne taustekļu muskulatūrā un šo neironu kontaktvietas ar taustekļa motoneironiem. Pie tam, elektriski kairinot atsevišķus serotonīnu saturošos cerebrālā ganglija neironus, novēro elektriskās aktivitātes izmaiņas taustekļa motoneironos, kā arī paša taustekļa kontrakciju izmaiņas. (Fuss, 1997). Tādejādi, ir pamats domāt, ka serotonīns iesaistās taustekļu kustību modulācijā, kura var būt nozīmīga, orientējoties gliemezim telpā pēc distanti uzņemtās informācijas.

Literatūrā plaši ir atrodami dati par serotonīna darbību arī citu sugu moluskos, un tā nozīmību šo dzīvnieku orientācijā teplā. Interesants ir piemērs, kā serotonīns vienlaicīgi var darboties gan kā mediators, gan kā modulators jūras gliemeža *Tritonia diomedea* aizsargreakcijas veidošanā (Katz & Frost, 1995). Serotonergie starpneironi, kuri veido kontaktus ar *Tritonia* peldmuskuli inervējošiem motoneironiem, izsauc uzbudinošu postsinaptisko potenciālu šajos motoneironos un

sekojošas muskuļa kontrakcijas. Taču šo motoneironu aktivitāti vienlaicīgi ietekmē vēl citi serotonergie neironi, kuri arī veido sinapsi ar šiem motoneironiem, un pastiprināti izdala serotonīnu sinaptiskajā spraugā ekstrēmās situācijās (Katz & Frost, 1995).

Motorās programmas modulācija ar serotonīna starpniecību ir daudz pētīta un labi raksturota. Pie tam, serotonīns modulē galvenokārt tās motorās programmas, kas saistītas ar ritmisku kustību aktivitāti. Tā piemēram, serotonīna ievadīšana *Tritonia* ķermeņa dobumā izsauc ritmiskas kustības, kuras raksturīgas dzīvniekam peldot (McClellan et al., 1994). Līdzīgu efektu serotonīns rada arī *Aplysia brasiliana* (Parson & Pinsker, 1989; McPherson & Blankenship, 1991) un *Clione limacina* organismā (Satterlie, 1995; Satterlie et al., 1995), kur serotonīns piedalās ne tikai motorās programmas radīšanā, bet arī peldēšanas ātruma regulācijā, iesaistot peldēšanas procesā jaunas motorās vienības.

Serotonīna efekts motorās programmas modulācijā nav attiecināms tikai uz moluskiem vien. Arī medicīniskai dēlei (Angstadt & Friesen, 1993; Managan et al., 1994), upes vēzim (Johnson et al., 1995) un vārdes kurkulim (Sillar & Simmers, 1994) kustību programmas modulācijā piedalās serotonīns.

Līdzās serotonīna efektiem motorās programmas modulācijā, literatūrā ir plaši aprakstīta serotonīna iedarbība uz perifērajiem izpildorgāniem. Kā viena no dažādās molusku sugās visvairāk pētītajām ir bukālo un parapodiālo muskuļu kontrakciju izmaiņas serotonīna ietekmē (*Achatina*: Yoshida & Kobayashi, 1991; 1995; *Aplysia*: Weiss et al., 1978; 1981; Ram et al., 1981; Kupfermann & Weiss, 1982; Parsons & Pinsker, 1989; Gamkrelidze et al., 1995; *Heliosoma*: Zoran et al., 1989; *Helix*: Kemenes & S.-Rozsa, 1987; *Lymnea*: Yeoman et al., 1994).

Neskatoties uz serotonīna plašo aktivējošo iedarbību, ir zināms arī serotonīna kavējošais efekts. Spolīštārpa *Ascaris suum* pārvietošanās telpā ir lokomotoriska ar izplatošām vijņveida kustībām. Ir zināms, ka serotonīns šo kustību aktivitāti nomāc (Reinitz & Stretton, 1996). Taču, piemēram, *Aplysia* gremošanas muskuļos, kā arī *Tritonia* atsevišķos peldēšanu nodrošinošos muskuļos, serotonīns ir aprakstīts kā modulators, kurš spēj veikt divējādu - gan aktivējošu, gan kavējošu efektu (McClellan et al., 1994; Ram et al., 1981).

Bez serotonīna modulējošā efekta kustību modeļa izveidē, serotonīns piedalās arī citos neirālajos procesos. Ir pierādīts, ka serotonīnam ir noteikta loma

nosacījuma refleksu izveidē un klasiskās apmācības procesā daudziem bezmugurkaulniekiem, tai skaitā arī moluskiem (Kandel, 1989; Glanzman, 1995). Tikpat plaši ir zināma serotonīna loma mugurkaulnieku centrālajā nervu sistēmā. Šeit serotonīns piedalās miega, atmiņas, apmācības un temperatūras regulācijā, kā arī kardiovaskulāro funkciju, endokrīno funkciju un citos regulācijas procesos.

### 1.5.1.2. Serotonīna receptori.

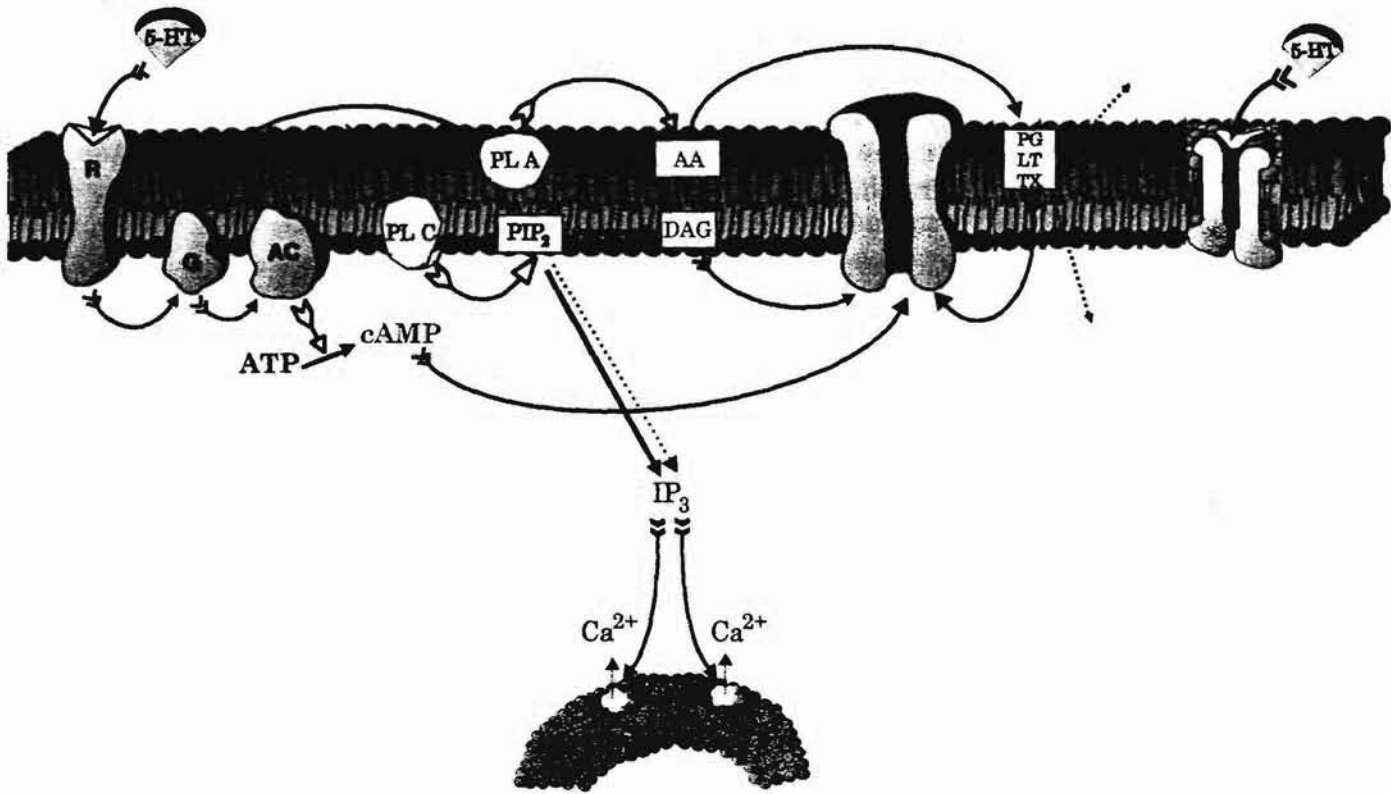
Apkopojot literatūras datus, var secināt, ka serotonīna daudzveidīgā iedarbība tiek panākta, serotonīnam saistoties pie dažādu veidu serotonīna receptoriem. Šobrīd izdala septiņus serotonīna receptoru tipus, kuri apvieno strukturāli un funkcionāli līdzīgus serotonīna receptorus. Daži no šiem receptoru tipiem ( 5-HT<sub>1</sub>; 5-HT<sub>2</sub>; 5-HT<sub>5</sub> ) tiek vēl iedalīti apakštipos, kur tipa robežās tie savstarpēji atšķiras ar signāla transdukcijas mehānismiem.

Lielākā daļa serotonīna receptoru ir ar G-proteīniem (GTP saistošajiem proteīniem, kuri ir vairāku apakštipu) saistītie receptori, kuru aktivācijas rezultātā šūnā tiek aizsāktas kaskādes reakcijas ar vairāku sekundāro starpnieku līdzdalību. Šos ar G-proteīniem saistītos receptorus nosacīti var iedalīt divās grupās: 1) receptori, kuri aktivē vai inhibē adenilciklāzi un regulē cAMP koncentrāciju šūnā; 2) receptori, kuri saistīti ar fosfolipāzi C un stimulē inozitolfosfāta metabolismu (Julius, 1991; Boess & Martin, 1994; 3. att.).

Serotonīns var iedarboties uz šūnas funkcionālo stāvokli, izmainot jonu kanālu funkcionālo aktivitāti šūnas membrānā. 5-HT<sub>3</sub> receptoriem ir pentamēra struktūra, kur četru transmembranālo un viena ekstracelulārā segmentu sakārtojums veido kanālu. Piesaistoties serotonīnam pie šāda liganda vadītā jonu kanāla receptorās apakšvienības, tas kļūst joncaurlaidīgs (Cooper et al., 1996).

Literatūrā var atrast arī norādes, ka serotonīna iedarbība realizējas, mediējot membrānas fosfolipīdu šķelšanu un arahidonskābes metabolismu (Garcia & Kim, 1997). Šāda veida serotonīna iedarbība ir definēta arī atsevišķās molusku sugās, kā piemēram, *Aplysia* un *Helisoma* neuro-muskulārajās sistēmās (Piomelli et., 1997). Ir zināms, ka žurkas gliomas šūnās serotonīns saistās pie 5-HT<sub>2A</sub> receptoriem un aktivē fosfolipāzi C, kā arī fosfolipāzi A, tādējādi aktivējot vairākas sekundāro

starpnieku sistēmas šūnā, gan tās, kuras saistītas ar inozitoltrifosfāta metabolismu, gan arī ar arahidonskābes metabolismu (Garcia & Kim, 1997).



- |        |                          |        |                        |
|--------|--------------------------|--------|------------------------|
| —————> | - bioķīmiska pārvērtība  | »————> | - fermentatīva ietekme |
| .....> | - telpiska pārvietošanās | »————> | - regulatora ietekme   |

2. att. **Serotonīna signāla transdukcijas mehānismu shematiskais attēlojums.**

Serotonīnam saistoties pie specifiskajiem receptoriem, var tikt aktivētas vairākas sekundāro starpnieku sistēmas: 1) **ciklisko nukleotīdu sistēma**. Aktivētais receptors saistās ar G-proteīnu un stimulējoši vai inhibējoši ietekmē enzīmu - adenilciclāzi (AC). AC fermentatīvi veicina cikliskā adenozinmonofosfāta (cAMP) veidošanos no adenozintrifosfāta (ATP). cAMP difundē šūnā un šeit aktivē enzīmus - proteīnkināzes, kuras savkārt veic funkcionālo proteīnu fosforilēšanu, un tādejādi ļauj izpausties serotonīna regulatorai ietekmei; 2) **PIP<sub>2</sub> metabolītu sistēma**. Aktivētais receptors saistās ar G-proteīnu un aktivē šūnas membrānā esošo enzīmu - fosfolipāzi C (PL C). PL C sekmē šūnas membrānas fosfolipīda - fosfaditilinozindifosfāta (PIP<sub>2</sub>) šķelšanu inozitoltrifosfātā (IP<sub>3</sub>) un diacilglicerolā (DAG). IP<sub>3</sub> difundē citoplazmā, kur aktivē Ca<sup>2+</sup> izdalīšanos no IP<sub>3</sub> - sensitīvajām Ca<sup>2+</sup> krātuvēm. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> pieaugums aktivē proteīnkināzes, kuras veic funkcionālo proteīnu fosforilēšanu. Otrs PIP<sub>2</sub> šķelšanās rezultātā izveidojies šķelšanas produkts - DAG - paliek šūnas membrānā, un šeit aktivē enzīmus - proteīnkināzes, kuras savkārt veic funkcionālo proteīnu fosforilēšanu; 3) **arahidonskābes metabolītu sistēma**. Aktivētais receptors saistās ar G-proteīnu un aktivē enzīmu - fosfolipāzi A (PL A), kura, savkārt, aktivē membrānas taukskābes - arahidonskābes (AA) - metabolismu. AA metabolīti - prostaglandīni (PG), leukotriēni (LT) un tromboksāni (TX), var aktivēt sekundāro starpnieku mehānismus gan šūnas membrānā, gan difundēt citoplazmā



un tur ietekmēt šūnas funkcijas regulējošos mehānismus, vai arī difundēt šūnstarpu šķidrumā; 4) **brīvo  $Ca^{2+}$  jonu koncentrācijas izmaiņas**. Serotonīns var piesaistīties arī pie ligandu vadītājiem jonu kanālu receptoriem. Serotonīnam saistoties pie kanāla receptorās apakšvienības, mainās kanāla telpiskā struktūra un kanāls kļūst joncaurlaidīgs.

### 1.5.2. FMRF-amīda neurofizioloģija

FMRF-amīds ir endogēnais neuropeptīds, kurš šī gadsimta 70-tajos gados pirmo reizi tika atklāts sauszemes gliemeža *Helix aspersa* nervu sistēmā (pēc Kupfermann, 1991). FMRF-amīda klātbūtne šobrīd ir zināma arī vairākās mugurkaulnieku sugās, tai skaitā arī cilvēka nervu sistēmā. FMRF-amīdu un FaRPs (no angl. *FMRF-amide related peptides*) saimes peptīdus saturošie neironi zīdītājiem galvenokārt ir identificēti galvas un muguras smadzeņu, kā arī gastro-intestiālā trakta neurosekretorajās šūnās (Kubben et al., 1986; Majane et al., 1988; Raffa, 1991).

Atšķirībā no serotonīna, kura iedarbība gan mugurkaulnieku, gan bezmugurkaulnieku organismos ir ļoti plaši pētīta, FMRF-amīda iedarbība ir salīdzinoši neizpētīta un varētu būt zinātnes nākotnes pētījumu objekts.

FMRF-amīda klātbūtne ir pierādīta vairākās molusku sugās, kā piemēram, *Aplysia californica* cerebrālā un abdominālā ganglija neironos (Taussig et al., 1989; Kupfermann, 1991), *Lymnaea stagnalis* cerebrālajā ganglijā (Brussaard et al., 1989), *Helix aspersa* un *Helix pomatia* taustekļu motoneironos (Bewick et al., 1990; Cottrell et al., 1992; Falconer et al., 1993; Fuss, 1997), kā arī kalmāra *Loligo pealei* cerebrālajā ganglijā (Chin et al., 1994). Vairumā molusku neuro-muskulārajās sistēmās FMRF-amīds ir definēts, kā aktivējošais transmitters, kurš var uzrādīt gan mediatora, gan modulatora aktivitāti. Pie tam, FMRF-amīda un kontrakcijas izsaucošā mediatora - acetilholīna - izdalīšanās notiek no vieniem un tiem pašiem motoneironiem.

FMRF-amīda klātbūtne ir pierādīta arī medicīniskās dēles ķermeņa sienas motoneironos, kur peptīda izdalīšanās ir toniska (Norris & Calabrese, 1987). Pēc autoru domām, FMRF-amīds šai neuro-muskulārajā sistēmā veic divējādas funkcijas: FMRF-amīda vāja izdalīšanās nelielās devās nodrošina toniskas muskuļu kontrakcijas, taču palielināta FMRF-amīda izdalīšanās pastiprina acetilholīna izraisītās kontrakcijas, jo, iespējams, FMRF-amīds novērš acetilholīna receptoro

struktūru desensitizāciju vai arī ierobežo acetilholīna krājumu izsīkšanu presinaptiskajā neironā.

Dažādās uzvedības reakcijās, kā piemēram, aizsargreakcijās, barības uzņemšanas, pārošanās u.c., kad dažādas muskuļu grupas ir atšķirīgi noslogotas, šāda vairāku transmieteru vienlaicīga izdalīšanās no viena motoneirona, acīmredzot, sekmē muskuļa pielāgošanos dažādām slodzēm ar maksimālu efektivitāti. Šāda vairāku ko-transmieteru izdalīšanās no viena neirona ir īpaši raksturīga tieši bezmugurkaulnieku neuro-muskulārajās sistēmās.

Literatūrā ir atrodamas vairākas norādes par FMRF-amīda signāltransdukcijas mehānismiem. Ir zināms, ka FMRF-amīda iedarbība realizējas, tam saistoies pie specifiskajiem receptoriem (Gayton, 1984; Payza, 1987; Chin et al., 1994). Līdzīgi kā vairums peptīdu dabas neurotransmiteri, arī FMRF-amīds saistās pie ar G-proteīnu saistītajiem receptoriem. Vairāku autoru pētījumu rezultāti liecina, ka FMRF-amīds spēj aktivēt inozitoltrifosfāta sekundāro starpnieku sistēmu un  $Ca^{2+}$  izdalīšanos no  $IP_3$ -sensitīvajām iekššūnas krātuvēm (Falconer et al., 1993; Nelson & Huddart, 1994), vai arī membrānas fosfolipīdu šķelšanu un arahidonskābes metabolismu (Taussig et al., 1989; Shi & Belardetti, 1991).

### ***Pētījuma mērķis un uzdevumi***

Promociju darba pētījumu mērķis bija: *noskaidrot gliemeža Helix pomatia neirālās vadības mehānismus taustekļa neuro-muskulārajā sistēmā.*

Šī mērķa sasniegšanai tika izvirzīti sekojoši darba uzdevumi:

- noskaidrot gliemeža *Helix pomatia* taustekļa muskulatūru inervējošo kustību nervu precīzu topogrāfisko izvietojumu tausteklī un taustekļa kustību raksturu atkarībā no nervu kairinājuma;
- noskaidrot taustekļa muskuļa un to inervējošo motoneironu sinapšu raksturu;
- noskaidrot serotonīna un FMRF-amīda darbības izraisītos efektus uz taustekļa muskuļu kontrakcijām;
- noskaidrot serotonīna ietekmju izraisītos molekulāros mehānismus taustekļa muskuļa šūnās.

## 2. MATERIĀLS un METODEDES

### 2.1. Dzīvnieki un to turēšana

Visos eksperimentos tika izmantoti funkcionāli nobrieduši vīngliemeži *Helix pomatia* ar čaulas diametru 3.5 - 4.5 cm un masu 15 - 25 g. Gliemeži tika ievākti Maincas piepilsētas neizmantojamās platībās, kuru veģitācijā dominēja lapu koki un krūmi, kā arī lakstaugi.

Ievāktie dzīvnieki tika ievietoti plastmasas kastēs (augstums x garums x platums: 20 x 40 x 25 cm) pa 10 - 15 dzīvniekiem katrā. Kā mitrumu uzturošs kastes pamatnes segums tika izmantota smilšaina augsne. Dzīvnieku barošanai tika izmantoti lapu salāti vai dārza gurķi. Šādi izvietoti dzīvnieki tika turēti labi vēdināmā telpā pie temperatūras 18<sup>o</sup> - 20<sup>o</sup> C līdz eksperimentam.

### 2.2. Nervu - muskuļa preparāta pagatavošana

Visi eksperimenti tika veikti ar izolētiem nervu-muskuļa preparātiem. Katrs preparāts sastāvēja no iekšējā un ārējā tautekļa nerva un gliemeža acu taustekļa. Gliemeža ķermeņa dobumā tika injicēts sukcinilholīna šķīdums (0.5% sukcinilholīns izšķīdināts 60mM MgCl<sub>2</sub> šķīdumā) 0.01 ml/g ķermeņa masas; pēc Balaban & Maksimova, 1993). Dzīvniekam esot pilnīgi relaksētā stāvoklī iekšējo orgānu maiss kopā ar čaulu zem mantijas malas tika nogriezts. Gliemeža pēdas nodalījums ar tam pieguļošajiem orgāniem tika ievietots Petri trauciņā, kura pamatne bija klāta ar silikona slāni, ļaujot ērti fiksēt preparātu ar lielajām fiksācijas adatām (Ø 0.4 mm). Preparāts tika fiksēts tā, lai no griezuma izveidojusies atvere ķermeņa dobumā atrastos preparāta virspusē. Veicot tālāko preparēšanu, preparāts pastāvīgi atradās paaugstinātas Mg<sup>2+</sup> koncentrācijas Ringera šķīdumā (1.tab.), tādējādi samazinot nervu šūnu aktivitāti preparēšanas laikā (Straub, 1995). Caur atveri ķermeņa dobumā ar diviem gareniskai asij paralēliem griezumiem līdz lūpu taustekļiem tika pārgriezta āda. Lai atvieglotu tālāko preparēšanas gaitu, āda tika pavilkta uz priekšu un ar adatu fiksēta Petri trauciņa silikona slānī. Tālākajā preparēšanas gaitā tika izgriezti cerebrālo gangliju un iekšējo orgānu maisa gangliju kompleksu nosedzošie dzimumsistēmas orgāni un

zarna. Barības vads ar tai pieguļošo bukālo masu tika izvilkti zem cerebrālā ganglija komisūras un iekšējo orgānu maisa gangliju kompleksu uz priekšu (lai tos nogriežot nepārgrieztu zem tiem esošos taustekļa nervus) un norgiezi. Lai izolētu iekšējo orgānu maisa gangliju kompleksu un cerebrālo gangliju kopā ar taustekļiem no atlikušās ķermeņa daļas, tika pārgriezti iekšējo orgānu maisa gangliju kompleksu un ķermeņa pēdu savienojošie nervi. Kā pēdējie tika pārgriezti no cerebrālā un bukālā ganglija uz ķermeņa pēdu atejošie nervu konektīvi un brīvi caur ķermeņa dobumu ejošie lūpu nervi.

legūtais preparāts, kuru veidoja iekšējo orgānu maisa gangliju kompleksss un cerebrālo gangliju pāris kopā ar abiem acu taustekļiem, tika pārlikts citā, ar paaugstinātas koncentrācijas  $Mg^{2+}$  -Ringeru pildītā Petri trauciņā tālākai mikropreparēšanai. Ar mazajām fiksācijas adatām ( $\varnothing$  0.01 mm) preparāts izplestā stāvoklī ar ventrālo pusi uz augšu tika fiksēts Petri trauciņā. Starp cerebrālo gangliju un taustekļu pamatni esošie saistaudi tika nogriezti. Tāpat no saistaudiem tika atbrīvoti iekšējais un ārējais taustekļa nervs. Nervu retrogrādās krāsošanas gadījumā saistaudi no nerviem tika atbrīvoti iespējami tālu līdz nervu ieejai taustekļa muskulatūrā vai cerebrālajā ganglijā. Atkarībā no eksperimenta, kādā tika izmantots preparāts (anatomiskais vai elektrofizioloģiskais pētījums), nervi vajadzīgajā garumā tika pārgriezti starp cerebrālo gangliju un taustekli.

## **2.3. Anatomiskie pētījumi**

### **2.3.1. Nervu šķiedru retrogrādā krāsošana**

Retrogrādās krāsošanas metode ar smago metālu  $Co^{2+}$  vai  $Ni^{2+}$  joniem pieļauj identificēt taustekli inervējošo nervu šķiedru precīzu izvietojumu taustekļa muskulatūrā. Anatomiskajiem pētījumiem tika ņemti tikko preparēti taustekļa nervu (iekšējā un ārējā) - taustekļa muskuļa preparāti. Izolētais preparāts pie taustekļa galotnes un pamatnes tika nostiprināts Petri trauciņā, kurš pildīts ar standarta Ringera šķīdumu. Ringerī brīvi peldošie taustekļa nervu gali katrs tika ievietots elastīgā plastikas kapilārā, kura diametrs ( $\varnothing$  0.3 - 0.4 mm) līdzinājās nerva diametram. Kapilārs, ar tajā esošo nervu, tika

uzpildīts ar 1.0 M  $\text{CoCl}_2$  vai  $\text{NiCl}_2$  šķīdumu un 36 - 48 stundas atstāts  $4^\circ \text{C}$  temperatūrā, ļaujot joniem difundēt nervu šķiedrās.

### **2.3.2. Krāsu reakcijas ar smagajiem metāliem**

Sagatavojot preparātu krāsoto struktūru attīstīšanai, taustekļa nervi pie to ieejas kapilārā, tika rūpīgi nogriezti. Lai attīstītu nokrāsotās nervu šķiedras, Petri trauciņā, kurā atradās sagatavotais preparāts, tika iepilināti daži pilieni rubīnskābes šķīduma (piesātināts ditiookiamīda šķīdums 96% etanolā). Jonu specifiskās krāsu reakcijas rezultātā ar niķeļa joniem krāsotās nervu šķiedru struktūras uzrāda zilu krāsu, bet ar kobalta joniem krāsotās struktūras - oranžu krāsu (Quicke & Brace, 1979).

Ar smagajiem metāliem krāsotās struktūras ir iespējams attīstīt arī ar  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  šķīdumu. Šādas krāsu reakcijas gadījumā krāsotās struktūras veido melnu krāsu kompleksu, kurš ļauj izšķirt taustekļa galotnē esošās vissīkākās nervu šķiedras. Vāji nokrāsotiem preparātiem ir iespējams veikt krāsas pastiprināšanu ar sudrabu pēc Crolla aprakstītās metodes (Croll, 1986).

### **2.3.3. Preparāta sagatavošana mikroskopēšanai**

Lai krāsoto preparātu sagatavotu mikroskopēšanai un ilgstošai uzglabāšanai ar pēc iespējas labām optiskām īpašībām, bija nepieciešama preparāta papildus apstrāde. Krāsoto audu paraugs tika 2 stundas fiksēts 4% formaldehīda šķīdumā, vēlāk dehidratēts pieaugošas koncentrācijas etanola šķīdumos (50% šķīdumā - 2 stundas, 70% un 90% - 1 stundu, 95% un 100% - 0.5 stundu), un beigās skaidrināts un atstāts uzglabāšanā metilsalicilāta šķīdumā. Metilsalicilāta gaismas laušanas koeficients ir līdzīgs šādi sagatavotu audu gaismas laušanas spējai, tādēļ apskatot audus mikroskopā, tie šķiet pilnīgi caurspīdīgi un ir saskatāmas tikai nokrāsotās struktūras. Šādi sagatavotajos preparātos ar gaismas mikroskopa (Jena-Med 2, Carl Zeiss, Jena) palīdzību tika pētīts iekšējā un ārējā taustekļa nerva izvietojums taustekļa muskulī un labākie izvēlētie preparāti tika dokumentēti ar fotomikroskopu 125x palielinājumā (Nikon Optiphort).

