

УДК 577.152; 577.24

А.В. СИДОРОВ¹, В.Н. ШАДЕНКО^{1,2}

СОХРАННОСТЬ РЕДОКС РАВНОВЕСИЯ В КЛЕТКАХ НЕРВНЫХ ГАНГЛИЕВ МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS* ПРИ ПРОЛОНГИРОВАННОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь;

²Республиканский научно-практический центр психического здоровья, Минск, Беларусь

Использование флуоресцентного зонда (2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата) показало, что инкубация клеток нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis* в 10 мМ растворе D-глюкозы не приводит к накоплению в их цитоплазме активных форм кислорода в течение 1 часа после воздействия. Продолжительная, свыше 2-х часов, экспериментальная гипергликемия (глюкоза, 10 мМ) не изменяет активность супероксиддисмутазы, содержание ТБК-активных продуктов и концентрацию глюкозы в гомогенатах центральных нервных ганглиев моллюска. Предполагается, что хорошо развитая система антиокислительной защиты ЦНС *Lymnaea stagnalis* определяет возможность использования глюкозы в качестве специфической сигнальной молекулы в отношении нейронов, не входящих в состав пищедобывающей сети.

Ключевые слова: глюкоза; активные формы кислорода; редокс равновесие; нервная система; беспозвоночные

Введение. Глюкоза является одним из основных метаболитов, выступая в качестве активного участника энергетического и пластического обмена у живых организмов. Признание наличия у этой молекулы сигнальных свойств, фактически легло в основу глюкостатической гипотезы (Mayer, 1953), предполагающей корректировку потребления пищи животными как результат модуляции активности глюкозочувствительных клеток гипоталамуса [1]. В последующем, такие клетки были обнаружены и в других отделах мозга позвоночных [2, 3], а также в составе нервных ганглиев беспозвоночных [4, 5]. С учётом того факта, что основная масса углеводов пищи поступает в кровь в виде глюкозы, а интенсивность кровотока особенно велика в органах нервной системы, глюкозу можно рассматривать в качестве одного из факторов объёмной передачи сигнала [6], диффузно распределённого в межклеточном пространстве нервной ткани и потенциально способного оказать воздействие на *любую* клетку мозга. Кроме того, регуляция обмена глюкозы критически значима для функционирования мозга [7]. В случае нейронов моллюсков речь идёт о модификации мембранного транспорта, включая активацию работы Na⁺/глюкозного котранспортёра и связанного с этим дополнительного притока ионов Na в нервную клетку, приводящим к её деполяризации, т.е. развитию возбуждения [5]. С другой стороны, поступление глюкозы в цитозоль может приводить к интенсификации окислительного фосфорилирования в электронтранспортной цепи митохондрий, которыми чрезвычайно богаты как тела, так и отростки нервных клеток [8]. Помимо выработки “дополнительных” порций АТФ, которая способна активировать транспортные системы мембран, например АТФ-зависимые K⁺-каналы [9], и тем самым напрямую определять возбудимость нейрона, как это имеет место в случае глюкозочувствительных клеток гипоталамуса крыс, в качестве побочного эффекта стоит отметить и возможность накопления активных форм кислорода (АФК), сигнальные эффекты которых в цитозоле [10], а также прямое действие на разнообразные внутриклеточные компоненты, в том числе белки ионных каналов плазмалеммы [11], определяющих электрические характеристики нейронов, хорошо известны. Закономерно возникает вопрос, в какой мере эффекты возрастания содержания глюкозы в интерстиции связаны, и связаны ли вообще, с внутриклеточным накоплением АФК и изменением редокс равновесия нервных клеток? Для проверки этой гипотезы мы использовали препараты нервной системы моллюска *Lymnaea stagnalis*. Центральные нейроны у данного вида, в том числе не входящие в состав пищевой сети, способны изменять характер своей электрической активности в зависимости от концентрации глюкозы в гемолимфе в течение короткого (секунды, минуты) промежутка времени [12, 13], вне связи с увеличением содержания АФК в цитозоле [12]. В то же время, острая экспериментальная гипергликемия приводит в отсроченной (по прошествии 24 ч) модификации состояния

антиокислительной системы в ЦНС данного вида [14]. Однако поведенческие эффекты, связанные с модификацией пищедобычи, т.е., по сути, уровнем глюкозы в гемолимфе [15], наблюдаются в течение более короткого (часы) временного периода. Целью данной работы было определить возможности накопления АФК в клетках нервных ганглиев и модификации в них редокс равновесия при гипергликемии в указанном временном окне.

