

ПЕРОКСИД ВОДОРОДА ВЫЗЫВАЕТ ИЗБИРАТЕЛЬНУЮ ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В НЕЙРОНАХ ВИСЦЕРАЛЬНОГО ГАНГЛИЯ МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS*

Сидоров А. В.

*Белорусский государственный университет
Минск, Беларусь*

Введение. Пероксид водорода рассматривается как активный участник процессов внутри- и межклеточной коммуникации. Источником его образования служат процессы восстановления супероксид-аниона, побочного продукта окислительного фосфорилирования энергетических субстратов в митохондриях. Высокий уровень обменных процессов в нервных клетках, относительная устойчивость пероксида водорода в интерстициальном пространстве, способность легко проходить через липидный бислой мембран, делает данную молекулу одним из универсальных сигнальных агентов, вовлечённых в обеспечение объёмной передачи сигнала. Последующее превращения пероксида водорода в реакции Фентона (в присутствии ионов Fe^{2+}) приводит к генерации гидроксильного радикала, чрезвычайно реакционноспособной молекулы, свободно-радикальной природы, мишени действия которой весьма разнообразны. Развитая антиоксидантная система защиты нервных клеток способна существенно ограничивать эффекты активных форм кислорода (АФК). Одним из её пассивных компонентов служат различные пигментные соединения, разрывающие цепь свободно-радикальных превращений, нейтрализуя АФК [1].

В составе центральных ганглиев моллюска *Lymnaea stagnalis* находятся многочисленные, крупные, ярко окрашенные нейроны, различия в окраске между которыми (от белого до ярко оранжевого) обусловлены наличием/отсутствием различных каротиноидов [2]. В сочетании с развитой ферментативной системой антиоксидантной защиты ЦНС, это позволяет как использовать соединения свободно-радикальной природы (монооксид азота) в качестве сигнальных молекул, так и противостоять окислительному стрессу, развивающимся под влиянием самых разнообразных факторов, включая действие загрязнителей окружающей среды [3]. Логично предположить, что в условиях физиологической и/или патологической продукции свободных радикалов, способность к генерации АФК в клетках нервных ганглиев будет различаться в зависимости от содержания в них нейропигментов. Ожидается, что нейроны белого (светло-оранжевого) цвета будут характеризоваться более интенсивной продукцией АФК при действии умеренных окислителей, по сравнению с клетками насыщенно-оранжевого цвета.

Цель. Работы была экспериментальной проверка высказанной гипотезы.

Методы исследования. Использовали взрослых, с высотой раковины не менее 40 мм, животных ($n=4$), содержащихся в стандартных условиях аквакультуры (не менее 1 л воды на особь, питание *ad libitum* листьями салата). Препарат тотальной ЦНС моллюска, очищенной от окружающей его соединительной ткани, фиксировали на дне покрытой силгардом чашки Петри посредством тонких препаративных игл, полностью погружённым в нормальный раствор Рингера для *Lymnaea* (в mM: NaCl – 44; KCl – 1,7; CaCl₂ – 4; MgCl₂ × 6 H₂O – 1,5; HEPES – 10; pH 7,5). Образование АФК в клетках дорсальной поверхности непарного висцерального ганглия оценивали с использованием флуоресцентного зонда (2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат, DCFDA), который добавляли в омывающий препарат раствор в конечной концентрации 1 мкМ за 30 мин до начала эксперимента. Окислительный стресс инициировали добавлением к препарату ЦНС пероксида водорода в конечной концентрации 1 mM (предварительно проводили 5-ти кратную смену раствора Рингера для удаления следов не проникшего в клетку флуоресцентного зонда). Флуоресценцию клеток нервных ганглиев фиксировали посредством цифровой камеры UCMOS05100KPA (Altamir, Россия) совмещенной с флуоресцентным бинокулярным стереомикроскопом NSZ 818FL (Nexcore, КНР), используя набор светофильтров: EX BP 450-490, BS FT 510, EM BP 515–565. Оценку препаратов проводили в течение 60 мин после нанесения пероксида водорода. Для обработки полученных изображений, оценки интенсивности флуоресценции, использовали возможности программы ImageJ (NIH, США).

