

УДК 57.044

## ИНДУКЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ У МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS* ПРИ ИНКУБАЦИИ ЖИВОТНЫХ В ВЫСОКОКОНЦЕНТРИРОВАННОМ РАСТВОРЕ ГЛЮКОЗЫ

**V. N. ШАДЕНКО<sup>1, 2)</sup>, A. V. СИДОРОВ<sup>1)</sup>**

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

<sup>2)</sup>Республиканский научно-практический центр психического здоровья,  
Долгиновский тракт, 152, 220053, г. Минск, Беларусь

Установлено, что двухчасовая инкубация моллюсков в 100 ммоль/л водном растворе глюкозы приводит к более чем 5-кратному возрастанию (с 0,17 (0,13; 0,24) до 1,30 (0,91; 1,37) ммоль/л) ее концентрации во внутренней среде (гемолимфе) улиток. Указанный эффект был кратковременным, значения показателя возвращались к исходному уровню (0,14 (0,10; 0,22) ммоль/л) уже через 2 ч после нормализации условий содержания животных (перемещение в чистую аквариумную воду), сохраняясь на этом уровне (0,20 (0,15; 0,29) ммоль/л) по прошествии суток. Использование 10 ммоль/л раствора глюкозы оказывается неэффективным для создания экспериментальной гипергликемии в гемолимфе *Lymnaea stagnalis*.

**Ключевые слова:** глюкоза; гемолимфа; беспозвоночные.

**Благодарность.** Работа выполнена в рамках проекта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б19-49).

## INDUCTION OF EXPERIMENTAL HYPERGLYCEMIA IN MOLLUSC *LYMNAEA STAGNALIS* AFTER ANIMAL'S INCUBATION IN HIGH-CONCENTRATED GLUCOSE SOLUTION

**V. N. SHADENKO<sup>a, b</sup>, A. V. SIDOROV<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Belarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

<sup>b</sup>Republican Research and Practice Center for Mental Health, 152 Dalhinaŭski Tract, Minsk 220053, Belarus

Corresponding author: A. V. Sidorov (sidorov@bsu.by)

We established that two hours' long exposition of molluscs in 100 mmol/L glucose water solution results in more than 5-fold (from 0.17 (0.13; 0.24) to 1.30 (0.91; 1.37) mmol/L) increase of its level in snail's haemolymph. This effect was short-term. No longer than 2 h after normalization of conditions (removal of animals in «pure» aquarium water)

### Образец цитирования:

Шаденко ВН, Сидоров АВ. Индукция экспериментальной гипергликемии у моллюска *Lymnaea stagnalis* при инкубации животных в высококонцентрированном растворе глюкозы. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;1:79–84.

<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-1-79-84>

### For citation:

Shadenko VN, Sidorov AV. Induction of experimental hyperglycemia in mollusc *Lymnaea stagnalis* after animal's incubation in high-concentrated glucose solution. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;1:79–84. Russian.  
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-1-79-84>

### Авторы:

**Виктория Николаевна Шаденко** – соискатель кафедры физиологии человека и животных биологического факультета<sup>1)</sup>, научный сотрудник лаборатории клинико-эпидемиологических исследований<sup>2)</sup>. Научный руководитель – А. В. Сидоров.

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

### Authors:

**Victoria N. Shadenko**, competitor at the department of human and animal physiology, faculty of biology<sup>a</sup> and researcher at the laboratory of clinical and epidemiological research<sup>b</sup>.  
*vika-st-18@list.ru*

**Alexander V. Sidorov**, doctor of science (biology), full professor; professor at the department of human and animal physiology, faculty of biology.  
*sidorov@bsu.by*

haemolymph glucose level return to the initial (0.14 (0.10; 0.22) mmol/L), being stable in next twenty-four hours (0.20 (0.15; 0.29) mmol/L). Glucose water solution (10 mmol/L) was ineffective in producing experimental hyperglycemia in haemolymph of *Lymnaea stagnalis*.

