

УДК 577.25

ЗНАЧЕНИЕ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ДЛЯ РАЗВИТИЯ АФК-ЗАВИСИМОЙ АПОПТОТИЧЕСКОЙ ДЕГРАДАЦИИ ДНК В КЛЕТКАХ НЕРВНЫХ ГАНГЛИЕВ МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS*

Н. Д. ЛИВАНОВА¹⁾, А. В. СИДОРОВ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Аннотация. Установлено, что двухчасовая экспозиция изолированных нервных ганглиев моллюска *Lymnaea stagnalis* в нормальном растворе Рингера, содержащем пероксид водорода (1 ммоль/л), генерирующую гидроксильный радикал смесь (0,5 ммоль/л CuCl_2 и 0,5 ммоль/л аскорбата) или их сочетание, по прошествии 18 ч приводит к появлению полос низкомолекулярных, кратных 180 парам нуклеотидов фрагментов ядерной ДНК при гель-электрофорезе. Одночасовая экспозиция изолированной центральной нервной системы моллюска *L. stagnalis* при аналогичных условиях не вызывает апоптотической деградации ДНК, выделенной из нервных ганглиев прудовика. В условиях, благоприятствующих генерации гидроксильного радикала (в присутствии ионов Cu^{2+}), а также при удалении ионов Ca^{2+} из окружающей среды (нахождение в бескальциевом (высокомагниево) растворе Рингера) отмечается увеличение числа и интенсивности полос низкомолекулярных фрагментов ДНК. Предполагается, что АФК-зависимая апоптотическая деградация может быть реализована лишь при достаточно пролонгированном

Образец цитирования:

Ливанова НД, Сидоров АВ. Значение длительности окислительного стресса для развития АФК-зависимой апоптотической деградации ДНК в клетках нервных ганглиев моллюска *Lymnaea stagnalis*. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2025;2:73–79.
EDN: WLOSFK

For citation:

Livanova ND, Sidorov AV. The importance of oxidative stress duration for the development of ROS-dependent apoptotic DNA degradation in cells within nerve ganglions of the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2025;2: 73–79. Russian.
EDN: WLOSFK

Авторы:

Надежда Дмитриевна Ливанова – аспирантка кафедры физиологии человека и животных биологического факультета. Научный руководитель – А. В. Сидоров.
Александр Викторович Сидоров – доктор биологических наук, профессор; профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Authors:

Nadezhda D. Livanova, postgraduate student at the department of human and animal physiology, faculty of biology.
www.nadia14glinskaya@gmail.com
Alexander V. Sidorov, doctor of science (biology), full professor; professor at the department of human and animal physiology, faculty of biology.
sidorov@bsu.by
<https://orcid.org/0000-0002-1711-7868>

окислительном напряжении (стрессе) в нервной ткани, что позволяет рассматривать свободнорадикальные формы кислорода как сигнальные молекулы нормальных физиологических процессов меж- и внутриклеточной коммуникации в мозге моллюсков.

Ключевые слова: гидроксильный радикал; окислительный стресс; нервные клетки; апоптоз; беспозвоночные.

THE IMPORTANCE OF OXIDATIVE STRESS DURATION FOR THE DEVELOPMENT OF ROS-DEPENDENT APOPTOTIC DNA DEGRADATION IN CELLS WITHIN NERVE GANGLIONS OF THE MOLLUSC *LYMNAEA STAGNALIS*

N. D. LIVANOVA^a, A. V. SIDOROV^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

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

Abstract. It was found that a two-hour exposure of isolated *Lymnaea stagnalis* nerve ganglia in normal Ringer's solution containing hydrogen peroxide (1 mmol/L), a hydroxyl radical-generating mixture (0.5 mmol/L of CuCl₂ and 0.5 mmol/L of ascorbate) or a combination of both, after 18 h, results in the appearance of bands of low-molecular-weight, multiple-of-180 base-pair nuclear DNA fragments in gel electrophoresis. Under mentioned above conditions, a one-hour exposure of isolated *L. stagnalis* central nervous system, doesn't result in the development of apoptotic degradation of DNA from the pond snail nerve ganglions. Under conditions favourable for the generation of hydroxyl radical (in the presence of Cu²⁺ ions), as well as with the removal of Ca²⁺ ions from the environment (in zero-calcium (high-magnesium) Ringer's solution), an increase in the number and intensity of low-molecular DNA fragment bands is observed. It is assumed that ROS-dependent apoptosis in the nervous tissue can be realised only with sufficiently prolonged oxidative stress, which allows us to consider reactive oxygen species as signalling molecules in normal physiological processes of inter- and intracellular communication within molluscan brain.

