
КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

CELL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

УДК 591.041

ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СЕНСОРНОГО НЕЙРОНА И ОБОРОНИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS* В УСЛОВИЯХ ПРОЛОНГИРОВАННОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

А. В. СИДОРОВ¹⁾, В. Н. ШАДЕНКО^{1), 2)}

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

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

Возрастание содержания глюкозы в гемолимфе (с 0,12 (0,05; 0,18) до 4,10 (3,18; 6,08) ммоль/л) приводит к модификации оборонительного поведения моллюсков, проявляющейся в увеличении втянутости тела животного в раковину и возрастании доли слабых защитных реакций в ответ на тактильную стимуляцию щупальца моллюска. Колебаний в длине щупалец и длительности латентного периода протракции выявлено не было. В условиях экспериментальной гипергликемии (нахождение препарата изолированной ЦНС в 10 ммоль/л растворе D-глюкозы в течение 2 ч) изменяются базовые электрические характеристики FMRF-амидергического нейрона

Образец цитирования:

Сидоров АВ, Шаденко ВН. Электрические характеристики сенсорного нейрона и оборонительные реакции моллюска *Lymnaea stagnalis* в условиях пролонгированной гипергликемии. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022; 1:23–38.

For citation:

Sidorov AV, Shadenko VN. Electrical properties of the sensory neuron and defense reactions of mollusc *Lymnaea stagnalis* at conditions of prolonged hyperglycemia. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;1:23–38. Russian.

Авторы:

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

Виктория Николаевна Шаденко – соискатель кафедры физиологии человека и животных биологического факультета¹⁾, научный сотрудник лаборатории клинико-эпидемиологических исследований²⁾. Научный руководитель – А. В. Сидоров.

Authors:

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>

Victoria N. Shadenko, competitor at the department of human and animal physiology, faculty of biology^a, and researcher at the laboratory of clinical and epidemiological research^b.

vika-st-18@list.ru

<https://orcid.org/0000-0003-0037-6131>

RPaD1, вовлеченного в детекцию сенсорных стимулов и кардиорегуляцию у *Lymnaea*. Речь идет о деполяризации его мембраны, сопровождаемой увеличением частоты генерации потенциала действия при неизменности вольт-амперной характеристики и мембранного сопротивления (емкости и постоянной времени) по сравнению с контролем. Отмечено возрастание длительности фаз деполяризации и реполяризации, а также амплитуды следовой гиперполяризации при неизменности других фаз спайка RPaD1. На основании выявленных особенностей формы потенциала действия при гипергликемии предполагается, что указанные изменения могут быть вызваны активацией Na^+ -глюкозного котранспортера и АТФ-чувствительных K^+ -каналов мембраны RPaD1. Действие глюкозы следует рассматривать в качестве метаболического сигнала, в том числе и в отношении непищевых нейронов мозга моллюсков.

Ключевые слова: оборонительное поведение; электрическая активность нейронов; потенциал действия; глюкоза; FMRF-амид; метаболические сигналы.

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

ELECTRICAL PROPERTIES OF THE SENSORY NEURON AND DEFENSE REACTIONS OF MOLLUSC *LYMNAEA STAGNALIS* AT CONDITIONS OF PROLONGED HYPERGLYCEMIA

A. V. SIDOROV^a, V. N. SHADENKO^{a, b}

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

^bRepublican Research and Practice Center for Mental Health,
152 Daŭhinaŭski Tract, Minsk 220053, Belarus

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

Hemolymph glucose level rise (from 0.12 (0.05; 0.18) to 4.10 (3.18; 6.08) mmol/L) modify the defensive behaviour of molluscs. This results in increase of the degree of animal's body retracted into the shell and in reinforcement of weak defense reactions in response to tentacles' tactile stimulation. No fluctuations in the tentacles length and the duration of the latent period of protraction were found. At experimental hyperglycemia (incubation of the isolated CNS preparation in 10 mmol/L D-glucose solution for 2 h), the basic electrical characteristics of FMRFamide-containing neuron RPaD1, involved in sensory stimuli detection and heart beat regulation in *Lymnaea*, were changed. Membrane depolarisation, accompanied by firing rate increase were observed, while current-voltage curve characteristics, as well as membrane resistance, capacity and time constant remains unchanged in comparison with control. An increase in rising and falling phases duration, undershoot amplitude were noted, while other parameters of the RPaD1 spike remained unchanged. Based on the revealed features of the action potential shape at hyperglycemia, it is assumed that these changes can be caused by the activation of the Na^+ -glucose co-transporter and ATP-sensitive K^+ -channels of the RPaD1 membrane. The action of glucose should be considered as a metabolic signal also in relation to non-feeding neurons in the mollusc brain.

Keywords: defense behaviour; neuronal electrical activity; action potential; glucose; FMRFamide; metabolic signals.

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

Введение

Различные нутриенты и метаболиты в значительной степени определяют особенности текущего поведения животных. Среди всего разнообразия таких веществ особенно выделяется глюкоза, чувствительность к уровню которой в интерстиции характерна для многих клеток организма, в том числе нервных [1; 2]. Согласно глюкостатической гипотезе, введенной в обиход в середине XX в. [3], именно реакции глюкозочувствительных клеток мозга, сосредоточенных в области гипоталамуса (если речь идет о млекопитающих), на повышение содержания глюкозы в крови определяют формирование итогового ответа организма, связанного прежде всего с корректировкой пищевого поведения. Чувствительность нейронов к уровню глюкозы во внутренних жидкостях организма (кровь, гемолимфа) отмечена как для позвоночных [4; 5], так и беспозвоночных [6] организмов, т. е. представляет собой общее звено универсального механизма поддержания глюкозного гомеостаза. Более того, нервные клетки беспозвоночных, чувствительные к уровню глюкозы, как правило, относятся к пептидсодержащим нейронам, ответственным за продукцию в том числе инсулиноподобных пептидов [7], например, у моллюсков (*Lymnaea*) или регулирующих содержание инсулина и глюкагона у насекомых (*Drosophila*) [8].

Ранее было установлено, что электрическая активность крупных пептидсодержащих нейронов (VD1 и RPaD2) кардиореспираторной сети ЦНС моллюска *Lymnaea stagnalis* выраженно изменяется уже в первые минуты после многократного возрастания уровня глюкозы в интерстиции [9]. В сочетании с фактом увеличения частоты сердечных сокращений моллюска в условиях гипергликемии [10] и с учетом того, что работа сердца является основополагающей для формирования гидроскелета животного [11], определяя характер движения тела моллюсков, это позволяет предположить, что некоторые моторные формы поведения также претерпят изменение в таких условиях. Для прудовика характерно пассивно-оборонительное поведение, связанное с втягиванием частей тела (щупальца, губы) или прикрытием всего тела раковиной, вплоть до полного его втягивания внутрь [12], в случае действия слабых или сильных тактильных раздражителей соответственно. Благодаря идентификации в ЦНС *L. stagnalis* клеток, участвующих в обработке и передаче различной сенсорной информации [13], в частности расположенного в правом париетальном ганглии пептидергического нейрона RPaD1, открывается дополнительная возможность оценить влияние пролонгированного действия высоких концентраций глюкозы на электрические характеристики мембраны нервных клеток и параметры генерируемых ими сигналов (потенциалов действия), что раньше сделано не было. Именно устоявшиеся изменения электрических свойств нейронов являются начальным звеном в цепи событий, приводящих как к текущей модификации поведения, так и к последующему закреплению и сохранению сформированного ответа, т. е. к научению и памяти, а модуляторное действие глюкозы на эти процессы не вызывает сомнений [14; 15]. Сказанное выше и предопределило проведение данного исследования.

Материалы и методы исследования

В работе использовали моллюсков *L. stagnalis*, собранных в осенний период в мелких мелиоративных каналах на территории Минской области. В лаборатории их содержали в аквариумах (на каждую особь приходилось не менее 1 л воды) при температуре $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$. Смену воды проводили еженедельно. Пищей служили листья салата (питание *ad libitum*). Опыты выполнены на животных одинакового размерного класса с высотой раковины от 3,5 до 4,5 см.

Исследование поведения. При анализе оборонительного поведения моллюсков помещали в чашки Петри, наполненные отстоявшейся водопроводной водой (контрольная группа) или 100 ммоль/л раствором глюкозы, приготовленным на основе отстоявшейся водопроводной воды (опытная группа), по 3 особи в каждую чашку. Отмечали характер реакции животного в ответ на тактильное раздражение щупальца волоском Фрея (максимальная сила воздействия – 10^{-2} Н). Выделяли следующие типы ответов (по мере увеличения выраженности оборонительной реакции): 1 – игнорирование стимула; 2 – ретракция щупальца; 3 – надвигание раковины на передний конец тела; 4 – полное прикрытие тела раковиной. Тестирование проводили на протяжении 2 ч с 15-минутными интервалами между тактильными стимулами. Длину щупалец и участка тела, не прикрытого раковиной, регистрировали с помощью измерителя и линейки, не касаясь тела моллюска, при верхнем равномерном освещении. Латентный период протракции определяли как время, прошедшее с момента помещения моллюска в новые условия (из аквариума в чашку Петри) до начала его выдвижения из раковины и последующей локомоции.

Создание гипергликемии и контроль содержания глюкозы в гемолимфе. Животные опытной группы предварительно в течение 2 ч содержались в аквариумах объемом 10 л, наполненных 100 ммоль/л водным раствором D-глюкозы («ч. д. а.»), а животные контрольной группы аналогичное время находились в «чистой» отстоявшейся водопроводной воде, что способствовало многократному возрастанию содержания глюкозы в гемолимфе [16]. Дополнительный контроль за уровнем глюкозы во внутренней среде проводили по окончании экспериментов по изучению поведения. Для этого сильной тактильной стимуляцией ноги моллюска вызывали реакцию полного втягивания тела, сопровождающуюся выбросом гемолимфы (в среднем объемом около 1 мл). Полученную пробу использовали для определения концентрации глюкозы глюкозооксидазным методом (набор реагентов компании «Анализ X» (Беларусь)). Измерения оптической плотности проводили на длине волны 520 нм (длина оптического пути – 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.

