

А. А. ЧИРКИН, П. Ю. ПИНЧУК, М. В. ВИШНЕВСКАЯ,
О. М. БАЛАЕВА-ТИХОМИРОВА

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛЕГОЧНЫХ ПРЕСНОВОДНЫХ МОЛЛЮСКОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

Учреждение образования «Витебский государственный университет имени П.М.
Машерова», Витебск, Республика Беларусь

В статье представлены данные о молекулярно-структурном сходстве 20-и ферментов, контролирующих содержание глюкозы, общего белка, мочевой кислоты, мочевины и холестерина в сыворотке крови человека, лабораторной крысы и в гемолимфе легочного пресноводного моллюска *Biomphalaria glabrata* в рамках поиска простых и доступных организмов, которых можно использовать для изучения особенностей обмена веществ при воздействии патологических факторов. Опыты с введением глюкозы показали, что прудовики обыкновенные (*Lymnaea stagnalis*) и катушки роговые (*Planorbarius corneus*), являющиеся ближайшими родственниками *Biomphalaria glabrata*, в паре могут служить возможными организмами для оценки состояния метаболизма при физиологической стимуляции обмена веществ введением глюкозы в концентрациях 0,05–0,5 %, нарушении инсулиновой регуляции обмена углеводов введением стрептозотоцина в дозах 35–100 мкг/г и моделировании токсических эффектов этанола в диапазоне концентраций 0,1–5,0 %.

Ключевые слова: циркулирующие молекулы, человек, крыса, легочные пресноводные моллюски, нарушения обмена веществ, стрептозотозин, этанол.

Введение. До настоящего времени проводится анализ биохимических процессов у представителей различных биологических царств с целью анализа состояния обмена веществ и обоснования возможности использования их в качестве индикаторных организмов. Так, в опубликованной работе текущего года установлены молекулярные механизмы поддержания гомеостаза ионов цинка у бактерий, дрожжей, растений и человека [1]. Для биомедицинских исследований наиболее часто используются высшие млекопитающие [2], обладающие высоким сходством геномов с геномом человека – обезьяны [3], свиньи [4], крысы [5], мыши [6] и др. Приведем примеры использования высших млекопитающих для моделирования основных механизмов, вовлеченных в развитие наиболее часто встречающегося у человека метаболического синдрома (МС): изменения диет, изменения геномов, прием лекарств. При моделировании метаболического синдрома применяют 4 типа диет. Диета с высоким содержанием фруктозы препятствует гликолитическому пути, поскольку исключается стадия контроля скорости гликолиза - превращение глюкозо-6-фосфата во фруктозо-1,6-бисфосфат. Фосфофруктокиназа действует как негативный регулятор метаболизма глюкозы и позволяет фруктозе непрерывно вступать в гликолитический путь с образованием пирувата, лактата, глицерина и ацилглицеринов. При рационе с высоким содержанием углеводов доступно большое количество глюкозы, которая расщепляется посредством гликолиза, превращается в гликоген и ведет к повышенной выработке инсулина. Этот гормон в жировой ткани способствует синтезу жирных кислот. Потребление диеты с высоким содержанием сахарозы из-за ее распада на молекулы фруктозы и глюкозы ведет к специфическим механизмам действия избытка глюкозы или фруктозы. Богатая триглицеридами диета способствует липолизу и выбросу в кровь глицерина и жирных кислот. Однако жирные кислоты, высвобождаемые в ходе липолиза, реэстерифицируются с образованием триглицеридов. Перепроизводство триглицеридов в результате чрезмерного потребления питательных веществ может вызвать их накопление в печени, что в дальнейшем приведет к резистентности гепатоцитов к инсулину. На втором месте находятся генетические модели метаболического синдрома: мыши с дефицитом лептина (*ob/ob*), мыши с дефицитом рецептора лептина (*db/db*), крысы Zucker с ожирением (ZF), крысы Zucker с диабетом и ожирением (ZDF), крысы DS/*obese*, крысы Goto-Kakizaki (GK), мыши POUND™. На третье место можно поставить лекарственные модели МС. Глюкокортикоиды вызывают МС посредством нескольких механизмов: 1) стимулируют дифференцировку преадипоцитов в зрелые

адипоциты; 2) усиливают липолиз с высвобождением свободных жирных кислот; 3) активируют протеолиз в мышцах, увеличивая количество свободных аминокислот, а индуцированная аминокислотами активация комплекса рапамицина-1 (mTORC1) у млекопитающих вызывает фосфорилирование субстрата инсулинового рецептора-1 (IRS-1), что и приводит к возникновению резистентности к инсулину; 4) способствуют глюконеогенезу в печени и вызывают гипергликемию и 5) неспецифическое связывание глюкокортикоидов с его рецептором в почках вызывает увеличение задержки натрия, экскреции калия, задержки воды и объема плазмы одновременно с повышением артериального давления. Прием антипсихотических препаратов может вести к развитию МС, о чем свидетельствуют увеличение массы тела, увеличение висцерального жира, нарушение толерантности к глюкозе и резистентность к инсулину в исследованиях на животных [7]. Вышеизложенное показывает, что даже у генетически близких к человеку экспериментальных животных не удастся воспроизвести все метаболические проявления МС.

