

УДК 591.044+591.5

## ЛЕГОЧНОЕ ДЫХАНИЕ И МЫШЕЧНАЯ ЛОКОМОЦИЯ *LYMNAEA STAGNALIS* В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ЗАКИСЛЕНИЯ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ

М. ШАХРАНИ<sup>1)</sup>, А. В. СИДОРОВ<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

В опытах на моллюсках установлено, что недельное нахождение животных в аквариумах с pH воды 6,3 приводит к интенсификации легочного дыхания, выражающейся в увеличении его длительности (в 1,5 раза) и частоты (в 1,4 раза), а также к равновеликому возрастанию скорости локомоции (на третьи сутки после начала экспериментов). К седьмому дню инкубации скорость перемещения моллюсков по субстрату вновь уравнивалась с таковой для контрольной группы (содержание в аквариумах с pH воды 7,3). Предполагается, что указанные различия могут быть обусловлены неодинаковой чувствительностью к уровню pH интерстиция дофамин- и серотонинергических нейронов и синапсов, вовлеченных в контроль дыхательной и локомоторной активностей соответственно.

**Ключевые слова:** моллюски; поведение; кислотно-основное равновесие (pH); экология пресных вод; адаптация.

## LUNG RESPIRATION AND MUSCULAR LOCOMOTION OF *LYMNAEA STAGNALIS* AT CHRONIC ACIDIFICATION OF ENVIRONMENT

M. SHAHRANI<sup>a</sup>, A. V. SIDOROV<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Belarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

Corresponding author: sidorov@bsu.by

In experiments on molluscs is assumed that weekly incubation of animals in aquariums with water pH level at 6.3 units, results in intensification of lung respiration, accompanied by its duration (1.5-time) and frequency (1.4-time) increase, as well as in equivalent rise of locomotion speed (on 3<sup>rd</sup> day after the beginning of experiments). On seventh day of incubation, locomotion speed became the same in comparison with control group (incubation in aquariums with water pH level at 7.3 units). We suggest that mentioned above differences are due to the different sensitivity of dopamine- and serotonin-containing neurons and synapses, which are involves in motor control of lung respiration and muscular locomotion respectively, to interstitial pH level.

**Key words:** molluscs; behavior; acid-base balance (pH); fresh water ecology; adaptation.

---

### Образец цитирования:

Шахрани М., Сидоров А. В. Легочное дыхание и мышечная локомоция *Lymnaea stagnalis* в условиях хронического закисления среды обитания // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 44–48.

### For citation:

Shahrani M., Sidorov A. V. Lung respiration and muscular locomotion of *Lymnaea stagnalis* at chronic acidification of environment. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 44–48 (in Russ.).

---

### Авторы:

**Мохаммед Шахрани** – аспирант кафедры физиологии человека и животных биологического факультета. Научный руководитель – А. В. Сидоров.

**Александр Викторович Сидоров** – доктор биологических наук, доцент; профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

### Authors:

**Mohamed Shahrani**, postgraduate student at the department of physiology of human and animals, faculty of biology.

alshahranimohamed45@gmail.com

**Alexander Sidorov**, doctor of science (biology), docent; professor at the department of physiology of human and animals, faculty of biology.

sidorov@bsu.by

## Введение

Развитие физиологических адаптаций – неперенное условие приспособления живых организмов к новым условиям существования. Характер возникающих изменений у животных во многом определяется реакцией со стороны нервной системы, играющей ключевую роль в формировании итогового поведенческого паттерна. Кислотно-основное равновесие (рН) является одним из факторов, определяющих экологическое состояние пресных вод, а также плотность популяции различных видов гидробионтов [1; 2]. Моллюск *Lymnaea stagnalis* (прудовик обыкновенный) – типичный обитатель пресных вод Беларуси, зачастую предпочитает мелкие мелиоративные каналы, окружающие сельскохозяйственные угодья. Физиолого-экологические особенности вида делают его идеальным как для биомониторинга [3], так и для исследования функций нервной системы [4, с. 5–12]. Вместе с тем нейронные механизмы адаптации *идентифицированных* элементов ЦНС, в том числе и формирование устойчивости к действию чрезвычайных раздражителей, например ацидофикации, остаются предметом пристального изучения [5], даже несмотря на ряд установленных мембранных систем, ответственных за поддержание постоянства рН цитоплазмы (протонные помпы, ионообменники и т. п.) [6; 7]. В большинстве исследований подобного рода речь идет об острых эффектах рН, в то время как хроническому действию указанного фактора уделяется гораздо меньшее внимание. В связи с этим целью настоящей работы является установление особенности двух моторных форм поведения *Lymnaea stagnalis* – легочной респирации и мышечной локомоции – в условиях длительного нахождения животных в среде обитания с новым уровнем рН.

