

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ  
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

УДК 591.181.041(043.3)

**ШАДЕНКО**

**Виктория Николаевна**

**ЛАБИЛЬНОСТЬ ПЕПТИДЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ  
ЦЕНТРАЛЬНЫХ НЕРВНЫХ ГАНГЛИЕВ *LYMNAEA STAGNALIS*  
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ**

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

по специальности 03.03.01 – физиология

Минск, 2022

Работа выполнена в Белорусском государственном университете

**Научный  
руководитель:**

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

**Официальные  
оппоненты:**

**Козловский Валерий Иванович**  
доктор биологических наук, доцент,  
заведующий кафедрой фармакологии имени  
профессора М.В. Кораблева учреждения образования  
«Гродненский государственный  
медицинский университет»

**Пашкевич Светлана Георгиевна**  
кандидат биологических наук, доцент  
заведующий лабораторией нейрофизиологии  
Государственного научного учреждения «Институт  
физиологии Национальной академии наук Беларуси»

**Оппонирующая  
организация:**

Учреждение образования «Белорусский  
государственный медицинский университет»

Защита состоится 16 декабря 2022 года в 14<sup>00</sup> на заседании совета по защите диссертаций К 01.36.01 при Государственном научном учреждении «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 220072, г. Минск, ул. Академическая, 28, тел./факс: +375 17 378-16-30; e-mail: khrustaleva.lir@gmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке при Государственном научном учреждении «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси».

Автореферат разослан « 14 » ноября 2022 года

Ученый секретарь  
совета по защите диссертаций К 01.36.01  
кандидат биологических наук



Т.А. Хрусталёва

## ВВЕДЕНИЕ

Содержание глюкозы во внутренней среде является одной из важнейших физиологических констант организма, определяющих функционирование его органов и систем. Будучи одним из основных нутриентов, глюкоза представляет собой метаболический сигнал [Mergenthaler P. et al., 2013], область действия которого не ограничивается отдельным участком интерстиция, что позволяет рассматривать её как один из факторов объёмной передачи [Lee C.-Y. et al., 2016]. В отличие от нейромедиаторов, с их развитым рецепторным аппаратом, определяющим специфичность действия таких молекул, чувствительность к изменению содержания глюкозы в интерстиции потенциально присуща любой клетке, что роднит её с другими неспецифическими экстрасинаптическими факторами объёмной передачи [Сидоров А. В., 2018]. На уровне ЦНС глюкозо-чувствительные клетки в основном расположены среди нейронов пищевой сети, будучи ответственными за формирование и поддержание специфического паттерна поведения [López-Gambero A. J. et al., 2019].

В отличие от позвоночных, для которых существенные отклонения в содержании глюкозы от базального уровня связаны с развитием целого комплекса нарушений, в том числе и неврологических [Mergenthaler P. et al., 2013], колебания уровня глюкозы во внутренней среде (гемолимфе) беспозвоночных носят скорее регуляторный характер [Oh Y. et al., 2019], хотя и достигают величин на порядок превышающих таковые в нормальных условиях [Dyakonova V. et al., 2015]. Во многом этому способствует наличие в составе их нервных ганглиев большого числа нейросекреторных клеток [Benjamin P. R., 2020], высвобождающих целый ряд регуляторных пептидов, в том числе и инсулин-подобных [Oh Y. et al., 2019], инициирующих утилизацию глюкозы в ходе роста и размножения [Geraerts P. M., 1992].

Пептидергические нейроны, не говоря уже о клетках использующих низкомолекулярные нейромедиаторы, широко представлены и в составе других нейронных сетей, управляющих действиями, непосредственно не связанными с пищедобычей и/или усилением анаболических процессов и возможность модификации их функций и свойств, прежде всего электрических, под влиянием глюкозы остаётся открытой. Будет ли механизм такой потенциальной глюкозо-чувствительности универсальным и схожим с уже известными, например, как следствие активации/инактивации глюкозных транспортёров плазмалеммы [Kits K. S. et al., 1991], или речь идёт об уникальности реакций нейрона в зависимости от типа клетки (морфологического, химического или функционального)?

Относительно мало известно и о клеточных механизмах устойчивости нейронов беспозвоночных к сверхвысоким концентрациям глюкозы, с действием которых им приходится постоянно сталкиваться. Усиление окислительного фосфорилирования в митохондриях, которыми богаты окончания нервных кле-

ток, вследствие утилизации избытка глюкозы [Harris K. M. et al., 2012], потенциально может привести к увеличению содержания активных форм кислорода (АФК), сигнальные свойства которых [Finkel T., 2014], как и вклад в нейродегенеративные процессы [Sesti V., 2016], хорошо известны. Очевидно, что адаптация нейронов к условиям гипергликемии, может быть связана и с модификацией активности антиокислительных систем мозга беспозвоночных, что также нуждается в экспериментальной проверке.

Нервная система пресноводного лёгочного моллюска *Lymnaea stagnalis* (прудовик обыкновенный) содержит ряд идентифицированных нейронов, позволяя проводить исследования свойств нервных клеток с учётом их позиции в нейронной сети, используемого нейромедиатора и т.п., делая указанный вид животных одним из модельных для нейробиологических исследований [Сидоров А. В., 2018; Fodor I. et al., 2020]. В сочетании с возможностью биохимического анализа антиокислительных свойств ткани его нервных ганглиев это позволит дать ответы на поставленные выше вопросы, предопределившие проведение данной работы.

## 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: «Мембранные механизмы возрастных изменений нейронов разной эргичности» (ГПНИ «Фундаментальные и прикладные науки – медицине», 2016–2018 гг., № ГР 20161315) и «Разработка и создание учебно-методического комплекса по нейробиологии» (ГПНИ «Конвергенция-2020», 2016–2020 гг., № ГР 20161893). 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 фармация» и «12. Междисциплинарные исследования».

**Цель и задачи исследования.** Цель работы – на примере модельного нейробиологического объекта, моллюска *Lymnaea stagnalis*, экспериментально доказать способность к рецепции глюкозы при увеличении её содержания в межклеточном пространстве для центральных, не входящих в состав пищевой сети, нейронов и установить механизмы возможной глюкозочувствительности.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать и верифицировать модель создания экспериментальной гипергликемии и оценить наблюдаемые при этом изменения оборонительных реакций моллюска *Lymnaea stagnalis*.

2. Изучить ответы идентифицированных, функционально различных нейронов центральных нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis* при быстром (минуты), многократном, по сравнению с исходным, возрастании уровня глюкозы в межклеточном пространстве.

3. Выявить изменения паттерна спонтанной активности, электрических свойств мембраны, временных и амплитудных характеристик спайка в условиях пролонгированного (часы) действия высоких концентраций глюкозы в интерстиции для нейронов, обладающих наиболее выраженной чувствительностью к изменению содержания глюкозы.

4. Оценить способность к накоплению активных форм кислорода и состояние редокс-равновесия в клетках центральных нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis* при длительном нахождении в среде с высоким содержанием глюкозы.

*Объект исследования:* прудовик обыкновенный (*Lymnaea stagnalis*), препараты его изолированной ЦНС, изолированные клетки нервных ганглиев.

*Предмет исследования:* оборонительное поведение, электрическая активность пептидергических нейронов кардиореспираторной и оборонительной сетей, система антиокислительной защиты клеток ЦНС.

Выбор объекта и предмета исследования обусловлен возможностью оценки электрофизиологических показателей в идентифицируемых нейронах заданной эргичности в сочетании с анализом поведенческой активности моллюсков.

**Научная новизна.** На примере ЦНС *Lymnaea stagnalis* выявлена способность ряда центральных, пептидергических, вовлечённых в кардиорегуляцию нейронов (RPaD1, VD1/RPaD2) к быстрым (минуты) ответам на многократное увеличение содержания глюкозы в интерстиции. Установлено, что при экспериментальной гипергликемии наблюдается ослабление защитных реакций животного на фоне умеренной стимуляции сердечных сокращений. Обнаружено, что резкое повышение содержания глюкозы в гемолимфе приводит к модификации редокс-равновесия в ткани нервных ганглиев по прошествии суток после такого воздействия, но его начальные эффекты не связаны с накоплением АФК в цитоплазме нейронов, что указывает на существование адаптационных механизмов, направленных на нейтрализацию эффектов, связанных с возрастанием количества высокоэнергетических субстратов в окружающем нервные клетки пространстве.

Установлен характер изменения электрических свойств мембраны пептидергических нейронов кардиорегуляторной сети *Lymnaea stagnalis* в условиях пролонгированной гипергликемии. Доказано изменение их возбудимости, связанное со снижением мембранного потенциала, сопровождаемое усилением частоты импульсации. Кроме того, выявлена модификация временных характеристик потенциалов действия, выражающаяся в увеличении скорости медленной деполяризации, пролонгировании фаз реполяризации и следовой гиперполяризации, указывающая на глюкозозависимость мембранной, прежде всего для ионов Na и K, про-

водимости, что может лежать в основе адаптации клеток ЦНС беспозвоночных к действию высоких концентраций глюкозы.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Инкубация животных в высококонцентрированном растворе глюкозы приводит к развитию экспериментальной гипергликемии, сопровождаемой многократным возрастанием уровня глюкозы в гемолимфе (при неизменности её содержания в других органах моллюска), уменьшая выраженность оборонительного поведения *Lymnaea stagnalis*.

