

## ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ НЕРВНЫХ КЛЕТОК *LYMNAEA STAGNALIS*<sup>1</sup>

В. Р. ХАРИТОНОВА<sup>1), 2)</sup>, А. В. СИДОРОВ<sup>1)</sup>

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

<sup>2)</sup>Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,  
ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский район, Беларусь

С использованием флуоресцентного зонда 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата оценен характер накопления активных форм кислорода (АФК) в первичной культуре (72 и 144 ч) нейронов центральных ганглиев моллюска *Lymnaea stagnalis* в условиях острого, индуцированного окислительного стресса. Установлено, что клетки большего размера накапливают большее количество АФК, тогда как высокие значения относительной (на единицу площади) флуоресценции, свидетельствующие о возрастании количества АФК, приходящихся на единицу внутриклеточного пространства, характерны для более мелких нейронов 72-часовой культуры. Изменения относительной флуоресценции в нейронах 72- и 144-часовой культур с течением времени приобретают отличный друг от друга характер: для более возрастной культуры отмечена отрицательная, статистически достоверная взаимосвязь ( $R = -0,31$ ), а в отношении клеток 72 ч культивирования статистически достоверной корреляции выявлено не было ( $R = 0,12$ ). Предполагается, что обнаруженная взаимосвязь между размером (формой) нейрона и его способностью противостоять накоплению АФК в цитозоле указывает на различия в резистентности нейронов ЦНС к окислительному повреждению в зависимости от их позиции в нейронной сети, обеспечивая тем самым избирательную устойчивость нейронных функций в условиях окислительного стресса.

**Ключевые слова:** свободные радикалы; нейроны; флуоресцентные красители; клеточные культуры.

**Благодарность.** Работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований «Конвергенция-2020» (задание 3.10.2).

<sup>1</sup>Материал статьи представлен в виде доклада на Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», проводившейся в рамках XIV съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 17–19 июня 2020 г.).

### Образец цитирования:

Харитонова ВР, Сидоров АВ. Особенности накопления активных форм кислорода в первичной культуре нервных клеток *Lymnaea stagnalis*. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2021;1:28–38.  
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-28-38>

### For citation:

Haritonova VR, Sidorov AV. Peculiarities of reactive oxygen species accumulation in the primary culture of nerve cells of *Lymnaea stagnalis*. Journal of the Belarusian State University. Biology. 2021;1:28–38. Russian.  
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-28-38>

### Авторы:

**Валентина Ренальдовна Харитонова** – биолог группы цитогенетики клинко-диагностической лаборатории<sup>2)</sup>.  
**Александр Викторович Сидоров** – доктор биологических наук, профессор; профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

### Authors:

**Valentina R. Haritonova**, biologist at the group of cytogenetics, clinicodiagnostic laboratory<sup>2)</sup>.  
[haritonovavalentina20@gmail.com](mailto:haritonovavalentina20@gmail.com)  
<https://orcid.org/0000-0002-4244-1977>  
**Alexander V. Sidorov**, doctor of science (biology), full professor; professor at the department of human and animal physiology, faculty of biology.  
[sidorov@bsu.by](mailto:sidorov@bsu.by)  
<https://orcid.org/0000-0002-1711-7868>

## PECULARITIES OF REACTIVE OXYGEN SPECIES ACCUMULATION IN THE PRIMARY CULTURE OF NERVE CELLS OF *LYMNAEA STAGNALIS*

V. R. HARITONOVA<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>Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,  
43 Frunzienskaja Street, Baraŭliany 223053, Minsk district, Belarus

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

A fluorescent dye 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate was used to characterize an accumulation of reactive oxygen species (ROS) in the primary culture (72 and 144 h) of neurons of the central ganglia of the mollusc *Lymnaea stagnalis* under conditions of acute, induced oxidative stress. It was found that larger cells accumulate a greater amount of ROS. High values of the relative (per unit area) fluorescence, indicating an increase in the amount of ROS per unit of intracellular space, are characteristic of smaller neurons of 72-hour culture. Changes in relative fluorescence over time are different from each other in neurons of 72- and 144-hour cultures. For an older culture, a negative, statistically significant relationship was noted ( $R = -0.31$ ), and for cells of 72 h of cultivation, a statistically significant correlation was not found ( $R = 0.12$ ). It is assumed that the discovered relationship between the size (shape) of a neuron and its ability to resist the accumulation of ROS in the cytosol indicates differences in the resistance of CNS neurons to oxidative damage depending on their place and position in the neural network, thereby ensuring the selective stability of neuronal functions under conditions of oxidative stress.

**Keywords:** free radicals; neurons; fluorescence dyes; cell cultures.

**Acknowledgements.** This work was supported by state program for scientific research «Convergence-2020» (task 3.10.2).

### Введение

Активные формы кислорода (АФК) определяют течение целого спектра физиологических [1] и патофизиологических [2] процессов. Возрастание интенсивности окислительного фосфорилирования в электронтранспортной цепи митохондрий приводит к увеличению внутриклеточной концентрации АФК, являющихся побочным продуктом (супероксид-анион,  $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) данного процесса [3]. Высокая скорость потребления кислорода особенно характерна для клеток нервной ткани [4], а благодаря насыщенности синаптических окончаний митохондриями формируются дополнительные сайты, обеспечивающие продукцию АФК [5]. В результате такое широкое присутствие АФК в нейронах позволяет им выступать (в субтоксических концентрациях) в качестве передатчика процессов внутриклеточной сигнализации [6; 7], а с учетом относительно высокой проницаемости для них клеточных мембран – и в качестве агента межклеточной коммуникации [8; 9], модифицируя тем самым функциональную активность нервных клеток [10]. Физиологические эффекты АФК на субклеточном уровне, включая модуляцию экспрессии генов, преимущественно опосредованы  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимыми путями внутриклеточной сигнализации и фосфорилированием белков [7]. Очевидно, что адекватное использование АФК в качестве сигнальных молекул невозможно без развитой системы антиокислительной защиты (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидазы, водо- и жирорастворимые низкомолекулярные антиоксиданты), предотвращающей неконтролируемое повышение уровня свободных радикалов в клетке, которое может привести к ее гибели в ходе некроза или апоптоза [11]. Нейроны относительно чувствительны к окислительному стрессу [12], что лишний раз указывает на сигнальную роль АФК в нервной ткани [13]. С другой стороны, такая «уязвимость» к действию достаточно обычного компонента внутренней среды создает комплекс проблем для всего организма, принимая во внимание ведущую роль нервной системы в управлении его функциями и практическую невозможность или, по крайней мере, сильную ограниченность способности нейронов к восстановлению своего исходного числа посредством клеточных делений в ходе взрослого (*adult*) нейрогенеза.