## Материалы и методы исследования

Моллюсков (*Lymnaea stagnalis*) собирали в мелких проточных водоемах (мелиоративные и водоотводные каналы) в осенний период года. В лаборатории их содержали в аквариумах (на каждую особь приходилось не менее 0,5 л воды) при температуре  $20 \pm 1$  °С. Воду меняли каждые три дня. Пищей служили листья одуванчика (питание *ad libitum*). Во всех экспериментальных сериях использовали животных одинакового размера (длина раковины – от 4,0 до 4,5 см) и одинаковой массы (от 5 до 6 г).

**Экспериментальные группы.** Животные были разделены на две условные группы. В состав контрольной группы входили моллюски, содержащиеся в аквариумах с рН воды  $7,3 \pm 0,1$ . Опытная группа была представлена особями, находящимися в аквариумах с рН воды  $6,3 \pm 0,1$ . В качестве буфера использовали N-2-гидроксиэтилпиперазин-N’2-этансульфоновую кислоту (HEPES) в конечной концентрации 10 моль/л. Требуемое значение рН доводили при помощи раствора NaOH в концентрации 1 моль/л. Контроль за уровнем рН аквариумной воды (каждые сутки) осуществляли путем применения рН-метра РеррНесТ 310 (*ATI Orion*, США) при 20 °С. Длительность экспозиции в аквариумах составила одну неделю.