2. Пептидергические (RPaD1, VD1/RPaD2), кардиорегуляторные нейроны центральных нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis* оказываются наиболее чувствительными элементами, реагирующими на повышение уровня глюкозы в окружающем ЦНС пространстве, по сравнению с серотонин- (LPeD1) и дофамин- (RPeD1) эргическими клетками локомоторной и дыхательной нейронных сетей.

3. Длительное (часы) действие высоких (10 мМ) концентраций глюкозы связано с изменением возбудимости, а также преимущественно временных показателей спайков пептидергических нейронов (RPaD1, VD1/RPaD2) ЦНС *Lymnaea* и носит универсальный характер для исследованных клеток.

4. Резкое, многократное возрастание содержания глюкозы в интерстиции не вызывает незамедлительного накопления АФК в цитоплазме клеток нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis* и не изменяет характеристик их антиокислительной защиты, но приводит к модификации редокс-равновесия в ЦНС в отдалённой (сутки) перспективе.

**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, оценке содержания глюкозы в их тканях, анализу состояния антиокислительной защиты в нервных ганглиях, статистической обработке данных. Методическая помощь со стороны научного руководителя была оказана при регистрации электрической активности нервных клеток. Текст диссертации (аналитический обзор литературы, экспериментальные главы, обсуждение полученных результатов) подготовлен соискателем самостоятельно, с учётом редакторских правок научного руководителя. В материалах научных статей, опубликованных в соавторстве, личный вклад соискателя составил 90 [1; 2], 80 [5; 8] и 70 [3; 6; 7] % соответственно. В материалах конференций [9–11] вклад соискателя составил 90 %, в тезисах докладов 90 [12–15; 17; 18], 70 [20; 23; 24] и 60 [19; 21] % соответственно. Среднее значение личного вклада по всем видам изданий – 82 %. В диссертацию не были включены результаты исследований соавторов научных работ.

**Апробация результатов диссертации.** Результаты работы доложены и обсуждены в ходе проведения ряда международных и республиканских конфе-

ренций: «Сигнальные механизмы регуляции физиологических функций» (Минск, Беларусь, 2017); 19<sup>th</sup> Conference of Junior Neuroscientists of Tubingen (Tubingen, Germany, 2018); «Фундаментальные и прикладные науки – медицине» (Минск, Беларусь, 2018); «Физико-химическая биология как основа современной медицины» (Минск, Беларусь, 2019); «Ломоносов» (Москва, Россия, 2019, 2021), «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии» (С.-Петербург, Россия, 2019); FENS Virtual Forum (2020).

**Опубликованность результатов диссертации.** По материалам диссертации опубликовано 24 работы: 8 статей в журналах (6 из перечня ВАК Республики Беларусь для опубликования диссертационных исследований, 2 – в международных изданиях БД Web of Science), 3 статьи в материалах конференций (1 за рубежом), 13 тезисов докладов (5 за рубежом). Общий объем опубликованных материалов – 11,03 авторского листа (9,04 авторского листа подготовлено лично соискателем).

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 130 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 274 источника (19 на русском и 255 на английском языках) и 24 публикации соискателя, приложения. Рукопись работы содержит 29 рисунков и 5 таблиц.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

Работа выполнена на представителе пресноводных моллюсков – прудовике обыкновенном (*Lymnaea stagnalis*). Животных собирали в летне-осенний период в Могилевской области (бассейны рек Вабич и Друть). В лаборатории их содержали в аквариумах с отстоявшейся водопроводной водой (не менее 1 л на особь), при температуре  $20 \pm 1$  °С. Пищей служили молодые листья салата или одуванчика (питание *ad libitum*). Экспериментальные (контрольные и опытные) группы комплектовались животными одинакового размерного класса: высота раковины от 3,5 до 4,5 см, масса от 2 до 5 г.

*Создание условий экспериментальной гипергликемии.* Моллюсков переносили в сосуды с «чистой» водой (контроль) или содержащие глюкозу в концентрации 10 или 100 мМ (опытные группы), где они находились в течение 2-х часов. До начала и/или сразу по окончании инкубации производили забор гемолимфы.

*Анализ поведенческой активности.* При изучении оборонительного поведения отмечали реакцию в ответ на тактильное раздражение щупальца волоском Фрея (сила воздействия –  $10^{-2}$  Н). Тестирование вели в течение 2-х часов с 15 мин интервалами. Регистрировали длину щупальцев и открытого участка те-

ла. Латентный период протракции определяли как время, прошедшее с момента помещения моллюска из аквариума в чашку Петри до начала его движения. За работой сердца наблюдали при помощи бинокулярной лупы ( $\times 10$ ), через слабо пигментированную раковину животного, фиксируя число сокращений за 30 с.

*Определение содержания глюкозы.* Тактильной стимуляцией ноги вызывали реакцию полного втягивания тела, сопровождающуюся выбросом части гемолимфы (500 мкл). Концентрацию глюкозы определяли глюкозооксидазным методом (реагенты «Анализ Х», Беларусь). Оптическую плотность измеряли на  $\lambda = 520$  нм (спектрофотометр Cary 50, Varian Inc., Австралия). Объем материала – 100 мкл, время инкубации с реагентом (1 мл) – 30 мин. В качестве стандарта использовали 100 мкл свежего 1 мМ раствора глюкозы.

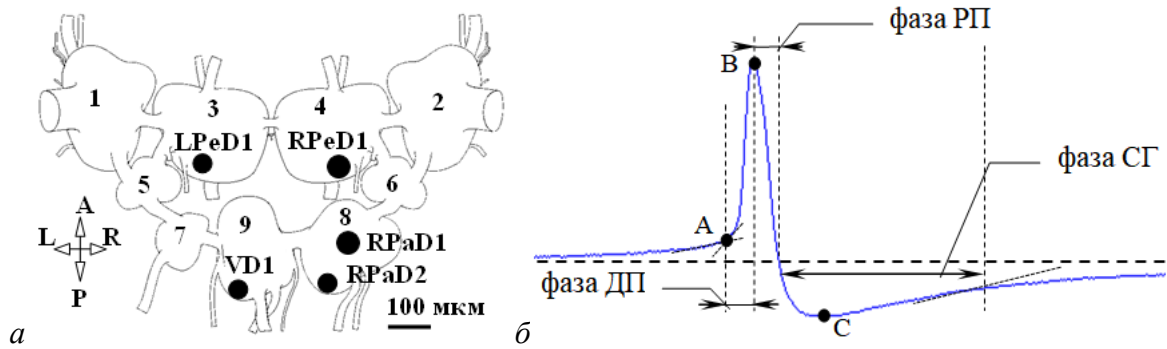
*Электрофизиологические исследования.* Животных наркотизировали (5 мин в 0,2 М растворе  $MgCl_2$ ), под бинокулярной лупой Zeiss Stemi 2000 (объектив  $\times 0,65$ –5,0 в зависимости от этапа работы) доставали центральное кольцо нервных ганглиев, которые обрабатывали (1 мг/мл, 5 мин) раствором проназы (Protease E, type XIV, Sigma, США). К регистрации электрической активности приступали не ранее 30 мин после отмывки препарата раствором Рингера для *Lymnaea stagnalis* (в мМ): NaCl – 44; KCl – 1,7;  $CaCl_2$  – 4;  $MgCl_2$  – 1,5; HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-этансульфоновая кислота) – 10, pH  $7,5 \pm 0,1$ . Растворы D-глюкозы готовили на его основе. Конечная концентрация глюкозы в экспериментальной (200 мкл) термостатируемой ( $20 \pm 1$  °C) камере составляла 1 (10) мМ. Для оценки пролонгированных эффектов гипергликемии препараты ЦНС инкубировали не менее 2 ч в 10 мМ растворе глюкозы. Контролем были препараты, находившиеся равновеликое время в «чистом» растворе Рингера.

Гигантские дофамин- (RPeD1) и серотонин- (LPeD1) эргические нейроны правого и левого pedalного ганглиев, пептидергические нейроны правого париетального (RPaD1) и пару электрически связанных нейронов висцерального и правого париетального (VD1/RPaD2) ганглиев идентифицировали по расположению в пределах нервного узла (рисунок 1 а), размеру, цвету, показателям и паттерну спонтанной электрической активности [Benjamin P. R., Winlow W., 1981].

Для регистрации электрической активности нейронов использовали микроэлектродный метод. Вытяжку стеклянных (пирекс) микропипеток проводили при помощи KOPF Vertical pipette puller, Model 720 (David Kopf Instruments, USA). Их заполняли 2,5 М раствором KCl (сопротивление 10–20 МОм).

В качестве индифферентного электрода выступала хлорированная серебряная проволока. Для точной подводки микроэлектрода к нейронам использовали комплект микроманипуляторов KM-2 (Россия), проводя эту операцию при визуальном контроле под бинокулярным микроскопом МБС-1 (объектив  $\times 4$ ). Усиление внутриклеточных сигналов, подачу де- или гиперполяризующих импульсов тока осуществляли с помощью микроэлектродного усилителя MS-01M (Линтех, Беларусь).





Для *a*: 1, 2 – левый и правый церебральный; 3, 4 – левый и правый педальный; 5, 6 – левый и правый плеуральный; 7, 8 – левый и правый париетальный ганглии; 9 – висцеральный ганглий; А – вперед, Р – назад, L – влево, R – вправо.