Keywords: hydroxyl radical; oxidative stress; nerve cells; apoptosis; invertebrates.

Введение

Сохранность нервных клеток и выполняемых ими функций является обязательным условием для нормального функционирования организма животных. Во взрослом, высокодифференцированном состоянии нейроны, как правило, не обладают митотической и (или) пролиферативной активностью, что делает популяцию таких клеток весьма чувствительной к действию различных факторов: потенциальная гибель части из них не может быть компенсирована оставшимися клетками посредством деления. Окислительный стресс, связанный с образованием активных форм кислорода (АФК), является одним из основных факторов, определяющих функционирование нейронных сетей мозга в самых разных условиях [1; 2]. Не вызывает сомнения и сигнальная роль ряда АФК, что подразумевает поддержание определенного редокс-равновесия в цитоплазме нервных клеток [3]. Одной из внутриклеточных мишеней для действия свободных радикалов являются нуклеиновые кислоты, в том числе ядерная и митохондриальная ДНК [4]. Помимо развитой системы антиокислительной защиты, включающей как ферментативные (супероксиддисмутаза, пероксидаза, каталаза), так и неферментативные (восстановленный глутатион, токоферол, аскорбат и др.) компоненты [5], нервные клетки могут содержать множественные ($\geq 10\ 000$) копии ДНК [6], т. е. быть полиплоидными, что также существенно повышает их устойчивость к окислительному стрессу.

Можно предположить, что выбор между сигнальным и патологическим действием АФК определяется не только конечной концентрацией свободных радикалов, но и временем, в течение которого сохраняется возможность реализации их эффектов. Кроме того, должны приниматься во внимание возможные пути трансформации одних форм АФК в другие, обладающие более выраженным повреждающим действием на клеточном уровне. Пероксид водорода (H₂O₂) традиционно считается основной сигнальной молекулой из пула АФК [7] благодаря его наибольшей стабильности в интерстиции и способности легко проникать через мембраны. Однако в присутствии металлов с переменной валентностью, таких

как медь (Cu) или железо (Fe), он может служить источником образования (реакция Фентона) гидроксильного радикала ($\cdot\text{OH}$) – короткоживущего высокорекреационноспособного соединения, ключевого повреждающего агента при окислительном стрессе [8].

Продукция нейронами буккальных ганглиев монооксида азота (NO), обладающего свободнорадикальными свойствами, является неотъемлемым этапом потребления пищи у пресноводного легочного моллюска *Lymnaea stagnalis* [9]. Контролируемые нейронной сетью буккальных ганглиев ритмические движения радулы, определяющие захват пищевого субстрата, могут осуществляться в течение многоминутных интервалов, тогда как время полужизни молекулы NO в интерстициальном пространстве составляет несколько секунд, что предполагает создание повышенной и длительной свободнорадикальной нагрузки в отношении рядом расположенных нервных узлов центральной нервной системы (ЦНС) моллюска *L. stagnalis* [10]. С другой стороны, пероксид водорода способен модифицировать [11] пищевое поведение прудовика (сигнальная роль АФК), а хроническое действие ряда неорганических поллютантов, в том числе тяжелых металлов [12], вызывает гибель части животных, что может быть связано с развитием окислительного стресса (токсическое действие АФК). Очевидно, что наличие механизма, определяющего переход от сигнальных к токсическим эффектам АФК, является обязательным условием для нормального функционирования нервных центров моллюсков и других беспозвоночных.

В связи с отмеченным выше целью данной работы было оценить возможность инициации процессов гибели клеток нервных ганглиев моллюска *L. stagnalis* в зависимости от длительности действия пероксида водорода, в том числе в условиях, способствующих образованию гидроксильного радикала.