## 2.4. Elektrofizioloģiskie pētījumi

### 2.4.1. Ar elektrisku kairinājumu izsauktās muskuļu kontrakcijas

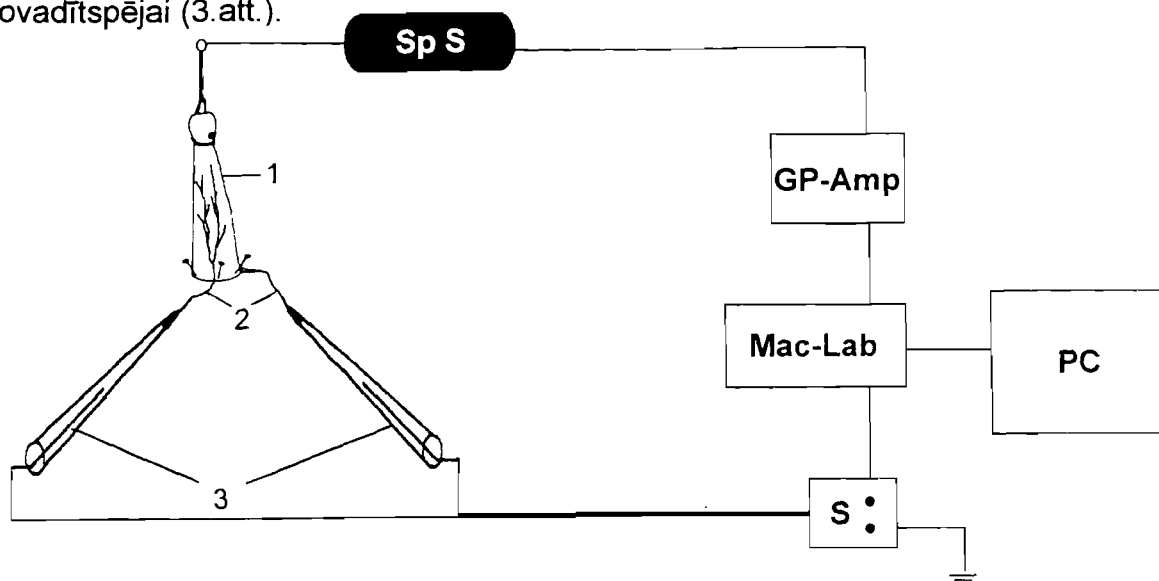
Veicot eksperimentus, kuros taustekļa muskuļa kontrakcijas tika izraisītas lietojot elektrisku kairinājumu, tika izmantots aparatūras slēgums, kāds parādīts 3.att. Izolētais preparāts tika nostiprināts pie taustekļa pamatnes eksperimentiem speciāli veidotā kamerā ar abpusēju caurteci Ringera un citu eksperimentos lietoto šķīdumu ērtai izskalošanai. Caur taustekļa galotnes smailes epiteliālo un saistaudu slāni, neskarot muskuļaudus, tika izvilktis smalks diegs, kurš savienoja taustekli ar jūtīgu spēka sensoru (izšķiršanas spēja - 2 spēka mg x m/s<sup>2</sup>). Sensors tika nostiprināts statīvā un tā svira tika novietota perpendikulāri attiecībā pret taustekļa garensiko asi. Ar sensoru uztvertās muskuļa kontrakcijas caur MacLab-4s analog-digitālo pārveidotāju (A/D Instruments) tika reģistrētas ar datoru (Macintosh, 6100/60 Power PC), kur dati tika uzglabāti un ar atbilstošām datu apstrādes programmām (Chart v 3.5/s, Scope v3.5/s, ADI; Igor 1.1, Wavemetrics) tālāk apstrādāti un analizēti.

Elektriskais kairinājums (3 taisnstūra impulsu kopa; frekvence 5 Hz; kairinājuma stiprums: 0.5 - 2.5 V; kairinājuma ilgums - 0.5 ms) tika panākts dodot impulsu ar datora palīdzību, un kurš caur MacLab-4s pārveidotāju tika novadīts līdz kairinātājelektrodam. Kairinājuma stiprums tika izvēlēts tā, lai muskuļa kontrakcija būtu 75 - 80% no maksimālās kontrakcijas. Intervāls starp kairinājumiem ikreiz bija 90 s.

Elektriski izsauktās taustekļa muskuļa kontrakcijas tika iegūtas divos veidos: 1) kairinot taustekļa nervus vai 2) tieši kairinot taustekļa muskuli.

**Taustekļa nervu elektrisks kairinājums.** Lai elektriski kairinātu taustekļa nervus, pie taustekļa pamatnes Ringera šķīdumā brīvi peldošie abi - iekšējais un ārējais taustekļa nervs, ar šjirces palīdzību katrs tika iesūkts smalkā plastikas kapilārā, kura diametrs bija nedaudz lielāks (0.7 - 0.8 mm) par nerva diametru. Šādā veidā fiksētu nervu bija iespējams kairināt ar caur kapilāra brīvajā galā ievietotu sudraba elektrodu (Ø 0.01 mm). Elektrods tika novietots kapilārā tā, lai tam nebūtu tieša kontakta ar nervu, tādejādi nerva

kairinājums tika panākts, pateicoties Ringera šķīduma augstai elektrovadītspējai (3.att.).



**3. att. Shematisks eksperimentu aparātūras attēlojums.** Šāds aparātūras slēgums tika izmantots taustekļa muskuļa kontrakciju ieguvei, elektriski kairinot abus taustekļa kustību nervus. Apzīmējumi: 1- tausteklis; 2 - taustekļa kustību nervi; 3- plastikas kapilāri, kuros ievietoti elektrodi nervu kairināšanai; Sp S- spēka sensors; GP-Amp- signālpastiprinātājs; Mac-Lab- signālpārveidotājs; PC- dators; S- slēdzis.

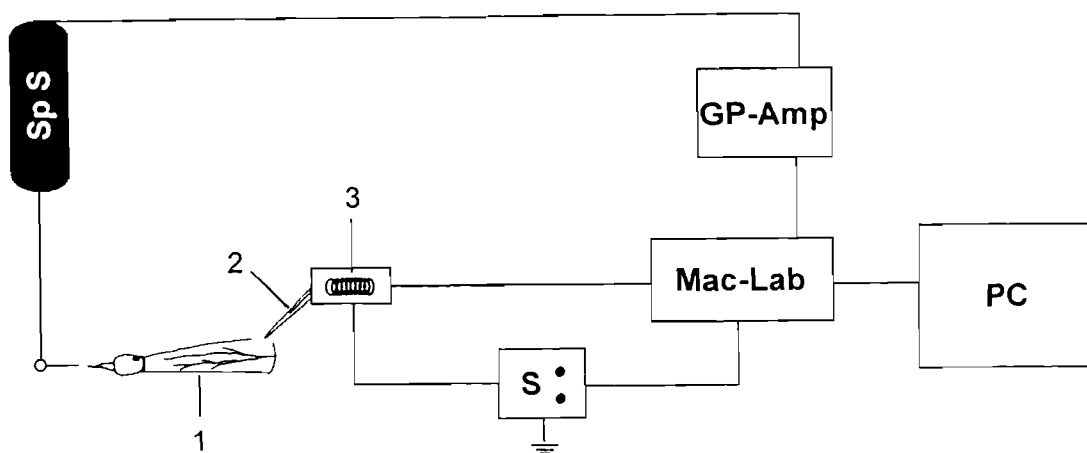
**Taustekļa muskuļa elektrisks kairinājums.** Tiešs taustekļa muskuļa kairinājums tika panākts, uzliekot riņķveida sudraba elektrodu tausteklī tā, lai elektrods noslēgta apļa veidā apņemtu taustekli un cieši piegulētu tā pamatnei. Lai izvairītos no iespējamā taustekļa nervu kairinājuma šādi tieši kairinot muskuli, eksperimenti tika veikti, vispirms izslēdzot acetilholīna receptoru darbību, bloķējot tos ar d-tubokurariņu.

#### 2.4.2. Ar ķīmiskajām vielām izsuktās taustekļa muskuļa kontrakcijas

Vairākās eksperimentu sērijās taustekļa muskuļa kontrakcijas tika iegūtas, tieši iedarbojoties uz muskuli ar acetilholīnu vai kofeīnu. Šādu eksperimentu norisei tika izmantots aparātūras saslēgums, kāds parādīts 4.att.

Izolētais muskuļa preparāts (bez taustekļa nerviem) horizontālā stāvoklī pie pamatnes tika nostiprināts speciāli veidotā eksperimenta kamerā. Līdzīgi kā eksperimentos ar elektriski izsuktajām muskuļa kontrakcijām, caur taustekļa galotni tika izvilks smalks diegs, kurš savienots ar

perpendikulāri pret taustekļa asi orientētu spēka sensora sviru. Ar sensoru uztvertās muskuļa kontrakcijas caur MacLab-4s analog-digitalo pārveidotāju tika reģistrētas ar datoru, kurā dati tika uzglabāti tālākai apstrādei.



4. att. **Shematisks eksperimentu aparātūras attēlojums.** Šāds aparātūras slēgums tika izmantots taustekļa muskuļa kontrakciju ieguvei ar ķīmiskām vielām. Apzīmējumi: 1- tausteklis; 2- adata, caur kuru kontrakciju izsaucošā viela tika pievadīta taustekļa muskulim; 3- virzulis, ar kura palīdzību adatā automātiski tika ievadīta kontrakciju izsaucošā viela; Sp S- spēka sensors; GP-Amp- signālpastiprinātājs; Mac-Lab- signālpārveidotājs; PC- dators; S- slēdzis.

Kontrakciju izsaucošā viela caur statīvā nostiprinātu adatu (1) 0.5 sekundēs tika ievadīta kamerā esošajā šķidrumā pie taustekļa pamatnes. Divas atveres kameras pretējās malās ļāva uzturēt kamerā caurteces plūsmu vielu aizskalošanai. Kamerā esošā šķidruma plūsmas ātrums bija 10 ml/min, un tas bija optimāls, lai aizskalotu ievadīto vielu, ļaujot tai tikai īsa impulsa veidā iedarboties uz taustekļa muskulatūru un izsaukt kontrakciju, kura pēc saviem parametriem līdzinājās elektriskā kairinājumā ceļā iegūtajām kontrakcijām.

### 2.4.3. Fizioloģiskais tests taustekļa kontrakciju virziena noteišanai

Lai kvalitatīvi novērtētu, kā taustekļa nervu aktivitāte ietekmē taustekļa kustību virzienu, izolēts nervu - muskuļa preparāts tika nostiprināts pie taustekļa pamatnes Petri trauciņā, kurš bija pildīts ar normāla Ringera šķīdumu. Bez atsvara izolēta taustekļa kontrakcija atslāba ļoti lēnu, pie tam



kontrakcijai atslābstot, tausteklis ne vienmēr atgriezās izejas stāvoklī. Lai no tā izvairītos, telpa taustekļa iekšpusē tika uzpildīta ar gaisu, lai pēc kontrakcijas tausteklis saglabātu celtspēju un atgrieztos izejas stāvoklī. Taustekļa nervu kairinājums tika panākts, tos elektriski kairinot ar Firmas HSE stimulatoru P. Izsaukto kontrakciju laikā taustekļa kustību virziens tika noteikts optiski. Taustekļa kontrakcijas tika iegūtas gan kairinot katru taustekļa nervu atsevišķi, gan abus nervus vienlaicīgi.

## 2.5. Pētījumā izmantotās vielas

Visas pētījumā izmantās vielas bija pasūtītas firmās SIGMA vai RBI. Kā fizioloģiskais šķīdums eksperimentos tika izmantots *Ringera* šķīdums, kurš tika pagatavots sekojošās vielu attiecībās:

### 1. tabula. Darbā izmantoto Ringera šķīdumu ķīmiskais sastāvs.

	<b>Helix -Ringers</b> standarta šķīdums (Straub, 1995)	<b>Mg 2+ - Ringers</b> (Straub, 1995)
<b>NaCl</b>	100 mM = 5,84 g/l	62,5 mM = 3,65 g/l
<b>KCl</b>	4 mM = 0,30 g/l	4 mM = 0,30 g/l
<b>MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O</b>	5 mM = 1,02 g/l	30 mM = 5,10 g/l
<b>CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O</b>	7 mM = 1,03 g/l	7 mM = 1,03 g/l
<b>Tris</b>	5mM = 0,61 g/l	5 mM = 0,61 g/l

pH (HCl): 7,5

Eksperimentos, kuri bija jāveic no bezkalcijs vidē, tika izmantots sekojoša sastāva Ringera šķīdums:

<b>NaCl</b>	100 mM = 5,84 g/l
<b>KCl</b>	4 mM = 0,30 g/l
<b>MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O</b>	5 mM = 1,02 g/l
<b>Tris</b>	5 mM = 0,61 g/l
<b>EDTA*</b>	1 mM = 0,29 g/l

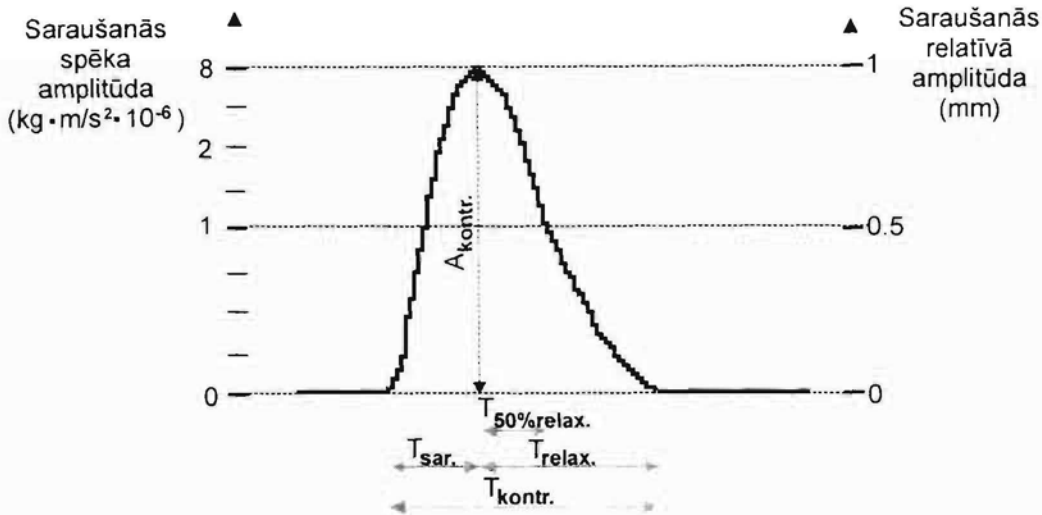
\* EDTA tika lietots, lai saistītu iespējami palikušo kalciju šķīdumā.

Visi atsevišķiem eksperimentiem nepieciešamie vielu šķīdumi vajadzīgajās koncentrācijās tika pagatavoti no pulverveida reaģentiem, lietojot augstas precizitātes analītiskos svarus (*Ohaus, Vācija*) un automātiskās pipetes (*Eppendorf PCR, Vācija*).

## 2.6. Rezultātu apstrāde un to izvērtējums.

Elektrofizioloģisko eksperimentu dati tika uzglabāti datorā, ar kura palīdzību tika veikti arī rezultātu mērījumi ar datu apstrādes programmu Chart v3.5. Tika mērīti sekojoši kontrakciju parametri (5. att.): saraušanās relatīvā amplitūda ( $A_{kontr.}$ ) un laiks, kurā kontrakcija atslābstot sasniedz pusi no maksimālās amplitūdas ( $T_{50\%relax.}$ ).

Datu statistiskā apstrāde un analīze tika veikta ar Macintosh un IBM datoru, izmantojot statistisko datu apstrādes programmu Exel un Statistic. Rezultātu būtiskuma līmenis tika novērtēts pēc Stjūdena kritērija. Atšķirības tika uzskatītas par būtiskām, ja  $p < 0,05$ .



**5. att. Atsevišķas taustekļa muskuļa kontrakcijas analīze.** Rezultātu izvērtējumam tika izmatota kontrakciju amplitūda  $A_{kontr.}$  un ilgums  $T_{50\%relax.}$ . Lai būtu iespējams izmērīt  $T_{50\%relax.}$ , vispirms bija nepieciešams uzzināt kopējo kontrakcijas ilgumu  $T_{kontr.}$  un kontrakcijas atslābšanas ilgumu  $T_{relax.}$  (attēlā - $T_{sar.}$  - kontrakcijas saraušanās fāzes ilgums).

### 3. REZULTĀTI

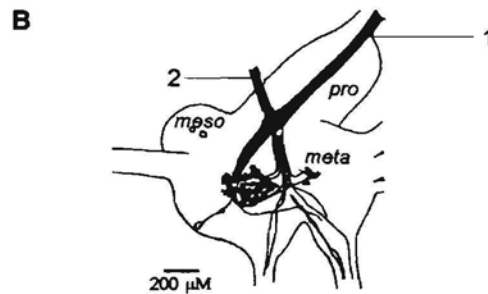
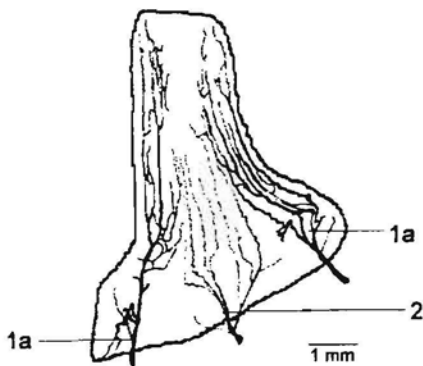
#### 3.1. Taustekļu motorā inervācija.

##### 3.1.1. Anatomiskie pētījumi.

Lai noteiktu motoro nervu topogrāfisko izvietojumu taustekļa muskulī, kā arī šo nervu izejas vietu no cerebrālā ganglija, tika veikta nervu retrogrādā krāsošana ar kobalta vai niķeļa joniem. Smago metālu specifiskā krāsu reakcija ar rubīnskābi deva iespēju noteikt iekšējā un ārējā taustekļa nerva - *nervus peritentacularis internus & externus*, izvietojumu muskulī un to izejas vietu no cerebrālā ganglija.

##### 3.1.1.1. Nervu izejas vietas no cerebrālā ganglija noteikšana.

Lai noteiktu iekšējā un ārējā taustekļa nervu izejas vietu no cerebrālā ganglija, abi nervi netālu (5 mm attālumā) no to izejas no cerebrālā ganglija tika pārgriezti un virzienā uz cerebrālo gangliju caur plastikas kapilāriem uzpildīti ar  $\text{CoCl}_2$  vai  $\text{NiCl}_2$  šķīdumu. Metāla jonu difūzijas un specifiskas krāsu reakcijas rezultātā ir iespējams izsekot krāsoto nervu makroskopiskam izvietojumam cerebrālajā ganglijā. Sekojot nervu izvietojumam ganglijā (6. att.), redzams, ka abu nervu izejas vieta no cerebrālā ganglija *metacerebrālās*



6 att. *Helix pomatia* acu taustekļa motorā inervācija: A - taustekļa nervu topogrāfija muskulī; B - taustekļa nervu topogrāfija cerebrālajā ganglijā; 1 - ārējais taustekļa nervs; 1a - ārējā taustekļa nerva šķiedra; 2 - iekšējais taustekļa nervs; *meso* - cerebrālā ganglija mezocerebrālā daļa; *pro* - cerebrālā ganglija procerebrālā daļa; *meta* - cerebrālā ganglija metacerebrālā daļa.

daļas ir nedaudz neskaidra. Tas ir izskaidrojams ar to, ka daļa nervus veidojošo neironu atrodas ne tikai *metacerebrālajā*, bet arī *pro-* un *mezocerebrālajā* ganglija daļā, un to aksoni neveido vienu izteiktu kopā saiešanas vietu, bet gan pievienojas nervam atšķirīgās vietās tā garumā cerebrālā ganglija robežās (vairums aksonu gan saiet kopā tieši *metacerebrālajā* daļā). Šādi krāsojot nervus ar metāla joniem, nav iespējams izsekot atsevišķo neironu lokalizācijai cerebrālajā ganglijā, taču ir saskatāma tikai tā vieta cerebrālajā ganglijā, kur kopā saplūst vairums neironu izaugumu, kuri veido nervus.

Taustekļa nervi iziet no ganglija ventrālās puses *metacerebrālās* daļas kā divi labi izteikti nervu zari, kas 2.5 - 3 mm attālumā no to izejas vietas uz robežas starp ganglija *pro-* un *metacerebrālo* daļu daļēji savienojas. Daļai nervu šūnu izaugumu krustojoties, atkal sadalās labi izteiktā iekšējā un ārējā taustekļa nervā. Ārējais taustekļa nervs šķērso ganglija *procerebrālo* daļu. Šeit taustekļa nervs iet paralēli sensorajam ožas nervam (*n. olfactorius*; attēlā nav speciāli krāsots, bet ir vāji saskatāmas tā ārējās kontūras), un ganglija *procerebrālās* daļas augšpusē iziet no cerebrālā ganglija. Iekšējais taustekļa nervs, pēc sazarošanās ar ārējo nervu, virzās pa *procerebrālās* daļas iekšpusi, kur arī iziet no cerebrālā ganglija.

### 3.1.1.2. Nervu topogrāfija taustekļa muskulī.

Kustību nervu telpiskā izvietojuma noteikšanai taustekļa muskulī, abi taustekļa nervi caur plastikas kapilāriem tika uzpildīti ar smago metālu hlorīda šķīdumiem: ārējais taustekļa nervs ar  $\text{NiCl}_2$  šķīdumu, iekšējais - ar  $\text{CoCl}_2$  šķīdumu. Lai atvieglotu mikroskopēšanu un nervus varētu apskatīt plāknē, tausteklis tā gareniskās ass virzienā no taustekļa pamatnes uz galotni tika pārgriezts un izplests. Specifiskās krāsu reakcijas rezultātā ārējais nervs ir nokrāsojies tumši zilā, bet iekšējais - oranžā krāsā. Redzams, ka vēl pirms nerva ieejas taustekļa muskulī ārējais taustekļa nervs sadalījies divos aptuveni vienāda diametra zaros, kur viens no tiem pie pamatnes ieiet taustekļa anterolaterālajā, bet otrs - posterolaterālajā apvidū. Iekšējais

taustekļa nervs attiecīgi ieiet tausteklī pie pamatnes tā mediālajā daļā. Apskatot nervu izvietojumu plaknē, ārējā taustekļa nerva zarošanās dēļ, tausteklī ir saskatāmi trīs aptuveni vienāda diametra nervu zari.

Abi nervi pie taustekļa pamatnes sazarojas daudzos sīkos sānu zariņos, kur daži no tiem virzās horizontāli un inervē taustekļa pamatnē esošo kolumelāro muskuli. Taču vairums nervu sānu zariņi virzās gareniskās ass virzienā uz taustekļa galotni, pie tam, abu nervu sadalījušies zariņi virzās paralēli, nekrustojoties, gandrīz līdz pašai galotnei.

### 3.1.2. Kustību nervu loma taustekļa kustībās

Lai noteiktu taustekļa kustību atkarību no nervu *n. peritenticularis int.* un *ext.* aktivitātes, elektriski tika kairināti abi taustekļa nervi, un taustekļa kustību virziens kontrakciju laikā tika kvalitatīvi izvērtēts. Pie tam, šajos eksperimentos tausteklī netika pievienots atsvars, ļaujot tam brīvi noliekties nervu elektriskā kairinājuma ietekmē. Pēc nervu kairinājuma, taustekļa muskuļiem saraujoties, pats tausteklis nesaliecās un vienmēr palika taisns, taču bija vērojama taustekļa noliekšanās, izmainoties gareniskās ass leņķim attiecībā pret gliemeža galvu (4.att.), kā tas arī ir novērots dabā, gliemežim kustinot taustekļus (skt. Diskusiju).

Iekšējā taustekļu nerva kairinājums izsauca taustekļa kontrakciju, kura taustekli nolieca mediālā virzienā; attiecīgi ārējā taustekļa nerva kairinājums nolieca taustekli laterālā virzienā (4.att.a). Vienlaicīgi elektriski stimulējot abus nervus, tika novērota taustekļa noliekšanās taisni uz priekšu (4.att. b). Nevienā no eksperimentiem, kairinot nervu, netika novērota taustekļa kustība uz augšu.

### 3.1.3. Kopsavilkums.

Gliemeža *Helix pomatia* acu taustekļu motoro inervāciju nodrošina iekšējais un ārējais taustekļa nervi- *n. peritenticularis interna* un *externa*. Vairums šos nervus veidojošo neironu ķermeņi atrodas cerebrālā ganglija *metacerebrālajā* daļā. Ieejot taustekļa muskulī, abi nervi vairākkārt dalās, un tālāk nekrustojoties iet paralēli gareniskai asij līdz taustekļa galotnei.

Elektrisks nervu kairinājums izsauc taustekļa noliekšanos: iekšējā nerva kairinājums - mediālā virzienā, ārējā nerva kairinājums - laterālā virzienā, bet abu nervu vienlaicīgs kairinājums - izraisa taustekļa taisnu noliekšanos uz priekšu. Šādas taustekļu kustības ir novērojamas arī dabā, gliemzēm orientējoties pēc olfaktoriskās un vizuālās informācijas.

### **3.2. Neurosekrētu - *SEROTONĪNA* un *FMRF-AMĪDA* efekts uz taustekļa muskuļa kontrakcijām.**

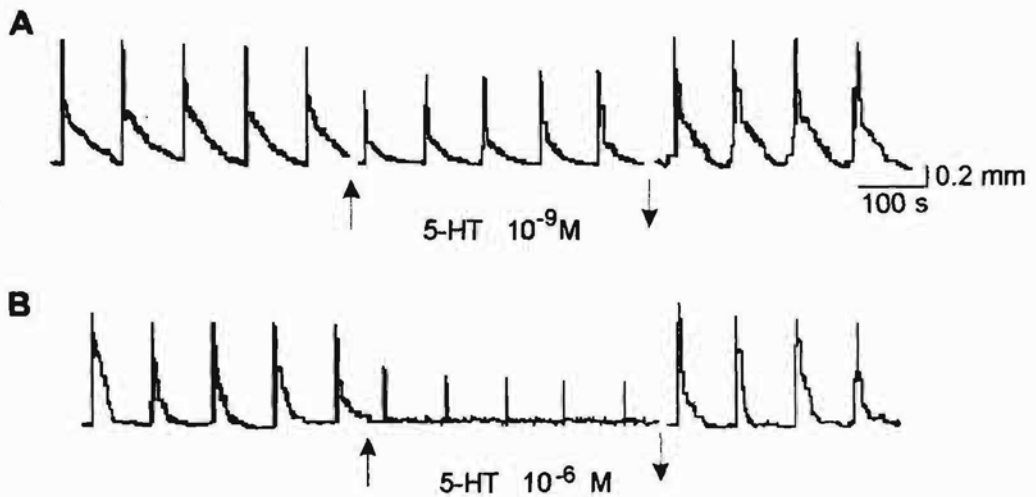
Ar imunoloģiskajām krāsošanas metodēm ir pierādīts, ka *Helix pomatia* cerebrālais ganglijs, īpaši tā *procerebrālā* daļa, satur virkni serotonergo un dažus FMRF - amīdu saturošus neironus, kuru aksoni iet taustekļa motoro nervu sastāvā (Fuss, 1997). No literatūras ir zināms, ka šiem neurosekrētiem ir modulējoša ietekme daudzu molusku neiromuskulārajās sistēmās, pie tam, to iedarbība var būt gan aktivējoša, gan inhibējoša. Mūsu interesēs bija noskaidrot, kādu ietekmi šīs bioloģiski aktīvās vielas iespējams rada uz *Helix pomatia* taustekļa muskuļa kontrakcijām, kuru tiešais izraisītājs ir nevis šīs vielas, bet gan no muskulim pienākošajiem nervgaliem izdalītais mediators - acetilholīns.

#### **3.2.1. Serotonīna efekti.**

*Helix pomatia* izolētā taustekļa nervu - muskuļa preparātā muskuļa kontrakcijas tika izraisītas, elektriski kairinot abus - iekšējo un ārējo - taustekļa nervus. Šādi iegūtu muskuļa kontrakciju izmaiņas tika novērotas dažādās koncentrācijas serotonīna klātbūtnē:  $10^{-9}$  līdz  $10^{-4}$  M. Šādu koncentrāciju serotonīna efektivitāti molusku neuro-muskulārajā sistēmā apstiprina arī vairāku autoru pētījumi (Ram et al., 1981; Ram et al., 1983; Parsons & Pinsker, 1989; Ram et al., 1994; Yeoman et al., 1995).

