

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ  
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

УДК 577.152; 591.041; 591.044 + 591.5

**ШАХРАНИ**

**Мохаммед Хусейн Джиума**

**НЕЙРОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ  
МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS*  
ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ  
НИТРИТОВ НАТРИЯ И КАЛИЯ**

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

по специальности 03.03.01 – физиология

**Минск, 2018**

Работа выполнена в Белорусском государственном университете

**Научный  
руководитель:**

**Сидоров Александр Викторович**  
доктор биологических наук, доцент,  
профессор кафедры физиологии человека и животных  
Белорусского государственного университета

**Официальные  
оппоненты:**

**Дромашко Сергей Евгеньевич**  
доктор биологических наук, профессор,  
заведующий лабораторией моделирования генетических  
процессов ГНУ «Институт генетики и цитологии  
НАН Беларуси»

**Пашкевич Светлана Георгиевна**  
кандидат биологических наук,  
заведующий лабораторией нейрофизиологии  
ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси»

**Оппонирующая  
организация:**

Учреждение образования «Белорусский государственный  
педагогический университет им. М. Танка»

Защита состоится 29 июня 2018 года в 14<sup>00</sup> на заседании совета по защите диссертаций Д 01.36.01 при ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» (220072, г. Минск, ул. Академическая, 28, тел. +375 17 284-16-30, факс +375 17 284-16-30, E-mail: pavlova@fizio.bas-net.by).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси».

Автореферат разослан 28 мая 2018 г.

Ученый секретарь  
совета по защите диссертаций  
кандидат биологических наук



Н.Ф. Павлова

Нитрит-анион ( $\text{NO}_2^-$ ) представляет собой естественный компонент азотного цикла в организме животных [Реутов и др., 1998] и в различных, прежде всего водных, экосистемах [Russo, 1985; Lundberg e.a., 2009]. Он занимает «промежуточное» положение между более окисленным нитрат-анионом ( $\text{NO}_3^-$ ) и аммиаком, а взаимные переходы от формы к форме являются следствием нитрит-оксидазной или нитрит-редуктазной активностей [Galloway & Cowling, 2002]. Восстановление широко используемых в сельскохозяйственной практике минеральных азотных удобрений (нитратов) является основной причиной повышенной нитритной нагрузки в организме гидробионтов [Mulholland e.a., 2008].

Формирование адаптации представляет собой совокупность морфологических, физиологических, поведенческих, популяционных особенностей вида, обеспечивающих возможность выживания в изменившихся условиях внешней среды. Механизмы таких перестроек продолжают оставаться предметом пристального изучения. На клеточном уровне мишенями для нитрит-ионов служат преимущественно гемсодержащие белки и ферменты антиоксидантной системы [van Faassen e.a., 2009]. Кроме того,  $\text{NO}_2^-$  может выступать в качестве источника монооксида азота (NO) [Jensen, 2009], сигнальные эффекты которого являются общепризнанными в современной физиологии. Применительно к нервной системе, это фактически означает неспецифическое, экстрасинаптическое действие нитрит-аниона, а адаптации, возникающие на нейронном уровне, играют ключевую роль в развитии устойчивости организма к действию экстремальных факторов, принимая во внимание ведущую роль ЦНС в регуляции и координации работы его функциональных систем.

Пресноводный лёгочный моллюск *Lymnaea stagnalis* (прудовик обыкновенный) широко распространён в Европе и Северной Америке, являясь типичным обитателем пресных вод [Pfleger & Chatfield, 1983]. Физиолого-экологические особенности представителей рода *Lymnaea* делают его идеальным объектом как для биомониторинга [Elder e.a., 1991; Rittschof & McClellan-Green, 2005], так и для изучения клеточных основ поведения [Benjamin e.a., 1985; Сидоров, 2011]. Основное внимание работ экологической и/или экотоксикологической направленности, в которых в качестве объекта исследований использовали *Lymnaea stagnalis*, связано с изучением процессов действия различных ксенобиотиков [Coutellec & Lagadic, 2006; Ter Maat e.a., 2007; De Schamphelaere e.a., 2008]. При этом речь идёт об оценке эффектов таких загрязнителей на ход размножения, развития, процессы роста, выживаемость и т.п.

Наряду с указанным, вызываемые действием различных водорастворимых химических агентов, в том числе и нитритов, изменения поведенческой активности часто оказываются вне сферы внимания таких публикаций, не говоря уже о клеточных механизмах потенциально их обуславливающих. Нейронные сети контроля лёгочного дыхания [Syed e.a., 1990, 1991] и мышечной локомоции

[Winlow & Haydon, 1986; Цыганов, 2000] *Lymnaea stagnalis* достаточно детально изучены, что позволяет дать оценку электрических характеристик их элементов с учётом выполняемой ими функции и нейромедиаторной составляющей нейрона и его контактов (синапсов). Насколько схожими (различными) будут эффекты ксенобиотика (нитрит-аниона) в отношении *функционально* отличающихся нервных клеток и какие мембранные механизмы определяют развитие адаптаций организма животных к действию такого фактора? Попытка ответа на поставленный вопрос и предопределила проведение данного исследования.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Связь работы с крупными научными программами (проектами) и темами.** Диссертация выполнена в рамках научно-исследовательских работ, проводимых на кафедре физиологии человека и животных Белорусского государственного университета. Тема исследования соответствует приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь на 2016–2020 годы (утверждены постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 12.03.2015, № 190) – «4. Медицина и фармацевтика». Работа выполнена в рамках научно-исследовательского проекта «Мембранные механизмы возрастных изменений нейронов разной эргичности» (ГПНИ «Фундаментальные и прикладные науки – медицине», 2016–2018 гг., № ГР 20161315).

**Цель и задачи исследования.** Цель работы – установить механизмы, определяющие развитие устойчивости модельного нейробиологического объекта, моллюска *Lymnaea stagnalis*, к действию высоких доз нитритов щелочных металлов.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить динамику развития и характер формирующихся изменений дыхательного поведения и мышечной локомоции моллюска в условиях хронического действия нитритов натрия и калия.

2. Оценить состояние системы антиокислительной защиты в клетках пищеварительной железы (печени) моллюска при пролонгированном действии нитритов натрия и калия.

3. Выявить временную динамику изменений спонтанной электрической активности и параметров спайка идентифицированных дофамин- (R.Pe.D.1) и серотонин- (L.Pe.D.1) эргических нейронов ЦНС *Lymnaea stagnalis* при нахождении моллюсков в условиях хронического действия нитрита натрия.

**Научная новизна.** У модельного нейробиологического объекта моллюска *Lymnaea stagnalis* впервые выявлена динамика показателей лёгочного дыхания и мышечной локомоции в условиях пролонгированного действия нитритов натрия и калия. Установлено, что по мере увеличения времени нахождения животных в новых условиях отмечается снижение выраженности их респиратор-

ного поведения при неизменности показателей двигательной активности. Обнаружено модифицирующее действие нитритов натрия и калия в отношении системы антиокислительной защиты в клетках пищевой железы (печени), указывающее на развитие адаптационных приспособлений, направленных на нейтрализацию эффектов неорганических загрязнителей окружающей среды.

Установлена степень изменения электрических характеристик идентифицированных клеток дыхательной (дофаминергический нейрон R.Pe.D.1) и локомоторной (серотонинергический нейрон L.Pe.D.1) сетей ЦНС *Lymnaea stagnalis* при пролонгированном действии нитрита натрия. Доказано изменение их возбудимости, связанное с деполяризацией мембраны на фоне остающейся неизменной частоты импульсации (R.Pe.D.1) или снижения частоты генерации потенциала действия на фоне стабильного значения потенциала покоя (L.Pe.D.1). Определены особенности изменения вольт-амперных кривых их мембран, а так же временных и амплитудных характеристик потенциалов действия, указывающие на существование различных способов адаптации к действию высоких доз нитритов в зависимости от типа нейрона.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Пролонгированное (неделя) действие нитритов натрия и калия приводит к модификации лёгочного дыхания *Lymnaea stagnalis*, связанного со снижением его интенсивности за счёт уменьшения длительности респираторного акта и протекающее на фоне неизменности локомоторной активности моллюсков;

2. Длительное пребывание в условиях постоянного действие нитритов натрия и калия приводит к изменению показателей антиокислительной защиты в пищеварительной железе (печени) *Lymnaea stagnalis*, свидетельствующих о достаточной устойчивости внутриклеточных систем в условиях нитритного загрязнения окружающей среды;

3. Вызываемые под влиянием нитрита натрия изменения электрических характеристик (потенциал покоя, частота импульсации, вольт-амперная характеристика) зависят от типа нейрона, отличаясь для дофаминергических (R.Pe.D.1) и серотонинергических (L.Pe.D.1) клеток ЦНС *Lymnaea stagnalis*;

4. Изменение временных и амплитудных показателей спайков R.Pe.D.1 и L.Pe.D.1 в условиях хронического действия нитрита натрия носят как однонаправленный (снижение длительности следовой гиперполяризации, уменьшение амплитуды спайка), так и разнонаправленный (возрастание длительности фазы реполяризации для R.Pe.D.1 и её снижение для L.Pe.D.1) характер.

*Объект исследования:* прудовик обыкновенный (*Lymnaea stagnalis*), препараты его изолированной ЦНС и ткани пищеварительной железы (печени).