Материалы и методы исследования

В работе использовали моллюсков *L. stagnalis*, собранных в осенний период на территории Минской области в мелких мелиоративных каналах. Животных одинакового размерного класса (высота раковины $(4,0 \pm 0,2)$ см, масса тела $(5,5 \pm 0,5)$ г) содержали в аквариумах, где на каждую особь приходилось не менее 1 л воды, при температуре (22 ± 1) °С. Смену воды проводили каждые три дня. Пищей служили листья салата и одуванчика (питание *ad libitum*).

Препараты ЦНС и инициация окислительного стресса. Для получения препарата изолированной нервной системы удаляли раковину и вскрывали стенку тела животного, открывая доступ к центральному кольцу нервных ганглиев. После этого перерезали все нервы, связывающие центральное кольцо нервных ганглиев с периферией, и извлекали его из полости тела. Операцию проводили в нормальном растворе Рингера для моллюска *L. stagnalis* следующего состава: NaCl – 44,0 ммоль/л; KCl – 1,7 ммоль/л; CaCl₂ – 4,0 ммоль/л; MgCl₂ · 6H₂O – 1,5 ммоль/л; HEPES – 10,0 ммоль/л (pH $7,60 \pm 0,03$).

Изолированные нервные системы (по 3–4 ЦНС для каждой серии в двух повторах) предварительно инкубировали в течение 1 ч (первый вариант) или 2 ч (второй вариант) в темноте в нормальном растворе Рингера (контроль) или в растворе Рингера, содержащем (указана конечная концентрация) пероксид водорода (1 ммоль/л) (первая экспериментальная серия), $\cdot\text{OH}$ -генерирующую смесь (0,5 ммоль/л CuCl₂ и 0,5 ммоль/л аскорбата) (вторая экспериментальная серия), пероксид водорода (1 ммоль/л) и $\cdot\text{OH}$ -генерирующую смесь (0,5 ммоль/л CuCl₂ и 0,5 ммоль/л аскорбата) (третья экспериментальная серия). По окончании инкубации препараты ЦНС каждой серии промывали, помещали в свежий раствор Рингера (5 мл для всех ЦНС серии) и оставляли в темноте при комнатной температуре (+20 °С) на 18 ч. Для получения бескальциевого раствора Рингера из него удаляли CaCl₂, а концентрацию MgCl₂ · 6H₂O увеличивали в 6 раз (до 9 ммоль/л).

Выделение и анализ препаратов ДНК клеток нервных ганглиев. Выделение ядерной ДНК проводили путем ее экстракции смесью хлороформа и изоамилового спирта в соотношении 24 : 1 с добавлением РНКазы А (25 мкг/мл) в течение последнего часа трехчасовой инкубации препаратов ЦНС в смеси для лизиса клеток (NaCl – 0,15 ммоль/л; трис-HCl – 10 ммоль/л; ЭДТА – 5 ммоль/л; SDS – 1 %) при температуре +40 °С. После осаждения холодным (–20 °С) этиловым спиртом (96 %), последующей промывки этанолом (70 %) и подсушивания полученный препарат ДНК растворяли в деионизированной воде (50 мкл) и хранили при температуре –70 °С для дальнейшего использования. Оценку чистоты препарата и определение концентрации ДНК осуществляли на основании значений оптической плотности при 260 и 280 нм (A_{260} и A_{280} соответственно) с учетом коэффициента разведения пробы и типа использованного растворителя с помощью спектрофотометра Cary-50 (Varian, Австралия). Разделение и выявление фрагментов ДНК проводили посредством гель-электрофореза с использованием агарозы (1 %), в качестве электрофоретической среды выступал трис-ацетатный буфер (40 ммоль/л), содержащий 0,5 мкг/мл этидиумбромида. Полученное с помощью системы геледокументации Infinity (Vilber Lourmat, Франция) изображение анализировали в приложении Image Lab (Bio-Rad Laboratories, США).