Нервные клетки беспозвоночных характеризуются высокой степенью устойчивости к действию различных химических и физико-химических факторов [14; 15]. Вместе с тем по своим функциональным характеристикам, связанным со способностью к генерации, проведению и интеграции электрических сигналов, они демонстрируют поразительное сходство с нейронами высших позвоночных. Очевидно,

что понимание клеточных механизмов, определяющих такую резистентность, может быть использовано при разработке различных нейропротекторных средств, существенно повышающих вероятность нормального функционирования мозга в условиях стресса различного происхождения, в том числе и окислительного. Кроме того, нейроны беспозвоночных не уступают в разнообразии своих характеристик (морфологических, электрофизиологических, нейромедиаторных и т. п.) нервным клеткам позвоночных [16]. *Идентификация* (соотнесение той или иной клетки с позицией, занимаемой в нейронной сети, ее химизмом и системой связи с другими клетками) центральных нейронов массово применяется в отношении центральной нервной системы (ЦНС) ряда беспозвоночных, выступающих в роли модельных объектов нейробиологических исследований, включая и пресноводного легочного моллюска *Lymnaea stagnalis* (прудовик обыкновенный) [14]. Она также открывает перспективы для анализа взаимосвязи между различными морфофункциональными характеристиками нейронов. В частности, крупные (диаметр сомы свыше 100 мкм) нейроны центрального кольца ганглиев *L. stagnalis* – это в основном вставочные нейроны, в то время как мелкие (40–60 мкм) клетки относятся к двигательным [17], хотя такую зависимость нельзя считать универсальной даже для этого вида. В ганглиях, управляющих работой мышц буккальной массы, обеспечивающей движения радулы при пищедобыче, наиболее крупные клетки представлены мотонейронами [18]. Размеры клеток изменяются и в ходе онтогенеза: одни и те же нейроны у молодых животных характеризуются существенно меньшим диаметром сомы и более низкой степенью ветвления отростков по сравнению с клетками ЦНС более возрастных животных [19]. Однако, в какой степени размеры нейронов связаны с возможностью противостоять окислительному стрессу (и связаны ли вообще), отличается ли характер реакции клеток в условиях окислительного стресса в зависимости от их функциональных свойств, до конца не установлено.

Таким образом, целью данной работы было оценить взаимосвязь между морфологическими характеристиками (размером) и возрастом культивируемых нейронов моллюска *L. stagnalis* и их способностью накапливать и сохранять в цитоплазме АФК в условиях индуцированного кратковременного окислительного стресса.

### Материалы и методы исследования

В работе использовали моллюсков *L. stagnalis* лабораторного разведения с высотой раковины от 3,5 до 4,0 см и массой ( $3,0 \pm 0,5$ ) г. В лаборатории их содержали в аквариумах (на каждую особь приходилось не менее 1 л воды) при температуре ( $20 \pm 1$ ) °С. Смену воды осуществляли каждую неделю. Пищей служили листья салата (питание *ad libitum*).

**Первичная культура нервных клеток.** Первоначально удаляли раковину животного и производили разрез стенки тела, края разреза отводили и закрепляли с помощью препаровальных игл, после чего перерезали пищевод и протоки слюнных желез, а также все отходящие от ЦНС нервы и помещали изолированное таким образом центральное кольцо ганглиев в нормальный раствор Рингера (1 ЦНС на 1 мл раствора). Дальнейшие манипуляции с полученными препаратами ЦНС проводили в пределах ламинар-бокса. Сначала каждый препарат 30 с промывали в стерильном растворе Рингера ( $\text{NaCl} - 44,0$ ;  $\text{KCl} - 1,7$ ;  $\text{CaCl}_2 - 4,0$ ;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 1,5$ ;  $\text{HEPES} - 10,0$  ммоль/л,  $\text{pH } 7,60 \pm 0,05$ ) с добавлением антибиотика (смесь пенициллина и стрептомицина, 100 мкг/мл) в 4-кратной повторности, каждый раз используя новые стерильные эппендорфы со свежим раствором и стерилизуя держатель ЦНС (загнутая иголка) в пламени спиртовки. После этого с помощью стерильных пинцетов разрывали соединительнотканную оболочку ганглиев, механически высвобождая содержащиеся в них нейроны, и получали суспензию клеток в стерильном физиологическом растворе объемом 100 мкл (для 1 ЦНС). Полученную суспензию нейронов переносили в содержащие специальную среду чашки Петри и оставляли в темноте при температуре ( $20 \pm 1$ ) °С. Дальнейшие исследования выполнены на клетках 72- или 144-часовой (3 и 6 сут соответственно) культуры.

**Подготовка чашек Петри, используемые растворы и среды.** Дно стерильных пластиковых чашек Петри размером  $35 \times 10$  мм (*Sarstedt Group*, Германия) предварительно полностью покрывали 0,1 % раствором поли-L-лизина (*Sigma-Aldrich*, США). По прошествии 24 ч остатки раствора сливали и дважды промывали чашки дистиллированной водой. Затем поверхность дна обрабатывали раствором антибиотика (100 мкг/мл) в течение 1,5 ч, после чего его сливали и дважды промывали чашки дистиллированной водой. Далее чашки оставляли в ламинар-боксе при включенном ультрафиолете на 15 мин, подсушивая покрытую поли-L-лизином поверхность. Подготовленные чашки Петри (по [20] с модификациями) использовали для культивирования клеток не ранее чем через 3 сут после обработки.

Для культивирования клеток нервной системы *L. stagnalis* применяли модифицированную среду следующего состава: 50 % – среда Лейбовица L-15 (L5520 без глутамина, *Sigma-Aldrich*), 25 % –

концентрированный ( $\times 4$ ), за исключением NaCl, нормальный раствор Рингера (NaCl – 79,9; KCl – 6,7; CaCl<sub>2</sub> – 11,02; MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O – 6,0; HEPES – 40,0 ммоль/л, pH 7,60  $\pm$  0,05), 25 % – дистиллированная вода (по [20; 21] с модификациями). Дополнительно в среду добавляли 50 мкг/мл смеси антибиотиков (пенициллин и стрептомицин), 300 мг/мл глутамина и 0,3 ммоль/л глюкозы (конечная концентрация). Отсутствие в среде культивирования различных ростовых факторов компенсировали за счет использования кондиционированной среды (по [21] с модификациями). Для ее подготовки выделяли ЦНС по описанной выше методике и помещали их (не разрывая соединительнотканную оболочку ганглиев) в нормальную культуральную жидкость (см. выше) из расчета 4 ЦНС на 5 мл среды (всего 4 пробирки) на срок 72 ч при постоянном перемешивании и комнатной температуре ((20  $\pm$  1) °C). По окончании инкубации среду пропускали через антибактериальный фильтр, замораживали (–18 °C), используя по мере необходимости. Общий объем культуральной среды на 1 чашку Петри – 2 мл, из которых 1,8 мл приходится на нормальную, а 0,2 мл – на кондиционированную среду.