Kā redzams 7. att. A,  $10^{-9}$  M serotonīna šķīdumā taustekļa muskuļa kontrakciju amplitūda un ilgums samazinājās salīdzinājumā ar tām taustekļa muskuļa kontrakcijām, kuras tika iegūtas fizioloģiskajā šķīdumā bez serotonīna klātbūtnes. 1 min laikā pēc serotonīna izskalošanas muskuļa kontrakcijas pilnībā atjaunojās sākotnējā lielumā. Paaugstinot serotonīna koncentrāciju līdz  $10^{-6}$  M, serotonīna efekts uz kontrakciju aktivitāti bija vēl

izteiktāks (1.att. B.) - amplitūda samazinājās par vairāk kā pusi no kontroles lieluma, bet kontrakciju ilgums  $T_{50\%relax.}$  vēl vairāk - līdz 36% no kontroles (n=8). Serotonīna izskalošana pilnībā atjaunoja sākotnējo kontrakciju raksturu fizioloģiskajā šķīdumā.



**7.att. Serotonīna efekti uz taustekļa muskuļa kontrakcijām, ja serotonīna koncentrācija ir 10<sup>-9</sup> M (A) un 10<sup>-6</sup> M (B).**

Vairumā eksperimentu serotonīns pats (bez nervu kairinājuma) neizsauca tiešu ietekmi uz taustekļa muskuli. Taču 10 no 28 eksperimentiem serotonīnas radīja muskuļa bazālā tonusa nelielu relaksāciju (vairumā gadījumu, ja 5-HT koncentrācija bija augstāka par 10<sup>-6</sup> M).

Serotonīna efekts uz atsevišķām kontrakcijām parādīts. Apvienots kontrakciju attēlojums ļauj spriest par atsevišķu kontrakciju raksturu fizioloģiskajā šķīdumā (gaišā kontūra) un serotonīna klātbūtnē (tumšā kontūra). Salīdzinot abu kontrakciju formu, redzams, ka serotonīns visvairāk ietekmē tieši kontrakcijas relaksācijas fāzi, proti, palielina relaksācijas ātrumu, tādējādi samazinot kopējo kontrakcijas ilgumu. Lielākās serotonīna

devās šis efekts ir vēl vairāk izteikts. Devas - efekta līknes (2.att. B), rāda, ka serotonīna ietekme uz kontrakciju ilgumu (attēlā dots kā laiks, kurā kontrakcija samazinās par pusi no maksimālās amplitūdas) ir lielāka nekā uz amplitūdu. Tā piemēram, serotonīns pie koncentrācijas  $10^{-8}$  M samazināja  $T_{50\%relax}$  apmēram līdz 70% no kontroles lieluma, bet pie koncentrācijas  $10^{-6}$  M pat līdz 36%. Turpretī, kontrakciju amplitūda pie serotonīna koncentrācijas  $10^{-8}$  M praktiski neizmainījās, bet pie koncentrācijas  $10^{-6}$  M samazinājās tikai līdz 78% no kontroles lieluma. Kā rāda attēls, abām devas - efekta līknēm (gaišās līnijas) ir sigmoidāls raksturs, turklāt, amplitūdas līkne ir par vairāk kā divām kārtām nobīdīta pa kreisi salīdzinot ar ilguma līkni. Serotonīna efekta pārsvaru uz kontrakciju ilgumu rāda arī kontrakciju ilguma attiecība pret amplitūdu (3.att.C). Ja kontrakciju ilgums un amplitūda tiku ietekmēti vienādi, tad šai attiecībai  $T_{50\%relax}$  : *AMPLITŪDA* pie dažādām serotonīna koncentrācijām vajadzētu palikt konstantam skaitlim. Kā rāda 3.att. C, šī attiecība ir mainīga, un fizioloģiskā šķīdumā tās lielums ir  $5.2 \pm 0.5$ . Pie serotonīna koncentrācijas  $10^{-8}$  M tā samazinās līdz  $3.7 \pm 0.7$ , un pie serotonīna koncentrācijas  $10^{-6}$  M sasniedz savu minimumu un ir  $2.35 \pm 0.8$  (n= 28).

Pamatojoties uz iegūtajiem datiem, jāsecina, ka serotonīna dominantais efekts ir samazināt taustekļa muskuļu kontrakciju relaksācijas ātrumu. Taustekļa muskuļa kontrakciju ilguma saīsināšana gliemežim var būt īpaši nozīmīga gadījumos, kad ir nepieciešamas ātras taustekļa kustības. Relaksācijas ātruma palielināšanas nozīmi ilustrē 4.att., kurš pretstatī ar īsu laika intervālu (10 sek) izsauktas muskuļa kontrakcijas fizioloģiskajā šķīdumā (A) un serotonīna klātbūtnē (B). Kā redzams, atkārtota taustekļa muskuļa aktivēšana fizioloģiskajā šķīdumā sekmē kontrakciju summāciju, turpretī serotonīna klātbūtnē šādu kontrakciju summācija ir kavēta. Tādejādi, domājams, ka serotonīns sekmē taustekļa kustību paātrināšanu, kas var būt īpaši nozīmīga ekstermālās situācijās gliemežim orientējoties apkārtējā vidē.

### 3.2.2. FMRF-amīda efekti

FMRF-amīda ietekme uz taustekļa muskuļu kontrakciju aktivitāti tika pārbaudīta, lietojot FMRF-amīdu koncentrācijā no  $10^{-8}$  M līdz  $10^{-5}$  M. Šādu



koncentrāciju FMRF-amīda efektivitāti molusku neuro-muskulārajā sistēmā apstiprina arī vairāku autoru pētījumi (Bewick et al., 1990; Huddart & Hill, 1996). Kā redzams 5.attēlā A, FMRF-amīds koncentrācijā  $10^{-8}$  M praktiski neizmaina kontrakciju amplitūdu, taču nedaudz samazina kontrakciju ilgumu - līdz 82% (n=10) no kontroles lieluma. Palielinot FMRF-amīda koncentrāciju šķīdumā, amīda ietekme bija izteiktāka: kontrakciju amplitūda palielinājās, bet ilgums samazinās vēl vairāk, un pie FMRF-amīda koncentrācijas šķīdumā  $10^{-6}$  M amplitūda bija 124% no sākotnējās vērtības, bet kontrakciju laiks samazinājās vairāk kā par pusi - līdz 35% no kontroles lieluma (5.att.B). Pēc FMRF- amīda izskalošanas, kontrakcijas fizioloģiskajā šķīdumā atjaunojās sākotnējā lielumā. FMRF-amīda efektu uz atsevišķām kontrakcijām ilustrē 6.attA. Salīdzinot muskuļa kontrakcijas formu fizioloģiskajā šķīdumā (gaišā līnija) ar FMRF-amīda klātbūtnē iegūto kontrakciju (tumšā līnija), redzams, ka līdzīgi kā serotonīna gadījumā, FMRF-amīds būtiskāk ietekmē tieši rekalsācijas fāzi, palielinot relaksācijas ātrumu, un tādējādi samazinot kopējo kontrakcijas ilgumu.

Abām devas - efekta līknēm („FMRF-amīda koncentrācija - amplitūda“ un „FMRF-koncentrācija - ilgums“) ir sigmoidāls raksturs (7. att., pārtrauktā kontūra). Taču par būtisku var uzskatīt amplitūdas līknes nobīdi pa kreisi vismaz par vienu kārtu salīdzinot ar ilguma līkni. Tādējādi ir pamats domāt, ka, līdzīgi kā serotonīna gadījumā, FMRF-amīds aktivē vairākas sekundāro starpnieku sistēmas šūnā, un FMRF-amīda efekts uz kontrakciju amplitūdu un ilgumu realizējas, aktivējoties dažādiem intracelulārajiem mehānismiem (skat. *Rezultātu analīzi*).

Lietojot FMRF-amīdu lielākās koncentrācijās (virs  $10^{-6}$  M), FMRF-amīds pats, bez elektriska nervu kairinājuma, izsauca taustekļa muskuļa kontrakcijas, kuru amplitūda variēja atkarībā no FMRF-amīda koncentrācijas. Tā piemēram,  $10^{-6}$  M FMRF-amīds izsauca muskuļa kontrakcijas, kuru amplitūda sasniedza 45 % no elektriska kairinājuma rezultātā iegūto kontrakciju amplitūdas, taču šādi iegūto kontrakciju ilgums  $T_{50\%relax}$  bija ievērojami pagarināts un sasniedza  $315 \pm 53$  % (n= 10). Visām ar FMRF-amīdu izsuktajām kontrakcijām, neatkarīgi no FMRF-amīda koncentrācijas,

bija pagarināts latentais periods, salīdzinot to ar acetilholīna izsauktajām kontrakcijām. Kontrakciju latentais periods gan pie FMRF-amīda koncentrācijas  $10^{-6}$  M, gan  $10^{-5}$  M bija  $3.35 \pm 0.3$  sek, kas būtiski atšķiras no latentā perioda kontrakcijām, kas iegūtas, tieši iedarbojoties ar acetilholīnu uz taustekli:  $0.3 \pm 0.1$  sek ( $n= 10$ ). Šāda latentu periodu būtiska atšķirība ( $p < 0.06$ ) liek domāt, ka FMRF-amīda un acetilholīna izraisītie intracelulārie regulācijas mehānismi arī ir atšķirīgi.

### **3.2.3. Kopsavilkums.**

Serotonīns un FMRF-amīds, kurus saturošie neironi atrodas *Helix pomatia* cerebrālajā ganglijā un inervē taustekļa muskuli, ietekmē taustekļa muskuļa kontrakcijas. Serotonīns nedaudz samazina kontrakciju amplitūdu un būtiski - kontrakciju ilgumu. Abus šos efektus raksturo atšķirīgas devas-efekta līknes.

FMRF-amīda efekta izpausme ir taustekļa muskuļa kontrakciju amplitūdas palielināšana un kontrakciju ilguma samazināšana. Arī FMRF-amīda iedarbības abas izpausmes raksturo atšķirīgas devas-efekta līknes. FMRF-amīds koncentrācijā, kas augstāka par  $10^{-6}$  M spēj izsaukt taustekļa muskuļa kontrakcijas, kuru latentais periods ir būtiski garāks par ar acetilholīnu izsaukto kontrakciju latentu periodu.

Abu neirosekrētu iedarbība uz *Helix* taustekļa muskuļa aktivitāti izpaužas spēka - ārtuma īpašību stimulēšanā, lai pielāgotu taustekļu darbību situācijām, kad ir nepieciešama paaugstināta kustību aktivitāte.

### **3.3. Taustekļa nerva - muskuļa sinapšu pētījumi**

Tālākie pētījumi tika veltīti serotonīna iedarbības molekulāro mehānismu izzināšanai nerva - muskuļa sinapsē un taustekļa muskuļu šūnās. No anatomiskajiem un fizioloģiskajiem pētījumiem, domājams, ka serotonīnam ir būtiskāka loma taustekļa kontrakciju aktivitātes modulēšanā kā FMRF-amīdam.

No literatūras datiem ir zināms (Fuss, 1997), ka serotonīns un taustekļa muskuļa kontrakcijas izsaucošais mediators acetilholīns izdalās no

atšķirīgiem nervgaliem. Zinot, ka serotonīns pats neizsauc *Helix pomatia* taustekļa muskuļa kontrakcijas, bet gan veic šo kontrakciju modulāciju, bija svarīgi noskaidrot, vai serotonīna iedarbība ir *presinaptiska* - serotonīnam iedarbojoties uz holinērgiskajiem nervgaliem vai *postsinaptiska* - serotonīnam iedarbojoties tieši uz muskuļa šūnām.

### 3.3.1. Holinērgisko sinapšu rakstura noteikšana

Daudzu molusku pētītajās neuro-muskulārajās sistēmās kā mediators, kurš izsauc muskuļu kontrakcijas, ir zināms acetilholīns (Cohen et al., 1978; Ram et al., 1994). Taču literatūrā ir arī norādes, ka šo funkciju var veikt arī serotonīns. Tāpēc pētījumā vispirms tika noskaidrots, vai *Helix pomatia* taustekļa neuro-muskulārajai sinapsei ir holinērgisks raksturs.

Kā redzams 7.att. A, mugurkaulnieku nikotīna receptoru antagonists - *d-tubokurarīns* ( $5 \times 10^{-4}$  M; n=5) gandrīz pilnīgi nomāc motoneirona kairinājuma izsauktās muskuļa kontrakcijas. Kontrakcijas pilnīgi atjaunojās sākotnējā lielumā 5 min laikā pēc antagonista izskalošanas.

Pievienojot fizioloģiskajam šķīdumam citu N-holinoreceptoru blokatoru, kurš ir efektīvs mugurkaulnieku veģetatīvo gangliju sinapsēs - *heksametoniju* ( $10^{-3}$  M; n= 5), pierādījās, ka viela pati, bez elektriska nervu kairinājuma, izsauca lielas amplitūdas muskuļu kontrakcijas, kā arī palielināja elektriski izsaukto kontrakciju amplitūdu un ilgumu (7. att. B).

Lietojot mugurkaulnieku gludās muskulatūras muskarīna receptoru blokatoru - *atropīnu* ( $10^{-3}$  M; n=5), tas neietekmēja kontrakciju amplitūdu, bet nedaudz ietekmēja kontrakciju kinētiku, palielinot kontrakciju ilgumu  $T_{50\%relax}$  līdz  $114 \pm 4.2$  % (7.att. C).

Šie eksperimenti ar dažādu holinērgisko receptoru antagonistiem ļauj secināt, ka *Helix* taustekļa neuro-muskulāro sinapšu farmakoloģisko blokādi visefektīvāk var izraisīt ar *d-tubokurarīnu*, kas savkārt norāda uz N-holinērgisko receptoru izplatību (pārsvaru, dominanci) šajās sinapsēs.

### 3.3.2. Serotonīna iedarbības vietas noteikšana taustekļa nerva-muskuļa sinapsē.

Lai noskaidrotu, vai serotonīna iedarbība ir *pre-* vai *postsinaptiska*, tika veikta eksperimentu sērija, kurā taustekļa muskuļa kontrakcijas tika izsauktas nevis elektriski stimulējot motoro nervu, bet gan iedarbojoties ar acetilholīnu tieši uz taustekļa muskulatūtu. Acetilholīns tika lietots tādā koncentrācijā ( $10^{-4}$  M), lai iegūtās kontrakcijas pēc savas amplitūdas un kinētikas līdzinātos motoneironu elektriska kairinājuma rezultātā izsuktajām kontrakcijām (salīdzinājumam 1.att. un 8.att.).

Kā redzams 8.attēlā, arī ar acetilholīnu izsuktās kontrakcijas fizioloģiskajā šķīdumā tiek modulētas serotonīna klātbūtnē (n=7). Šie rezultāti ļauj spriest, ka serotonīns savu efektu realizē, tieši iedarbojoties uz taustekļa muskuli un nevis uz presinaptisko motoneironu.

### **3.3.3. Kopsavilkums.**

*Helix pomatia* neuro-muskulāro sinapsu pētījumi rāda, ka taustekļa nerva-muskuļa sinapsēm ir holinērgisks raksturs, un serotonīna modulējošais efekts tajā tiek realizēts, serotonīnam iedarbojoties postsinaptiski.

## **3.4. Serotonīna iedarbības molekulārie mehānismi.**

No literatūras ir zināms, ka serotonīna modulējošā iedarbība var realizēties, serotonīnam saistoties pie specifiskajiem serotonīna receptoriem šūnas membrānā un aktivējot sekundāro starpnieku mehānismus šūnā, vai arī, serotonīnam iedarbojoties uz acetilholīna receptoriem. Pie tam, modulējošā efekta realizācija caur ACh receptoriem var notikt divējādi: 1) serotonīnam tieši saistoties pie ACh receptoriem un aktivējot kādu noteiktu sekundāro starpnieku sistēmu (Garcia-Colunga & Miledi, 1996) vai 2) serotonīnam, saistoties pie ACh receptoru atsevišķām apakšvienībām, var izmainīties ACh receptoru jutību pret acetilholīnu.

### **3.4.1. Serotonīns un acetilholīna receptori.**

Lai noskaidrotu, vai serotonīna iedarbība taustekļa muskulī saistīta ar ACh receptoriem, tika veikta eksperimentu sērija, kurā taustekļa muskuļa

kontrakcijas tika iegūtas, elektriski kairinot taustekļa muskuli, izsaucot tiešu muskuļa šūnu depolarizāciju.

Kā redzams 9.attēlā, gan tiešs elektrisks muskuļa kairinājums (attēlā apzīmēts ar punktu), gan nerva kairinājums (attēlā apzīmēts ar zvaigznīti) fizioloģiskajā šķīdumā izsauc taustekļa muskuļa kontrakcijas. Lai izvairītos no iespējamās ACh receptoru aktivācijas, tieši elektriski kairinot muskuli, ACh receptoru darbība tika izslēgta ar *d-tubokurarīnu*. Šādos apstākļos elektrisks nervu kairinājums bija neefektīvs un neizsauca taustekļa muskuļa kontrakcijas, kā tas bija vērojams pirms *d-tubokurarīna* pievienošanas. Taču tieša muskuļa kairinājuma spēja izraisīt kontrakcijas saglabājās.

Kā redzams 9.attēlā arī, serotonīns koncentrācijā  $10^{-6}$  M modulē tieša muskuļa kairinājuma rezultātā iegūtās kontrakcijas arī tad, ja acetilholīna receptoru darbība ir izslēgta, proti, būtiski samazina kontrakciju ilgumu, taču praktiski neizmaina kontrakciju amplitūdu. Kontrakciju ilgums  $T_{50\%relax}$  serotonīna klātbūtnē ( $10^{-6}$  M) samazinājās līdz  $27 \pm$  % no kontroles lieluma ( $n=5$ ). Aptuveni par šādu pašu lielumu serotonīna ( $10^{-6}$  M) klātbūtnē samazinājās arī taustekļa muskuļa kontrakcijas, kuras tika izsauktas, kairinot abus motoros taustekļa nervus (salīdz. ar 2.att.B).

Tieša elektriska muskuļa kairinājuma rezultātā iegūto kontrakciju amplitūda serotonīna klātbūtnē ( $10^{-6}$  M) nesamazinājās un saglabājās  $97\% \pm 13$  % no kontroles lieluma, turpretī motoneirona kairinājuma izraisīto kontrakciju amplitūda serotonīna ( $10^{-6}$  M) klātbūtnē samazinājās līdz  $78 \pm 11\%$ .

Šīs eksperimentu sērijas rezultāti apstiprina izvirzīto hipotēzi, ka serotonīna iedarbība uz taustekļa muskuļu kontrakciju amplitūdu un ilgumu realizējas ar atšķirīgiem celulārajiem mehānismiem. Serotonīna ietekme uz kontrakciju **ilguma** izmaiņām realizējas neatkarīgi no ACh receptoriem, jo tā saglabājas arī tad, ja ACh receptoru darbība ir inhibēta. Taču serotonīna iedarbība uz taustekļu kontrakciju **amplitūdu** neizpaudās, ja ACh receptoru darbība tika kavēta ar *d-tubokurarīnu*. Šis fakts ļauj domāt, ka serotonīna inotropajā efektā vismaz daļēji iesaistās arī ACh receptori.

### 3.4.2. Serotonīna receptoru tipa noskaidrošana

Serotonīna receptoru tipi mugurkaulniekiem šodien ir labi zināmi un daudzi no tiem ir arī raksturoti. Bez mugurkaulnieku receptoriem nepastāv tik strikta klasifikācija, un tie parasti tiek raksturoti pēc to līdzības mugurkaulnieku receptoriem. Lai izzinātu serotonīna darbības mehānismu *Helix pomatia* neuro-muskulārajā sistēmā, mūsu interesēs bija noskaidrot serotonīna receptoru tipu.

#### 3.4.2.1. Liganda vadītie jonu kanālu receptori.

Noskaidrojot serotonīna receptoru tipu *Helix* taustekļa muskulī, tika veikti daži eksperimenti, lietojot *2-metil-5-hidroksitriptamīnu*, kurš ir zināms, kā mugurkaulnieku serotonīna 5-HT<sub>3</sub> receptoru agonists.

Kā redzams ....att., nervu kairinājuma izraisītās taustekļa muskuļa kontrakcijas *2-metil-5-hidroksitriptamīna* ( $10^{-6}$  M) klātbūtnē bija neadekvāti lielas un ilgas, proti, kontrakciju amplitūda un ilgums  $T_{50\%relax}$  palielinājās attiecīgi līdz  $145 \pm 18.3$  % un  $154 \pm 23.4\%$  (n=5). Pievienojot vēl papildus serotonīnu ( $10^{-7}$  M vai  $10^{-6}$  M), tika novērotas nenoteikta rakstura muskuļa kontrakciju izmaiņas: kontrakciju amplitūda pārmaiņus samazinājās un atkal pieauga. Pēc *metilhidroksitriptamīna* un serotonīna izskalošanas 5 min laikā kontrakcijas atkal stabilizējās un atgriezās kontroles lielumā.

Šīs nenoteiktā rakstura taustekļa muskuļa kontrakciju izmaiņas serotonīna ietekmē *metilhidroksitriptamīna* klātbūtnē, ļauj domāt, ka serotonīns un *metilhidroksitriptamīns* konkurē par piesaisti vieniem un tiem pašiem receptoriem. No literatūras ir zināms, ka *2-metil-5-hidroksitriptamīns* saistās pie serotonīna 5-HT<sub>3</sub> receptoriem, kuri ir liganda vadītie jonu kanālu receptori. Tādejādi ir var domāt, ka arī *Helix pomatia* taustekļa muskulatūrā vismaz daļa receptoru ir liganda vadītie jonu kanālu receptori.

#### 3.4.2.2. 5-HT<sub>1A</sub> receptori

Turpinot noskaidrot serotonīna receptoru tipu *Helix pomatia* taustekļa muskuļa šūnās, tika lietots mugurkaulnieku 5-HT<sub>1A</sub> receptoru antagonists NAN 190, kurš ir atrasts arī kā efektīvs serotonīna iedarbības blokators jūras gliemeža *Aplysia* bukālajā muskulī (Ram et al., 1994).

Kā redzams 10. att. A, NAN 190 koncentrācijā  $10^{-5}$  M nedaudz, bet statistiski ticami (par...%), samazināja ar elektrisku nervu kairinājumu izsaukto *Helix* taustekļa muskuļa kontrakciju ilgumu ( $n = 10$ ). Kaut arī kontrakciju amplitūda netika ietekmēta, tomēr hronotropais efekts ļauj uzskatīt NAN 190 par savdabīgu serotonīna agonistu.

Fizioloģiskajam šķīdumam, kurš saturēja NAN 190, tika pievienots serotonīns, lai tā gala koncentrācija būtu  $10^{-7}$  M, proti, koncentrācija, kura izsauca raksturīgo serotonīna efektu fizioloģiskajā šķīdumā. Kā redzams 10. att.B, NAN 190 klātbūtnē serotonīns neietekmēja kontrakcijas, kas ļauj secināt, ka NAN 190 ir bloķējis serotonīna receptorus un nomācis serotonīna efektu. Palielinot serotonīna koncentrāciju līdz  $10^{-6}$  M, serotonīna ietekmē samazinājās kontrakciju ilgums, taču ne tik ievērojami, kā standarta fizioloģiskajā šķīdumā bez NAN 190: kontrakciju ilgumu raksturojošais parametrs  $T_{50\%relax.}$  samazinājās līdz 66% NAN 190 klātbūtnē (standarta fizioloģiskajā šķīdumā  $T_{50\%relax.}$  samazinājās līdz 28%); amplitūda - samazinājās līdz 87% (attiecīgi fizioloģiskajā šķīdumā - līdz 78%).

Kā ilustrē ...attēls, serotonīna abu efektu devas - efekta līknes NAN 190 klātbūtnē ir nobīdītas aptuveni par divām kārtām uz augstākas koncentrācijas pusi. Tā varētu būt netieša norāde, ka gan serotonīns, gan NAN 190 konkurē par vieniem receptoriem, proti, NAN 190 ir konkurējošais antagonists serotonīna receptoriem *Helix* taustekļa muskuļa šūnās.

Ir zināms, ka NAN 190 selektīvi bloķē mugurkaulnieku gludās muskulatūras šūnu  $5-HT_{1A}$  receptorus. Arī dažu molusku muskuļos ir atrasts, ka NAN 190 ir efektīvs  $5-HT_{1A}$  receptoru blokators. Mūsu iegūtie rezultāti norādīja, ka arī *Helix* taustekļa muskuļu šūnās serotonīns saistās pie šiem receptoriem. Viena no  $5-HT_{1A}$  receptoru aktivācijas īpatnībām, ir cAMP kā sekundārā starpnieka iesaiste. Nākamās eksperimentu sērijas mērķis bija pārbaudīt šī fenomena lomu *Helix* taustekļa muskuļa šūnās.

### **3.4.3. Cikliskā adenozinmonofosfāta nozīme serotonīna efektu realizācijā.**

Visvairāk pētītajā jūras gliemeža *Aplysia* neuro-muskulārajā sistēmā ir atrasts, ka serotonīns aktivē tos intracelulāros mehānismus, kas sekmē

cAMP koncentrācijas izmaiņas muskuļa šūnā. Eksperimenti ar selektīvo 5-HT<sub>1A</sub> receptoru blokatoru NAN 190 arī norādīja uz iespējamo cAMP iesaisti serotonīna efekta realizācijā.

Lai noskaidrotu cAMP lomu serotonīna efekta realizācijā, tika veikta eksperimentu sērija, lietojot cAMP analogu - *8-Br-cAMP*. *8-Br-cAMP* savā sastāvā saturošās bromīdgrupas dēļ brīvi iekļūst šūnā, kur spēj ietekmēt sekundāro starpnieku mehānismus (Weiss et al., 1980). Ja serotonīns savu darbību realizētu caur cAMP sekundāro starpnieku sistēmu, tad *8-Br-cAMP* lietošanai fizioloģiskajā šķīdumā vajadzētu izsaukt tādu pašu efektu, kā to veic serotonīns, proti, amplitūdas un relaksācijas laika samazināšanu.

Kā rāda 12. attēls, pievienojot membrānas caurlaidīgo cAMP analogu - *8-Br-cAMP*, tas neizsauca taustekļa muskuļa kontrakciju izmaiņas, kā to veica serotonīns (14.att. A) redzams atsevišķu kontrakciju salīdzinājums). Tā piemēram, *8-Br-cAMP* ( $10^{-4}$  M) klātbūtnē nervu kairinājuma rezultātā izraisīto muskuļa kontrakciju amplitūda saglabājas  $95 \pm 8.5\%$ , tāpat arī kontrakciju ilgums  $T_{50\%relax}$  palika neizmainīts:  $95 \pm 13\%$  no kontroles lieluma ( $n=7$ ). *Br-cAMP* koncentrācijas samazināšana vai palielināšana par vienu kārtu, deva līdzīgus rezultātu, proti, kontrakciju raksturs standartkļūdas robežās neizmainījās.

Lai izvairītos no varbūtības, ka cAMP iedarbība nav realizējusies sakarā ar *8-Br-cAMP* komponentu nespēju izkļūt cauri muskuļa šūnu membrānai (jo taustekļa muskuli apņem biezs saistaudu slānis), nākamajos eksperimentos nervu-muskuļa preparāts pirms *8-Br-cAMP* lietošanas tika apstrādāts ar proteāzi: preparāts tika inkubēts 5 min proteāzes (konc. 1 mg/ml) šķīdumā. 4 no 6 eksperimentiem proteāze pati neietekmēja kontrakciju raksturu, taču 2 eksperimentos kontrakciju amplitūda pēc preparāta apstrādes ar proteāzi nedaudz samazinājās. Kā rāda 13. attēls, serotonīns modulē šāda ar proteāzi apstrādāta nervu - muskuļa preparāta kontrakcijas, gluži tā pat, kā preparātos bez to iepriekšējas apstrādes ar proteāzi, norādot, ka proteāze nav iejaukusies nedz muskuļa darbības funkcijās, nedz serotonīna modulējošā efekta realizācijā. Pēc serotonīna izskalošanas no fizioloģiskā šķīduma un *8-Br-cAMP* ( $10^{-4}$  M) pievienošanas tika novērots, ka 5 no 6 eksperimentiem *8-Br-cAMP* ievērojami izmainīja



nervu kairinājuma rezultātā iegūtās taustekļa muskuļa kontrakcijas. Kā redzams 13. attēlā, šādu *8-Br-cAMP* ietekmētu kontrakciju amplitūda sasniedza 200% no kontroles lieluma, bet vidēji muskuļa kontrakciju amplitūda tika palielināta līdz  $146 \pm 28\%$  un kontrakciju ilgums  $T_{50\%relax.}$ , attiecīgi, līdz  $148 \pm 37\%$  no kontroles lieluma. Taču šis kontrakciju ilguma pieaugums ir skaidrojams ar ievērojamo amplitūdas pieaugumu.