Для *б*: ДП, РП – де- и реполяризация, СГ – следовая гиперполяризация

**Рисунок 1.** – Расположение исследованных нейронов в ЦНС *Lymnaea stagnalis* (*a*) и амплитудно-временные характеристики потенциала действия (*б*)

Электрические сигналы нейронов после предварительной оцифровки записывали на жесткий диск компьютера. Текущий мониторинг, запись и последующий обсчет сигналов осуществляли при помощи программы электронного осциллографа InputWin [Солтанов В. В., Бурко В. Е., 2005].

Частоту импульсации определяли для 4-х последовательных 30 с участков нейнограммы длительностью 2 мин (шаг квантования 5 мс). Параметры потенциала действия (ПД), включая длительность и амплитуду отдельных его фаз (рисунок 1 *б*), для 4-х произвольно выбранных спайков оценивали по 30 с отрезкам нейнограммы, выполненным с шагом квантования 0,5 мс. Амплитуду порога отсчитывали от уровня потенциала покоя до регенеративного возрастания натриевой проводимости (точка А), ПД – до положительного (точка В), а следовой гиперполяризации (СГ) – до отрицательного (точка С) пикового значения спайка. За положительную фазу ПД принимали участок от точки А до момента пересечения кривой записи с уровнем мембранного потенциала (его общая (S) и средняя (S/t), рассчитанная с учётом длительности фазы, площади выражаются в условных машинных единицах, м.е.), за отрицательную фазу – участок СГ.

Постоянную времени мембраны ( $\tau_m$ ) определяли по изменению мембранного потенциала, вызванного толчком тока ( $-0,5$  нА), как время, когда оно достигнет  $1/e$  от максимально наблюдаемого. Значение мембранной ёмкости ( $C_m$ ) вычисляли по формуле:  $\tau_m = R_m \times C_m$ , где  $R_m$  – сопротивление мембраны. При этом  $R_m$  определяли исходя из входного сопротивления клетки, при толчке тока ( $-0,5$  нА) за вычетом сопротивления микроэлектрода. Для построения кривой вольт-амперной характеристики (ВАХ) мембраны последовательно подавали импульсы тока в диапазоне от  $-2$  до  $+2$  нА (с шагом  $0,5$  нА) и длительностью 3 с, одновременно фиксируя значение мембранного потенциала исследованных клеток. Полученные данные представляли в графической форме.

*Изучение антиоксидантной системы моллюска в условиях экспериментальной гипергликемии.* Пробы гемолимфы и печени были получены отдельно по каж-

дой особи, на одну пробу нервных ганглиев приходилось 1 или 3 ЦНС от разных моллюсков. Полученный материал замораживали и хранили при минус 20 °С используя по мере необходимости. Гомогенаты готовили на основе холодной (4 °С) дистиллированной воды. Активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1.) определяли спектрофотометрическим методом по скорости аутоокисления кверцетина [Kostyuk V. A., Potapovich A. I., 1989]. Активность Se-зависимой глутатионпероксидазы (Se-ГП, КФ 1.11.1.9), определяли по ее способности к детоксикации трет-бутил перекиси (2 мМ) в присутствии восстановленного глутатиона (Г-SH, 2 мМ) [Flohe L., Cuzler W.A., 1984]. Уровень 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 J., Lindsay R. H., 1968]. Интенсивность процессов перекисного окисления липидов определяли по образованию в гомогенатах ТБК- (тиобарбитуровая кислота) активных продуктов по модифицированной [Kostyuk V. A., Potapovich A. I., 1987] методике. Определение количества белка проводили по методу Бредфорда [Bradford M. M., 1976]. В контрольных пробах использовали равный гомогенату объем дистиллированной воды. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Cary 50 (Varian Inc., Австралия).

Оценку накопления АФК проводили используя флуоресцентный краситель 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат (DCFDA, 10 мкМ,  $\lambda_{\text{ex,max}} - 501$ ,  $\lambda_{\text{em,max}} - 525$  нм, Sigma–Aldrich). Зонд добавляли непосредственно к суспензии клеток нервных ганглиев, выдерживая её 1 ч в темноте, затем клетки осаждали центрифугированием (6000 об/мин, 5 мин), удаляли раствор с зондом и ресуспензировали свежим раствором Рингера, повторяя процедуру дважды. Оценку интенсивности флуоресценции проводили посредством планшетного флуориметра Cary Eclipse (Agilent Technologies, USA) до (0 мин) и после экспериментального (глюкоза, 10 мМ) воздействия (на 15, 30, 60 мин).

*Статистическая обработка данных.* Нормальность распределения оценивали при помощи *W*-теста Шапиро–Уилка. В случае её подтверждения для всех сравниваемых групп данные представляли в виде  $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ , используя для сравнения *t*-критерий Стьюдента для зависимых или независимых пар данных, дисперсионный анализ (ANOVA) по однофакторной схеме или для повторных измерений. Если нормальность распределения не была подтверждена для всех групп сравнения, данные представляли в виде медиана (нижний; верхний квартили), используя непараметрические методы: *U*-критерий Манна–Уитни (*z*) или критерий знаков для независимых или зависимых пар соответственно, а также *H*-критерий Крускала–Уоллиса и *F*-критерий Фридмана ( $\chi^2$ ,  $F_{\text{ANOVA}}$ ) при сравнении нескольких независимых и зависимых групп соответственно. Достоверными считали различия при уровне значимости (*P*) менее 0,05. Построение линий тренда, уравнений регрессии и величин их аппроксимации получены при использовании статистических воз-

возможностей программы Microsoft Excel 2010. Статистическая обработка данных произведена в программе Statistica 6.0.

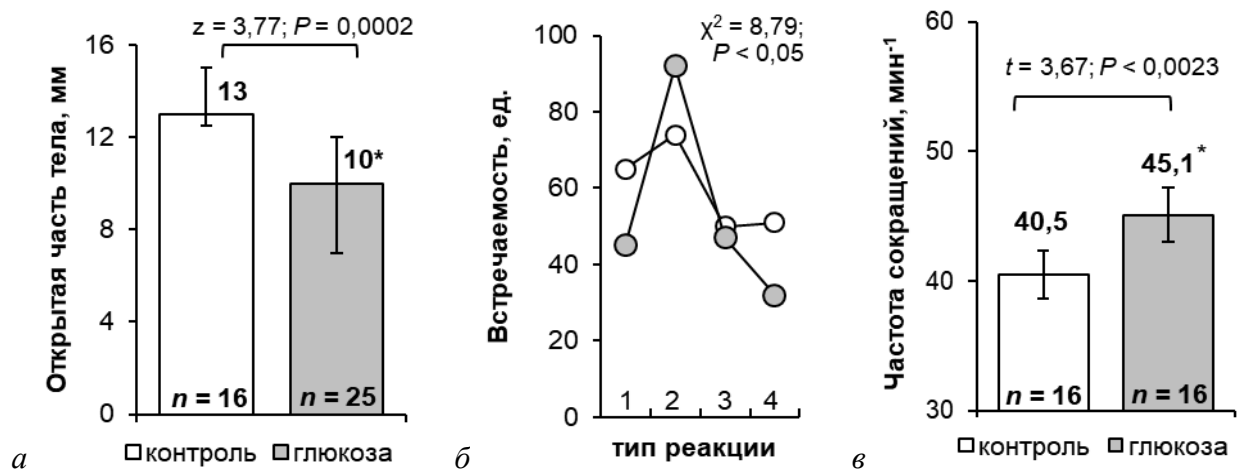
Число наблюдений ( $n$ ) указано отдельно для каждой анализируемой выборки. Результаты работы основаны на оценке поведения 101 моллюска, анализе 198 проб гемолимфы, 138 проб гомогенатов ЦНС, печени, стенки тела и реакциях 82 исследованных идентифицированных нейронов.

### **Глюкозный гомеостаз и оборонительное поведение *Lymnaea stagnalis* при экспериментальной гипергликемии**

Содержание глюкозы в гемолимфе *Lymnaea stagnalis* составляет 0,23 (0,19; 0,24) мМ ( $n = 13$ ). Инкубация моллюсков в 10 мМ водном растворе глюкозы повышает её уровень в гемолимфе в 1,4 раза ( $z = 2,56$ ;  $P = 0,0103$ ), а в 100 мМ – в 7,6 раза ( $z = 4,18$ ;  $P < 0,0001$ ), до 1,30 (0,91; 1,37) мМ по сравнению с контролем (0,15 (0,09; 0,16) мМ) для данного временного интервала. Через 2 и 24 ч после окончания инкубации значения показателя не отличались от контрольного ни для одного из использованных растворов (10 и 100 мМ).

Наименьшее содержание глюкозы отмечено в гемолимфе *Lymnaea* ( $n = 12$ ) –  $0,20 \pm 0,02$  мМ. В других тканях её концентрация многократно превышала таковую для гемолимфы, составляя  $9,22 \pm 0,67$  ( $t = 13,55$ ;  $P < 0,0001$ ),  $17,96 \pm 1,15$  ( $t = 15,44$ ;  $P < 0,0001$ ) и  $31,93 \pm 1,97$  ( $t = 16,15$ ;  $P < 0,0001$ ) мМ для нервных ганглиев, стенки тела и печени, соответственно. Было выявлено наличие положительной, средней по силе корреляции между уровнем глюкозы в гемолимфе и её содержанием в печени ( $r = 0,67$ ;  $t = 2,82$ ;  $P = 0,0183$ ) и стенке тела ( $r = 0,59$ ;  $t = 2,32$ ;  $P = 0,0429$ ), но не в нервных ганглиях ( $r = 0,07$ ;  $t = 0,22$ ;  $P = 0,8329$ ). Инкубация животных ( $n = 12$ ) в 100 мМ растворе глюкозы приводит к 9-кратному возрастанию уровня глюкозы в гемолимфе (до  $1,80 \pm 0,26$  мМ,  $t = 4,95$ ;  $P < 0,0001$ ) и в 1,2 раза для ткани печени (до  $37,23 \pm 1,42$  мМ,  $t = 2,18$ ;  $P = 0,0399$ ), но не для тканей стенки тела и нервных ганглиев, где отличия не носят достоверный характер. Статистически значимой взаимосвязи между уровнем глюкозы в гемолимфе и её содержанием в других тканях выявлено не было.