В сочетании с заметным развитием инструментов редактирования генов стволовые клетки и органоиды человека предоставляют современные системы для изучения механизмов метаболических заболеваний. С момента создания технологии эмбриональных стволовых клеток человека (чЭСК, hESCs) и технологии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК, iPSC) из этих плюрипотентных стволовых клеток человека получают различные типы клеток, имеющих отношение к заболеванию, с помощью протоколов поэтапной дифференцировки, имитирующих органогенез *in vivo* [8]. За последнее десятилетие моделирование патологических процессов человека улучшилось благодаря технологии органоидов. Органоид определяется как трехмерная структура, полученная из стволовых клеток, клеток-предшественников и/или дифференцированных клеток, которые самоорганизуются посредством межклеточных взаимодействий для моделирования структуры и функции нативной ткани *in vitro*. Органоиды печени и органоиды жировой ткани, независимо от того, получены ли они из hPSC, здоровой ткани или пораженной ткани рассматриваются как платформа для изучения развития и прогрессирования проявлений метаболических заболеваний человека, а также потенциальных методов их терапии [9]. В последние годы были созданы органоиды почек свиньи из наивно-подобных эмбриональных стволовых клеток свиней (нЭСК). Полученные свиные органоиды имели трубчатую структуру и матричные компоненты. Органоиды свиньи экспрессировали почечные маркеры, включая AQP1 (проксимальные каналы), WT1 и PODO (подоциты) и CD31 (эндотелиальные клетки сосудов). Эти результаты подразумевают, что в органоидах развилось большинство типов почечных клеток и надклеточных структур, включая клубочки и проксимальные каналы [10, 11]. Общая проблема в работе с органами на чипах заключается в изоляции их во время тестирования. Кроме того, эти технологии требуют специального оборудования и подготовленного персонала.

Следующий уровень моделирования патологических процессов определяется культивированием клеток *in vitro*. Для этого исследуют функциональное состояние клеток с помощью омиксных наук. Библиотека метаболических задач, которые может выполнять клетка, «встроена» в ее геном, а способность модулировать активность этих задач позволяет клетке адаптироваться к изменяющейся среде. Концепция «метаболических задач» используется для оценки качества и возможностей метаболических моделей в масштабе генома [12]. Посттрансляционная модификация белка (ПТМ) - термин, обозначающий биохимическую модификацию определенных аминокислотных остатков в белках-мишенях, что значительно увеличивает функциональное разнообразие протеома. На основе ПТМ изучают распространенные метаболические заболевания и их последствия, включая диабет, ожирение, жировые заболевания печени, гиперлипидемию и атеросклероз, нарушения эпигенетических механизмов регуляции, а также оценивают эффективность фармакотерапии [13]. На всех этапах моделирования метаболизма *in silico* обычно используются различные алгоритмы машинного обучения и анализа результатов [14].

Таким образом, моделирование изменений метаболизма на уровнях целого организма → изолированных органов и органоидов → клеточных культур и машинного обучения являются важными этапами биомедицинских исследований. Однако актуальным остается поиск простейших организмов, которые занимают промежуточное положение между млекопитающими и культурами клеток [15]. На протяжении последнего десятилетия проводится сравнительный анализ изменений показателей обмена веществ у двух видов легочных пресноводных моллюсков, отличающихся по типу транспорта кислорода – прудовики обыкновенные *Lymnaea stagnalis* (транспорт кислорода с помощью медь содержащего гемоцианина) и катушки роговые *Planorbis corneus* (транспорт кислорода с помощью железо содержащего гемоглобина). В предыдущих исследованиях была

проанализирована молекулярно-структурная гомология 16 ферментов гликолиза, глюконеогенеза и пентозофосфатного пути обмена углеводов человека, свиньи, лабораторной крысы и легочного пресноводного моллюска *Biomphalaria glabrata*. По сравнению с человеком обнаружено сходство аминокислотных последовательностей ферментов у лабораторных крыс в диапазоне 98,63–81,79 %, у свиней – 99,08–88,96 % и у моллюска – 74,22–37,31 %; по третичной структуре белков-ферментов – у лабораторных крыс в диапазоне 96,97–81,79 %, у свиней – 99,08–89,94 % и у моллюска – 74,38–36,70 %. Полученные данные демонстрируют возможность использования в биомедицинских исследованиях более простых животных [16, 17]. В отличие от *Drosophila melanogaster* и *Caenorhabditis elegans*, которые являются наиболее распространенными и наиболее хорошо изученными моделями беспозвоночных, легочные пресноводные моллюски имеют относительно большую продолжительность жизни, что позволяет изучать возрастные изменения, затрагивающие генетические, молекулярные и клеточные механизмы; имеют существенное преимущество из-за отсутствия гисто-гематических барьеров, в частности, гематоэнцефалического, что позволяет прямо изучать молекулярные мишени для разработки инновационных терапевтических стратегий путем введения в среду обитания или гемолимфу потенциальных лекарственных средств. Более того, моллюски не имеют серьезных этических и экономических проблем, характерных для животных моделей, которые в настоящее время наиболее часто используются при доклинических исследованиях. Следует также отметить, что геномы ряда легочных пресноводных моллюсков секвенированы и аннотированы [2, 18–20].