**Key words:** glucose; haemolymph; invertebrate.

**Acknowledgements.** This work supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant No. B19-49).

## Введение

Концентрация глюкозы во внутренней среде организма животных является одной из важнейших физиологических констант, определяющих его нормальное функционирование. Колебания уровня глюкозы (гипо- или гипергликемия разной степени выраженности, продолжительности и генеза) в интегриальном пространстве оказывают выраженное влияние на целый ряд физиологических систем, включая нервную [1]. С этих позиций, особенно в случаях кратковременного, быстропроходящего сдвига концентрации, молекулу глюкозы можно рассматривать в качестве сигнальной, т. е. выступающей в роли триггера ответных реакций на клеточном (нейронном) уровне.

При исследовании клеточных механизмов нервных функций широко используются различные модельные организмы, включая беспозвоночных, в том числе и пресноводный легочный моллюск *Lymnaea stagnalis* [2]. Для данной модели в целях оценки физиологического действия различных веществ (потенциальные нейромодуляторы, загрязнители окружающей среды и т. п.) применяются два основных методических подхода: инъекция препарата в полость цефалопедального синуса или инкубация животного в аквариумах, содержащих исследуемое вещество в определенной концентрации. В последнем случае возможное действие реализуется благодаря высокой проницаемости кожных покровов моллюсков для водорастворимых, относительно низкомолекулярных (~200 Да) молекул [3]. Такой подход видится более предпочтительным, поскольку не связан с нанесением травмы животному, хотя и не лишен ограничений, обусловленных растворимостью и устойчивостью препарата в воде, его высоким расходом и т. п.

Глюкоза является эндогенным компонентом внутренней среды моллюсков, активным участником углеводного обмена, а ее концентрация в гемолимфе может колебаться в широком диапазоне значений [4]. Поэтому «просто инкубация» животных в растворах глюкозы заданной концентрации не может гарантировать уравнивание ее содержания внутри организма (в гемолимфе) с таковым для внешней среды (раствор для инкубации). Сказанное явилось предпосылкой для разработки и верификации способа создания кратковременной экспериментальной гипергликемии у модельного нейробиологического объекта – моллюска *Lymnaea stagnalis*.

## Материалы и методы исследования

Моллюсков (*Lymnaea stagnalis*) собирали в мелких проточных водоемах (мелиоративные и водоотводные каналы) в осенний период. В лаборатории их содержали в аквариумах (на каждую особь приходилось не менее 1 л воды) при температуре ( $20 \pm 1$ ) °C. Смену воды проводили каждую неделю. Пищей служили листья салата (питание *ad libitum*). Использовали животных одинакового размерного класса, которые были разбиты на три равные по численности условные группы – контрольную и две экспериментальные, не отличающиеся друг от друга по своим морфометрическим показателям согласно дисперсионному анализу (см. таблицу).

**Морфологические показатели экспериментальных групп животных**  
**Morphological parameters of experimental groups of animals**

Группа моллюсков	Показатели	
	Высота раковины, см ( $H = 0,92$ ; $P = 0,6318$ )	Масса, г ( $H = 5,19$ ; $P = 0,0747$ )
1-я (контроль), $n = 13$	3,5 (3,3; 3,8)	2,1 (1,9; 2,4)
2-я (глюкоза, 10 ммоль/л), $n = 13$	3,6 (3,5; 4,0)	2,7 (2,4; 3,1)
3-я (глюкоза, 100 ммоль/л), $n = 13$	3,6 (3,3; 3,9)	2,6 (2,0; 3,3)

Примечание.  $H$  – критерий Крускала – Уоллиса (ANOVA);  $P$  – уровень значимости.

Моллюсков доставали из аквариумов их постоянного содержания, умеренной тактильной стимуляцией подошвы ноги животного вызывали реакцию полного втягивания тела в раковину (whole body withdrawal), сопровождающуюся выбросом части гемолимфы в объеме, достаточном для последующего определения концентрации глюкозы (не менее 100 мкл). Затем моллюсков возвращали в аквариум и оставляли в покое на 15 мин (до начала выдвижения из раковины и свободного перемещения). После этого животных переносили в 10-литровые аквариумы с заданными условиями инкубации, где они находились в течение 2 ч. Моллюски контрольной группы помещались в сосуды с чистой водой, а опытных групп – в аквариумы с 10 и 100 ммоль/л раствором глюкозы «ч. д. а.», приготовленным на отстоявшейся водопроводной воде. По окончании инкубации производили забор гемолимфы описаным выше способом у животных всех групп, предварительно ополоснув раковину и ногу моллюсков дистиллированной водой во избежание загрязнения пробы следами высококонцентрированного раствора глюкозы. Затем животных переносили в аквариумы их постоянного содержания. Забор проб гемолимфы повторяли еще дважды, по прошествии 2 и 24 ч после окончания инкубации.

