

УДК 591.113

### ОСМОТИЧЕСКАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ В ГЕМОЛИМФЕ МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS* ПРИ ОСТРОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

А. В. СИДОРОВ<sup>1)</sup>

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

Установлено, что развитие гипергликемии, сопровождаемой многократным увеличением содержания глюкозы в гемолимфе (до 4,0–4,5 ммоль/л), не приводит к изменению осмоляльности во внутренней среде *Lymnaea*. Инкубация моллюсков в 100 ммоль/л водном растворе полиэтиленгликоля-200 на протяжении 2 ч вызывает 1,4-кратное повышение осмоляльности гемолимфы (до 210 мосмоль/кг) по сравнению с контрольным уровнем.

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

**Благодарность.** Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Б22-105). Отдельная благодарность выражается младшему научному сотруднику научно-исследовательской лаборатории физиологии и биотехнологии растений кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета Белорусского государственного университета Н. В. Лазерко за методическую помощь в работе с осмометром.

---

#### Образец цитирования:

Сидоров АВ. Осмотическая концентрация в гемолимфе моллюска *Lymnaea stagnalis* при острой экспериментальной гипергликемии. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;3:85–89.  
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-85-89>

#### For citation:

Sidorov AV. Hemolymph osmolality in mollusk *Lymnaea stagnalis* during acute experimental hyperglycemia. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;3:85–89. Russian.  
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-85-89>

---

#### Автор:

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

#### Author:

**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>

## HEMOLYMPH OSMOLALITY IN MOLLUSK *LYMNAEA STAGNALIS* DURING ACUTE EXPERIMENTAL HYPERGLYCEMIA

A. V. SIDOROV<sup>a</sup>

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

It has been established that the development of hyperglycemia, accompanied by a multiple increase in the hemolymph glucose content (up to 4.0–4.5 mmol/L), doesn't lead to any significant changes in *Lymnaea's* hemolymph osmolality. Incubation of mollusks in 100 mmol/L aqueous solution of polyethylene glycol 200 for 2 h causes a 1.4-fold increase in hemolymph osmolality (up to 210 mosmol/kg) compared to the control level.

**Keywords:** osmolality; glucose; invertebrates.

**Acknowledgements.** This work supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (project B22-105). Special thanks are addressed to N. V. Lazerko, junior researcher at the laboratory of plant physiology and biotechnology, department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology, Belarusian State University, for her kind help in osmometer use.

### Введение

Количественный и качественный состав внеклеточной жидкости напрямую определяет как свойства нейронов, так и их способность выполнять свои функции. Оказавшись в интерстициальном пространстве, многие из продуктов нормального метаболизма, например глюкоза или различные органические кислоты, начинают выполнять сигнальные функции, непосредственно определяя поведение контактирующих с ними клеток [1]. Кроме того, данные соединения изменяют физико-химические свойства внеклеточной жидкости (рН, осмолярность), что также обуславливает установление нового функционального состояния для целой популяции нейронов согласно принципам объемной передачи сигнала [2].

Ранее было показано, что пролонгированная (2 ч) инкубация моллюсков *Lymnaea stagnalis* в высококонцентрированном (100 ммоль/л) водном растворе глюкозы приводит к примерно 10-кратному повышению содержания глюкозы в их гемолимфе, т. е. развитию острой гипергликемии [3], это сопровождается модификацией некоторых форм поведенческой активности и электрических характеристик нервных клеток [4]. Однако потенциальные осмотические эффекты, связанные с использованием такого высококонцентрированного раствора, учитывая высокую проницаемость покровов моллюска для воды, не были приняты во внимание. В связи с этим целью данной работы было оценить характер сдвигов осмотической концентрации в гемолимфе *L. stagnalis* при развитии экспериментальной гипергликемии.

### Материалы и методы исследования

В работе использовали моллюсков *L. stagnalis*, собранных в летний период на территории Минской области (мелкие мелиоративные каналы). В лаборатории их содержали в аквариумах (на каждую особь приходилось не менее 1 л воды) при температуре (25 ± 1) °С. Смену воды проводили каждые 3 дня. Пищей для моллюсков служили листья одуванчика (питание *ad libitum*).

Животные контрольной группы (Cntr, *n* = 7) в течение 2 ч находились в 1-литровых аквариумах, наполненных «чистой» отстоявшейся водопроводной водой. Особи экспериментальных групп (*n* = 7 для каждой группы) такое же время содержались в свежеприготовленных водных растворах D-глюкозы (Glu (100 ммоль/л)), хлорида натрия (NaCl (50 ммоль/л)) и полиэтиленгликоля-200 (PEG-200 (100 ммоль/л)), подобранных таким образом, чтобы достигалось равенство их теоретически рассчитанных осмотических концентраций. По окончании инкубации сильной тактильной стимуляцией ноги моллюска вызывали реакцию полного втягивания тела, сопровождающуюся выбросом гемолимфы (в среднем объемом около 1 мл).