Электрофизиологические исследования. Эксперименты были выполнены на препаратах изолированной ЦНС. Нейроны RPaD1 идентифицировали по расположению в пределах ЦНС, размеру и окраске сомы. Для размягчения периневральной оболочки и облегченного проникновения микроэлектродов в нейроны препараты предварительно обрабатывали раствором проназы (Protease E, type XIV (Sigma, США)) в концентрации 1 мг/мл, приготовленным на нормальном физиологическом растворе для *L. stagnalis*, в течение 5 мин при температуре 20°C . Электрическую активность нейронов регистрировали

после промывки обработанного препарата свежим физиологическим раствором в течение 30 мин. Препараты ЦНС контрольной группы помещали в нормальный физиологический раствор (концентрация указана в миллимолях на литр): NaCl – 44,0; KCl – 1,7; CaCl₂ – 4,0; MgCl₂ · 6H₂O – 1,5; HEPES – 10,0 (pH 7,50 ± 0,03). Препараты ЦНС опытной группы не менее 2 ч инкубировали в нормальном физиологическом растворе, концентрация глюкозы в котором составляла 10 ммоль/л. Внутриклеточную регистрацию электрических параметров нейронов осуществляли с помощью Ag/AgCl-электродов и микроэлектродного усилителя МС-01М (ООО «Линтех», Беларусь). Микропипетки заполняли 2,5 моль/л раствором KCl (сопротивление микроэлектрода – 10–20 МОм). В качестве индифферентного электрода использовали хлорированную серебряную проволоку. Частотные характеристики спонтанной импульсной активности определяли для четырех последовательных 30-секундных участков нейрограммы общей длительностью 2 мин, записанных с шагом квантования 5 мс. Параметры потенциала действия (см. рис. 1 и его описание) для четырех произвольно выбранных спайков оценивали по 30-секундным отрезкам нейрограммы, выполненным с шагом квантования 0,5 мс и обработанным с использованием специальных возможностей программы электронного осциллографа *InputWin* [17]. В случае если нейрон находился в молчащем состоянии (спайковая активность отсутствует), генерацию потенциалов действия вызывали пропусканием через мембрану клетки положительного тока (+0,5 нА).

Для построения кривой вольт-амперной характеристики мембраны, отражающей зависимость сопротивления клетки от мембранного потенциала, последовательно подавали импульсы гиперполяризующего и деполяризующего тока в диапазоне от –2 до +2 нА (с шагом 0,5 нА) длительностью 3 с, одновременно фиксируя значение мембранного потенциала нейрона RPaD1. Полученные данные представляли в графической форме.

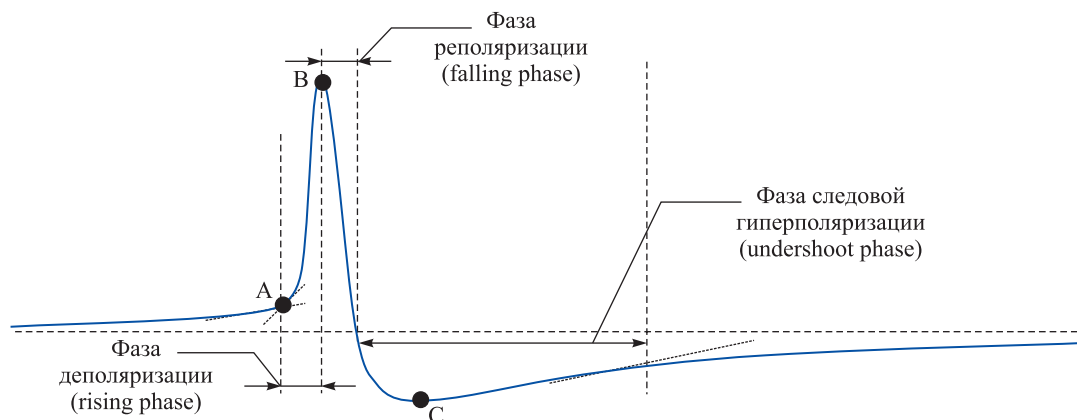


Рис. 1. Оцениваемые в работе амплитудно-временные характеристики потенциала действия (спайка) в нейроне RPaD1 ЦНС *L. stagnalis*. Вертикальные пунктирные линии обозначают границы временных фаз спайка (указаны в поле рисунка). Горизонтальная пунктирная линия отмечает значение потенциала покоя. Амплитуда порога отсчитывалась от уровня потенциала покоя до регенеративного возрастания натриевой проводимости (точка А), амплитуда потенциала действия – до положительного пикового значения спайка (точка В), амплитуда следовой гиперполяризации – до отрицательного пикового значения спайка (точка С). За положительную фазу потенциала действия принят участок от точки А до момента пересечения кривой записи с установленным значением мембранного потенциала (его общая площадь (*S*) ограничена вышеназванными линиями, а средняя площадь (*S/t*) рассчитывается с учетом длительности фазы, обе выражаются в условных машинных единицах (м. е.)), за отрицательную фазу – участок, соответствующий следовой гиперполяризации

Fig. 1. The amplitude-time characteristics of the action potential (spike) in the RPaD1 neuron in the CNS of *L. stagnalis* studied in the present work. Vertical dotted lines separate the boundaries of the spike time phases (indicated in the figure field). Horizontal dotted line marks the value of the resting potential. The threshold amplitude was measured from the resting potential level to a regenerative increase in sodium conductivity (point A), the action potential amplitude – to a positive peak value of spike (point B), undershoot amplitude – to a negative peak value of spike (point C). The positive phase of the action potential was taken from point A to the moment of intersection of the recording curve with the set value of the membrane potential (its total area (*S*) is limited by the above lines, and the average area (*S/t*) is calculated taking into account the phase duration, marked in conditional machine units (m. u.)), for the negative phase – the area corresponding to the undershoot

Постоянную времени мембраны определяли по характеру изменения мембранного потенциала, вызванного приложением гиперполяризующего толчка тока ($-0,5$ нА), как время, когда изменение потенциала клетки достигнет $\frac{1}{e}$ ($\sim 63,2$ %) от максимально наблюдаемого, а значение мембранной емкости вычисляли по формуле

$$\tau_m = R_m \cdot C_m,$$

где τ_m – постоянная времени; R_m – сопротивление; C_m – емкость мембраны.

При этом сопротивление мембраны определяли исходя из входного сопротивления клетки при гиперполяризующем толчке тока ($-0,5$ нА) за вычетом сопротивления микроэлектрода, пренебрегая сопротивлением аксоплазмы и внеклеточной среды.

Статистическая обработка. Нормальность распределения для каждого ряда экспериментальных данных предварительно оценивали с помощью *W*-теста Шапиро – Уилка (Shapiro – Wilk *W*-test). В случае подтверждения нормальности распределения сравниваемых показателей использовали параметрические методы оценки: *t*-критерий Стьюдента (Student's *t*-test) для независимых пар и дисперсионный анализ для повторных измерений (repeated measures ANOVA). Если нормальность распределения показателей не была подтверждена для всех без исключения групп данных, применяли непараметрические методы, в частности *U*-критерий Манна – Уитни (Mann – Whitney *U*-test) (*z*) для попарного сравнения независимых выборок. Данные представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего (нормальное распределение) или медиана (нижний квартиль; верхний квартиль) (непараметрический характер распределения). Уравнения регрессии и значения аппроксимации получены с использованием статистических возможностей программы *Microsoft Excel 2010*. Число наблюдений (*n*) указано для каждого массива данных отдельно. Данные обрабатывали посредством программы *Statistica 6.0*. Достоверными считались результаты при уровне значимости (*p*), равном или меньшем 0,05.

Результаты и их обсуждение

Оборонительное поведение. Инкубация животных в высококонцентрированном растворе глюкозы приводит к модификации характеристик пассивно-оборонительного поведения моллюсков (рис. 2). В частности, речь идет о статистически достоверном увеличении втянутости тела животного в раковину (см. рис. 2, б), в то время как изменений в длине щупалец (см. рис. 2, а) и длительности латентного периода протракции (см. рис. 2, в) выявлено не было.

Проведенный корреляционный анализ (рис. 3) показал, что между уровнем глюкозы в гемолимфе и показателями пассивно-оборонительного поведения как в контроле, так и в условиях экспериментальной гипергликемии практически не существует статистически значимой взаимосвязи. На это указывают небольшие (0,30 и менее) значения коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r_s), а также крайне низкие (0,10 и менее) значения величин достоверности аппроксимации для уравнений, используемых для описания такой зависимости. Единственным исключением являются данные контрольной группы в отношении размеров участка тела, не прикрытого раковиной, когда достоверность аппроксимации для выявленной полиномиальной зависимости составила 0,60 (см. рис. 3, б). При этом в условиях гипергликемии отмечается формирование статистически достоверной взаимосвязи между этим показателем и уровнем глюкозы в гемолимфе (см. рис. 3, д), однако значение достоверности аппроксимации для полученного уравнения регрессии невелико (0,20).

Также установлено, что увеличение содержания глюкозы во внутренней среде приводит к возрастанию доли слабых защитных реакций (ретракция щупальца) в ответ на тактильную стимуляцию покровов моллюска (рис. 4, а) прежде всего за счет снижения числа сильных оборонительных реакций, связанных с полным прикрытием тела животного раковиной и игнорированием стимула. При этом формирование различий между контрольной и опытной группами приходится на 2-й час экспериментальной сессии (ср. рис. 4, б и в).

Проведенный по окончании изучения оборонительного поведения контроль содержания глюкозы в гемолимфе выявил наличие статистически достоверных различий ($z = 6,30$; $p < 0,0001$, *U*-критерий Манна – Уитни) между контрольной (0,12 (0,05; 0,18) ммоль/л, $n = 28$) и опытной (4,10 (3,18; 6,08) ммоль/л, $n = 26$) группами моллюсков, что дополнительно подтверждает развитие гипергликемии у соответствующей группы в использованной экспериментальной модели.

Электрические свойства мембраны и параметры потенциала действия RPaD1. В отношении оцениваемых электрических характеристик мембраны нейрона RPaD1 (сопротивление, емкость, постоянная времени) статистически достоверных различий между контрольной и опытной (гипергликемия) группами выявлено не было (см. таблицу).