Концентрацию глюкозы определяли глюкозооксидным методом (набор реагентов «Анализ Х», Беларусь). Измерения оптической плотности проводили на длине волн 520 нм (оптический путь 1 см) при 20 °C посредством спектрофотометра Cary 50 (Variant Inc., Австралия). Объем материала для анализа – 100 мкл, время инкубации с реагентом (1 мл) – 30 мин. В качестве стандарта использовали 100 мкл свежеприготовленного 1 ммоль/л раствора глюкозы. При оценке уровня глюкозы в гомогенатах тканей стенки тела (5 %, на основе дистиллированной воды) к 100 мкл такого материала предварительно добавляли 50 мкл 50 % трихлоруксусной кислоты. Связанный белок осаждали центрифугированием (6000 об/мин, 1 мин), а 100 мкл полученного супернатанта использовали для последующего анализа.

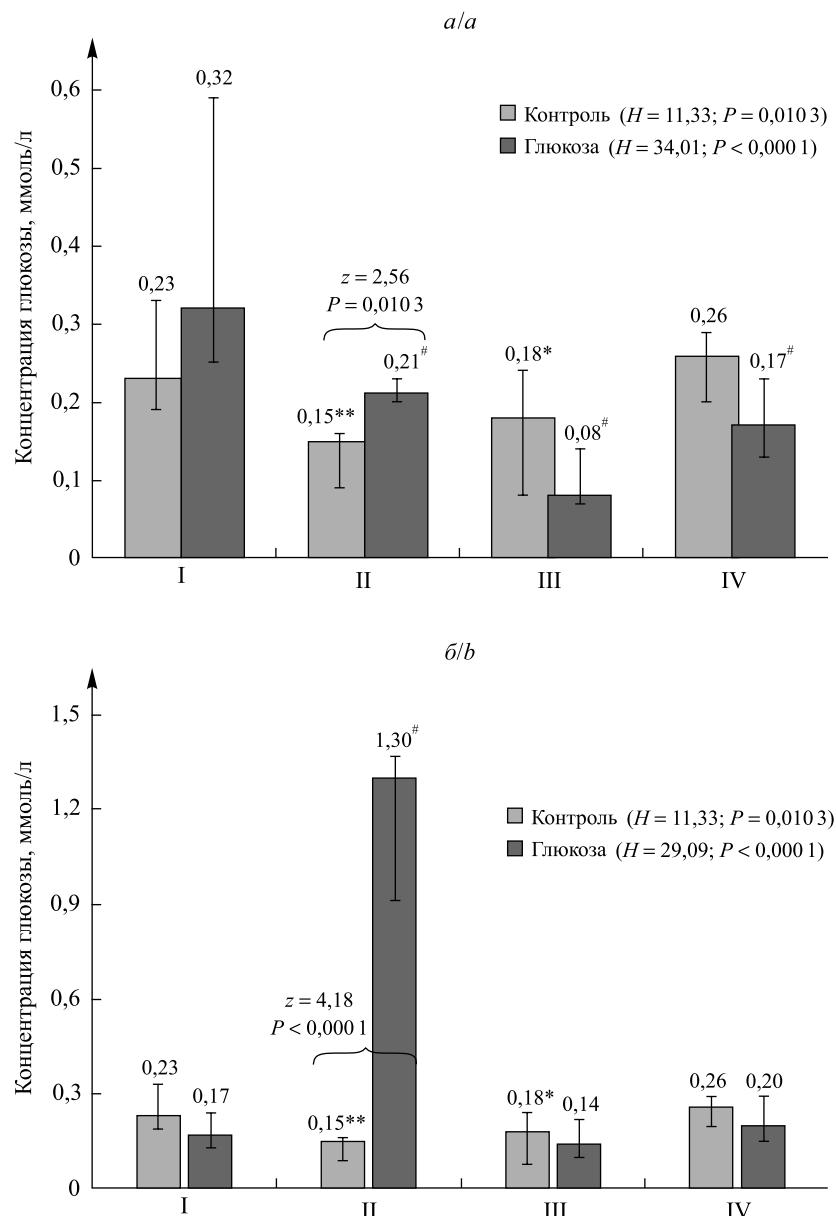
Экспериментальные данные, представленные в виде: медиана (верхний quartиль; нижний quartиль), обрабатывали общепринятыми методами медико-биологической статистики [5]. Для каждого ряда величин предварительно оценивали нормальность распределения при помощи *W*-теста Шапиро – Уилка. Поскольку таковая не была подтверждена для всех без исключения временных интервалов оценки уровня глюкозы каждой группы моллюсков, использовали непараметрические методы оценки. При сравнении нескольких независимых групп (моллюски не были снабжены индивидуальными метками, что не позволило отследить изменение показателя во все временные отрезки опыта индивидуально по каждой особи) применяли критерий Крускала – Уоллиса (*H*) для дисперсионного анализа (ANOVA) по однократной схеме, при сравнении двух независимых групп – *U*-критерий Манна – Уитни. Расчет степени изменения показателя производили на основании значений медианы. Данные обрабатывали посредством программы *Statistica 6.0*. Достоверными считались результаты при уровне значимости  $P < 0,05$ .