Результаты и их обсуждение. Непарный висцеральный ганглий содержит крупные кластеры пептидергических нейронов [4], умеренно-оранжевого (Е-, F- и G-группы) и белого (Y-cells) цвета, вовлечённых в контроль кардиореспирации или относящихся к нейросекреторным, контролирующим водный обмен клеткам соответственно (рисунок). Кроме того, в его составе идентифицируется ключевой нейрон центрального генератора дыхательного ритма – VD4 (белой окраски, содержит FMRFамид), отвечающий за тормозную фазу респираторного цикла. Аппликация пероксида водорода приводит к развитию флуоресценции избирательно в нейронах дорсальной поверхности ганглия. Наибольшая интенсивность свечения, достигающая максимума к 5-10 мин после приложения пероксида водорода и затем прогрессивно снижающаяся, была отмечена в отношении клеток F-группы. Образование АФК в клетках Е- и G-групп, а также нейроне VD4, происходило с задержкой, достигая максимума к 10-15 мин после воздействия, после чего интенсивность флуоресценции существенно снижалась (к 30 мин). Флуоресценция клеток Y-кластера (белого цвета), равно как и крупных нейронов, расположенных на переднем и заднем полюсах ганглия, отражающая продукцию в них АФК, выявлена не была.

Полученные данные позволяют утверждать, что наличие в цитоплазме нервных клеток пигментных гранул способно оказать влияние на генерацию АФК и, потенциально, развитие в них окислительного стресса. Вместе с тем,

возможность образования АФК, как с качественной, так и количественной точек зрения, определяется не только характером пигментации нейрона, что подкрепляется данными об отсутствии свечения клеток Y-кластера. Более того, отличия фиксируются и среди нейронов флуоресцирующего пула, как в плане динамики процесса, так и его интенсивности, что может быть отражением различий, обусловленных размерами клеток, типом используемого медиатора, функциональной специфичности и т.п., как это отмечалось ранее в отношении изолированных нейронов *Lymnaea* [4].

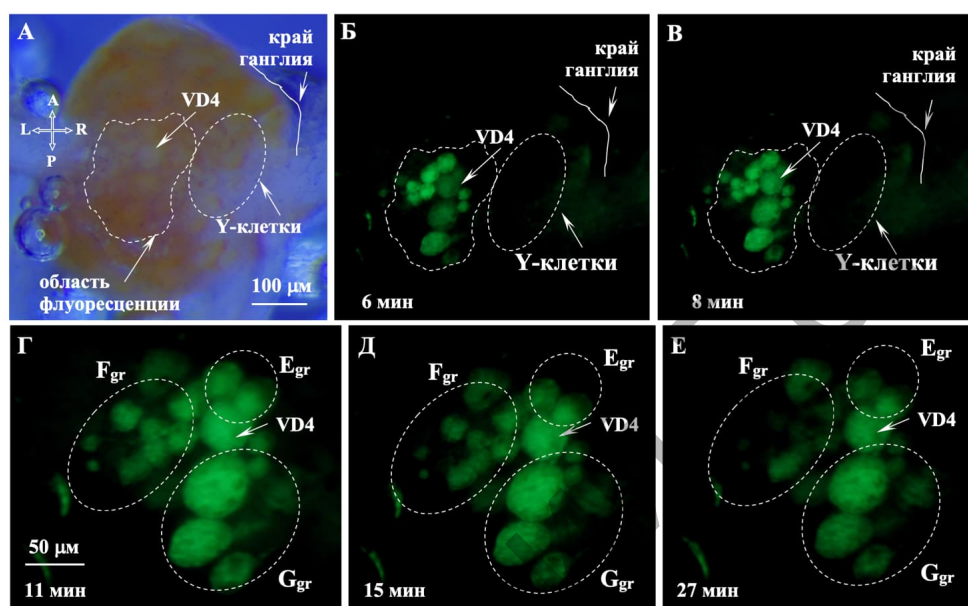


Рисунок – Генерация АФК в идентифицированных нейронах висцерального ганглия *Lymnaea stagnalis* в ответ на действие пероксида водорода