Pamatojoties uz iegūtajiem rezultātiem, var secināt, ka *8-Br-cAMP*, iespējams, spēj ietekmēt *Helix* taustekļa muskuļa kontrakcijas, taču tā efekts ir atšķirīgs no serotonīna darbības efekta, un serotonīna iedarbība nav viennozīmīgi saistāma ar cAMP sekundāro starpnieku sistēmu.

Iepriekšējie eksperimenti ar mugurkaulnieku serotonīna  $5-HT_{A1}$  tipa receptoru antagonistu NAN 190, rosināja secināt, iespējams, ka mugurkaulnieku un *Helix* serotonīna receptoru tipi nav pilnīgi identiski, un *Helix* taustekļa muskuļa serotonīna receptori nevar tikt raksturoti, izmantojot mugurkaulnieku serotonīna receptoru vispārpieņemto klasifikāciju.

Tāpēc tālākie pētījumi serotonīna molekulārā darbības mehānisma noskaidrošanā netika saistīti ar receptoru tipa noskaidrošanu, bet gan ar iespējamiem intracelulārajiem procesiem muskuļa šūnā.

#### **3.4.4. Kalcija nozīmes noskaidrošana serotonīna efektu realizācijā.**

Turpinot noskaidrot serotonīna efekta realizācijas molekulāros mehānismus, pievērsāmies muskuļa kontrakciju nodrošināšanai nozīmīgo katjonu - *kalcija jonu*, lomas noskaidrošanai. Kā liecina literatūras dati, serotonīnam ir regulējoša iedarbība uz intracelulārā un ekstracelulārā kalcija iesaisti kontrakciju norisē arī vairāku citu molusku sugu pētītajās neiro-muskulārajās sistēmās (Gloe et al., 1987; Nick et al., 1996).

##### **3.4.4.1. Kalcija nozīme taustekļa muskuļa kontrakciju norisē.**

Kā pirmais solis kalcija lomas izzināšanā taustekļa muskuļa kontrakciju norisē, tika noskaidrotas kontrakciju rakstura izmaiņas atkarībā no kalcija koncentrācijas ekstracelulārajā šķīdumā. Šai nolūkā tika veiktas divas eksperimentu sērijas, kurās taustekļa muskuļa kontrakcijas tika izsauktas:1)

elektriski kairinot abus taustekļa nervus; 2) iedarbojoties tieši uz taustekļa muskuli ar *acetilholīnu* (konc.  $10^{-3}$  M). Abas eksperimentu sērijas tika veiktas dažādas  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrācijām šķīdumos: 200%, 150%, 100%, 75%, 50%, 25% un 0%. Kā 100% -  $\text{Ca}^{2+}$  šķīdums tika pieņemts standarta fizioloģiskais šķīdums, kurā kalcija koncentrācija bija 7mM (skat. nodaļu *Materiāls un metodes*).

15. attēla A grafiks ilustrē elektriska nervu kairinājuma rezultātā izsaukto taustekļa muskuļa kontrakciju amplitūdas un ilguma  $T_{50\%relax.}$  izmaiņas atkarībā no kalcija koncentrācijas fizioloģiskajā šķīdumā. Ja  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrācija šķīdumā bija augstāka par standarta fizioloģiskajā šķīdumā esošo, t.i., 200% un 150% -  $\text{Ca}^{2+}$  šķīdumi, ir novērojama tendence palielināties kontrakciju amplitūdai un samazināties ilgumam  $T_{50\%relax.}$ : 200% - kalcija šķīdumā kontrakciju amplitūda pieauga līdz  $138 \pm 13.2$  % salīdzinot ar kontroli, bet ilgums  $T_{50\%relax.}$  samazinājās līdz  $55 \pm 7.9$  % no kontroles lieluma. Samazināta  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  fizioloģiskajā šķīdumā (75 - 50%) muskuļa kontrakciju raksturs būtiski neizmainījās un saglabājās tuvs kontroles lielumam. Vienīgi 25% -  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  - šķīdumā kontrakciju amplitūda samazinājās līdz  $62 \pm 6.9$  % ( $n=8$ ), bet kontrakciju ilgums saglabājās kontroles lielumā. Bezkalcijs vidē (0% -  $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ) novēroja gan kontrakciju amplitūdas, gan ilguma  $T_{50\%relax.}$  samazināšanos: amplitūda samazinājās līdz  $35 \pm 8.1$ %, bet ilgums  $T_{50\%relax.}$  līdz  $63 \pm 24$  % no kontroles lieluma (16. att.).

Līdzīgi rezultāti tika iegūti, ja muskuļa kontrakcijas tika izsauktas, tieši kairinot muskuli ar *acetilholīnu* (15.att.B): 200% -  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  šķīdumā kontrakciju amplitūda sasniedza  $146 \pm 18.5$ %, bet ilgums  $T_{50\%relax.}$  samazinājās līdz  $81 \pm 11.6$ % no kontroles lieluma. Samazinātas kalcija koncentrācijas (75 - 25%) šķīdumos kontrakciju amplitūda un ilgums būtiski neizmainījās un saglabājas tuvi kontroles lielumam. Un tikai bezkalcijs vidē taustekļa muskuļa kontrakciju amplitūda samazinās līdz  $23 \pm 1.8$ %, kā arī nedaudz samazinās kontrakciju ilgums  $T_{50\%relax.}$  - līdz  $92 \pm 4.1$ % ( $n=7$ ) no kontroles lieluma (17.att. A kontrakcijas 200, 100, 0%  $\text{Ca}^{2+}$ ).

Nevienā no bezkalcijs vidē veiktajiem eksperimentiem ( $n=15$ ) netika novērota kontrakciju pilnīga izžušana. Tas liecina, ka kontrakciju norisei šādos apstākļos  $\text{Ca}^{2+}$  tiek mobilizēts no intracelulārajām krātuvēm. Tomēr

kalcija trūkums ekstracelulārajā vidē izsauca nelielu muskuļa bazālā tonusa nestabilitāti, un nelielas (līdz 0.1 mm) pašuzliesmojušas kontrakcijas. Pie tam, kontrakciju izsaukšana bezkalcija vidē bija ierobežota, proti, šādos apstākļos bija iespējams izsaukt ne vairāk kā divas muskuļa kontrakcijas pēc kārtas, kuras bija iespējams izmantot tālākajos mērījumos, jo turpinot izsaukt kontrakcijas, bija vērojama pakāpeniska kontrakciju amplitūdas samazināšanās. Lai eksperimentus bezkalcija vidē tomēr varētu turpināt, bija nepieciešama īslaicīga (5 min) bezkalcija šķīduma nomaina ar standarta fizioloģisko šķīdumu.

No 15. attēla līknēm ir saskatāms, ka ekstracelulārajā kalcija izmaiņas vairāk ietekmē taustekļa muskuļa kontrakciju amplitūdu kā ilgumu.

#### 3.4.4.2. Serotonīna efekti dažādu $[Ca^{2+}]_o$ vidēs.

Veiktie eksperimenti fizioloģiskajos šķīdumos ar dažādu  $Ca^{2+}$  saturu parādīja, ka būtiskas kontrakciju izmaiņas ir novērojamas, ja  $Ca^{2+}$  koncentrācija ir paaugstināta (200% -  $[Ca^{2+}]_o$ ) vai bezkalcija vidē (0% -  $[Ca^{2+}]_o$ ). Samazinātas kalcija koncentrācijas šķīdumos (75 - 25%) būtiskas kontrakciju izmaiņas netika novērotas. Tādēļ, lai noskaidrotu serotonīna iespējamo lomu  $Ca^{2+}$  regulācijā, tika veikti papildus eksperimenti 200% -  $[Ca^{2+}]_o$  - fizioloģiskajā šķīdumā un bezkalcija vidē. Taustekļa muskuļa kontrakcijas šajos eksperimentos tika iegūtas, tieši iedarbojoties uz muskuli ar acetilholīnu.

Kā rāda 18.att.(B, 2 līknes), pievienojot serotonīnu ( $10^{-7}$  M) 200% -  $[Ca^{2+}]_o$  šķīdumā, novēro nelielu kontrakciju amplitūdas samazināšanos līdz  $83 \pm 7.2$  %, kā arī ilguma  $T_{50\%relax}$  samazināšanos līdz  $65 \pm 6.9$  % ( $n=5$ ). Kontrakciju amplitūdas izmaiņas šādā paaugstinātās  $Ca^{2+}$  koncentrācijas šķīdumā līdzinās tādas pašas koncentrācijas serotonīna ( $10^{-7}$  M) izsauktajām amplitūdas izmaiņām standarta fizioloģiskajā šķīdumā ( $85 \pm 10.8\%$ ). Taču kontrakciju ilguma izmaiņa 200% -  $[Ca^{2+}]_o$  šķīdumā serotonīna ietekmē ir mazāka kā standarta fizioloģiskajā šķīdumā, kur tā bija  $43 \pm 6.4\%$  ( att. 4 līknes).

Bezkalcija vidē iegūtās taustekļa muskuļa kontrakcijas bija ievērojami samazinātas gan pēc amplitūdas, gan ilguma. Pievienojot 0% -  $[Ca^{2+}]_i$  šķīdumam serotonīnu ( $10^{-7}$  M), novēroja nelielas kontrakciju izmaiņas: amplitūda samazinājās līdz  $84 \pm 11.4\%$ , salīdzinot ar amplitūdu bez serotonīna klātbūtnes, un kontrakciju ilgums samazinājās līdz  $87 \pm 8.6\%$  ( $n=5$ ). Taču, neskatoties uz to, ka serotonīna klātbūtnē tika novērotas muskuļa kontrakciju izmaiņas, bija grūti novērtēt, vai šīs izmaiņas (samazināšanās) bija serotonīna radītas, vai kalcija trūkuma radītas. Kā jau iepriekš tika minēts, kontrakciju iegūšana bezkalcija vidē bija apgrūtināta, jo iegūtās kontrakcijas bija nelielas pēc amplitūdas, kā arī, atkārtoti izsaucot kontrakcijas bezkalcija vidē, bija vērojama to pakāpeniska samazināšanās.

Tādejādi apkopojot iegūtos rezultātus, var secināt, ka ekstracelulārā  $Ca^{2+}$  koncentrācijas izmaiņas pašas par sevi ietekmē gan kontrakciju amplitūdu, gan ilgumu. Taču serotonīna iedarbība uz kontrakciju raksturu izpaužas atšķirīgi: gan augstas  $Ca^{2+}$  koncentrācijas šķīdumā, gan bezkalcija vidē serotonīns samazina kontrakciju amplitūdu par aptuveni tikpat lielu lielumu ( $84 - 85\%$  salīdzinot ar kontrakcijām standarta fizioloģiskajā šķīdumā). Kontrakciju ilguma izmaiņas serotonīna ietekmē, savkārt, ir atkarīgas no  $Ca^{2+}$  koncentrācijas ekstracelulārajā šķīdumā: augstas  $Ca^{2+}$  koncentrācijas šķīdumā kontrakciju ilgums  $T_{50\%relax}$  serotonīna ietekmē samazinājās līdz  $65\%$  no kontroles lieluma, taču bezkalcija vidē - līdz  $87\%$ . Tātad serotonīna efekti uz taustekļa muskuļiem nav pilnīgi neatkarīgi no  $Ca^{2+}$  koncentrācijas šūnstarpu šķīdumā.

Serotonīna efekta mehānismu noskaidrošanai bija svarīgi uzzināt, vai arī intracelulārajam kalcijam ir kāda loma šo procesu realizācijā. Lai to īstenotu, tika veikta nākamā eksperimentu sērija, kur kontrakciju izsaukšanai tika izmantots kofeīns.

#### **3.4.4.3. Serotonīna efekti kofeīna klātbūtnē**

Mugurkaulnieku skeleta muskuļos kofeīns izsauc fāziskas kontrakcijas, kuru izcelsmes pamatā ir  $Ca^{2+}$  atbrīvošana no sarkoplazmatiskā tīkla (Weber & Herz, 1968). Arī asinsvadu gludajos muskuļos kofeīns izsauc kontrakcijas bezkalcija vidē, atbrīvojot  $Ca^{2+}$  no šūnu iekšējām krātuvēm (Deth & Lynch,

1981; Leijten & van Breemen, 1984). Līdzīgi kā mugurkaulnieku muskuļos, arī bezmugurkaulnieku muskuļos, kā piemēram, *Aplysia* bukālajā muskulī, kofeīns izsauc kontrakcijas bezkalcijs vidē, mobilizējot  $Ca^{2+}$  no šūnas iekšējām krātuvēm (Gole et al., 1987).

Pētījumi ar *Aplysia* rāda, ka serotonīns modulē izolēta radulas slēdzējmuskuļa kontrakcijas, kas izraisītas ar acetilholīnu, palielinot kontrakciju biežumu (resp., atslābšanas ilgumu) un spēka amplitūdu, un šī modulācija ir atkarīga no kalcijs koncentrācijas ekstracelulārajā šķīdumā. Taču serotonīna modulējošā ietekme tiek kavēta, ja radulas slēdzējmuskuļa kontrakcijas tiek izsauktas ar kofeīnu (Gole et al., 1987). Serotonīna modulatorā efekta nespēja izpausties, ja muskuļa kontrakcijas ir izraisītas ar kofeīnu, ir aprakstīta arī *Aplysia* bukālās masas muskuļos (Ram et al., 1984).

Mūsu interesēs bija noskaidrot, vai serotonīns spēj ietekmēt *Helix* taustekļa muskuļa kontrakcijas šķīdumā, kas nesatur  $Ca^{2+}$ , un kur vienīgā iespēja iegūt  $Ca^{2+}$  kontrakcijām, ir to mobilizēt no šūnu iekšējām krātuvēm. Kā intracelulārā  $Ca^{2+}$  atbrīvotājs tika izmantots kofeīns.

Eksperiments vispirms tika noskaidrots, pie kādas koncentrācijas kofeīns izsauc taustekļa muskuļa kontrakcijas. Šai nolūkā eksperimenti tika veikti standarta fizioloģiskajā šķīdumā, un kontrolei kontrakcijas tika iegūtas, tieši kairinot muskuli ar acetilholīnu ( $10^{-3}$  M). Kā rāda 18. att., kofeīns koncentrācijā  $10^{-7}$  M un  $10^{-5}$  M izsauca ļoti vājas kontrakcijas, kuru izmantošana tālākajos pētījumos bija apgrūtināta. Koncentrācijā  $10^{-3}$  M kofeīna izsauktā kontrakcija ir nedaudz mazāka par acetilholīna izsaukto kontrakciju, taču tās lielums ir pietiekošs, lai varētu izmantot salīdzinošiem pētījumiem. Paaugstinot kofeīna koncentrāciju vēl par vienu vai divām kārtām ( $10^{-2}$  M un  $10^{-1}$  M), tika novērota kontrakciju nestabilitāte un nelielas pašuzliemojošas kontrakcijas. Tādejādi par optimālāko kofeīna koncentrāciju tālākajiem pētījumiem taustekļa muskuļu kontrakciju izraisīšanai tika izvēlēta kofeīna koncentrācija  $10^{-3}$  M.

Turpmākie eksperimenti tika veikti bezkalcijs vidē. Kā jau iepriekš tika aprakstīts, ar acetilholīnu izsauktās kontrakcijas bezkalcijs vidē bija ievērojami samazinātas pēc amplitūdas (līdz 23%) un nedaudz pēc ilguma

(līdz 92%) salīdzinot ar tādā pašā veidā iegūtajām kontrakcijām standarta fizioloģiskajā šķīdumā. Taču, kā rāda attēls, ar kofeīnu izsaukto kontrakciju amplitūda un ilgums bezkalcija vidē būtiski nemainījās, salīdzinot to ar standarta fizioloģiskajā šķīdumā izsauktajām kontrakcijām (19. att. kontr. viena virs otras). Tādejādi mūsu eksperimenti parādīja, ka kofeīns spēja izsaukt *Helix* taustekļa muskuļa kontrakcijas arī bezkalcija vidē, kuras pēc lieluma būtiski neatšķīrās no kontrakcijām, kas bija izsauktas ar kofeīnu standarta fizioloģiskajā šķīdumā.

Nākamajos eksperimentos tika detalizēti pētīta kofeīna spēja modulēt nervu elektriska kairinājuma rezultātā izraisītās muskuļa kontrakcijas. Kā rāda 20.att., standarta fizioloģiskajā šķīdumā iegūtās taustekļa muskuļa kontrakcijas var tikt ietekmētas kofeīna klātbūtnē. Pievienojot šķīdumam kofeīnu ( $10^{-3}$  M), tas ne tikai izsauca muskuļa kontrakciju, bet veica arī elektriski izsaukto kontrakciju modulāciju: amplitūda nenozīmīgi pieauga (līdz  $117.4 \pm 16.0$  % salīdzinot ar standarta fizioloģiskajā šķīdumā iegūto), taču kontrakciju ilgums  $T_{50\%relax.}$  pieauga gandrīz 3 reizes - līdz  $279.2 \pm 47.4\%$  ( $n=7$ ). Piecos no septiņiem eksperimentiem kofeīna pievienošana fizioloģiskajam šķīdumam samazināja muskuļa bazālo tonusu. Pievienojot šādam šķīdumam, kurš saturēja kofeīnu, vēl papildus serotonīnu ( $10^{-7}$  M), novēroja nelielas elektriski izsaukto kontrakciju izmaiņas: kontrakciju amplitūda palielinājās līdz  $115.3 \pm 9.5$  % un kontrakciju ilgums  $T_{50\%relax.}$  samazinājās līdz  $84.9 \pm 12.1\%$  ( $n=7$ ) salīdzinot ar kontrakcijām kofeīna klātbūtnē bez serotonīna. (7. att.) Taču neskatoties uz to, ka kofeīna klātbūtnē serotonīns sekmēja kontrakciju ilguma samazināšanu, šī samazināšana bija salīdzinoši neliela, un kontrakciju ilgums pat nelīdzinājās tam (bija ievērojami garāks), kāds bija standarta fizioloģiskajā šķīdumā. Tas norāda, ka serotonīnam ir tieksme samazināt kontrakciju ilgumu, taču kofeīna klātbūtnē tā pilnībā nespēj izpausties. Vēl jo vairāk, kofeīna klātbūtnē serotonīns sekmē nelielu kontrakciju amplitūdas pieaugumu. Tādejādi, šie rezultāti ļauj domāt, ka kofeīns un serotonīns savu modulējošo ietekmi realizē, darbojas uz vienām un tām pašām šūnu struktūrām.

Turpinot izzināt kalcija lomu serotonīna modulējošā efekta realizācijā, tika noskaidrots, kāda ir serotonīna ietekme uz kontrakcijām, kuras iegūtas ar

kofeīnu bezkalcija vidē. Kā jau parādīja iepriekšējie eksperimenti, kofeīns koncentrācijā  $10^{-3}$  M spēja izsaukt taustekļa muskuļa kontrakcijas gan standarta fizioloģiskajā šķīdumā, gan fizioloģiskajā šķīdumā bez kalcija. Tādejādi, vienīgā iespēja iegūt kalciju kontrakcijām ir, to atbrīvojot no šūnu iekšējām krātuvēm. Pievienojot bezkalcija šķīdumam serotonīnu ( $10^{-7}$  M), novēroja ar kofeīnu izsaukto muskuļa kontrakciju izmaiņas (20. att.): nedaudz samazinājās kontrakciju amplitūda līdz  $89 \pm 9.8\%$  un kontrakciju ilgums  $T_{50\%relax}$  līdz  $91 \pm 7.6\%$  ( $n=8$ ) salīdzinot ar kontrakcijām pirms serotonīna pievienošanas. Tādejādi arī šīs eksperimentu sērijas rezultāti tikai vēlreiz apstiprināja iepriekš teikto, ka serotonīns un kofeīns šūnā iedarbojas uz vienām struktūrām, proti, kofeīn-atkarīgajām  $Ca^{2+}$ -krātuvēm.

Apkopojot iegūtos rezultātus var secināt, ka 1) kofeīna klātbūtne ietekmē serotonīna izraisīto  $Ca^{2+}$  izplūdi no intracelulārajām krātuvēm; 2) serotonīnam ir specifiski aktivējoša ietekme uz kontrakciju atslābšanas procesu, kuras pamatā ir  $Ca^{2+}$  atsūkņēšana no citoplazmas.

Lai apstiprinātu rezultātus, kuri norādīja uz  $Ca^{2+}$  iespējamo lomu serotonīna modulācijā, turpmākajā pētījuma gaitā tika veikti eksperimenti, kuros  $Ca^{2+}$  kanāli tika farmakoloģiski inhibēti.

#### 3.4.4.4. Šūnas virsmas membrānas kalcija kanālu inaktivācija.

*Nifedipīns* ir zināms kā mugurkaulnieku L-tipa kalcija kanālu antagonists. Arī pētījumos ar moluskiem ir atrasts, ka nifedipīns kavē t.s. lēno kalcija plūsmu (*slow inward current*) šūnā, kas izmaina turpmāko kontrakciju raksturu (Braha et al., 1993; Brezina et al., 1994). Iepriekšējie pētījumi bija norādījuši uz iespējamo ekstracelulārā kalcija lomu serotonīna efekta realizācijā. Tādēļ nākamajā eksperimentu sērijā gribējām noskaidrot, kā mainās serotonīna efekts, ja ārējie kalcija kanāli muskuļa šūnā ir inhibēti ar nifedipīnu. Taustekļa muskuļa kontrakcijas standarta fizioloģiskajā šķīdumā tika iegūtas, elektriski kairinot abus taustekļa nervus.  $5 \times 10^{-7}$  M nifedipīna pievienošana šķīdumam izmainīja taustekļa muskuļa kontrakcijas (21. att.): kontrakciju ilgums  $T_{50\%relax}$  samazinājās līdz  $77 \pm 12.1\%$  no sākotnējā lieluma, bet kontrakciju amplitūda standartnovirzes robežās saglabājās

kontroles lielumā ( $107 \pm 5.9\%$ ). Sekojoši pievienojot vēl serotonīnu, kura gala koncentrācija šķīdumā sasniedza  $10^{-7}$  M, tas praktiski neizmainīja kontrakciju raksturu un standartnovirzes robežās kontrakciju parametri saglabājās tādi paši, kā pirms serotonīna pievienošanas, proti, kontrakciju amplitūda -  $96 \pm 5.9\%$ , ilgums  $T_{50\%relax}$  -  $104 \pm 6.7\%$  ( $n=6$ ). Nifedipīna pievienošana visos eksperimentos izsauca nelielas īslaicīgas pašuzliesmojošas kontrakcijas un bazālā tonusa nestabilitāti, kā tas līdzīgi bija vērojams vairākos eksperimentos bezkalcija vidē. Šī tonusa nestabilitāte saglabājās arī pēc serotonīna pievienošanas. 5 min laikā pēc vielu izskalošanas kontrakcijas standarta fizioloģiskajā šķīdumā atgriezās sākotnējā lielumā.

Iegūtie rezultāti rāda, ka ārējo kalcija kanālu inhibēšana ar *nifedipīnu* izsauc *Helix* taustekļa muskuļa kontrakciju ilguma izmaiņas, mazāk ietekmējot kontrakciju amplitūdu. Šādas izmainītas muskuļa kontrakcijas vairs netiek tālāk modulētas ar serotonīnu, kas standarta apstākļos veica kontrakciju modulāciju. Ārējo kalcija kanālu inhibēšana simulē serotonīna efektu, un pievienojot šķīdumā vēl papildus serotonīnu, tā darbībai neļauj izpausties. Tādejādi, var domāt, ka serotonīns savu efektu realizē, izmainot ekstracelulārā  $Ca^{2+}$  plūsmu.

#### **3.4.4.5. Intracelulāro kalcija krātuvju kalcija kanālu inaktivācija.**

Muskuļa kontrakciju norisei standarta apstākļos tiek izmantots ne tikai ekstracelulārais kalcijs, bet arī kalcijs, kas atrodas deponēts kalcija krātuvēs intracelulārajā telpā. Ir zināmas divu veidu intracelulārās kalcija krātuves - inozitoltrifosfāt-atkarīgās kalcija krātuves, kuras lokalizētas vairāk šūnas centrā, un kofeīna-atkarīgās kalcija krātuves, kuras atrodas šūnas perifērijā (Kostyuk & Kirischuk, 1993). Kalcija izdalīšanās no abu veidu krātuvēm var tikt regulēta ar dažādiem farmakoloģiskiem līdzekļiem. Augu valsts alkaloīds *riandins* ir zināms kā kofeīna-atkarīgo kalcija krātuvju kanālu inhibitors mugurkaulnieku sirds un skeleta muskuļos (Fill & Coronado, 1988), kā arī asinsvadu gludajā muskulatūrā (Ullmer et al., 1996). Lai pārliecinātos, vai



*rianodins* ietekmē kalcija izdalīšanos arī no *Helix* taustekļa muskuļu šūnu kofeīn-atkarīgajām krātuvēm, tika veikta nākamā eksperimentu sērija.

Taustekļa muskuļa kontrakcijas tika iegūtas elektiski kairinot abus taustekļa nervus. Standarta fizioloģiskā šķīduma nomaiņa ar rianodinu saturošu šķīdumu, kurā rianodina koncentrācija bija  $10^{-5}$  M, izsauca nelielas kontrakciju izmaiņas: kontrakciju amplitūda nedaudz samazinājās līdz  $84 \pm 7.7\%$ , bet kontrakciju laiks  $T_{50\%relax}$  standartnovirzes robežās saglabājās kontroles lielumā ( $108 \pm 12.2$ ; n=5).

Kā jau iepriekš tika aprakstīts, kofeīna klātbūtne fizioloģiskajā šķīdumā izsauca nelielu kontrakciju amplitūdas un ievērojamu kontrakciju laika pieaugumu, salīdzinot ar kontroles lielumu (skat. iepriekš). Taču pievienojot kofeīnu ( $10^{-3}$  M) šķīdumam, kurš saturēja *rianodinu*, kofeīns būtiski neizmainīja muskuļa kontrakciju raksturu (21. att. viens virs otra): amplitūda bija  $98 \pm 9.2\%$  un kontrakciju laiks  $T_{50\%relax}$  -  $104 \pm 16.6\%$  (n=5). Tas norāda, ka *rianodins* ir inhibējis kofeīna-atkarīgo intracelulāro  $Ca^{2+}$  krātuvju kanālus, un kofeīna iedarbība ir neefektīva. Tādejādi, līdzīgi kā mugurkaulnieku skeleta un gludajos muskuļos, arī *Helix* taustekļa muskulī *rianodins* inhibē kofeīna-jūtīgos kalcija kanālus.

Šie farmako-fizioloģiskie eksperimenti apstiprina mūsu iepriekšējo eksperimentu sēriju pierādījumus, ka *Helix* taustekļa muskuļa intracelularajās  $Ca^{2+}$  krātuvēs ir kofeīna-atkarīgie kalcija kanāli.

Saskaņā ar farmako-fizioloģiskajiem priekšstatiem, ka rianodins ir efektīvs kofeīna-atkarīgo kalcija kanālu inhibitors, turpmākajos pētījumos tika noskaidrots, vai serotonīns saglabā savu iedarbību, ja intracelularie kalcija kanāli ir inhibēti ar šo vielu. Kā rāda 22. attēls, rianodina pievienošana fizioloģiskajam šķīdumam izsauca nelielas muskuļa kontrakciju izmaiņas - samazināja kontrakciju amplitūdu, bet kontrakciju ilgums standartnovirzes robežās saglabājas (skat. arī iepriekš). Papildus serotonīna pievienošana šķīdumā izsauca kontrakciju izmaiņas: kontrakciju amplitūda praktiski neizmainījās ( $97 \pm 9.0\%$ ), taču kontrakciju ilgums  $T_{50\%relax}$  samazinājās līdz  $68 \pm 6.1\%$  (n=6). Pēc vielu izskalošanas no šķīduma 5 min laikā kontrakcijas atgriezās sākotnējā lielumā.