### Результаты исследований и их обсуждение

Анализ динамики уровня глюкозы в гемолимфе животных контрольной группы (рисунок) выявил статистически достоверное падение показателя по сравнению с исходной (до инкубации) оценкой, приходящееся на первое (сразу после инкубации) и последующее (спустя 2 ч) измерения, проведенные по завершении инкубации, – в 1,5 ( $z = 2,67; P = 0,0077$ ) и 1,3 ( $z = 2,10; P = 0,0355$ ) раза соответственно. Спустя 24 ч концентрация глюкозы в гемолимфе статистически достоверно не отличалась от первоначально измеренной. Схожее по направленности изменение наблюдалось и для животных, содержавшихся в 10 ммоль/л растворе глюкозы, – снижение оцениваемого показателя по сравнению с исходным для данной группы уровнем (см. рисунок *a*). Для измерения, проведенного спустя 2 ч после инкубации, была отмечена максимальная степень падения – в 4 раза ( $z = 4,14; P < 0,0001$ ). Непосредственно по завершении инкубации различия составили 1,5 раза ( $z = 3,65; P < 0,0001$ ), и даже по прошествии суток концентрация глюкозы в гемолимфе была ниже в 1,9 раза ( $z = 3,45; P < 0,0006$ ) по сравнению с начально оцененной для этой группы.

Отличная от описанной выше динамика рассматриваемого показателя отмечена для второй экспериментальной группы, животные которой содержались в 100 ммоль/л растворе глюкозы (см. рисунок *b*). Наблюдалось многократное, в 7,6 раза ( $z = 4,18; P < 0,0001$ ), возрастание уровня глюкозы по сравнению с исходным (до инкубации) значением, выявленное при анализе проб гемолимфы, полученных сразу после завершения инкубации моллюсков. В другие временные отрезки, спустя 2 и 24 ч после окончания экспериментального воздействия, значения показателя статистически достоверно не отличались от начального.

Дисперсионный анализ полученных данных по каждому временному отрезку эксперимента показал, что статистически значимые различия между группами животных присущи начальному (до инкубации) и непосредственно после завершения инкубации измерениям:  $H = 7,90$  ( $P = 0,0192$ ) и  $H = 28,31$  ( $P < 0,0001$ ) соответственно. Однако попарное сравнение показывает, что в первом случае статистическая



Уровень глюкозы в гемолимфе *Lymnaea stagnalis* при инкубации моллюсков в 10 ммоль/л (a) и 100 ммоль/л (b) растворе глюкозы:

I – до начала инкубации; II – сразу после инкубации;

III – через 2 ч после инкубации; IV – через 24 ч после инкубации.

Представлено значение показателя – медиана (числа над столбиками)

и интерквартильный размах (планки погрешностей).