Указано расположение идентифицированных нейронов и границы нейронных кластеров (пунктирные овалы); области флуоресценции (неровная пунктирная линия); время, прошедшее после аппликации пероксида водорода (Б–Е); калибровочные линии даны отдельно для верхнего и нижнего ряда фотографий. А – нормальное изображение, Б–В – флуоресцентное изображение после аппликации пероксида водорода, Г–Е – изменение флуоресценции в выделенной области ганглия с течением времени

Выводы. Пигментные включения модифицируют процессы генерации АФК в цитоплазме клеток нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis*, что может лежать в основе избирательной устойчивости нейронов к окислительному стрессу.

Работа выполнена в рамках ГПНИ «Конвергенция-2030».

ЛИТЕРАТУРА

1. Lee, K. H. Neuroprotective effect of antioxidants in the brain / K. H. Lee, M. Cha, B. H. Lee // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – Vol. 21, № 19. – P. 7152.
2. Puzatkina, E. A. On correlation of carotenoid concentration with abilities for involvement of anaerobic respiration in molluscs *lymnaea stagnalis* and *unio pectorum* / E. A. Puzatkina, B. I. Kolupaev // J. Evol. Biochem. Phys. – 2000. – Vol. 36, № 1. – P. 85-87.

3. Sidorov, A. V. Neuromodulatory effects of hydrogen peroxide on central neurons in the feeding network of the mollusc *Lymnaea stagnalis* / A. V. Sidorov // J. Evol. Biochem. Physiol. – 2017. – Vol. 53, № 6. – P. 493-500.
4. Benjamin, P. R. Peptidergic Systems in the Pond Snail *Lymnaea*: From Genes to Hormones and Behavior / P. R. Benjamin, I. Kemenes // Advances in Invertebrate (Neuro)Endocrinology / eds.: S. Saleuddin, A. B. Lange, I. Orchard. – New York : Apple Academic Press, 2020. – Ch. 7. – P. 213-254.
5. Харитонов, В. Р. Особенности накопления активных форм кислорода в первичной культуре нервных клеток *Lymnaea stagnalis* / В. Р. Харитонов, А. В. Сидоров // Журнал Белорусского государственного университета. Биология. – 2021. – № 1. – С. 28-38.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА КИСЛОРОДТРАНСПОРТНУЮ ФУНКЦИЮ ЭРИТРОЦИТОВ

Слатинская О. В.¹, Приезжев А. В.¹, Зинчук В. В.²,
Луговцов А. Е.¹

¹Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова
Москва, Россия

²Гродненский государственный медицинский университет
Гродно, Беларусь

Введение. Нарушения оксигенации тканей лежат в основе патогенеза широкого спектра заболеваний. Кислородтранспортная функция (КТФ) крови определяется способностью гемоглобина (Гб) связывать и высвобождать O₂ при взаимодействии эритроцитов с другими клетками, компонентами плазмы и клетками сосудов [1]. Низкоинтенсивное переменное магнитное поле (ПМП) (300 мТл, 20 Гц) рассматривается как перспективный немедикаментозный метод коррекции гипоксических состояний, однако молекулярные механизмы его воздействия на Гб и эритроциты изучены недостаточно.

Цель. Оценить влияние кратковременного воздействия ПМП на КТФ эритроцитов и конформационные изменения Гб *in vitro*.

Методы исследования. Эритроциты крыс и людей подвергали воздействию ПМП (300 мТл, 20 Гц) на протяжении 2, 6 и 30 минут. КТФ оценивали по показателю p₅₀ кривой диссоциации оксигемоглобина [2], содержание нитрат/нитритов оценивали с помощью реактива Грисса [3], конформацию Гб оценивали методом спектроскопии комбинационного рассеяния (КР).

Результаты и их обсуждение. Воздействие ПМП на эритроциты *in vitro* приводило к значимому снижению сродства Гб к кислороду: зарегистрирован сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина вправо p₅₀_{реал} на 33,2% (p<0,05), независимо от наличия лейкоцитов и тромбоцитов в пробе (изотонический раствор или плазма крови). Данный эффект сопровождался активацией