Содержание глюкозы в гемолимфе определяли глюкозооксидазным методом с применением набора реагентов компании Анализ X (Беларусь). Измерения оптической плотности проводили на длине волны 500 нм (длина оптического пути 1 см) при температуре 20 °С посредством спектрофотометра Cary 50 (Variant Inc., Австралия). Объем материала для анализа составлял 100 мкл, время инкубации с реагентом (1 мл) – 30 мин. В качестве стандарта использовали 100 мкл свежеприготовленного 1 или 5 ммоль/л раствора глюкозы. Оценку осмолярности пробы производили с помощью осмометра Vapro 5600 (Wescor Inc., США). В качестве калибровочного стандарта использовали 100 мосмоль/кг водный раствор сорбитола.

Все экспериментальные группы (по 7 особей в каждой) комплектовались животными одинакового размерного класса (см. таблицу). Попарное сравнение морфометрических показателей указанных групп также не выявило статистически значимых различий между анализируемыми рядами данных ни для одной из пар сравнения.

Морфологическая характеристика экспериментальных групп  
Morphological characteristics of the experimental groups

Показатели	Экспериментальная группа				Статистика для рядов данных групп
	Cntr	NaCl (50 ммоль/л)	PEG-200 (100 ммоль/л)	Glu (100 ммоль/л)	
Масса	(6,4 ± 0,3) г	(5,6 ± 0,3) г	(5,9 ± 0,5) г	(6,1 ± 0,3) г	$F(3, 24) = 0,82912$ ; $p = 0,49089$
Высота раковины	(47 ± 1) мм	(46 ± 1) мм	(45 ± 1) мм	(46 ± 1) мм	$F(3, 24) = 0,95101$ ; $p = 0,43172$

Примечания: 1. Данные представлены как среднее ± ошибка среднего. 2. Статистика для рядов данных групп рассчитана с использованием дисперсионного анализа по однофакторной схеме (one-way ANOVA).

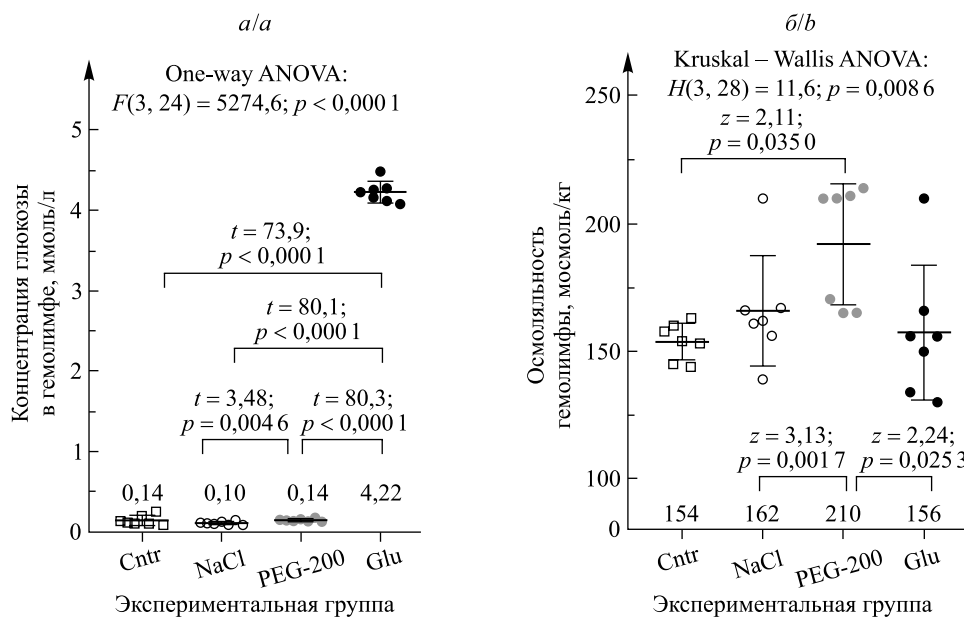
Нормальность распределения для каждого ряда экспериментальных данных предварительно оценивали с помощью *W*-теста Шапиро – Уилка. В случае подтверждения нормальности распределения сравниваемых показателей использовали параметрические методы оценки, а именно *t*-критерий Стьюдента для независимых пар и дисперсионный анализ по однофакторной схеме (one-way 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) или *H*-тест Крускала – Уоллиса (Kruskal – Wallis ANOVA) при сравнении двух или нескольких независимых выборок соответственно. Статистическая обработка результатов проведена посредством программы *Statistica 6.0*. Данные представлены как среднее ± ошибка среднего (в случае нормального распределения) или медиана (верхний; нижний квартили) (в случае непараметрического распределения). Достоверными считались результаты при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