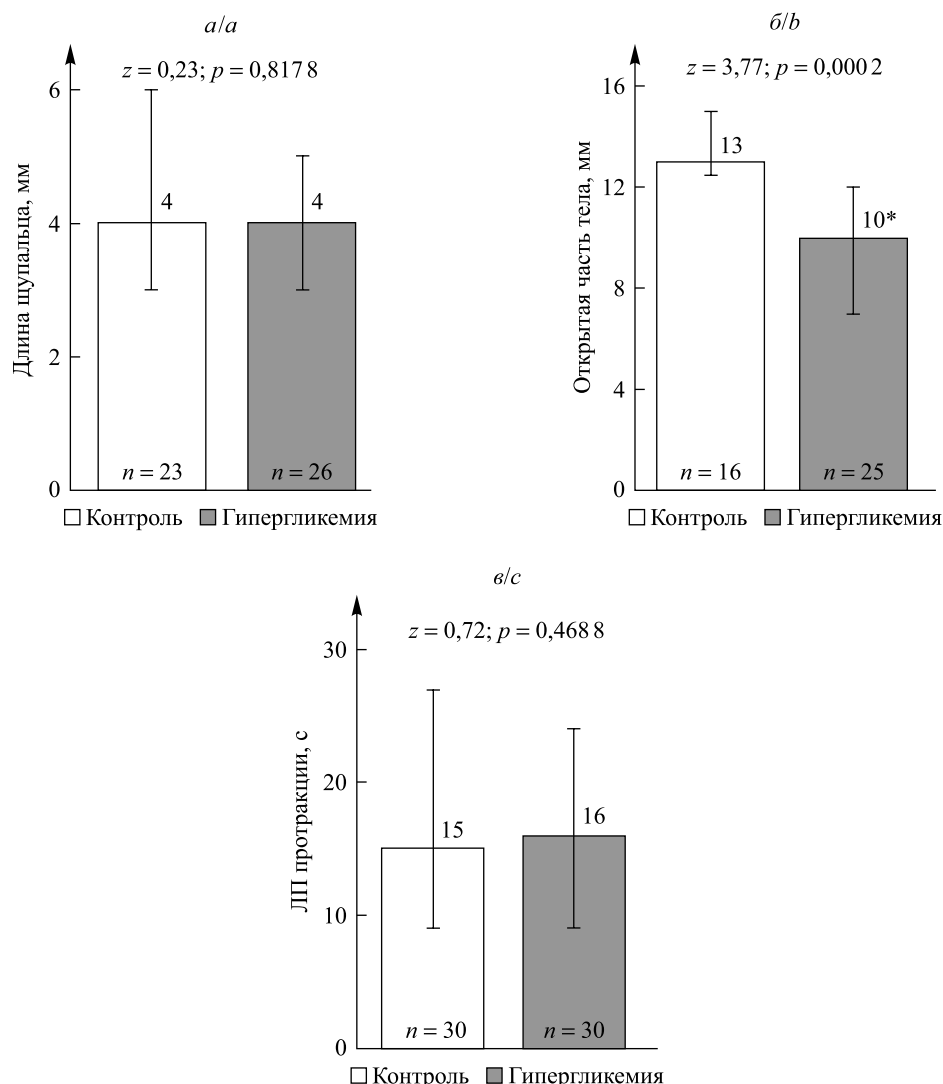


Рис. 2. Показатели пассивно-оборонительного поведения *L. stagnalis* в контроле и в условиях экспериментальной гипергликемии:

a – длина щупальца; *б* – длина участка тела, не прикрытого раковиной; *в* – длительность латентного периода (ЛП) протракции.

Представлено значение показателя (числа над столбиками – медиана, планки погрешностей – нижний, верхний квартили), число животных в серии (*n*).

Для каждой группы сравнения указаны значения *U*-критерия Манна – Уитни (*z*) и уровня значимости (*p*).

Статистически достоверные изменения дополнительно отмечены астериском

Fig. 2. Defensive behaviour of *L. stagnalis* in control and under conditions of experimental hyperglycemia:

a – tentacle length; *b* – the length of the body part uncovered by the shell;

c – duration of the latent period (LP) of protraction. Experimental meaning (numbers above the columns – median, error bars – lower, upper quartiles), the number of animals

in the experimental groups (*n*) are presented. For each comparison group, Mann – Whitney *U*-test (*z*) and significance level (*p*) are indicated. Significant changes are additionally marked by asterisk

Электрические характеристики мембраны нейрона RPaD1

Electrical properties of RPaD1 neuronal membrane

Оцениваемый показатель	Контроль (<i>n</i> = 9)	Гипергликемия (<i>n</i> = 9)	Статистические различия (<i>t</i> -критерий; уровень значимости)
Сопротивление (R_m), МОм	29,9 ± 6,6	27,3 ± 5,2	$t = 0,30$; $p = 0,7676$
Емкость (C_m), нФ	8,6 ± 2,5	7,6 ± 1,2	$t = 0,38$; $p = 0,7110$
Постоянная времени (τ_m), мс	227,0 ± 54,5	214,0 ± 48,0	$t = 0,18$; $p = 0,8628$

Примечание. Данные представлены как среднее ± ошибка среднего.

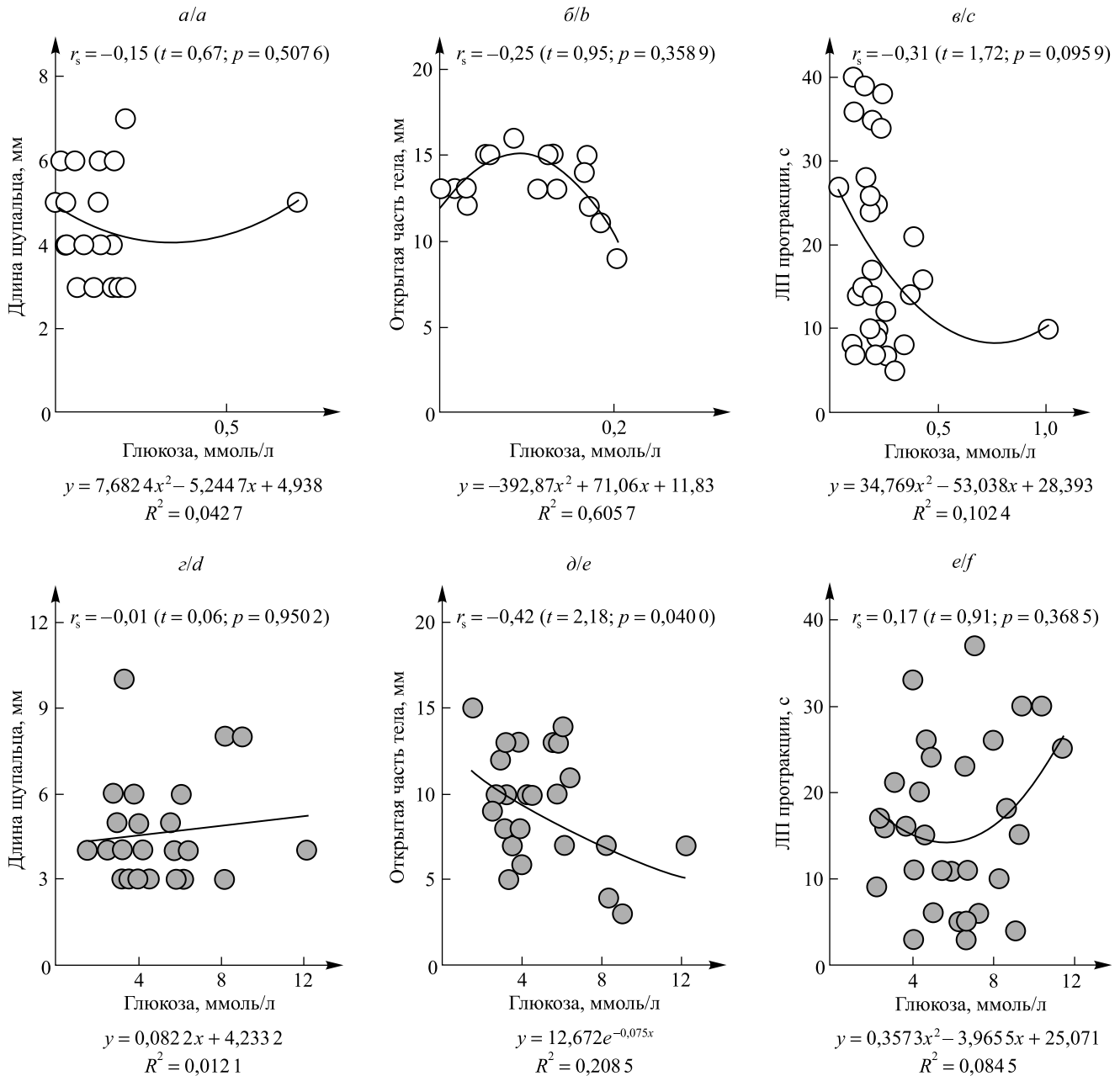


Рис. 3. Взаимосвязь между показателями пассивно-оборонительного поведения и уровнем глюкозы в гемолимфе *L. stagnalis* в контроле (a – в) и в условиях экспериментальной гипергликемии (г – е):

a, г – длина щупальца; б, д – длина участка тела, не прикрытого раковиной; в, е – длительность латентного периода (ЛП) протракции.

Представлены значения для проб гемолимфы отдельно по каждому моллюску.

Светлые круги – контрольная группа, темные круги – опытная группа (гипергликемия).

Для каждого показателя представлено значение коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r_s) с указанием значения его t -критерия Стьюдента (t) и уровня значимости (p) (вверху диаграммы), а также уравнение регрессии (y) с максимальной достоверностью аппроксимации (R^2) (внизу диаграммы)

Fig. 3. The relationship between the defensive behaviour parameters of *L. stagnalis* and its hemolymph glucose level in control (a – c) and under conditions of experimental hyperglycemia (d – f):

a, d – tentacle length; б, e – the length of the body part uncovered by the shell;

c, f – duration of the latent period (LP) of protraction. The values for hemolymph samples

are presented separately for each mollusc. Light circles – control group, dark circles – experimental group (hyperglycemia).