Фигурная скобка отмечает статистически достоверные пары сравнения в одинаковый временной интервал (*U*-критерий Манна – Уитни). \**P* < 0,05, \*\**P* < 0,01, различия достоверны в контрольной группе по сравнению с исходным (до начала инкубации) значением показателя (*U*-критерий Манна – Уитни); <sup>#</sup>*P* < 0,001, различия достоверны в опытных группах по сравнению с исходным значением показателя (*U*-критерий Манна – Уитни). Приведено значение критерия Крускала – Уоллиса (*H*) для дисперсионного анализа по однофакторной схеме (K – W ANOVA) и соответствующего ему уровня значимости (*P*) для всех групп моллюсков

Glucose level in the haemolymph of *Lymnaea stagnalis* during incubation in 10 mmol/L (a) and 100 mmol/L (b) glucose solutions:

I – before incubation; II – immediately; III – 2 h after; IV – 24 h after incubation.

Experimental meaning – median (numbers above the columns) and lower and upper quartiles (error bars).

Bracket – significant for the same period of time (Mann – Whitney *U*-test). \**P* < 0,05, \*\**P* < 0,01, significant for control group in comparison with initial (before incubation) meaning (Mann – Whitney *U*-test);

<sup>#</sup>*P* < 0,001, significant for experimental groups in comparison with initial

meaning (Mann – Whitney *U*-test). Kruskal – Wallis ANOVA test (*H*) (K – W ANOVA) and corresponding significance level (*P*) presented for all groups of molluscs

значимость основана на различиях между двумя экспериментальными группами. При этом каждая из них по содержанию глюкозы в гемолимфе не отличалась от контрольной:  $z = 1,56$  ( $P = 0,1178$ ) и  $z = 1,36$  ( $P = 0,1742$ ) для моллюсков, содержавшихся в 10 и 100 ммоль/л растворах глюкозы соответственно. Напротив, в случае произведенного сразу после окончания инкубации измерения статистически достоверные отличия были определены по отношению к контрольной группе (см. рисунок). В оставшиеся временные интервалы (2 и 24 ч после окончания инкубации) различия между группами не носили статистически достоверного характера:  $H = 5,36$  ( $P = 0,0687$ ) и  $H = 3,02$  ( $P = 0,2210$ ) соответственно.

Полученные данные по исходному уровню глюкозы в гемолимфе *Lymnaea stagnalis* в целом совпадают с результатами работ, впервые затрагивающих вопросы подобного рода, согласно которым у непотребляющих пищу особей он составлял 30 мкг/мл [6], т. е.  $\sim 0,17$  ммоль/л. В нашем случае объединенное значение по исходным (до инкубации) данным для всех трех групп составило 0,24 (0,18; 0,23) ммоль/л. Наблюдаемый разброс величин во многом можно отнести на счет использования в работе моллюсков, питание и перемещение которых в пределах аквариумов осуществлялись без всяких ограничений. Известно, что уже само потребление пищи приводит к существенному увеличению концентрации глюкозы в гемолимфе – с 16 до 36 мкг/мл (т. е. с  $\sim 0,09$  до 0,20 ммоль/л) при сравнении голодных и активно питающихся особей *Lymnaea stagnalis* [4]. Длительное потребление богатых углеводами субстратов вызывает стойкое 5-кратное повышение содержания глюкозы во внутренней среде моллюсков – до 86 мкг/мл (т. е. 0,48 ммоль/л) [4]. Сезонные колебания уровня сахаров у *Lymnaea stagnalis*, связываемые с действием температурного фактора, свидетельствуют о падении уровня фруктозы и глюкозы в 35 и 12 раз соответственно в зимний период (гипобиоз, 4 °C) по сравнению с летне-осенним [7]. В сочетании с отмеченным при этом изменением поведения моллюсков [8] данный факт может служить указанием на нейромодуляторную роль молекул глюкозы по аналогии с охарактеризованной ранее ролью сдвигов кислотно-основного равновесия (pH) гемолимфы [9], в том числе и в отношении нейронных сетей мозга прудовика, не связанных с пищедобычей [10].