Модификация характеристик оборонительного поведения ассоциируется с ростом уровня глюкозы в гемолимфе с 0,12 (0,05; 0,18) до 4,10 (3,18; 6,08) мМ. При этом увеличивается втянутость тела животного в раковину (рисунок 2 а), а длина щупалец и латентный период протракции не изменяются. Между уровнем глюкозы в гемолимфе и показателями оборонительного поведения, как в контроле, так и в условиях экспериментальной гипергликемии, не существует статистически значимой взаимосвязи: коэффициенты корреляции Спирмена и значения достоверности аппроксимации меньше 0,30 и 0,10 соответственно. При гипергликемии возрастает доля слабых защитных реакций (ретракция щупальца) в ответ на тактильную стимуляцию (рисунок 2 б), за счёт снижения числа ответов, связанных с полным прикрытием тела раковинной и игнорированием стимула.



Представлено значение исследуемого показателя (числа над столбиками, медиана (верхний; нижний квартили) для *a*, среднее (его ошибка) для *в*) и число животных (*n*).

Типы реакции: 1 – игнорирование стимула; 2 – ретракция щупальца; 3 – надвигание раковины на передний конец тела; 4 – полное прикрытие тела раковинной. Фигурная скобка и звёздочка отмечают статистически достоверные различия.

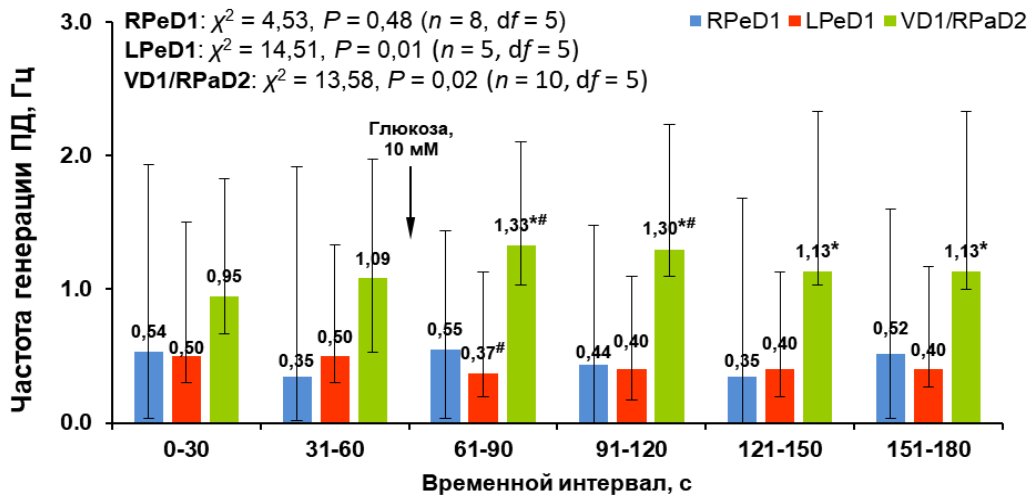
**Рисунок 2. – Показатели поведения (*a*), оборонительные реакции в ответ на тактильную стимуляцию щупальца (*б*) и частота сердечных сокращений (*в*) *Lymnaea stagnalis* при экспериментальной гипергликемии**

Отмечается умеренное (в 1,1 раза) возрастание ЧСС у моллюсков опытной группы по сравнению с контрольной (рисунок 2 *в*), связанное с многократным (в 6 раз) увеличением концентрации глюкозы в их гемолимфе – с 0,09 (0,08; 0,10) до 0,54 (0,44; 0,69) мМ соответственно ( $z = 3,75; P = 0,0002$ ).

### Электрическая активность идентифицированных нейронов *Lymnaea stagnalis* в условиях экспериментальной гипергликемии

Добавление глюкозы (1 мМ) не приводит к статистически достоверному изменению показателей спонтанной электрической активности (частота, уровень потенциала покоя) в краткосрочном, в течение 1-й и 2-й мин после воздействия, периоде ни для одного из исследованных нейронов. Увеличение действующей концентраций глюкозы до 10 мМ вызывает незамедлительную реакцию со стороны исследованных клеток (рисунок 3).

Для дофаминергического нейрона RPeD1 речь идёт о слабовыраженной гиперполяризации мембраны (на  $5,4 \pm 0,8$  мВ,  $n = 8$ ), уже на 1-й мин после аппликации глюкозы, сохраняющейся на отмеченном уровне и на 2-й мин и трансформации паттерна электрической активности – с фазической на тоническую. Для серотонинергической клетки LPeD1 отмечена неизменность мембранного потенциала и паттерна активности для всего изученного временного интервала. Развивающаяся деполяризация при возрастании уровня глюкозы характерна для пары электрически связанных, пептидергических нейронов VD1/RPaD2. Для VD1 уже на 1-й мин после добавления глюкозы величина деполяризации составила  $5,6 \pm 0,6$  мВ ( $n = 6$ ) от контрольного значения, достигая  $10,8 \pm 0,8$  мВ ( $n = 6$ ) на 2-й мин эксперимента. Для RPaD2 изменения мембранного потенциала были не столь выражены –  $4,2 \pm 0,6$  и  $8,8 \pm 0,9$  мВ ( $n = 6$ ) для 1-й и 2-й мин наблюдения соответственно.



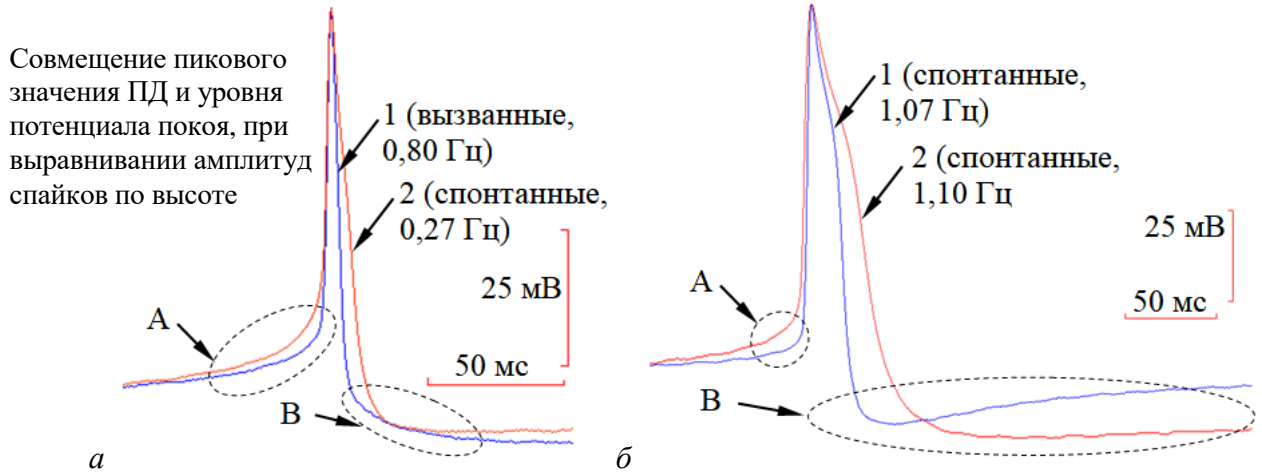
Указаны значения исследованных показателей (медиана, числа над столбиками), интерквартильный размах (планки погрешностей) и количество исследованных нейронов ( $n$ ) для клетки каждого типа. Момент добавления глюкозы (Glucose, 10 mM) отмечен стрелкой. Для всех нейронов указано значение  $\chi^2$  (Fridman ANOVA) и уровня значимости  $P$ . Достоверные различия ( $P < 0,05$ , Wilcoxon matched pairs test) по сравнению с контрольными условиями (0–30 или 31–60 с)

дополнительно отмечены звёздочкой (\*) и решёткой (#) соответственно.

