

СИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПРЕДСЕРДНОГО НАТРИЙУРЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА В ГЕМОЦИТАХ РЕЧНОГО РАКА

© М. Г. Мартынова, О. М. Быстрова, В. Н. Парфенов

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: heartdev@mail.cytspb.rssi.ru

В гемолимфе речного рака *Astacus astacus* присутствуют три типа клеток: агранулярные гемоциты (ГЦ I), гемоциты, содержащие мелкие гранулы (ГЦ II), и гемоциты, содержащие крупные гранулы (ГЦ III). Пролиферация, дифференциация и функции ГЦ ракообразных изучены недостаточно. При помощи светооптической и ЭМ-авторадиографии с использованием ³H-тимидина мы показали, что только ГЦ I способны к синтезу ДНК и митозам, тогда как ГЦ II и ГЦ III не пролиферируют. Для проверки предположения о том, что ГЦ I являются пролиферирующими клетками-предшественниками гранулярных ГЦ, были проанализированы автографы популяции ГЦ через 1, 2, 7 и 21 сут после однократного введения ³H-тимидина. Вопреки ожиданию, меченных ГЦ II и ГЦ III не было обнаружено. Эти результаты ставят под сомнение способность ГЦ I дифференцироваться в другие типы ГЦ. Методом авторадиографии с использованием ³H-уридина наибольшая активность синтеза РНК была зафиксирована в ГЦ I и примерно в 2 и 4 раза меньшая — в ГЦ II и ГЦ III соответственно. Кроме того, методом ЭМ-иммуноцитохимии ANP-иммунореактивный материал был обнаружен в больших гранулах ГЦ III. Наличие ANP в секреторных гранулах значительно расширяет спектр возможных функций ГЦ рака и предполагает их участие в регуляции водно-солевого баланса и иммунных реакциях.

Ключевые слова: синтез ДНК, синтез РНК, ANP.

Принятые сокращения: ГЦ — гемоциты, ЭМ — электронная микроскопия, ШЭР — шероховатый эндоплазматический ретикулум, ANP — предсердный натрийуретический пептид.

У ракообразных в гемолимфе распознают три типа гемоцитов (ГЦ), которые описывают под разными названиями: I тип — агранулярные ГЦ, гиалиноциты и коагулоциты; II тип — ГЦ с мелкими гранулами, фагоциты, амёбоциты, полугранулярные клетки и промежуточные клетки; III тип — ГЦ с крупными гранулами, гранулоциты, эозинофильные ГЦ и гранулярные амёбоциты (Stang-Voss, 1971; Mix, Sparks, 1980; Martin, Graves, 1985; Uhrík et al., 1989). Мы их будем обозначать как ГЦ I, ГЦ II и ГЦ III соответственно. Одни исследователи рассматривают эти морфологически различающиеся формы ГЦ как функциональные и (или) возрастные вариации одного типа клеток (см. обзоры: Stang-Voss, 1974; Bauchau, 1981), другие склонны считать их отдельными клеточными линиями (Gargioni, Varracco, 1998). Существует и версия независимого происхождения ГЦ II и ГЦ III от агранулярных ГЦ I (Van de Braak et al., 2002). В цитированных работах отмечают такие функции ГЦ ракообразных, как синтез гемоцианина, фагоцитоз и инкапсуляция чужеродных тел, участие в коагуляции гемолимфы, регенерации тканей и иммунных реакциях. Содержимое гранул ГЦ ракообразных изучено мало.

Предсердный натрийуретический пептид (ANP) входит в систему натрийуретических пептидов, включающую в себя также BNP и CNP. Ген ANP кодирует состоящий из 126 аминокислотных остатков прогормон ANP, который в дальнейшем распадается на четыре гормона:

LANP (long-acting natriuretic peptide), дилататор сосудов, калийуретический пептид и собственно натрийуретический пептид — ANP (Vesely, 2002). Собственно ANP расположен на С-конце молекулы прогормона и состоит из 28 аминокислотных остатков (99—126). Хорошо известно участие натрийуретических пептидов в регуляции водно-солевого баланса, кровяного давления и объема плазмы крови. Исследования последних лет показали, что функции этих пептидов могут быть значительно шире. Так, было выявлено их центральное участие в модуляции иммунного ответа при астме (Mohapatra et al., 2004), а также антиканцерогенные свойства (Vesely, 2005; Saba, Vesely, 2006). Противоопухолевое действие натрийуретических пептидов связано с их способностью понижать активность таких ростстимулирующих веществ, как ERK-1/2 (Extracellular Receptor Kinase) и фактора транскрипции NfκB (Nuclear Factor Kappa Beta), а также ингибировать синтез ДНК (Vesely, 2005; Saba, Vesely, 2006).