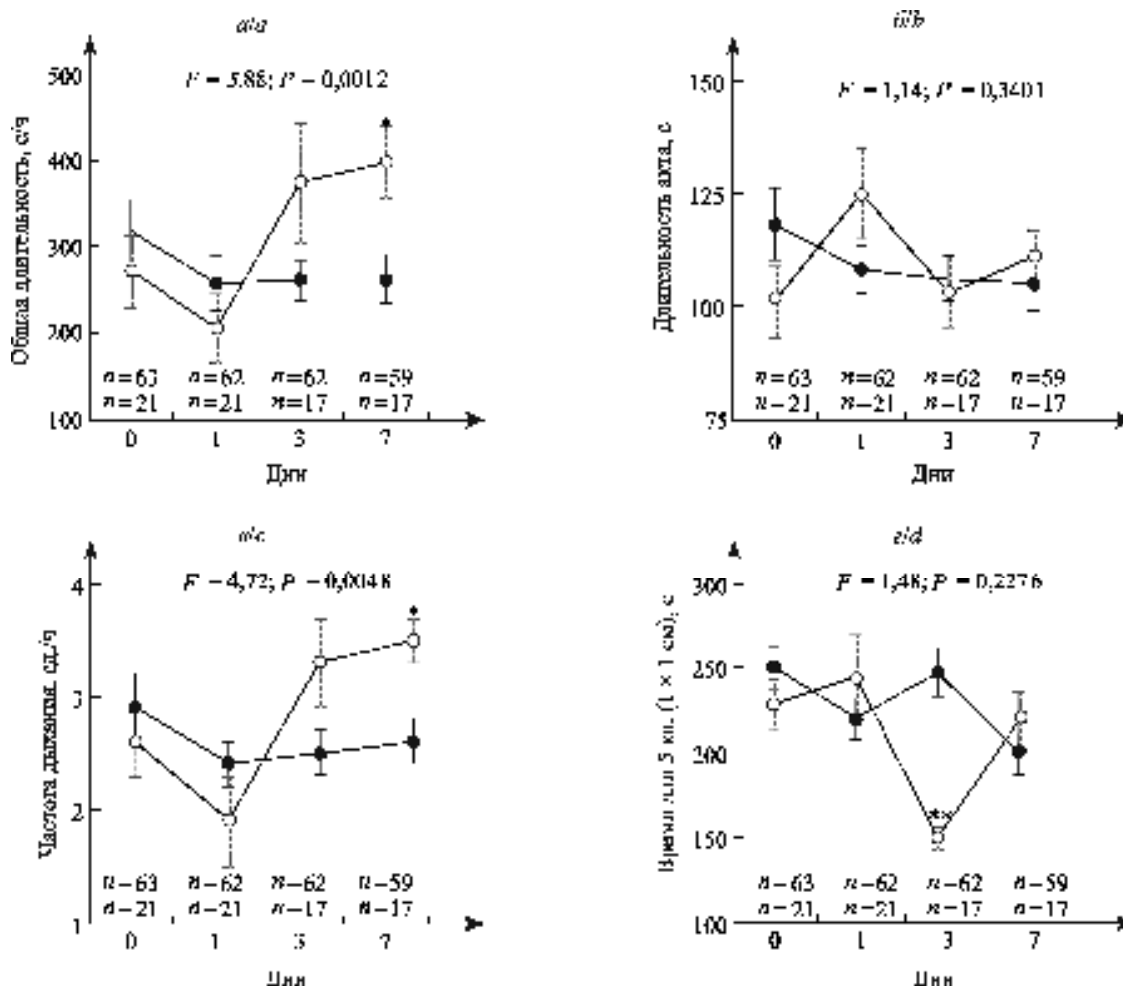
**Анализ форм поведения.** Для оценки дыхательного поведения моллюсков помещали в аквариумы (объем – 4,5 л, высота – 50 см) по 5 особей на сосуд. Регистрировали количество респирационных циклов (открытие – закрытие пневмостома) за 1 ч наблюдения (частота респирации), а также длительность каждого цикла отдельно у каждого моллюска. Рассчитывали среднюю длительность респирационного акта, суммарную длительность респирации за 1 ч наблюдения. 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 новые условия с помощью секундомера фиксировали время, необходимое для преодоления 5 квадратов (кв.) ( $1 \times 1$  см). Анализ поведения проводили непосредственно до изменения условий содержания, а затем на первый, третий и седьмой дни после помещения животных в аквариумы с заданным уровнем рН воды.

**Статистика.** Экспериментальные данные обрабатывали общепринятыми методами медико-биологической статистики [8]. Нормальность распределения для каждого ряда экспериментальных данных предварительно оценивали при помощи *W*-теста Шапиро – Уилка. Достоверность различий временных изменений показателей дыхательного и локомоторного поведения отдельно по каждой группе определяли при помощи *F*-критерия Фишера посредством дисперсионного анализа по однофакторной схеме (one-way ANOVA). Для сравнения совокупности данных по временной динамике исследуемых показателей для двух экспериментальных групп использовали метод дисперсионного анализа для повторных измерений (repeated measures ANOVA). Для статистически различных независимых пар данных дополнительно рассчитывали значение *t*-критерия Стьюдента. Число животных (*n*) указано для каждой серии опытов отдельно. При оценке выживаемости в группах использовали метод Гехана, рассчитывая *z*-критерий (сравнение двух выборок). Данные обрабатывали посредством программы *Statistica 6.0*. Достоверными считались результаты при уровне значимости (*P*) меньше 0,05.

## Результаты исследований и их обсуждение

Анализ выживаемости моллюсков не выявил статистически значимых различий между экспериментальными группами (тест Гехана:  $z = -1,5$ ,  $P = 0,1332$ ), что свидетельствует об отсутствии токсического воздействия аквариумной воды с pH 6,3 на организм моллюсков. Для животных контрольной серии нами не обнаружено статистически достоверных различий для показателей дыхательной и локомоторной активностей с течением времени (рисунок).