Материалы и методы. 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 1 л воды) при температуре 20 ± 1 °С. Смену воды проводили каждую неделю. Пищей служили листья салата (питание *ad libitum*). Использовали животных одинакового размерного класса с высотой раковины от 3,5 до 4,5 см.

Накопление АФК в нейронах. В изолированной ЦНС, при помощи пинцетов разрывали соединительно-тканную оболочку ганглиев, механически высвобождая содержащиеся в них нейроны, получая суспензию клеток в физиологическом растворе Рингера объемом 200 мкл (для одной ЦНС/пробы). Для оценки накопления АФК в цитоплазме использовали флуоресцентный краситель: 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат (DCFDA, максимумы λ_{ex} – 501, λ_{em} – 525 нм, Sigma–Aldrich) в конечной концентрации 10 мкМ. Зонд добавляли непосредственно к суспензии клеток, выдерживая их в темноте, в течение 1 ч. По окончании инкубации, клетки осаждали центрифугированием (6000 об/мин, 5 мин), физиологический раствор с содержащимся в нём зондом удаляли, а клетки ресуспензировали свежим раствором Рингера. Процедуру отмывки клеток от следов зонда повторяли дважды.

Подготовленные пробы (по 8 для каждой экспериментальной серии), объемом 225 мкл располагали в отдельных лунках 24-луночного планшетах. Оценку интенсивности флуоресценции проводили до (0 мин) и после экспериментального воздействия (на 15, 30 60 мин). К клеткам опытной группы добавляли 25 мкл 100 мМ раствора глюкозы (итоговая концентрация в лунке – 10 мМ), а к клеткам контрольной группы – равновеликое количество нормального раствора Рингера. Флуоресценцию (возбуждение 501 нм, эмиссия 529 нм) образующегося продукта измеряли посредством планшетного флуориметра Cary Eclipse (Agilent Technologies, USA) при трёхкратной повторности каждого измерения (в дальнейшем использовали одно, среднеарифметическое значение). Усредненную интенсивность флуоресценции лунок, содержащих контрольные клетки или лунок до экспериментального воздействия (0 мин), принимали за 100 %.

Приготовление гомогената тканей. Первоначально удаляли раковину, вскрывали полость цефалопедалного синуса и производили забор центрального кольца нервных ганглиев (одна ЦНС на пробу). Изолированные препараты ЦНС инкубировали в 10 мМ растворе D-глюкозы, приготовленном на основе нормального раствора Рингера для *Lymnaea* (в мМ: NaCl – 44,0; KCl – 1,7; CaCl₂ – 4,0; MgCl₂ x 6 H₂O – 1,5; HEPES – 10,0, pH 7,5±0,03) – опытная группа или в «чистом» растворе Рингера (контроль) не менее 2-х часов. Затем их замораживали и хранили при минус 20 °С используя по мере необходимости. Гомогенаты предварительно взвешенных проб (аналитические весы ВЛР-200, точность 0.05 мг) готовили на основе холодной (4 °С) дистиллированной воды.

Анализ содержания глюкозы. Концентрацию глюкозы в гомогенатах нервных ганглиев определяли глюкозооксидазным методом (набор реагентов «Анализ Х», Беларусь) с учётом всех предшествующих разведений материала. Измерения оптической плотности проводили на длине волны 520 нм, длина оптического пути 1 см, при 20 °С посредством спектрофотометра Cary 50 (Variant Inc., Австралия). Объем гомогената для анализа – 50 мкл, время инкубации с реагентом (1 мл) – 30 мин. В качестве стандарта использовали 50 мкл свежеприготовленного 1 мМ раствора глюкозы.