**Оценка накопления АФК, получение и анализ изображений.** Для оценки накопления АФК в цитоплазме использовали флуоресцентный краситель 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат (DCFDA,  $\lambda_{ex}$  = 501 нм,  $\lambda_{em}$  = 525 нм (максимумы), *Sigma-Aldrich*) в конечной концентрации 10 мкмоль/л. Зонд добавляли непосредственно к культуральной среде в чашки Петри, выдерживая их в темноте в течение 1 ч. По окончании инкубации среду с содержащимся в ней зондом удаляли, а чашки Петри с находящимися на подложке клетками дважды промывали свежим раствором Рингера (2 мл в течение 5 мин), после чего добавляли новую порцию раствора Рингера (2 мл), закрывали чашку металлической фольгой и использовали для последующего микроскопического исследования. Генерацию АФК в среде инкубации инициировали добавлением 1 ммоль/л перекиси водорода (конечная концентрация) к находящемуся в чашке Петри раствору Рингера, в который предварительно (за 15 мин) были добавлены FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O и ЭДТА (оба в конечной концентрации 10 мкмоль/л). Оценку динамики накопления АФК проводили в первые 20 мин наблюдения, до стабилизации уровня флуоресценции. Оценку остаточной флуоресценции осуществляли не ранее чем через 30 мин после добавления пероксида водорода в течение последующих 1–2 ч наблюдения.

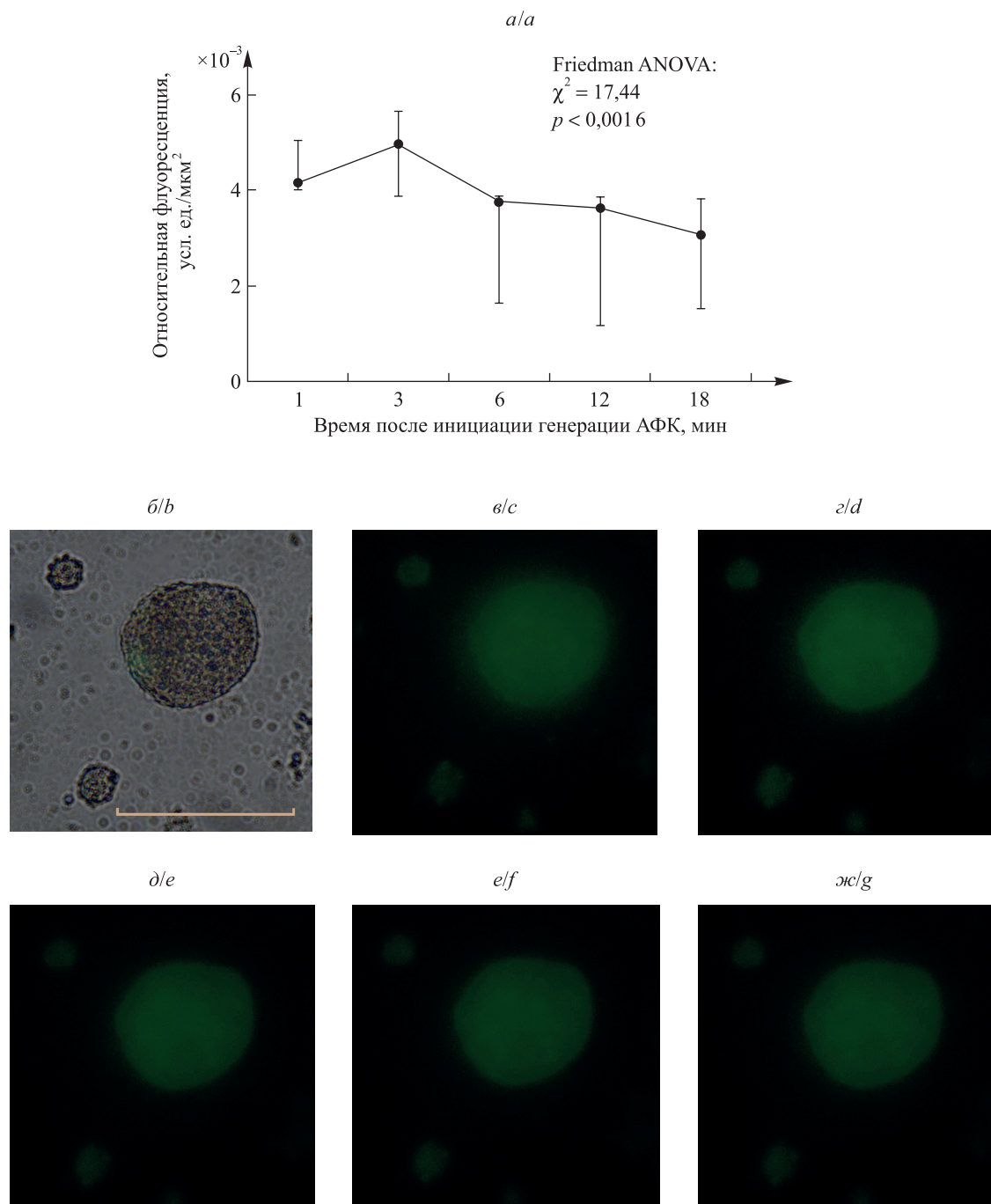
Клетки анализировали с помощью инвертированного эпифлуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse TS100F (входящий фильтр  $\lambda_{ex}$  = 450–490 нм, выходящий фильтр  $\lambda_{em}$  = 680 нм, дихроматическое зеркало – 505 нм) при 40-кратном увеличении объектива. Для последующей обработки и анализа полученных изображений использовали программу *ImageJ 1.50i* (*National Institute of Health*, США). Определяли площадь клеток (оптическое изображение), интенсивность флуоресценции (флуоресцентное изображение) оценивали по условному показателю – интенсивности серого цвета, приходящегося на область изображения, соответствующую занимаемому клеткой участку. Ввиду шумовой флуоресценции фона (подложки или раствора со следами зонда) на каждом изображении оценивали интенсивность серого цвета фона для пяти площадок, по площади соответствующих оптическому изображению клетки. Полученное среднее значение вычиталось из оцененной величины интенсивности для флуоресцентного изображения клетки. Относительную флуоресценцию определяли в пересчете на единицу площади клетки (1 мкм<sup>2</sup>). Калибровку полученных изображений выполняли с помощью объект-микрометра (цена деления 0,1 мм) и специальных возможностей программы *ImageJ*.

**Статистическая обработка.** Экспериментальные данные обрабатывали общепринятыми методами медико-биологической статистики [22]. Нормальность распределения для каждого ряда экспериментальных данных предварительно оценивали с помощью *W*-теста Шапиро – Уилка. Поскольку для основных исследованных показателей (площадь клеток, интенсивность флуоресценции) нормальность распределения не была подтверждена, использовали непараметрическую статистику. Данные представлены в виде: медиана (верхний; нижний квартили). Для оценки взаимозависимости оцениваемых показателей использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (*R*), для сравнения двух независимых групп применяли *U*-критерий Манна – Уитни (*Mann – Whitney U-test*, *z*), для множественного сравнения зависимых выборок – ранговый дисперсионный анализ (*Friedman ANOVA*). Число наблюдений (*n*) указано для каждой серии опытов отдельно. Данные обрабатывали посредством программы *Statistica 6.0* (*StatSoft Inc.*, США). Достоверными считались результаты при *p*  $\leq$  0,05.

## Результаты и их обсуждение

Динамика изменения относительной флуоресценции нейронов в краткосрочном периоде (20 мин после инициации реакции генерации АФК) представлена на рис. 1, а.

Первоначальное усиление интенсивности флуоресценции приходится на первые минуты после возрастания уровня АФК, а затем отмечается ее снижение, флуоресцентное свечение участков клетки остается практически неизменным на протяжении дальнейшего периода наблюдения (см. рис. 1, б–ж).