Целью работы было использование легочных пресноводных моллюсков для изучения экспериментально вызванных нарушений обмена веществ.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили на 250 особях прудовика обыкновенного и 250 особях катушки роговой. В каждой исследовательской подгруппе было от 8 до 10 моллюсков. Все животные были одинакового размерного класса от 3 до 4,5 сантиметров, массой от 3 до 6 граммов. Расчетный возраст такой группы составляет около 50 недель, при средней продолжительности жизни 2 года. Моллюсков помещали на 30 мин в ванночки с растворами глюкозы 0,05 %, 0,1 %, 0,15 %, 0,5 % (8 групп), а также в ванночки с растворами этанола 0,1%, 0,5% и 5% (6 групп). Биохимические показатели оценивали через 12 и 24 часа. В 9 группах исследовали влияние вводимого в ногу раствора стрептозоцина в дозах 35,0, 80,0 и 100 мкг/г. Биохимические показатели оценивали через 24 и 48 часов [21]. Для изучения хронического действия этанола в эксперименте использовался легочной пресноводный моллюск прудовик обыкновенный в количестве 135 особей. Отобранных моллюсков, разделили на 3 группы по 9 моллюсков в группе: 1 группа – контроль, моллюски данной группы ничем не обрабатывались; 2 группа – моллюски, в течении 10 суток подвергались ежесуточной обработке 3 % этиловым спиртом в течении 30 минут; 3 группа – моллюски, в течении 20 суток подвергались ежесуточной обработке 3 % этиловым спиртом в течении 30 минут.

Срезы гепатопанкреаса окрашивали гематоксилин-эозином. В гемолимфе определяли содержание общего белка, глюкозы, мочевины, мочевой кислоты и холестерина, используя стандартные наборы реагентов фирмы НТПК «Анализ Х». Весь цифровой материал обработан методом параметрической статистики (t-критерий Стьюдента). Методами биоинформатики было изучено сходство молекулярно-структурной организации ферментов, участвующих в обмене глюкозы, этанола, мочевины, мочевой кислоты и холестерина [2].

Результаты и их обсуждение. Биоинформатический анализ, включающий сравнительный анализ аминокислотных последовательностей ферментов (AAS), нуклеотидных последовательностей кодирующих их генов (NS) и сходство третичных структур ферментов (3D), показал, что для моллюска *Biomphalaria glabrata*, ближайшим родственником которого является катушка роговая, имеется средний уровень молекулярно-структурного сходства ферментов, а у лабораторных крыс высокий уровень молекулярно-структурного сходства ферментов, участвующих в обмене глюкозы, общего белка, мочевой кислоты, мочевины и холестерина по сравнению с человеком (табл. 1). Это послужило основанием:

1) для использования легочных пресноводных моллюсков при изучении экспериментально вызванных нарушений обмена веществ;

2) в качестве контрольных биохимических показателей – определения содержания глюкозы, общего белка, мочевой кислоты, мочевины и холестерина.

Табл. 1. Оценка сходства аминокислотных последовательностей белков, нуклеотидных последовательностей генов и третичных структур ферментов обмена веществ между человеком и модельными организмами

Фермент и его номер в классификации ферментов (КФ)	<i>Biomphalaria glabrata</i>			<i>Rattus norvegicus</i>		
	AAS	NS	3D	AAS	NS	3D
Обмен глюкозы						
Фосфоглюкомутаза, КФ 5.4.2.2.	69,1	57,9	50,4	83,4	69,2	66,5
Гексокиназа 3, КФ 2.7.1.1.	29,3	27,9	37,9	71,6	62,9	56,9
Глюкозо-6-фосфатаза, КФ 3.1.3.9.	53,0	49,7	38,8	93,8	84,4	86,8
Г-6-Ф-дегидрогеназа, КФ 1.1.1.49.	72,3	59,0	69,4	96,7	87,6	93,5
Обмен общего белка						
Катепсин А, КФ 3.4.16.5.	67,5	56,2	54,6	88,8	84,0	88,7
Катепсин В, КФ 3.4.22.1.	60,9	56,1	51,9	89,1	80,2	81,8
Катепсин С, КФ 3.4.14.1.	65,2	56,7	51,6	87,3	82,8	80,1
Катепсин D, КФ 3.4.23.5.	58,5	50,7	51,6	89,8	88,6	83,3
Катепсин F, КФ 3.4.22.41.	31,7	45,3	30,5	83,1	77,6	78,4
Катепсин L, КФ 3.4.22.15.	46,0	42,1	49,3	85,9	77,7	74,1
Катепсин O, КФ 3.4.22.42.	50,6	49,5	37,9	83,5	78,1	79,2
Катепсин X, КФ 3.4.18.1.	67,9	58,3	68,2	90,2	82,1	87,9
Обмен мочевой кислоты						
Ксантиноксидаза, КФ 1.17.3.2.	32,4	37,6	30,6	95,9	86,1	90,7
Обмен мочевины						
Карбамоилфосфатсинтетаза, КФ 6.3.4.16.	78,6	63,3	63,6	98,5	89,4	96,1
Аргининсукцинатсинтетаза, КФ 6.3.4.5.	79,6	63,3	70,1	99,0	89,7	97,6
Аргининсукцилатлиаза, КФ 4.3.2.1.	76,9	61,1	63,9	92,2	84,8	90,1
Аргиназа, КФ 3.5.3.1.	52,9	48,9	52,2	68,1	57,0	58,3
Обмен холестерина						
Ацетоацетилтрансфераза, КФ 2.3.1.9.	57,5	50,7	45,1	57,4	51,1	43,8
ГМГ-КоА-синтаза, КФ 2.3.3.10.	72,3	62,7	66,5	97,7	89,6	94,8
ГМГ-КоА-редуктаза, КФ 1.1.1.34.	72,7	61,4	57,1	95,8	86,2	92,9