For each parameter, the Spearman's rank correlation coefficient (r_s) is shown, supplemented by Student's t -test value (t) and significance level (p) (top of the diagram), as well as by the regression equation (y) with the maximum approximation confidence (R^2) (bottom of the diagram)

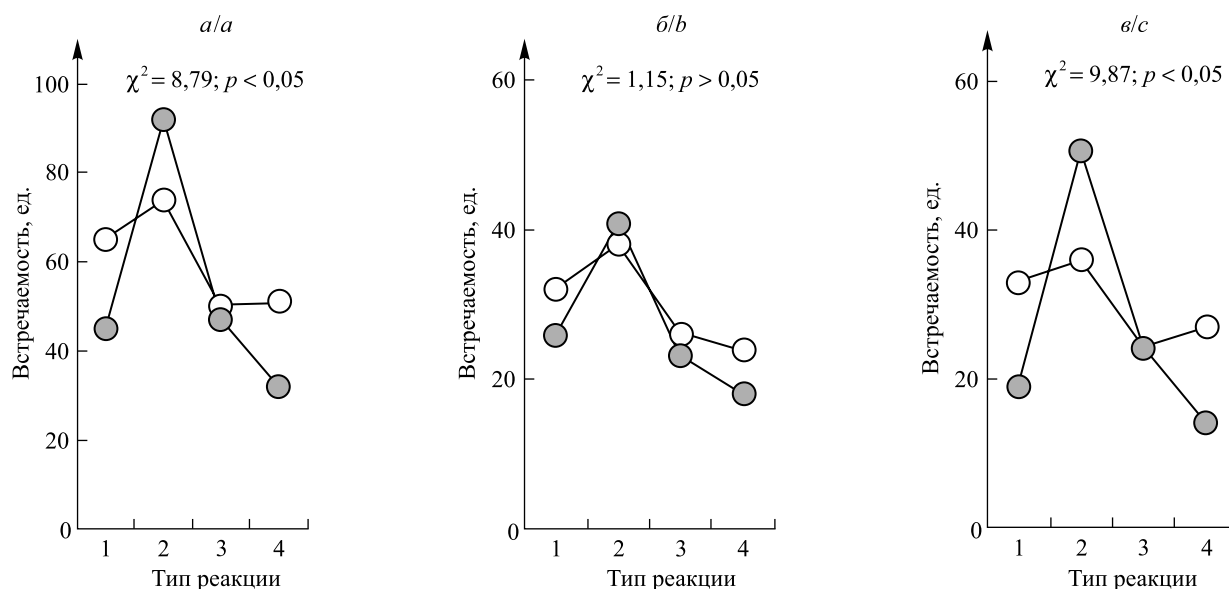


Рис. 4. Оборонительные реакции *L. stagnalis* в ответ на тактильную стимуляцию щупальца волоском Фрея (максимальная сила воздействия – 10^{-2} Н) в контроле и в условиях экспериментальной гипергликемии: а – за 2 ч наблюдения; б – в течение 1-го часа наблюдения; в – в течение 2-го часа наблюдения. Типы реакции: 1 – игнорирование стимула; 2 – ретракция щупальца; 3 – надвигание раковины на передний конец тела; 4 – полное прикрытие тела раковинной. Светлые круги – контрольная группа, темные круги – опытная группа (гипергликемия). Представлено значение критерия χ^2 и уровня значимости (p). Для статистически достоверных различий $p < 0,05$

Fig. 4. Defensive reactions of *L. stagnalis* in response to tactile stimulation of the tentacle by Frey's hair (maximum strength impact – 10^{-2} N) in control and under conditions of experimental hyperglycemia: a – for 2 h of observation; b – during the 1st hour of observation; c – during the 2nd hour of observation.

Reaction types: 1 – ignoring the stimulus; 2 – retraction of the tentacle; 3 – pushing the shell onto the anterior end of the body; 4 – complete covering of the body by a shell. Light circles – control group, dark circles – experimental group (hyperglycemia). The χ^2 test value and significance level (p) are presented. For statistically significant differences, $p < 0.05$

В отношении мембранного потенциала нейрона RPaD1 было отмечено статистически достоверное (в 1,24 раза) уменьшение его величины в опытной группе по сравнению с контролем (рис. 5, а), т. е. деполяризация мембраны. Лишь в двух из девяти клеток контрольной группы выявлено наличие спонтанной ритмики (генерация спайков), в то время как в опытной группе только один из девяти нейронов изначально находился в молчащем состоянии. Даже в случае искусственной стимуляции молчащих нейронов RPaD1 контрольной группы полученные значения для частоты генерации потенциала действия были статистически достоверно (в 1,75 раза) меньше по сравнению с таковыми, естественно наблюдаемыми в условиях гипергликемии (рис. 5, б). В отношении вольт-амперной характеристики мембраны статистически достоверных различий, согласно данным дисперсионного анализа для повторных измерений (repeated measures ANOVA), отмечено не было ($F = 1,04$; $p = 0,41$), в том числе отдельно для положительных (выходящих) и отрицательных (входящих) токов (рис. 5, в).

Ряд временных и амплитудных характеристик спайка RPaD1 также претерпевали изменения в ходе эксперимента (рис. 6, 7). Следует отметить увеличение скорости медленной деполяризации мембраны в условиях гипергликемии (см. рис. 6, б и в, область А), а также выраженности следовой гиперполяризации (см. рис. 6, б и в, область В), наблюдаемое вне зависимости от характера спайковой активности (вызванная или спонтанная), ее частоты, типа (формы) спайка. В ходе более детального анализа выявлены крайне незначительное (в 1,19 раза) возрастание длительности фазы деполяризации (см. рис. 7, а) и гораздо более существенное (в 1,61 раза) увеличение длительности фазы реполяризации (см. рис. 7, б) потенциала действия в нейронах в условиях экспериментальной гипергликемии по сравнению с контролем. В то же время статистически достоверных различий в длительности фазы следовой гиперполяризации не обнаружено (см. рис. 7, в). В отношении амплитуды фаз спайка единственное статистически достоверное изменение (в 1,33 раза) отмечено для следовой гиперполяризации (см. рис. 7, е), тогда как амплитуды потенциала действия (см. рис. 7, г) и порога его генерации (см. рис. 7, д) не претерпевают значимых колебаний в условиях экспериментальной гипергликемии по сравнению с контролем.

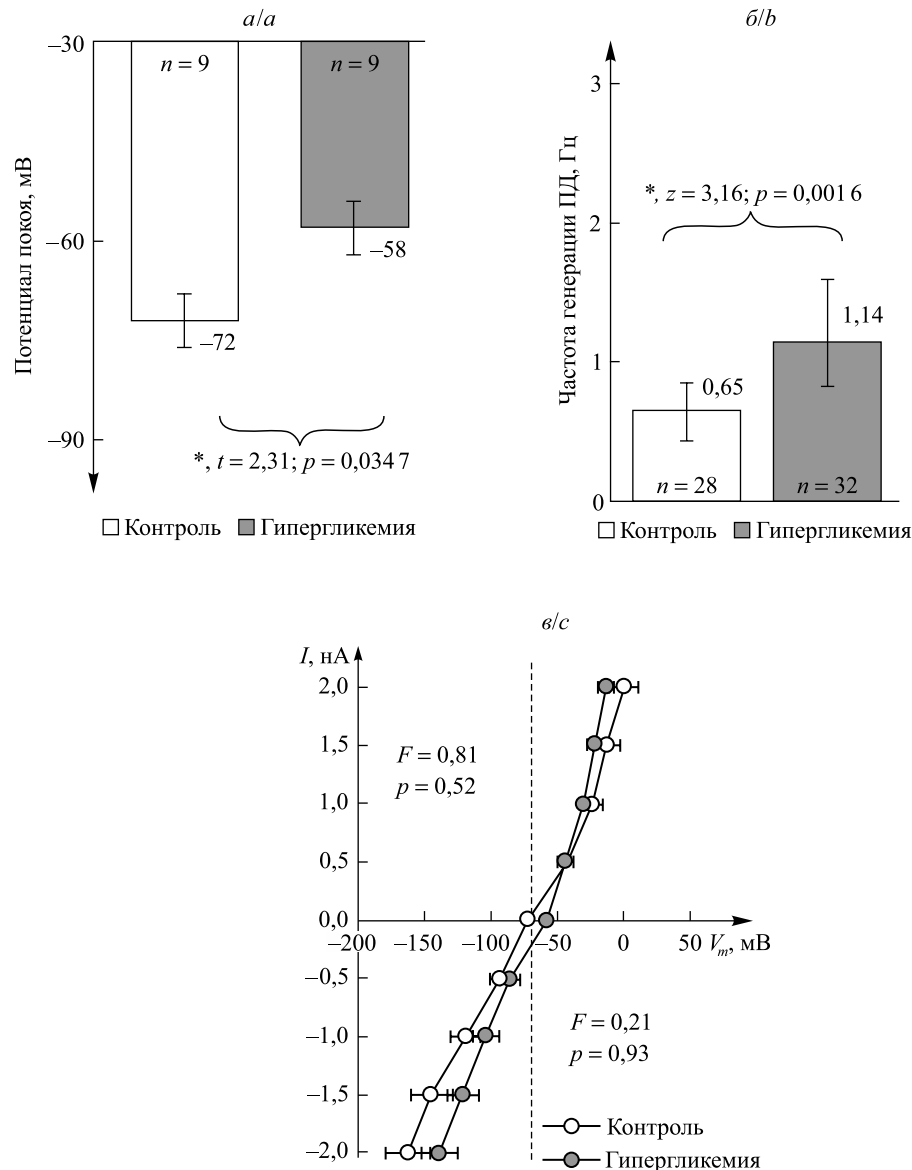
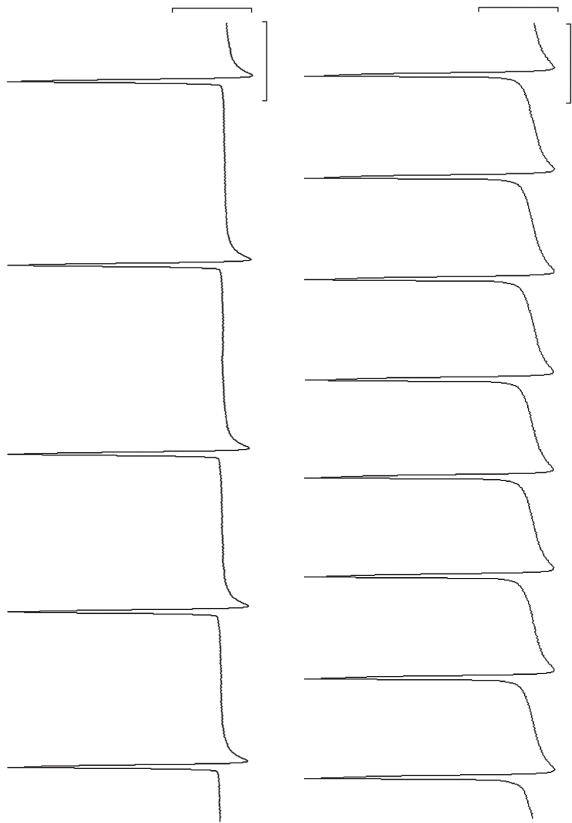