Система антиокислительной защиты в гомогенатах нервных ганглиев. Активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1.) определяли спектрофотометрическим методом [16], основанным на оценке скорости аутоокисления флавоноида кверцетина, при длине волны 406 нм и оптического пути 1 см. В контрольной пробе использовали равновеликий объем дистиллированной воды. Результат выражали в единицах активности фермента (U) на мг общего белка (U/мг белка) или мл гомогената (U/мл). Интенсивность процессов перекисного окисления липидов определяли по образованию в гомогенатах нервных ганглиев ТБК- (тиобарбитуровая кислота) активных продуктов по модифицированной методике [17]. Гомогенат вносили в 0,5 % раствор свежеприготовленной ТБК, оставляли на 5 мин, прибавляли ТХУ (50 %) и помещали пробу на водяную баню (100 °С) на 15 мин, после чего её центрифугировали (6000 об/мин, 10 мин). Оптическую плотность супернатанта определяли при длине волны 532 нм и оптического пути 1 см, с учётом коэффициента молярной экстинкции для малонового диальдегида (МДА, $156000 \text{ (моль/л)}^{-1} \times \text{см}^{-1}$). Контролем служила проба,

содержащая дистиллированную воду вместо гомогената. Результат выражали в количестве ТБК-активных продуктов на мг общего белка (нмоль / мг белка).

Определение количества белка проводили по методу Бредфорда [18] при длине волны 595 нм и оптического пути 1 см, при однократной повторности измерения для каждой пробы. Расчёт производили на основании калибровочной кривой (бычий альбумин, от 100 до 1000 мкг/мл с шагом 100 мкг/мл) и полученного по её данным уравнению линейной регрессии, на 30 мин после добавления в реагент гомогената нервных ганглиев. В контрольной пробе использовали равновеликий гомогенату объём дистиллированной воды.

Статистический анализ. Экспериментальные данные обрабатывали общепринятыми методами медико-биологической статистики, с использованием возможностей программы Statistica 6.0. Нормальность распределения для каждого ряда экспериментальных данных предварительно оценивали при помощи *W*-теста Шапиро–Уилка. В случае подтверждения нормальности распределения показателей для всех сравниваемых групп использовали параметрические методы оценки – *t*-критерий Стьюдента для независимых пар, представляя данные в виде среднее ± ошибка среднего. При сравнении нескольких независимых групп – *F*-критерий Фишера (дисперсионный анализ по однофакторной схеме, one-way ANOVA или для повторных измерений, repeated measures ANOVA). Если нормальность распределения не была подтверждена для всех экспериментальных групп, использовали непараметрических методы оценки и сравнения полученных результатов – *U*-критерий Манна–Уитни (*z*) при сравнении двух независимых выборок, представляя данные в виде – медиана (нижний; верхний квартили). Число наблюдений (*n*) указано отдельно для каждой анализируемой выборки отдельно. Достоверными считались данные при уровне значимости (*P*) равном или меньшем 0,05.

Результаты и их обсуждение. Анализ накопление АФК в нейронах. Использование флуоресцентного зонда позволило оценить возможность генерации АФК в изолированных клетках нервных ганглиев *Lymnaea* в динамике первого часа после создания условий гипергликемии. Добавление к суспензии клеток глюкозы (10 мМ, конечная концентрация) не приводит к возрастанию интенсивности флуоресценции в опытной группе по сравнению с контрольной ни в одном из оцениваемых временных отрезков (рис. 1 А).