ANP является эволюционно консервативным белком; он обнаружен в растениях, а также у одноклеточных и беспозвоночных животных (Vesely, Vesely, 1999; Vesely, 2002). Ранее мы показали наличие ANP-иммунореактивного материала в эндотелиальных клетках сердца брахиоподы *Rhynchonella psitacea* и аннелиды *Arenicola marina*, а также в гранулярных клетках сердца брюхоногих моллюсков *Achatina fulica* и *Helix pomata* (Bystrova et al.,

2002; Мартынова и др., 2004). У ракообразных экспрессия гена *ANP* была выявлена биохимическими методами в сердце краба *Callinectes sapidus* (Poulos et al., 1995) и в сердце и ГЦ мечехвоста *Limulus polyphemus* (Vesely, Vesely, 1999), однако клеточная локализация пептида в органе не была установлена.

Цель данного исследования — попытаться выявить генетические связи между ГЦ разных типов, проследить корреляцию морфологии ГЦ рака с их репликативной и транскрипционной активностью, а также изучить наличие и локализацию ANP в ГЦ.

Материал и методика

Широкопалого речного рака *Astacus astacus*, добытого в озерах Всеволожского р-на Ленинградской обл., содержали в пластмассовых кюветах с водопроводной водой при 14 °С и постоянном световом режиме (12 ч освещения). Пищевой рацион состоял из живых личинок хирономуса и опавших листьев. Все эксперименты проводили на раках среднего размера массой около 15 г.

Электронная микроскопия (ЭМ). Изолированные сердца рака фиксировали в 2.5%-ном глутаральдегиде на 0.05 М какодилатном буферном растворе с 10%-ным содержанием сахарозы в течение 2 ч, постфиксировали в 1%-ном OsO₄ на какодилатном буфере с 4%-ным содержанием сахарозы в течение 1 ч и затем обезвоживали в ряду спиртов повышающейся концентрации с добавлением замещающего спирт ацетона на конечных стадиях проводки. В качестве заливочной смолы использовали смесь Аралдита и Эпона-812. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме ЛКВ-III с помощью алмазного ножа. Срезы контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца. Материал просматривали в электронном микроскопе JEM-7 при 80 кВ.

Светооптическая и ЭМ-авторадиография. В перикардальный синус рака вводили ³H-тимидин со специфической активностью 732.6 ГБк/моль (ГИПХ, Санкт-Петербург) в дозе 0.8 МБк на 1 г массы животного или ³H-уридин (ГИПХ, Санкт-Петербург) в такой же дозе. Сердца изолировали и фиксировали в опытах с ³H-уридином через 4 ч после введения изотопа, а в опытах с ³H-тимидином — через 4 ч, а также через 1, 2, 7 и 21 сут после введения изотопа. Для каждой временной точки использовали по 5 раков. Дальнейшую обработку и заливку осуществляли по приведенной выше схеме. Для получения ЭМ-автографов (Larra, Droz, 1970) ультратонкие срезы помещали на предметные стекла, покрытые целлюлозной пленкой, контрастировали цитратом свинца и покрывали фотоэмульсией М (Московский завод технических фотопластинок). Препараты экспонировали от 1 до 2 мес. После проявления срезы переносили на сеточки для ЭМ. Светооптические автографы получали на полутонких срезах (1 мкм). Время экспозиции с фотоэмульсией составляло от 20 до 30 сут. После проявления среды окрашивали основным фуксином с метиленовым голубым и азуром II (Ontell, 1974).

Для оценки интенсивности синтеза РНК в ядрах ГЦ разных типов на светооптических автографах подсчитывали количество зерен восстановленного серебра. Для каждого из трех типов ГЦ анализировали по 100 ядер. Стандартное отклонение от среднего при 95%-ном доверительном интервале определяли по методу Стьюдента.