Наблюдаемая временная динамика исследуемого показателя у животных контрольной группы и содержащихся в 100 ммоль/л растворе глюкозы хорошо объяснима с позиций особенностей водного обмена у *Lymnaea stagnalis*. Количество выводимой за 1 ч воды равно почти 4-кратному весу тела животного при общем объеме гемолимфы (внеклеточной жидкости), составляющем  $\sim 45$  % массы моллюска, применительно к взрослым особям [11]. Период полувыведения из гемолимфы инъецированной глюкозы и вовсе равен 11 мин при 25 °C [12]. Поступление чистой воды в контрольных условиях эксперимента, призванное компенсировать общую потерю жидкости вследствие развития реакции полного втягивания тела в ходе забора проб, неизменно приведет к разбавлению содержимого внутренней среды моллюсков, т. е. к снижению концентрации глюкозы. При этом скорость поступления последней из клеточных депо оказывается недостаточной для быстрой компенсации отмеченных сдвигов уровня сахаров в гемолимфе. По схожей причине нормализация уровня глюкозы в гемолимфе отмечается уже по прошествии 2 ч после завершения инкубации моллюсков в 100 ммоль/л экспериментальном растворе глюкозы и последующего их возвращения в чистую аквариумную воду – за это время происходит почти 10-кратная полная смена объема гемолимфы.

Неожиданным было практическое полное отсутствие эффектов инкубации моллюсков в 10 ммоль/л растворе глюкозы, хотя такая концентрация превышает ее уровень во внутренней среде в  $\sim 50$  (!) раз. Да и в случае использования 100 ммоль/л раствора для инкубации, хоть и приводившего к многократному возрастанию концентрации глюкозы в гемолимфе, соотношение содержания глюкозы во внешней и внутренней среде было еще больше – примерно 75 : 1. Можно предположить, что данный факт обусловлен затрудненным проникновением глюкозы через покровы моллюска, поскольку скорость обменных процессов у холоднокровных, способных эффективно утилизировать углеводные субстраты, относительно невелика [13]. Эти затруднения могут быть связаны с повышенным, по сравнению с гемолимфой, содержанием глюкозы в тканях стенки тела прудовика, что может существенно ослабить диффузионные потоки глюкозы через означеный барьер. Для моллюсков контрольной группы, т. е. постоянно содержащихся в аквариумах с чистой водой, определенная в гомогенатах стенки тела концентрация глюкозы составила 18,19 (16,17; 21,27) ммоль/л при  $n = 12$  (соотношение с таковой для гемолимфы 75 : 1), что подтверждает приведенные выше рассуждения. Кроме того, такое различие концентраций, равно как и возможный сдвиг уровня в гемолимфе, лишний раз подчеркивает потенциальную нейромодуляторную роль глюкозы по отношению к нервным центрам моллюска в качестве неспецифического экстракорпорального фактора.

Таким образом, инкубация животных в высококонцентрированном (100 ммоль/л) растворе глюкозы может быть эффективной для развития острой кратковременной гипергликемии во внутренней среде

пресноводных моллюсков (*Lymnaea stagnalis*), что позволяет использовать данную методику для моделирования состояний измененного углеводного обмена и наблюдаемых модификаций нейронной и поведенческой активности животных.

## Библиографические ссылки

1. Tups A, Benzler J, Sergi D, Ladyman SR, Williams LM. Central regulation of glucose homeostasis. *Comprehensive Physiology*. 2017;7(2):741–764. DOI: 10.1002/cphy.c160015.
2. Сидоров АВ. *Функциональная активность нервных центров беспозвоночных*. Минск: БГУ; 2011.
3. Сидоров АВ, Маслова ГТ. Состояние антиокислительной защиты в центральных нервных ганглиях моллюска *Lymnaea stagnalis* при модуляции активности NO-ergicеской системы. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2008;44(5):453–458.
4. Veldhuijzen JP. Effects of different kinds of food, starvation and restart of feeding on the haemolymph-glucose of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Netherlands Journal of Zoology*. 1974;25(1):89–102. DOI: 10.1163/002829675X00146.
5. Glantz S. *Primer of Biostatistics*. New York: McGraw-Hill; 1994.
6. Friedl FE. Hemolymph glucose in the freshwater pulmonate snail *Lymnaea stagnalis*: Basal values and an effect of ingested carbohydrate. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A. Physiology*. 1971;39(4):605–610. DOI: 10.1016/0300-9629(71)90182-4.
7. Карапова МВ. Сезонные изменения содержания свободных редуцирующих углеводов жидкостей тела пресноводного моллюска *Lymnaea stagnalis*. *Известия Российской академии наук. Серия биологическая*. 2006;4:470–475.
8. Сидоров АВ. Влияние температуры на легочное дыхание, оборонительные реакции и локомоторное поведение пресноводного легочного моллюска *Lymnaea stagnalis*. *Журнал высшей нервной деятельности имени И. П. Павлова*. 2003;53(4):513–517.
9. Сидоров АВ, Полянина ИП. Кислотно-основное равновесие модулирует дыхательное и пищевое поведение моллюска *Lymnaea stagnalis*. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2003;39(5):445–450.
10. Alania M, Dyakonova V, Sakharov DA. Hyperpolarization by glucose of feeding-related neurons in snail. *Acta Biologica Hungarica*. 2004;55(1–4):195–200. DOI: 10.1556/ABiol.55.2004.1-4.24.
11. Van Aardt WJ. Quantitative aspects of the water balance in *Lymnaea stagnalis* (L.). *Netherlands Journal of Zoology*. 1967; 18(3):253–312. DOI: 10.1163/002829668X00018.
12. Veldhuijzen JP. Glucose-tolerance in the pond snail *Lymnaea stagnalis* as affected by temperature and starvation. *Netherlands Journal of Zoology*. 1974;25(2):206–218. DOI: 10.1163/002829675X00227.
13. Berg K, Jonasson PM, Ockelmann KW. Respiration of freshwater invertebrates. *Hydrobiologia*. 1962;19:1–39.