Результаты и их обсуждение

Одночасовая инкубация препаратов изолированной ЦНС в ранее описанных условиях (см. раздел «Материалы и методы исследования») не приводит к развитию апоптотической деградации ядерной ДНК ни в одной из экспериментальных серий (рис. 1). Слабовыраженные, сильно размытые полосы размером около 180 пар нуклеотидов (п. н.) отмечены для препаратов ДНК, полученных в контрольных условиях и при действии одного пероксида водорода (см. рис. 1, дорожки 1 и 2), что может быть связано с присутствием в пробе следов белка (соотношение A_{260}/A_{280} указанных препаратов составляет 1,52 и 1,61 соответственно). При высокой степени очистки пробы (значения A_{260}/A_{280} достигают 1,79 и 1,81), что было характерно для экспериментальных серий с использованием \bullet ОН-генерирующей смеси (чистой и в сочетании с пероксидом водорода), даже в случае внесения в лунку образца ДНК в четырехкратном количестве по отношению к контролю следов ее фрагментации не выявлено (см. рис. 1, дорожки 3 и 4).

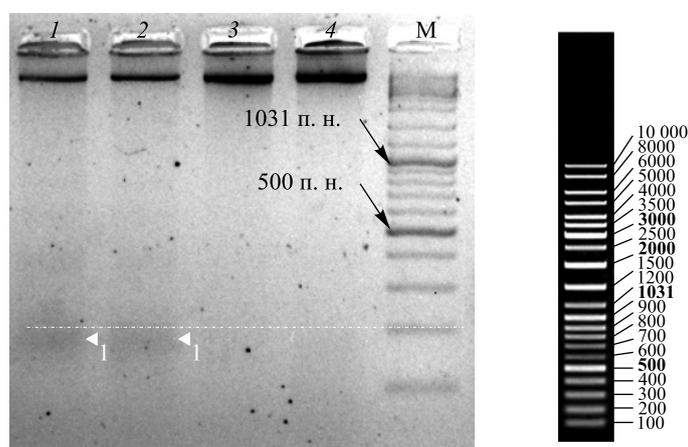


Рис. 1. Гель-электрофорез (инvertированное изображение) с образцами ДНК, выделенными из клеток нервных ганглиев моллюска *L. stagnalis*, после одночасовой инкубации препаратов ЦНС в экспериментальных растворах.

Дорожки геля: 1 – контроль (раствор Рингера); 2 – пероксид водорода (1 ммоль/л); 3 – \bullet ОН-генерирующая смесь (0,5 ммоль/л CuCl_2 и 0,5 ммоль/л аскорбата); 4 – пероксид водорода (1 ммоль/л) и \bullet ОН-генерирующая смесь (0,5 ммоль/л CuCl_2 и 0,5 ммоль/л аскорбата); М – маркер молекулярного веса GeneRuler DNA Ladder Mix (SM0331; Thermo Scientific, США) (детальная характеристика составляющих его фрагментов ДНК приведена на вставке справа). Каждая экспериментальная дорожка содержит 10 мкл раствора ДНК (65 мкг/мкл (дорожки 1 и 2) или 250 мкг/мл (дорожки 3 и 4)) и 2 мкл загрузочного буфера (40 % раствор сахарозы, содержащий 0,25 % бромфенолового синего), объем внесенного маркера молекулярного веса равен 3 мкл. Полосы фрагментов ДНК отмечены треугольниками.

Пунктирная линия указывает фронт распространения фрагмента размером 200 п. н.

Fig. 1. Gel electrophoresis (inverted image) with DNA samples isolated from *L. stagnalis* nerve ganglion cells after one-hour incubation of CNS preparations in experimental solutions.

Gel lanes: 1 – control (Ringer's solution); 2 – hydrogen peroxide (1 mmol/L); 3 – \bullet OH-generating mixture (0.5 mmol/L of CuCl_2 and 0.5 mmol/L of ascorbate); 4 – hydrogen peroxide (1 mmol/L) and \bullet OH-generating mixture (0.5 mmol/L of CuCl_2 and 0.5 mmol/L of ascorbate); M – molecular weight marker GeneRuler DNA Ladder Mix (SM0331; Thermo Scientific, USA) (detailed characteristics of its DNA fragments are given in the inset on the right).

Each experimental lane contains 10 μL of DNA solution (65 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (lanes 1 and 2) or 250 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (lanes 3 and 4)) and 2 μL of loading buffer (40 % sucrose solution containing 0.25 % bromophenol blue), the volume of added molecular weight marker is 3 μL . The DNA fragment bands are marked with triangles.