**Рис. 1.** Изменение флуоресценции культивируемых нейронов *L. stagnalis* после начала генерации АФК во внешней среде:  
*a* – изменение относительной флуоресценции клеток; *б–ж* – пример изменения флуоресценции в отдельных клетках (*б* – оптическое изображение; *в, г, д, е, ж* – флуоресцентное изображение, полученное через 1, 3, 6, 9 и 18 мин после инициации генерации АФК соответственно).  
Интенсивность флуоресценции в начальной точке времени (0 мин) условно принимали равной фоновой (не указано на графике). Калибровочная линия – 100 мкм

**Fig. 1.** Fluorescence in cultured *L. stagnalis* neurons after initiation of ROS generation:  
*a* – relative fluorescence of neurons; *b–g* – an example of fluorescence change in individual neurons (*b* – optical image; *c, d, e, f, g* – fluorescent image respectively obtained 1, 3, 6, 9 and 18 min after initiation of ROS generation).

The fluorescence intensity at the initial time point (0 min) was conventionally assumed to be equal to the background one (not indicated in the graph). Calibration bar – 100  $\mu\text{m}$

Установлено, что более крупные нейроны накапливают большее количество АФК. В частности, проведенный корреляционный анализ (рис. 2, а) выявил наличие относительно небольшой ( $R = 0,18$ ), но статистически достоверной ( $p = 0,0216$ ,  $t = 2,32$  при  $n = 169$ ) взаимосвязи между интенсивностью флуоресценции и размером клетки в отношении 72-часовой культуры клеток нервной системы *L. stagnalis*. Схожая тенденция была отмечена и для 144-часовой культуры: значение рангового коэффициента корреляции Спирмена ( $R$ ) составило 0,31 ( $p = 0,0002$ ,  $t = 3,81$  при  $n = 139$ ). Сравнение значений  $R$  для этих двух культур не дает оснований для вывода об их статистически значимых отличиях друг от друга ( $p = 0,2318$ ), что дополнительно подтверждает зависимость интенсивности флуоресценции от размера клеток для культур разного возраста. Вертикальное смещение линии тренда для 144-часовой культуры вверх по отношению к таковой для 72-часовой культуры (см. рис. 2, а) фактически отражает различия в размерах между нейронами этих двух культур и, следовательно, в интенсивности их флуоресценции. В частности, размер клеток 144-часовой культуры почти в 2 раза превышает аналогичный показатель для 72-часовой культуры (рис. 3, а). В то же время различия в интенсивности абсолютной флуоресценции были не столь велики: в 1,6 раза выше у 144-часовой культуры по сравнению с нейронами 72 ч культивирования (см. рис. 3, б).

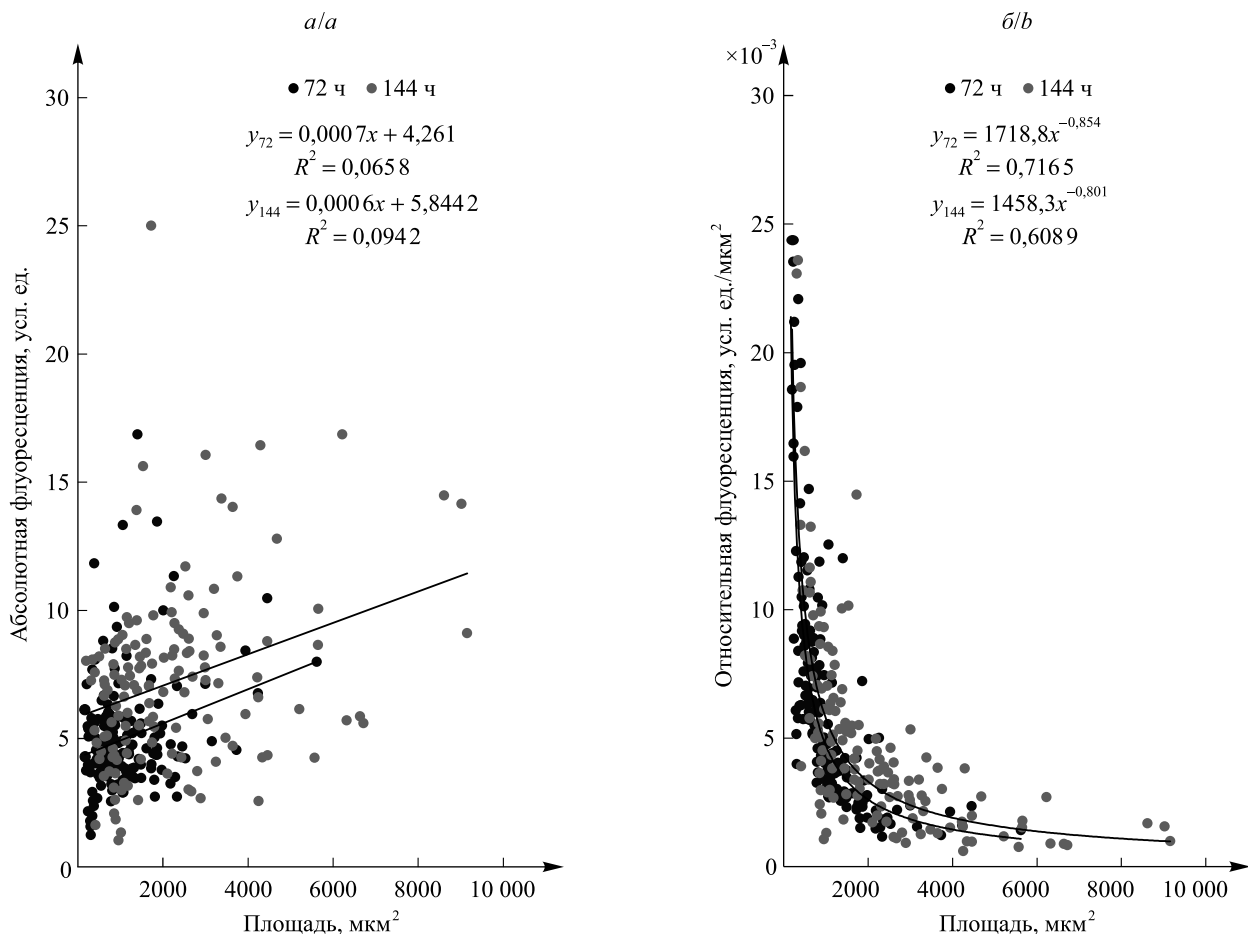


Рис. 2. Зависимость флуоресценции культивируемых нейронов *L. stagnalis* от размера клетки:  
а – абсолютная флуоресценция; б – относительная флуоресценция.