ЭМ-иммуноцитохимия. Выявление клеточной локализации ANP проводили на ультратонких срезах материала, заключенного в эпоксидные смолы. Срезы, помещенные на никелевые сеточки, обрабатывали 3%-ной перекисью водорода в течение 20 мин для разрыхления смолы и повышения иммунореактивности ткани. Затем срезы инкубировали в растворе поликлональных антител к ANP (amino acids 99—126, Peninsula Lab. Inc., Vachem) с рабочим разведением 1 : 1000 в течение 1 сут при 4 °С. В качестве вторых антител использовали белок А, конъюгированный с коллоидным золотом (10 нм) (Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов), с рабочим разведением 1 : 20. Контролем служили срезы, обработанные только вторыми антителами.

Результаты

Ультраструктура ГЦ. ГЦ I — небольшие клетки диаметром около 7 мкм слегка овальной формы и с высоким ядерно-плазматическим отношением (рис. 1, а). Лопастное ядро окружено узким ободком цитоплазмы, содержащей мелкие гранулы, небольшое количество митохондрий, расширенные каналы шероховатого эндоплазматического ретикулума (ШЭР), вакуоли и ламеллярные тельца. ГЦ II — овальные клетки размером около 12.5 × 7.5 мкм, содержащие большое количество мелких гранул (рис. 1, б). Гранулы локализуются вокруг лопастного ядра, а непосредственно под клеточной оболочкой расположен слой цитоплазмы, свободный от гранул. Клетки несут на поверхности небольшие выросты. Помимо гранул в ГЦ II имеются расширенные каналы ШЭР и вакуоли. Иногда можно наблюдать картины экзоцитоза содержимого их образований в гемолимфу (рис. 1, в). Цитоплазма содержит также небольшие митохондрии и комплексы Гольджи, ГЦ III — большие клетки овальной формы со средним размером 245 × 10.5 мкм (рис. 4, з). Ядро неглубоко лопастное. Цитоплазма заполнена крупными гранулами, содержимое которых неоднородно по электронной плотности. В цитоплазме имеется несколько комплексов Гольджи, около которых расположены мелкие гранулы.

Большинство ГЦ можно легко причислить к одной из трех описанных групп. Однако отдельные ГЦ обладают смешанными морфологическими характеристиками. Так, имеются ГЦ, соответствующие по размеру ГЦ I, но содержащие уже значительное количество гранул. Встречаются также ГЦ, имеющие наряду с большим количеством мелких несколько крупных гранул. Такие клетки представляются стадиями дифференцировки зрелых типов ГЦ.

Синтез ДНК. На светооптических автографах тканей сердца, зафиксированных через 4 ч, 1, 2, 7 и 21 сут после введения ³H-тимидина (³HT), метка присутствовала над ядрами только ГЦ I. Электронно-микроскопические автографы показали, что ядра ³HT-меченных ГЦ содержат небольшое количество мелких гранул и расширенные каналы эргастоплазматического ретикулума (рис. 2). Изредка встречались ГЦ I, находящиеся в стадии митоза (рис. 2, вставка). Включения предшественника синтеза ДНК в ядра ГЦ II и ГЦ III не наблюдали ни при импульсном, ни при отставленном мечении.

Синтез РНК. Активность синтеза РНК в ГЦ рака оценивали на материале, зафиксированном через 4 ч после введения ³H-уридина. Метка располагалась главным