Значения  $F$ -критерия составили:  $F = 0,96$ ,  $P = 0,4141$  – общая длительность респирации;  $F = 1,26$ ,  $P = 0,2877$  – длительность отдельного акта;  $F = 0,7276$ ,  $P = 0,5364$  – частота респирации;  $F = 1,12$ ,  $P = 0,3419$  – скорость локомоции. Напротив, содержание животных в аквариумах с pH воды 6,3 (закисление) приводило к выраженному изменению характеристик легочного дыхания и мышечной локомоции по сравнению с исходными. По прошествии недели после нахождения моллюсков в новых условиях отмечено статистически достоверное увеличение (в 1,5 раза) общей длительности легочного дыхания ( $F = 2,99$ ,  $P = 0,0366$ ), происходящее на фоне равновеликого возрастания (в 1,4 раза) частоты



Показатели легочного дыхания и мышечной локомоции у моллюсков, длительно содержавшихся в условиях закисления аквариумной воды: а – общая длительность легочной респирации; б – длительность отдельного респираторного акта; в – частота респирации; г – скорость мышечной локомоции. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  ошибка среднего. Ось абсцисс – время (дни), прошедшее с момента помещения (принят за 0) улиток в аквариумы с новыми условиями содержания. ● – Контрольная группа (pH воды 7,3); ○ – экспериментальная группа (pH воды 6,3). Число животных ( $n$ ) в каждый временной отрезок указано отдельно (верхний ряд – контрольная, нижний – экспериментальная группы). Приведено значение  $F$ -критерия и уровня значимости  $P$  (дисперсионный анализ для повторных измерений).

\*, \*\* Различия статистически достоверны по сравнению с контролем в тот же временной отрезок,  $P < 0,05$  или  $P < 0,01$  соответственно ( $t$ -критерий Стьюдента)

Lung respiration and muscular locomotion of mollusks after long-term incubation in aquariums with acidic pH: а – total respiratory time; б – pneumostome open time; в – amount of respiratory cycles; д – muscular locomotion rate. Data present mean value  $\pm$  SEM. Abscissa – time (days) after the beginning of exposition (accepted as 0) of animals in aquariums with novel conditions. ● – Control group (water pH 7.3); ○ – experimental group (water pH 6.3). Number of animals ( $n$ ) presented individually for each time gap (upper row – control, bottom row – experimental group).  $F$ -test and significance level ( $P$ ) meanings for repeated measures ANOVA are presented. \*, \*\* Significant, in comparison with control at the same time gap,  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$  respectively (Student's  $t$ -test)

респирации ( $F = 3,55$ ,  $P = 0,0186$ ) при неизменной длительности респираторного акта ( $F = 1,38$ ,  $P = 0,2552$ ). Схожее возрастание (в 1,5 раза) скорости передвижения моллюсков по субстрату зафиксировано на третьи сутки после начала эксперимента ( $F = 4,41$ ,  $P = 0,0068$ ). Непосредственное сравнение двух групп выявило схожие черты различий в исследованных показателях дыхательной активности (см. рисунок) – расхождения в реакциях начинали отмечаться через трое суток после смены условий содержания и достигли максимума по прошествии семи дней после начала эксперимента. Исключение составили данные по скорости локомоции – дисперсионный анализ для повторных измерений не выявил статистически значимых различий во временной динамике указанного показателя между контрольной и опытной группами.

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что нахождение животных в условиях ацидофикации не сказывается на выживании особей, т. е. не влияет на численный состав популяции *Lymnaea stagnalis*. Это позволяет предположить, что, даже несмотря на известную проницаемость кожных покровов беспозвоночных для небольших ионов [9], прудовик обладает достаточно эффективным механизмом поддержания постоянства кислотно-основного равновесия внутренней среды организма, что позволяет свести к минимуму колебания pH гемолимфы, возникающие под действием внешних факторов [10], и удерживать данный показатель в пределах физиологической нормы. На уровне отдельных нейронов речь может идти об активации специфических каналов плазмалеммы, впервые описанных именно у моллюсков и обеспечивающих перенос избыточных протонов из цитоплазмы в интерстиций, тем самым нормализуя pH внутри клетки [11].