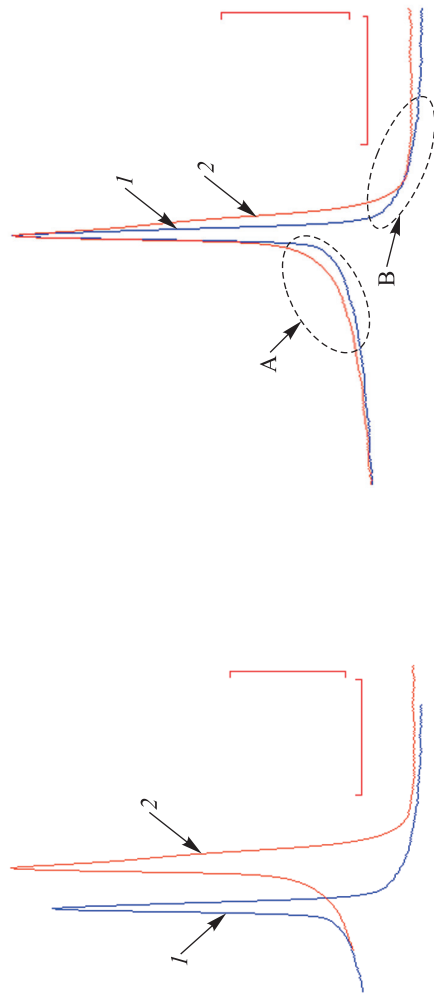
Рис. 5. Электрические характеристики нейрона RPaD1 в ЦНС *L. stagnalis* в контроле и в условиях экспериментальной гипергликемии:
а – потенциал покоя; б – частота генерации потенциала действия (ПД);
в – вольт-амперная характеристика мембраны. Представлено значение показателя (числа над столбиками – среднее (для части а) или медиана (для части б), планки погрешностей – ошибка среднего (для части а) или нижний, верхний квартили (для части б)), число проанализированных нейронов (для части а) или участков нейронаграммы (для части б) (n).
Для каждой группы сравнения указаны значения t-критерия Стьюдента (t) (для части а) или U-критерия Манна – Уитни (z) (для части б) и уровня значимости (p).
Статистически достоверные изменения дополнительно отмечены астерiskом.
Для части в указаны значения F-критерия Фридмана (F) и уровня значимости (p) в случае дисперсионного анализа для повторных измерений отдельно для положительных (левый верхний угол диаграммы) и отрицательных (правый нижний угол диаграммы) токов. Вертикальная пунктирная линия представлена для наглядности изменений вольт-амперной характеристики

Fig. 5. Electrical properties of RPaD1 neuron in the CNS of *L. stagnalis* in control and under conditions of experimental hyperglycemia:
a – membrane potential; b – firing rate; c – current-voltage curve. Experimental meaning (numbers above the columns – mean (for part a) or median (for part b), error bars – standard error of the mean (for part a) or lower, upper quartiles (for part b)), the number of neurons under the study (for part a) or amount of 30 s record sections (for part b) (n) are presented. For each comparison group, Student's t-test (t) (for part a) or Mann – Whitney U-test (z) (for part b) and significance level (p) are indicated. Significant changes are additionally marked by asterisk. For part c, Friedman's F-test (F) and significance level (p) for repeated measures ANOVA are indicated separately for positive (upper left corner of the chart) and negative (lower right corner of the chart) currents. The vertical dotted line is shown for the convenience of perception of current-voltage curve changes

a/a



δ/b



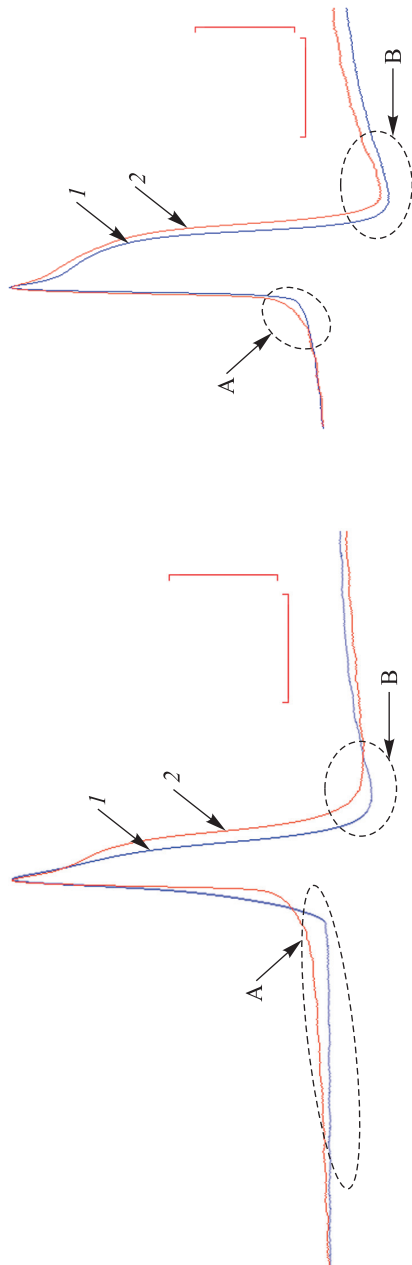


Рис. 6. Спонтанная электрическая активность нейрона RPaD1 в ЦНС *L. stagnalis* (a) и форма его спайков (б, в) в контроле и в условиях экспериментальной гипергликемии.

Часть а содержит записи от разных нейронов RPaD1. Верхняя линия записи – контроль, нижняя – гипергликемия. Калибровка: по времени – 0,5 с, по амплитуде – 30 мВ.

Часть б представляет изображение наложенных друг на друга потенциалов

действия нейрона RPaD1 разных препаратов ЦНС (слева – наложение со смещением вправо для иллюстрации изменений амплитудных характеристик спайка, справа – наложение с совмещением пикового значения и уровня потенциала покоя, сопровождаемое выравниванием амплитуд потенциалов действия средствами графического редактора (по высоте рисунка), отражающее изменение временных характеристик действия

Участки записи, отражающие изменения медленной деполаризации и следовой гиперполяризации мембраны, акцентированы пунктирной линией (области А и В соответственно). Спайк синего цвета (1) – контроль (вызванные потенциалы, частота – 0,80 Гц), спайк красного цвета (2) – гипергликемия (спонтанные потенциалы, частота – 0,27 Гц). Калибровка: по времени – 50 мс, по амплитуде – 25 мВ.

Часть в имеет те же обозначения, что и часть б. Слева – контроль (вызванные потенциалы, частота – 0,77 Гц), гипергликемия (спонтанные потенциалы, частота – 1,63 Гц). Справа – контроль (спонтанные потенциалы, частота – 2,93 Гц), гипергликемия (спонтанные потенциалы, частота – 3,17 Гц). Наложение спайков такое же, как для части б, справа.

Калибровка: по времени – 50 мс, по амплитуде – 30 мВ

Fig. 6. Spontaneous electrical activity of RPaD1 neuron in the CNS of *L. stagnalis* (a) and its spikes shapes (b, c) in control and under conditions of experimental hyperglycemia.

Part a contains recordings from different RPaD1 neurons. Top trace – control, bottom trace – hyperglycemia. Calibration: time – 0.5 s, amplitude – 30 mV.

Part b represents overlapping images of action potentials of the RPaD1 neurons

from different CNS preparations (left – overlapping with right shift, illustrating spike amplitude changes, right – overlapping with peak and rest potential values superposition, accompanied by action potential amplitudes equalisation by means of a graphics editor (along the height of the figure), illustrating spike time-course changes).

Parts of the record reflecting changes in slow depolarisation and undershoot are accented

by dotted lines (areas A and B, respectively). Blue spike (1) – control (evoked potentials, 0.80 Hz), red spike (2) – hyperglycemia (spontaneous potentials, 0.27 Hz). Calibration: time – 50 ms, amplitude – 25 mV.

Part c has the same as for part b. Left – control (evoked potentials, 0.77 Hz),

hyperglycemia (spontaneous potentials, 1.63 Hz). Right – control (spontaneous potentials, 2.93 Hz), hyperglycemia (spontaneous potentials, 3.17 Hz). Overlapping images – the same as for b (right part).