*Предмет исследования:* лёгочное дыхание и мышечная локомоция, спонтанная электрическая активность нейронов дыхательной и локомоторной сети, антиокислительная защита клеток пищеварительной железы (печени).

Выбор объекта и предмета исследования обусловлен необходимостью одновременной оценки изменений электрофизиологических характеристик в идентифицируемых нейронах разной эргичности у одной и той же особи, вовлечённых в контроль лёгочной респирации и мышечной локомоции моллюска.

**Личный вклад соискателя.** Выбор темы исследования, формулировка положений общей характеристики работы и выводов осуществлялись совместно с научным руководителем. Диссертантом полностью самостоятельно выполнены исследования по изучению поведения моллюсков и анализу состояния антиокислительной защиты в пищеварительной железе (печени). Методическая помощь со стороны научного руководителя была оказана при регистрации и анализе спонтанной электрической активности нервных клеток, статистической обработке полученных данных. Текст диссертации (аналитический обзор литературы, фактическая составляющая экспериментальных глав) написан соискателем самостоятельно. Глава посвящённая анализу и обсуждению полученных данных – после консультаций с научным руководителем. Научным руководителем проведено редактирование (смысловое и стилистическое) текста диссертационной работы. В материалах научных статей, опубликованных в соавторстве, личный вклад соискателя составил 80 [1], 90 [3, 4], 70 [5, 6] и 15 [2] % соответственно. В материалах конференций [7, 8] вклад соискателя составил 90 %, в тезисах докладов 90 [9, 10], 70 [13, 14], 60 [11] и 40 [12] % соответственно. Среднее значение личного вклада по всем видам изданий – 70 %. В диссертацию не были включены результаты исследований соавторов научных работ.

**Апробация результатов диссертации.** Результаты работы доложены автором (лично или как соавтором доклада) и обсуждены в ходе проведения ряда международных и республиканских конференций: «Сахаровские чтения 2015 года: экологические проблемы XXI века» (Минск, Беларусь, 2015); «Нейрофизиология боли в эксперименте и клинике» (Минск, Беларусь, 2015); «Физиологические проблемы адаптации» (Минск–Ставрополь, Беларусь–Россия, 2015); «Кислород и свободные радикалы» (Гродно, Беларусь, 2016); «Simpler Nervous Systems: XI East European Conference of the International Society for Invertebrate Neurobiology» (Moscow–Zvenigorod, Russia, 2016); «Сигнальные механизмы регуляции физиологических функций» (Минск, Беларусь, 2017); «Биологическая осень 2017: к Году науки в Беларуси» (Минск, Беларусь, 2017).

**Опубликованность результатов диссертации.** По материалам диссертации опубликовано 14 работ: 6 статей в журналах из перечня научных изданий Республики Беларусь для опубликования диссертационных исследований, 2 статьи в сборниках работ и материалах конференций (1 за рубежом), 6 тезисов докладов (1 за рубежом). Общий объём опубликованных материалов – 4,44 авт. л. (3,04 авт. л. подготовлено лично соискателем).

**Структура и объём диссертации.** Диссертация изложена на 126 страницах (из них 98 – основной текст) и состоит из введения, общей характеристики работы, аналитического обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов (3 главы), их обсуждения (1 глава), заключения, библиографического списка, включающего 273 источника (86 на русском и 187 на английском языках) и 14 публикаций соискателя, приложения. Рукопись работы содержит 51 рисунок и 1 таблицу.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

Работа выполнена на представителе пресноводных моллюсков прудовике обыкновенном – *Lymnaea stagnalis*. Животных периодически собирали в мелких водоемах в окрестностях п. Негорелое (Дзержинский район, Минской области) в весенне-осенний период года. В лаборатории моллюсков содержали в аквариумах, при этом на каждого моллюска приходилось не менее 0,5 литра воды. Пищей служили молодые листья салата. Смену воды проводили каждые три дня. Температура воды составляла  $20 \pm 1$  °С. Во всех экспериментальных сериях использовали животных одинакового размерного класса – длина раковины от 4 до 4,5 см, масса от 5 до 6 г. Расчётный возраст [Zotin, 2009] такой группы составлял ок. 50 недель (1 год), при средней продолжительности жизни прудовика в 2 года.

*Поведенческая активность.* Перед началом экспериментов на раковину каждого животного наносили индивидуальную метку. Анализ поведения проводили до изменения условий содержания, а затем на 1-й, 3-й и 7-й дни инкубации в аквариумах с заданными условиями. Моллюски контрольной группы оставались интактными, а экспериментальной – подвергнуты действию растворённого в аквариумной воде нитрита Na или нитрита K в конечной концентрации 1 и 10 мМ (для каждой соли). Опыты по изучению поведения проведены при температуре постоянного содержания животных ( $20 \pm 1$  °С).

Для оценки дыхательного поведения моллюсков помещали в аквариумы объемом 4,5 л и высотой 50 см из расчёта 5–6 особей/аквариум. Пищу располагали на дне сосуда. В рабочем журнале фиксировали количество респираторных циклов, определяемых как открытие–закрытие дыхательного отверстия (пневмостома), за 1 ч наблюдения, а также время нахождения пневмостома в открытом состоянии (длительность цикла). Рассчитывали среднюю длительность одиночного респираторного акта и суммарную длительность легочного дыхания за 1 ч наблюдения (отдельно по каждому моллюску).

Для оценки мышечной локомоции животных переносили в кристаллизаторы, стоящие на миллиметровой бумаге и наполненные отстоявшейся водопроводной водой (высота слоя 0,5 см). Через 10 мин после помещения улиток в но-

вые условия с помощью секундомера фиксировали время, необходимое для преодоления 5 квадратов (1×1 см).

*Анализ системы антиокислительной защиты.* По окончании экспериментов по изучению хронического действия нитритов на поведенческую активность прудовика, осуществляли забор материала пищеварительной железы (печени) индивидуально от каждого моллюска. Пробы замораживали и хранили при минус 20 °С, используя для последующего анализа по мере необходимости. Срок хранения проб не превышал 3-х месяцев. При помощи стеклянного гомогенизатора взвешенные части печени измельчали в холодной (4 °С) дистиллированной воде, получая 5 % гомогенат. Массу печени определяли на весах Scout SC2020 (Ohaus, USA) с точностью до 0,01 г. Центрифугирование проб осуществляли посредством лабораторной центрифуги Sigma, 1–6 (Германия). Для оценки оптической плотности анализируемых растворов использовали спектрофотометр Cary 50 (Variant Inc., Австралия).

Уровень восстановленного глутатиона (Г-SH) определяли спектрофотометрически (412 нм) по реакции с 5,5'-дитиобис-нитробензойной кислотой (ДТНБ, реактив Элмана) используя коэффициент молярной экстинкции ( $13700 \text{ (моль/л)}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ ) согласно [Sedlak & Lindsay, 1968]. Активность Se-зависимой глутатионпероксидазы (Se-ГП, КФ 1.11.1.9) определяли по [Flohe & Cuzler, 1984], используя в качестве инициатора реакции трет-бутил перекись (конечная концентрация 2 мМ). Интенсивность процессов перекисного окисления липидов определяли по образованию в гомогенатах печени ТБК- (тиобарбитуровая кислота) активных продуктов [Kostiuk & Potapovich, 1987]. Активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1.) определяли спектрофотометрическим методом, основанным на оценке скорости аутоокисления флавоноида кверцетина [Kostyuk & Potapovich, 1989]. Определение количества белка проводили по методу Бредфорд [Bradford, 1976].

*Исследование электрической активности нейронов.* Электрофизиологическая часть выполнена на препаратах изолированной ЦНС, полученных от животных, содержащихся в 10 мМ растворе нитрита Na в течение 1, 3 и 7 суток, а контролем выступили препараты от особей, не подвергавшихся действию соли.

Животных наркотизировали (5 мин в 0,2 М растворе  $\text{MgCl}_2$ ) и фиксировали на дне препаративной ванночки. Вскрывали висцеральный синус, удаляли покрывающие ЦНС соединительно-тканые оболочки, перерезали все нервы, связывающие её с периферией. Изолированные нервные ганглии 5 мин обрабатывали раствором (1 мг/мл) проназы (Protease E, type XIV, Sigma, США). После 30 мин отмывки препарата ЦНС свежим физиологическим раствором приступали к регистрации электрической активности нейронов. Препараты помещали в экспериментальную (объём 200 мкл) термостатируемую камеру ( $20 \pm 1$  °С). Использовали нормальный раствор Рингера для *Lymnaea stagnalis* следующего со-



става (мМ): NaCl – 44; KCl – 1,7; CaCl<sub>2</sub> – 4; MgCl<sub>2</sub> × 6 H<sub>2</sub>O – 1,5; HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'2-этансульфоновая кислота) – 10, pH 7,6 ± 0,02.