Представлены уравнения линий тренда (линейной (а) и степенной (б))  
и величина достоверности аппроксимации ( $R^2$ )

Fig. 2. Fluorescence of cultured *L. stagnalis* neurons in dependence on cell size:  
а – absolute fluorescence; б – relative fluorescence. Equations of trend lines (linear (а) and power-law (б))  
and the value of the approximation reliability ( $R^2$ ) are presented

Отличная ситуация складывается для относительной (на единицу площади) флуоресценции (см. рис. 2, б). Здесь речь идет о ее уменьшении при увеличении площади, занимаемой клеткой. Зависимость носит достоверный характер как для 72-часовой ( $R = -0,84$ ,  $p < 0,0001$ ,  $t = 20,01$  при  $n = 169$ ), так и для 144-часовой ( $R = -0,76$ ,  $p < 0,0001$ ,  $t = 13,64$  при  $n = 139$ ) культуры при статистически значимой ( $p = 0,0497$ ) разнице между определенными коэффициентами ранговой корреляции ( $R$ ). Другими словами, речь идет о снижении количества АФК, приходящихся на единицу внутриклеточного пространства,

у крупных клеток (рис. 4, в). При этом зависимость хорошо описывается степенной функцией, на что указывают относительно высокие (60 и более) значения достоверности аппроксимации. Поскольку в пределах 144-часовой культуры отмечается увеличение площади клеток, неудивительно, что значения относительной флуоресценции, определенные для составляющих ее клеток, были в 1,4 раза ниже аналогичного показателя для нейронов 72 ч культивирования (см. рис. 3, в). Однако даже в случае примерно равной площади клеток в нейронах 72-часовой культуры интенсивность флуоресценции была выше (ср. рис. 4, а и б).

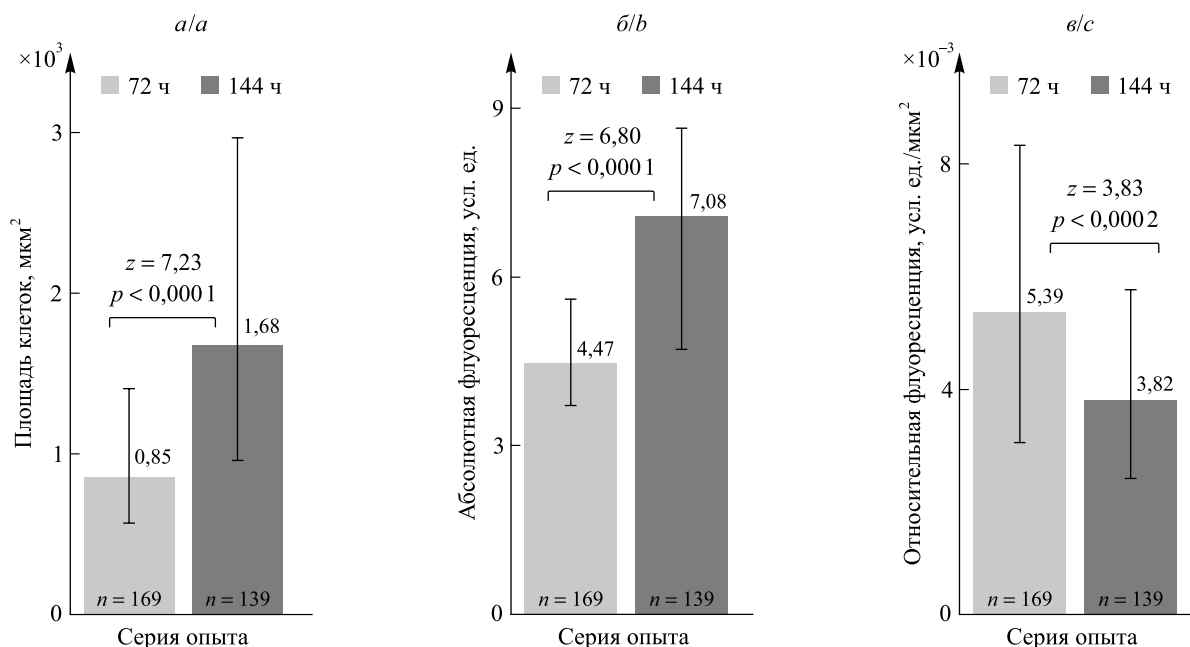


Рис. 3. Площадь клетки (а), абсолютная (б) и относительная (в) флуоресценция в культурах нейронов *L. stagnalis* разного возраста.

Представлено значение показателя – числа рядом со столбиками диаграммы (медиана) и планки погрешностей (интерквартильный размах). Приведены число исследованных нейронов (*n*) для каждой серии опыта, значение *U*-критерия Манна – Уитни (*z*) и соответствующий ему уровень значимости (*p*)

Fig. 3. Cell area (a), absolute (b) and relative (c) fluorescence in cultures of *L. stagnalis* neurons of different ages. Experimental meaning – numbers above the columns (median) and error bars (lower and upper quartiles). Number of observations (*n*) for each experimental group, meaning of Mann – Whitney *U*-test (*z*) and the corresponding significance level (*p*) are presented

Интересно, что изменения относительной флуоресценции с течением времени приобретают отличный (на основании сравнения коэффициентов ранговой корреляции *R* при  $p < 0,0001$ ) друг от друга характер в нейронах 72- и 144-часовой культур (рис. 5). Так, для клеток 72 ч культивирования не было обнаружено статистически достоверной корреляции между указанными показателями:  $R = 0,12$ ,  $p = 0,0910$ ,  $t = 1,70$  при  $n = 177$  (см. рис. 5, а). В то же время для более возрастной культуры была отмечена отрицательная, статистически достоверная взаимосвязь:  $R = -0,31$ ,  $p = 0,0002$ ,  $t = 3,84$  при  $n = 142$  (см. рис. 5, б). Такая зависимость может указывать на снижение уровня АФК с течением времени в более зрелых нейронах 144-часовой культуры при относительной сохранности содержания АФК в цитоплазме клеток 72 ч культивирования.

Размер и форма нервных клеток видятся критически значимыми для реализации ими своей важнейшей функции – генерации, передачи и интеграции нервных импульсов. В частности, давно известно, что такие основополагающие характеристики нейрона, как входное электрическое сопротивление и емкость клетки, определяющие значения постоянных времени и длины, зависят от размера и пространственной геометрии нейрона [23]: при одинаковой форме (например, сфера) у более мелких объектов входное сопротивление оказывается выше, а емкость ниже, чем у более крупных клеток. Принцип размера (*size principle*) [24], призванный объяснить различия в функциональных свойствах нейронов, впервые был отмечен в отношении нервных клеток спинного мозга: клетки малых размеров являются более возбудимыми по сравнению с более крупными нейронами. Уже отмечалось, что с возрастом размеры нервных клеток увеличиваются (характерно и для нейронов *L. stagnalis*). Диаметр сомы нейрона R.Рe.D.1 *L. stagnalis* значительно больше у животных старшей возрастной группы [19]. В результате у более мелких нейронов,

характерных для молодых особей, повышается входное сопротивление, но снижаются постоянная времени мембраны и ток реобазы, что и является основанием для утверждения о возрастании их возбудимости [25]. Соответственно, в ходе нормального (физиологического) старения возбудимость клетки снижается.