The dotted line indicates the spreading front of the 200 bp fragment

Установлено, что двухчасовая инкубация центрального кольца нервных ганглиев в среде, обеспечивающей генерацию гидроксильного радикала или содержащей пероксид водорода, приводит к появлению на геле полос фрагментов ДНК, кратных 180 п. н. (рис. 2). Для препаратов ДНК, полученных в контрольных условиях, отмечена слабовыраженная, имеющая нечеткие границы широкая полоса деградации ДНК в диапазоне от 100 до 200 п. н. (см. рис. 2, дорожка 1), что может быть связано с наличием примеси РНК в указанной пробе (это подтверждается достаточно высоким соотношением A_{260}/A_{280} , равным 2,61). Полос, кратных 180 п. н., не выявлено.

Добавление в среду инкубации пероксида водорода (1 ммоль/л) ассоциируется с наличием четырех последовательных полос низкомолекулярных фрагментов ДНК (см. рис. 2, дорожка 2) размером около 180, 360, 540 и 720 п. н. Интенсивность первой из них существенно выше интенсивности полосы для контрольных условий (соотношение A_{260}/A_{280} препарата составляет 1,76, что свидетельствует о достаточной степени очистки ДНК). Сочетание \bullet ОН-генерирующей смеси (0,5 ммоль/л CuCl_2 и 0,5 ммоль/л аскорбата) с пероксидом водорода приводит к наиболее выраженной апоптотической деградации ядерной ДНК, выделенной из клеток нервных ганглиев (см. рис. 2, дорожка 4). В этом случае отмечается наличие пяти последовательных полос, соответствующих примерно 180, 360, 540, 720 и 900 п. н. и имеющих наибольшую интенсивность среди всех экспериментальных серий. Максимальная интенсивность отмечена для первой полосы (около 180 п. н.), намного более узкой, чем полоса для контрольных условий (соотношение A_{260}/A_{280} препарата равно 1,86). Основной, высокомолекулярный фрагмент данной дорожки смещен в направлении низкомолекулярных продуктов (полос геля), что также указывает на выраженность процессов деградации ДНК в этих условиях. Даже одной \bullet ОН-генерирующей смеси оказывается достаточно для инициации процессов апоптоза в клетках нервных ганглиев прудовика (см. рис. 2, дорожка 3): отмечается наличие четырех полос низкомолекулярных фрагментов ДНК размером около 180, 360, 540 и 720 п. н., интенсивность которых, особенно первой полосы, оказывается выше интенсивности полос, выявленных для пероксида водорода (соотношение A_{260}/A_{280} препарата равно 1,98). Логично предположить, что пероксид водорода может образовываться в клетках нервных ганглиев моллюска *L. stagnalis* в концентрации, достаточной для генерации свободнорадикальных форм кислорода, в частности гидроксильного радикала, при создании соответствующих условий, например при наличии в среде ионов металлов с переменной валентностью (Cu, Fe).

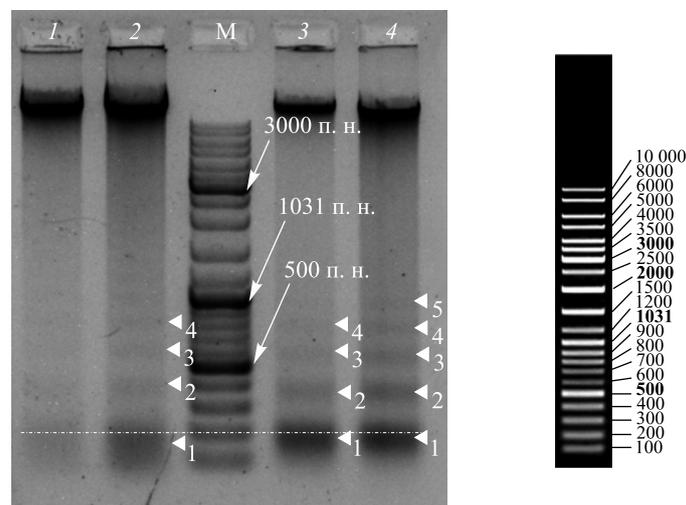


Рис. 2. Гель-электрофорез (инвертированное изображение) с образцами ДНК, выделенными из клеток нервных ганглиев моллюска *L. stagnalis*, после двухчасовой инкубации препаратов ЦНС в экспериментальных растворах. Каждая экспериментальная дорожка содержит 10 мкл раствора ДНК (110 мкг/мкл) и 2 мкл загрузочного буфера (40 % раствор сахарозы, содержащий 0,25 % бромфенолового синего), объем внесенного маркера молекулярного веса равен 3 мкл. Остальные обозначения см. на рис. 1