С другой стороны, наблюдаемые изменения поведенческой активности свидетельствуют о том, что колебания pH можно рассматривать в качестве корректирующего фактора в отношении моторных программ ЦНС. При этом статистически значимые эффекты проявляются в отдаленном периоде (третьи и седьмые сутки после начала воздействия), что вполне согласуется с нашими более ранними данными [12], выявившими относительную устойчивость показателей поведения *Lymnaea stagnalis* в условиях 24 ч действия аквариумной воды с pH, равным 6. Следует отметить, что нейронная сеть, вовлеченная в контроль мышечной локомоции, оказывается более устойчивой к изменению pH по сравнению с таковой для легочной респирации. Известно, что ключевым нейромедиатором, обеспечивающим транслокацию моллюска, является серотонин [13], в то время как выраженность легочного дыхания определяется активностью дофаминергических путей мозга [14]. Полученные ранее данные свидетельствуют о выраженном снижении эффективности передачи сигнала в дофаминергических контактах ЦНС *Lymnaea stagnalis* и относительной устойчивости спонтанной электрической активности центральных серотонинергических клеток мозга [4, с. 170–176] при закислении межклеточного пространства. В связи с этим факт усиления легочного дыхания (частоты и общей длительности) у животных, находившихся в аквариумах с низким pH воды, может быть объяснен со следующих позиций. Снижение эффективности синаптической передачи в дофаминергических контактах между центральными нейронами и мотонейронами мышц закрывающих пневмостом, как это и происходит в ходе естественной активации дыхательного ритма (фаза «вдоха») [15], приводит к тому, что пневмостом более длительное время находится в открытом состоянии, тем самым увеличивая выраженность легочного дыхания. Анализ корреляционной зависимости между pH гемолимфы и длительностью легочной респирации, а также скоростью перемещения моллюсков выявил наличие отрицательной корреляции в первом случае и отсутствие статистически значимой взаимосвязи – во втором [4, с. 139–142; 16]. В сочетании с полученными нами данными это свидетельствует о большей степени устойчивости (при пониженных pH) мышечной локомоции и контролирующей ее серотонинергической системы мозга.

### Заключение

Таким образом, длительное нахождение моллюсков в условиях ацидофикации приводит к пролонгированному изменению легочного дыхания на фоне остающейся неизменной локомоторной активности. Отмеченные различия могут быть обусловлены неодинаковой чувствительностью центральных дофамин- и серотонинергических нейронов к концентрации свободных протонов в межклеточной жидкости (pH интерстиция).

### Библиографические ссылки

1. Camargo J. A., Alonso A. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment // Environ. Int. 2006. Vol. 6. P. 831–849.
2. Hasler C. T., Butman D., Jeffrey J. D., et al. Freshwater biota and rising pCO<sub>2</sub>? // Ecol. Lett. 2016. Vol. 19 (1). P. 98–108.
3. Elder J. F., Collins J. J. Freshwater molluscs as indicators of bioavailability and toxicity of metals in surface-water systems // Rev. Environ. Contam. Toxicol. 1991. Vol. 122. P. 37–79.

4. Сидоров А. В. Функциональная активность нервных центров беспозвоночных. Минск, 2011.
5. Сидоров А. В. Регуляция и модуляция нейронных функций при колебаниях уровня pH интерстиция // Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География. 2008. № 3. С. 67–72.
6. Schwiening C. J. pH phantoms – a physiological phenomenon? // *Physiol. News*. 2003. Vol. 50. P. 15–19.
7. Reeh P. W., Steen K. H. Tissue acidosis in nociception and pain // *Prog. Brain Res.* 1996. Vol. 113. P. 143–151.
8. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М., 1998.
9. Laverack M. S. Tactile and chemical perception in earthworms // *Comp. Biochem. Physiol.* 1961. Vol. 2. P. 22–34.
10. Sidorov A. V., Polyanina I. P. Acid-base balance modulates respiratory and alimentary behaviour of the mollusc *Lymnaea stagnalis* // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2003. Vol. 39, № 5. P. 555–561.
11. Byerly L., Moody W. J. Membrane currents of internally perfused neurones of the snail, *Lymnaea stagnalis*, at low intracellular pH // *J. Physiol.* 1986. Vol. 376. P. 477–491.
12. Сидоров А. В., Полянина И. П. Влияние изменения кислотно-основного равновесия (pH) воды на поведение моллюска *Lymnaea stagnalis* // Вестн. Белорус. гос. ун-та. Сер. 2, Химия. Биология. География. 2003. № 3. С. 46–48.
13. Цыганов В. В. Координация активности моноаминергических педальных нейронов у пресноводных улиток // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 2000. Т. 86. С. 369–378.
14. Syed N. I., Bulloch A. G. M., Lukowiak K. *In vitro* reconstruction of the respiratory central pattern generator of the mollusk *Lymnaea* // *Science*. 1990. Vol. 250, issue 4978. P. 282–285.
15. Syed N. I., Harrison D., Winlow W. Respiratory behavior in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. I. Behavioral analyses and the identification of motor neurones // *J. Comp. Physiol.* 1991. Vol. 169A. P. 541–555.
16. Sidorov A. V. Coordination of locomotor activity of mollusc *Lymnaea stagnalis* at nutrition: role of the internal medium acid-base balance (pH) // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2006. Vol. 42, вып. 1. P. 43–48.