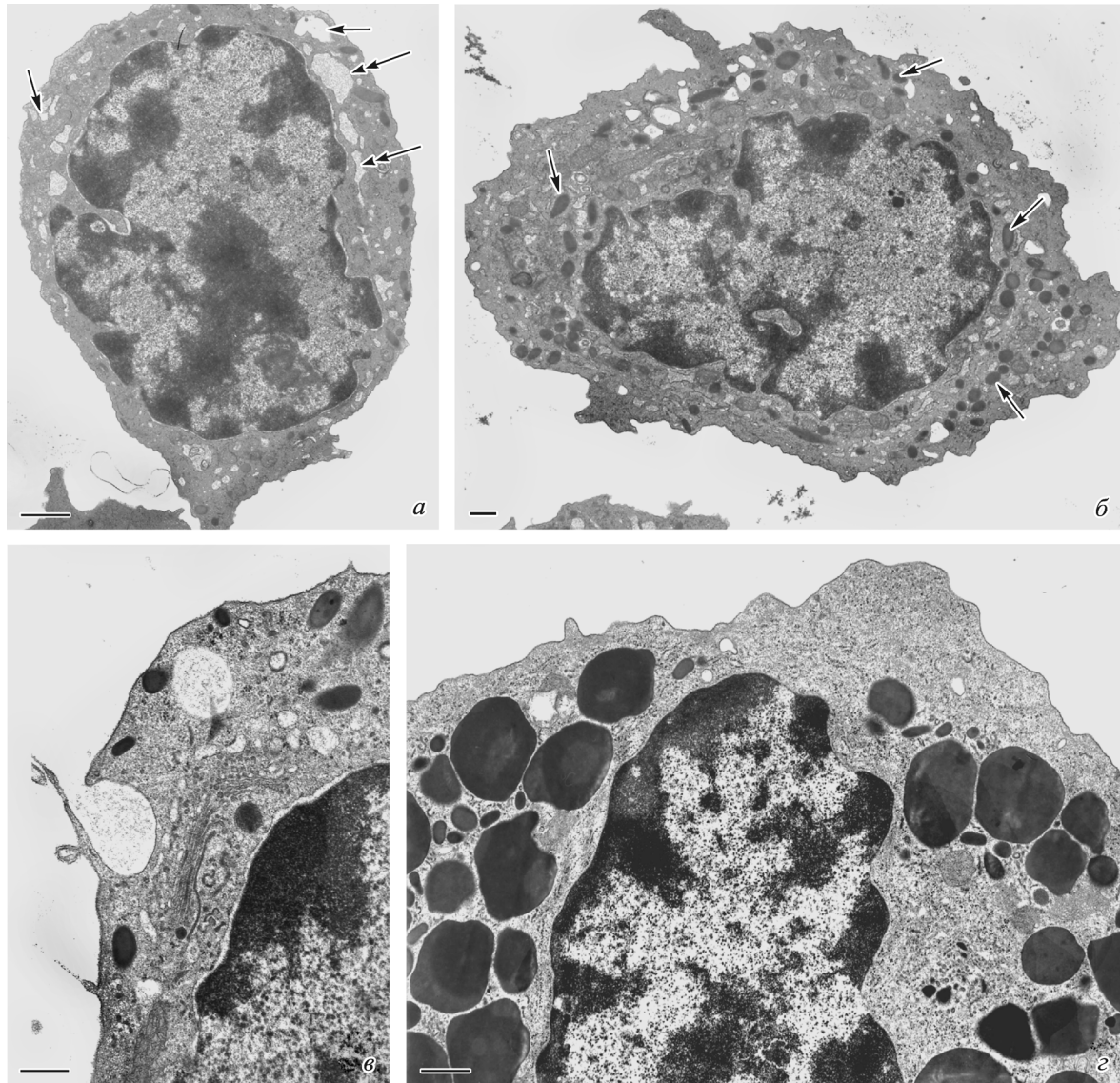


Рис. 1. Ультраструктура гемоцитов (ГЦ) речного рака.

a — агранулярный ГЦ I отличается высоким ядерно-плазменным отношением, содержит расширенные каналцы ШЭР (двойные стрелки) и маленькие вакуоли (стрелки); *б* — ГЦ II содержит наряду с расширенными каналцами ШЭР и вакуолями большое количество мелких электронно-плотных гранул (стрелки); *в* — аппарат Гольджи в ГЦ II и выбросе содержимого одной из двух крупных вакуолей; *г* — ГЦ III содержит множество крупных гранул. Масштабные отрезки — 1 мкм.

образом над ядрами ГЦ всех трех типов (рис. 3). Подсчет количества зерен восстановленного серебра на светооптических автографах показал статистически достоверные различия интенсивности мечения ядер ГЦ разных типов. Число зерен метки над ядрами ГЦ I составило 27.3 ± 3.3 , над ядрами ГЦ II — 17.3 ± 1.7 и над ядрами ГЦ III — 7.6 ± 1.5 .

Иммунолокализация ANP. Иммуноцитохимический анализ выявил наличие ANP-иммунореактивного материала в крупных гранулах ГЦ III (рис. 4). Мелкие гранулы, находящиеся в этих же ГЦ и в ГЦ других типов, а также содержимое расширенных каналцев ШЭР ANP-иммунореактивности не проявляли. Около аппарата Гольджи можно было наблюдать мелкие зарождающиеся в диктиосомах гранулы, не несущие иммунной метки, и расположенные поблизости крупные меченые гранулы (рис. 5).