## References

1. Tups A, Benzler J, Sergi D, Ladyman SR, Williams LM. Central regulation of glucose homeostasis. *Comprehensive Physiology*. 2017;7(2):741–764. DOI: 10.1002/cphy.c160015.
2. Sidorov AV. *Funktional'naya aktivnost' nervnykh tsentrov bespozvonochnykh* [Nerve centers functional activity in invertebrates]. Minsk: Belarusian State University; 2011. Russian.
3. Sidorov AV, Maslova GT. State of antioxidative protection in central nervous ganglia of the mollusc *Lymnaea stagnalis* at modulation of activity of the NO-ergic system. *Zhurnal evolyutsionnoi biokhimii i fiziologii*. 2008;44(5):453–458. Russian.
4. Veldhuijzen JP. Effects of different kinds of food, starvation and restart of feeding on the haemolymph-glucose of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Netherlands Journal of Zoology*. 1974;25(1):89–102. DOI: 10.1163/002829675X00146.
5. Glantz S. *Primer of Biostatistics*. New York: McGraw-Hill; 1994.
6. Friedl FE. Hemolymph glucose in the freshwater pulmonate snail *Lymnaea stagnalis*: Basal values and an effect of ingested carbohydrate. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A. Physiology*. 1971;39(4):605–610. DOI: 10.1016/0300-9629(71)90182-4.
7. Karanova MV. Seasonal variation in the content of free reducing sugars in body fluids of freshwater mollusk *Lymnaea stagnalis*. *Izvestiya Rossiiskoi akademii nauk. Seriya biologicheskaya*. 2006;4:470–475. Russian.
8. Sidorov AV. [Effects of temperature on respiration, defensive behavior and locomotion of fresh water snail *Lymnaea stagnalis*]. *Zhurnal vysshei nervnoi deyatel'nosti imeni I. P. Pavlova*. 2003;53(4):513–517. Russian.
9. Sidorov AV, Polyanina IP. Acid-base balance modulates respiratory and alimentary behaviour of the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Zhurnal evolyutsionnoi biokhimii i fiziologii*. 2003;39(5):445–450. Russian.
10. Alania M, Dyakonova V, Sakharov DA. Hyperpolarization by glucose of feeding-related neurons in snail. *Acta Biologica Hungarica*. 2004;55(1–4):195–200. DOI: 10.1556/ABiol.55.2004.1-4.24.
11. Van Aardt WJ. Quantitative aspects of the water balance in *Lymnaea stagnalis* (L.). *Netherlands Journal of Zoology*. 1967; 18(3):253–312. DOI: 10.1163/002829668X00018.
12. Veldhuijzen JP. Glucose-tolerance in the pond snail *Lymnaea stagnalis* as affected by temperature and starvation. *Netherlands Journal of Zoology*. 1974;25(2):206–218. DOI: 10.1163/002829675X00227.
13. Berg K, Jonasson PM, Ockelmann KW. Respiration of freshwater invertebrates. *Hydrobiologia*. 1962;19:1–39.