При воздействии глюкозы структурных изменений в гистологических препаратах гепатопанкреаса двух видов моллюсков не выявлено. Этанол у прудовиков, но не у катушек роговых, вызывал увеличение размеров ацинусов гепатопанкреаса (2,739 нм до 4,686 нм). При введении стрептозотоцина у моллюсков отмечено увеличение количества выделительных клеток.

Результаты моделирования процессов, связанных с избыточным поступлением в организм глюкозы представлены в таблице 2.

Табл. 2. Влияние глюкозы на показатели метаболизма в гемолимфе легочных пресноводных моллюсков (верхняя строка – *Planorbarius corneus*, нижняя строка – *Lymnaea stagnalis*)

Группы	Глюкоза ммоль/л	Общий белок г/л	Мочевая к-та мкмоль/л	Мочевина ммоль/л	Холестерин ммоль/л
Контроль, 12 ч	0,70±0,01	21,40±0,10	127,00±0,80	7,10±0,05	0,37±0,01
	0,42±0,01	5,90±0,08	63,3±0,30	6,40±0,07	0,68±0,03
Контроль, 24 ч	0,70±0,04	21,50±0,10	127,30±0,70	6,90±0,08	0,37±0,01
	0,40±0,01	5,90±0,08	63,3±0,30	6,40±0,07	0,68±0,03
0,05%, 12 ч	0,71±0,03	23,31±0,10 ¹	127,06±0,80	6,80±0,07	0,38±0,02
	0,50±0,02 ¹	5,70±0,09	65,4±0,40 ¹	6,30±0,09	0,70±0,02
0,1%, 12 ч	0,81±0,02 ¹	24,10±0,20 ¹	131,30±1,20 ¹	7,01±0,08	0,38±0,01
	0,72±0,02 ¹	5,90±0,09	68,0±0,40 ¹	6,80±0,06 ¹	0,65±0,02
0,15%, 12 ч	0,83±0,01 ¹	24,70±0,20 ¹	130,60±1,30 ¹	6,51±0,06	0,39±0,02
	0,70±0,03 ¹	6,10±0,10	70,3±0,50 ¹	5,90±0,06 ¹	0,67±0,02
0,5%, 12 ч	1,40±0,02 ¹	24,32±0,20 ¹	145,60±1,90 ¹	5,80±0,05	0,48±0,02 ¹
	0,91±0,04 ¹	7,20±0,08 ¹	79,6±1,00 ¹	5,00±0,06 ¹	0,65±0,02
0,05%, 24 ч	0,72±0,02	23,41±0,30 ¹	126,80±0,70	6,80±0,07	0,44±0,02 ¹
	0,40±0,01	5,09±0,08	62,3±0,90	6,30±0,09	0,66±0,02
0,1%, 24 ч	0,70±0,02	23,90±0,09 ¹	127,50±0,50	7,02±0,08	0,46±0,02 ¹
	0,62±0,03 ¹	5,70±0,09	71,0±1,20 ¹	6,70±0,06 ¹	0,67±0,02
0,15%, 24 ч	0,70±0,03	24,42±0,30 ¹	130,01±0,80 ¹	6,51±0,06	0,45±0,02
	0,63±0,06 ¹	7,50±0,07 ¹	66,9±1,00 ¹	5,80±0,07 ¹	0,69±0,03
0,5%, 24 ч	1,40±0,04 ¹	23,51±0,05 ¹	130,22±0,6 ¹	5,80±0,05	0,45±0,03
	0,90±0,03 ¹	8,20±0,03 ¹	75,6±1,09 ¹	5,00±0,06 ¹	0,66±0,03

Примечание: ¹ – $p \leq 0,05$ по сравнению с группой «Контроль 12 часов», поскольку контрольные значения изучаемых показателей практически одинаковы на протяжении суток

Прежде всего следует обратить внимание на различия в биохимических показателях гемолимфы контрольных групп легочных пресноводных моллюсков. У роговых катушек по сравнению с прудовиками обыкновенными выявлено более высокое содержание биохимических показателей в гемолимфе: в 3,63 раза – общего белка, в 2,01 раза – уровня мочевой кислоты, в 1,67 раза – количества глюкозы, примерно одинаковое содержание мочевины и наполовину меньшее содержание холестерина. Биохимические показатели гемолимфы роговых катушек оказались более близкими к биохимическим показателям крови человека, что, вероятно, определяется аналогичным типом транспорта кислорода. Обнаружено полное совпадение величин мочевины, свидетельствующее о функционировании цикла мочевины в клетках гепатопанкреаса, а также всего двукратное уменьшение содержания мочевой кислоты, играющей важную роль в антиоксидантных процессах и трехкратное уменьшение содержания общего белка, характеризующего состояние обмена белков и поддержание онкотического давления.