Гигантские нейроны правого (дофаминергический, R.Pe.D.1) и левого (серотонинергический, L.Pe.D.1) педальных ганглиев идентифицировали по расположению, размеру, цвету, электрофизиологическим показателям [Benjamin & Winlow, 1981]. Регистрацию спонтанной электрической активности осуществляли посредством внутриклеточных стеклянных микроэлектродов. Для вытягивания микропипеток использовали печь KOPF Vertical pipette puller, Model 720 (David Kopf Instruments, USA). Их заполняли 2,5 М раствором KCl (сопротивление 10–20 МΩ). Усиление сигналов, подача де- или гиперполяризующих импульсов тока осуществляли с помощью микроэлектродного усилителя МС-01М (Линтех, Беларусь). Текущий мониторинг, запись и последующий обсчёт сигналов осуществляли при помощи программы электронного осциллографа Input-Win [Солтанов и Бурко, 2005]. Фиксацию показателей электрической активности проводили не ранее 10 мин после введения микроэлектрода в клетку и стабилизации потенциала покоя нейрона в пределах ± 2 мВ.

Для R.Pe.D.1 и L.Pe.D.1 фиксировали значение потенциала покоя. Частоту импульсации определяли при анализе записи электрической активности длительностью 2 мин как среднее по 4-м временным интервалам по 30 с каждый. Временные и амплитудные, отсчитываемые от уровня потенциала покоя, характеристики спонтанных потенциалов действия (спайков) определяли как среднее для 3-х произвольно выбранных импульсов начального, среднего и конечного участков нейрограммы. Оценивали длительности фаз де- (ДП) и реполяризации (РП), следовой гиперполяризации (СГ), амплитуды спайка, СГ и порога. Для построения кривой вольт-амперной характеристики (ВАХ) мембраны в исследуемый нейрон последовательно подавали импульсы гипер- и деполяризующего тока в диапазоне от минус 2 до плюс 2 нА (с шагом 0,5 нА) и длительностью 3 с, одновременно фиксируя значение мембранного потенциала R.Pe.D.1 и L.Pe.D.1, а полученные данные представляли в графической форме.

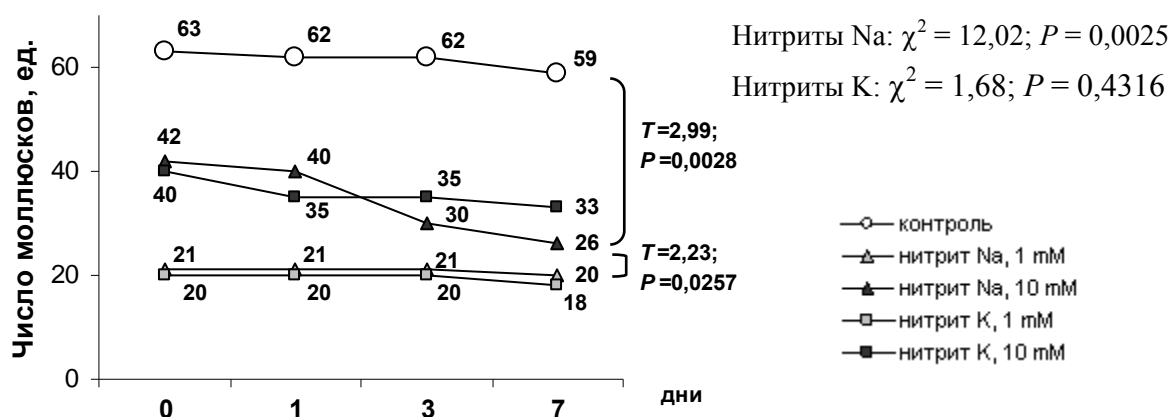
*Статистическая обработка данных.* Экспериментальные данные обрабатывали методами медико-биологической статистики [Гланц, 1998]. В случае нормальности распределения (*W*-тест Шапиро–Уилка) для всех без исключения сравниваемых групп использовали параметрические методы оценки (данные в виде  $\bar{x} \pm S_x$ ): дисперсионный анализ по однофакторной схеме и для повторных измерений при сравнении нескольких групп, *t*-критерий Стьюдента для независимых и зависимых пар при сравнении двух групп. Если нормальность распределения не была подтверждена для всех сравниваемых групп, использовали непараметрические методы оценки (данные в виде – медиана (25 и 75 процентиля)): в случае независимых групп – *H*-критерий Крускала–Уоллиса (сравнение нескольких групп) или *U*-критерий Манна–Уитни (сравнение двух выборок).

При сравнении нескольких зависимых групп –  $F$ -критерий Фридмана, а двух зависимых – критерий знаков. При оценке выживаемости использовали метод Гехана для обобщённого критерия Вилкоксона – сравнение двух выборок или критерий  $\chi^2$  – сравнение нескольких групп. При сравнении кривых ВАХ мембраны использовали метод дисперсионного анализа для повторных измерений.

Число наблюдений ( $n$ ) указано для каждой серии отдельно. Результаты работы основаны на оценке поведения 186 моллюсков, анализе 143 проб пищеварительной железы (печени) и реакциях 80 исследованных идентифицированных нейронов (41 для R.Pe.D.1 и 39 для L.Pe.D.1). Полученные данные обрабатывали посредством программы Statistica 6.0, считая их достоверными при  $P \leq 0,05$ .

### Лёгочное дыхание и мышечная локомоция моллюска *Lymnaea stagnalis* в условиях хронического действия нитритов натрия и калия

Анализ выживаемости животных в аквариумах с разным уровнем нитритов показал изменение их численности в зависимости от условий содержания (рисунок 1).



Ось абсцисс – время (дни), прошедшее с момента помещения (принят за 0) улиток в аквариумы с новыми условиями содержания. Ось ординат – число живых особей (точное значение представлено возле точек графика). Указано значение обобщённого критерия Вилкоксона ( $T$ ) при сравнении пар данных или  $\chi^2$  (модель Кокса) при сравнении множественных групп, а также уровня значимости  $P$ .

**Рисунок 1. – Выживаемость моллюсков в зависимости от условий содержания**

Отмечено статистически достоверное снижение количества моллюсков по отношению к контрольной группе в условиях действия нитрита Na (10 мМ) – 38,1 % погибших моллюсков от исходной численности к 7-му дню эксперимента. В то же время растворы  $\text{NaNO}_2$  (1 мМ), а также  $\text{KNO}_2$  (1 и 10 мМ) не вызывали статистически значимой гибели животных при сравнении с контролем (6,4 % погибших) – 4,8, 10,0 и 17,5 % погибших соответственно.

В случае длительного (1 неделя) содержания моллюсков в аквариумах в контрольных условиях (отстоявшаяся водопроводная вода) не было обнаружено изменений показателей дыхательной активности и мышечной локомоции в течение всего времени эксперимента (таблицы 1, 2). Действие  $\text{NaNO}_2$  (1 мМ) не вызывает изменений общей длительности лёгочного дыхания и частоты респи-

Таблица 1. – Дыхательное поведение *Лутнага* в условиях хронического действия нитритов Na и K

Экспериментальные группы	Показатель лёгочной респирации			
	Начальный день (0)	1-день инкубации	3-й день инкубации	7-й день инкубации
<i>Общая длительность лёгочного дыхания (с/ч)</i>				
<b>Контроль</b> $\chi^2 = 3,35$ ( $P = 0,3405$ )	237 (101;391) ( $n = 63$ )	177 (113;254) ( $n = 61$ )	206 (120;358) ( $n = 61$ )	182 (122;333) ( $n = 63$ )
<b>Нитрит Na (1 мМ)</b> $\chi^2 = 6,38$ ( $P = 0,0947$ )	329 (226;411) ( $n = 21$ )	187 (150;271) ( $n = 21$ )	244 (160;360) ( $n = 21$ )	186 (123;308) ( $n = 20$ )
<b>Нитрит Na (10 мМ)</b> $\chi^2 = 10,16$ ( $P = 0,0173$ )	141 (109;252) ( $n = 42$ )	155 (104;210) ( $n = 40$ )	184 (85;354) ( $n = 30$ )	102 (64;137)* <sup>#</sup> ( $n = 26$ )
<b>Нитрит K (1 мМ)</b> $\chi^2 = 17,13$ ( $P = 0,0007$ )	351 (228;493) ( $n = 20$ )	142 (109;202)* ( $n = 20$ )	215 (147;308)* ( $n = 20$ )	208 (125;264)* ( $n = 18$ )
<b>Нитрит K (10 мМ)</b> $\chi^2 = 7,87$ ( $P = 0,0492$ )	236 (124;389) ( $n = 40$ )	155 (104;214) ( $n = 36$ )	160 (85;253) ( $n = 36$ )	118 (71;196)* ( $n = 34$ )
<i>Длительность респираторного акта (с)</i>				
<b>Контроль</b> $\chi^2 = 3,91$ ( $P = 0,2718$ )	102 (85;131) ( $n = 61$ )	105 (83;125) ( $n = 59$ )	101 (79;132) ( $n = 61$ )	95 (70;126) ( $n = 56$ )
<b>Нитрит Na (1 мМ)</b> $\chi^2 = 12,22$ ( $P = 0,0067$ )	125 (112;148) <sup>#</sup> ( $n = 21$ )	96 (85;135)* ( $n = 20$ )	83 (70;133)* ( $n = 21$ )	66 (60;120)* ( $n = 20$ )
<b>Нитрит Na (10 мМ)</b> $\chi^2 = 5,97$ ( $P = 0,1130$ )	88 (66;126) ( $n = 41$ )	68 (56;99) <sup>#</sup> ( $n = 37$ )	92 (77;154) ( $n = 25$ )	84 (50;104) <sup>#</sup> ( $n = 26$ )
<b>Нитрит K (1 мМ)</b> $\chi^2 = 17,54$ ( $P = 0,0006$ )	172 (120;245) ( $n = 19$ )	81 (69;104)* ( $n = 20$ )	109 (83;120)* ( $n = 20$ )	113 (71;132) ( $n = 18$ )
<b>Нитрит K (10 мМ)</b> $\chi^2 = 9,72$ ( $P = 0,0211$ )	100 (75;168) ( $n = 38$ )	76 (58;112)* <sup>#</sup> ( $n = 32$ )	79 (56;101) <sup>#</sup> ( $n = 35$ )	79 (50;113)* <sup>#</sup> ( $n = 32$ )
<i>Частота дыхания (ед./ч)</i>				
<b>Контроль</b> $\chi^2 = 1,91$ ( $P = 0,5919$ )	2 (1;4) ( $n = 63$ )	2 (1;3) ( $n = 61$ )	2 (1;3) ( $n = 61$ )	2 (1;4) ( $n = 58$ )
<b>Нитрит Na (1 мМ)</b> $\chi^2 = 2,21$ ( $P = 0,5308$ )	2 (2;3) ( $n = 21$ )	2 (1;3) ( $n = 21$ )	3 (1;5) ( $n = 21$ )	2 (1;4) ( $n = 20$ )
<b>Нитрит Na (10 мМ)</b> $\chi^2 = 5,22$ ( $P = 0,1566$ )	2 (1;3) ( $n = 42$ )	2 (1;3) ( $n = 40$ )	2 (1;3) ( $n = 30$ )	1 (1;2) <sup>#</sup> ( $n = 26$ )
<b>Нитрит K (1 мМ)</b> $\chi^2 = 1,81$ ( $P = 0,6131$ )	2 (1;4) ( $n = 20$ )	2 (1;2) ( $n = 20$ )	2 (1;3) ( $n = 20$ )	2 (1;3) ( $n = 18$ )
<b>Нитрит K (10 мМ)</b> $\chi^2 = 3,22$ ( $P = 0,3588$ )	2 (1;4) ( $n = 40$ )	2 (1;3) ( $n = 36$ )	2 (1;3) ( $n = 36$ )	1 (1;2) <sup>#</sup> ( $n = 34$ )