Инкубация моллюсков в экспериментальных растворах приводит к статистически значимому увеличению содержания глюкозы в гемолимфе только в случае использования высококонцентрированного водного раствора глюкозы (см. рисунок, часть *a*). Речь идет о примерно 30-кратном возрастании ее содержания по сравнению с уровнем глюкозы в контроле или других экспериментальных группах. В то же время согласно дисперсионному анализу (one-way ANOVA) различий между оставшимися экспериментальными группами и контролем не выявлено ( $F(2, 18) = 2,1$ ;  $p = 0,1514$ ), несмотря на отмеченное расхождение между данными для растворов NaCl (50 ммоль/л) и PEG-200 (100 ммоль/л). В этом случае колебания содержания глюкозы носят умеренный характер (около 40 %), что несопоставимо с таковыми при гипергликемии.

Развитие экспериментальной гипергликемии не ассоциируется с изменением осмотической концентрации в гемолимфе *L. stagnalis* (см. рисунок, часть *b*). Эффекты, вызываемые инкубацией моллюсков в высококонцентрированном растворе глюкозы, согласно дисперсионному анализу (Kruskal – Wallis ANOVA) сопоставимы с эффектами инкубации для контроля и раствора NaCl (50 ммоль/л) ( $H(2, 21) = 2,6$ ;  $p = 0,2735$ ). Вместе с тем использование раствора PEG-200 (100 ммоль/л) приводит к почти 1,3–1,4-кратному увеличению осмотической концентрации в гемолимфе по сравнению с таковой как в контроле, так и в других экспериментальных группах.

Осмотическая концентрация в гемолимфе *L. stagnalis* обычно составляет 130 мосмоль/кг, хотя отклонения этого показателя в разные стороны тоже хорошо задокументированы [5], не говоря уже о существенном превышении данного уровня у других групп беспозвоночных, например насекомых [6]. Именно такое ее расчетное значение определяется и для гемолимфозамещающего раствора Рингера, используемого при работе с препаратами изолированной нервной системы прудовика [7]. С этих позиций прирост осмотической силы, вызываемый увеличением содержания глюкозы в гемолимфе при развитии экспериментальной гипергликемии, составляет всего около 4–5 % (4–5 мосмоль/кг) к базальному уровню. Следовательно, наблюдаемые при этом изменения поведения моллюсков, электрической активности их нейронов обусловлены действием глюкозы и не связаны с осмотическими эффектами от ее присутствия во внеклеточной жидкости.



Содержание глюкозы (а) и осмотическая концентрация (б) в гемолимфе *L. stagnalis* при экспериментальной гипергликемии. Точки диаграммы – данные по каждому моллюску отдельно (белые квадраты соответствуют контролю, белые круги – NaCl (50 ммоль/л), серые круги – PEG-200 (100 ммоль/л), черные круги – глюкозе (100 ммоль/л)). Дополнительно представлены среднее  $\pm$  ошибка среднего (а), медиана (верхний; нижний квартили) (б). Точные значения для среднего и медианы приведены рядом с названиями экспериментальных групп. Для статистически достоверных независимых пар сравнения указано значение *t*-критерия Стьюдента или *U*-критерия Манна – Уитни (*z*) (нормальное и непараметрическое распределение соответственно), а также значения *F* и *H* для дисперсионного анализа по однофакторной схеме (нормальное распределение) или *H*-теста Крускала – Уоллиса (непараметрическое распределение) при сравнении всех групп данных

Hemolymph glucose content (а) and osmolality (б) in *L. stagnalis* during experimental hyperglycemia. The points of the diagram are the data for each mollusk separately (white squares correspond to control, white circles – to NaCl (50 mmol/L), gray circles – to PEG-200 (100 mmol/L), black circles – to glucose (100 mmol/L)). Additionally, mean  $\pm$  SEM (а), median (upper; lower quartiles) (б) are presented.