**Рисунок 3. – Частота генерации потенциалов действия в идентифицированных нейронах *Lymnaea stagnalis* в условиях острой кратковременной гипергликемии**

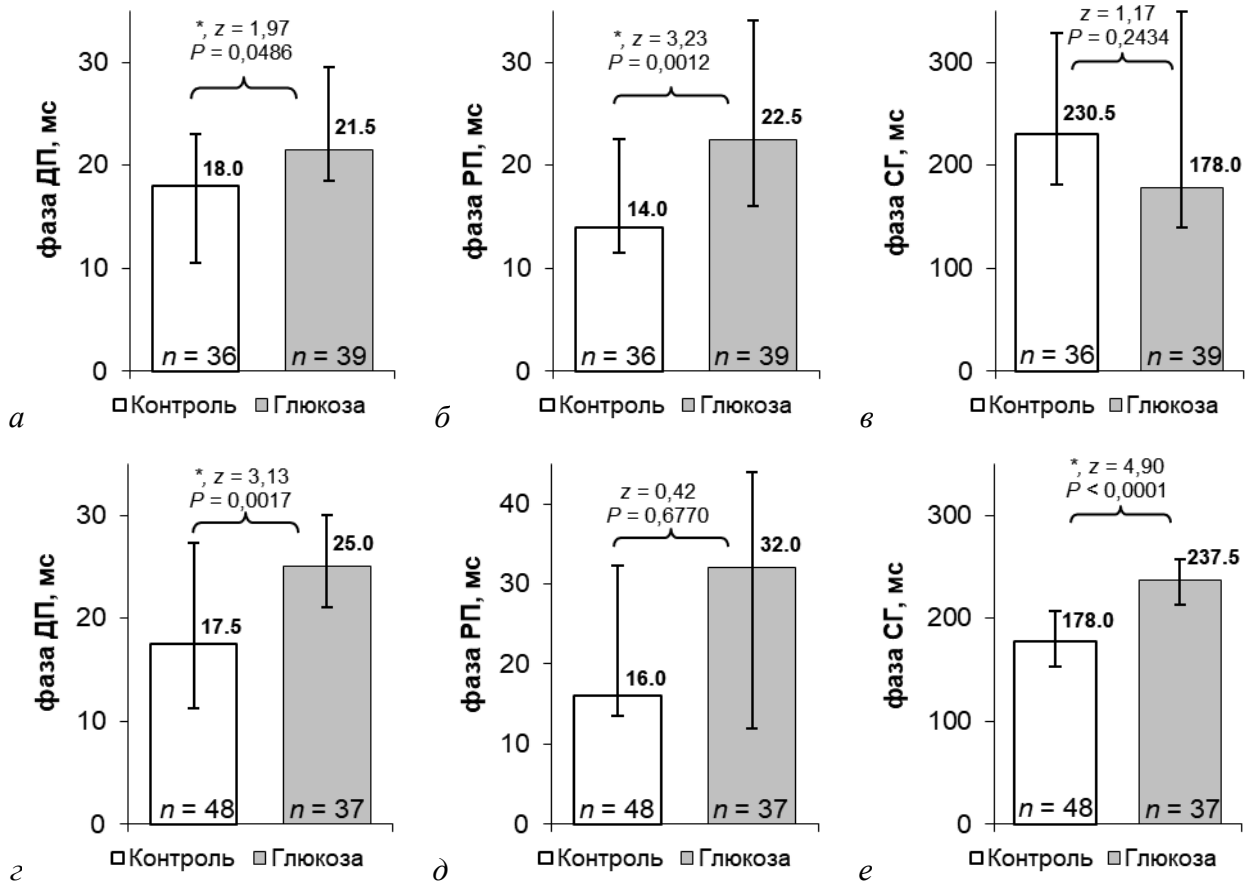
Трансформации паттерна активности VD1/RPaD2 отмечено не было – импульсация клеток носила тонический характер. В случаях с RPaD1, при наличии у данной клетки исходной электрической активности, аппликация глюкозы не привела к статистически значимому изменению частоты импульсации ( $F_{ANOVA} = 4,75$ ;  $P = 0,1911$ ) или мембранного потенциала. Добавление глюкозы приводит к появлению синаптических потенциалов, сопровождающихся генерацией серии импульсов, происходящих на фоне умеренной (~ 5 мВ) деполяризации клетки в случае исходно молчащих структур. Для спонтанно активных нейронов оно сопровождается появлением высокоамплитудных спайков при суммации амплитуд синаптического потенциала и собственного ПД друг с другом.

Форма спайков RPaD1 и VD1 изменяется при гипергликемии (рисунок 4): увеличивается скорость медленной деполяризации, выраженность следовой гиперполяризации (СГ), вне зависимости от характера активности (вызванная / спонтанная, частота, тип спайка). Наиболее выражены изменения временных показателей (рисунок 5): возрастание длительности де- (ДП) и реполяризации (РП), СГ. Для RPaD1 эти различия не были статистически значимыми в отношении СГ, а для VD1 – РП. Амплитудные характеристики спайка демонстрировали большую сохранность – лишь в отношении СГ для RPaD1 отмечено её уменьшение в 1,33 раза по сравнению с контролем, в то время как для VD1 ни одна из амплитуд достоверно не изменялась. Интегральные показатели спайка RPaD1 претерпевали значимые изменения лишь в отношении СГ – уменьшение её общей ( $S$ ) и средней ( $S/t$ ) площадей в 1,57 и 1,24 раза соответственно. Для положительной и негативной фаз VD1 отмечено возрастание их  $S$  в 1,32 и 2,49 раза, а  $S/t$  – в 1,26 и 1,29 раза в условиях пролонгированной гипергликемии.



Наложение отдельных спайков (синего цвета (1) – контроль, красного (2) – глюкоза (10 мМ), отражающее изменение временных характеристик спайка. А и В – области изменений формы ПД. Записи спонтанной электрической активности нейронов для контрольных и опытных условий получены от разных препаратов ЦНС (указана частота генерации ПД и её вид).

**Рисунок 4. – Форма потенциала действия (ПД) в нейронах RPaD1 (а) и VD1 (б) ЦНС *Lymnaea stagnalis* в контроле и при экспериментальной гипергликемии**



Представлено значение показателя – числа над столбиками (медиана) и планки погрешностей (нижний, верхний квартили), число проанализированных спайков (*n*). Для каждой группы сравнения указаны значения *z* (*U*-критерий Манна-Уитни) и уровня значимости (*P*).

Статистически достоверные изменения дополнительно отмечены звёздочкой.

*a, z* – длительность фазы деполяризации (ДП); *б, д* – длительность фазы реполяризации (РП); *в, е* – длительность фазы следовой гиперполяризации (СГ)

**Рисунок 5. – Временные характеристики спайка в нейронах RPaD1 (а–в) и VD1 (z–е) в ЦНС *Lymnaea stagnalis* в контроле и при экспериментальной гипергликемии**

Для электрических характеристик мембраны RPaD1 статистически достоверных различий между контрольной и опытной сериями выявлено не было, а для VD1 отмечено возрастание в 1,79 раза постоянной времени мембраны. Установлено снижение потенциала покоя как RPaD1, так и VD1 (деполяризация мембраны), в 1,24 и 1,29 раза соответственно, в экспериментальной группе относительно контрольной (таблица).

Таблица. – Электрические характеристики нейронов RPaD1 и VD1

Показатель	Сетевой нейрон RPaD1		Пейсмейкерный нейрон VD1	
	Контроль	Глюкоза, 10 мМ	Контроль	Глюкоза, 10 мМ
Сопротивление ( $R_m$ ), МΩ	29,9 ± 6,6 (n = 9)	27,3 ± 5,2 (n = 9)	25,1 ± 5,3 (n = 9)	21,0 ± 3,6 (n = 7)
Ёмкость ( $C_m$ ), нФ	8,6 ± 2,5 (n = 9)	7,6 ± 1,2 (n = 9)	14,1 ± 3,2 (n = 9)	26,4 ± 5,5 (n = 7)
Постоянная времени ( $\tau_m$ ), мс	227,0 ± 54,5 (n = 9)	214,0 ± 48,0 (n = 9)	261 ± 54 (n = 9)	468 ± 83* (n = 7)
Потенциал покоя, мВ	72 ± 4 (n = 9)	58 ± 4* (n = 9)	58 ± 4 (n = 9)	45 ± 3* (n = 9)
Частота импульсов, Гц	0,65 (0,44;0,84) (n = 28)	1,14 (0,82;1,59)** (n = 32)	1,07 (0,77;1,50) (n = 28)	1,00 (0,50;1,20) (n = 32)

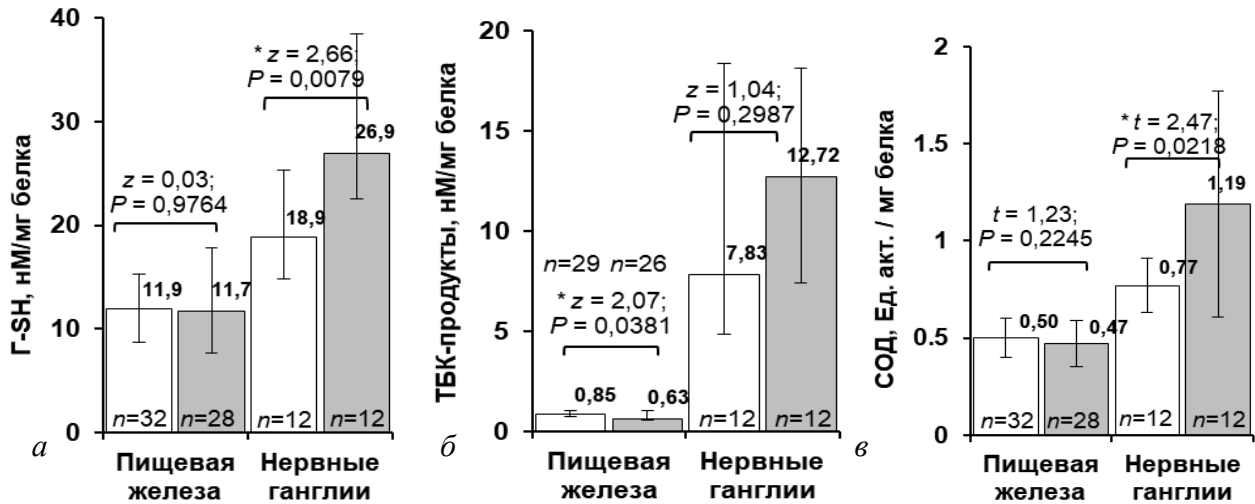
*Примечание:* Данные представлены в виде среднее ± ошибка среднего, для частоты импульсов – медиана (верхний; нижний квартили). Статистически достоверные изменения по отношению к контролю, отдельно для каждого типа нейрона, отмечены звёздочкой (\* –  $P < 0,05$ ; \*\* –  $P < 0,01$ )

Лишь в 2-х из 9-ти клеток RPaD1 контроля отмечалось наличие спонтанной ритмики, а в опытной группе лишь один нейрон из 9-ти находился в молчащем состоянии. При искусственной стимуляции нейронов контроля, значения частоты генерации ПД были меньше в 1,75 раза по сравнению с естественно наблюдаемыми при гипергликемии. Для VAX мембраны достоверных различий, согласно дисперсионному анализу для повторных измерений, отмечено не было, как для RPaD1 ( $F = 1,04$ ;  $P = 0,41$ ), так и для VD1 ( $F = 0,65$ ;  $P = 0,74$ ), в том числе отдельно для положительных (выходящих) и отрицательных (входящих) токов.