Fig. 2. Gel electrophoresis (inverted image) with DNA samples isolated from *L. stagnalis* nerve ganglion cells after two-hour incubation of CNS preparations in experimental solutions. Each experimental lane contains 10 μL of DNA solution (110 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) and 2 μL of loading buffer (40 % sucrose solution containing 0.25 % bromophenol blue), the volume of added molecular weight marker is 3 μL . The remaining designations see on fig. 1

Изменение содержания ионов Ca^{2+} в растворах для инкубации оказывает заметное влияние на выраженность апоптотической деградации ядерной ДНК, выделенной из клеток нервных ганглиев (рис. 3). В частности, максимальная интенсивность полос, соответствующих фрагментам ДНК, равным или кратным 180 п. н. (примерно 180, 360, 540, 720 и 900 п. н.), отмечена в случае использования бескальциевого (высокомagneзиевого) раствора Рингера (см. рис. 3, дорожка 3), причем особенно высокой была интенсивность первой (около 180 п. н.) и второй (около 360 п. н.) полос.

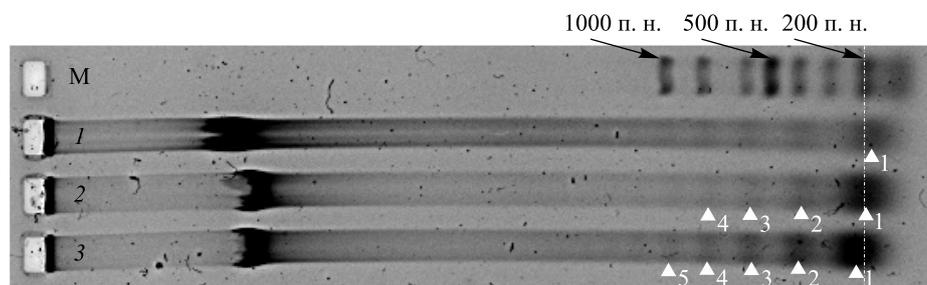


Рис. 3. Гель-электрофорез (инвертированное изображение) с образцами ДНК, выделенными из клеток нервных ганглиев *L. stagnalis*, после двухчасовой инкубации препаратов ЦНС в экспериментальных растворах с разным содержанием ионов Ca^{2+} .

Дорожки геля: 1 – контроль (раствор Рингера); 2 – пероксид водорода (1 ммоль/л) и $\cdot\text{OH}$ -генерирующая смесь (0,5 ммоль/л CuCl_2 и 0,5 ммоль/л аскорбата) в нормальном растворе Рингера; 3 – пероксид водорода (1 ммоль/л) и $\cdot\text{OH}$ -генерирующая смесь (0,5 ммоль/л CuCl_2 и 0,5 ммоль/л аскорбата) в бескальциевом растворе Рингера; М – маркер молекулярного веса Low Range DNA Ladder (M-202L; Jena Bioscience, Германия).

Каждая экспериментальная дорожка содержит 10 мкл раствора ДНК (200 мкг/мл) и 2 мкл загрузочного буфера (40 % раствор сахарозы, содержащий 0,25 % бромфенолового синего), объем внесенного маркера молекулярного веса равен 3 мкл.

Полосы фрагментов ДНК отмечены треугольниками.

Пунктирная линия указывает фронт распространения фрагмента размером 200 п. н.

Fig. 3. Gel electrophoresis (inverted image) with DNA samples isolated from *L. stagnalis* nerve ganglion cells after two-hour incubation of CNS preparations in experimental solutions with different Ca^{2+} ion content.