Содержание в ванночках с глюкозой в диапазоне концентраций 0,1%–0,5% вызывало повышение уровня глюкозы в гемолимфе легочных пресноводных моллюсков. Спустя 24 часа этот эффект проявлялся при концентрации глюкозы 0,5%. Таким образом выявлен диапазон концентраций вводимой глюкозы, который проявляется гипергликемией в течение 12 часов. Этот эффект показывает степень реактивности инсулярного аппарата катушек. Уровень общего белка повышался у роговых катушек при всех концентрациях вводимой глюкозы, а у прудовиков обыкновенных увеличение общего белка было зарегистрировано только через 12 часов при концентрации глюкозы 0,5% и спустя 24 часа при концентрациях вводимой глюкозы 0,15–0,5%. Этот эффект можно связать с анаболическим действием инсулина. Уровень мочевой кислоты также повышался в гемолимфе после введения глюкозы, за исключением действия малых концентраций глюкозы (0,05%) через 12 часов у роговых катушек, а также через 24 часа у обоих видов моллюсков при концентрации глюкозы 0,05% и роговых катушек при концентрации глюкозы 0,1%. Возможно, это результат стимуляции биосинтеза пуриновых азотистых оснований или распада нуклеиновых кислот для повышения антиоксидантного потенциала гемолимфы. Уровень мочевины, являющейся показателем обезвреживания аммиака в печени, при всех вариантах введения глюкозы не изменялся у роговых катушек. У прудовиков обыкновенных содержание мочевины повышалось в

гемолимфе при воздействии глюкозы с концентрацией 0,1% через 12 часов и через 24 часа. При высоких концентрациях глюкозы (0,15 и 0,5%) через 12 часов и 24 часа у прудовиков обыкновенных выявлено снижение концентрации мочевины. По всей видимости, малые концентрации вводимой глюкозы не оказывали неблагоприятного влияния на метаболизм клеток гепатопанкреаса, но при относительно высоких уровнях вводимой глюкозы проявилось ингибирующее действие на процессы обезвреживания аммиака в печени. Обращает на себя внимание повышение уровня общего холестерина при введении глюкозы в концентрации 0,5% через 12 часов, а также при введении глюкозы в низких концентрациях (0,05–0,1%) через 24 часа. Вероятно, это позднее проявление введения циркулирующего источника энергии на метаболизм, в данном случае – биосинтез холестерина. Полученные результаты показали диапазоны концентрации глюкозы, при котором, используя катушки роговые, можно исследовать процессы мочевинообразования. У прудовиков введение глюкозы не оказало влияния на содержание холестерина в гемолимфе.

В таблице 3 приведены результаты биохимического исследования гемолимфы легочных пресноводных моллюсков при введении стрептозотацина.

Табл. 3 Влияние стрептозотацина на некоторые показатели метаболизма в гемолимфе легочных пресноводных моллюсков (верхняя строка – *Planorbarius corneus*, нижняя строка – *Lymnaea stagnalis*)

Группы	Глюкоза ммоль/л	Общий белок г/л	Мочевая к-та мкмоль/л	Мочевина ммоль/л	Холестерин ммоль/л
Контроль	0,70±0,02	21,3±0,06	126,9±0,67	7,12±0,04	0,37±0,01
	0,43±0,01	5,90±0,04	63,1±0,35	6,50±0,03	0,58±0,03
Контроль, 24 ч	0,71±0,03	21,6±0,14	127,3±0,76	7,13±0,04	0,37±0,02
	0,42±0,02	5,90±0,08	63,6±0,27	6,52±0,04	0,58±0,02
Контроль, 48 ч	0,71±0,03	21,6±0,14	127,1±0,74	7,16±0,04	0,40±0,02
	0,42±0,03	5,91±0,05	63,5±0,36	6,53±0,06	0,55±0,03
Стрептозотацин, 35 мг/г, 24 ч	0,82±0,02 ¹	21,3±0,06	129,4±0,43 ¹	7,35±0,03 ¹	0,42±0,03
	0,80±0,03 ¹	5,10±0,03 ¹	65,9±0,29 ¹	6,67±0,01 ¹	0,56±0,05
Стрептозотацин, 80 мг/г, 24 ч	1,41±0,02 ¹	20,6±0,09 ¹	132,1±0,62 ¹	7,84±0,07 ¹	0,41±0,02
	1,12±0,01 ¹	4,90±0,02 ¹	72,3±0,53 ¹	6,86±0,02 ¹	0,60±0,02 ¹

Продолжение таблицы 3

Стрептозотацин, 100 мг/г, 24 ч	1,81±0,02 ¹	19,7±0,09 ¹	134,1±0,69 ¹	7,92±0,03 ¹	0,53±0,02 ¹
	1,30±0,02 ¹	4,71±0,03 ¹	74,0±0,38 ¹	7,25±0,07 ¹	0,65±0,02 ¹
Стрептозотацин, 35 мг/г, 48 ч	1,03±0,02 ¹	17,8±0,09 ¹	137,1±0,46 ¹	7,32±0,01 ¹	0,41±0,02
	1,05±0,02 ¹	4,51±0,09 ¹	66,6±0,76 ¹	6,71±0,01 ¹	0,58±0,03
Стрептозотацин, 80 мг/г, 48 ч	1,63±0,02 ¹	16,2±0,07 ¹	138,6±0,22 ¹	7,84±0,03 ¹	0,52±0,04
	1,24±0,02 ¹	4,52±0,11 ¹	72,5±0,70 ¹	7,52±0,02 ¹	0,60±0,02 ¹
Стрептозотацин, 100 мг/г, 48 ч	1,90±0,03 ¹	13,5±0,10 ¹	140,1±0,46 ¹	8,31±0,01 ¹	0,61±0,02 ¹
	1,51±0,02 ¹	3,30±0,07 ¹	74,3±0,63 ¹	8,20±0,02 ¹	0,71±0,03 ¹