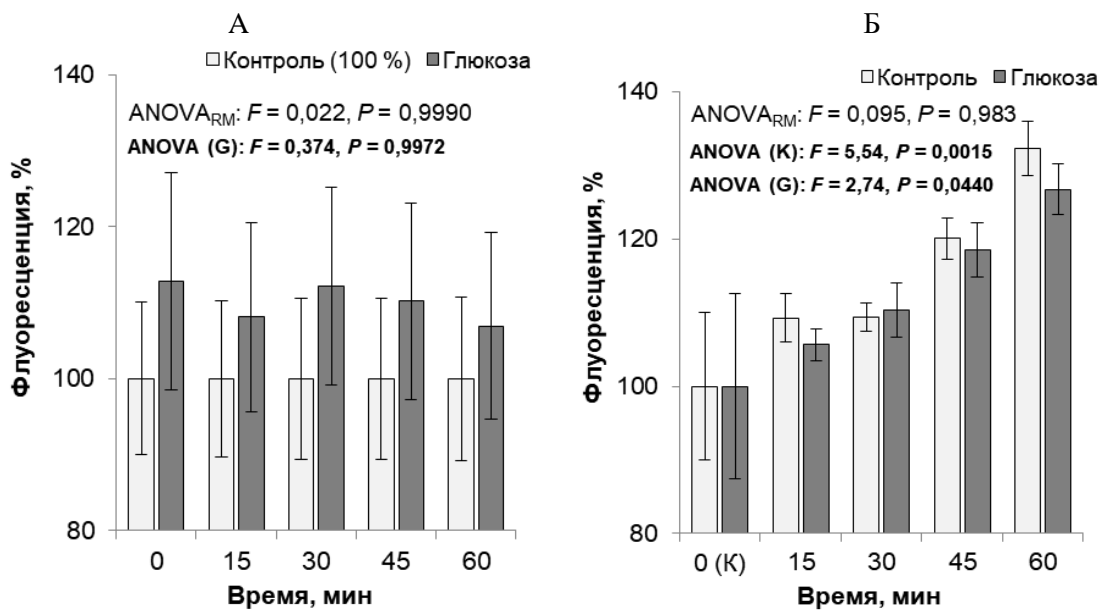


Рис. 1. Флуоресценция в суспензии изолированных клеток нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis*

«Контроль» – (нормальный физиологический раствор Рингера), «Глюкоза» – экспериментальные условия (глюкоза, конечная концентрация 10 мМ). Данные представлены в виде среднее арифметическое ± ошибка среднего. Число проб (*n*) – 8 для каждой серии эксперимента. Приведены данные по дисперсионному анализу (*F*-критерий) для повторных измерений (ANOVA_{RM}), по однофакторной схеме (ANOVA), отдельно для каждой группы данных (К – контроль, G – глюкоза). Дополнительно указана величина уровня значимости *P*. А – флуоресценция в контрольной группе принята за 100 % (для каждого временного интервала (0, 15, 30 и 60 мин) отдельно), Б – флуоресценция в начальный момент времени (0) принята за 100 % (для каждой серии отдельно)

Оценка интенсивности флуоресценции по отношению к начальным (до создания гипергликемии) условиям показывает её статистически достоверное увеличение, примерно в 1,2–1,3 раза к 60 мин, как в опытной, так и контрольной сериях (рис. 1 Б).

Однако различий между этими двумя группами данных, согласно дисперсионному анализу для повторных измерений, выявлено не было (см. значения статистических показателей в поле рис. 1 Б), что не позволяет говорить о накоплении АФК в изолированных нейронах ЦНС *Lymnaea stagnalis* в условиях экспериментальной гипергликемии в течение указанного отрезка времени.

Система антиокислительной защиты в препаратах изолированной ЦНС в условиях пролонгированной гипергликемии. Продолжительная (не менее 2 ч) инкубация препаратов в растворе Рингера, концентрация глюкозы к котором составляла 10 мМ, не приводит к статистически достоверному увеличению её (глюкозы) содержания в нервных ганглиях по сравнению с контрольными условиями (рис. 2 А). Различия по массе ганглиев ($3,42 \pm 0,08$ мг, $n = 13$ и $3,40 \pm 0,13$ мг, $n = 12$) и содержанию общего белка ($64,1 \pm 1,43$ мг/мл, $n = 13$ и $63,7 \pm 3,43$ мг/мл, $n = 12$) для данных групп не носили статистически достоверного характера: $t = 0,19$, $P = 0,8534$ и $t = 0,10$, $P = 0,9192$ соответственно. Статистическая неизменность отмечена и в отношении ТБК-активных продуктов (рис. 2 Б). Для активности СОД, при оценке данного показателя как в пересчёте на мг бека (рис. 3 В), так и при выражении его на единицу объёма гомогената ($42,0$ ($30,3; 47,9$) У/мл, $n = 13$ и $48,3$ ($40,2; 51,4$) У/мл, $z = 1,65$, $P = 0,0987$) справедливо говорить лишь о тенденции (значение P между $0,05$ и $0,10$) к увеличению её активности в условиях пролонгированной гипергликемии.