Gel lanes: 1 – control (Ringer's solution); 2 – hydrogen peroxide (1 mmol/L) and $\cdot\text{OH}$ -generating mixture (0.5 mmol/L of CuCl_2 and 0.5 mmol/L of ascorbate) in normal Ringer's solution; 3 – hydrogen peroxide (1 mmol/L) and $\cdot\text{OH}$ -generating mixture (0.5 mmol/L of CuCl_2 and 0.5 mmol/L of ascorbate) in calcium-free Ringer's solution; M – molecular weight marker Low Range DNA Ladder (M-202L; Jena Bioscience, Germany).

Each experimental lane contains 10 μL of DNA solution (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 2 μL of loading buffer (40 % sucrose solution containing 0.25 % bromophenol blue), the volume of added molecular weight marker is 3 μL . The DNA fragment bands are marked with triangles.

The dotted line indicates the spreading front of the 200 bp fragment

Полученные данные свидетельствуют о наличии временного порога (1–2 ч) для реализации эффектов АФК по инициации процессов апоптотической гибели клеток нервных ганглиев. Вполне вероятно, что развитой системы антиокислительной защиты ЦНС моллюска *L. stagnalis* [13], включая присутствие каротиноидов в цитоплазме нейронов ее составляющих [14], оказывается достаточно для нейтрализации действия АФК в отношении нуклеиновых кислот, по крайней мере в определенный интервал времени. Тем самым создается возможность для использования АФК (особенно пероксида водорода) и активных форм азота (в частности, монооксида азота) в качестве сигнальных молекул, когда их поддерживаемое присутствие в интерстициальном пространстве ограничено временными рамками. В связи с этим стоит упомянуть тот факт, что для особой вида *L. stagnalis* характерен крайне высокий водный обмен: количество выводимой за 1 ч воды равно четырехкратной массе тела животного [15]. В сочетании с относительно небольшим периодом интенсивной продукции (минуты) и временем нахождения в стабильном высокоактивном состоянии (секунды и менее) для большинства биологически активных свободных радикалов, в том числе монооксида азота и пероксида водорода, данное свойство обеспечивает структурную и функциональную целостность клеток нервных ганглиев прудовика и реализацию сигнальных эффектов. Напротив, пролонгированное, превышающее указанный временной порог (более 2 ч) действие постоянно присутствующих факторов, инициирующих образование активных форм азота и кислорода, например различных загрязнителей окружающей среды, приводит к гибели всего организма, что неоднократно отмечалось в ходе различных эколого-токсикологических исследований [16]. В частности, именно хроническая экспозиция ювенильных особей вида *L. stagnalis* в присутствии ионов меди вызывает развитие разнообразных токсических эффектов [17].

Внутриклеточные пути кальциевой сигнализации являются ключевым связующим звеном между свободнорадикальным повреждением нуклеиновых кислот и последующей инициацией апоптотической гибели клеток. Ранее нами сообщалось, что эффекты пероксида водорода в отношении щелевых контактов моллюска *L. stagnalis*, приводящие к уменьшению коэффициента сопряжения между нейронами [18], могут быть нивелированы при блокировании Ca^{2+} -каналов плазмалеммы. В связи с этим ожидаемой реакцией было бы отсутствие или по крайней мере существенное снижение эффектов АФК в отношении ДНК клеток нервных ганглиев в бескальциевом растворе, чего не наблюдалось. Однако стоит заметить, что, помимо интерстициального пространства, значительные запасы ионов Ca^{2+} сосредоточены во внутриклеточных депо (митохондриях, эндоплазматический ретикулум). Именно эти запасы могут

служить источником увеличения концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле при развитии окислительного стресса [19], особенно в случае активации апоптотического пути, инициированного повреждением ДНК. Кроме того, бескальциевый раствор существенно ограничивает взаимодействие нервных клеток посредством химических синаптических контактов, делая невозможным либо, во всяком случае, резко снижая высвобождение нейромедиаторов и (или) нейромодуляторов. С учетом вовлеченности некоторых из них, например дофамина, различных нейропептидов, в реализацию нейропротекторных эффектов [20], в том числе в отношении факторов окислительного повреждения нейронов, видимое ограничение подобной сигнализации и взаимодействия клеток сказывается на общей устойчивости нейронов ЦНС моллюска *L. stagnalis* к действию АФК.