Примечание: ¹ – $p \leq 0,05$ по сравнению с соответствующими контрольными группами легочных пресноводных моллюсков

Введение стрептозотоцина обеспечило примерно одинаковые гипергликемические эффекты у обследованных легочных пресноводных моллюсков [21, 22]. При введении возрастающих доз стрептозотоцина на протяжении 48 часов увеличивалась концентрация глюкозы, мочевой кислоты, мочевины и уменьшалась концентрация общего белка в гемолимфе обоих видов моллюсков. Уровень холестерина увеличивался у прудовиков при дозах 80 мг/г и 100 мг/г через 24 и 48 часов, а у катушек этот эффект выявлен лишь при введении стрептозотоцина в дозе 100 мг/г через 24 и 48 часов. Эти результаты напоминают результаты введения глюкозы, но без эффектов инсулина. Поэтому изучение гомеостаза глюкозы при алиментарной и индуцированной стрептозотоцином гипергликемии возможно проводить на легочных пресноводных моллюсках.

В таблице 4 представлены данные о результатах однократного воздействия экзогенного этанола на биохимические показатели легочных пресноводных моллюсков.

Табл. 4. Влияние этанола на показатели метаболизма в гемолимфе легочных пресноводных моллюсков (верхняя строка – *Planorbarius corneus*, нижняя строка – *Lymnaea stagnalis*)

Группы	Глюкоза ммоль/л	Общ.белок г/л	Мочевая к-та ммоль/л	Мочевина ммоль/л	Холестерин ммоль/л
Контроль, 12 ч	0,70±0,01	21,40±0,10	127,00±0,80	7,10±0,05	0,37±0,01
	0,42±0,01	5,90±0,08	63,3±0,30	6,40±0,07	0,68±0,03
Контроль, 24 ч	0,70±0,04	21,50±0,10	127,30±0,70	6,90±0,08	0,37±0,01
	0,40±0,01	5,90±0,08	63,3±0,30	6,40±0,07	0,68±0,03
0,1 %, 12 ч	0,71±0,03	23,71±0,02 ¹	127,10±0,80	7,07±0,05	0,40±0,01
	0,60±0,02	5,80±0,07	63,7±0,5	6,30±0,04	0,70±0,01
0,5 %, 12 ч	0,82±0,02	21,60±0,07	133,00±1,10 ¹	7,55±0,03 ¹	0,40±0,01 ¹
	0,80±0,02	5,30±0,06 ¹	70,3±0,7 ¹	6,60±0,05 ¹	0,80±0,02
5 %, 12 ч	1,10±0,02 ¹	20,03±0,10 ¹	135,60±0,60 ¹	8,02±0,03 ¹	0,60±0,02 ¹
	1,00±0,02 ¹	4,60±0,1 ¹	73,8±0,3 ¹	7,20±0,07 ¹	0,80±0,02 ¹
0,1 %, 24 ч	0,70±0,02	23,90±0,10 ¹	127,20±0,60	6,80±0,05	0,50±0,01 ¹
	0,50±0,008	5,90±0,08	63,4±0,6	6,30±0,05	0,80±0,008
0,5 %, 24 ч	0,80±0,03 ¹	23,01±0,11 ¹	128,80±0,50	7,40±0,02 ¹	0,60±0,03 ¹
	0,90±0,008 ¹	6,20±0,05 ¹	70,5±0,6	6,70±0,04 ¹	0,80±0,01
5 %, 24 ч	1,22±0,03 ¹	21,70±0,09	130,80±0,60 ¹	7,50±0,03 ¹	0,60±0,02 ¹
	1,00±0,01 ¹	5,90±0,1	69,8±0,8	6,60±0,02 ¹	0,80±0,01

Примечание: ¹ – $p \leq 0,05$ по сравнению с соответствующими контрольными группами легочных пресноводных моллюсков.

Все концентрации вводимого этанола (0,1 %, 0,5 % и 5 %) вызвали в гемолимфе катушек повышение уровня холестерина, что, вероятно, связано с поступлением эффективного источника энергии, легко включающегося в общий путь катаболизма и через ацетил-КоА способного увеличивать концентрацию холестерина. Однако введение этанола привело к повышению уровня мочевины, мочевой кислоты и глюкозы, особенно при самой высокой дозе вводимого спирта. Содержание общего белка в гемолимфе катушек изменялось разнонаправлено. В гемолимфе прудовиков обыкновенных найдены близкие изменения уровней мочевины, мочевой кислоты, общего белка и глюкозы. Основным отличием между двумя видами легочных пресноводных моллюсков в реакции на введение растворов этанола явилось отсутствие систематического повышения уровня холестерина. Возможно, это связано с тем, что у моллюска с переносчиком кислорода гемоглобином исходная концентрация холестерина почти в два раза ниже, чем у прудовиков.