*Примечание:* Для экспериментальных групп приведено значение критерия Фридмана, \* – достоверно по сравнению с начальным днём наблюдения (критерий знаков,  $P < 0,05$ ), <sup>#</sup> – достоверно по сравнению с контролем для того же времени инкубации ( $U$ -критерий Манна–Уитни).

рации, но приводит к прогрессивному снижению длительности отдельного респираторного акта в ходе эксперимента – в 1,3, 1,5 и 1,9 раза на 1-й, 3-й и 7-й день инкубации соответственно (по сравнению с начальными условиями). Для  $\text{KNO}_2$  (1 мМ) максимальное снижение общей длительности лёгочного дыхания (в 2,5 раза) приходится на 1-й и сохраняется в последующие (3- и 7-й) дни опыта – в 1,6 и 1,7 раза соответственно и обусловлено преимущественно равновеликим падением длительности респираторного акта (в 2,1, 1,6 и 1,5 раз для 1-го,

Таблица 2. – Мышечная локомоция *Lymnaea* в условиях хронического действия нитритов Na и K

Экспериментальные группы	Время пересечения 5 квадратов (1×1 см), с			
	Начальный день (0)	1-день инкубации	3-й день инкубации	7-й день инкубации
<b>Контроль</b> $\chi^2 = 4,25$ ( $P = 0,2358$ )	260 (165;340) ( $n = 61$ )	194 (149;272) ( $n = 57$ )	221 (164;290) ( $n = 58$ )	240 (153;301) ( $n = 53$ )
<b>Нитрит Na (1 мМ)</b> $\chi^2 = 11,46$ ( $P = 0,0095$ )	292 (272;364) <sup>#</sup> ( $n = 21$ )	270 (205;349) <sup>#</sup> ( $n = 20$ )	196 (160;291) ( $n = 21$ )	210 (160;274)* ( $n = 20$ )
<b>Нитрит Na (10 мМ)</b> $\chi^2 = 3,41$ ( $P = 0,3325$ )	155 (111;179) <sup>#</sup> ( $n = 42$ )	178 (133;222) ( $n = 40$ )	184 (139;255) ( $n = 28$ )	157 (120;185) ( $n = 26$ )
<b>Нитрит K (1 мМ)</b> $\chi^2 = 2,98$ ( $P = 0,3942$ )	198 (169;251) ( $n = 20$ )	218 (172;255) ( $n = 20$ )	172 (120;209) <sup>#</sup> ( $n = 20$ )	194 (157;276) ( $n = 18$ )
<b>Нитрит K (10 мМ)</b> $\chi^2 = 4,53$ ( $P = 0,2097$ )	179 (136;216) <sup>#</sup> ( $n = 38$ )	144 (120;174) <sup>#</sup> ( $n = 35$ )	180 (137;230) <sup>#</sup> ( $n = 36$ )	188 (136;241) ( $n = 34$ )

Примечание: Те же, что и для таблицы 1.

3-го и 7-го дня соответственно) при неизменности показателей частоты респирации. Возрастание концентрации используемых солей до 10 мМ приводит к снижению общей длительности дыхания, приходящейся на 7-й день опыта, – в 1,4 и 2 раза для  $\text{NaNO}_2$  и  $\text{KNO}_2$  соответственно. Отмечены достоверные изменения длительности респираторного акта (снижение в 1,3 раза на 1- и 7-й дни в условиях действия нитрита K), но не частоты дыхания (см. данные таблицы 1).

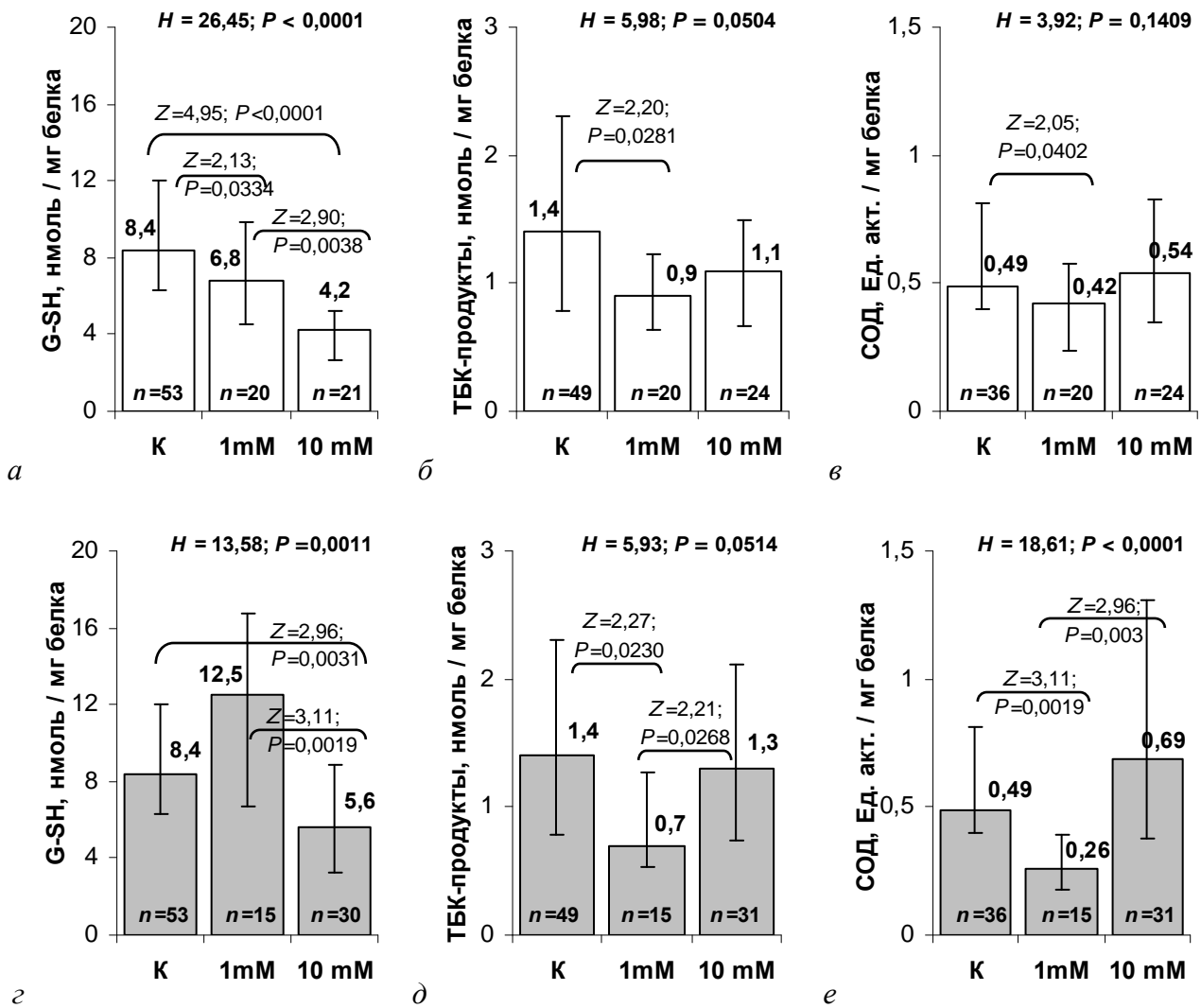
Прогрессивное, с увеличением времени экспозиции моллюсков в экспериментальных условиях, возрастание скорости их перемещения отмечено в отношении нитрита Na (1 мМ) – в 1,4 раза для 7-го дня опыта. Возрастание действующей концентрации  $\text{NaNO}_2$  до 10 мМ, равно как и использование  $\text{KNO}_2$  (1 и 10 мМ), не изменяет локомоцию *Lymnaea* (см. данные таблицы 2).