Calibration: time – 50 ms, amplitude – 30 mV

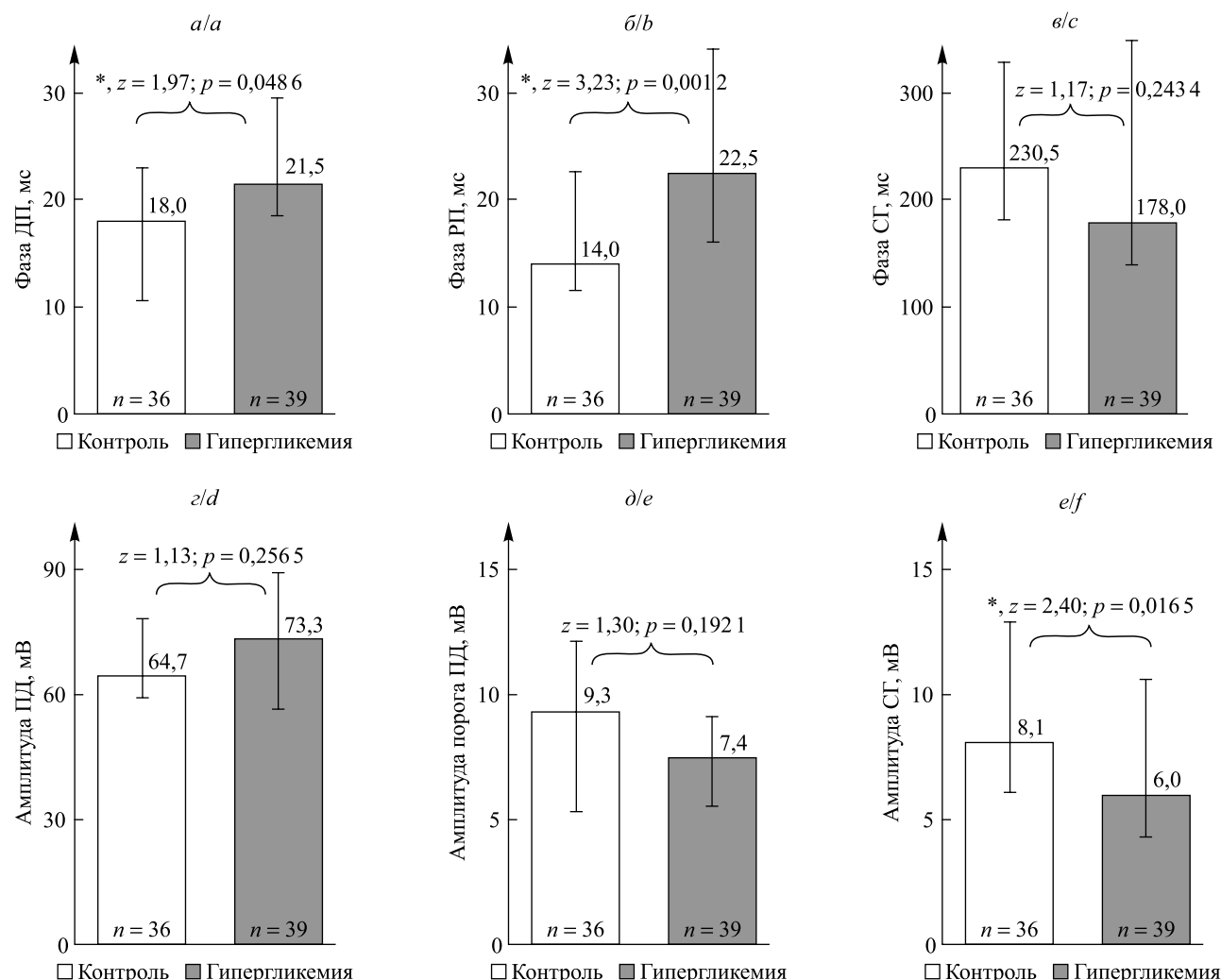


Рис. 7. Амплитудно-временные характеристики спайка в нейроне RPaD1 в ЦНС *L. stagnalis* в контроле и в условиях экспериментальной гипергликемии:

а – длительность фазы деполаризации (ДП); б – длительность фазы реполаризации (РП); в – длительность фазы следовой гиперполяризации (СГ); г – амплитуда потенциала действия (ПД); д – амплитуда порога потенциала действия (ПД); е – амплитуда следовой гиперполяризации (СГ). Описание фаз спайка см. на рис. 1. Представлено значение показателя (числа над столбиками – медиана, планки погрешностей – нижний, верхний квартили), число проанализированных спайков (n). Для каждой группы сравнения указаны значения U -критерия Манна – Уитни (z) и уровни значимости (p). Статистически достоверные изменения дополнительно отмечены астериском

Fig. 7. Amplitude-time characteristics of the spike in RPaD1 neuron in the CNS of *L. stagnalis* in control and under conditions of experimental hyperglycemia:

а – rising phase (depolarisation, DP) duration; б – falling phase (repolarisation, RP) duration; в – undershoot (US) phase duration; г – action potential (AP) amplitude; д – threshold amplitude; е – undershoot amplitude. See fig. 1 for details of spike phases description. Experimental meaning (numbers above the columns – median, error bars – lower, upper quartiles), the number of spikes under the study (n) are presented. For each comparison group, Mann – Whitney U -test (z) and significance level (p) are indicated. Significant changes are additionally marked by asterisk

Как следствие, такие интегральные показатели спайка, как общая и средняя площадь его фаз, претерпевали статистически выраженные изменения лишь в отношении негативной фазы, т. е. фактически следовой гиперполяризации (рис. 8). Речь идет о снижении в 1,57 и 1,24 раза общей и средней площади этой фазы соответственно для нейронов опытной группы. Характеристики положительной фазы потенциала действия не претерпевали статистически значимых изменений по сравнению с контролем.

Обсуждение результатов. Модификация оборонительного поведения, наблюдаемая в условиях экспериментальной гипергликемии, носит разнонаправленный характер: с одной стороны, происходит усиление выраженности оборонительной доминанты (большая степень прикрытия тела животного раковинной), а с другой – смещение реакции на тактильную стимуляцию в сторону слабых оборонительных ответов, правда, и за счет уменьшения числа ответов, связанных с игнорированием стимула, а целый ряд

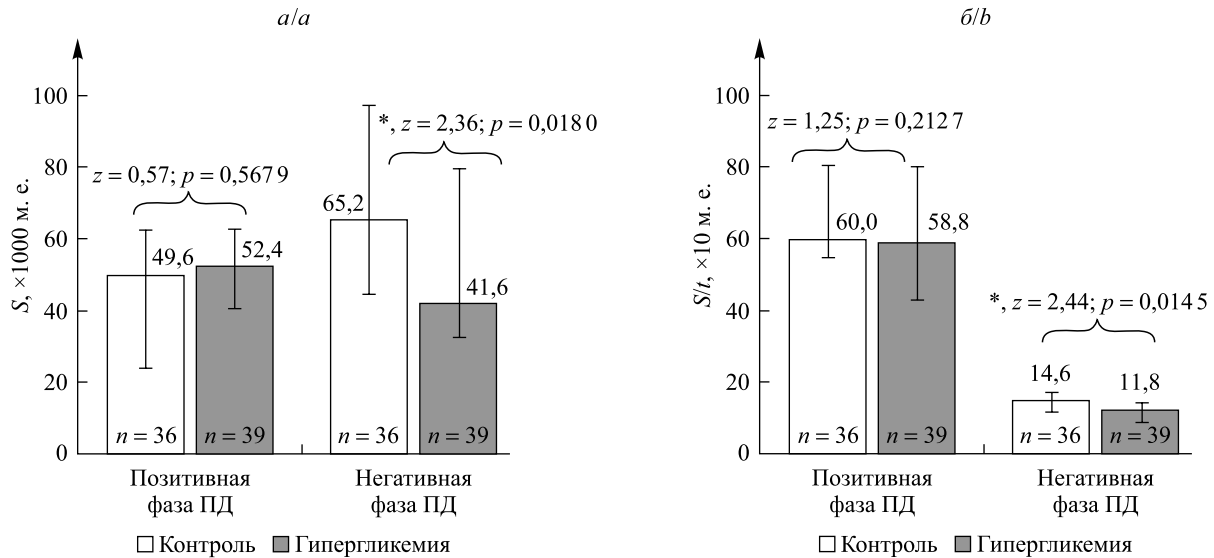


Рис. 8. Интегральные параметры спайка в нейроне RPaD1 в ЦНС *L. stagnalis* в контроле и в условиях экспериментальной гипергликемии:

а – общая площадь (S) фазы спайка; б – средняя площадь (S/t) фазы спайка.

Описание фаз спайка см. на рис. 1. Представлено значение показателя (числа над столбиками – медиана, планки погрешностей – нижний, верхний квартили), число проанализированных спайков (n).

Для каждой группы сравнения указаны значения U-критерия Манна – Уитни (z) и уровня значимости (p).

Статистически достоверные изменения дополнительно отмечены астериском

Fig. 8. Integral parameters of a spike in RPaD1 neuron in the CNS of *L. stagnalis* in control and under conditions of experimental hyperglycemia:

a – total area (S) of the spike phase; b – average area (S/t) of the spike phase.

See fig. 1 for details of spike phases description. Experimental meaning (numbers above the columns – median, error bars – lower, upper quartiles), the number of spikes under the study (n) are presented.

For each comparison group, z (Mann – Whitney U-test) and significance level (p) are indicated.

Significant changes are additionally marked by asterisk

показателей не претерпевают статистически значимых изменений. Такое положение дел может быть обусловлено тем, что действие глюкозы ограничено определенным диапазоном концентраций. В частности, при изучении оборонительных реакций наземного моллюска *Helix lucorum*, связанных с отдергиванием его ноги, установлено, что повышение уровня глюкозы в гемолимфе облегчает развитие подобного ответа [18]. В то же время внутриволокнистая инъекция растворов глюкозы (0,5 мл), также облегчающая развитие такой реакции, была эффективна в случае использования концентрации 5,0 ммоль/л, но не 2,5 или 10,0 ммоль/л. В своих дальнейших работах [19] эти же авторы показали, что введение животным аналогов гастрин- и холецистокининподобных пептидов воспроизводит эффекты повышения уровня глюкозы в гемолимфе. Это дополнительно подчеркивает роль нейроэндокринных пептидсодержащих клеток, которыми достаточно богат мозг моллюсков, в том числе *Lymnaea* [20], в формировании поведенческого ответа при гипергликемии. Состояние, связанное с частичным прикрытием тела раковины, а также сохранность реакций на тактильные стимулы при гипергликемии однозначно свидетельствуют об эффективной работе сердца моллюска, создающего надлежащее давление гемолимфы, которое обеспечивает функционирование гидроскелета (в противном случае животное было бы не в состоянии осуществлять движения тела). Увеличение уровня глюкозы в гемолимфе *L. stagnalis* ассоциируется с возрастанием частоты сердечных сокращений [10].