Наблюдаемые нами различия в занимаемой клетками площади у нейронов 72- и 144-часовой культур могут быть связаны с тем, что при более продолжительном культивировании нейронов они плотнее примыкают к субстрату и, расплываясь, покрывают большую поверхность подложки, т. е. округлая клетка принимает овальную форму при неизменности объема ее цитоплазмы. Однако тот факт, что зависимость интенсивности флуоресценции (абсолютной и относительной) от размера (площади) клетки была выявлена в популяции нейронов как 72-часовой, так и 144-часовой культуры (см. рис. 2), позволяет утверждать, что содержание АФК в цитоплазме (количество и плотность) зависит от линейных размеров нейрона. Интересно, что клетки, обнаруживающие тенденцию к формированию отростков, более интенсивно накапливают АФК (см. рис. 4, *г*). Это может указывать на меньшую устойчивость к свободнорадикальному повреждению у интенсивно пролиферирующих нейронов ЦНС *L. stagnalis* по аналогии с известными фактами в отношении клеток других видов [26; 27]. Модификация формы, в том числе связанная с интенсификацией роста окончаний клетки, в большей мере присуща молодым (менее крупным) нейронам, именно для таких клеток выявлено большее относительное содержание АФК в цитоплазме (см. рис. 3, *б*). Интересно, что для клеток 144-часовой культуры отмечено снижение относительной флуоресценции с увеличением времени, прошедшего после инициации реакции генерации АФК (использованная АФК-генерирующая смесь обеспечивает «пиковую» продукцию, прежде всего гидроксильного радикала, преимущественно в первые 15 мин, утрачивая свои способности по наработке новых порций АФК к 30 мин после запуска), что может указывать на активность систем

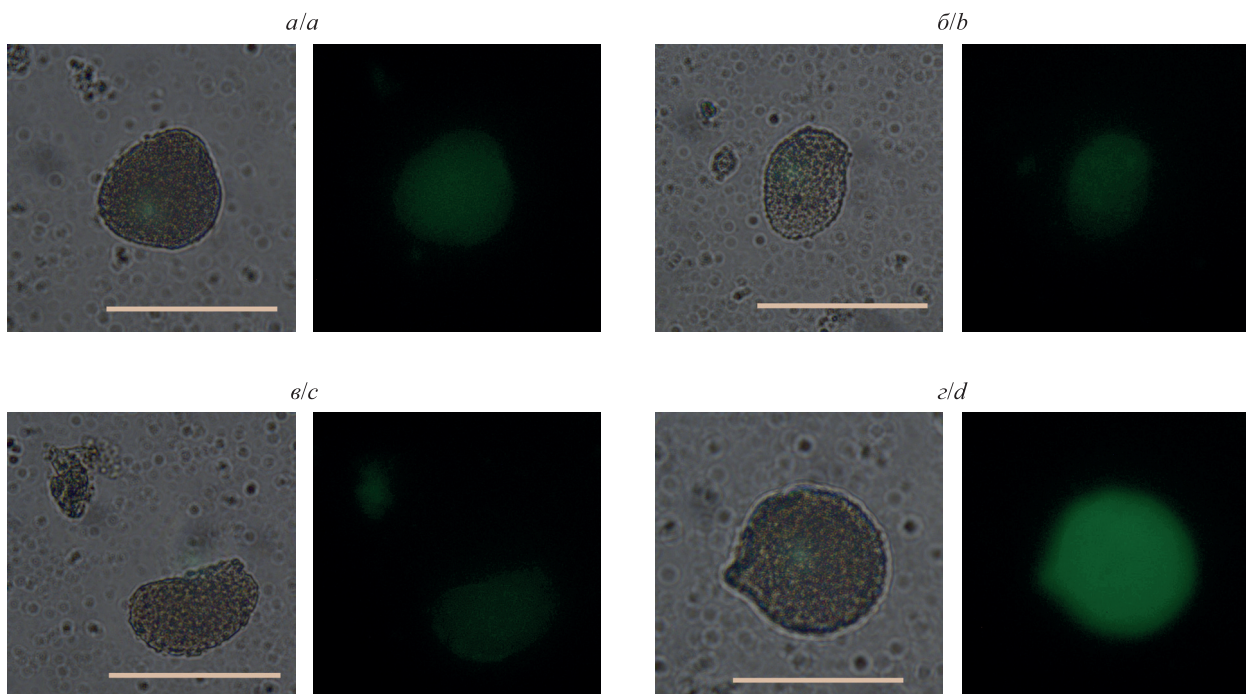


Рис. 4. Примеры флуоресценции клеток в культуре нейронов *L. stagnalis* после инициации генерации АФК во внешней среде: *а* – нейрон (72-часовая культура); *б* – нейрон (144-часовая культура); *в* – нейроны разных размеров (72-часовая культура); *г* – нейрон с формирующимся отростком (144-часовая культура). Все представленные фотографии для флуоресцентного изображения (справа) получены через 30–40 мин после инициации генерации АФК при одинаковом времени экспозиции (350 мс) и последующих одинаковых модификациях исходного изображения (яркость/контраст, насыщенность цвета) средствами графических программ. Калибровочная линия (100 мкм) дана для оптического изображения (слева)

Fig. 4. Examples of cell fluorescence in a culture of *L. stagnalis* neurons after initiation of ROS generation in the external environment: *a* – neuron (72-hour culture); *b* – neuron (144-hour culture); *c* – neurons of different sizes (72-hour culture); *d* – neuron with a developing process (144-hour culture). All fluorescent images (right) were obtained from 30 to 40 min after initiation of ROS generation with the same exposure time (350 ms) and subsequent identical modifications of the original image (brightness/contrast, color saturation) by means of special software. Calibration bar (100 μm) is given for the optical image (left)