Таким образом, лёгочное дыхание прудовика оказывается в большей степени подвержено модифицирующему влиянию солей азотистой кислоты по сравнению с мышечной локомоцией, что может свидетельствовать о большей резистентности серотонинергических путей ЦНС, по сравнению с дофаминергическими, к хроническому действию указанного фактора.

#### **Антиоксидантная система защиты в клетках пищеварительной железы (печени) моллюска *Lymnaea stagnalis* в условиях хронического действия нитритов натрия и калия**

Развитие окислительного стресса в тканях индикаторных видов традиционно ассоциируется с действием различных органических [Porte e.a., 1991] и неорганических [Regoli e.a., 1998] поллютантов. При этом именно клетки гемолимфы (гемоциты) являются источником как супероксид аниона ( $\text{O}_2^-$ ), так и NO – начальных звеньев в цепи свободно-радикальных превращений, инициирующих включение антиоксидантных систем организма [Dailianis, 2009].

Действие нитритов натрия и калия приводит к изменению состояния антиоксидантной защиты в клетках печени *Lymnaea stagnalis* (рисунок 2).



Представлено значение медианы для исследуемого показателя (числа над столбиками диаграммы) и число экспериментальных проб ( $n$ ). Разброс представлен 25-м (нижний) и 75-м (верхний) процентиллями. Для рядов данных указано значение  $H$ -критерия Крускала–Уоллиса, для статистически значимых пар сравнения –  $Z$  ( $U$ -критерий Манна–Уитни), а также уровень значимости  $P$ .

К – контрольная группа, светлые столбы – нитрит Na (части  $a, б, в$ ), серые – нитрит калия (части  $z, д, e$ )  
 $a, z$  – восстановленный глутатион,  $б, д$  – ТБК-продукты,  $в, e$  – активность СОД

**Рисунок 2. – Показатели антиокислительной защиты в клетках печени у моллюсков длительно содержавшихся в условиях действия нитритов натрия и калия**

В случае  $\text{NaNO}_2$  отмечено статистически достоверное, прогрессивное снижение уровня Г-SH по сравнению с контролем – в 1,2 и 2 раза для 1 и 10 мМ соответственно, а реакция на приложение  $\text{KNO}_2$  носила несколько отличный характер – падение уровня Г-SH в клетках печени в условиях действия 10 мМ (в 1,5 раза), но не 1 мМ раствора  $\text{KNO}_2$  (рисунок 2  $a, z$ ). Изменения уровня ТБК-активных продуктов так же носили статистически достоверный характер в отношении обеих использованных солей. В частности, для нитрита Na (1 мМ) отмечено снижение указанного показателя в 1,3 раза по сравнению с контролем, в то время как в концентрации 10 мМ статистически значимых различий не наблюдалось. Для нитрита K (1 мМ) степень снижения количества ТБК-активных продуктов по сравнению с контролем была ещё выше – в 2 раза, а в

концентрации 10 мМ статистически достоверно от него не отличалась (рисунок 2 б, д). Схожая динамика отмечена и для СОД – падение её активности выявлено в случае использования 1 мМ растворов нитритов Na и K – в 1,2 и 1,9 раза соответственно. В то время как при действии указанных солей в концентрации 10 мМ значения показателей не отличались от контрольных (рисунок 2 в, е). Статистически достоверных (к контролю) изменений активности Se-ГП ( $H = 2,52$ ;  $P = 0,2834$  для  $\text{NaNO}_2$  и  $H = 1,95$ ;  $P = 0,3781$  для  $\text{KNO}_2$ ) и общего количества белка ( $H = 0,22$ ;  $P = 0,8973$  для  $\text{NaNO}_2$  и  $H = 0,49$ ;  $P = 0,7837$  для  $\text{KNO}_2$ ) не было обнаружено ни для одной из используемых солей.

Таким образом, изменение показателей антиокислительной защиты в органах пищеварительной системы моллюсков отражают формирование адаптаций, направленных на предотвращение развития окислительного стресса в организме в ответ на действие неорганических загрязнителей окружающей среды.

**Спонтанная электрическая активность идентифицированных дофамин- (R.Pe.D.1) и серотонин- (L.Pe.D.1) эргических нейронов ЦНС моллюска *Lymnaea stagnalis* в условиях хронического действия нитрита натрия**

Пара симметрично расположенных гигантских клеток правого и левого педальных ганглиев [Winlow e.a., 1981; Winlow & Haydon, 1986] – R.Pe.D.1 (дофаминергический) и L.Pe.D.1 (серотонинергический) относятся к полифункциональным вставочным нейронам интегрированными в структуру центральных генераторов дыхательного (R.Pe.D.1) и локомоторного (L.Pe.D.1) ритмов [Syed e.a., 1990; Tsyganov, 2000], т. е. они характеризуются и функциональными отличиями друг от друга.

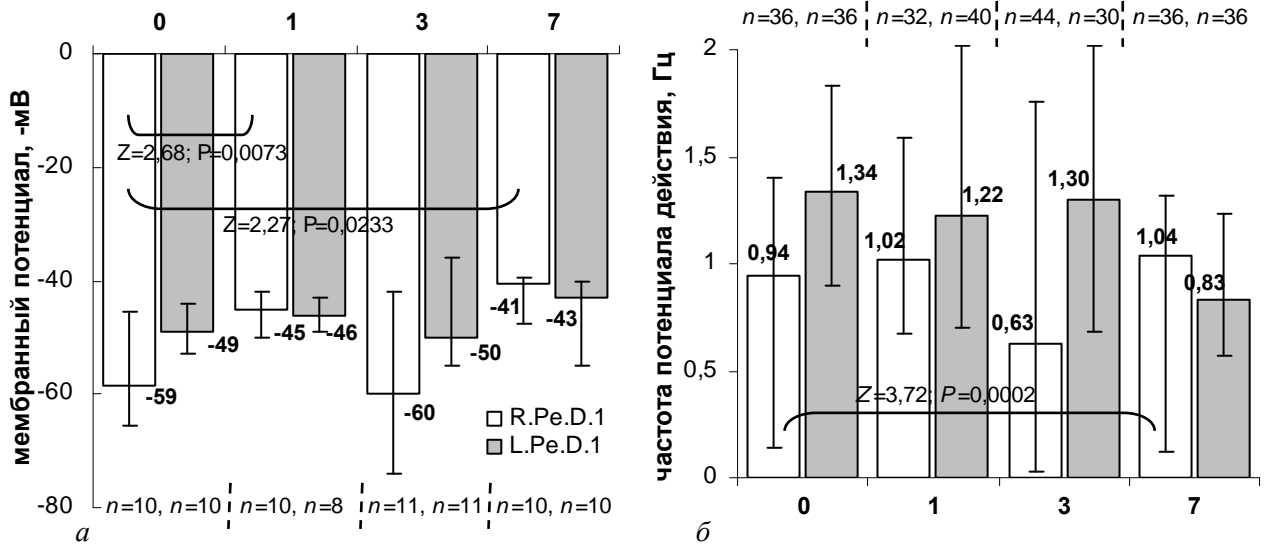
Хроническое действие нитрита Na приводит к деполяризации R.Pe.D.1, достигая максимума к 7-му дню инкубации, но не изменяет уровень поляризации мембраны L.Pe.D.1 (рисунок 3 а). Достоверных изменений частоты потенциала действия R.Pe.D.1 выявлено не было, а для L.Pe.D.1 отмечено снижение частоты импульсации с увеличением времени действия нитрита натрия, достигая максимума на 7-й день инкубации – 1,6 кратное падение по сравнению с контролем (рисунок 3 б).

Для R.Pe.D.1 смещение кривой вольт-амперной характеристики (ВАХ) по сравнению с контролем отмечено уже на 1-й день экспозиции животных в 10 мМ растворе  $\text{NaNO}_2$  – вправо в области положительных и влево в области отрицательных токов (рисунок 4 а). В дальнейшем (3- и 7-й дни) отклонения кривой ВАХ не были статистически значимы. Для L.Pe.D.1 изменение положения частей кривой ВАХ было выявлено лишь на 3-й день эксперимента и сохранялось на том же уровне по прошествии недели – влево в области положительных и вправо в области отрицательных токов (рисунок 4 б).

Различия между реакциями R.Pe.D.1 и L.Pe.D.1 на действие  $\text{NaNO}_2$  (10 мМ) распространяются на временные и амплитудные характеристики спайка.