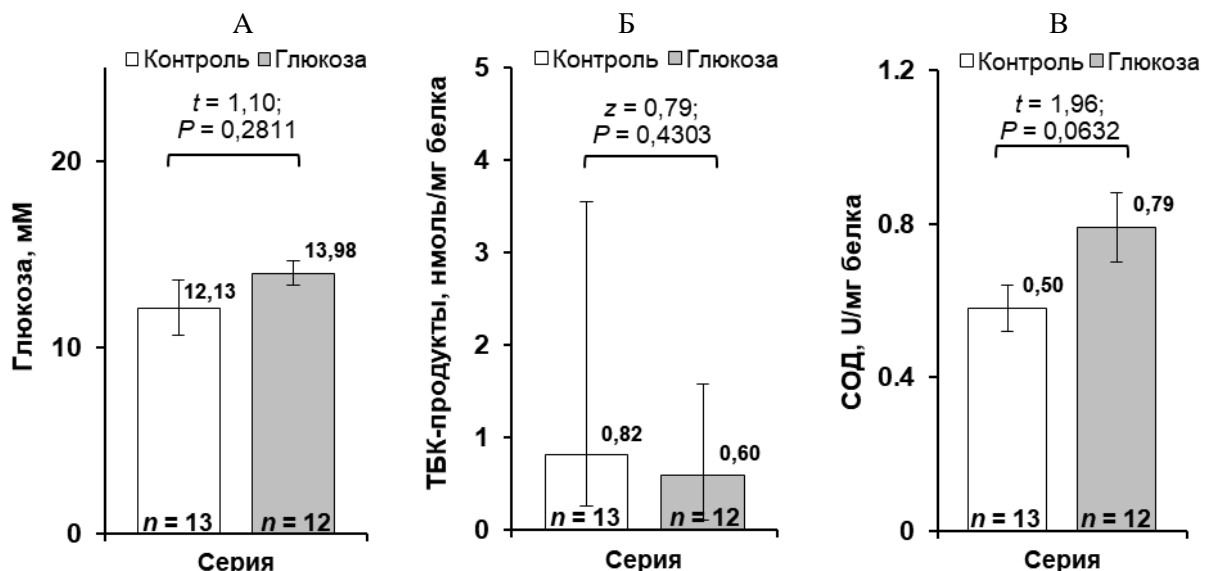


Рис. 2. Содержание глюкозы и характеристика антиокислительной системы в препаратах изолированной ЦНС *Lymnaea stagnalis* в норме (контроль) и в условиях пролонгированной гипергликемии (глюкоза). Светлые столбики – контрольная, серые – опытная группы. Приведены значения исследованных показателей (числа над столбиками) и количество проб (n) для каждой серии. Для всех пар сравнения контрольной и опытной групп указано значение z (U -критерий Манна-Уитни, непараметрическое распределение) или t -критерия Стьюдента (нормальное распределение) для независимых групп и уровня значимости P . А – концентрация глюкозы, Б – уровень ТБК-продуктов, В – активность супероксиддисмутазы (СОД)

Практическая неизменность редокс равновесия в клетках нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis* в условиях гипергликемии может быть следствием наличия в них хорошо развитой системы антиокислительной защиты [19]. Известно, что многие нейроны прудовика содержат ретиноиды [20], чьи антиоксидантные свойства препятствуют быстрому нарастанию содержания свободно-радикальных форм кислорода в случае интенсификации окислительных процессов в митохондриях, вследствие увеличения внутриклеточной концентрации глюкозы. Стоит отметить, что уровень глюкозы в нервных ганглиях прудовика (около 10 мМ) многократно, почти на два порядка, превышает таковой в омывающей их гемолимфе (0,1–0,2 мМ) [14, 21]. Даже в случае отмеченных колебаний содержания глюкозы в гемолимфе, в зависимости от характера питания [15], её концентрация, по видимому, редко превышает значение в 5 мМ [22], что меньше аналогичного показателя в нервной ткани, а, следовательно, не может рассматриваться как фактор, способный