Tādejādi divas neatkarīgas eksperimentu sērijas (sērija ar kofeīna izsauktajām kontrakcijām un sērija ar riadonīnu) parādīja, ka *Helix* taustekļa muskulī ir kofeīna-atkarīgie kalcija kanāli, un serotonīna modulējošā iedarbība nav pilnībā efektīva, ja ir kavēta kalcija izdalīšanās no intracelulārajām kalcija krātuvēm.

Apkopojot rezultātus par serotonīna ietekmi uz taustekļa muskuļa kontrakciju amplitūdu un ilgumu dažādu ekstracelulārā un intracelulārā  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrāciju klātbūtnē, jāsecina, ka  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrācijas izmaiņas vairāk ietekmē serotonīna efektu uz kontrakciju ilgumu nekā uz amplitūdu. Kontrakciju amplitūda tiek mazāk ietekmēta arī standarta fizioloģiskajā šķīdumā. Serotonīns koncentrācijā  $10^{-7}$  M samazināja kontrakciju amplitūdu līdz 85% (kontrakciju ilgums  $T_{50\%relax}$  tādos pašos apstākļos samazinājās līdz 45%) no kontroles lieluma. Aptuveni tikpat liela, serotonīna izsaukta amplitūdas izmaiņa saglabājas, ja tika mainīta ekstracelulārā  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrācija. Taču serotonīna ietekme uz amplitūdu bija praktiski neefektīva, ja tika iztukšotas vai inaktivētas intracelulārā kalcija krātuves, daļēji saglabājoties serotonīna efektam uz kontrakciju ilgumu.

Iegūtie dati ļauj secināt, ka serotonīna iedarbība uz taustekļa muskuļa kontrakciju amplitūdu un ilgumu tiek realizēta ar atšķirīgiem molekulāriem mehānismiem. Efekts uz kontrakciju ilgumu, domājams, realizējas, serotonīnam ietekmējot kalcija apmaiņu starp ekstracelulāro šķīdumu un šūnu, bet serotonīna efektam uz amplitūdu pagaidām nav iespējams viennozīmīgs izskaidrojums. Domājams, šī efekta realizācija ir pakārtota tiem molekulāriem procesiem un jonu plūsmu izmaiņām, kuras aktivē serotonīns, samazinot kontrakciju ilgumu.

Taču no eksperimentiem ir saskatāms, ka, manipulējot ar ekstracelulāro un intracelulāro  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrāciju, serotonīna iedarbības izpausme nav pilnīga, proti, tāda, kā standarta fizioloģiskajā šķīdumā. Šis fakts liek domāt, ka serotonīna iedarbība taustekļa muskulī ir kompleksa, un ir saistīta ne tikai ar  $\text{Ca}^{2+}$  plūsmas izmaiņām, bet, iespējams, ir iesaistīti vēl kādi citi procesi šūnā.

### 3.4.5. Ar G-proteīnu saistīto receptoru esamība taustekļa muskuļa šūnās.

Serotonīna daudzveidīgā iedarbība mugurkaulnieku un bezmugurkaulnieku organismā tiek panākta, serotonīnam saistoties pie dažādiem serotonīna receptoriem, kuru lielākā daļa ir ar G-proteīnu saistītie receptori. Šūnas atbildes reakcijā, kuru izraisa serotonīna piesaiste ar G-proteīnu saistītajiem receptoriem, var iesaistīties dažādas intracelulāro starpnieku sistēmas (skat. *levadu*).

Neliela mūsu eksperimentu sērija ar G-proteīna farmakoloģisko analogu *GTP- $\gamma$ -S* norādīja uz iespējamo ar G-proteīna saistīto receptoru klātbūtni arī *Helix* taustekļa muskulī.

Kā ilustrē 23. attēls, *GTP- $\gamma$ -S* pievienošana šķīdumam ( $10^{-3}$  M), izsauc elektriska nervu kairinājuma izsaukto kontrakciju ilguma izmaiņas, praktiski neietekmējot kontrakciju amplitūdu (tā saglabājas ap 105 % no kontroles lieluma). Muskuļa kontrakciju ilgums  $T_{50\%relax.}$  samazinās līdz 38% no sākotnējā lieluma pirms *GTP- $\gamma$ -S* pievienošanas (n=5). Pievienojot serotonīnu, novēro, ka kontrakciju ilgums turpina samazināties, taču ne tik izteikti, kā tas bija standarta fizioloģiskajā šķīdumā bez *GTP- $\gamma$ -S* klātbūtnes. Kontroles apstākļos fizioloģiskajā šķīdumā serotonīns koncentrācijā  $10^{-6}$  M samazināja kontrakciju ilgumu  $T_{50\%relax.}$  līdz  $35 \pm 8.2\%$ , taču *GTP- $\gamma$ -S* klātbūtnē tikai līdz 62%, t.i, gandrīz par uz pusi mazāku lielumu. 3 min laikā pēc vielu izskalošanas kontrakcijas atgriezās sākotnējā lielumā.

Apvienots *GTP- $\gamma$ -S* ietekmētu atsevišķu kontrakciju attēls (24. att.) ļauj salīdzināt kontrakciju relaksācijas fāzes kinētiku šķīdumā ar un bez serotonīna: relaksācijas fāzes sākuma daļa abām kontrakcijām norit līdzīgi, un nav arī būtiskas atšķirības kontrakcijas ilgumā  $T_{50\%relax.}$ , līdz kontrakcija sasniegusi 65% no sākotnēja lieluma. Atšķirības relaksācijas fāzes kinētikā ir izteiktas tieši relaksācijas beigu posmā: 1) serotonīna klātbūtnē muskuļa relaksācija norit vienmērīgi visā relaksācijas fāzē un ir straujāka kā fizioloģiskajā šķīdumā bez serotonīna; 2) *GTP- $\gamma$ -S* saturošā šķīdumā bez serotonīna, relaksācijas fāzes beigu posmā atslābšanas ātrums palēninās un

līdz ar to palielinās kopējais relaksācijas ilgums un  $T_{50\%relax.}$ ; 3) šķīdumā, kurā pievienots gan GTP- $\gamma$ -S, gan serotonīns, atslābšana ir vienmērīga, bet tas kopējais ilgums (un arī  $T_{50\%relax.}$ ) ir salīdzinoši visīsākais.

Tā kā serotonīns ietekmē ne tikai kontrakciju kinētiku (šo ietekmi izdevās modelēt, izmantojot G-proteīna analogu), bet arī kontrakciju spēku, varam secināt, ka serotonīna summārais efekts taustekļa muskulī - kontrakciju amplitūdas un ilguma samazināšana, realizējas, serotonīnam saistoties pie dažādiem 5-HT receptoru apakštipiem postsinatiskajā neironā.

Tādejādi, ir pamats domāt, ka *Helix* taustekļa muskulī vismaz daļa serotonīna receptoru ir ar G-proteīnu saistītie receptori. G-proteīns šūnas membrānā var aizsākt vairākas intracelularo starpnieku ķēžu reakcijas (skat. 3.att.), kuras ved pie kanālproteīnu fosforilēšanas un jonu plūsmu izmaiņām šūnu membrānā.

#### **3.4.6. Litija iedarbība uz taustekļa muskuļa kontrakcijām.**

PIP<sub>2</sub> pārvērtības šūnā var tikt regulētas ar nelielā izmēra litija joniem. Šie joni difundē šūnā, kur inhibējoši iedarbojas uz fosfatāzi, kura fermentatīvi regulē inozitola veidošanos no inozitolfosfāta (A, Rang & Dale, 1987). Tāpat litijs šūnā var kompleksi kavējoši ietekmēt cAMP veidošanos, inhibējot G-proteīna mijiedarbību ar receptormolekulām, kā arī adenilciklāzes fermentatīvo aktivitāti (att. B, Rang & Dale, 1987; Peters et al., 1992).

Ja serotonīna efekts realizējas ar PIP<sub>2</sub> metabolītu vai cAMP sekundāro starpnieku sistēmas līdzdalību, litija klātbūtnē vajadzētu mainīties serotonīna efektiem uz taustekļa kontrakcijām. Šo varbūtību mēs pārbaudījām pētījumā.

Eksperimenta grupas dzīvniekiem katru dienu 10 dienu laikā tika injicēts Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> šķīdums ( $9 \times 10^{-3}$  mg vielas uz 1 g ķermeņa masas). Šāda procedūra neizsauca izmaiņas dzīvnieku uzvedībā visā kontroles laikā. Pēc 10 dienām dzīvnieki tika izmantoti fizioloģiskajiem eksperimentiem. Līdzīgos pētījumos ar *Heliophrya erhardi* (latviski) šādā veidā veikta litija injekcija dzīvniekiem izraisa efektu (Evans et al., 1988). Pamatojoties uz

bezmugurkaulnieku strukturālo īpatnību līdzību, ir pamats domāt, ka šāda procedūra var būt efektīva arī gliemežim.

Eksperimenti ar izolētiem nervu - muskuļu preparātiem tika veikti litija-fizioloģiskajā šķīdumā, proti, fizioloģiskajā šķīdumā, kurā litija koncentrācija bija  $10^{-3}$  M. Taustekļa muskuļa kontrakcijas tika izraisītas, elektriski kairinot abus taustekļa nervus. Šādos eksperimenta apstākļos dzīvniekiem tika pārbaudīta dažādu koncentrāciju ( $10^{-8}$  līdz  $10^{-4}$  M) serotonīna šķīduma ietekme uz muskuļa kontrakcijām.

Kā rāda 24. attēls, litija klātbūtnē saglabājas serotonīna ( $10^{-6}$  M) efekti gan uz taustekļa kontrakciju amplitūdu, gan ilgumu: amplitūda samazinājās līdz  $78 \pm 13.2\%$ , bet ilgums  $T_{50\%relax.}$  līdz  $18 \pm 1.0\%$  ( $n = 5$ ; šādas koncentrācijas serotonīna ietekmē normālu dzīvnieku taustekļa muskuļa kontrakciju amplitūda standarta fizioloģiskajā šķīdumā samazinājās līdz  $85 \pm 11.2\%$  un attiecīgi  $T_{50\%relax.}$  līdz  $31 \pm 7.4\%$ ; skat. iepriekš ...lpp.). Kā redzams, šādos apstākļos serotonīna efekti uz muskuļa kontrakcijām ne tikai saglabājās, bet ir izteikti pat nedudz vairāk nekā normāliem dzīvniekiem. Uz to arī norāda devas - efekta līknes .... attēlā. Salīdzinot devas-efektu līknes normāliem dzīvniekiem un dzīvniekiem, kuriem 10 dienas tika injicēts litija šķīdums, kā arī eksperimenti ar šiem dzīvniekiem tika veikti litiju saturošā fizioloģiskajā šķīdumā, var pārlicināties, ka līknes ir līdzīgas pēc savas formas, taču kontrakciju parametru izmaiņa dažādu serotonīna koncentrāciju klātbūtnē dzīvniekiem, kuriem bija veikta litija injekcija, ir nedaudz lielāka nekā normāliem dzīvniekiem.

Turpinot litija efekta izpēti, tika veikta eksperimentu sērija ar nervu-muskuļa preparātiem, kuri iegūti no normāliem dzīvniekiem. Taustekļa muskuļa kontrakcijas tika izraisītas, elektriski kairinot taustekļa nervus.

Vispirms tika pārbaudīts, kā taustekļa kontrakciju raksturu ietekmē standarta fizioloģiskā šķīduma nomaiņa ar litiju saturošu fizioloģisko šķīdumu. Taustekļa kontrakcijas litija fizioloģiskajā šķīdumā tika izraisītas pēc piecu minūšu preparāta inkubācijas šajā šķīdumā.

Kā rāda iegūtie rezultāti, litija klātbūtne fizioloģiskajā šķīdumā būtiski neietekmēja kontrakciju izmaiņas: ja litija koncentrācija fizioloģiskajā šķīdumā bija  $10^{-3}$  M, kontrakciju amplitūda bija  $95 \pm 7.5\%$  un ilgums  $T_{50\%relax.}$  -  $97 \pm$

4.3% (n=5) salīdzinot ar kontrakcijām standarta fizioloģiskajā šķīdumā. Savkārt,  $10^{-4}$  M litija klātbūtnē kontrakciju parametri attiecīgi bija  $93 \pm 3.3\%$  un  $113 \pm 6.9\%$  (n=5).

Serotonīna ( $10^{-7}$  M) pievienošana litiju saturošam fizioloģiskajam šķīdumam izsauca taustekļa kontrakciju amplitūdas un ilguma  $T_{50\%relax.}$  samazināšanos, līdzīgi kā tas notika tādas pašas koncentrācijas ( $10^{-7}$  M) serotonīna klātbūtnē standarta fizioloģiskajā šķīdumā: litija šķīdumā amplitūda samazinājās līdz  $88 \pm 7.8\%$  (standarta fizioloģiskajā šķīdumā tas samazinājās līdz  $84 \pm 4.6\%$ ) un ilgums  $T_{50\%relax.}$  līdz  $46 \pm 9.7\%$  (n=5; standarta fizioloģiskajā šķīdumā attiecīgi līdz  $45 \pm 6.9\%$ ).

Tādejādi iegūtie rezultāti rāda, ka īslaicīga litija iedarbība neietkmēja ne *Helix* taustekļa muskuļa kontrakciju raksturu, ne arī serotonīna efektu. Taču iedarbojoties ar litiju ilgstoši, injicējot to dzīvnieka organismā, vērojama serotonīna efekta neliela pastiprināšanās. Tomēr maz ticams, ka šī efektu nelielā pastiprināšanās notiek, litijam iedarbojoties uz tiem pašiem sekundāro starpnieku ķēžu reakciju posmiem kā serotonīnam.

Kā jau minēts iepriekš, litija intracelulārā iedarbība ir kavējoša, taču no literatūras zināms, ka serotonīna efekts ir sekundāro starpnieku mehānismus aktivējošs. Vienīgais izņēmums ir, serotonīnam saistoties ar 5-HT<sub>1</sub> tipa receptoriem, kuru aktivācijas rezultātā notiek cAMP sekundārās starpnieku sistēmas inhibēšana. Tādejādi varētu domāt, ka serotonīns, tāpat kā litijs inhibējoši iedarbojas tieši uz šo sekundāro starpnieku sistēmu. Taču mūsu eksperimentu sērija ar cAMP analogu nenorādīja uz serotonīna efektu tiešu saistību ar šo sekundāro starpnieku sistēmu. Tāpēc jautājums par serotonīna aktivētajām sekundāro starpnieku sistēmām *Helix* taustekļa muskuļa šūnās ir diskutējams, un pilnīgai tā izzināšanai nepieciešami papildus pētījumi, kurus vislabāk būtu veikt ar intracelulārajām pētīšanas metodēm.

### 3.4.7. Kopsavilkums.

Izzinot serotonīna iedarbības molekulāros mehānismus *Helix pomatia* taustekļa muskulī, tika pierādīts, ka serotonīna iedarbība realizējas, serotonīnam saistoties pie specifiskajiem receptoriem, no kuriem vismaz daļa

ir ar G-proteīnu saistītie receptori, kā arī, iespējams, ligandu vadītie jonu kanālu receptori. No eksperimentu sērijas, kurā kontrakcijas tika iegūtas, tieši elektriski kairinot taustekļa muskuli, ir pamats domāt, ka serotonīna iedarbība saistīta ne tikai ar serotonīna specifiskajiem, bet arī ar acetilholīna receptoriem.

Serotonīna specifiskie receptori taustekļa neuro-muskulārajā sistēmā nav identiski mugurkaulnieku serotonīna 5-HT<sub>1A</sub> receptoriem, jo cAMP sekundāro starpnieku sistēma nav dominējošā serotonīna efekta realizācijā.

Kofeīns regulatori ietekmē taustekļa muskuļa kontrakcijas, kā arī serotonīna efektu izpausmes kofeīna klātbūtnē ir samazinātas.

Serotonīna efekti ir atkarīgi no intracelulārā un ekstracelulārā kalcija koncentrācijas: hronotropais efekts realizējas, serotonīnam ietekmējot L-tipa [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> plūsmu, un pakārtoti šīs plūsmas izmaiņām tiek panākts arī serotonīna inotropais efekts.

### **3.5.1. Serotonīna metabolisma un serotonērgisko neironu summārās aktivitātes mainība.**

Par vēl vienu serotonīna iespējamo iedarbību *Helix* nerva-muskuļa sinapsē netieši liecina eksperimenti ar selektīvo serotonērgo šūnu toksīnu 5,6-DHT. DHT tiek plaši lietots eksperimentos ar bezmugurkaulniekiem serotonīnu saturošo šūnu pētīšanai (Baker et al., 1993; Sahley, 1994). Injicēts dzīvnieka organismā, šis toksīns atgriezeniski bojā serotonērgos neironus un inhibē serotonīna izdalīšanos. DHT iedarbība sāk izpausties ne vēlāk kā 14 dienas pēc DHT injicēšanas, un serotonērgo šūnu funkcijas daļēji vai pilnīgi atjaunojas pēc 60 dienām pēc DHT iedarbības pārtraukšanas (S.-Rozsa et al., 1986; Balaban, 1987).

Eksperimenta dzīvniekiem katru otro dienu divu nedēļu laikā tika injicēts 5,6-DHT. Visu šo laika periodu dzīvnieku uzvedībā netika novērotas nekādas ārējas izpausmes, kas atšķirtos no dzīvnieku uzvedības pirms 5,6-DHT injicēšanas. Pēc 14 dienām kopš pirmās 5,6-DHT injekcijas dzīvnieki tika izmantoti eksperimentiem. Tika pārbaudīta dažādu koncentrāciju

serotonīna iedarbība uz taustekļa muskuļa kontrakcijām, kuras tika izsauktas, elektriski kairinot abus taustekļa kustību nervus.

Kā rāda devas - efekta līknes ...attēlā A,B, dažādu koncentrāciju serotonīna iedarbība uz *Helix* taustekļa muskuļa kontrakciju amplitūdu un ilgumu  $T_{50\%relax}$  saglabājas līdzīga kāda tā bija dzīvniekiem, kuriem nebija injicēts 5,6-DHT. Taču, ja salīdzina devas - efekta līknes, kas atspoguļo kontrakciju ilguma  $T_{50\%relax}$  attiecību pret amplitūdu (...att. C), novēro (būtiskas) atšķirības (p...): absolūtā vērtība, kas raksturo šo attiecību normāliem dzīvniekiem standarta fizioloģiskajā šķīdumā bija  $2.3 \pm 0.6$  (n=8), bet dzīvniekiem, kuriem bija injicēts 5,6-DHT, šī vērtība standarta fizioloģiskajā šķīdumā bija gandrīz trīs reizes lielāka:  $7.0 \pm 2.5$  (n=7). Dažādu serotonīna koncentrāciju šķīdumos ( $10^{-9}$  -  $10^{-4}$  M) normāliem dzīvniekiem šī vērtība ir robežās no 0.64 līdz 2.4, kas ir mazāka nekā 5,6-DHT injicētiem dzīvniekiem: 2.4 līdz 4.

Rezultāti rāda, ka serotonīna efekts nav mainījies dzīvniekiem, ja tiem serotonergie neironi bija bojāti ar 5,6-DHT, taču ir mainījies pats kontrakciju raksturs, un tādēļ arī palielinājusies kontrakciju attiecības " $T_{50\%relax}$  / amplitūda" absolūtā vērtība. Šīs vērtības palielināšanās ir iespējama divos gadījumos: 1) ja palielinās kontrakciju ilgums  $T_{50\%relax}$ ; vai 2) ja samazinās kontrakciju amplitūda. Mūsu eksperimentos ar 5,6-DHT injicētiem dzīvniekiem bija izteikta kontrakciju kopējā ilguma, kā arī  $T_{50\%relax}$  palielināšanās, ko ilustrē arī 25.att. Salīdzinot normālu dzīvnieku un 5,6-DHT injicētu dzīvnieku kontrakcijas standarta fizioloģiskajā šķīdumā, kuras ir līdzīgas pēc amplitūdas, redzams, ka kontrakciju saraušanās fāzes ir praktiski vienādas, taču būtiskas atšķirības novērojamas kontrakciju atslābšanas fāzē, kura normāliem dzīvniekiem ir ievērojami īsāka.

Serotonīna izdalīšanās *Helix* nervu sistēmā dabiskos apstākļos ir toniska, taču vērojamas sezonālas svārstības (Kupfermann, 1991). Tāpēc iespējams, ka arī dabiskos apstākļos var veidoties periodiskas gliemeža tās uzvedības reakcijas, kurās ir iesaistītas taustekļu funkciju izmaiņas.

5,6-DHT injekcija dzīvnieka organismā bija pārtraukusi serotonīna izdalīšanos nervu sistēmā un, iespējams, mainījusi efektorstruktūru jutību pret serotonīna modulējošām ietekmēm. Ilgstošs serotonīna signāla iztrūkums,



acīmredzot, ne tik daudz maina serotonīna reakcijas spēju, kā signāla transdukcijas iekšējo mehānismu struktūru.

### **3.5.2. Kopsavilkums.**

Serotonergo šūnu toksīna *5,6-DHT* ilgstoša iedarbība neizmaina serotonīna iedarbības raksturu uz *Helix pomatia* taustekļa muskuļa kontrakcijām, taču izmaina pašu taustekļa kustību ātrumu.

## 4. REZULTĀTU ANALĪZE

### 4.1. *N. peritenticularis interna* un *externa* izvietojums taustekļa muskulatūrā un to nozīme taustekļa kustībās

Gliemeža *Helix pomatia* taustekļa nervu pētījumos, izmantojot anatomiskās un fizioloģiskās pētīšanas metodes, bija iespējams noteikt taustekļa nervu un taustekļa muskulatūras funkcionālo saistību. Balstoties uz nervu retrogrādās krāsošanas rezultātiem, ir noteikta iekšējā un ārējā taustekļa nervu inervācija taustekļa muskulī. Modificējot iegūtos fotoattēlus (skt. nod. *Rezultāti*), ir iespējams stādīt priekšās nervu lokalizāciju muskulī, kā arī to izejas vietu no cerebrālā ganglija (6. att.). Nervu retrogrādās krāsošanas metode ar smago metālu joniem nepieļauj precīzu visu abus kustību nervus veidojošo neironu lokalizācijas cerebrālajā ganglijā noteikšanu, taču nervu izvietojums taustekļa muskulī, šādi krāsojot nervus, ir labi nosakāms. Un šai pētījumā svarīgi bija izzināt tieši kustību nervu precīzu lokalizāciju taustekļa muskulī, kas ar retrogrādās krāsošanas metodi ir arī sasniegts.

Kustību nervus veidojošo neironu precīzu lokalizāciju cerebrālajā ganglijā ir iespējams noteikt ar neironu intracelulārajām krāsošanas metodēm. Tā piemēram, viena no šīm metodēm ir neironu krāsošana ar lizīna-kobalta kompleksu, ievadot šo vielu šūnā ar uzpildīta elektroda palīdzību, periodiski depolarizējot neironu ar elektrisko strāvu (Altrup & Peters, 1982).

*Helix* taustekļa muskuļa kustību nervu neironu intracelulāra krāsošana ir veikta arī Maincas Universitātes Neuroetoloģijas laboratorijā (Straub, 1995). Šādi intracelulāri krāsojot atsevišķus cerebrālā ganglija neironus un ļaujot krāsvielas šķīdumam difundēt virzienā no šūnas ķermeņa uz perifēriju, ir atrasts, ka to neironu ķermeņi, kuru aksoni saiet kopējā kūlītī un veido iekšējo un ārējo taustekļa nervus, atrodas ne tikai ganglija metacerebrālajā daļā, kā to var redzēt, nervus krāsojot ar retrogrādo krāsošanas metodi, bet arī nedaudzi kustību neironi atrodas ganglija pro- un mezocerebrālajā daļā. Tāpat ir pierādīts, ka atsevišķi aksoni taustekļa nervos ienāk no abus cerebrālos ganglijus savienojošās komisūras, kā arī no lūpu nerviem, ožas nerva un pedālā un pleirālā konektīva (Straub, 1995). Šāda taustekļa nervu atsevišķo neironu plaša projekcija arī citās nervu sistēmas daļās ļauj domāt arī par citu sensoro sistēmu ietekmēm uz taustekļu motoneironu aktivitāti. Gliemežu neuroetoloģiskie pētījumi un uzvedības vērojumi liecina, ka dominējošo ietekmi uz

taustekļa kustībām dod tieši sensorais olfaktoriskais nervs, mazāka ietekme ir informācijai no optiskā nerva (gliemezim ir ļoti mazspējīga redzes sensorā sistēma), kura neironi arī ieiet cerebrālā ganglija metacerebrālajā daļā (Chase, 1986; Kilijs, 1995). Šajā daļā atrodas arī vairums to neironu ķermeņi, kuri veido taustekļa kustību nervus. Pie tam, vairumā gadījumu, sensorās informācijas pārvešana no sensorā neirona uz kustību neironu bezmugurkaulniekiem notiek bez starpneironu palīdzības, vai tikai ar dažu starpneironu līdzdalību, un sensorais neirons (neirona aksons) parasti atrodas tajā pašā ganglijā līdzās kustību neironam (Chan & Moffett, 1981).

Gliemeža *Helix pomatia* **iekšējais un ārējais taustekļa nervi** ir eferentie nervi. To nervu šķiedru veidojošie neironi nav viendabīgi, bet gan vairāku populāciju: *holinērgiskie motoneironi* (šī vārda šaurākā nozīmē, proti, šo neironu impulsācija izraisa muskuļa šķiedru kontrakcijas); muskuļa aktivitāti *modulējošie neironi*, tai skaitā, serotonērgiskie neironi; vēl cita neironu populācija - piemēram, *FMRF-amīdu saturošie* neironi, kuri atkarībā no neirosekrēta izdalīšanās straujuma var izsaukt gan inervējamā muskuļa šķiedru kontrakciju, gan modulēt cita mediatora (acetilholīna) izsauktās kontrakcijas.

Abu *taustekļa nervu* izvietojums muskulī liecina par plašu, praktiski visu muskuli aptverošu motoro inervāciju. Atsevišķi literatūrā atrodami dati liecina (Chase & Tolloczko, 1993; Peschel, 1998), ka eferentās nervu šķiedras aiziet līdz pašai taustekļa galotnei.

Līdzās *taustekļa nerviem*, tausteklī atrodas arī sensorais ožas nervs, kā arī optiskais nervs. Šo nervu neironu ķermeņi atrodas ganglijā, kurš lokalizēts taustekļa galotnē, bet šo neironu aksoni virzās uz cerebrālo gangliju, kur sensoro informāciju nodod tālāk starpneironiem vai motoneironiem (Chase & Tolloczko, 1993). Šāda informācijas pārvadīšana nodrošina kairinātāja iedarbību un atbildes reakcijas izsaukšanu taustekļa muskulī.

Mūsu morfoloģiskā pētījuma rezultāti pierādīja, ka *iekšējais un ārējais taustekļa nervs* inervē katrs savu taustekļa muskuļa daļu, un nervu inervācijas zonas praktiski nepārklājas. To arī apstiprināja fizioloģiskā testa rezultāti, kairinot atsevišķi katru nervu (skat.....lpp.).

