СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ДЛЯ ОЦЕНКИ УРОВНЯ СОДЕРЖАНИЯ ГЛИКОГЕНА В МОДЕЛЬНОЙ НЕМАТОДЕ *CAENORHABDITIS ELEGANS*

Сидор Е. А.¹,

evgenia.sidor@gmail.com

Андреянов О. Н.¹,

доктор ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник

1980oleg@mail.ru

Аннотация

Модельная нематода *Caenorhabditis elegans* широко используется в исследованиях метаболической регуляции и процессах старения, в биологии развития, клеточной биологии, нейробиологии и генетике. В последних работах показана решающая роль гликогена, полимера глюкозы, в стрессоустойчивости, поддержании запасов энергии и старении организмов. В настоящее время основными способами определения гликогена в нематоде *C. elegans* являются окрашивание йодом, ферментный анализ и Рамановская микроспектроскопия, описанная в 2019 году А. Cherkas. Предлагаемый в данной работе спектрофотометрический метод позволяет дать количественную оценку уровня гликогена, в отличие от используемых в современной практике. Нематод выращивали на агаре NGM, засеянном *E. coli* в качестве источника пищи, в течение 7 суток в термостате при температуре 20 ± 2 °C. Затем смывали буфером M9 и отделяли от бактерий центрифугированием 10 мин при 9 000 g. Помещали образцы в ледяную баню и проводили подсчет нематод в каждой пробе при увеличении микроскопа $\times 10$. Концентрацию гликогена определяли спектрофотометрическим методом. Данное значение является средним для разных стадий развития нематоды и составляет $0,001821 \pm 0,000009$ мкг.

Ключевые слова: *Caenorhabditis elegans*, гликоген, спектрофотометрический метод.

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (117218, г. Москва, ул. Б. Черемушкинская, д. 28)

SPECTROPHOTOMETRIC METHOD TO ESTIMATE GLYCOGEN LEVELS IN THE MODEL NEMATODE *CAENORHABDITIS ELEGANS*

Sidor E. A.¹,

evgenia.sidor@gmail.com

Andreyanov O. N.¹,

Doctor of Veterinary Sciences, High Research Associate

1980oleg@mail.ru

Abstract

The model nematode *Caenorhabditis elegans* is widely used in studies on metabolic regulation and aging processes, in developmental and cell biology, neurobiology and genetics. Recent studies have shown the crucial role of glycogen, the glucose polymer, in stress resistance, energy maintenance and aging of organisms. Currently, the main methods for determining glycogen in the *C. elegans* nematode are iodine staining, enzyme analysis, and Raman microspectroscopy, described in 2019 by A. Cherkas. The proposed spectrophotometric method allows us to quantify glycogen levels, in contrast to those used in modern practice. The nematode was grown on NGM agar seeded with *E. coli* as a food source for 7 days in a thermostat at $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Then, it was washed with M9 buffer and separated from bacteria by centrifugation for 10 min at 9 000 g. The samples were placed in an ice bath and nematodes were counted in each sample at $\times 10$ microscope magnification. The glycogen concentration was determined spectrophotometrically. This value is average for different stages of the nematode development and amounts to $0.001821 \pm 0.000009 \mu\text{g}$.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*, glycogen, spectrophotometric method.

Введение. Гликоген является основным резервным полисахаридом животных и человека и служит в качестве буфера, предотвращая неблагоприятные воздействия избыточной глюкозы и высвобождая ее в ответ на метаболические потребности. Последние достижения в исследованиях гликогена показали его решающую роль в стрессоустойчивости, поддержании запасов энергии и старении организмов [5].

Caenorhabditis elegans — свободноживущая нематода, являющаяся модельным организмом, широко используемым в исследованиях

¹ All-Russian Scientific Research Institute for Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plant — a branch of the Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV" (28, Bolshaya Chermushkinskaya st., Moscow, 117218, Russia)

метаболической регуляции и процессах старения, в биологии развития, клеточной биологии, нейробиологии и генетике [1]. *C. elegans* использует гликоген аналогично млекопитающим. Известно, что запасание гликогена позволяет защитить нематод от осмотического и аноксического стресса, а также от острого окислительного стресса, способствуя при этом ускоренному старению [3, 4, 5].

Определение количественного содержания гликогена у *C. elegans* до сих пор вызывает затруднения среди исследователей. Окрашивание йодом, описанное Frazier и Roth (2015), часто используется для качественной оценки содержания гликогена [4]. Однако применимость этого метода для анализа ограничена из-за формы нематод и неоднородности накопления гликогена в различных частях тела. Кроме того, йод связывается с гликогеном нековалентно, и интенсивность цвета может уменьшаться со временем или во время других этапов приготовления, таких как промывание. Также отмечена довольно высокая степень индивидуальной вариабельности интенсивности окрашивания. Ферментативные анализы могут быть использованы для определения содержания гликогена с высокой специфичностью, но дороги; к тому же при их использовании необходимо определить содержание белка в опытном образце, поскольку конечный результат анализа выражается в виде общего гликогена на единицу белка, присутствующего в пробе. Не так давно был предложен метод Рамановской (2019) микроспектроскопии (RMS), позволяющий оценить характер распределения макромолекул при субклеточном разрешении в отдельных нематодах. RMS имеет потенциал для использования в качестве чувствительного, точного и высокопроизводительного метода для оценки запасов гликогена в *C. elegans*, но, к сожалению, так же является полуколичественным [2]. Поэтому востребованы чувствительные, надежные, экономичные и воспроизводимые методы количественной оценки запасов гликогена для применения на животных моделях.