Обсуждение

Наши результаты показывают, что только агранулярные ГЦ I включают ^3H -тимидин и митотически делятся, тогда как содержащие гранулы ГЦ II и ГЦ III этой способностью не обладают. Мы ожидали, что через несколько суток после введения ^3H -тимидина включившие изотоп ГЦ I дифференцируются в гранулярные ГЦ, что приведет к появлению меченых ГЦ II и ГЦ III. Однако и при отставленном времени фиксации только ГЦ I демонстрировали метку. ГЦ I также значительно активнее синтезируют РНК, чем гранулярные ГЦ; интенсивность мечения ^3H -уридином ГЦ I более чем в 2 раза превышала интенсивность мечения ГЦ II и почти четырехкратно превосходила этот показатель у ГЦ III. Выявленные характеристики ГЦ рака не позволяют однозначно решить вопрос о генетических связях между ГЦ разных типов. Присутствие

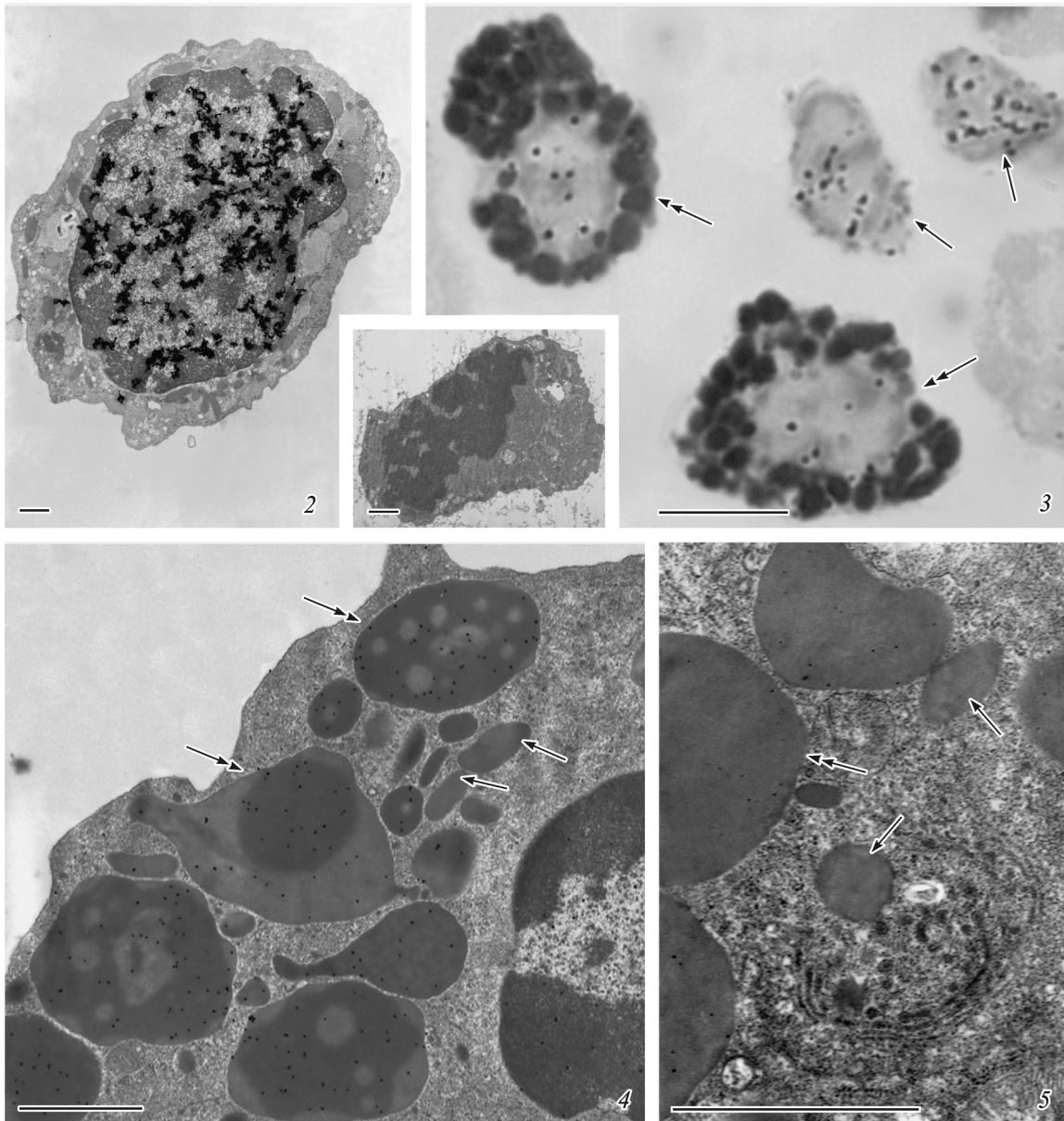


Рис. 2. ЭМ-автограф. Меченный ^3H -тимидином ГЦ I.