Kvalitatīvi izvērtējot fizioloģiskā testa rezultātus, kurā taustekļa kustību virziens tika noteikts atkarībā no nervu kairinājuma, ir interesanti salīdzināt šo

taustekļa kustību virzienu ar novērojumiem *in vivo*. Dabā, gliemezim virzoties uz zināmas modalitātes kairinātāju, tā taustekļu kustību virziens ir analogisks fizioloģiskajā testā iegūtajiem rezultātiem, proti, tausteklis var tikt noliekts uz priekšu mediālā vai laterālā virzienā attiecībā pret ķermeņa asi, taču tas nekad netiek saliekts un vienmēr paliek taisni izstiepts gareniskās ass virzienā. Uz augšu izstieptu taustekļu stāvoklis, kas arī reizēm ir novērojams gliemezim dabā, liecina, ka gliemezis savā tuvumā nav uztvēris zināmas sensorās modalitātes informāciju, uz kuru iekšējo motīvu (piem., izsalkuma, dzimumdziņas) vadīts virzītos gliemezis (Peschel & Teyke, 1995; Peschel, 1998). Un šādi uz augšu vērsti gliemeža taustekļi norāda, ka gliemezis atrodas meklēšanas pozīcijā.

#### 4.2. Neurosekrētu loma *Helix* taustekļa kustībās

Pēdējo gadu desmitu laikā molusku nervu sistēmā tiek atklāti arvien jauni peptīdi un amīdi, kuri ir zināmi arī mugurkaulnieku nervu sistēmā. Pārsteidzoša ir tā neurosekrētu darbības mehānisma īpatnība, ka dažādās neuro-muskulārajās sistēmās šo vielu pretējie efekti var tikt realizēti, iesaistoties vieniem un tiem pašiem sekundāro starpnieku mehānismiem.

Neurosekrēti atkarībā no to darbības rakstura viena organisma dažādās sistēmās var darboties gan kā hormoni, gan mediatori, gan arī modulatori. Darbā apskatītie neurosekrēti - *serotonīns* un *FMRF-amīds*, molusku neuro-muskulārajā sistēmā var uzrādīt gan neurohormonu, gan neiromediatoru, gan neiromodulatoru aktivitāti.

Serotonīnu saturošie neironi vīngliemezim *Helix pomatia* atrodas gan centrālajā nervu sistēmā, kā arī perifērajos audos (Vehovszky et al., 1993; Fuss, 1997). Dati par FMRF-amīdu saturošiem neironiem ir mazāk, bet ir zināms, ka tie ir sastopami cerebrālajā ganglijā (Cottrell et al., 1983; Falconer et al., 1993), viscerālajā un parietālajā ganglijos (Lehman & Greenberg, 1987), kā arī pedālajā ganglijā (Cottrell et al., 1992).

Abu minēto un šai darbā pētīto neurosekrētu darbība *Helix pomatia* neuro-muskulārajā sistēmā ir vērsta uz muskuļu darbības pielāgošanu apstākļiem, kad ir nepieciešamība paaugstināt kustību aktivitāti, piemēram, meklējot barību vai

labvēlīgākus dzīves apstākļus (Kupfermann, 1991; McPherson & Blankenship, 1991; Weiss et al., 1992; Satterlie, 1994).

#### 4.2.1. Serotonīna efekti molusku neuro-muskulārajās sistēmās

*Helix pomatia* neuro-muskulārajās sinapsēs mediatora funkciju veic acetilholīns; serotonīns veic šī gliemeža taustekļa muskuļa kontrakciju modulāciju. Pretstatā vairumam serotonīna efektu citu molusku neuro-muskulārajās sistēmās, *Helix* taustekļa muskulī serotonīns veicina kontrakciju amplitūdas samazināšanu un relaksācijas ātruma palielināšanu, kas sekmē kopējā muskuļa kontrakciju ilguma samazināšanu. Serotonīna efekts uz *Helix pomatia* taustekļa muskuļa kontrakcijām ir serotonīna koncentrācijas atkarīgs. Pie tam, serotonīna efekts uz kontrakciju ilgumu (hronotropais efekts) ir izteikts vairāk, un to izraisa arī serotonīna zemākas koncentrācijas nekā ietekmes uz kontrakciju amplitūdu (inotropo efektu). Arī citā *Helix* sugā, *Helix aspersa*, ir novērots, ka rīkles gludajā muskulatūrā serotonīna izsauktās kontrakciju kinētiskās pārmaiņas ir vairāk izteiktas kā kontrakciju amplitūdas izmaiņas (Lloyd, 1980 a,b). Jūras moluska sugā *Aplysia brasiliana* serotonīns analogiski veicina parapodiju muskuļu relaksācijas laika samazināšanos un kontrakciju frekvences ievērojamu pieaugumu (Parsons & Pinsker, 1989). Serotonīna ietekme uz muskuļa kontrakcijām ir pētīta un aprakstīta arī daudzu citu molusku neuro-muskulārajās sistēmās (*Aplysia*: Weiss et al., 1978; Sawada et al., 1984; McPherson & Blankenship, 1991; *Clione*: Satterlie, 1995; *Achatina*: Yoshida & Kobayashi, 1991; 1995), un vairumā gadījumu serotonīns izsauc kontrakciju amplitūdas palielināšanos. Retāk sastopams ir arī pretējais efekts, proti, serotonīna ietekmēta muskuļa kontrakciju amplitūdas samazināšana (Lloyd, 1980 a,b). Interesanti, ka vienā organismā serotonīns spēj izraisīt arī pretējus efektus uz dažādu muskuļu kontrakcijām, un kā galvenais iemesls tam ir koncentrācijas atkarīga serotonīna saistība ar dažādiem receptoriem (Boess & Martin, 1993; Delay et al., 1997).

Serotonīna izdalīšanās *Helix* taustekļa nerva-muskuļa sinapsē ir toniska. Uz to arī norāda elektrofizioloģiskie dati (Fuss, 1997; Fuss & Teyke, 1998). Stimulējot *Helix pomatia* cerebrālā ganglija neironu CV1, kurš ir serotonerģisks, tiek modulēta taustekļa muskuļa kontrakcijas. Elektriskās aktivitātes pieraksts no atsevišķiem

neironiem rāda, ka CV1 neirons tiek aktivēts gan taustekļa kustību laikā uz barības objektu, gan arī aizsardzības refleksa laikā. Tāpēc uzskats par ierobežotu serotonīna izdalīšanos tikai *Helix* paaugstinātas kustību aktivitātes laikā, domājams, ir maldīgs. Vairāk ticams, ka serotonērgisko neironu aktivitāte vērojama jebkura rakstura kustību laikā. izdalās pie visām taustekļa muskuļa kontrakcijām. Pie tam, CV1 neirona aktivācija pati par sevi neizsauc taustekļa muskuļa kontrakcijas, kas norāda, ka serotonīns un kontrakcijas izsaucošais mediators *acetilholīns* izdalās no dažādiem nervgaliem.

Relaksācijas ātruma pieaugums, ko sekmē serotonīns, var būt īpaši svarīgs gadījumos, kad ir nepieciešamas ātras taustekļa kustības. Šādos paaugstinātas kustību aktivitātes apstākļos serotonīns nodrošina ātras taustekļa kustības bez kontrakciju summācijas, kā to uzskatāmi rāda 7. attēls (nod. *Rezultāti*).

Daudzi pētījumi atspoguļo serotonīna nozīmi molusku barības meklēšanas laikā (Weiss et al., 1981; Kupferman & Weiss, 1982). Moluska serotonērgo šūnu "iztukšošana" ar 5,6-DHT ievērojami pagarina barības atrašanas laiku. Ar serotonērgo šūnu toksīnu *DHT* injicētiem dzīvniekiem, salīdzinot ar kontroles dzīvniekiem, ir nepieciešams ievērojami garāks laika periods, lai tie atrastu barības avotu. Tāpat ir ievērojami samazināta šādu dzīvnieku vispārējā kustību aktivitāte, kas var būt īpaši nelabvēlīga aizsardzības refleksu laikā (Teyke, 1996).

Detalizēta *Helix pomatia* taustekļu kustību analīze rāda, ka uz dažādiem barības objektiem dzīvnieki reaģē ar taustekļu noliekšanu, bet šīs reakcijas latentais periods ir atkarīgs no barības veida (Peschel et al, 1996). Iespējams, ka tādas latentā perioda izmaiņas saistītas ar serotonērgo neironu aktivitātēm. Tādejādi, pamatojoties uz literatūras datiem, var domāt, ka serotonīna "iztukšošana" gliemeža nervu sistēmā, samazina arī taustekļa muskuļu kustīgumu, un dzīvnieka orienācija un pārvietošanās telpā kļūst lēnāka.

Strauja muskuļu atslābšana pēc kontrakcijas ir īpaši svarīga kustību veidošanā organismiem ar hidrostatisko skeletu. Šāds hidrostatisks skelets, kurā nav kaulu, locītavu un antagonisko muskuļu grupu, ir raksturīgs arī moluskiem. Tādēļ, viena no priekšrocībām, ko nodrošina serotonīna iedarbība uz muskuli molusku organismā, ir atsevišķu muskuļu ātra relaksācija, kas, pieļauj muskuļu ātras un precīzas kustības.

#### 4.2.2. FMRF-amīda efekti molusku neuro-muskulārajās sistēmās

FMRF-amīds vairumā pētījumos ar bezmugurkaulniekiem, tai skaitā ar moluskiem, tiek apskatīts kā neiromediators. Tas izsauc kontrakcijas, piemēram, molusku sirds muskulī un rīkles gludajā muskulatūrā (Lehman & Greenberg, 1987), kā arī taustekļa muskuļos (Cottrell et al., 1983; Falconer et al., 1993). Manā pētījumā iegūtie dati par FMRF-amīdu kā mediatoru ir sasakaņā ar literatūrā aprakstīto. FMRF-amīds, gluži tāpat kā acetilholīns, spēj izsaukt muskuļa kontrakcijas. Taču, visticamāk, šo abu vielu kontrakcijas izsaucošie mehānismi, ir atšķirīgi. To norāda arī ar šīm vielām izsaukto taustekļa muskuļa kontrakciju latentie periodi, kuri būtiski atšķiras: ar ACh izsaukto kontrakciju latentais periods bija 0.3 sek, bet ar FMRF-amīdu izsaukto kontrakciju latentais periods bija būtiski garāks -  $3.35 \pm 0.3$  sek.

Šobrīd ir zināms, ka FMRF-amīda iedarbība realizējas, tam saistoties pie specifiskiem receptoriem šūnas membrānā (Gayton, 1984) Taču par FMRF-amīda receptoru struktūras īpatnībām un klasifikāciju, kā arī signāla transdukcijas mehānismiem šūnā vēl ir daudz neizzināta.

No literatūras ir zināms, ka FMRF-amīds aktivē  $PIP_2$  sekundāro starpnieku sistēmu šūnā (Falconer et al., 1993; Nelson & Huddart, 1994). Tādejādi iespējams, ka arī FMRF-amīda spēja izsaukt taustekļa muskuļa kontrakcijas ir saistīta ar amīda aktivēto  $IP_3$  koncentrācijas pieaugumu šūnā un sekojošu  $Ca^{2+}$  izdalīšanos no  $IP_3$  - atkarīgajām intracelulārajām kalcija krātuvēm.

*Helix* taustekļa muskuļa neuro-muskulārajā sistēmā FMRF-amīds darbojas ne tikai kā mediators, kurš izsauc muskuļa kontrakcijas, bet arī kā modulators, kurš izsauc kontrakciju rakstura izmaiņas. Pie tam, kā modulators FMRF-amīds darbojas zemākās koncentrācijās nekā mediators.

Šai pētījumā *Helix* taustekļa muskuļa kontrakcijas tika izsauktas, ja FMRF-amīda koncentrācija bija  $10^{-6}$  M, taču FMRF-amīda spēja modulēt elektriska nevu kairinājuma rezultātā izsauktās kontrakcijas tika uzrādīta, ja FMRF-amīda koncentrācija par divām kārtām zemāka -  $10^{-8}$  M. Tādejādi domājams, ka FMRF-amīda primārais efekts *Helix* taustekļa muskulī ir kontrakciju modulācija, kura notiek pie zemākām FMRF-amīda koncentrācijām.

Pētījumi ar *Helix aspersa* rāda, ka FMRF-amīds taustekļa nerva-muskuļa sinapsē izdalās no tiem pašiem nervgaliem, no kuriem izdalās kontrakcijas

izsaucošais mediators *acetilholīns* (Cottrell et al., 1983; Bewick et al., 1990). Ņemot vērā, abu *Helix* sugu - *Helix aspersa* un *Helix pomatia*, daudzu struktūru morfoloģisko līdzību, nevar izslēgt, ka arī mūsu pētījuma dzīvniekam - *Helix pomatia*, FMRF-amīds un acetilholīns ir ko-mediatori, kuri izdalās no vieniem un tiem pašiem neironiem. Taču precīzu un viennozīmīgu FMRF-amīdu sekretējošo neironu identifikācija *Helix pomatia* un citu dzīvnieku nervu sistēmā jāuzskata par aktuālu un būtisku pētījumu uzdevumu.

Domājams, ka FMRF-amīds *Helix* organismā pastiprināti izdalās un darbojas kā mediators tad, ja organisms ir nonācis ekstremālās un stresa situācijās, kā piemēram, nelabvēlīgas apkārtējās vides apstākļos. Šādos apstākļos, kad ir nepieciešama pastiprināta aktivitāte organismam nelabvēlīgās situācijas novēršanai, FMRF-amīds, pastiprināti izdaloties sinapsē, var veikt mediatora funkciju. Šāda īslaicīga mediatora funkcijas „pārņemšana” organismam var būt īpaši nozīmīga tad, ja kontrakcijas izsaucošā mediatora - acetilholīna - krājumi presinaptiskajā neironā ir samazinājušies vai pat izsīkuši.

### **4.3. Taustekļa nerva-muskuļa sinapses fizioloģija**

#### **4.3.1. Holinērgiskās sinapses**

Kā jau tika minēts iepriekš, *acetilholīns* ir mediators, kurš izsauc *Helix pomatia* taustekļa muskuļa kontrakcijas. Pētījuma gaitā tika noskaidrots, ka acetilholīna izsaukto taustekļa muskuļa kontrakciju vispilnīgāko farmakoloģisko blokādi veic *d-tubokurārīns*, kurš ir zināms kā mugurkaulnieku skeleta muskuļu un veģetatīvo gangliju N-holinērgisko receptoru blokators (Range & Dale, 1987). Tādejādi, pēc holinērgisko receptoru tipa *Helix pomatia* taustekļa muskuli var uzskatīt par šķērsvītrotu muskuli. Toties pēc sinapses uzbūves muskuļa struktūra ir tuvāka gludajai muskulatūrai.

Šāds abu muskuļu tipu raksturīgo īpatnību apvienojums vērojams arī dažu citu molusku muskuļos (Buma, 1988; Ram et al., 1994). Šķiet, interesants ir fakts, ka, piemēram, jūras moluska *Aplysia* bukālajā muskulī ir abu tipu - N- un M-holinērgiskie receptori (Ram et al., 1994). Turpretī, mugurkaulnieku muskuļos šo holinērgisko receptoru atrašanās ir stingri diferencēta - N-holinoreceptori atrodas skeleta



šķērsvītrotajos muskuļos, bet M-holinoreceptori - gludajos muskuļos. Tādejādi šis *Aplysia* muskulis apvieno abu muskuļu tipu īpatnības.

#### 4.3.2. Serotonēģiskās sinapses

Pētījuma rezultāti norādīja uz to, ka serotonīna modulējošā iedarbība uz taustekļa muskuli ir postsinaptiska, t.i., serotonīns iedarbojas tieši uz muskuļa šūnām un nevis presinaptiski uz acetilholīna izdalīšanos (skat. *Rezultāti* 3.4.1.???) Bezmugurkaulnieku organismos vairums sinapšu pie muskuļu šūnām ir polineironālas, t.i., kontrakciju izsaucošo un modulējošo sekrētu izdalošie nervgali veido kopēju sinapi ar muskuļa šķiedru (Shepherd, 1994).

Elektrofizioloģiskie pētījumi ar *Helix pomatia* ir parādījuši, ka taustekļa muskuļa kontrakcijas izsaucošais mediators - *acetilholīns* - un kontrakciju raksturu mainošais modulators - *serotonīns* - izdalās no dažādiem presinaptiskajiem neironiem (Fuss, 1997). Taču šobrīd nav skaidru pierādījumu, vai bez *serotonīna*, no tiem pašiem presinaptiskajiem nervgaliem neizdalās vēl kādi citi neurosekrēti, kā piemēram, histamīns, dopamīns vai glicīns, kuri arī ir plaši izplatīti *Helix* nervu sistēmā.

Par *Helix* ķermeņa muskulatūras serotonēģo inervāciju šobrīd ir veikti salīdzinoši maz pētījumu; vairums pētījumu ir veltīti, galvenokārt, iekšējo orgānu maisa muskuļu serotonēģai inervācijai (Bogusch, 1972; Lloyd, 1980 *a,b*; S.-Rozsa, 1984). Mikroskopiskie pētījumi rāda, ka serotonēģie aksoni neveido īstus sinaptiskus kontaktus pie muskuļu šūnām (Heyer et al., 1973). Tādejādi, transmitterim izdaloties sinaptiskajā zonā, domājams, tiek panākta vairāk vai mazāk humorāla iedarbība uz vairākiem muskuļiem. Šķiet, pieņemams ir uzskats, ka molusku muskuļos neurosekrēts izdalās efektororgāna tuvumā, un nav saistīts ar ierobežotu sinaptisko apvidu. Šobrīd gan nav īsti zināms, cik plaša ir transmittera distantā iedarbība, taču vairāki pētījumi liecina par to, ka serotonīna darbība tomēr ir telpā ierobežota. Tā piemēram, *Aplysia brasiliana* parapodiju muskuļos serotonīns izdalās audos bez specializētas nervu-muskuļu sinapses veidojuma. Tomēr serotonīna modulējošā iedarbība ir izteikta tikai uz noteiktu muskuļu šūnu grupu, kuras ir saistītas ar noteiktiem motoneironiem (McPherson & Blankenship, 1991).

#### 4.4. Serotonīna darbības molekulārie mehānismi

Izzinot serotonīna molekulāros mehānismus, tika noskaidrots, ka serotonīna inotropais efekts ir saistīts ar serotonīna iedarbību uz ACh receptoriem. To pierāda eksperimentu sērija, kurā ACh receptoru darbība tika inhibēta ar *d-tubokurarīnu*, un taustekļa muskuļa kontrakcijas tika iegūtas tieši elektriski kairinot muskuli. Šādos apstākļos  $10^{-6}$  M serotonīna inotropais efekts tika kavēts, tai pašā laikā saglabājoties serotonīna hronotropajam efektam.

Serotonīns ir zināms kā mugurkaulnieku gan skeleta muskuļu, gan gangliju N-holinērgisko receptoru daļējs inhibitors (Garcia-Colunga & Miledi, 1996). Acetilholīna efektu serotonīns spēj inhibēt, saistoties pie ACh receptoru dažādām apakšvienībām. Arī mūsu iepriekšējās eksperimentu sērijās pierādījās, ka ACh receptori *Helix pomatia* taustekļa neuro-muskulārajās sinapsēs ir N-holinoreceptori. Arī serotonīna modulējošais efekts nespēja pilnīgi izpausties uz kontrakciju spēku, ja ACh receptori tika inhibēti, un kontrakcijas tika iegūtas tiešas muskuļa šūnu depolarizācijas ceļā, elektriski kairinot muskuli.

Taču serotonīna efekti galvenokārt ir saistāmi nevis ar serotonīna iedarbību ar ACh receptoriem, bet gan specifiskajiem 5-HT receptoriem. Tādēļ, lai noskaidrotu serotonīna darbības molekulāros mehānismus, uzmanība tika pievērsta serotonīna receptoru tipa noskaidrošanai. Pēc *Gerhardt* un *van Heerikhuizen* (Gerhardt & van Heerikhuizen, 1997) šobrīd ir zināmi 7 mugurkaulnieku serotonīna receptoru tipi, kur katram tipam ir vairāki apakštipi. Vairumam serotonīna receptoru ir zināmi arī to aktivācijas molekulārie mehānismi. Neskatoties uz lielo serotonīna receptoru daudzveidību, vairumā gadījumu serotonīna iedarbība ar šiem receptoriem ir saistīta ar G-proteīna saistīto sekundāro starpnieku sistēmu. Un tikai 5-HT<sub>3</sub> tipa receptoru aktivācija tieši sekmē membrānas jonu kanālu aktivitātes izmaiņas (skat. *levadu*).

Šāda receptoru un to aktivēto sekundāro starpnieku sistēmu daudzveidība organismā ievērojami paplašina neurotransmiteru iedarbības efektus, un tādejādi viena viela organismā spēj izsaukt daudzveidīgas celulārās un fizioloģiskās atbildes reakcijas.

Zinot serotonīna receptoru tipu, ir iespējams noteikt arī tā darbības aktivētās molekulāro mehānismu sistēmas muskuļa šūnās. Tāpēc arī mēs, noskaidrojot

serotonīna darbības molekulāros mehānismus, vispirms pievērsāties tā receptoru tipa noskaidrošanai.

Vairāki pētījumi ar moluskiem ir norādījuši, ka pastāv strukturāla un funkcionāla līdzība starp molusku un mugurkaulnieku serotonīna receptoriem (Ram et al., 1994; Walcourt-Ambakederemo & Winlow, 1994; Li et al., 1995). Pamatojoties uz šiem pierādījumiem, tika veikti eksperimenti, lai noskaidrotu serotonīna receptoru tipu *Helix pomatia* taustekļa neuro-muskulārajās sinapsēs.

Lietojot mugurkaulnieku selektīvo serotonīna 5-HT<sub>1A</sub> receptoru antagonistu NAN 190, tas nomāca serotonīna efekta izpausmi taustekļa muskuļa kontrakcijām, norādot uz iespējamo taustekļa muskuļa receptoru līdzību ar mugurkaulnieku serotonīna receptoriem. Līdzīgi kā *Helix* muskuļos, arī *Aplysia* bukālās masas muskuļos, NAN 190 inhibē serotonīna efekta izpausmi (Ram et al., 1994). Vēl jo vairāk, moluska *Lymnaea* serotonīna 5-HT<sub>1ym</sub> receptoru klonēšana ir pierādījusi šo molusku receptoru sekvenču lielo līdzību ar mugurkaulnieku 5-HT<sub>1A</sub> receptoriem (Sugamori et al., 1993).

Interesanti, ka mugurkaulnieku 5-HT<sub>1A</sub> receptoru aktivācija sekmē intracelulārā cAMP koncentrācijas **samazināšanu** (Adham et al., 1993). Taču, kā jau tika minēts iepriekš (skat. nod. *Rezultāti*), vairumā no izpētītajām molusku neuro-muskulārajām sistēmām, serotonīns palielina muskuļa kontrakciju amplitūdu, **palielinot** intracelulāro cAMP koncentrāciju. Saskaņā ar mūsu pētījuma rezultātiem moluska *Helix pomatia* taustekļa muskulatūra šajā ziņā ir citāda: serotonīna ietekmē kontrakciju amplitūda un ilgums samazinājās. Tas ļauj izvirzīt hipotēzi, ka *Helix pomatia* taustekļa muskuļa šūnu membrānās ir mugurkaulnieku muskuļos identificētiem serotonīna 5-HT<sub>1A</sub> receptoriem līdzīgi receptori, kuru aktivācija izraisa intracelulārā cAMP samazināšanos, kas sekmē kontrakciju amplitūdas un ilguma samazināšanos. Taču rezultāti, ko ieguvām eksperimentos, meklējot šīs hipotēzes apstiprinājumu, ir pretrunīgi.

Eksperimentāli palielinot cAMP koncentrāciju šūnā, lietojot 8-Br-cAMP, tika panāktas savdabīgas *Helix pomatia* taustekļa muskuļa kontrakciju izmaiņas. Pēc izolētā nervu-muskuļa preparāta inkubācijas proteāzē, kas veicina 8-Br-cAMP iekļūšanu muskuļa šūnās, kontrakciju amplitūda un ilgums palielinājās, taču šīs kontrakciju ilguma pieaugums ir saistāms ar amplitūdas izsaukto pieaugumu.

Tādejādi varētu domāt, ka cAMP koncentrācijas samazināšanās izsauc pretējo efektu - amplitūdas un ilguma samazināšanos, kā tas ir vērojams arī mugurkaulnieku serotonīna 5-HT<sub>1A</sub> receptoru aktivācijas gadījumā.

Taču šai hipotēzei pretrunīgus pierādījumus sniedz intracelulārā cAMP mērījumi, kuri tika veikti *Helix pomatia* taustekļa muskuļa šūnās Maincas Universitātes Neuroetoloģijas laboratorijā (rezultāti apkopoti rakstā, kas atrodas iespiešanās, Ozolina et al.): kontroles apstākļos taustekļa muskuļa 1 mg proteīna satur 5.2 pM cAMP. Līdzīga cAMP koncentrācija ir konstatēta arī *Aplysia* bukālā muskuļa šūnās (Weiss et al., 1979; Ram et al., 1983; Brezina et al., 1994). Intracelulārā cAMP pieaugums vērojams līdz ar serotonīna koncentrācijas palielināšanu. Tā piemēram, 10<sup>-9</sup> M serotonīns sekmē cAMP koncentrācijas pieaugumu *Helix pomatia* muskuļa šūnās līdz 7.1 pM/1mg proteīna masas, un līdz 7.9 pM/1mg serotonīna koncentrācijā 10<sup>-6</sup> M. Serotonīns koncentrācijā 10<sup>-3</sup> M palielina cAMP koncentrāciju līdz 9.7 pM. Taču arī šis cAMP koncentrācijas pieaugums ir salīdzinoši neliels un nedod pat divkārtīgu cAMP koncentrācijas pieaugumu, kā tas ir vērojams citās molusku neuro-muskulārajās sistēmās, kur serotonīns izsauc 100- un pat 1000-kārtīgu cAMP koncentrācijas pieaugumu (Weiss et al., 1979; Weiss et al., 1981; Ram et al., 1983; Brezina et al., 1994).

Veicot intracelulārā cAMP mērījumus 8-Br-cAMP (10<sup>-3</sup> M) klātbūtnē, tika konstatēts, ka cAMP koncentrācija palielinājās līdz 53.3 pM/1mg, kas ir 10-kārtīgs cAMP pieaugums, kurš arī liecina, ka 8-Br-cAMP vismaz daļēji izkļūst cauri taustekļa muskuļa membrānai.

Tādejādi jāsecina, ka serotonīna modulējošā iedarbība *Helix* taustekļa muskulī nav viennozīmīgi saistāma ar cikliskā AMP sekundāro starpnieku sistēmu, kā tas ir daudzās citās molusku pētītajās neuro-muskulārajās sistēmās. Jāsecina arī, ka *Helix pomatia* taustekļa muskuļu serotonīna receptori nav viennozīmīgi identificējami kā 5-HT<sub>1A</sub> receptori, kaut arī eksperimentos tika novērota NAN 190 (5-HT<sub>1A</sub> receptoru antagonists) spēja bloķēt serotonīna efektus. Tādejādi, neskatoties uz *Helix* serotonīna receptoru farmakoloģisko līdzību mugurkaulnieku 5-HT<sub>1A</sub> receptoriem, tomēr atšķirīgi ir to aktivētie molekulārie mehānismi šūnās. Tas ļauj secināt, ka ne vienmēr bezmugurkaulnieku receptori var tikt raksturoti pēc to līdzības mugurkaulnieku receptoriem. Arī atsevišķi pētījumi ar *Helix aspersa* ir norādījuši uz serotonīna receptoru dažādu apakštīpu būtiskām atšķirībām no šo receptoru

analogiem mugurkaulnieku neuro-muskulārajā sistēmā (Vehovszky & Walker, 1991; Green et al., 1996).

Pilnīgi iespējams, ka *Helix pomatia* taustekļa muskuļa šūnās cAMP ir sekundārais starpnieks, kurš ir iesaistīts citās modulatorās sistēmās, taču cAMP iesaiste serotonīna efekta realizācijā ir uzskatāma par maznozīmīgu.

Neskatoties uz to, ka cAMP sekundārā starpnieku sistēma, kura ir ar G-proteīna molekulāro reakciju ķēdes posms, nav dominējošā serotonīna efekta realizācijā, tas neizslēdz citu G-proteīna aktivēto sekundāro starpnieku sistēmu līdzdalību šajā efektā.