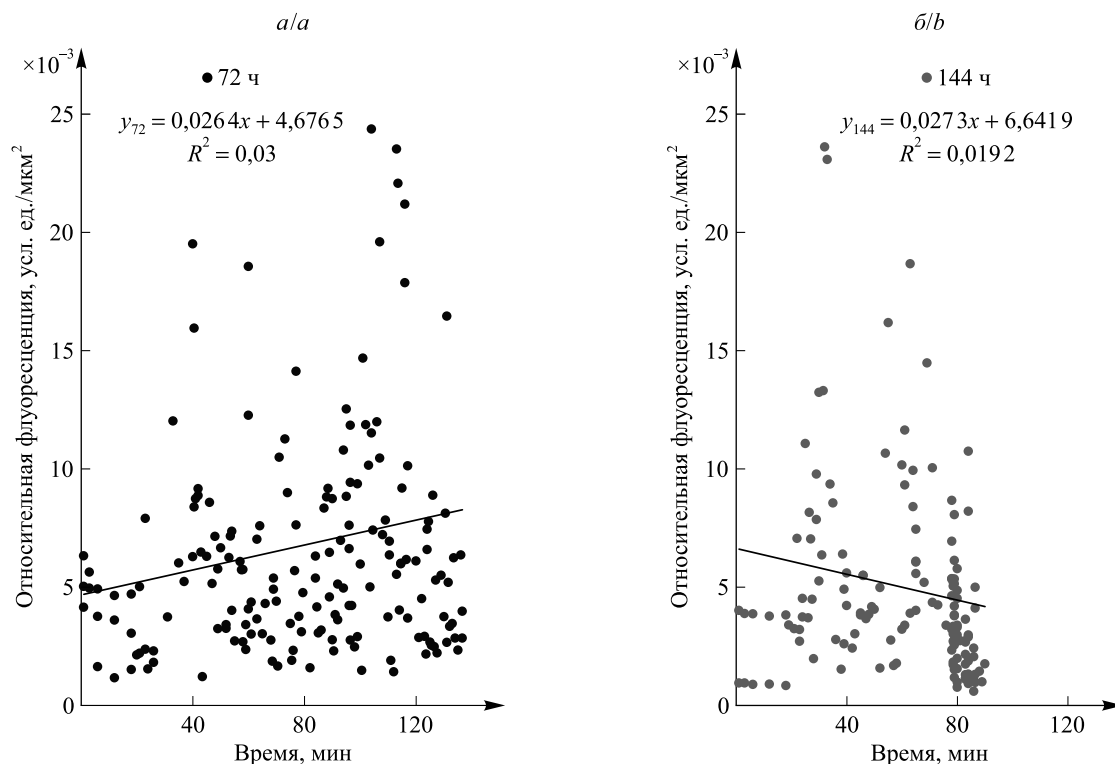


Рис. 5. Зависимость относительной флуоресценции культивируемых нейронов *L. stagnalis* от времени, прошедшего после инициации генерации АФК: а – 72-часовая культура; б – 144-часовая культура. Представлены уравнения линейной линии тренда и величина достоверности аппроксимации ( $R^2$ )

Fig. 5. Dependence of the relative fluorescence of cultured *L. stagnalis* neurons on the time elapsed after the initiation of ROS generation: а – 72-hour culture; б – 144-hour culture. Equations of linear trend lines and the value of the approximation reliability ( $R^2$ ) are presented

антиоксидантной защиты, лучше функционирующих в более зрелых нейронах, как ответ клетки на возрастание базального уровня свободных радикалов. В частности, в отношении гранулярных клеток мозжечка было показано [28], что при увеличении продолжительности культивирования повышается накопление АФК в клетке.

Различия в особенностях накопления и элиминации АФК, источником которых служат процессы, протекающие во внеклеточном пространстве, для клеток разного размера (формы) могут лежать в основе различий в устойчивости нейронов к окислительному стрессу в зависимости от их функциональных свойств. Известно, что в ЦНС *L. stagnalis* крупные интернейроны оказываются более устойчивыми (согласно данным электрофизиологии) к индуцированному окислительному стрессу по сравнению с мелкими мотонейронами [29], для которых характерно образование кластеров клеток [17]. Другими словами, полифункциональные клетки, к которым относятся вставочные нейроны, оказываются более защищенными по сравнению со специализированными двигательными нейронами: даже потеря некоторых из них не будет столь критична для функционирования всей нейронной сети. Кроме того, использование функционально различными нейронами разных нейромедиаторов [16] открывает перспективы для анализа устойчивости нервных клеток к окислительному повреждению в зависимости от их химической природы, что, однако, не входило в непосредственные задачи данной работы.

Таким образом, существует выраженная взаимосвязь между размером (формой) нейрона и его способностью противостоять накоплению АФК в цитозоле, что указывает на различия в резистентности нейронов ЦНС к окислительному повреждению в зависимости от их позиции в нейронной сети, обеспечивая тем самым избирательную устойчивость нейронных функций в условиях окислительного стресса.

### Библиографические ссылки

1. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. 2002;82(1):47–95. DOI: 10.1152/physrev.00018.2001.
2. Beal MF. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annals of Neurology*. 1995;38(3):357–366. DOI: 10.1002/ana.410380304.

3. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*. 2003;552(2):335–344. DOI: 10.1113/jphysiol.2003.049478.
4. Гусев ЕИ, Скворцова ВИ. *Ишемия головного мозга*. Москва: Медицина; 2001. 328 с.
5. Feniouk BA, Skulachev VP. Cellular and molecular mechanisms of action of mitochondria-targeted antioxidants. *Current Aging Science*. 2017;10(1):41–48. DOI: 10.2174/1874609809666160921113706.
6. Finkel T. Oxygen radicals and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*. 1998;10(2):248–253. DOI: 10.1016/S0955-0674(98)80147-6.
7. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine*. 1997;22(1–2):269–285. DOI: 10.1016/S0891-5849(96)00275-4.
8. Auerbach JM, Segal M. Peroxide modulation of slow onset potentiation in rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. 1997;17(22):8695–8701. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.17-22-08695.1997.
9. Sidorov AV. Effect of hydrogen peroxide on electrical coupling between identified *Lymnaea* neurons. *Invertebrate Neuroscience*. 2012;12(1):63–68. DOI: 10.1007/s10158-012-0128-7.
10. Sidorov AV. Neuromodulatory effects of hydrogen peroxide on central neurons in the feeding network of the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2017;53(6):493–500. DOI: 10.1134/S0022093017060060.
11. Костюк ВА, Потапович АИ. *Биорадикалы и биоантиоксиданты*. Минск: БГУ; 2004. 174 с.
12. Kishida KT, Klann E. Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2007;9(2):233–244. DOI: 10.1089/ars.2007.9.ft-8.
13. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*. 1992;59(5):1609–1623. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb10990.x.
14. Сидоров АВ. *Функциональная активность нервных центров беспозвоночных*. Минск: БГУ; 2011. 247 с.
15. Sidorov AV. Coordination of locomotor activity of mollusc *Lymnaea stagnalis* at nutrition: role of the internal medium acid-base balance (pH). *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2006;42(1):43–48. DOI: 10.1134/S0022093006010066.
16. S.-Rózsa K. The pharmacology of molluscan neurons. *Progress in Neurobiology*. 1984;23(1–2):79–150. DOI: 10.1016/0301-0082(84)90013-3.
17. Kyriakides M, Mccrohan CR, Slade CT, Syed NI, Winlow W. The morphology and electrophysiology of the neurones of the paired pedal ganglia of *Lymnaea stagnalis* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 1989;93(4):861–876. DOI: 10.1016/0300-9629(89)90513-6.
18. Benjamin PR, Staras K, Kemenes G. A systems approach to the cellular analysis of associative learning in the pond snail *Lymnaea*. *Learning and Memory*. 2000;7(3):124–131. DOI: 10.1101/lm.7.3.124.
19. Klaassen LJ, Janse C, van der Roest M. Multiple synaptic connections of a single neuron change differentially with age. *Neurobiology of Aging*. 1998;19(4):341–349. DOI: 10.1016/S0197-4580(98)00065-7.
20. Yar T, Winlow W. Isolation and characterization of whole-cell calcium channel currents in cultured, identified neurones of *Lymnaea*. *EC Neurology*. 2016;3(5):459–481.
21. Ridgway RL, Syed NI, Lukowiak K, Bulloch AGM. Nerve growth factor (NGF) induces sprouting of specific neurons of the snail, *Lymnaea stagnalis*. *Developmental Neurobiology*. 1991;22(4):377–390. DOI: 10.1002/neu.480220406.
22. Glantz SA. *Primer of biostatistics*. 4<sup>th</sup> edition. New York: McGraw-Hill; 1997. XVI, 473 p.
23. Kandel ER. *Cellular basis of behavior: an introduction to behavioral neurobiology*. San Francisco: W. H. Freeman and Company; 1976. XX, 727 p.
24. Henneman E, Somjen G, Carpenter DO. Functional significance of cell size in spinal motoneurons. *Journal of Neurophysiology*. 1965;28(3):560–580. DOI: 10.1152/jn.1965.28.3.560.
25. McComb C, Meems R, Syed N, Lukowiak K. Electrophysiological differences in the CPG aerial respiratory behavior between juvenile and adult *Lymnaea*. *Journal of Neurophysiology*. 2003;90(2):983–992. DOI: 10.1152/jn.00263.2003.
26. Fishel ML, Vasko MR, Kelley MR. DNA repair in neurons: so if they don't divide what's to repair? *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2007;614(1–2):24–36. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2006.06.007.
27. Kuhn TB. Oxygen radicals elicit paralysis and collapse of spinal cord neuron growth cones upon exposure to proinflammatory cytokines. *BioMed Research International*. 2014;2014:191767. DOI: 10.1155/2014/191767.
28. Olguín-Albuérne M, Morán J. ROS produced by NOX2 controls *in vitro* development of cerebellar granule neurons development. *ASN Neuro*. 2015;7(2):1759091415578712. DOI: 10.1177/1759091415578712.
29. Moroz LL, Rubakhin SS, Frolow AA, Kostiuk VA. Free-radical damage of identified neurones in *Lymnaea stagnalis*. *Acta Biologica Hungarica*. 1993;44(1):29–32.