### **Антиокислительная система в органах и тканях *Lymnaea stagnalis* при экспериментальной гипергликемии**

С использованием флуоресцентного зонда была оценена возможность генерации АФК в суспензии клеток нервных ганглиев в динамике первого часа после добавления к ней глюкозы (10 мМ). Возрастание интенсивности флуоресценции в опытной группе по сравнению с контрольной не было отмечено ни в одном из оцениваемых временных отрезков – 15, 30, 45 и 60 мин ( $F = 0,022$ ;  $P = 0,990$ ). Продолжительная (не менее 2 ч) инкубация препаратов ЦНС в 10 мМ растворе глюкозы достоверно не увеличивает содержания глюкозы в нервных ганглиях, не изменяет количество ТБК-активных продуктов и активность СОД.

По прошествии 24 ч после окончания инкубации животных в высококонцентрированном водном растворе глюкозы (100 мМ) в тканях пищевой железы (печени) было отмечено 1,3-кратное снижение количества ТБК-активных продуктов, при неизменности активности СОД, Se-ГП и уровня  $\Gamma$ -SH (рисунок 6).



Светлые столбики – контрольная, серые – опытная группы. Приведены значения исследованных показателей (числа над столбиками) и количество проб ( $n$ ) для каждой экспериментальной серии. Для всех пар сравнения указано значение  $U$ -критерия Манна-Уитни или  $t$ -критерия Стьюдента для независимых групп и уровня значимости  $P$ . Статистически достоверные различия ( $P < 0,05$ ) дополнительно отмечены звездочкой (\*).

$a$  – содержание восстановленного глутатиона ( $\Gamma$ -SH),  $b$  – уровень ТБК-продуктов,  $v$  – активность супероксиддисмутазы (СОД)

**Рисунок 6. – Антиокислительная система в клетках пищевой железы и нервных ганглиях *Lymnaea* через 24 ч после острой экспериментальной гипергликемии**

Со стороны нервных ганглиев реакция была более заметной. Речь идёт о 1,6-кратном увеличении уровня  $\Gamma$ -SH и 1,5-кратном возрастании активности СОД. Достоверных изменений активности Se-ГП и количества ТБК-активных продуктов у опытной группы по сравнению с контролем не выявлено.

### **Пептидергическая система нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis* при экспериментальной гипергликемии**

Глюкоза выступает в качестве быстрого метаболического сигнала, пролонгированное действие которого выражено модифицирует электрические свойства пептид- (FMRF-амид) эргических клеток ЦНС *Lymnaea stagnalis*, определяя модификацию оборонительных ответов животного в новых условиях. Глюкозозависимая избирательная активация таких нейронов приводит к выработке как инсулин-подобных пептидов и нормализации уровня глюкозы в интерстиции, так и других регуляторных молекул, обеспечивающих утилизацию «избытка» глюкозы при интенсификации процессов роста и размножения моллюсков, определяя формирование специфического поведенческого паттерна.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. При свободном доступе к пище соотношение концентрации глюкозы в гемолимфе ( $0,20 \pm 0,02$  ммоль/л) к её содержанию в тканях нервных ганглиев, стенки тела и пищевой железы (печени) пресноводного лёгочного моллюска *Lymnaea stagnalis* составляет 1 : 46 : 90 : 160 соответственно. Двухчасовая инкубация моллюсков в 100 мМ водном растворе D-глюкозы приводит к 5–10 кратному (до  $1,80 \pm 0,26$  ммоль/л и выше) возрастанию её концентрации во внутренней среде (гемолимфе) улиток, в то время как в других органах её содержание статистически достоверно не изменяется (нервные ганглии, стенка тела) или незначительно, в 1,2 раза, увеличивается (в печени). Использование 10 мМ водного раствора глюкозы оказывается неэффективным для создания экспериментальной гипергликемии у *Lymnaea stagnalis*. Указанные особенности свидетельствуют о наличии развитых физиологических систем поддержания глюкозного гомеостаза в тканях моллюсков, включая нервную. В условиях развивающейся экспериментальной гипергликемии отмечается модификация оборонительного поведения моллюсков, проявляющаяся в увеличении втянутости тела животного в раковину и ослаблении ответов, связанных с тактильной стимуляцией кожи, а также усилении сердечной деятельности [1–3; 5; 7; 12; 13; 15–17].

2. Резкое увеличение концентрации глюкозы в интерстиции вызывает модификацию показателей электрической активности идентифицированных вставочных нейронов *Lymnaea stagnalis* в зависимости от их функциональной принадлежности. Наиболее чувствительными клетками, реагирующими на повышение уровня глюкозы в окружающем ЦНС пространстве, оказываются пептидергические кардиорегуляторные нейроны RPaD1 и VD1/RPaD2, а также серотонинсодержащие клетки (LPeD1) локомоторной сети, а дофаминергические нейроны (RPeD1) центрального генератора дыхательного ритма практически не изменяют свои электрические характеристики. В условиях выраженной гипергликемии (10 мМ) отмечено усиление частоты импульсации VD1/RPaD2 и её снижение в отношении LPeD1, наблюдаемые уже на первой минуте после воздействия, при неизменности указанного показателя для RPeD1. Действие глюкозы инициирует появление синаптических потенциалов на мембране нейрона RPaD1, свидетельствующих об активации кардиорегуляторного ритма в ЦНС *Lymnaea*. Добавление в среду инкубации глюкозы в меньших концентрациях (1 мМ) не приводит к статистически достоверным изменениям показателей электрической активности для всех исследованных нейронов [3; 6; 7; 11; 15; 20–23].

3. В условиях экспериментальной гипергликемии изменяются электрические характеристики FMRF-амидергического нейрона RPaD1 и мультипептидергического пейсмейкерного нейрона VD1, вовлечённых в детекцию сенсорных стимулов и кардиорегуляцию у *Lymnaea stagnalis*. Речь идёт о деполяриза-

ции их мембраны, сопровождаемой увеличением частоты генерации потенциала действия (для RPaD1, но не для VD1) при неизменности значений сопротивления, ёмкости, постоянной времени (возрастает для VD1, но не для RPaD1) мембраны и вольт-амперной характеристики по сравнению с контролем. Отмечено увеличение длительности фаз де- и реполяризации, значений амплитуды следовой гиперполяризации, при неизменности других фаз спайка RPaD1. Для VD1 речь идёт об удлинении фазы деполяризации и следовой гиперполяризации на фоне остающихся стабильными значений амплитудных характеристик фаз спайка. На основании выявленных особенностей формы потенциала действия при гипергликемии предполагается, что указанные изменения могут быть вызваны активацией  $\text{Na}^+$ /глюкозного котранспортёра и АТФ-чувствительных  $\text{K}^+$ -каналов мембраны исследованных нейронов [6; 7; 23; 24].

4. Инкубация клеток нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis* в 10 мМ растворе D-глюкозы не приводит к накоплению в их цитоплазме АФК в течение 1-го часа после воздействия. Продолжительная, свыше 2-х часов, гипергликемия не изменяет активность СОД, количество ТБК-активных продуктов и концентрацию глюкозы в гомогенатах ЦНС. Спустя сутки после вызванной экспериментальной гипергликемии, в нервных ганглиях отмечается 1,5-кратное увеличение содержания восстановленного глутатиона и активности СОД на фоне 1,3-кратного снижения количества общего белка. Активность Se-зависимой глутатионпероксидазы и уровень ТБК-активных продуктов не претерпевают статистически достоверных изменений. Предполагается, что развитая система антиокислительной защиты центральных ганглиев необходима для обеспечения устойчивого функционирования нервных клеток *Lymnaea stagnalis* при резких нарушениях глюкозного гомеостаза внутренней среды [5; 8; 9; 10; 14; 18; 19].