Eksperimenti ar GTP- $\gamma$ -S norādīja, ka serotonīna efekta realizācijā taustekļa muskulī, piedalās ar G-proteīnu saistītie serotonīna receptori. Pētījuma gaitā gan netika noskaidrots šo receptoru tips un to iespējamā līdzība mugurkaulnieku receptoriem.

Eksperimentos ar membrāncaurlaidīgo G-proteīna analogu - GTP- $\gamma$ -S - šī viela daļēji atdarināja serotonīna efektu uz *Helix* taustekļa muskuļa kontrakcijām, samazinot kontrakciju ilgumu, kā arī samazināja serotonīna iedarbības izpausmes. Acīmredzot, GTP- $\gamma$ -S, difundējot muskuļa šūnas membrānā, ir izsaucis noteiktas sekundāro starpnieku sistēmas aktivāciju, kura sekmē kontrakciju ilguma samazināšanos. Pieņemot, ka šo sekundāro starpnieku aktivāciju citkārt veic serotonīns, tam saistoties pie ar G-proteīnu saistītajiem receptoriem, GTP- $\gamma$ -S klātbūtnē serotonīns vairs nespēja vēl vairāk izmainīt šīs sekundāro starpnieku sistēmas aktivitāti, un tādēļ arī serotonīna efekts neizpaudās. Tomēr eksperimenti ar GTP- $\gamma$ -S norādīja, ka GTP- $\gamma$ -S klātbūtnē serotonīna iedarbība ir tikai daļēji kavēta (GTP- $\gamma$ -S klātbūtnē serotonīns samazināja kontrakciju ilgumu  $T_{50\%relax}$  līdz 62%, bet standarta fizioloģiskajā šķīdumā līdz 35%). Tas ļauj domāt, ka serotonīna kopējais efekts *Helix* taustekļa muskulī realizējas serotonīnam, iespējams, saistoties pie vēl citu tipu serotonīna receptoriem, kuri nav ar G-proteīnu saistītie receptori. Šādi receptori ir zināmi mugurkaulnieku organismā kā 5-HT<sub>3</sub> tipa receptori.

Cits izskaidrojums tam, ka GTP- $\gamma$ -S pilnībā neatdarināja serotonīna efektu, ir varbūtība, ka pētījumā izmatotās GTP- $\gamma$ -S koncentrācijas bija par zemām, un,

iespējams, paaugstinot GTP- $\gamma$ -S koncentrāciju, būtu iespējams sasniegt serotonīna efekta pilnīgu atdarināšanu ar GTP- $\gamma$ -S.

Tādejādi pētījuma gaitā tika noskaidrots, ka serotonīna efekts *Helix* neiro-muskulārajā sistēmā realizējas ar G-proteīna atkarīgo sekundāro starpnieku sistēmu, taču vairāk ticams, ka ar vairākām sekundāro starpnieku sistēmām.

Serotonīna mijiedarbības rezultātā ar specifiskajiem receptoriem šūnā tiek aktivēti noteikti sekundāro starpnieku mehānismi, un šī procesa rezultātā tiek izmainītas jonu plūsmas šūnā. Gan mugurkaulnieku, gan bezmugurkaulnieku organismos serotonīns ir zināms gan kā ekstracelulārā, gan intracelulārā kalcija jonu plūsmu izmainītājs. Tādēļ vairākas šī pētījuma eksperimentu sērijas tika veltītas serotonīna ietekmes izpētei uz kalcija jonu plūsmām šūnā.

Šūnas virsmas membrānas kalcija kanālu aktivitāti serotonīns spēj izmainīt vai nu tieši, saistoties pie liganda vadītajiem kalcija jonu kanāliem (5-HT<sub>3</sub> receptoriem), vai netieši, aktivējot noteiktas sekundāro starpnieku sistēmas šūnā. Tā piemēram, mugurkaulnieku aortas gludajā muskulatūrā serotonīns aktivē IP<sub>3</sub> sekunādrā starpnieka sistēmu, kā rezultātā selektīvi izmaina L-tipa kalcija kanālu aktivitāti un sekmē kalcija ieplūdi šūnā (Hirakawa et al., 1995; Florian & Watts, 1998). L-tipa kalcija kanālu aktivitāte mugurkaulniekiem serotonīna ietekmē var tikt izmainīta arī caur cAMP sekundārā starpnieka sistēmu. Taču piemēram, *Xenopus* kāpura neironos serotonīns, saistoties pie specifiskiem receptoriem (5-HT<sub>1A</sub> un 5-HT<sub>1D</sub>) un aktivējot noteiktus sekundāro starpnieku mehānismus, inhibē T-, N- un P/Q-tipa šūnas virsmas membrānas kalcija kanālu aktivitāti (Sun & Dale, 1997).

Tikpat daudzveidīga kā serotonīna ietekme uz šūnas virsmas membrānas kalcija kanāliem, ir zināma arī serotonīna iedarbība uz intracelulāro kalcija krātuvi membrānu kanāliem. Gan mugurkaulnieku, gan bezmugurkaulnieku muskuļu šūnās ir divu veidu kalcija krātuves, no kurām kalcija atbrīvošanās notiek atšķirīgu regulatoru ietekmju rezultātā. Kalcija krātuves, kas atrodas šūnas perifērijā, tuvāk šūnas virsmas membrānai, ir Ca<sup>2+</sup>-atkarīgās kalcija krātuves (dažkārt tiek sauktas arī par kofeīna-atkarīgajām, vai arī rianodīna-atkarīgajām kalcija krātuvēm). Ca<sup>2+</sup> atbrīvošanās no šīm krātuvēm, ir atkarīga no Ca<sup>2+</sup> koncentrācijas šūnas citoplazmā. Mūsu eksperimentu sērijas ar kofeīnu un rianodīnu sniedza tiešu apliecinājumu tam,

ka šīs kalcija krātuves ir arī mūsu pētāmajā objektā *Helix pomatia*. Otrs intracelulāro  $\text{Ca}^{2+}$  krātuļu veids, kuras vairāk lokalizētas šūnas centrā, ir  $\text{IP}_3$ -atkarīgās kalcija krātuves. Savkārt, kalcija atbrīvošanu no šīm krātuļām regulē  $\text{IP}_3$  (Kostyuk & Kirischuk, 1993).

Pamatojoties uz pētījumā iegūtajiem rezultātiem, domājams, ka serotonīnam ir specifiska, īpatnēja ietekme gan uz intracelulārā, gan ekstracelulārā kalcija plūsmām.

Mūsu eksperimentos ar L-tipa kalcija kanālu inhibitoru *nifedipīnu* apstiprinājās, ka nifedipīns ( $5 \times 10^{-7}$  M) nemaina elektriski izraisīto kontrakciju amplitūdu, kas liecina, ka  $\text{Ca}^{2+}$  ieplūde caur L-tipa kanāliem šajā objektā nepiedalās kontrakciju norisē. Taču, acīmredzot, nifedipīns aktivē  $\text{Ca}^{2+}$ - sūkni un  $\text{Ca}^{2+}$  atpakaļatsūkņēšanu no šūnas citoplazmas, un tādēļ arī kontraktīvu relaksācijas fāzes ilgums nifedipīna klātbūtnē samazinājās.

Serotonīna efekts nifedipīna klātbūtnē neizpaužas. Tāpēc nevar teikt, ka serotonīns izmaina L-tipa  $\text{Ca}^{2+}$  ieplūdi šūnā. Varētu domāt, ka šai ieplūdei ir nozīme tajos objektos, kur serotonīns izraisa amplitūdas pieaugumu. Iespējams, ka šajos objektos kontrakciju, vismaz daļēji, izraisa tieši tas  $\text{Ca}^{2+}$ , kas ieplūst šūnā pa L-tipa  $\text{Ca}^{2+}$  kanāliem.

Serotonīna klātbūtnē  $\text{Ca}^{2+}$  ieplūst šūnā arī pa ligandu vadītajiem jonu kanālu receptoriem ( $5\text{-HT}_3$  receptoriem). Iespējams, ka nifedipīns un serotonīns konkurē par vienām un tām pašām piesaistes vietām. Taču nav zināms, vai šīs piesaistes vietas ir tikai L-tipa  $\text{Ca}^{2+}$  kanāli. Ja atbilde ir apstiprinoša, nav zināms arī, vai serotonīns ir šo kanālu agonists vai antagonists.

Tomēr arī elektriska motoneironu kairinājuma un acetilholīna izraisītajās kontrakcijās *Helix pomatia* muskuļos depolarizācija atver L-tipa  $\text{Ca}^{2+}$ -kanālus un  $\text{Ca}^{2+}$  ieplūst šūnā (taču šis kalcijs nav svarīgs kontrakciju norisei), un, protams, ka intracelulārais kalcijs modulē daudzu sekundāro starpnieku sistēmu aktivitāti.  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  šai darbā gan nav mērīts, taču eksperimentu sērijas dažādu kalcija koncentrāciju šķīdumos pierāda serotonīna efektu neatkarību no  $[\text{Ca}^{2+}]_o$ .

Taču kontrakcijai, tieši tās saraušanās fāzei, tiek izmantots kalcijs, kurš atrodas iekšēju  $\text{Ca}^{2+}$  krātuļās. Un tieši serotonīna inotropais efekts, domājams, ir saistīts ar serotonīna ietekmi uz intracelulāro kalciju, kurš deponēts  $\text{IP}_3$ - un rianodīna-atkarīgajās  $\text{Ca}^{2+}$ - krātuļās. Serotonīna ietekmi uz rianodīna-atkarīgajām

$\text{Ca}^{2+}$ -krātuvēm pierāda serotonīna nespēja modulēt, proti, samazināt kontrakciju amplitūdu, rianodina klātbūtnē. Tādejādi, apstākļos, kad intracelulārajās  $\text{Ca}^{2+}$ -krātuvēs piesaistes vietu receptorā ir aizņēmis rianodins, serotonīna iedarbība ir neefektīva.

$\text{Ca}^{2+}$  izdalīšanās no  $\text{IP}_3$ -atkarīgajām  $\text{Ca}^{2+}$ -krātuvēm darbā netika pētīta, taču šajās  $\text{Ca}^{2+}$ -krātuvēs deponētais kalcijs, domājams, ir galvenais kontrakcijām nepieciešamais  $\text{Ca}^{2+}$  avots. Un  $\text{Ca}^{2+}$  izdalīšanās no  $\text{IP}_3$ -atkarīgajām  $\text{Ca}^{2+}$ -krātuvēm var tikt regulēta ar daudzu sekundāro starpnieku mehānismu starpniecību (...att.). Un ir zināms, ka serotonīns, saistoties pie specifiskajiem receptoriem, spēj ietekmēt šīs visas sekundāro starpnieku sistēmas: ciklisko nukleotīdu sistēmu,  $\text{PIP}_2$  metabolītu sistēmu un brīvo  $\text{Ca}^{2+}$  jonu sekundāro starpnieku sistēmu.

Tādejādi, serotonīna ietekme uz kontrakciju amplitūdu realizējas, serotonīnam samazinot  $\text{Ca}^{2+}$  izdalīšanos no rianodīna- atkarīgajām, kā arī  $\text{IP}_3$ -atkarīgajām  $\text{Ca}^{2+}$ -krātuvēm.

Mūsu pētījuma vairāku eksperimentu sēriju rezultāti apliecināja serotonīna modulējošo ietekmi uz *Helix* taustekļa muskuļa kontrakciju ilgumu. Kontrakciju atslābšanas fāzes ilgums serotonīna ietekmē samazinājās:

1) ja taustekļa kontrakcijas tika izraisītas kustību nervu elektriska kairinājuma gadījumā:

- standarta fizioloģiskajā šķīdumā;
- fizioloģiskajā šķīdumā ar paaugstinātu kalcija koncentrāciju;
- fizioloģiskajā šķīdumā ar kofeīnu;
- fizioloģiskajā šķīdumā ar intracelulāro kalcija krātuvju kalcija kanālu inhibitoru - rianodīnu;

inhibitoru - rianodīnu;

2) ar kofeīnu izraisītu taustekļa muskuļa kontrakciju gadījumā standarta fizioloģiskajā šķīdumā.

Tātad serotonīns spēj samazināt kontrakciju ilgumu pat tad, ja kontrakciju izraisošie faktori un pašas kontrakciju saraušanās fāzes parametri (amplitūda, straujums), ir izmainīti.

Kontrakciju atslābšanas fāzes kinētiku noteicošais faktors jebkurā gadījumā ir palielināta  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ; samazināšanas straujums.  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  normalizēšanos nodrošina aktīvi



sūkņi (resp.,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-āzes), kas atrodas gan šūnas virspusējā, gan intracelulāro  $\text{Ca}^{2+}$  depo struktūru membrānās.

Iegūtie rezultāti, mūsaprāt, ir tiešs apliecinājums vienam no serotonīna daudzpusīgā modulējošā efekta mehānismiem, proti, aktivējoša ietekme uz kalcija sūkņiem.

Tādejādi pētījuma gaitā ir pierādīts, ka parka vīngliemeža *Helix pomatia* lielo acu taustekļu kustības nodrošinošie iekšējais un ārējais taustekļa nervs - *nervus peritenticularis interna & externa*- iziet no cerebrālā ganglija un ieiet taustekļa muskuļi, kur šie nervi zarojas, un atsevišķie atzarojumi nekrustojoties, iet paralēli līdz taustekļa galotnei.

Nervu elektrisks kairinājums *in vitro* izolētā taustekļa nervu-muskuļa preparātā izsauc taustekļa kustības, kuras ir līdzīgas *in vivo* gliemeža taustekļa kustībām dabā.

Tika noskaidrots, ka taustekļa mioneirālajā sinapsē ir N-tipa holinērgiskie receptori.

No literatūras datiem un pētījumiem laboratorijā ir zināms, ka molusku nervu sistēma satur daudzas peptīdu un amīdu dabas vielas, kuras organismā var darboties gan kā hormoni, gan mediatori, gan modulatori. Arī vīngliemeža taustekļa nervos ir pierādītas gan serotonīnu saturošās, gan FMRF-amīdu saturošās šķiedras. Pētījumā tika konstatēts, ka gan serotonīns, gan FMRF-amīds uz taustekļa muskuļi darbojas modulatori, izmainot muskuļa kontrakciju raksturu. Serotonīns sekmē taustekļa muskuļa kontrakciju spēka un atslābšanas fāzes ilguma samazināšanu, bet FMRF-amīds palielina kontrakciju spēku, tai pašā laikā, samazinot kontrakciju atslābšanas fāzes ilgumu. Līdzās FMRF-amīda modulatorai aktivitātei, ir pierādītas arī tā mediatora īpašības, jo augstā koncentrācijā FMRF-amīds sēj izsaukt *Helix* taustekļa muskuļa kontrakcijas. Abu neirosekrētu -serotonīna un FMRF-amīda- iedarbība uz taustekļa muskuļa kontrakciju ilgumu ir vairāk izteikta, kā uz spēku. Tādejādi, serotonīna un FMRF-amīda dominējošais efekts ir taustekļa muskuļa kontrakciju relaksācijas ātruma palielināšana. Šāda serotonīna un FMRF-amīda iedarbība ir īpaši svarīga organismiem ar hidrostatisko skeletu, kuriem iztrūkst antagonisko muskuļu, kas sekmētu kontrahējošo muskuļu atgriešanos izejas stāvoklī.

Tā kā vīngliemezīm lieli acū taustekļi satur gan acis, gan ožas epitēliju, proti, galvenos sensoros orgānus, kas vīngliemezīm ļauj distanti uztvert informāciju no apkārtējās vides, tad taustekļu kontrakciju ātruma palielināšana var būt nozīmīga gliemeža orientētai kustībai apkārtējā vidē.

Noskaidrojot serotonīna iedarbības molekulāros mehānismus, ir pierādīts, ka serotonīna iedarbība *Helix* taustekļa neuro-muskulārajā sinapsē ir postsinaptiska, serotonīnam tieši iedarbojoties uz taustekļa muskuļa šūnām, un nevis presinaptiski uz kustību neironu. Serotonīna efekts uz kontrakciju amplitūdu un ilgumu realizējas ar atšķirīgiem, bet savstarpēji saistītiem sekundāro starpnieku mehānismiem.

Pētījums parādīja, ka serotonīna inotropais efekts ir neatkarīgs no  $[Ca^{2+}]_o$  koncentrācijās, taču to ietekmē  $[Ca^{2+}]_i$  izmaiņas. Serotonīna ietekme uz kontrakciju amplitūdu tiek realizēta, samazinoties  $Ca^{2+}$  atbrīvošanai no intracelulārajām rianodīna- un, domājams, arī  $IP_3$ -atkarīgajām  $Ca^{2+}$ -krātuvēm.

Taču hronotropā efekta realizācija ir saistīta ar  $Ca^{2+}$ -sūkņu aktivāciju, kuru sekmē serotonīns.

Šīs serotonīna iedarbības tiek panāktas, serotonīnam saistoties gan pie ar G-poteīna saistītajiem receptoriem, kā arī ligandu vadītajiem jonu kanāliem, kā arī inotropā efekta realizācija iesaistās acetilholīna receptori. Atšķirībā no vairuma citu molusku pētītajām neuro-muskulārajām sistēmām, cAMP sekundāro starpnieku sistēma nav dominējošā serotonīna efekta realizācijā.

Tādejādi, serotonīna iedarbības rezultātā tiek panākta *Helix pomatia* taustekļu muskuļu kontrakciju modulācija, kura ir nozīmīga vīngliemeža orientētajai telpā.

## SECINĀJUMI

1. Gliemeža *Helix pomatia* taustekļa nervi - *n. peritenticularis interna & externa*, kuri sākas cerebrālajā ganglijā, veic acu taustekļu motoro inervāciju, un, ieejot muskulī, abi nervi vairākkārt dalās un nekrušojoties iet paralēli gareniskai asij līdz pat taustekļa galotnei.
2. *Helix pomatia* taustekļa mioneirālajā sinapsē ir N-holinoreceptori, kuru efektīvu farmakoloģisko blokādi veic *d-tubokurarīns*. *Helix pomatia* taustekļa muskulis pēc motorās regulācijas mehānisma neatbilst nevienam no klasiskajiem muskuļu klasifikācijas tipiem, bet gan veido savdabīgu gludo un šķērsvītrotu muskuļu īpatnību kombināciju.
3. *Helix pomatia* endogēnais neurosekrēts - *FMRF-amīds* - *in vitro* koncentrācijās virs  $10^{-8}$  M darbojas kā muskuļa kontrakciju modulators: palielina kontrakciju spēku un atslābšanas fāzes ātrumu, tādējādi samazinot atslābšanas fāzes ilgumu. Koncentrācijās, kas pārsniedz  $10^{-6}$  M, FMRF-amīds darbojas arī kā taustekļa muskuļa kontrakcijas izsaucošais mediators.
4. *Helix pomatia* endogēnais neurosekrēts - *serotonīns* - *in vitro* izraisa devas atkarīgu taustekļa muskuļa kontrakciju modulāciju: samazina kontrakciju spēku un palielina kontrakciju atslābšanas fāzes ātrumu, tādējādi samazinot atslābšanas fāzes ilgumu un novēršot kontrakciju summāciju. Šos efektus raksturo atšķirīgas devas - efekta līknes.
5. Serotonīna modulējošie efekti *Helix pomatia* taustekļa neuro-muskulārajā sistēmā realizējas postsinaptiski, serotonīnam saistoties ar *specifiskiem* receptoriem. Serotonīna inotropā efekta realizācijā vismaz daļēji iesaistīti arī *acetilholīna* receptori.
6. NAN 190, mugurkaulnieku serotonīna 5-HT<sub>1A</sub> receptoru farmakoloģiskais antagonists, ir efektīvs arī *Helix pomatia* taustekļa neuro-muskulārajā sistēmā. Tomēr serotonīna specifiskie receptori *Helix pomatia* taustekļa neuro-muskulārajā sistēmā nav identiski mugurkaulnieku 5-HT<sub>1A</sub>, jo cAMP sekundāro starpnieku sistēma nav dominējoša serotonīna efekta realizācijā.
7. Serotonīna modulējošie efekti uz taustekļa muskuļa kontrakciju spēku un atslābšanas ilgumu realizējas ar atšķirīgiem, bet savstarpēji saistītiem sekundāro starpnieku mehānismiem:
  - **hronotropais efekts** realizējas **neatkarīgi** no *acetilholīna* receptoriem,  $[Ca^{2+}]_o$  koncentrācijas, kā arī to *neietekmē intracelulāro*  $[Ca^{2+}]$ ; *krātuvju rianodina receptortu* inaktivācija; tas realizējas gan ar *acetilholīnu*, gan ar *kofeīnu* izraisītu muskuļa kontrakciju gadījumā, kā arī motoneironu un muskuļa elektriska kairinājuma izsauktu kontrakciju gadījumā;
  - **inotropais efekts** ir jūtīgāks pret šīm visām augstākminētajām ietekmēm;
  - **hronotropais efekts** realizējas, serotonīnam aktivējot kalcija sūkņus un kalcija „atpakaļizsūkņēšanu“ no šūnas citoplazmas;
  - **inotropā efekta** realizācija saistīta ar serotonīna izsauktu  $Ca^{2+}$  izplūdes no intracelulārajām kalcija krātuvēm samazināšanu, kuras pamatā ir vairāku intracelulāro mehānismu aktivāciju un kavēšana.
8. Farmakoloģiskais preparāts kofeīns izraisa regulatoras ietekmes uz *Helix pomatia* taustekļa muskuļa šūnām. Kofeīna efekti ir: taustekļa muskuļa kontrakciju izraisīšana un citu stimulu izraisīto kontrakciju modulācija, galvenokārt, palielinot atslābšanas fāzes ilgumu, kā arī nedaudz palielinot spēka amplitūdu.
9. *Helix pomatia* taustekļa muskuļa šūnās atrodas *rianodina-atkarīgās* kalcija krātuves, ko pierāda kofeīna spēja izsaukt taustekļa muskuļa kontrakcijas, kā arī kofeīna neefektivitāte pēc rianodina lietošanas.

## **HIPOTÉZES**

1. Serotonīna iedarbība bezmugurkaulnieku neuro-muskulārajā sistēmā ir atšķirīga no serotonīna iedarbības mugurkaulnieku neuro-muskulārajās sistēmās, un izsauc citas regulatorās reakcijas.
2. Dzīvnieku pasaulē vērojama izteikta serotonīna ietekmju uz neuro-muskulāro sistēmu daudzveidība: serotonīna efekti un darbības mehānismi ir atšķirīgi mugurkaulnieku un bezmugurkaulnieku organismos, kā arī atkarīgi no neuro-muskulāro struktūru funkcijas organismā.
3. Serotonīna sezonālās svārstības *Helix pomatia* organismā ietekmē taustekļa muskuļa reaktivitāti uz nervu sistēmas iedarbību, kā arī taustekļa kustību un organisma uzvedības reakciju straujumu



## Literatūras saraksts

Abadia-Fenoll F., Rios A., Almendros A., Navascues J. (1982) An electronic microscopic study on the muscle cells and nerve fibres in the digestive gland of the snail *Cryptomphallus aspersa*. **Z.Mikrosk.Anat.Forsch.** 96(5): 873-84.

Adham N., Kao H.-T., Schechter L.E., Bard J., Olsen M., Urquhart D., Durkin M., Hartig P.R., Weinshank R.L., Branchek T.A. (1993) Cloning of another human serotonin receptor (5-HT 1F): a fifth 5-HT1 receptor subtype coupled to the inhibition of adenylate cyclase. **Proc Natl Acad Sci USA** 90: 408-412.

Altrup U., Peters M. (1982) Procedure of intracellular staining of neurons in the snail *Helix pomatia*. **Neurosci Meth** 5:161 - 165.

Angstadt J.D., Friesen W.O. (1993) Modulation of swimming behavior in the medicinal leech I. Effects of serotonin on the electrical properties of swimgating cell 204. **J.Comp.Pysiol.** 172(A): 223-234.

Arreola J., Calvo J., Garcia M.C., Sanchez J.A. (1987) Modulation of calcium channels of twitch skeletal muscle fibers of the frog by adrenaline and cyclic adenosine monophosphate. **J Physiol** 393:307-33.

Baker M.W., Vohra M.M., Croll R.P. (1993) Serotonin depletors, 5,7-dihydroxytryptamine and p-chlorophenylalanine, cause sprouting in the CNS of the adult snail. **Brain Research** 623: 311-315.

Balaban PM, Maksimova OA (1993) Positive and negative brain zones in the snail. **European J.Neurosci.** 5:786-774.

Balaban P.M., Vehovszky A., Maximova O.A., Zakharov I.S. (1987) Effect of 5,7-dihydroxytryptamine on the food-aversive conditioning in the snail *Helix lucorum* L. **Brain Research** 404: 201-210.

Behman C.D., Tsien R.W. (1988) Noradrenaline modulation of calcium channels in single smooth muscle cells from rabbit ear artery. **J Physiol.** 404:767-784.

Belan P.V., Kiss T., Snitsarev V., Storozhuk M.V., Osipenko O.N. (1994) The effect of acetylcholine and serotonin on calcium transients and calcium currents in identified *Helix pomatia* L. neurons. **Cell Signal.** 6(5): 551-559.

Bewick G.S., Price D.A., Cottrell G.A. (1990) The fast response mediated by the C3 motoneurone of *Helix* is not attributable to the contained FMRFamide. **J exp Biol.** 148: 201-219.

Boess F.G., Martin I.L. (1994) Molecular biology of 5-HT receptors. **Neuropharmac.** 33(3/4): 275-317.

- Bogusch G. (1972) Zur Innervation des glatten Penisretraktormuskels von *Helix pomatia*: Allgemeine Histologie und Histochemie des monoaminergen Nervensystems. **Z.Zellforsch.** 126: 383-401.
- Braha O., Edmonds B., Sacktor T., Kandel E.R., Klein M. (1993) The contribution of protein kinase A and protein kinase C to the actions of 5-HT on the L-type Ca<sup>2+</sup> current of the sensory neurons in *Aplysia*. **J Neurosci.** 13(5): 1839 - 1851.
- Brezina V, Evans C.G., Weiss K.R. (1994) Activation of K current in the accessory radula closer muscle of *Aplysia californica* by neuromodulators that depress its contractions. **J Neurosci** 14(7): 4412-4432.
- Brezina V, Evans C.G., Weiss K.R. (1994) Enhancement of Ca current in the accessory radula closer muscle of *Aplysia californica* by neuromodulators that potentiate its contractions. **J. Neurosci.** 14: 4393 -4411.
- Brezina V., Evans C.G., Weiss K.R. (1994 c) Characterization of the membrane ion currents of a model molluscan muscle, the accessory radula closer muscle of *Aplysia californica*. III Depolarisation-activated Ca current. **J Neurophysiol.**
- Brown R.O., Gusman D., Bausman A.J., Mayeri E. (1985) Identification of *Aplysia* neurons containing immunoreactive FMRFamide. **Neuropeptides** 6: 517-526.
- Brussard A.B., Kits K.S., ter Maat A. (1989) One receptor type mediates two independent effects of FMRFa on neurosecretory cells of *Lymnaea*. **Peptides.** 10(2): 289-297.
- Borne R.F. (1998) Serotonin: the Neurotransmitter for the '90s. :2
- Buma P. (1988) Synaptic and nonsynaptic release of neuromediators in the central nervous system. **Acta Morphol Neerl Scand.** 26(2-3): 81-113.
- Chan C.Y., Moffett S. (1981) Cerebral motoneurons mediating tentacle retraction in the land slug *Ariolimax columbianus*. **J Neurobiology** 13(2):163-172.
- Chase R. (1982) The olfactory sensitivity of snails, *Achatina fulica*. **J.Comp.Physiol.**, 148A: 225-235.
- Chase R. (1986) Lessons from snails tentacles. **Chem Senses** 11: 411-426.
- Chase R., Croll R.P. (1981) Tentacular function in snail olfactory orientation. **J.Comp.Physiol.** 143A:357-362.