В таблице 5 представлены биохимические изменения в гемолимфе прудовиков обыкновенных (*Lymnaea stagnalis*) при хроническом воздействии этанола.

Табл. 5. Влияние этанола при длительном воздействии на показатели метаболизма в гемолимфе прудовика обыкновенного

Группы	Глюкоза, ммоль/л	Общий белок, г/л	Мочевая к-та, мкмоль/л	Мочевина, ммоль/л	Холестерол ммоль/л
Контроль	0,41±0,04	5,91±0,06	63,4±0,50	6,40±0,06	0,68±0,03
3 % этанол, 10 суток	0,24±0,05 ¹	9,30±0,05 ¹	67,6±0,91 ¹	6,91±0,06 ¹	0,92±0,07 ¹
3 % этанол, 20 суток	0,13±0,01 ¹	7,21±0,08 ¹	73,8±0,52 ¹	7,33±0,03 ¹	1,07±0,06 ¹

Примечание: ¹ – $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой

При хроническом введении этанола в гемолимфе у прудовиков выявлено последовательное снижение концентрации глюкозы на фоне повышения содержания общего белка, мочевой кислоты, мочевины и холестерина. Полученные результаты означают, что прудовики обыкновенные могут использоваться для изучения алкогольной зависимости не только по реактивности нервной системы, но и по параметрам метаболизма.

Заключение. Опыты с введением глюкозы и стрептозотоцина показали, что прудовики обыкновенные и катушки роговые в паре могут применяться для оценки состояния метаболизма при физиологической стимуляции обмена веществ введением циркулирующих источников энергии (глюкозы) и нарушении регуляции инсулином обмена глюкозы при введении стрептозотоцина. Кроме того, прудовики и катушки роговые могут рассматриваться как возможные объекты для исследования негативных эффектов этанола с использованием концентраций в диапазоне 0,1–5,0 %. В Республике Беларусь легочные пресноводные моллюски широко используются для исследования различных нейробиологических проблем при некоторых нарушениях обмена веществ. В данной статье использован метод погружения моллюсков в жидкость, разработанный на кафедре физиологии человека и животных БГУ [22, 23].

В недавнем обзоре литературы с названием «Чему мы можем научить *Lymnaea* и чему нас может научить *Lymnaea*?» описаны преимущества использования моллюска *Lymnaea stagnalis* для изучения нейронной основы обучения и памяти при классическом обусловливании аппетита и избегания; приведено множество поведенческих тестов, которые применяются для выявления способностей памяти и возможность использовать улиток при трансляционных исследованиях в медико-биологических исследованиях [24].

Таким образом, проведенные исследования показали, что легочные пресноводные моллюски могут использоваться для оценки действия водорастворимых веществ на обмен веществ. Для них характерны некоторые преимущества по сравнению с млекопитающими: соответствие международным этическим требованиям, доступность и дешевизна, отсутствие потребности в специальном оборудовании и обслуживании, возможность получения адекватной информации по циркулирующим в жидкостях организма биохимическим показателям (глюкоза, общий белок, мочевая кислота, мочевина, холестерол).

Литература:

- [1] Bui H.B., Inaba K. Structures, mechanisms, and physiological function of zinc transporters in different biological kingdoms // Int. J. Mol. Sci. 2024. Vol. 25(5). P. 3045.
- [2] Чиркин А.А., Балаева-Тихомирова О.М., Семенов И.О., Пинчук П.Ю. Отбор модельных организмов для биомедицинских исследований посредством изучения молекулярно-структурной гомологии протеолитических ферментов // Новости медико-биологических наук. 2022. Т. 22. № 3. С. 214–218.
- [3] Levitt D. E., Bourgeois B.L., Rodríguez-Graciani K.M. et al. Alcohol impairs bioenergetics and differentiation capacity of mioblasts from simian immunodeficiency virus-infected female macaques // Int. J. Mol. Sci. 2024. Vol.25(4). P. 2448.
- [4] Liao S.F., Ji F., Fan P., Denryter K. Swine gastrointestinal microbiota and the effect of dietary amino acids on its composition and metabolipm // Int. J. Mol. Sci. 2024. Vol. 25(2). P.1237. <https://doi.org/10.3390/ijms25021237>.
- [5] Ronghao Zhang R., Jadhav D.A., Najeong Kim N. et al. Profiling cell heterogeneity and fructose transporter expression in the rat nephron by integrating single-cell and microdissected tubule segment transcriptomes // Int. J. Mol. Sci. 2024. Vol.25(5). P. 3071.
- [6] Suiwal S., Wartenberg P., Boehm U. et al. A novel Cre recombinase mouse strain for cell-specific deletion of floxed genes in ribbon sinapse-forming retinal neurons // Int. J. Mol. Sci. 2024. Vol. 25(3). P. 1916.
- [7] Wong S.K., Chin K.Y., Suhaimi F.H., Fairus A., Ima-Nirwana S. Animal models of metabolic syndrome: a review // Nutr. Metab. (Lond). 2016. Vol.13. P. 65.