Вставка — ГЦ I в стадии митоза.

Рис. 3. Светооптический автограф ГЦ I (стрелки) и ГЦ III (двойные стрелки), меченных ^3H -уридином.

Окраска основным фуксином с метиленовым голубым и азуром II.

Рис. 4. Иммуноцитохимическая локализация ANP-подобного материала в больших гранулах ГЦ III (двойные стрелки).

Содержимое гранул имеет неравномерную электронную плотность. Мелкие гранулы (стрелки) остаются немечеными.

Рис. 5. Аппарат Гольджи в ГЦ III.

Мелкие гранулы (стрелки) вблизи диктиосом не мечены антителами к ANP, тогда как крупные гранулы (двойные стрелки) несут метку. Масштабные отрезки: 2 и вставка, 4 и 5 — 1 мкм; 3 — 10 мкм.

в гемолимфе ГЦ со смешанными морфологическими характеристиками и постепенное снижение активности синтеза РНК от ГЦ I и ГЦ II и затем ГЦ III позволяют построить единую линию постепенной дифференцировки ГЦ, однако опыты с отставленной меткой ^3H -тимидином эту версию не подтверждают.

ANP-иммунореактивный материал был выявлен только в крупных гранулах ГЦ III. По-видимому, ANP-подоб-

ный материал накапливается в гранулах по мере их созревания, так как мелкие гранулы, расположенные около аппарата Гольджи, его еще не содержат. Используемые нами антитела к С-терминальному фрагменту молекулы ANP распознают как собственно гормон ANP, так и его предшественник — прогормон ANP, и, следовательно, не исключено присутствие в гранулах обеих форм пептида.

Относительно содержимого гранул ГЦ ракообразных имеются весьма немногочисленные данные. Так, в гранулах ГЦ креветки *Sicyonia ingentis* выявлено наличие антибактериальных молекул, лизосомных энзимов и профенолоксидазы (Martin, Chiu, 2003). Информационная РНК антимикробных пептидов ракообразных, таких как пенаидины и крустин, а также элементы профенолоксидазной системы обнаружены в ГЦ креветки *Litopenaeus vannamei* (Окумга, 2007). Гранулярные ГЦ рака *Procambarus clarkii*, как было показано, позитивны к неспецифической эстеразе и демонстрируют фенолоксидазную активность (Lanz et al., 1993). Наиболее подробно изучено участие ГЦ ракообразных в иммунных процессах. Врожденная неспецифическая иммунная система беспозвоночных включает в себя клеточную и гуморальную компоненты. В обеих реакциях задействованы ГЦ, которые активно фагоцитируют и (или) инкапсулируют чужеродный материал, а также выделяют в гемолимфу иммуноактивные вещества. Системе комплемента позвоночных у беспозвоночных соответствует профенолоксидазная (проРО) система. Ее деятельность, если кратко, сводится к следующему. Связывание липополисахаридов и β -1,3-глюканов клеточных стенок микроорганизмов распознающими белками иммунной системы беспозвоночного животного активизирует каскад сериновых протеиназ профенилоксидазной системы, что ведет к высвобождению фенолоксидазы, окисляющей фенолы до меланина — соединения, токсичного для микроорганизмов (Cerenius, Soderhall, 2004). Активизация профенилоксидазной системы сопровождается и актуализацией ряда дополнительных иммунных белков, например пероксипектина — фактора клеточной адгезии. Информационная РНК профенилоксидазы обнаружена в ГЦ креветки *Litopenaeus vannamei* (Lai et al., 2005). Профенилоксидаза выявлена в ГЦ II и III типов нескольких видов десятиногих раков (Soderhall, Smith, 1983). Наличие пероксипектина и его предшественника пропероксипектина обнаружено в ГЦ рака *Pacifastacus leniusculus* (Lin et al., 2007). Показано также, что компоненты профенилоксидазной системы индуцируют дегрануляцию ГЦ речного рака *Astacus astacus* (Smith, Soderhall, 1983). Таким образом, ANP в ГЦ рака колокализуется с проиммунными компонентами профенилоксидазной системы. В настоящее время накапливаются данные об участии ANP в иммунных реакциях (см. обзор: Vollmar, 2005). Можно предположить, что ANP усиливает иммунный потенциал ГЦ.