- Chase R., Pryer K., Baker R., Madison D. (1978) Responses to conspecific chemical stimuli in the terrestrial snail *Achatina fulica*. **Behav. Biol.**, 22: 302-315.
- Chase R., Tolloczko B. (1993) Tracing neural pathways in snail olfaction: from the tip of the tentacles to the brain and beyond. **Microsc Res Tech** 24: 214-230.
- Christopher K.J., Chang J.P., Goldberg J. (1996) Stimulation of ciliary beat frequency by serotonin is mediated by a Ca<sup>2+</sup> influx in ciliated cells of *Helisoma trivolvis* embryos. **J Exp Biol** 199: 1105-1113.
- Chin G.J., Payza K., Price D.A., Greenberg M.J., Doble K.E. (1994) Characterization and solubilization of the FMRFamide receptor of squid. **Biol Bull** 187 (2): 185-199.
- Coggeshall R.E. (1972) The muscle cells of the follicle of the ovotestis in *Aplysia* as the probable target organ for bag cell extract. *Amer Zool* 12: 521-523.
- Cohen J.L., Weiss K.R., Kupfermann I. (1978) Motor control of buccal muscles in *Aplysia*. **J. Neurophysiol.** 41:157-180.
- Cooper J.R., Bloom F.E., Roth R.H.(eds.) (1996) Serotonin and histamine. In: *The biochemical basis of neuropharmacology*. Oxford University Press, NewYork, Oxford, 370-386.
- Cornelius F. (1980) The regulation of tension in a chemically skinned molluscan smooth muscle. **J Gen Physiol.** 75:709-725.
- Cotterell G.A., Price D.A., Doble K.E., Hettle E, Sommerville J., MacDonald M. (1992) Identified *Helix* neurons: mutually exclusive expression of the tetrapeptide and heptapeptide members of the FMRFamide family. **Biol.Bull.** 183: 113-122.
- Cottrell G.A., Schot L.P., Dockray G.J. (1983) Identification and probable role of a single neurone containing the neuropeptide *Helix* FMRF amide. **Nature.** 304: 638-640.
- Croll R.P., Chase R. (1980) Plasticity of olfactory orientation to foods in the snail, *Achatina fulica*. **J.Comp.Physiol.**, 136A:267-277.
- Dahl E, Flack B., v. Mecklengurg c., Myhrberg H., Rosengren E. (1966) Neural localization of dopamine and 5-hydroxytryptamine in some mollusca. **Z.Zellforsch.**, 71: 489 - 498.

- DeCourcelles D., Leysen J., DeClerck F., VanBelle H., Janssen P. (1985) Evidence that phospholipid turnover is the signal transducing system coupled to serotonin S2 receptor sites. **J Biol Chem** 260: 7603-7608.
- Delay R.J., Kinnamon S.C., Roper S.D. (1997) Serotonin modulates voltage-dependent calcium current in *Necturus* taste cells. **J Neurophysiol** 77: 2515-2524.
- Derkach V., Surprenant A., North R.A. (1989) 5-HT<sub>3</sub> receptors are membrane ion channels. **Nature** 339: 706-709.
- Deth R.C., Lynch C.J. (1981) Mobilization of a common source of smooth muscle Ca<sup>2+</sup> by norepinephrine and methylxanthines. **Am J Physiol** 240: 239-247.
- Elekes K., Stefano G.B., Carpenter D.O. (1993) Enkephalin-like immunoreactive neurons in the central nervous system of gastropods (*Helix pomatia*, *Lymnaea stagnalis*, *Aplysia californica*): a comparative immunocytochemical study. **Cell Tissue Res.** 272: 329 - 341.
- Evans R.L., McCrohan C.R., Butler R.C. (1988) Tentacle contraction in *Heliophrya erhardi* (Suctorina): the role of inositol phospholipid metabolites and cyclic nucleotides in stimulus-response coupling. **Exp.Cell Res.** 177(2):382-390.
- Falconer S.W., Carter A.N., Downes C.P., Cottrell G.A. (1993) The neuropeptide Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (FMRFamide) increases levels of inositol 1,4,5-trisphosphate in the tentacle retractor muscle of *Helix aspersa*. **Exp Physiol** 78:757-766.
- Fiedler K., Lieder J. (1994) Mikroskopische Anatomie der Wirbellosen. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, Jena, NY, S: 48-60.
- Fill M., Coronado R. (1988) Ryanodine receptor channel of sarcoplasmic reticulum. **TINS** 11(10): 453-457.
- Florian J.A., Watts S.W. (1998) Integration of mitogen-activated protein kinase kinase activation in vascular 5-HT<sub>2A</sub> receptor signal transduction. **J Pharmacol Exp Theor** 284(1):284-355.
- Frank D.A., Greenberg M.E. (1994) CREB: a mediator of long-term memory from mollusks to mammals. **Cell** 79: 5-8.
- Fuller R.W. (1996) Mechanisms and functions of serotonin neuronal systems. **Ann.N.Y.Acad.Sci.** 780:176 - 184.



- Fuss S.(1997) Identifizierung und Charakterisierung des serotonergen Neurons CV1 der Weinbergschnecke, *Helix pomatia*. Diplomarbeit an der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz: 4-5.
- Gamkrelidze G.N., Laurienti P.J., Blankenship J.E. (1995) Identification and characterization of cerebral ganglion neurons that induce swimming and modulate swim-related pedal ganglion neurons in *Aplysia brasiliana*. *J Neurophysiol.* 74: 1444-1462.
- Garcia M.C., Kim H.Y. (1997) Mobilization of arachidonate and docosahexaenoate by stimulation of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor in rat C6 glioma cells. *Brain Res.* 768(1-2): 43-48.
- Gayton R.J. (1982) Mammalian neuronal actions of FMRFamide and the structurally related opioid Met-enkephalin-Arg6-Phe7. *Nature.* 298(5871): 275-276.
- Gerhardt C.C., van Heerikhuizen H. (1997) Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors. **Eur J Pharmacol** 334(1):1-23.
- Gilloteaux J. (1972) Innervation of the byssal retractor muscle in *Mytilus edulis*. *Z Zellforsch.* 124: 204-216.
- Ghosh T.K., Eis P.S., Mullaney J.M., Ebert L.C., Gill D.L. (1988) Competitive, reversible, and potent antagonism of inositol 1,4,5-triphosphate-activated calcium release by heparin. **J Biol Chem** 263(23): 11075-11079.
- Glanzman D.L. (1995) The cellular basis of classical conditioning in *Aplysia californica* - it's less simple than you think. **TINS** 18:30-36.
- Gole D., Munday L., Kreiman M., Ram J.L. (1987) Caffeine effects on buccal muscles of *Aplysia*. **Comp Biochem Physiol.** 88C: 313 - 318.
- Green K.A., Lambert J.J., Cottrell G.A. (1996) Ligand-gated ion channels opened by 5-HT in molluscan neurones. **Br J Pharmacol** 119(3): 602-608.
- Harnström B (1925) Über die sogenannten Intelligenzshären des Molluskengehirns und die Innervation des Tentakels von *Helix*. **Acta Zool.** 6:183-215.
- Hernadi L., Erdelyi L., Parducz A., Szabadi H., Such G., Jancso G. (1995) *In vitro* capsaicin-induced cytological changes and alteration in calcium distribution in giant serotonergic neurons of the snail *Helix pomatia*: a light- and electron-microscopic study. **Cell Tissue Res** 282:445-453.
- Heyer C.B., Kater S.B., Karlsson U.L. (1973) Neuromuscular systems in molluscs. **Amer.Zool.**, 13:247-270.

- Hill R.B., Greenberg M.J., Irisawa H., Nomura H. (1970) Electromechanical coupling in a molluscan muscle, the radula protector of *Busycon canaliculatum*. **J.Exp.Zool.** 174: 331-348.
- Hirakawa Y., Kuga T., Kobayashi S., Kanaide H., Takeshita A. (1995) Dual regulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels by serotonin 2 receptor stimulation in vascular smooth muscle cells. **Am J Physiol** 268(2): H544-549.
- Hooper S.L., Probst W.C., Cropper E.C., Kupfermann I., Weiss K.R. (1994) SCP application or B15 stimulation activates cAPK in the ARC muscle of *Aplysia*. **Brain Res** 657:337-341.
- Hoyle G. (1964) Muscle and neuromuscular Physiology. In: *Physiology of mollusca*. Vol.1, Wilburg K.M., Yonge C.M. (ed.), Acad Press, New York, London, pp: 313-345.
- Jacklet J.W. (1980) Light sensitivity of the rhinophores and eyes of *Aplysia*. **J Comp Physiol.** 136: 257-262.
- Johnson B.R., Peck J.H., Harris-Warrick R.M. (1995) Distributed amine modulation of graded chemical transmission in the pyloric network of the lobster stomatogastric ganglion. **J.Neurophysiol** 74:437-452.
- Julius D. (1991) Molecular biology of serotonin receptors **Annu Rev Neurosci** 14:335-360.
- Katz P.S. (1995) Intrinsic and extrinsic neuromodulation of motor circuits. *Curr Opin Neurobiol* 5:799-808.
- Katz P.S., Frost W.N. (1995) Intrinsic neuromodulation in the *Tritonia* swim CPG: Serotonin mediates both neuromodulation and neurotransmission by the dorsal swim interneurons. **J.Neurophysiol.** 74:2281-2294.
- Katz P.S., Frost W.N. (1996) Intrinsic neuromodulation: altering neural circuit from within. **TINS** 19:54-61.
- Kandel E.R.(1989) Genes, nerve cells and the remembrance of things past. **J Neuropsych** 1:103-125.
- Kandel E.R., Schwatz J.H., Jessell T.M. 1991, Principles of Neural Science 3rd Ed., Elsevier, NY. Amsterdam, London, Tokyo.
- Kemenes G., S-Rozsa K. (1987) The role of serotonergic mechanisms in food-induced arousal of the snail *Helix pomatia* L. In: **Neurobiology molluscan models**, Boer H.H., Geraerts W.P.M., Joosse J.(ed.), North-Holland, Amsterdam: pp. 277-286.

Kendrick-Jones J., Lehman W., Szent-Györgyi A.G. (1970) Regulation in molluscan muscles. **J.Mol.Biol.**, 54:313-326.

Kerkut G.A., Walker R.J. (1975) Nervous system, eye and statocysts. In: *Pulmonates*. Vol.1, Fretter V., Peake J. (ed.). Acad Press, London, NY, San Francisco, pp.166 - 202.

Kilias R. (1995) Die Weinbergschnecke. Spektrum Akad. Verlag., Heidelberg: 73 - 82.

Kostyuk P.G., Kirischuk S.I. (1993) Spatial heterogeneity of caffeine- and 1,4,5-trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> transients in isolated snail neurons. **Neuroscience**. 53(4): 943-7.

Kravitz E.A. (1991) Hormonal orchestration of behavior: amines and the biasing of behavioral outputs in lobster. In: *Synapse - Transmission Modulation*, Elsner N., Penzlin (ed.) Gerog Thieme Verlag, Stuttgart, New York, pp: 141-153.

Kubben F.J., van Assche C.L., Bosman F.T. (1986) FMRF-amide immunoreactivity in the mammalian gastroenteropancreatic neuroendocrine system. *Histochemistry*. 86(4-6): 439-444.

Kupfermann I. (1991) Functional studies of cotransmission. **Physiol Rev** 71: 7585 - 7591.

Kupfermann I., Weiss K.R. (1982) Activity of an identified serotonergic neuron in free moving *Aplysia* correlates with behavior arousal. **Brain Res** 241: 334-337.

Lehman H.K., Greenberg M.J. (1987) The avtion of FMRFamide-like peptides on visceral and somatic muscles of the snail *Helix aspersa*. **J.exp.Biol.** 131:55 - 68.

Leijten P.A.A., van Breemen C. (1984) The effect of caffeine on the noradrenaline-sensitive calcium store in rabbit aorta. **J Physiol** 357: 327 - 339.

Leslie R.A., Moorman J.M., Grahame -Smith D.G. (1993) Lithium enhances 5-HT<sub>2A</sub> receptor-mediated c-fos expression in rat cerebral cortex. **Neuroreport** 5(3): 241-244.

Li X.-C., Giot J., Kuhl D., Hen R., KAndel E.R. (1995) Cloning and characterization of two related serotonergic receptors from the brain and the reproductives system of *Aplysia* that activate phospholipase C. **J Neurosci.** 15: 7585-7591.

Lind H. (1989) Homing to hibernating sites in *Helix pomatia* involving detailed long-term memory. **Ethology**, **81**, 221-234.

Lloyd P.E. (1980 a) Modulation of neuromuscular activity by 5-hydroxytryptamine and endogenous peptides in the snail, *Helix aspersa*. **J comp Physiol**. 139: 333-339.

Lloyd P.E. (1980 b) Mechanisms of action of 5-hydroxytryptamine and endogenous peptides on a neuromuscular preparation in the snail, *Helix aspersa*. **J comp Physiol** 139: 341-347.

Lowy J., Vibert P.J. (1967) Structure and organization of actin in a molluscan smooth muscle. *Nature*, 215: 1254-1255.

Maeda N., Kawasaki T., Nakade S., Yokota N., Taguchi T., Kasai M., Mikoshiba K. (1991) Structural and functional characterization of inositol 1,4,5-triphosphate receptor channel from mouse cerebellum. **J Biol Chem** 266(2):1109-1116.

Majane E.A., Casanova M.F., Yang H.Y. (1988) Biochemical characterization of FMRF-NH<sub>2</sub>-like peptides in spinal cords of various mammalian species using specific radioimmunoassays. *Peptides*. 9 (5): 1137-1144.

McClellan A.D., Brown G.D., Getting P.A. (1994) Modulation of swimming in *Tritonia*: excitatory and inhibitory effects of serotonin. **J. Comp. Physiol.** 174(A): 257-266.

McPherson D.R., Blankenship J.E. (1991) Neural control of swimming in *Aplysia brasiliana* III. Serotonergic modulatory neurons. **J. Neurophysiol.** 66:1366-1379.

Managan P.S., Curran G.A., Hurney C.A., Friese W.O. (1994) Modulation of swimming behavior in the medicinal leech III. Control of cellular properties in motor neurons by serotonin. **J.Comp.Pysiol.** 175(A): 709-722.

Nelson M.T., Standen N.B., Brayden J.E., Worley J.F. (1988) Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. **Nature**. 336: 382-385.

Nick T.A., Kaczmarek L.K., Carew T.J. (1996) Ionic currents underlying developmental regulation of repetitive firing in *Aplysia* bag cell neurons. **J. Neurophysiol.** 16(23): 7583 - 7598.

Norris B.J., Calabrese R.L. (1987) Identification of motor neurons that contain a FMRFamide-like peptide and the effect of FMRFamide on longitudinal muscle in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*. **J comp Physiol**. 266: 95 - 111.

Orellana S., Solski P.A., Brown J.H. (1987) Guanosine 5'-O-(Thiotriphosphate) - dependent Inositol Trisphosphate formation in membranes is inhibited by Phorbol Ester and Protein Kinase C. **J Biol Chem** 262(4): 1638-1643.

Osborne N.N., Cottrell G.A. (1971) Distribution of biogenic amines in the slug, *Limax maximus*. **Z.Zellforsch.** 112:15 - 30.

Parson D.W., Pinsker H.M. (1989) Swimming in *Aplysia brasiliiana*: behavioral and cellular effects of serotonin. *J Neurophysiol.* 62: 1163-1176.

Payza K. (1987) FMRFamide receptors in *Helix aspersa*. *Peptides.* 8(6): 1065-1074.

Peschel M., Straub V., Teyke T. (1996) Consequences of food attraction conditioning in *Helix* : a behavioral and electrophysiological study. **J comp Physiol.** 178: 317- 327.

Peschel M.(1998) Analyse spezifischer Tentakelbewegungen der Weinbergschnecke, *Helix pomatia* (L.), auf kontrollierte Duftreize. Cuvillier Verlag, Göttingen.:1-9, 90.

Peters D.J., Snaar-Jagalska B.E., Van Haastert P.J., Schaap P. (1992) Lithium, an inhibitor of cAMP-induced inositol 1,4,5-trisphosphate accumulation in *Dictyostelium discoideum*, inhibits activation of guanine-nucleotide-binding regulatory proteins, reduces activation of adenylylcyclase, but potentiates activation of guanylyl cyclase by cAMP. **Eur.J.Biochem.** 209(1):299-304.

Piomelli D., Shapiro E., Feinmark S.J., Schwartz J.H. (1987) Metabolites of arachidonic acid in the nervous system of *Aplysia*: possible mediators of synaptic modulation. *J neurosci* 7(11): 3675-3686.

Raffa R.B. (1991) The action of FMRF-NH<sub>2</sub> and FMRF-NH<sub>2</sub> related peptides on mammals. *NIDA Res Monogr* 105: 243-249.

Ram J.L., Shukla U.A., Ajimal G.S. (1981) Serotonin has both excitatory and inhibitory modulatory effects on feeding muscles in *Aplysia*. **J Neurobiol.** 12:613-621.

Ram J.L., Shukla U.A., Greenberg L. (1983) Serotonin - activated adenylyl cyclase and the possible role of cyclic AMP in modulation of buccal muscle contraction in *Aplysia*. **J Neurobiol.** 14:113 - 121.

Ram J.L., Shukla U.A., Parti R., Goines R.L. (1984) Extracellular calcium dependence of contracture and modulation by serotonin in buccal muscle E1 of *Aplysia*. **J Neurobiol.** 15(3): 197-206.

- Ram J.L., Judge K., Jednak M.A. (1994) Antagonists of cholinergic and serotonergic responses of *Aplysia* buccal muscle. **Comp. Biochem. Physiol.** 107 C: 235 - 242.
- Range H.P., Dale M.M. (1987) Pharmacology, Churchill livingstone, Edinburg, London, Melbourne, NewYork. pp: 528-529.
- RBI-Handbook of receptor classification and signal transduction (1995) ed. by Watling K.L., Keibarian K.J., Neumeyer J.L., Research Biochemicals International, Natick, USA
- Reinitz C.A., Stretton A.W.O. (1996) Behavioral and cellular effects of serotonin on locomotion and male mating posture in *Ascaris suum* (Nematoda). **J Comp Physiol A** 178:655-667.
- Rosenbluth J. (1968) Oligoquely striated muscle. IV. Sarcoplasmic reticulum, contractile apparatus and endomysium of the body muscle of polychaete, *Glycera*, in relation to its speed. **J.Cell.Biol.** 36:245-259.
- Rogers D.C. (1968) Fine structure of smooth muscle and neuromuscular junction in the foot of *Helix aspersa*. **Z.Zellforsch.** 99:315-335.
- Rogers D.C. (1969) Fine structure of smooth muscle and neuromuscular junction in the optic tentacles of *Helix aspersa* and *Limax flavus*. **Z.Zellforsch.** 89:80-94.
- Sahley C.L. (1994) Serotonin depletion impairs but does not eliminate classical conditioning in the leech *Hirudo medicinalis*. 108(6): 1043 - 1052.
- Sanger J.W.(1971) Sarcoplasmic reticulum in the cross-striated adductor muscle of the bay scallop, *Aequipecten irradians*. **Z.Zellforsch.** 118:156-161.
- Sanger J.W. and Hill R.B. (1972) Ultrastructure of the radula protractor of *Busycon canaliculatum*, sarcolemmic tubules and sarcoplasmic reticulum. **Z.Zellforsch.** 127:314-322.
- Satterlie R.A. (1995) Serotonergic modulation of swimming speed in the pteropod mollusc *Clione limacina*. II. Peripheral modulatory neurons. **J exp Biol.** 198: 905-916.
- Satterlie R.A., Norekian T.P., Jordan S., Kazilek C.J. (1995) Serotonergic modulation of swimming speed in the pteropod mollusc *Clione limacina* I. Serotonin immunoreactivity in the central nervous system and wings. **J Exp Biol** 198: 895-904.
- Sawada M., Ichinose M., Ito I., Maeno T., McAdoo D.J.(1984) Effects of 5-hydroxytryptamine on membrane potencial, contractility, accumulation of

cyclic AMP, and Ca<sup>2+</sup> movements in anterior aorta and ventricle of *Aplysia*. **J Neurophysiol.** 51: 361-374.

Sawada M., Cleary L.J., Byrne J.H. (1989) Inositol triphosphate and activation of protein kinase C modulate membrane current in tail motor neurons of *Aplysia*. **J Neurophysiol.** 61(2): 302-310.

Schipp R. and Schäfer A. (1969) Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen und den zentralen Herzorganen von Cephalopoden (*Sepia officinalis*). **Z.Zellforsch.** 98:576-598.

Schmidt R.F. (1995) Neuro- und Sinnesphysiologie. Aufl.2, Springer Verlag. Berlin, Heidelb, NY. 14-16.

Schulz F. (1938) Bau und Funktion der Sinneszellen in der Körperoberfläche von *Helix pomatia*. **Z.Morphol. Ökol.Tiere.** 33:555-581.

Schütt A., Basar E., Bullock T.H. (1992) The effects of acetylcholine, dopamine and noradrenaline on the visceral ganglion of *Helix pomatia* I. Ongoing compound field potentials of low frequencies. **Comp Biochem Physiol.** 102C: 159-168.

Scott M.L., Brezina V., Weiss K.R. (1997) Ion currents and mechanisms of modulation in the radula opener muscles of *Aplysia*. **J Neurophysiol.** 78(5): 2372-2387.

Shenker A., Maayani S., Weinstein H., Green J.P. (1985) Two 5-HT receptors linked to adenylate cyclase in guinea pig hippocampus are discriminated by 5-carboxamidotryptamine and spiperone. **Eur J Pharmacol** 109: 427-429.

Shepherd G.R. (1994) **Neurophysiology** 3rd.ed. Oxford University Press, 384 - 415.

Shi R.Y., Belardetti F. (1991) Serotonin inhibits the peptide FMRFamide response through a cyclic AMP-independent pathway in *Aplysia*. **J Neurophysiol** 66(6): 1847-1857.

Sillar K.T., Simmers A.J. (1994) 5HT induces NMDA receptor-mediated intrinsic oscillations in embryonic amphibian spinal neurons. **Proc R Soc Lond B** 255:139-145.

Sperelakis N. (1988) Regulation of calcium slow channels of cardiac muscle by cyclic nucleotides and phosphorylation. **J Mol Cell Cardiol** 20: 75-105.

S.-Rozsa K. (1984) The pharmacology of molluscan neurons. **Prog Neurobiol.** 23:79-150.

- S.-Rozsa K., Hernadi L., Kemenes G. (1986) Selective *in vivo* labelling of serotonergic neurones by 5,6-dihydroxytryptamine in the snail *Helix pomatia* L. **Comp Biochem Physiol** 85C(2): 419-425.
- Straub V.A. (1995) Neuronale Korrelate eines appetitiven Lernphänomens bei der Weinbergschnecke, *Helix pomatia* - Elektrophysiologische Charakterisierung der durch Lernen modifizierten neuronalen Antworten auf natürliche Geruchsreize. . Diplomarbeit an der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz: 82 S.
- Sugamori K.S., Sunahara R.K., Guan H.-C., Bulloch A.G.M., Tensen C.P., Seeman P., Niznik H.B., van Tol H.M. (1993) Serotonin receptor cDNA cloned from *Lymnaea stagnalis*. **Proc. natn. Acad.Sci USA** 90:11-15.
- Sugita S., Baxter D.A., Byrne J.H. (1994) Activation of protein kinase C mimic serotonin-induced modulation of voltage-dependet potassium current in preular sensory neurons of *Aplysia*. **J Neurophysiol.** 72(3): 1240-1248.
- Sun Q.Q., DAle N. (1997) Serotonergic inhibition of the T-type and high voltage-activated Ca<sup>2+</sup> currents in the primary sensory neurons of *Xenopus* larvae. **J Neurosci** 17(18): 6839-6849.
- Suzuki S., Kawamura M., Maruyuma K. (1971) Paricle length and stability of natural F-actin from adductor muscle of the clam, *Meretrix meretrix*, **Comp.Biochem.Physiol.**, 38A:147-155.
- Szent-Györgyi A.G., Cohen C., Kendrick-Jones J. (1971) Paramyosin and the filaments of molluscan "cach" muscles. II Native filaments: isolation and chracterization, **J.Mol.Biol.** 56:239-258.
- Takeda N., Tsuruoka H. (1979) A sex pheromone secreting gland in the terrestrial snail, *Euhadara pelliomphala*. *J.Exp.Zool.*, **207**,17-26.
- Taussig R., Sweet-Cordero A., Scheller R.H. (1989) Modulation of ionic currents in *Aplysia* motor neuron B15 by serotonin, neuropeptides, and second messenger. *J Neurosci* 9(9): 312-329.
- Teyke T. (1995) Food-attraction conditioning in the snail, *Helix pomatia*. **J Comp Physiol A** (177): 409-414
- Ullmer C., Boddeke H.G.W.M., Schmuck K., Lübbert (1996) 5-HT 2B receptor-mediated calcium release from ryanodine-sensitive intracellular stores in human pulmonary artery endotelial cells. **Br.J.Pharmacol.** 117: 1081 - 1088.
- Uneyama H., Ueno S., Akaike N. (1993) Serotonin-operated potassium current in CA1 neurons dissociated from rat hippocampus. **J Neurophysiol** 69(4): 1044-1052.



- Uneyama H., Ueno S., Akaike N. (1993) Serotonin - operated potassium current in CA1 neurons dissociated from rat hippocampus. **J Neurophysiol** 69(4): 1044-1052.
- Vehovszky A., Walker R.J. (1991) An analysis of the 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor subtypes of central neurones of *Helix aspersa*. **Comp Biochem Physiol.** 107C:129-141.
- Walcourt-Ambakederemo A., Winlow W. (1994) 5-HT receptors on identified *Lymnaea* neurones in culture: pharmacological characterization of 5-HT<sub>3</sub> receptors. **Gen Pharmac** 26(3): 553-561.
- Weber A., Herz R. (1968) The relationship between caffeine contracture of intact muscle and the effect of caffeine on reticulum. **J gen Physiol** 52: 750 - 759.
- Weiss K.R., Koch U.T., Koester J., Mandelbaum D.E., Kupfermann I. (1980) Neural and molecular mechanisms of food-induced arousal in *A.californica*. **Adv Physiol Sci** 23:305-344.
- Weiss K.R., Cohen J.L., Kupfermann I. (1978) Modulatory control of buccal musculature by a serotonergic neuron (Metacerebral cell) in *Aplysia*. **J. Neurophysiol** 41:181-203.
- Weiss K.R., Koch U.T., Koester J., Mendelbaum D.E., Kupfermann I. (1981) Neural and molecular mechanisms of food-induced arousal in *A. califoenica*. **Adv Physiol Sci** 23: 305-344.
- Weiss K.R., Brezina V., Cropper E.C., Hooper S.L., Miller M.W., Probst W.C., Vilim F.S., Kupfermann I. (1992) Peptidergic co-transmission in *Aplysia*: Functional implications for rhythmic behaviors. **Experientia** 48: 456-463.
- Yakel J.L., Jackson M.B. (1988) 5HT<sub>3</sub> receptors mediate rapid responses in cultured hippocampus and clonal cell line. **Neuron** 1:615-621.
- Yeoman M.N., Pieneman A.W., Ferguson G.P., Ter Maat A., Benjamin P.R. (1994) Modulatory role for the serotonergic cerebral giant cells in the feeding system of the snail, *Lymnea*. I. Fine wire recordings in the intact animal and pharmacology. **J Neurophysiol** 72:1357-1371.
- Yoshida M., Kobayashi M. (1991) Neural control of the buccal muscle movement in the african giant snail *Achatina fulica*. **J Exp Biol** 155:415-433.
- Yoshida M., Kobayashi M. (1995) Modulation of the buccal muscle contractions by identified serotonergic and peptidergic neurons in the snail *Achatina fulica*. **J Exp Biol** 198: 729-738.

Zakharov I.S., Ierusalimsky V.N., Balaban P.M. (1995) Pedal serotonergic neurons modulate the synaptic input of withdrawal interneurons of *Helix*. **Invertebrate Neurosci.** 1: 41-52.

Zhang B., Harris-Warrick R.M. (1994) Multiple receptors mediate the modulatory effects of serotonergic neurons in a small neural network. **J Exp Biol** 190:555-577.

Zoran M.J., Haydon P.G., Matthews P.J. (1989) Aminergic and peptidergic modulation of motor function at an identified neuromuscular junction in *Helisoma*. **J Exp Biol** 142:225-243.