$H_{R.Pe.D.1} = 9,22$  ( $P < 0,0265$ );  $H_{L.Pe.D.1} = 1,06$  ( $P < 0,7869$ )

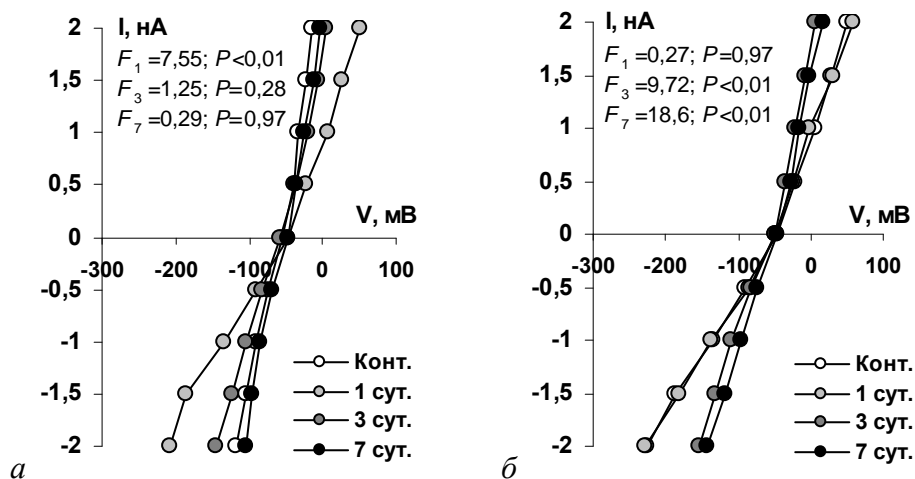
$H_{R.Pe.D.1} = 4,26$  ( $P < 0,2350$ );  $H_{L.Pe.D.1} = 14,7$  ( $P < 0,0021$ )



Данные в виде медиана (25 и 75 процентиля). Числа на вершине столбиков – значение показателя,  $n$  – число нейронов для анализа (а) или число наблюдений (б). Ось абсцисс – время (дни), прошедшее с момента помещения (принят за 0) улиток в аквариумы с новыми условиями. Для каждого типа нейронов приведены значения  $H$ -критерия Крускала–Уоллиса (нижний индекс) при сравнении нескольких групп. Фигурные скобки даны для статистически различных пар сравнения (указаны значения  $Z$   $U$ -критерия Манна–Уитни и уровня значимости  $P$  при сравнении двух независимых групп).

а – потенциал покоя, б – частота потенциала действия

**Рисунок 3. – Электрическая активность нейронов R.Pe.D.1 и L.Pe.D.1 в условиях хронического действия нитрита натрия (10 мМ)**

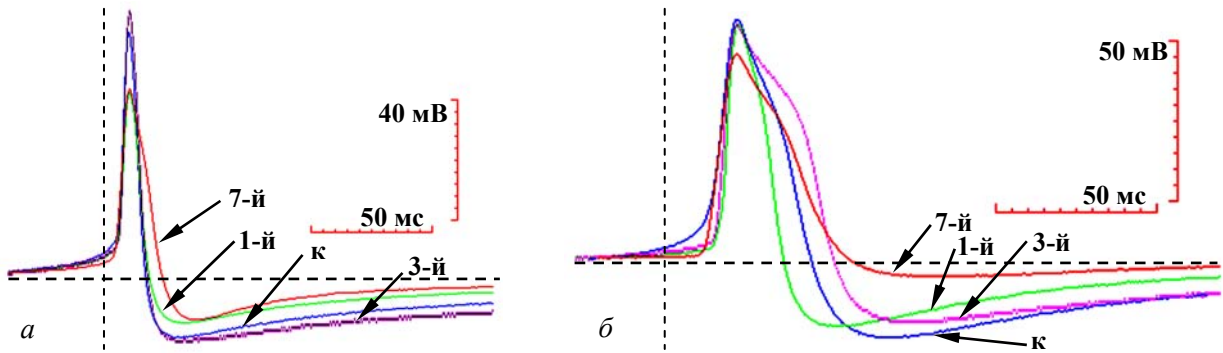


Дано значение  $F$  критерия и уровня значимости  $P$  (дисперсионный анализ для повторных измерений) при сравнении с контролем для 1-го, 3-го и 7-го дня опыта (нижний индекс).

**Рисунок 4. – Вольт-амперная характеристика мембраны нейронов**

**R.Pe.D.1 (а) и L.Pe.D.1 (б) в условиях хронического действия нитрита натрия (10 мМ)**

Для R.Pe.D.1 выявлено изменение длительности фаз спайка: ДП ( $H = 20,0$ ,  $P = 0,0002$ ) и РП ( $H = 22,7$ ,  $P < 0,0001$ ) – первоначальное снижение, сменяющееся возвратом к исходному уровню и прогрессивное увеличение по мере времени инкубации соответственно. Для L.Pe.D.1 изменения претерпевала фаза РП ( $H = 22,7$ ,  $P < 0,0001$ ), но не ДП ( $H = 22,7$ ,  $P < 0,0001$ ) (рисунок 5).



Дано изображение «наложенных» друг на друга потенциалов действия, с совмещением уровня потенциала покоя, от разных препаратов ЦНС, полученных от моллюсков, отличающихся по времени действия  $\text{NaNO}_2$  (к – контроль, 1-й, 3-й и 7-й дни опыта).

**Рисунок 5. – Форма спонтанных потенциалов действия нейронов R.Pe.D.1 (а) и L.Pe.D.1 (б) в условиях хронического действия нитрита натрия (10 мМ)**

Длительность фазы СГ претерпевала максимальное снижение на 1-й день опыта – в 1,9 (R.Pe.D.1) и 1,3 (L.Pe.D.1) раза. Амплитуда спайка снижалась с увеличением времени инкубации:  $H = 22,7$ ,  $P < 0,0001$  (R.Pe.D.1) и  $H = 22,7$ ,  $P < 0,0001$  (L.Pe.D.1). При этом изменений амплитуды СГ и порога для R.Pe.D.1 выявлено не было, а для L.Pe.D.1 речь идёт о её 1,6- и 1,7-кратном снижении соответственно, приходящимися на 7-й день опыта.

Таким образом, различия в реакциях R.Pe.D.1 и L.Pe.D.1 обусловлены как внутренними (потенциал покоя, вольт-амперная характеристика мембраны) свойствами клеток, так и внешними (частота генерации потенциала действия) факторами, связанными с синаптическими влияниями от других нейронов ЦНС. В совокупности они и определяют специфичность ответов контролируемых ими форм поведения на действие нитритов.

### **Адаптация моллюска *Lymnaea stagnalis* к существованию в условиях хронической нитритной нагрузки**

Адаптацию к новым условиям существования можно рассматривать как оптимальный приспособительный результат со стороны организма, значительно повышающий его шансы на выживание. Несмотря на высокую токсичность нитритов для гидробионтов, *Lymnaea stagnalis* демонстрирует достаточную устойчивость к действию данного загрязнителя как и целый ряд других пресноводных моллюсков (*Anodonta anatina*, *Megaloniais nervosa*, *Potamopyrgus antipodarum*, *Unio crassus*, *Pomacea paludosa*), для которых полублетальные дозы нитрит-аниона превышают 10 мМ уровень [Camargo e.a., 2005]. Одной из её причин может быть сохранность мембранных механизмов, обеспечивающих функционирование нервных клеток мозга улитки и снижение дыхательной активности, что замедляет развитие окислительного стресса в организме. В сочетании с развитой антиокислительной защитой в клетках печени это обеспечивает реализацию физиологических функций в условиях нитритного загрязнения среды.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. С увеличением длительности содержания моллюсков в нормальных условиях не происходит изменений показателей их лёгочного дыхания (общей длительности, частоты респирации, длительности респираторного акта) и мышечной локомоции. Действие нитрита натрия и калия в концентрации 1 мМ приводит к финальному (по прошествии 7-ми дневной инкубации) 1,9- и 1,5-кратному снижению длительности дыхательного акта, на фоне остающейся неизменной частоты респирации. Возрастание действующей концентрации солей до 10 мМ выражается уже в 1,4- и 2-кратном (для нитрита натрия и калия соответственно) падении общей длительности лёгочного дыхания. Увеличение (в 1,4 раза) скорости перемещения моллюсков по твёрдому субстрату отмечено лишь в отношении 1 мМ раствора нитрита натрия, в то время как для 10 мМ раствора, а также для нитрита калия (1 и 10 мМ) оно не носило статистически значимого характера [3, 4, 7, 9].

2. Недельная экспозиция моллюсков в 1 и 10 мМ растворах нитритов натрия и калия приводит к изменению характеристик антиокислительной защиты в клетках печени. Отмечено снижение уровня восстановленного глутатиона, Г-SH (в 1,2 раза), а также количества ТБК-активных продуктов (в 1,6 раза) и активности супероксиддисмутазы, СОД (в 1,2 раза), в условиях действия нитрита натрия в 1 мМ концентрации. Для нитрита калия (1 мМ) речь идёт о 1,9- и 2-кратном падении количества ТБК-активных продуктов и активности СОД. Возрастание действующей концентрации до 10 мМ приводит к 2- и 1,5-кратному снижению уровня Г-SH (для нитрита натрия и калия соответственно) оставляя неизменными другие показатели. Ни для одной из экспериментальных концентраций использованных солей не было отмечено изменений активности Se-зависимой глутатионпероксидазы, а также количества общего белка. Указанное действие нитритов может быть направлено на формирование адаптаций, препятствующих развитию окислительного стресса в организме моллюска в ответ на действие неорганических загрязнителей окружающей среды [1, 8, 10].