- [8] Hu W., Lazar M.A. Modelling metabolic diseases and drug response using stem cells and organoids // Nat. Rev. Endocrinol. 2022. Vol. 18. P. 744–759.
- [9] Sharma A., Sances, S., Workman, M. J., Svendsen, C. N. Multi-lineage human iPSC-derived platforms for disease modeling and drug discovery // Cell Stem Cell. 2020. 26(3). P. 309–329.
- [10] Marsee, A., Roos F.J.M., Versteegen M.M.A. et al. Building consensus on definition and nomenclature of hepatic, pancreatic, and biliary organoids // Cell Stem Cell. 2021. Vol. 28 (5). P. 816–832.
- [11] Meishuang Li, Xiyun Guo, Linxin Cheng et al. Porcine kidney organoids derived from native-like embryonic stem cells // Int. J. Mol. Sci. 2024. Vol. 25(1). P. 682.
- [12] Richelle, A., Kellman B.P., Wenzel A.T. et al. Model-based assessment of mammalian cell metabolic functionalities using omics data // Cell Reports Methods. 2021. Vol. 1 (3). P. 100040.
- [13] Wu, X., Xu, M., Geng, M. et al. Targeting protein modifications in metabolic diseases: molecular mechanisms and targeted therapies // Sig Transduct Target Ther. 2023. Vol. 8. P. 220. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01439-y>.
- [14] Sghaireen M.G., Al-Smadi Y., Al-Qerem A. et al. Machine learning approach for metabolic syndrome diagnosis using explainable data-augmentation-based classification // Diagnostics. 2022. Vol. 12(12). P. 3117. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12123117>.
- [15] Андреева Д.Д., Синегубов А.А., Бурзак Н.А. и др. Трансгенные модельные объекты нового поколения и их использование в персонализированной медицине // Российский журнал персонализированной медицины. 2021. Том 1(1). С. 95–117.
- [16] Чиркин А.А., Балаева-Тихомирова О.М. Молекулярно-структурная гомология протеолитических ферментов: монография. Чебоксары: Издательский дом «Среда», 2022. 124 с.
- [17] Чиркин А.А., Балаева-Тихомирова О.М., Долматова В.В., Семенов И.О. Молекулярно-структурная гомология протеолитических ферментов в изучении механизма протеолиза и его регуляции // Весці НАН Беларусі. Серыя хім. навук. 2021. Т. 57 №. 2. С. 206–2017.
- [18] Kuroda R., Abe M. The pond snail *Lymnaea stagnalis* // EvoDevo. 2020. Vol. 11(1). P. 24.
- [19] Rosato M., Hoelscher B., Lin Z. et al. Transcriptome analysis provides genome annotation and expression profiles in the central nervous system of *Lymnaea stagnalis* at different ages // BMC Genomics. 2021. Vol. 22(1). P. 637.
- [20] Orlov I.A., Ataev G.L., Gourbal B., Tokmakova A.S. et al. The transcriptomic analysis of *Planorbarius corneus* hemocytes (Gastropoda) naturally infected with *Bilharziella polonica* (Schistosomatidae) // Dev. Comp. Immunol. 2023. Vol. 140. P. 104607.
- [21] Чиркин А.А., Данченко Е.О., Толкачева Т.А. и др. Моделирование биохимических признаков сахарного диабета у легочных пресноводных моллюсков // Новости медико-биологических наук, 2016. Том. 14, №3. С. 28–32.
- [22] Сидоров А.В. Нейромодуляторное действие пероксида водорода на центральные нейроны пищевой сети моллюска *Lymnaea stagnalis* // Журн. эволюц. биохим. и физиол. 2017. Т. 53, № 6. С. 437–443.
- [23] Шаденко В.Н. Лабильность пептидергических нейронов центральных нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis* при экспериментальной гипергликемии: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Мн.: Ин-т физиологии НАН Беларусі, 2009. 23 с.
- [24] Rivi V., Benatti C., Lukowiak K., Colliva C. et al. What can we teach *Lymnaea* and what can *Lymnaea* teach us? // Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 2021. Vol. 96 (4). P. 1590–1602.

A. A. CHIRKIN, P. YU. PINCHUK, M. V. VISHNEVSKAYA, O. M. BALAEVA-TIKHOMIROVA

USE OF PULMONARY FRESHWATER MOLLUSKS FOR STUDYING METABOLIC DISORDERS

Educational institution "Vitebsk State University named after P.M. Masherov", Vitebsk, Republic of Belarus

Summary

The article presents data on the molecular structural similarity of 20 enzymes that control the content of glucose, total protein, uric acid, urea and cholesterol in the blood serum of humans, laboratory rats and in the hemolymph of the pulmonary freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata* as part of the search for simple and accessible organisms that can be used to study the characteristics of metabolism under the influence of pathological factors. Experiments with the introduction of glucose have shown that common pond snails (*Lymnaea stagnalis*) and horned pond snails (*Planorbarius corneus*), which are the closest relatives of *Biomphalaria glabrata*, in pairs can serve as possible organisms for assessing the state of metabolism during physiological stimulation of metabolism by administering glucose in concentrations of 0,05–0,5 %, disruption of insulin regulation of carbohydrate metabolism by administration of streptozotocin in doses of 35–100 mcg/g and modeling of the toxic effects of ethanol in the concentration range of 0,1–5,0 %.

Key words: circulating molecules, human, rat, pulmonary freshwater molluscs, metabolic disorders, streptozotocin, ethanol.