Морфологически различающиеся ГЦ II и ГЦ III, вероятно, выполняют разные функции. Так, у рака *Astacus leptodactylus* ГЦ II обладают выраженной фагоцитарной активностью, тогда как ГЦ III задействованы в активизации профенилоксидазной системы (Giuliani et al., 2007). Пероксидазная активность была обнаружена только в больших гранулах ГЦ рака *Procambarus clarkii* (Lanz et al., 1993). ANP, как нами было показано, локализован также только в больших гранулах ГЦ III.

Эволюционные связи кроветворных тканей и клеток крови у беспозвоночных и позвоночных животных неясны. На основании морфологического сходства и наличия ANP в гранулах можно предположить некоторую функциональную аналогию между тучными клетками позвоночных и гранулярных ГЦ рака. У позвоночных животных тучные клетки обычно интегрированы в соединительную ткань органов. В свободном состоянии они находятся в жидкости перитонеальной полости, а недифференцированные предшественники тучных клеток мигрируют

в кровяном русле от кроветворных органов, где они зарождаются, к местам своей резиденции в различных органах. Наличие ANP выявлено в гранулах тучных клеток сердца (Belloni et al., 2005) и перитонеальной полости (Martynova et al., 2005) крысы.

На основании наличия ANP спектр возможных функций ГЦ рака может быть значительно расширен. Вероятно, они участвуют в регуляции водно-солевого баланса, модуляции иммунных реакций, влияют на пролиферативное поведение других клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49393) и гранта президента РФ (НШ-1125.2006.4).

Список литературы

- Мартынова М. Г., Крылова М. И., Быстрова О. А. 2004. Иммуноцитохимическая локализация предсердного натрийуретического пептида в эндотелиальных и гранулярных клетках сердца лофотрохофорных. Цитология. 46 (5) : 448—455.
- Bauchau A. G. 1981. Crustaceans. In: Invertebrate blood cells. N. A. Ratcliffe, A. F. Rowley (eds). New York: Acad. Press. 3 : 386—420.
- Belloni A. S., Guidolin D., Salmasso R., Bova S., Rossi G. P., Nussdorfer G. G. 2005. Adrenomedullin, ANP and BNP are colocalized in a subset of endocrine cells in the rat heart. Int. J. Mol. Med. 15 : 567—571.
- Bystrova O. A., Parfenov V. N., Martynova M. G. 2002. Atrial natriuretic peptide in the granular cells of the snail heart. Цитология. 44 (2) : 115—119.
- Cerenius L., Soderhall K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. Immunol. Rev. 198 : 116—126.
- Gargioni R., Barracco M. A. 1998. Hemocytes of the palaemonid *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*. J. Morphol. 236 : 209—221.
- Giulianini P. G., Bierti M., Lorenzon S., Battistella S., Ferrero E. A. 2007. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from the freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*: cell types and their role after *in vivo* artificial non-self challenge. Micron. 38 : 49—57.
- Lai C. Y., Cheng W., Kuo C. M. 2005. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase from haemocytes of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 18 : 417—430.
- Lanz H., Tsutsumi V., Arechida H. 1993. Morphological and biochemical characterization of *Procambarus clarkii* blood cells. Develop. Comp. Immunol. 17 : 389—397.
- Larra F., Droz B. 1970. Techniques radioautographiques et leur application a l'etude du renouvellement des constituants cellulaires. J. Microsc. 9 : 845—880.
- Lin X., Cerenius L., Lee B. L., Soderhall K. 2007. Purification of properoxinectin, a myeloperoxidase homologue and its activation to a cell adhesion molecule. Biochim. biophys. acta. 1770 : 87—93.
- Martin G. G., Chiu A. 2003. Morphology of the midgut trunk in the penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*, highlighting novel nuclear pore particles and fixed hemocytes. J. Morphol. 258 : 239—248.
- Martin G. G., Graves B. L. 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. J. Morphol. 185 : 339—348.
- Martynova M. G., Bystrova O. A., Moiseeva O. M., Evdovin A. L., Kondratov K. A., Medvedeva N. D. 2005. The presence of ANP in rat peritoneal mast cells. Cell. Res. 15 : 811—816.
- Mix M. C., Sparks A. K. 1980. Hemocyte classification and differential counts in the Dungeness crab, *Cancer magister*. J. Invertebr. Pathol. 35 : 134—143.
- Mohapatra S. S., Lockey R. F., Vesely D. L., Gower W. R., jr. 2004. Natriuretic peptides and genesis of asthma: an emerging paradigm? J. Allergy Clin. Immunol. 114 : 520—526.