5. Масштабные сдвиги уровня глюкозы в гемолимфе могут играть сигнальную роль, опосредуя развитие нового функционального состояния организма беспозвоночных. Действие глюкозы следует рассматривать в качестве метаболического сигнала, в том числе и в отношении нейронов, не входящих в состав пищевой сети мозга моллюсков, а хорошо развитая система антиокислительной защиты ЦНС *Lymnaea stagnalis* определяет такую возможность, блокируя неконтролируемое нарастание АФК в условиях локальной гипергликемии. Эффекты глюкозы в отношении пептидергических клеток прудовика носят одинаковый (универсальный) характер и связаны с модификацией их мембранной натриевой и калиевой проводимостей, увеличивающих возбудимость данных нейронов. В свою очередь, это инициирует выброс содержащихся в них нейропептидов, обладающих регуляторным влиянием в том числе и в отношении двигательных (моторных) систем, обеспечивая условия для утилизации избытка глюкозы во внутренней среде на текущие нужды организма, достигая оптимального приспособительного результата [2; 4–8; 11; 18; 19].

## Рекомендации по практическому использованию результатов

Разработанные модели экспериментальной гипергликемии могут быть использованы для оценки изменений поведенческой активности модельных беспозвоночных, в том числе и для анализа влияния глюкозы на когнитивные функции их мозга. Анализ электрической активности, временных и амплитудных характеристик спайка в идентифицированных нейронах, позволяют провести быструю оценку влияния различных метаболитов как на транспортные системы мембраны, так и на возбудимость таких клеток, в том числе и в зависимости от их функциональной специфичности и/или используемого нейромедиатора. Препараты изолированной ЦНС прудовика могут быть рекомендованы для проведения научно-исследовательских работ по клеточной биологии с целью дальнейшего изучения механизмов устойчивости нейронов к действию чрезвычайных раздражителей различной природы.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры физиологии человека и животных БГУ (акт № 204/380). Они могут найти применение в учреждениях образования биологического и медико-биологического профилей в рамках подготовки квалификационных (курсовые, дипломные) работ, организации самостоятельной научно-исследовательской практики студентов, использоваться при чтении курсов «Физиология человека и животных», «Биофизика», «Сравнительная физиология», «Нейробиология».

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в научных журналах:

1. **Шаденко, В. Н.** Индукция экспериментальной гипергликемии у моллюска *Lymnaea stagnalis* при инкубации животных в высококонцентрированном растворе глюкозы / В. Н. Шаденко, А. В. Сидоров // Журнал Белорусского государственного университета. Биология. – 2019. – № 1. – С. 79–84.
2. **Шаденко, В. Н.** Концентрация глюкозы в органах и тканях моллюска *Lymnaea stagnalis* в норме и в условиях экспериментальной гипергликемии / В. Н. Шаденко, А. С. Сидоров // Новости мед.-биол. наук. – 2019. – Т. 19, № 2. – С. 12–17.
3. Сидоров, А. В. Реакции идентифицированных кардиорегуляторных нейронов ЦНС моллюска *Lymnaea stagnalis* в условиях гипергликемии и при действии инсулина / А. В. Сидоров, **В. Н. Шаденко**, В. Б. Казакевич // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. – 2019. – № 3. – С. 49–58.
4. **Шаденко, В. Н.** Возрастные изменения нейронных функций при нарушении метаболизма глюкозы / В. Н. Шаденко // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. – 2020. – № 2. – С. 3–14.

5. **Shadenko, V. N.** Antioxidative defense in the hepatopancreas and nerve ganglia of the mollusk *Lymnaea stagnalis* after acute experimental hyperglycemia / V. N. Shadenko, A. V. Sidorov // J. Evol. Biochem. Physiol. – 2020. – Vol. 56, № 3. – P. 235–242.

6. Sidorov, A. V. Electrical activity of identified neurons in the central nervous system of a mollusk *Lymnaea stagnalis* under acute hyperglycemia / A. V. Sidorov, **V. N. Shadenko** // J. Evol. Biochem. Physiol. – 2021. – Vol. 57, № 6. – P. 1257–1266.

7. Сидоров, А. В. Электрические характеристики сенсорного нейрона и оборонительные реакции моллюска *Lymnaea stagnalis* в условиях пролонгированной гипергликемии / А. В. Сидоров, **В. Н. Шаденко** // Экспериментальная биология и биотехнология. – 2022. – № 1. – С. 23–38.

8. Сидоров, А. В. Сохранность редокс равновесия в клетках нервных ганглиев моллюска *Lymnaea stagnalis* при пролонгированной экспериментальной гипергликемии / А. В. Сидоров, **В. Н. Шаденко** // Новости мед.-биол. наук. – 2022. – Т. 22, № 1. – С. 143–148.

#### **Статьи в сборниках материалов конференций:**

9. **Шаденко, В. Н.** Супероксиддисмутазная активность в гемолимфе моллюска *Lymnaea stagnalis* в модели острой кратковременной гипергликемии / В. Н. Шаденко, А. В. Сидоров // Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии : сб. материалов III Конф. молодых ученых биохимиков и молекуляр. биологов с междунар. участием, Гродно, 11–12 мая 2017 г. / редкол.: Л. И. Надольник (отв. ред.) [и др.]. – Гродно, 2017. – С. 148–149.

10. **Шаденко, В. Н.** Супероксиддисмутазная активность в пищевой железе (печени) моллюска *Lymnaea stagnalis* после однократной острой гипергликемии [Электронный ресурс] / В. Н. Шаденко, А. В. Сидоров // Кислород и свободные радикалы : сб. материалов междунар. науч.-практ. конф., 15–16 мая 2018 г. / Гродн. гос. мед. ун-т ; под ред. В. В. Зинчука. – Гродно, 2018. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

11. Сидоров, А. В. Реакции идентифицированных нейронов моллюска в условиях гипергликемии и при действии инсулина / А. В. Сидоров, **В. Н. Шаденко** // Обзоры по клин. фармакологии и лекарств. терапии. – 2018. – Т. 16, спец. вып. 1 : Психофизиология и психоэндокринология : материалы конф., Ставрополь, 23–26 мая 2018 г. – С. 119–120.

#### **Тезисы докладов:**

12. **Шаденко, В. Н.** Возрастание концентрации глюкозы в гемолимфе вызывает увеличение частоты сердечных сокращений у моллюска *Lymnaea stagnalis* / В. Н. Шаденко, 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 рожд. акад. И. А. Булыгина, Минск, 5 окт. 2017 г. / Беларус. гос. ун-т [и др.] ; редкол.: В. В. Лысак [и др.]. – Минск, 2017. – С. 129.

13. **Шаденко, В. Н.** Сохранность мышечной локомоции моллюска *Lymnaea stagnalis* при возрастании концентрации глюкозы в гемолимфе / В. Н. Шаденко, А. В. Сидоров // Биологическая осень 2017: к Году науки в Беларуси : тез. докл. Междунар. науч. конф. молодых ученых, Минск, 9 нояб. 2017 г. / Беларус. гос. ун-т, Биол. фак., Совет молодых ученых ; редкол.: В. В. Лысак (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2017. – С. 156–158.

14. **Shadenko, V. N.** Acute hyperglycemia modulate antioxidant defense in the CNS of model invertebrate mollusk *Lymnaea stagnalis* / V. N. Shadenko, A. V. Sidorov // NeNa Conference 2018 : 19th Conf. of jun. neuroscientists of Tübingen, Germany, Schramberg (Black Forest) – Tübingen, 24–26 Sept. 2018 : bk of abstr. – Tübingen, 2018. – P. 39.

15. **Шаденко, В. Н.** Влияние инсулина и глюкозы на частоту сердечных сокращений и электрическую активность нейронов кардиореспираторной сети моллюска *Lymnaea stagnalis* / В. Н. Шаденко, А. В. Сидоров // Новости мед.-биол. наук. – 2018. – Т. 18, № 1 : Труды международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные науки – медицине», Минск, 12 окт. 2018 г. – С. 120–121.

16. **Шаденко, В. Н.** Влияние острой экспериментальной гипергликемии на легочную респирацию моллюска *Lymnaea stagnalis* [Электронный ресурс] / В. Н. Шаденко // Ломоносов – 2019 : материалы Междунар. молодеж. науч. форума, Москва, 8–12 апр. 2019 г. / Моск. гос. ун-т ; редкол.: И. А. Алешковский (отв. ред.) [и др.]. – М., 2019. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).

17. **Шаденко, В. Н.** Концентрация глюкозы в тканях моллюска *Lymnaea stagnalis* при экспериментальной гипергликемии / В. Н. Шаденко, А. В. Сидоров // Физико-химическая биология как основа современной медицины : тез. докл. участников Респ. конф. с междунар. участием, посвящ. 110-летию со дня рожд. В. А. Бандарина (Минск, 24 мая 2019 г.) / Беларус. гос. мед. ун-т, Каф. общей химии ; под ред. В. В. Хрусталева, Т. А. Хрустальной. – Минск, 2019. – С. 143–145.

18. **Shadenko, V. N.** The effect of acute hyperglycemia on the activity of the antioxidant system in the central nervous system and in the liver of the invertebrate mollusk – *Lymnaea stagnalis* / V. N. Shadenko, A. V. Sidorov // Med. Acad. J. – 2019. – Vol. 19, suppl. : Interaction of the nervous and immune systems in health and disease : abstr. of the VII Intern. symp., Saint Petersburg, 27–31 May 2019. – P. 37–39.