качественно повлиять на концентрационные градиенты и потоки этого нутриента через мембрану нервных клеток. В этой связи, первостепенное значение для реализации эффектов гипергликемии в отношении нервных клеток, а через них и в отношении других систем организма, приобретают сигнальные свойства молекулы глюкозы. В частности, глюкозозависимая избирательная активация преимущественно пептид-содержащих клеток ЦНС *Lymnaea stagnalis*, приводит к выработке как инсулин-подобных пептидов [5, 23] и нормализации уровня глюкозы в интерстиции, так и других регуляторных молекул, обеспечивающих утилизацию «избытка» глюкозы за счёт интенсификации процессов роста и размножения моллюсков [24], определяя формирование специфического поведенческого паттерна.

Заключение. Многократное, пролонгированное (часы) увеличение содержания глюкозы в интерстиции не приводит к накоплению АФК в цитозоле клеток нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis* и не изменяет базовые характеристики их антиокислительной системы. Можно предположить, что сигнальные эффекты глюкозы в отношении нейронов обусловлены прямым её действием на транспортные свойства мембраны, определяющие изменение возбудимости клеток.

Литература:

- [1]. Mayer J. Glucostatic mechanism of regulation of food intake // N. Engl. J. Med. 1953. Vol. 249. P. 13–16.
- [2]. López-Gambero A.J., Martínez F., Salazar K., Cifuentes M., Nualart F. Brain glucose-sensing mechanism and energy homeostasis // Mol. Neurobiol. 2019. Vol. 56. P. 769–796.
- [3]. Levin B.E. Neuronal glucose sensing: still a physiological orphan? // Cell Metab. 2007. Vol. 6. P. 252–254.
- [4]. Oh Y., Lai J.S., Mills H.J., Erdjument-Bromage H., Giammarinaro B., Saadipour K., Wang J.G., Abu F., Neubert T.A., Suh G.S. A glucose-sensing neuron pair regulates insulin and glucagon in Drosophila // Nature. 2019. Vol. 574. P. 559–564.
- [5]. Kits K.S., Bobeldijk R.C., Crest M., Lodder J.C. Glucose-induced excitation in molluscan central neurons producing insulin-related peptides // Pflugers Arch. 1991. Vol. 417. P. 597–604.
- [6]. Lee C.Y., Dallérac G., Ezan P., Anderova M., Rouach N. Glucose Tightly Controls Morphological and Functional Properties of Astrocytes // Front Aging Neurosci. 2016. Vol. 8:82.
- [7]. Mergenthaler P., Lindauer U., Dienel G.A., Meisel A. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function // Trends Neurosci. 2013. Vol. 36. P. 587–597.
- [8]. Harris J.J., Jolivet R., Attwell D. Synaptic energy use and supply // Neuron. 2012. Vol. 75. P. 762–777.
- [9]. Kang L., Routh V.H., Kuzhikandathil E.V., Gaspers L.D., Levin B.E. Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons // Diabetes. 2004. Vol. 53. P. 549–559.
- [10]. Holmström K.M., Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2014. Vol. 6. P. 411–421.
- [11]. Patel R., Sesti F. Oxidation of ion channels in the aging nervous system // Brain Res. 2016. Vol. 1639. P. 174–185.
- [12]. Sidorov A.V., Shadenko V.N. Electrical activity of identified neurons in the central nervous system of a mollusk *Lymnaea stagnalis* under acute hyperglycemia // J. Evol. Biochem. Physiol. 2021. Vol. 57. P. 1257–1266.
- [13]. Dyakonova V., Hernádi L., Ito E., Dyakonova T., Zakharov I., Sakharov D. The activity of isolated snail neurons controlling locomotion is affected by glucose // Biophysics. 2015. Vol. 11. P. 55–60.
- [14]. Shadenko V.N., Sidorov A.V. Antioxidative defense in the hepatopancreas and nerve ganglia of the mollusk *Lymnaea stagnalis* after acute experimental hyperglycemia // J. Evol. Biochem. Physiol. 2020. Vol. 56, № 3. P. 235–242.
- [15]. Veldhuijzen J.P. Effects of different kinds of food, starvation and restart of feeding on the haemolymph-glucose of the pond snail *Lymnaea stagnalis* // Neth. J. Zool. 1974. Vol. 25. P. 89–102.
- [16]. Kostyuk V.A., Potapovich A.I. Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple assay for determination of superoxide dismutase // Biochem. Int. 1989. Vol. 19. P. 1117–1124.
- [17]. Костюк В.А., Потапович А.И. Определение продуктов перекисного окисления липидов с помощью триобарбитуловой кислоты в анаэробных условиях // Вопр. мед. химии. 1987. Т. 33. С. 115–118.
- [18]. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
- [19]. Sidorov A.V., Maslova G.T. State of antioxidative protection in central nervous ganglia of the mollusk *Lymnaea stagnalis* at modulation of activity of the NO-ergic system // J. Evol. Biochem. Physiol. 2008. Vol. 44, № 5. P. 435–441.
- [20]. Dmetrichuk J.M., Carlone R.L., Jones T.R., Vesprini N.D., Spencer G.E. Detection of endogenous retinoids in the molluscan CNS and characterization of the trophic and tropic actions of 9-cis retinoic acid on isolated neurons // J. Neurosci. 2008. Vol. 28. P. 13014–13024.