Заключение

Таким образом, реализация эффектов АФК в отношении ДНК клеток ЦНС моллюска *L. stagnalis* требует наличия минимального времени действия (1–2 ч), что позволяет использовать свободнорадикальные формы кислорода в качестве сигнальных молекул в быстрых процессах меж- и внутриклеточной коммуникации.

Библиографические ссылки

1. Wilson C, Muñoz-Palma E, González-Billault C. From birth to death: a role for reactive oxygen species in neuronal development. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2018;80:43–49. DOI: 10.1016/j.semdb.2017.09.012.
2. Lee KH, Cha M, Lee BH. Crosstalk between neuron and glial cells in oxidative injury and neuroprotection. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(24):13315. DOI: 10.3390/ijms222413315.
3. Munteanu C, Galaction AI, Turnea M, Blendea CD, Rotariu M, Poștaru M. Redox homeostasis, gut microbiota, and epigenetics in neurodegenerative diseases: a systematic review. *Antioxidants*. 2024;13(9):1062. DOI: 10.3390/antiox13091062.
4. Chatgillalolu C, Ferreri C, Krokidis MG, Masi A, Terzidis MA. On the relevance of hydroxyl radical to purine DNA damage. *Free Radical Research*. 2021;55(4):384–404. DOI: 10.1080/10715762.2021.1876855.
5. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;44(2):532–553. DOI: 10.1159/000485089.
6. Nandakumar S, Rozich E, Buttitta L. Cell cycle re-entry in the nervous system: from polyploidy to neurodegeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9:698661. DOI: 10.3389/fcell.2021.698661.
7. Averill-Bates D. Reactive oxygen species and cell signaling. Review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*. 2024;1871(2):119573. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2023.119573.
8. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011;283(2–3):65–87. DOI: 10.1016/j.tox.2011.03.001.
9. Kobayashi S, Sadamoto H, Ogawa H, Kitamura Y, Oka K, Tanishita K, et al. Nitric oxide generation around buccal ganglia accompanying feeding behavior in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience Research*. 2000;38(1):27–34. DOI: 10.1016/s0168-0102(00)00136-x.
10. Moroz LL. Giant identified NO-releasing neurons and comparative histochemistry of putative nitrergic systems in gastropod molluscs. *Microscopy Research & Technique*. 2000;49(6):557–569. DOI: 10.1002/1097-0029(20000615)49:6<557::AID-JEMT6>3.0.CO;2-S.
11. 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.
12. Brix KV, Esbaugh AJ, Munley KM, Grosell M. Investigations into the mechanism of lead toxicity to the freshwater pulmonate snail, *Lymnaea stagnalis*. *Aquatic Toxicology*. 2012;106–107:147–156. DOI: 10.1016/j.aquatox.2011.11.007.
13. Shadenko VN, Sidorov AV. Antioxidant defense in the hepatopancreas and nerve ganglia of the mollusk *Lymnaea stagnalis* after acute experimental hyperglycemia. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2020;56(3):235–242. DOI: 10.1134/S0022093020030060.
14. Karnaukhov VN. Carotenoids in oxidative metabolism of mollusoid neurons. *Experimental Cell Research*. 1971;64(2):301–306. DOI: 10.1016/0014-4827(71)90080-2.
15. 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.
16. Amorim J, Abreu I, Rodrigues P, Peixoto D, Pinheiro C, Saraiva A, et al. *Lymnaea stagnalis* as a freshwater model invertebrate for ecotoxicological studies. *Science of the Total Environment*. 2019;669:11–28. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.035.
17. Brix KV, Esbaugh AJ, Grosell M. The toxicity and physiological effects of copper on the freshwater pulmonate snail, *Lymnaea stagnalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Toxicology & Pharmacology*. 2011;154(3):261–267. DOI: 10.1016/j.cbpc.2011.06.004.
18. 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.
19. Peng T-I, Jou M-J. Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1201(1):183–188. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05634.x.
20. Ishige K, Chen Q, Sagara Y, Schubert D. The activation of dopamine D4 receptors inhibits oxidative stress-induced nerve cell death. *The Journal of Neuroscience*. 2001;21(16):6069–6076. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-16-06069.2001.