- Okumura T. 2007. Effects of lipopolysaccharide on gene expression of antimicrobial peptides (penaeidins and crustin), serine proteinase and prophenoloxidase in haemocytes of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 22 : 68—76.
- Ontell M. 1974. Muscle satellite cells: a valid technique for light microscopic identification and quantitative study of changes in their population following denervation. Anat. Rec. 178 : 211—228.
- Poulos J. E., Gower W. R., jr., Friedl F. E., Vesely D. L. 1995. Atrial natriuretic peptide gene expression within invertebrate hearts. Gen. Comp. Endocrinol. 100 : 61—68.
- Saba S. R., Vesely D. L. 2006. Cardiac natriuretic peptides: hormones with anticancer effects that localize to nucleus, cytoplasm, endothelium, and fibroblasts of human cancer. Histol. Histo-pathol. 21 : 775—783.
- Smith V. J., Soderhall K. 1983. Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system *in vitro*. Cell Tissue Res. 233 : 295—303.
- Soderhall K., Smith V. J. 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. Develop. Comp. Immunol. 7 : 229—239.
- Stang-Voss C. 1971. Zur Ultrastruktur der Blutzellen Wirbelloser Tiere: Über die Hämozyten von *Astacus astacus* (L.) (Crustacea). Z. Zellforsch. 122 : 68—75.
- Stang-Voss Ch. 1974. On the ultrastructure of invertebrate hemocytes: an interpretation of their role in comparative hematology. In: Contemporary topics in immunology. E. L. Cooper (ed.). New York; London: Plenum Press. 4 : 65—76.
- Uhrík B., Rýdlova K., Zacharová D. 1989. The roles of haemocytes during degeneration and regeneration of crayfish muscle fibers. Cell Tissue Res. 255 : 443—449.
- Van de Braak C. B., Botterblom M. H., Liu W., Taverner N., van der Knaap W. P., Rombout J. H. 2002. The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Fish Shellfish Immunol. 12 : 253—272.
- Vesely D. L. 2002. Atrial natriuretic peptide prohormone gene expression: hormones and diseases that upregulate its expression. IUBMB Life. 53 : 153—159.
- Vesely D. L. 2005. Atrial natriuretic peptides: anticancer agents. J. Investig. Med. 57 : 360—365.
- Vesely M. D., Gaver W. R., jr., Perez-Lamboy G., Overton R. M., Graddy L., Vesely D. L. 2001. Evidence for an atrial natriuretic peptide-like gene in plants. Exp. Biol. Med. 226 : 61—65.
- Vesely M. D., Vesely D. L. 1999. Environmental upregulation of the atrial natriuretic peptide gene in the living fossil, *Limulus polyphemus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 254 : 751—756.
- Vollmer A. M. 2005. The role of atrial natriuretic peptide in the immune system. Peptides. 26 : 1086—1094.

Поступила 12 IX 2007

SYNTHESIS OF NUCLEIC ACIDS AND LOCALIZATION OF ATRIAL NATRIURETIC PEPTIDE IN THE CRAYFISH HAEMOCYTES

M. G. Martynova, O. A. Bystrova, V. N. Parfenov

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: heartdev@mail.cytspb.rssi.ru

Three types of cells circulate in haemolymph of the crayfish *Astacus astacus*: agranular haemocytes (HCs I), small-granule haemocytes (HCs II) and large-granule haemocytes (HCs III). Their proliferation, differentiation and function remain poorly understood. By means of light and electron microscopic autoradiography using [³H]-thymidine, we have revealed that only HCs I are capable of DNA synthesis and mitosis whereas HCs II and HCs III are replicatively inactive. To determine whether the HCs I are proliferating progenitor cells for the granular HCs, we have analyzed autographs of HC population in 1, 2, 7 and 21 days after a single [³H]-thymidine administration. Contrary to the expectation, we have failed to find labeled HCs II and HCs III. These findings raise doubts on the capacity of the HCs I to differentiate into two other types of HCs. By autoradiography using ³H-uridine, it has been detected that intensity of the RNA synthesis was the greatest in HCs I and less by a factor of two and four in HCs II and HCs III, respectively. Additionally, by EM immunocytochemistry, ANP-like immunoreactivity was revealed in the large granules of the HCs III. We assume that availability of ANP in secretory granules extends the possible functions of the crayfish HCs and suggests their participation in regulation of water-salt balance and immune responses.