3. Действие нитрита натрия (10 мМ) приводит к деполаризации мембраны дофаминергического нейрона дыхательной сети ЦНС *Lymnaea stagnalis* (R.Pe.D.1), но не изменяет частоту его импульсации. В отношении серотонинергического нейрона локомоторной сети (L.Pe.D.1), напротив, отмечено снижение частоты генерации потенциала действия, на фоне статистически неизменного значения потенциала покоя. Для клетки R.Pe.D.1 выявлено первоначальное отклонение (вправо в области положительных и влево в области отрицательных токов, что говорит о снижении способности его мембраны к развитию как возбуждения, так и торможения) кривой вольт-амперной характери-

стики мембраны, сменяющееся последующим возвратом к исходным значениям. Для нейрона L.Pe.D.1 сдвиги кривой вольт-амперной характеристики (влево в области положительных и вправо в области отрицательных токов, свидетельствующих о возрастании его способности к процессам возбуждения и торможения) возникают с задержкой, но сохраняются по прошествии недельной экспозиции моллюсков в растворе нитрита натрия [2, 6, 11, 12, 13].

4. Изменение временных характеристик спайка у исследованных нейронов носит отличный, в зависимости от типа клетки, характер. Начальное снижение длительности, сменяющееся её восстановлением в исходных значениях, отмечено для фаз деполяризации у нейрона R.Pe.D.1, реполяризации у нейрона L.Pe.D.1, а так же следовой гиперполяризации обеих клеток. Длительность фазы реполяризации у R.Pe.D.1 прогрессивно возрастает по мере увеличения времени нахождения моллюсков в условиях действия нитрита натрия, а длительность фазы деполяризации у L.Pe.D.1 не изменяется с течением времени эксперимента. Амплитуда потенциала действия претерпевает итоговое снижение в 1,2 и 1,3 раза (для R.Pe.D.1 и L.Pe.D.1 соответственно), тогда как конечное снижение амплитуд порога (в 1,6 раза) и следовой гиперполяризации (в 2 раза) отмечено лишь в отношении спайков нейрона L.Pe.D.1, но не R.Pe.D.1 [5, 6, 14].

5. Развитие физиологической адаптации к действию нитрит-аниона на поведенческом уровне связано с уменьшением дыхательной активности, что может рассматриваться как способ снижения свободно-радикальной нагрузки в организме моллюсков, возникающей в условиях сильного неорганического загрязнения окружающей среды. Этому так же способствует развитая система антиокислительной защиты в клетках пищеварительной железы (печени) прудовика, а неизменность локомоторной активности позволяет сохранить возможность полноценной реализации других форм поведения *Lymnaea stagnalis*. При этом различия в реакциях функциональных систем организма на возрастание нитритной нагрузки в окружающей среде обусловлены особенностями электрических характеристик и свойств центральных нейронов, отличающихся друг от друга в зависимости от функциональной принадлежности клетки [1, 3, 5, 6, 11].

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

Разработанные модели оценки изменений поведенческой активности и электрических свойств мембраны идентифицированных клеток мозга беспозвоночных позволяют выявить характер воздействия, оказываемого водорастворимыми неорганическими загрязнителями окружающей среды на организм моллюсков. Используемые для анализа временных и амплитудных показателей спайка подходы позволяют провести первоначальную оценку влияния различных экологических факторов на мембранные системы нервных клеток, определяющие их электрические свойства. Препараты изолированной нервной систе-

мы прудовика могут быть рекомендованы для использования в научно-исследовательской практике лабораторий экологической и токсикологической направленности для разработки систем долговременного мониторинга качества водных ресурсов.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры физиологии человека и животных БГУ (акт № 0304/820). Они могут найти применение в учреждениях образования экологического и биологического профилей, использоваться при чтении курсов «Физиология человека и животных», «Экологическая физиология», «Сравнительная физиология», «Нейробиология», организации самостоятельной работы студентов в рамках подготовки курсовых, дипломных и магистерских проектов.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в научных журналах:

1. **Шахрани, М.Х.Д.** Антиоксидантная система защиты в пищеварительной железе (печени) моллюска *Lymnaea stagnalis* в условиях хронического закисления среды обитания / М.Х.Д. Шахрани, А.В. Сидоров // Труды Белорусского государственного университета. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2016. – Т. 11, Ч. 1. – С. 127–132.
2. Костюк, В.А. Современные тенденции в научной деятельности кафедры физиологии человека и животных биологического факультета: клеточный и системный подходы / В.А. Костюк, А.И. Потапович, А. Албухайдар, С.А. Руткевич, Х.-А. Хрущ, К.М. Люзина, А.В. Сидоров, **М.Х.Д. Шахрани**, А. Эль-Рахал, А.Г. Чумак // Вестн. БГУ. Сер.2. Химия, Биология, География. – 2016. – № 3. – С. 3–12.
3. **Шахрани, М.Х.Д.** Лёгочное дыхание и мышечная локомоция *Lymnaea stagnalis* при действии нитритов натрия и калия в условиях хронического закисления среды обитания / М.Х.Д. Шахрани, А.В. Сидоров // Новости мед.-биол. наук (News of Biomed. Sci). – 2017. – Т. 15, № 1. – С. 5–9.
4. **Шахрани, М.Х.Д.** Лёгочное дыхание и мышечная локомоция *Lymnaea stagnalis* в условиях хронического закисления среды обитания / М.Х.Д. Шахрани, А.В. Сидоров // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. – 2017. – № 1. – С. 44–48.
5. **Шахрани, М.Х.Д.** Потенциалы действия нейронов педального ганглия моллюска *Lymnaea stagnalis* при действии высоких доз нитрита натрия / М.Х.Д. Шахрани, А.В. Сидоров // Новости мед.-биол. наук (News of Biomed. Sci). – 2017. – Т. 16, № 2. – С. 14–18.
6. **Шахрани, М.Х.Д.** Сравнительная характеристика электрофизиологических показателей идентифицированных дофаминергических (R.Pe.D.1) и серотонинергических (L.Pe.D.1) нейронов центральной нервной системы мол-

люска *Lymnaea stagnalis* / М.Х.Д. Шахрани, А.В. Сидоров // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. – 2017. – № 3. – С. 3–9.

#### **Материалы конференций:**

7. **Шахрани, М.Х.Д.** Изменение локомоторной активности пресноводного лёгочного моллюска *Lymnaea stagnalis* в условиях длительного закисления среды обитания / М.Х.Д. Шахрани, А.В. Сидоров // Физиологические проблемы адаптации: сборник научных статей. – Ставрополь: Изд-во СКФУ, 2015. – С. 160–161.

8. **Шахрани, М.Х.Д.** Глутатионпероксидазная активность в печени моллюска *Lymnaea stagnalis* при закислении среды обитания / М.Х.Д. Шахрани, А.В. Сидоров // Кислород и свободные радикалы : сборник материалов Международной научно-практической конференции [Электронный ресурс] / отв. ред. В. В. Зинчук. – Электрон. текст. дан. и прогр. (объем 3 Mb). – Гродно : ГрГМУ, 2016. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). – С. 184–186.

#### **Тезисы докладов:**

9. **Шахрани, М.Х.Д.** Хроническое действие нитритов натрия и калия на дыхательное поведение моллюска *Lymnaea* при закислении / М.Х.Д. Шахрани, А.В. Сидоров // Сахаровские чтения 2015 года: экологические проблемы XXI века: Мат-лы 15-й межд. науч. конф., 21–22 мая 2015, Минск, Республика Беларусь / под ред. С. С. Позняка, Н. А. Лысухо. – Минск : МГЭУ им. А.Д. Сахарова, 2015. – С. 196–197.

10. **Шахрани, М.Х.Д.** Изменение уровня восстановленного глутатиона и глутатионпероксидазной активности в печени моллюска *Lymnaea stagnalis* при закислении среды обитания / М.Х.Д. Шахрани, А.В. Сидоров // Нейрофизиология боли в эксперименте и клинике: Мат-лы межд. конф-и, Минск, 16 окт. 2015 / Новости мед.-биол. наук (News of Biomed. Sci). – 2015. – Т. 12, № 3. – С. 62–63.

11. **Shahrani, M.H.G.** Responses of identified neurons within *Lymnaea*'s CNS on chronic action of sodium nitrite / M.H.G. Shahrani, A.V. Sidorov // Simpler Nervous Systems: XI East European Conference of the International Society for Invertebrate Neurobiology Abstracts. Zvenigorod, 15–19 May, 2016 / Moscow: Institute of Highest Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, 2016. – P. 73.

12. **Шахрани, М.Х.Д.** Вольт-амперная характеристика мембраны центрального дофаминергического нейрона модельного нейробиологического объекта при различных видах стресса / М.Х.Д. Шахрани, А. ЭльРахал, А.В. Сидоров // Стресс как этиологический фактор болезней человека: Мат-лы межд. конф-и, Минск, 14 окт. 2016 / Новости мед.-биол. наук (News of Biomed. Sci). – 2016. – Т. 14, № 3. – С. 99–100.