Содержащий FMRF-амид нейрон RPaD1 [21] вовлечен в обработку и передачу различной сенсорной информации [13], а также регуляцию биения сердца и развития оборонительных реакций, связанных с втягиванием тела животного (*withdrawal*) в раковину [20]. По всей видимости, выделение FMRF-амида является одной из реакций нейрона RPaD1 на возрастание уровня глюкозы в гемолимфе. В пользу этого говорят наблюдаемые факты деполяризации и значительного усиления частоты импульсации этой клетки в условиях экспериментальной гипергликемии. Схожие реакции отмечены и в отношении других пептидсодержащих нейронов ЦНС *Lymnaea*, в частности светло-зеленых клеток церебральных ганглиев, усиление электрической активности которых наблюдается при нарастании содержания глюкозы (максимум при ее уровне 5,0 ммоль/л) и сопровождается выбросом инсулиноподобных пептидов [7], реализующих свое действие в отношении других нейронных сетей. В этом случае выделяемый RPaD1 FMRF-амид, обладающий кардиостимулирующим действием, способен к активации истинных кардиорегуляторных

нейронов, преимущественно расположенных [22] в правом париетальном или соседнем с ним висцеральном ганглии (отростки RPaD1 не найдены в области сердца моллюска [11]), в том числе и по механизму объемной передачи сигнала, не будучи ограничен узким пространством синаптической щели.

Среди возможных механизмов такой глюкозоиндуцированной активации RPaD1 следует отметить следующие. Во-первых, речь может идти о снятии тормозных синаптических влияний, в результате которых эта клетка обычно находится в молчащем состоянии [23]. Однако полученные нами данные в отношении неизменности сопротивления (емкости и постоянной времени) мембраны в условиях гипергликемии говорят о сохранности способности этой клетки к нейронной интеграции (временной суммации) на не отличающемся от контроля уровне. При этом изменения формы спайка свидетельствуют о модификации свойств собственно мембраны RPaD1. Отмеченное фактическое «расширение» спайка может быть следствием более высокой частоты генерации потенциала действия при гипергликемии (частотная зависимость длительности спайка хорошо известна) [24; 25]. Однако выраженность эффекта при гипергликемии даже в случае более низких частот импульсации клетки, по сравнению с контролем (см. рис. 6, б), говорит в пользу частотно-независимой составляющей. В связи с этим стоит отметить, что повышение уровня глюкозы сопровождается активацией Na^+ -глюкозного котранспортера в пептидсодержащих нейронах *Lymnaea* [7], как следствие, речь идет об усилении входящих, деполяризующих мембрану клетки потоков натрия (возрастание скорости медленной деполяризации отчетливо прослеживается при гипергликемии) (см. рис. 6). Замедление реполяризации, в том числе и уменьшение амплитуды следовой гиперполяризации, очевидно, является следствием модификации K^+ -проводимости мембраны. Известно, что поступление глюкозы в нейроны усиливает в них продукцию АТФ [26], а возрастание ее уровня в цитоплазме может приводить к закрытию АТФ-зависимых K^+ -каналов, представленных в нервных клетках как позвоночных [27], так и беспозвоночных [28], уменьшая потоки калия через мембрану. Такой механизм хорошо объясняет снижение уровня мембранного потенциала (деполяризация) и повышение возбудимости нейрона, наблюдаемые при гипергликемии (см. рис. 5, а), однако факт отсутствия сенсора напряжения в структуре АТФ-зависимых K^+ -каналов предполагает их потенциал-независимость, а следовательно, и неучастие в развитии потенциала действия, хотя имеются сведения [29] о двойном (уровень внутриклеточного АТФ и значение мембранного потенциала) управлении (*gating*) этими каналами. В то же время ингибирующее действие АТФ [30] и глюкозозависимых полипептидов (инкретины) [31] в отношении потенциалчувствительных калиевых каналов ряда специализированных клеток позвоночных хорошо известно. Можно предположить, что подобный механизм(-ы) может быть реализован в отношении нейронов прудовика, обуславливая наблюдаемый эффект возрастания длительности фазы реполяризации потенциала действия, однако такое предположение нуждается в дополнительной экспериментальной проверке.

Таким образом, глюкоза выступает в качестве метаболического сигнала, пролонгированное действие которого выражено модифицирует электрические свойства пептидсодержащих (FMRF-амидсодержащих) клеток ЦНС моллюска *L. stagnalis*, предопределяя модификацию оборонительных ответов животного в новых условиях.

Библиографические ссылки

1. Steinbusch L, Labouëbe G, Thorens B. Brain glucose sensing in homeostatic and hedonic regulation. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2015;26(9):455–466. DOI: 10.1016/j.tem.2015.06.005.
2. 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.
3. Mayer J. Glucostatic mechanism of regulation of food intake. *The New England Journal of Medicine*. 1953;249(1):13–16. DOI: 10.1056/NEJM195307022490104.
4. Karnani M, Burdakov D. Multiple hypothalamic circuits sense and regulate glucose levels. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2011;300(1):R47–R55. DOI: 10.1152/ajpregu.00527.2010.
5. Routh VH. Glucose sensing neurons in the ventromedial hypothalamus. *Sensors*. 2010;10(10):9002–9025. DOI: 10.3390/s101009002.
6. Dus M, Lai JS-Y, Gunapala KM, Min S, Tayler TD, Hergarden AC, et al. Nutrient sensor in the brain directs the action of the brain-gut axis in *Drosophila*. *Neuron*. 2015;87(1):139–151. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.05.032.
7. Kits KS, Bobeldijk RC, Crest M, Lodder JC. Glucose-induced excitation in molluscan central neurons producing insulin-related peptides. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology*. 1991;417(6):597–604. DOI: 10.1007/BF00372957.
8. Oh Y, Lai JS-Y, Mills HJ, Erdjument-Bromage H, Giammarinaro B, Saadipour K, et al. A glucose-sensing neuron pair regulates insulin and glucagon in *Drosophila*. *Nature*. 2019;574(7779):559–564. DOI: 10.1038/s41586-019-1675-4.
9. Sidorov AV, Shadenko VN. Electrical activity of identified neurons in the central nervous system of a mollusk *Lymnaea stagnalis* under acute hyperglycemia. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2021;57(6):1257–1266. DOI: 10.1134/S0022093021060065.

10. Сидоров АВ, Шаденко ВН, Казакевич ВБ. Реакции идентифицированных кардиорегуляторных нейронов ЦНС моллюска *Lymnaea stagnalis* в условиях гипергликемии и при действии инсулина. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;3:49–58. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-3-49-58.
11. Сафонова ТА, Журавлев ВЛ, Ноздрачев АД. *Кардиореспираторная система моллюсков: структура, функции, механизмы регуляции*. Санкт-Петербург: Издательство Санкт-Петербургского университета; 2008. 244 с.
12. Сидоров АВ. *Функциональная активность нервных центров беспозвоночных*. Минск: БГУ; 2011. 247 с.
13. Zaitseva OV, Shuvalova NE. Morphological properties of neuron RPD1 in *Lymnaea stagnalis* and its involvement in processing of polymodal sensory information. *Neurophysiology*. 1988;20(6):571–578. DOI: 10.1007/BF02150261.
14. Koekkoek LL, Mul JD, la Fleur SE. Glucose-sensing in the reward system. *Frontiers in Neuroscience*. 2017;11:716. DOI: 10.3389/fnins.2017.00716.
15. Mita K, Okuta A, Okada R, Hatakeyama D, Otsuka E, Yamagishi M, et al. What are the elements of motivation for acquisition of conditioned taste aversion? *Neurobiology of Learning and Memory*. 2014;107:1–12. DOI: 10.1016/j.nlm.2013.10.013.
16. 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. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-1-79-84.
17. Солтанов ВВ, Бурко ВЕ. Компьютерные программы обработки электрофизиологических данных. *Новости медико-биологических наук*. 2005;1:91–95.
18. Шевелкин АВ, Шумова ЕА. Роль глюкозы в облегчении оборонительных реакций во время приема пищи у виноградных улиток *Helix lucorum*. *Журнал высшей нервной деятельности имени И. П. Павлова*. 1993;43(3):577–584.
19. Shevelkin AV. Facilitation of defense reactions during the consumption of food in snails: the participation of glucose and gastrin/cholecystokinin-like peptide. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 1994;24(1):115–124. DOI: 10.1007/BF02355661.
20. Benjamin PR, Kemenes I. Peptidergic systems in the pond snail *Lymnaea*: from genes to hormones and behavior. In: Saleuddin S, Lange AB, Orchard I, editors. *Advances in invertebrate (neuro)endocrinology: a collection of reviews in the post-genomic era. Volume 1. Phyla other than Arthropoda*. New York: Apple Academic Press; 2020. p. 213–254. DOI: 10.1201/9781003029854-7.
21. Bright K, Kellett E, Saunders SE, Brierley M, Burke JF, Benjamin PR. Mutually exclusive expression of alternatively spliced FMRFamide transcripts in identified neuronal systems of the snail *Lymnaea*. *Journal of Neuroscience*. 1993;13(6):2719–2729. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.13-06-02719.1993.
22. Buckett KJ, Peters M, Dockray GJ, Van Minnen J, Benjamin PR. Regulation of heartbeat in *Lymnaea* by motoneurons containing FMRFamide-like peptides. *Journal of Neurophysiology*. 1990;63(6):1426–1435. DOI: 10.1152/jn.1990.63.6.1426.
23. Benjamin PR, Winlow W. The distribution of three wide-acting synaptic inputs to identified neurons in the isolated brain of *Lymnaea stagnalis* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology*. 1981;70(3):293–307. DOI: 10.1016/0300-9629(81)90182-1.
24. Winlow W. The plastic nature of action potentials. In: Bulloch A, editor. *The cellular basis of neuronal plasticity: physiology, morphology and biochemistry of molluscan neurons*. Manchester: Manchester University Press; 1989. p. 3–27 (Studies in neuroscience; No. 7).
25. Edstrom JP, Lukowiak KD. Frequency-dependent action potential prolongation in *Aplysia* pleural sensory neurones. *Neuroscience*. 1985;16(2):451–460. DOI: 10.1016/0306-4522(85)90017-x.
26. López-Gamero AJ, Martínez F, Salazar K, Cifuentes M, Nualart F. Brain glucose-sensing mechanism and energy homeostasis. *Molecular Neurobiology*. 2019;56(2):769–796. DOI: 10.1007/s12035-018-1099-4.
27. Chin-Wei Huang, Chao-Ching Huang, Juei-Tang Cheng, Jing-Jane Tsai, Sheng-Nan Wu. Glucose and hippocampal neuronal excitability: role of ATP-sensitive potassium channels. *Journal of Neuroscience Research*. 2007;85(7):1468–1477. DOI: 10.1002/jnr.21284.
28. Inoue I, Tsutsui I, Brown ER. K⁺ accumulation and K⁺ conductance inactivation during action potential trains in giant axons of the squid *Sepioteuthis*. *The Journal of Physiology*. 1997;500(2):355–366. DOI: 10.1113/jphysiol.1997.sp022026.
29. Xiang-Dong Tang, Zhen-Qing Tong. An adenosine triphosphate (ATP)-sensitive K⁺ channel of rat neocortical neurons is bi-gated by intracellular ATP and voltage: a novel channel gating mechanism? *Neuroscience Letters*. 1995;193(2):93–96. DOI: 10.1016/0304-3940(95)11675-m.
30. Rui Ye, Jun Liu, Zhiying Jia, Hongyang Wang, YongAn Wang, Wei Sun, et al. Adenosine triphosphate (ATP) inhibits voltage-sensitive potassium currents in isolated Hensen's cells and nifedipine protects against noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Medical Science Monitor*. 2016;22:2006–2012. DOI: 10.12659/msm.898150.
31. Su-Jin Kim, Woo Sung Choi, John Song Mou Han, Warnock G, Fedida D, McIntosh CHS. A novel mechanism for the suppression of a voltage-gated potassium channel by glucose-dependent insulinotropic polypeptide: protein kinase A-dependent endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(31):28692–28700. DOI: 10.1074/jbc.M504913200.