- [21]. Шаденко В.Н., Сидоров А.В. Концентрация глюкозы в органах и тканях моллюска *Lymnaea stagnalis* в норме и в условиях экспериментальной гипергликемии // Новости мед.-биол. наук (News of Biomed. Sci). 2019. Т. 19, № 2. С. 12–17.
- [22]. Scheerboom J.E.M., Hemminga M.A., Doderer A. The effects of a change of diet on consumption and assimilation and on the haemolymph-glucose concentration of the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L) // Proc. Kon. Ned. Akad. Wet., Ser C. 1978. Vol. 81. P. 335–346.
- [23]. Li K.W., Geraerts W.P., van Loenhout H., Joosse J. Biosynthesis and axonal transport of multiple molluscan insulin-related peptides by the neuroendocrine light green cells of *Lymnaea stagnalis* // Gen. Comp. Endocrinol. 1992. Vol. 87. P. 79–86.
- [24]. Geraerts W.P.M. Neurohormonal control of growth and carbohydrate metabolism by the light green cells in *Lymnaea stagnalis* // Gen. Comp. Endocrinol. 1992. Vol. 86. P. 433–444.

Поступила в редакцию: 12.01.2022 г.

A.V. SIDOROV¹, V. N. SHADENKO^{1,2}

MAINTENANCE OF REDOX BALANCE IN THE CELLS WITHIN NERVE GANGLIA OF THE MOLLUSK *LYMNAEA STAGNALIS* AT PROLONGED EXPERIMENTAL HYPERGLYCEMIA

¹*Belarusian State University, Minsk, Belarus;*

²*Republican Research and Practice Center for Mental Health, Minsk, Belarus*

Summary

Using a fluorescent probe (2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate), it was found that incubation of *Lymnaea stagnalis* nerve ganglion cells in 10 mM D-glucose solution does not lead to the accumulation of reactive oxygen species (ROS) in their cytoplasm for 1 hour after exposure. Prolonged, over 2 hours, experimental hyperglycemia does not change the activity of superoxide dismutase, the content of TBA-reactive products and the concentration of glucose in homogenates of the central nervous ganglia. It is assumed that the well-developed system of antioxidant defense of *Lymnaea stagnalis* CNS determines the possibility of using glucose as a specific signaling molecule in relation to neurons of non-feeding network.

Key words: glucose; reactive oxygen species; redox balance; nervous system; invertebrates