13. **Шахрани, М.Х.Д.** Вольт-амперная характеристика идентифицированных дофамин- (R.Pe.D.1) и серотонин (L.Pe.D.1) эргического нейронов ЦНС моллюска *Lymnaea stagnalis* при хроническом действии высоких доз нитрита натрия / М.Х.Д. Шахрани, А.В. Сидоров // Сигнальные механизмы регуляции физиологических функций: тез. докл. XIV Съезда Белорус. о-ва физиологов и III Междунар. науч. конф.: к 95-летию со дня основания каф. физиологии человека и животных БГУ и нормальной физиологии БГМУ; к 110-летию со дня рождения акад. И.А. Булыгина, Минск, 5 окт. 2017 г. / Редкол.: В. В. Лысак [и др.]. – Минск: Изд. центр БГУ, 2017. – С. 131.

14. **Шахрани, М.Х.Д.** Временные и амплитудные характеристики спонтанных потенциалов действия идентифицированного дофаминергического нейрона (R.Pe.D.1) ЦНС моллюска *Lymnaea stagnalis* при действии высоких доз нитрита натрия / М.Х.Д. Шахрани, А.В. Сидоров // Биологическая осень 2017 : к Году науки в Беларуси : тез. докл. Междунар. науч. конф. молодых ученых, 9 ноября 2017 г., Минск, Беларусь / БГУ, Биологический фак., Совет молодых ученых ; редкол.: В. В. Лысак (гл. ред.) [и др.]. – Минск : БГУ, 2017. – С. 158–159.



## РЕЗЮМЕ

Шахрани Мохаммед Хусейн Джиума

### Нейронные механизмы адаптации моллюска *Lymnaea stagnalis* при хроническом действии нитритов натрия и калия

**Ключевые слова:** идентифицированные нейроны, лёгочное дыхание, мышечная локомоция, электрические характеристики клеток, антиокислительная система, дофамин, серотонин, нитритное загрязнение, моллюск.

**Цель исследования:** установить клеточные механизмы, определяющие формирование устойчивости нейронных сетей модельного нейробиологического объекта – моллюска *Lymnaea stagnalis* к действию высоких доз нитритов щелочных металлов.

**Методы исследования:** физиологические, биохимические, статистические.

**Использованная аппаратура:** компьютеризированная электрофизиологическая установка (усилитель МС-01М, программа электронного осциллографа InputWin), спектрофотометр Cary-50.

**Полученные результаты и их новизна:** впервые оценена динамика показателей лёгочного дыхания и мышечной локомоции *Lymnaea stagnalis* в условиях пролонгированного действия нитритов Na и K. Установлено, что по мере увеличения времени нахождения животных в новых условиях отмечается снижение выраженности их респираторного поведения при неизменности показателей двигательной активности. Установлена динамика изменения электрических характеристик идентифицированных клеток дыхательной (дофаминергический нейрон R.Pe.D.1) и локомоторной (серотонинергический нейрон L.Pe.D.1) сетей ЦНС *Lymnaea stagnalis* при пролонгированном действии нитрита Na и доказано разнонаправленное изменение из возбудимости. Выявлено модифицирующее действие нитритов Na и K в отношении антиокислительной защиты в клетках пищевой железы (печени), указывающее на развитие адаптаций, направленных на нейтрализацию эффектов неорганических загрязнителей окружающей среды.

**Рекомендации по использованию:** разработанные модели оценки изменений поведенческой активности и электрических свойств мембраны идентифицированных клеток мозга беспозвоночных позволяют выявить характер воздействия, оказываемого водорастворимыми неорганическими загрязнителями окружающей среды, на организм гидробионтов.

**Область применения:** научно-исследовательские лаборатории экологической и токсикологической направленности, сравнительной физиологии, биофизики, учреждения образования биологического и экологического профилей.

# РЭЗІЮМЭ

Шахрані Махамед Хусэйн Джіўма

## Нейронныя механізмы адаптацыі малюска *Lymnaea stagnalis* пры хранічным дзеянні нітрытаў натрыю і калію

**Ключавыя словы:** ідэнтыфікаваныя нейроны, лёгачнае дыханне, мышачная лакамоцыя, электрычныя характарыстыкі клеткі, антыакісляльная сістэма, дафамін, сератанін, нітрытнае забруджванне, малюск.

**Мэта даследавання:** устанавіць клеткавыя механізмы, якія вызначаюць фарміраванне ўстойлівасці нейронавых сетак мадэльнага нейрабіялагічнага аб'екта – малюска *Lymnaea stagnalis* да дзеяння высокіх доз нітрытаў шчолачных металаў.

**Метады даследавання:** фізіялагічныя, біяхімічныя, статыстычныя.

**Выкарыстаная апаратура:** кампутарызаваная электрафізіялагічная ўстаноўка (ўзмацняльнік MC-01M, праграма электроннага асцілографа Input-Win), спектрафатометр Cary-50.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна:** ўпершыню ацэнена дынаміка паказчыкаў лёгачнага дыхання і мышачнай лакамоцыі *Lymnaea stagnalis* ва ўмовах пралангаванага дзеяння нітрытаў Na і K. Устаноўлена, што па меры павелічэння часу знаходжання жывёл у новых умовах адзначаецца зніжэнне выяўленасці іх рэспіраторнага паводзяння пры нязменнасці паказчыкаў рухальнай актыўнасці. Устаноўлена дынаміка змены электрычных характарыстык ідэнтыфікаваных клетак дыхальнай (дафамінэргічны нейрон R.Pe.D.1) і лакаматорнай (сератанінэргічны нейрон L.Pe.D.1) сеткі ЦНС *Lymnaea stagnalis* пры пралангаваным дзеянні нітрытаў натрыя і даказаная рознакіраваная змена іх узбудлівасці. Выяўлена мадыфікуючае дзеянне нітрытаў Na і K ў дачыненні антыакісляльнай абароны ў клетках стрававальнай залозы (печань), якое ўказвае на развіццё адаптацый, накіраваных на нейтралізацыю эфектаў неарганічных забруджвальнікаў навакольнага асяроддзя.

**Рэкамендацыі па выкарыстанню:** распрацаваныя мадэлі ацэнкі змяненняў паводніцкай актыўнасці і электрычных ўласцівасцей мембраны ідэнтыфікаваных клетак мозгу беспазваночных дазваляюць выявіць характар ўздзеяння, якое аказваюць водарастваральныя неарганічныя забруджвальнікі навакольнага асяроддзя на арганізм гідрабіёнтаў.

**Галіна выкарыстання:** навукова-даследчыя лабараторыі экалагічнай і таксікалагічнай накіраванасці, параўнальная фізіялогія, біяфізіка, установы адукацыі біялагічнага і экалагічнага профіля.

# SUMMARY

**Shahrani Mohamed Hussien Giuma**

## **Neuronal mechanisms of adaptation in mollusc *Lymnaea stagnalis* to the chronic impact of sodium and potassium nitrites**

**Key words:** identified neurons, lung respiration, muscular locomotion, electrical properties of the cells, antioxidant system, dopamine, serotonin, nitrites pollution, mollusc

**Aim of research:** to identify the cellular basis underlies the resistance of neuronal networks of the model neurobiological object, mollusc *Lymnaea stagnalis*, to the impact of alkaline metals nitrites.

**Methods of research:** physiological, biochemical, statistical.

**Equipment used:** computerised electrophysiological setup (amplifier MC-01M, electron oscilloscope program InputWin), spectrophotometer Cary-50.

**Results and their novelty:** for the first time, the dynamics of lung respiration and muscular locomotion on the chronic impact of sodium and potassium nitrites were analyzed. With the lapse of incubation time the decline of respiratory activity, but not locomotion, were observed. Electrical properties of giant identified dopamine- (R.Pe.D.1, respiratory neuronal network) and serotonin- (L.Pe.D.1, neuronal network of locomotion) containing neurons were detected under sodium nitrite impact. It was estimated multidirectional changes in their excitability. Solutions of sodium and potassium nitrites seem to modulate antioxidant defence system of hepatopancreas. Their effects point out on the development of adaptation aimed the neutralization of environmental inorganic pollutants action.

**Recommendation for application:** developed model for the analysis of behavioral activity and electrical properties of membrane of identified nervous cells of invertebrate brain enable to studying the effects of water-soluble inorganic pollutants on the organism of hydrobionts.

**Field of application:** research laboratories in ecology and toxicology, comparative physiology, biophysics, Institutes of higher education in Biology and Ecology.

Подписано в печать 28.05.2018 Формат 60x84<sub>1/16</sub> Бумага офсетная  
Гарнитура Роман Печать цифровая Усл. печ. л. 1,3 Уч. изд. л. 1,6 Тираж 60 экз. Заказ № 2667  
ИООО «Право и экономика» 220072 Минск Сурганова 1, корп. 2  
Тел. 284 18 66, 8 029 684 18 66  
E-mail: pravo-v@tut.by; pravo642@gmail.com Отпечатано на издательской системе  
KONICA MINOLTA в ИООО «Право и экономика»  
Свидетельство о государственной регистрации издателя,  
изготовителя, распространителя печатных изданий, выданное  
Министерством информации Республики Беларусь 17 февраля 2014 г.  
в качестве издателя печатных изданий за № 1/185