19. Сидоров, А. В. Антиоксидантная система как основа устойчивости нервных клеток беспозвоночных к действию чрезвычайных раздражителей [Электронный ресурс] / А. В. Сидоров, Г. Т. Маслова, **В. Н. Шаденко** // Свободные радикалы в химии и жизни : тез. докл. III Междунар. конф., Минск, 10–11 окт. 2019 г. / Белорус. гос. ун-т ; редкол.: О. И. Шадыро (отв. ред.) [и др.]. – Минск, 2019. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

20. **Шаденко, В. Н.** Влияние высоких концентраций глюкозы на активность идентифицированных кардиорегуляторных нейронов центральных ганглиев моллюска *Lymnaea stagnalis* [Электронный ресурс] / В. Н. Шаденко, А. В. Сидоров // Физико-химическая биология как основа современной медицины : тез. докл. участников Респ. конф. с междунар. участием, посвящ. 80-летию со дня рожд. Т. С. Морозкиной (Минск, 29 мая 2020 г.) / Белорус. гос. мед. ун-т, Каф. биол. химии, Каф. общей химии ; под ред. А. Д. Тагановича, В. В. Хрусталева, Т. А. Хрустальной. – Минск, 2020. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

21. **Shadenko, V. N.** Responses of identified neurons within cardiorespiratory network in the CNS of *Lymnaea stagnalis* on insulin action [Electronic resource] / V. N. Shadenko, A. V. Sidorov, V. B. Kazakevich // FENS 2020 Virtual Forum, 11–15 July 2020. – Mode of access: <https://cslide.ctimeetingtech.com/fens2020/attendee/person/5427>. – Date of access: 13.07.2020.

22. **Шаденко, В. Н.** Влияние высоких концентраций глюкозы на активность идентифицированных кардиорегуляторных нейронов ЦНС моллюска *Lymnaea stagnalis* [Электронный ресурс] / В. Н. Шаденко // Ломоносов – 2021 : материалы междунар. молодеж. науч. форума, 12–23 апр. 2021 г. / Моск. гос. ун-т ; редкол.: И. А. Алешковский (отв. ред.) [и др.]. – М., 2021. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).

23. **Шаденко, В. Н.** Модификация электрической активности идентифицированных интернейронов *Lymnaea stagnalis* при действии глюкозы / В. Н. Шаденко, А. В. Сидоров // Новости мед.-биол. наук. – 2020. – Т. 21, № 3 : Труды международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные науки – медицине», Минск, 8 окт. 2021 г. – С. 120–121.

24. **Шаденко, В. Н.** Пластичность потенциалов действия в пептидсодержащем нейроне ЦНС моллюска *Lymnaea stagnalis* при гипергликемии / В. Н. Шаденко, А. В. Сидоров // Новости мед.-биол. наук. – 2022. – Т. 22, № 1 : Труды IV Республиканской научной конференции «Сигнальные механизмы регуляции физиологических функций». – С. 105–106.



## РЕЗЮМЕ

Шаденко Виктория Николаевна

### Лабильность пептидергических нейронов центральных нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis* при экспериментальной гипергликемии

**Ключевые слова:** идентифицированные нейроны, глюкоза, оборонительные реакции, электрические свойства мембраны, потенциал действия, антиокислительная система, активные формы кислорода, беспозвоночные.

**Цель исследования:** экспериментально доказать способность к рецепции глюкозы при увеличении её содержания в межклеточном пространстве для центральных, не входящих в состав пищевой сети, нейронов и установить механизмы возможной глюкозочувствительности.

**Объект исследования:** пресноводный моллюск *Lymnaea stagnalis*.

**Методы исследования:** электрофизиологические, биохимические, поведенческие, статистические.

**Полученные результаты и их новизна:** впервые оценены реакции ряда не входящих в состав пищевой сети интернейронов разной эргичности ЦНС *Lymnaea stagnalis* при гипергликемии. Установлено, что действие глюкозы наиболее выражено в отношении пептидсодержащих клеток, вовлечённых в кардиорегуляцию (RPaD1, VD1/RPaD2), по сравнению с серотонин- (LPeD1) и дофамин- (RPeD1) содержащими нейронами локомоторной и дыхательной сетей. Эффекты глюкозы связаны с возрастанием возбудимости данных клеток, а также модификацией временных характеристик потенциала действия (его расширения), указывающих на изменения натриевой (увеличение) и калиевой (снижение) проводимостей мембраны нейронов. В условиях гипергликемии не происходит быстрого накопления активных форм кислорода в клетках нервных ганглиев, а их система антиокислительной защиты способна погасить развитие окислительного стресса в таких условиях.

**Рекомендации по использованию:** разработанные модели оценки изменений электрических свойств мембраны клеток мозга беспозвоночных позволяют выявить характер воздействия, оказываемого различными метаболитами с сигнальными свойствами в отношении идентифицированных нейронов, различных по своим морфофункциональным характеристикам и химизму.

**Область применения:** научно-исследовательские лаборатории биофизической и электрофизиологической направленности, учреждения образования биологического и медико-биологического профилей.

## РЭЗІЮМЭ

Шадэнка Вікторыя Мікалаеўна

### Лабільнасць пептыдэргічных нейронаў цэнтральных нервовых гангліяў *Lymnaea stagnalis* пры эксперыментальнай гіперглікеміі

**Ключавыя словы:** ідэнтыфікаваныя нейроны, глюкоза, абарончыя рэакцыі, электрычныя ўласцівасці мембраны, патэнцыял дзеяння, антыакісляльная сістэма, актыўныя формы кіслароду, бесхрыбтовыя.

**Мэта даследавання:** эксперыментальны доказ здольнасці да рэцэпцыі глюкозы, пры павелічэнні яе змяшчэння ў міжклеткавай прасторы, для цэнтральных, якія не ўваходзяць у склад стрававальнай сеткі, нейронаў малюска *Lymnaea stagnalis* і ўсталяванне механізмаў чулівасці да глюкозы такіх клетак.

**Аб'ект даследавання:** прэснаводны малюск *Lymnaea stagnalis*.

**Метады даследавання:** электрафізіялагічныя, біяхімічныя, паводніцкія, статыстычныя.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна:** упершыню ацэнены рэакцыі шэрагу не ўваходзячых у склад харчовай сеткі інтэрнейронаў рознай эргічнасці ЦНС *Lymnaea stagnalis* пры гіперглікеміі. Устаноўлена, што дзеянне глюкозы найбольш адлюстроўваецца ў дачыненні да пептыдзмяшчальных клетак, уцягнутых у кардыярэгуляванне (RPaD1, VD1/RPaD2), у параўнанні з сератанін- (LPeD1) і дафамін- (RPeD1) змяшчальнымі нейронамі лакаматорнай і рэспіраторнай сетак. Эфекты глюкозы звязаныя з узрастаннем узбудлівасці дадзеных клетак, а таксама мадыфікацыяй часавых характарыстык патэнцыялу дзеяння (яго пашырэння) паказваюць на змены натрыевай (павелічэнне) і каліевай (зніжэнне) праводнасцяў мембраны нейронаў. Ва ўмовах гіперглікеміі не адбываецца хуткага назапашвання актыўных формаў кіслароду ў клетках нервовых гангліяў, а іх сістэма антыакісляльнай абароны здольная пагасіць развіццё акісляльнага стрэсу ў такіх умовах.

**Рэкамендацыі па выкарыстанню:** распрацаваныя мадэлі ацэнкі змяненняў электрычных уласцівасцей мембраны клетак мозгу бесхрыбтовых дазваляюць выявіць характар уздзеяння, якое аказваецца рознымі метабалітамі з сігнальнымі ўласцівасцямі ў дачыненні да ідэнтыфікаваных нейронаў, розных па сваіх морфафункцыянальных характарыстыках і хімізму.

**Галіна выкарыстання:** навукова-даследчыя лабараторыі біяфізічнай і электрафізіялагічнай накіраванасці, установы адукацыі біялагічнага і медыка-біялагічнага профіляў.



## SUMMARY

**Shadenko Victoria Nikolaevna**

**Lability of peptidergic neurons of the central nerve ganglia of  
*Lymnaea stagnalis* at experimental hyperglycemia**

**Key words:** identified neurons, glucose, defence responses, membrane electrical properties, action potential, antioxidant system, reactive oxygen species, invertebrates.

**Aim of research:** experimental proofs of the glucose reception ability during increase in its content in the intercellular space, for central, non-feeding network neurons within mollusc *Lymnaea stagnalis* and the understanding of possible glucose sensitivity mechanisms of such cells.

**Object of study:** freshwater mollusk *Lymnaea stagnalis*.

**Methods of research:** electrophysiological, biochemical, behavioural tests, statistical.

**Results and their novelty:** for the first time, responses of chemically different, non-feeding interneurons within CNS of *Lymnaea stagnalis* at hyperglycemia were analyzed. It was assumed that glucose action is more effective in relation to peptide-containing cells involved in cardioregulation (RPaD1, VD1/RPaD2), compared with serotonin- (LPeD1) and dopamine- (RPeD1) containing neurons of locomotion and respiratory networks. The effects of glucose are associated with an increase in the excitability of these cells, as well as in modification of the temporal characteristics of their action potentials (its expansion), indicating changes in the sodium (increase) and potassium (decrease) conductivities of the neuronal membrane. There is no rapid accumulation of reactive oxygen species in the cells of the nervous ganglia under experimental hyperglycemia and their antioxidant defense system is able to prevent the development of the oxidative stress at these conditions.

**Recommendation for application:** models, developed for the analysis of membrane electrical properties of the nervous cells within invertebrate brain, make it possible to reveal the effect exerted by various metabolic signals on identified neurons varying in their functional properties and chemical nature.

**Field of application:** research laboratories in biophysics and electrophysiology, Institutes of higher education in Biology and Biomedicine.