Материалы и методы. Культура нематоды *C. elegans* и штамм OP50 *E. coli*, служащий ей источником пищи, были получены из коллекции Центра паразитологии ИНПЭ РАН. Культуры поддерживали на плотных питательных средах NGM и LB соответственно по известной методике [6]. Для проведения опыта *C. elegans* выращивали на 24 чашках Петри ($d = 80$ mm), засеянных *E. coli*, в течение 7 суток в термостате при температуре 20 ± 2 °C. Еще 8 чашек с агаром NGM были засеяны *E. coli* и служили контролем. Нематод смывали стерильным буфером M9 и отделяли от бактерий центрифугированием при 9000g

в течение 10 мин. *C. elegans* переносили пастеровской пипеткой в 3 стерильные пробирки и помещали в ледяную баню. Подсчет нематод в пробе осуществляли в камере Мигачевой-Котельникова, предварительно разбавив холодным буфером в несколько раз, при увеличении микроскопа $\times 10$. Повторяли операцию 3 раза и рассчитывали среднее количество нематод в каждой пробе. Определение гликогена проводили спектрофотометрическим методом, описанном в патенте «Способ определения количества гликогена в личинках трихинелл для контроля качества обезвреживания инвазионного материала» [7].

Результаты исследований. В трех образцах, полученных после 7 суток культивирования *C. elegans* в термостате при 20 ± 2 °C, содержалось от 67520 ± 2120 до 84120 ± 4060 нематод на разных стадиях развития. В смыве с NGM, засеянным *E. coli* и используемым в качестве контрольного образца, не детектировалось качественного изменения окраски раствора. Среднее содержание гликогена в одной нематоды составило $0,001821 \pm 0,000009$ мкг (табл. 1).

Таблица 1

Результаты измерений оптической плотности в исследуемых пробах *C. elegans*

№ пробы	Количество нематод в пробе, шт.	Показатель оптической плотности	Содержание гликогена в одной нематоды в пробе, мкг	Среднее содержание гликогена в одной нематоды, мкг
1	67520 ± 2120	0,161	0,001834	$0,001821 \pm 0,000009$
2	84120 ± 4060	0,198	0,001811	
3	75680 ± 3650	0,179	0,001819	

Закключение. Установлена концентрация гликогена в модельной свободноживущей нематоды *C. elegans*. Данное значение является средним для разных стадий развития нематоды и составляет $0,001821 \pm 0,000009$ мкг. Используемый метод определения концентрации гликогена позволяет дать количественную оценку содержания полисахарида и может быть применим в различных исследованиях *C. elegans* при условии достаточного количества опытного материала.

Литература

1. Ankeny R.A. The natural history of *Caenorhabditis elegans* research // Nature Reviews Genetics. 2001. V. 2. № 6. P. 474–479.
2. Cherkas A. et al. Label-free molecular mapping and assessment of glycogen in *C. elegans* // Analyst. 2019. V. 144. № 7. P. 2367–2374.

3. Gusarov I., Nudler E. Glycogen at the crossroad of stress resistance, energy maintenance, and pathophysiology of aging // *BioEssays*. 2018. V. 40. № 9. С. 1800033. DOI: 10.1002/bies.201800033
4. La Macchia J.C., Frazier H.N., Roth M.B. Glycogen fuels survival during hypotonic-anoxic stress in *Caenorhabditis elegans* // *Genetics*. 2015. V. 201. № 1. P. 65–74.
5. Seo Y. et al. Metabolic shift from glycogen to trehalose promotes lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018. V. 115. № 12. P. E2791–E2800.
6. Stiernagle T. Maintenance of *C. elegans* // *C. elegans: A Practical Approach*. 1999. V. 2. P. 51–67.
7. Андреев О.Н., Сидор Е.А., Тимофеева О.Г. Способ определения количества гликогена в личинках трихинелл для контроля качества обезвреживания инвазионного материала: пат. 2681167 РФ № 2018106639; опубли. 04.03.2019, Бюл. № 7.

References

1. Ankeny R.A. The natural history of *Caenorhabditis elegans* research. *Nature Reviews Genetics*. 2001; 2(6):474–479.
2. Cherkas A. et al. Label-free molecular mapping and assessment of glycogen in *C. elegans*. *Analyst*. 2019; 144(7):2367–2374.
3. Gusarov I., Nudler E. Glycogen at the crossroad of stress resistance, energy maintenance, and pathophysiology of aging. *BioEssays*. 2018; 40(9):1800033. DOI: 10.1002/bies.201800033
4. LaMacchia J.C., Frazier H.N., Roth M.B. Glycogen fuels survival during hypotonic-anoxic stress in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 2015; 201(1):65–74.
5. Seo Y. et al. Metabolic shift from glycogen to trehalose promotes lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018; 115(12):E2791–E2800.
6. Stiernagle T. Maintenance of *C. elegans*. *C. elegans: A Practical Approach*. 1999; 2:51–67.
7. Andreyanov O.N., Sidor E.A., Timofeeva O. G. A method for determining the amount of glycogen in *Trichinella* larvae to control the quality of disposal of invasive material: Pat. 2681167 RF №. 2018106639; publ. 03/04/2019, Bull. № 7. (In Russ.)