The exact values for the mean and median are the numbers next to the names of the experimental groups. Student's *t*-test or Mann – Whitney *U*-test (*z*) values are presented for two independent groups (normal and non-parametric distribution, respectively), as well as the *F* and *H* values for one-way (normal distribution) or Kruskal – Wallis (non-parametric distribution) ANOVA

Известно, что возрастание осмотической силы гемолимфы (до 160–190 мосмоль/кг) приводит к ограничению синтеза и накоплению пептидных гормонов, т. е. регулирует активность нейросекреторных клеток (*dark green cells*) центральных нервных ганглиев *Lymnaea* [8], в том числе вовлеченных в контроль процессов размножения и роста у прудовика [9]. С этой точки зрения факт несколько повышенной (150–160 мосмоль/кг) осмоляльности гемолимфы, отмечаемый в проведенных экспериментах, получает удовлетворительное объяснение: новые кладки яиц на стенках аквариумов, используемых для постоянного содержания опытных животных, наблюдались практически постоянно. Полученные результаты также свидетельствуют о том, что использование водорастворимых неионных полимеров (полиэтиленгликоли) с небольшой молекулярной массой может быть эффективным для моделирования состояния гиперосмолярности и вызываемых ею эффектов у водных беспозвоночных.

## Библиографические ссылки

1. Smith RL, Soeters MR, Wüst RCI, Houtkooper RH. Metabolic flexibility as an adaptation to energy resources and requirements in health and disease. *Endocrine Reviews*. 2018;39(4):489–517. DOI: 10.1210/er.2017-00211.
2. Agnati LF, Cortelli P, Biagini G, Bjelke B, Fuxe K. Different classes of volume transmission signals exist in the central nervous system and are affected by metabolic signals, temperature gradients and pressure waves. *Neuroreport*. 1994;6(1):9–12. DOI: 10.1097/00001756-199412300-00004.
3. 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.

4. 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. DOI: 10.33581/2957-5060-2022-1-23-38.
5. Ebanks SC, Grosell M. Fluid and osmolyte recovery in the common pond snail *Lymnaea stagnalis* following full-body withdrawal. *Journal of Experimental Biology*. 2008;211(3):327–336. DOI: 10.1242/jeb.010132.
6. Natochin YuV, Parnova RG. Osmolality and electrolyte concentration of hemolymph and the problem of ion and volume regulation of cells in higher insects. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology*. 1987;88(3):563–570. DOI: 10.1016/0300-9629(87)90082-X.
7. Sidorov AV, Kazakevich VB. Dependence of electric activity of motoneurons and locomotor behavior of *Lymnaea stagnalis* on environmental temperature. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2001;37(3):252–257. DOI: 10.1023/A:1012667206908.
8. Roubos EW, Moorers-Van Delft CM. Morphometric *in vitro* analysis of the control of the activity of the neurosecretory dark green cells in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *Cell and Tissue Research*. 1976;174(2):221–231. DOI: 10.1007/BF00222160.
9. van Heumen WRA, Roubos EW. Ultrastructural evidence for synthesis, storage and release of insulin-related peptides in the central nervous system of *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience*. 1990;39(2):493–500. DOI: 10.1016/0306-4522(90)90285-c.

## References

1. Smith RL, Soeters MR, Wüst RCI, Houtkooper RH. Metabolic flexibility as an adaptation to energy resources and requirements in health and disease. *Endocrine Reviews*. 2018;39(4):489–517. DOI: 10.1210/er.2017-00211.
2. Agnati LF, Cortelli P, Biagini G, Bjelke B, Fuxe K. Different classes of volume transmission signals exist in the central nervous system and are affected by metabolic signals, temperature gradients and pressure waves. *Neuroreport*. 1994;6(1):9–12. DOI: 10.1097/00001756-199412300-00004.
3. 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.
4. 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. DOI: 10.33581/2957-5060-2022-1-23-38.
5. Ebanks SC, Grosell M. Fluid and osmolyte recovery in the common pond snail *Lymnaea stagnalis* following full-body withdrawal. *Journal of Experimental Biology*. 2008;211(3):327–336. DOI: 10.1242/jeb.010132.
6. Natochin YuV, Parnova RG. Osmolality and electrolyte concentration of hemolymph and the problem of ion and volume regulation of cells in higher insects. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology*. 1987;88(3):563–570. DOI: 10.1016/0300-9629(87)90082-X.
7. Sidorov AV, Kazakevich VB. Dependence of electric activity of motoneurons and locomotor behavior of *Lymnaea stagnalis* on environmental temperature. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2001;37(3):252–257. DOI: 10.1023/A:1012667206908.
8. Roubos EW, Moorers-Van Delft CM. Morphometric *in vitro* analysis of the control of the activity of the neurosecretory dark green cells in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *Cell and Tissue Research*. 1976;174(2):221–231. DOI: 10.1007/BF00222160.
9. van Heumen WRA, Roubos EW. Ultrastructural evidence for synthesis, storage and release of insulin-related peptides in the central nervous system of *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience*. 1990;39(2):493–500. DOI: 10.1016/0306-4522(90)90285-c.

Получена 10.10.2022 / исправлена 10.10.2022 / принята 10.10.2022.  
Received 10.10.2022 / revised 10.10.2022 / accepted 10.10.2022.