References

1. Steinbusch L, Labouëbe G, Thorens B. Brain glucose sensing in homeostatic and hedonic regulation. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2015;26(9):455–466. DOI: 10.1016/j.tem.2015.06.005.
2. 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.
3. Mayer J. Glucostatic mechanism of regulation of food intake. *The New England Journal of Medicine*. 1953;249(1):13–16. DOI: 10.1056/NEJM195307022490104.
4. Karnani M, Burdakov D. Multiple hypothalamic circuits sense and regulate glucose levels. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2011;300(1):R47–R55. DOI: 10.1152/ajpregu.00527.2010.
5. Routh VH. Glucose sensing neurons in the ventromedial hypothalamus. *Sensors*. 2010;10(10):9002–9025. DOI: 10.3390/s101009002.
6. Dus M, Lai JS-Y, Gunapala KM, Min S, Tayler TD, Hergarden AC, et al. Nutrient sensor in the brain directs the action of the brain-gut axis in *Drosophila*. *Neuron*. 2015;87(1):139–151. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.05.032.

7. Kits KS, Bobeldijk RC, Crest M, Lodder JC. Glucose-induced excitation in molluscan central neurons producing insulin-related peptides. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology*. 1991;417(6):597–604. DOI: 10.1007/BF00372957.
8. Oh Y, Lai JS-Y, Mills HJ, Erdjument-Bromage H, Giammarinaro B, Saadipour K, et al. A glucose-sensing neuron pair regulates insulin and glucagon in *Drosophila*. *Nature*. 2019;574(7779):559–564. DOI: 10.1038/s41586-019-1675-4.
9. Sidorov AV, Shadenko VN. Electrical activity of identified neurons in the central nervous system of a mollusk *Lymnaea stagnalis* under acute hyperglycemia. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2021;57(6):1257–1266. DOI: 10.1134/S0022093021060065.
10. Sidorov AV, Shadenko VN, Kazakevich VB. Responses of identified cardioregulatory neurons within CNS of mollusc *Lymnaea stagnalis* at hyperglycemia and insulin action. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;3:49–58. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-3-49-58.
11. Safonova TA, Zhuravlev VL, Nozdrachev AD. *Kardiorespiratornaya sistema mollyuskov: struktura, funktsii, mekhanizmy regulatsii* [Cardiorespiratory system of molluscs: structure, functions, regulatory mechanisms]. Saint Petersburg: Izdatel'stvo Sankt-Petersburgskogo universiteta; 2008. 244 p. Russian.
12. Sidorov AV. *Funktsional'naya aktivnost' nervnykh tsentrov bespozvonochnykh* [Nerve centers functional activity in invertebrates]. Minsk: Belarusian State University; 2011. 247 p. Russian.
13. Zaitseva OV, Shuvalova NE. Morphological properties of neuron RPD1 in *Lymnaea stagnalis* and its involvement in processing of polymodal sensory information. *Neurophysiology*. 1988;20(6):571–578. DOI: 10.1007/BF02150261.
14. Koekkoek LL, Mul JD, la Fleur SE. Glucose-sensing in the reward system. *Frontiers in Neuroscience*. 2017;11:716. DOI: 10.3389/fnins.2017.00716.
15. Mita K, Okuta A, Okada R, Hatakeyama D, Otsuka E, Yamagishi M, et al. What are the elements of motivation for acquisition of conditioned taste aversion? *Neurobiology of Learning and Memory*. 2014;107:1–12. DOI: 10.1016/j.nlm.2013.10.013.
16. 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. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-1-79-84.
17. Soltanov VV, Burko VE. [Computer programs for electrophysiological data-processing]. *News of Biomedical Sciences*. 2005;1:91–95. Russian.
18. Shevelkin AV, Shumova EA. [The role of glucose in facilitating defensive reactions during feeding in the edible snail *Helix lucorum*]. *Zhurnal vysshei nervnoi deyatel'nosti imeni I. P. Pavlova*. 1993;43(3):577–584. Russian.
19. Shevelkin AV. Facilitation of defense reactions during the consumption of food in snails: the participation of glucose and gastrin/cholecystokinin-like peptide. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 1994;24(1):115–124. DOI: 10.1007/BF02355661.
20. Benjamin PR, Kemenes I. Peptidergic systems in the pond snail *Lymnaea*: from genes to hormones and behavior. In: Saleuddin S, Lange AB, Orchard I, editors. *Advances in invertebrate (neuro)endocrinology: a collection of reviews in the post-genomic era. Volume 1. Phyla other than Arthropoda*. New York: Apple Academic Press; 2020. p. 213–254. DOI: 10.1201/9781003029854-7.
21. Bright K, Kellett E, Saunders SE, Brierley M, Burke JF, Benjamin PR. Mutually exclusive expression of alternatively spliced FMRFamide transcripts in identified neuronal systems of the snail *Lymnaea*. *Journal of Neuroscience*. 1993;13(6):2719–2729. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.13-06-02719.1993.
22. Buckett KJ, Peters M, Dockray GJ, Van Minnen J, Benjamin PR. Regulation of heartbeat in *Lymnaea* by motoneurons containing FMRFamide-like peptides. *Journal of Neurophysiology*. 1990;63(6):1426–1435. DOI: 10.1152/jn.1990.63.6.1426.
23. Benjamin PR, Winlow W. The distribution of three wide-acting synaptic inputs to identified neurons in the isolated brain of *Lymnaea stagnalis* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology*. 1981;70(3):293–307. DOI: 10.1016/0300-9629(81)90182-1.
24. Winlow W. The plastic nature of action potentials. In: Bulloch A, editor. *The cellular basis of neuronal plasticity: physiology, morphology and biochemistry of molluscan neurons*. Manchester: Manchester University Press; 1989. p. 3–27 (Studies in neuroscience; No. 7).
25. Edstrom JP, Lukowiak KD. Frequency-dependent action potential prolongation in *Aplysia* pleural sensory neurones. *Neuroscience*. 1985;16(2):451–460. DOI: 10.1016/0306-4522(85)90017-x.
26. López-Gamero AJ, Martínez F, Salazar K, Cifuentes M, Nualart F. Brain glucose-sensing mechanism and energy homeostasis. *Molecular Neurobiology*. 2019;56(2):769–796. DOI: 10.1007/s12035-018-1099-4.
27. Chin-Wei Huang, Chao-Ching Huang, Juei-Tang Cheng, Jing-Jane Tsai, Sheng-Nan Wu. Glucose and hippocampal neuronal excitability: role of ATP-sensitive potassium channels. *Journal of Neuroscience Research*. 2007;85(7):1468–1477. DOI: 10.1002/jnr.21284.
28. Inoue I, Tsutsui I, Brown ER. K^+ accumulation and K^+ conductance inactivation during action potential trains in giant axons of the squid *Sepioteuthis*. *The Journal of Physiology*. 1997;500(2):355–366. DOI: 10.1113/jphysiol.1997.sp022026.
29. Xiang-Dong Tang, Zhen-Qing Tong. An adenosine triphosphate (ATP)-sensitive K^+ channel of rat neocortical neurons is gated by intracellular ATP and voltage: a novel channel gating mechanism? *Neuroscience Letters*. 1995;193(2):93–96. DOI: 10.1016/0304-3940(95)11675-m.
30. Rui Ye, Jun Liu, Zhiying Jia, Hongyang Wang, YongAn Wang, Wei Sun, et al. Adenosine triphosphate (ATP) inhibits voltage-sensitive potassium currents in isolated Hensen's cells and nifedipine protects against noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Medical Science Monitor*. 2016;22:2006–2012. DOI: 10.12659/msm.898150.
31. Su-Jin Kim, Woo Sung Choi, John Song Mou Han, Warnock G, Fedida D, McIntosh CHS. A novel mechanism for the suppression of a voltage-gated potassium channel by glucose-dependent insulinotropic polypeptide: protein kinase A-dependent endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(31):28692–28700. DOI: 10.1074/jbc.M504913200.