## References

1. Camargo J. A., Alonso A. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environ. Int.* 2006. Vol. 6. P. 831–849.
2. Hasler C. T., Butman D., Jeffrey J. D., et al. Freshwater biota and rising pCO<sub>2</sub>? *Ecol. Lett.* 2016. Vol. 19 (1). P. 98–108. DOI: 10.1111/ele.12549.
3. Elder J. F., Collins J. J. Freshwater molluscs as indicators of bioavailability and toxicity of metals in surface-water systems. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 1991. Vol. 122. P. 37–79.
4. Sidorov A. V. Nerve centers functional activity in invertebrates. Minsk, 2011 (in Russ.).
5. Sidorov A. V. Regulation and modulation of neuronal functions under interstitial pH alterations. *Vestnik BGU. Ser. 2, Khim. Biol. Geogr.* 2008. No. 3. P. 67–72 (in Russ.).
6. Schwiening C. J. pH phantoms – a physiological phenomenon? *Physiol. News*. 2003. Vol. 50. P. 15–19.
7. Reeh P. W., Steen K. H. Tissue acidosis in nociception and pain. *Prog. Brain Res.* 1996. Vol. 113. P. 143–151.
8. Glants S. Mediko-biologicheskaya statistika. Moscow, 1998 (in Russ.).
9. Laverack M. S. Tactile and chemical perception in earthworms. *Comp. Biochem. Physiol.* 1961. Vol. 2. P. 22–34.
10. Sidorov A. V., Polyanina I. P. Acid-base balance modulates respiratory and alimentary behaviour of the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2003. Vol. 39, No. 5. P. 555–561.
11. Byerly L., Moody W. J. Membrane currents of internally perfused neurones of the snail, *Lymnaea stagnalis*, at low intracellular pH. *J. Physiol.* 1986. Vol. 376. P. 477–491.
12. Sidorov A. V., Polyanina I. P. Water acid-base balance (pH) modulates the behavior of the mollusk, *Lymnaea stagnalis*. *Vestnik Beloruss. gos. univ. Ser. 2, Khim. Biol. Geogr.* 2003. No. 3. P. 46–48 (in Russ.).
13. Tsyganov V. V. Coordination of the activity of monoaminergic pedal neurons in fresh water snails. *Russ. Fiziol. Zh. im. I. M. Sechenova*. 2000. Vol. 86. P. 369–378 (in Russ.).
14. Syed N. I., Bulloch A. G. M., Lukowiak K. *In vitro* reconstruction of the respiratory central pattern generator of the mollusk *Lymnaea*. *Science*. 1990. Vol. 250, issue 4978. P. 282–285.
15. Syed N. I., Harrison D., Winlow W. Respiratory behavior in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. I. Behavioral analyses and the identification of motor neurones. *J. Comp. Physiol.* 1991. Vol. 169A. P. 541–555.
16. Sidorov A. V. Coordination of locomotor activity of mollusc *Lymnaea stagnalis* at nutrition: role of the internal medium acid-base balance (pH). *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2006. Vol. 42, issue 1. P. 43–48.

Статья поступила в редколлегию 04.10.2016.  
Received by editorial board 04.10.2016.