## References

1. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. 2002;82(1):47–95. DOI: 10.1152/physrev.00018.2001.
2. Beal MF. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annals of Neurology*. 1995;38(3):357–366. DOI: 10.1002/ana.410380304.
3. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*. 2003;552(2):335–344. DOI: 10.1113/jphysiol.2003.049478.
4. Gusev EI, Skvortsova VI. *Ishemiya golovnogo mozga* [Ischemia of the brain]. Moscow: Meditsina; 2001. 328 p. Russian.
5. Feniouk BA, Skulachev VP. Cellular and molecular mechanisms of action of mitochondria-targeted antioxidants. *Current Aging Science*. 2017;10(1):41–48. DOI: 10.2174/1874609809666160921113706.
6. Finkel T. Oxygen radicals and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*. 1998;10(2):248–253. DOI: 10.1016/S0955-0674(98)80147-6.
7. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine*. 1997;22(1–2):269–285. DOI: 10.1016/S0891-5849(96)00275-4.
8. Auerbach JM, Segal M. Peroxide modulation of slow onset potentiation in rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. 1997;17(22):8695–8701. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.17-22-08695.1997.

9. Sidorov AV. Effect of hydrogen peroxide on electrical coupling between identified *Lymnaea* neurons. *Invertebrate Neuroscience*. 2012;12(1):63–68. DOI: 10.1007/s10158-012-0128-7.
10. Sidorov AV. Neuromodulatory effects of hydrogen peroxide on central neurons in the feeding network of the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2017;53(6):493–500. DOI: 10.1134/S0022093017060060.
11. Kostyuk VA, Potapovich AI. *Bioradikaly i bioantioksidanty* [Bioradicals and bioantioxidants]. Minsk: Belarusian State University; 2004. 174 p. Russian.
12. Kishida KT, Klann E. Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2007;9(2):233–244. DOI: 10.1089/ars.2007.9.ft-8.
13. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*. 1992;59(5):1609–1623. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb10990.x.
14. Sidorov AV. *Funktsional'naya aktivnost' nervnykh tsentrov bespozvonochnykh* [Nerve centers functional activity in invertebrates]. Minsk: Belarusian State University; 2011. 247 p. Russian.
15. Sidorov AV. Coordination of locomotor activity of mollusc *Lymnaea stagnalis* at nutrition: role of the internal medium acid-base balance (pH). *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2006;42(1):43–48. DOI: 10.1134/S0022093006010066.
16. S.-Rózsa K. The pharmacology of molluscan neurons. *Progress in Neurobiology*. 1984;23(1–2):79–150. DOI: 10.1016/0301-0082(84)90013-3.
17. Kyriakides M, McCrohan CR, Slade CT, Syed NI, Winlow W. The morphology and electrophysiology of the neurones of the paired pedal ganglia of *Lymnaea stagnalis* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 1989;93(4):861–876. DOI: 10.1016/0300-9629(89)90513-6.
18. Benjamin PR, Staras K, Kemenes G. A systems approach to the cellular analysis of associative learning in the pond snail *Lymnaea*. *Learning and Memory*. 2000;7(3):124–131. DOI: 10.1101/lm.7.3.124.
19. Klaassen LJ, Janse C, van der Roest M. Multiple synaptic connections of a single neuron change differentially with age. *Neurobiology of Aging*. 1998;19(4):341–349. DOI: 10.1016/S0197-4580(98)00065-7.
20. Yar T, Winlow W. Isolation and characterization of whole-cell calcium channel currents in cultured, identified neurones of *Lymnaea*. *EC Neurology*. 2016;3(5):459–481.
21. Ridgway RL, Syed NI, Lukowiak K, Bulloch AGM. Nerve growth factor (NGF) induces sprouting of specific neurons of the snail, *Lymnaea stagnalis*. *Developmental Neurobiology*. 1991;22(4):377–390. DOI: 10.1002/neu.480220406.
22. Glantz SA. *Primer of biostatistics*. 4<sup>th</sup> edition. New York: McGraw-Hill; 1997. XVI, 473 p.
23. Kandel ER. *Cellular basis of behavior: an introduction to behavioral neurobiology*. San Francisco: W. H. Freeman and Company; 1976. XX, 727 p.
24. Henneman E, Somjen G, Carpenter DO. Functional significance of cell size in spinal motoneurons. *Journal of Neurophysiology*. 1965;28(3):560–580. DOI: 10.1152/jn.1965.28.3.560.
25. McComb C, Meems R, Syed N, Lukowiak K. Electrophysiological differences in the CPG aerial respiratory behavior between juvenile and adult *Lymnaea*. *Journal of Neurophysiology*. 2003;90(2):983–992. DOI: 10.1152/jn.00263.2003.
26. Fishel ML, Vasko MR, Kelley MR. DNA repair in neurons: so if they don't divide what's to repair? *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2007;614(1–2):24–36. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2006.06.007.
27. Kuhn TB. Oxygen radicals elicit paralysis and collapse of spinal cord neuron growth cones upon exposure to proinflammatory cytokines. *BioMed Research International*. 2014;2014:191767. DOI: 10.1155/2014/191767.
28. Olguín-Albuérne M, Morán J. ROS produced by NOX2 controls *in vitro* development of cerebellar granule neurons development. *ASN Neuro*. 2015;7(2):1759091415578712. DOI: 10.1177/1759091415578712.
29. Moroz LL, Rubakhin SS, Frolov AA, Kostiuk VA. Free-radical damage of identified neurones in *Lymnaea stagnalis*. *Acta Biologica Hungarica*. 1993;44(1):29–32.

Статья поступила в редколлегию 29.01.2021.  
Received by editorial board 29.01.2021.