

## ИММУНОЛОКАЛИЗАЦИЯ СУБСТАНЦИИ P И FMRФАМИДА В ПРЕДСЕРДИИ БРЮХОНОГОГО МОЛЛЮСКА *ACHATINA FULICA*

© С. В. Шабельников, О. А. Быстрова, М. Г. Мартынова

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

Методами иммуногистохимии и электронно-микроскопической иммуноцитохимии была исследована локализация субстанции P (SP) и FMRФамида в предсердии моллюска *Achatina fulica*. Нервные волокна, иннервирующие предсердие улитки, плотно контактируют с гранулярными клетками (ГК), расположенными между мышечными и эндокардиальными клетками, образуя нейроэндокринные комплексы. Оба нейромедиатора были обнаружены в клетках этих предсердных нейроэндокринных комплексов. Методом иммунопероксидазной гистохимии была показана локализация SP- и FMRФамид-иммунореактивного материала в гранулах предсердных ГК. Электронно-микроскопическая иммуноцитохимия подтвердила наличие SP- и FMRФамид-иммунореактивного материала в гранулах ГК и, кроме того, показала его присутствие в нейросекреторных гранулах нервных волокон, как входящих в нейроэндокринные комплексы, так и контактирующих с кардиомиоцитами.

Ключевые слова: нервные медиаторы, гранулярная клетка.

Миогенное сердце моллюсков находится под комплексным нервным контролем серотонинергических, пептидергических и холинергических нейронов (Журавлев, 1999). Сердце брюхоногого моллюска *Achatina fulica* иннервируется перикардиальной ветвью интестинального нерва, отходящего от висцерального ганглия. Нервные волокна сосредоточены в предсердии улитки, в то время как большая часть желудочка слабо иннервирована, за исключением части, примыкающей к аорте (Nisbet, Plummer, 1969). Нервные окончания в предсердии образуют контакты как с кардиомиоцитами, так и с гигантскими гранулярными клетками (ГК), расположенными между кардиомиоцитами и эндокардиальными клетками. Тесная связь нервных терминалей с ГК позволяет говорить о наличии в предсердии улитки особых нейроэндокринных комплексов (Martynova et al., 2007) и предполагать существование контроля над секреторной активностью ГК со стороны нервной системы. Действительно, нами была показана дегрануляция предсердных ГК улитки при электрической стимуляции сердечного нерва (Shabelnikov et al., 2007). Нейротрансмиттеры, участвующие в регуляции секреции ГК, в настоящее время не определены. Исследователи отмечали сходство крупных электронно-плотных гранул в нервных окончаниях, иннервирующих предсердие, с нейросекреторными гранулами в нейрогипофизе позвоночных и высказывали предположение об их возможной нейрогуморальной функции (Cottrell, Osborne, 1969). В дальнейшем из ганглиев и различных органов моллюсков было выделено большое число пептидов, названных кардиоактивными за их способность влиять на работу сердца и на активность отдельных идентифицированных нейронов. Первым из этого ряда был выделен тетрапептид Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (FMRФамид). Было показано, что некоторые нейроны, иннервирующие

сердце *A. fulica*, содержат FMRФамид (Fujiwara-Sacata, Kobayashi, 1994). FMRФамид-иммунореактивный материал был обнаружен также в центральной и периферической нервной системе других беспозвоночных и некоторых позвоночных (Boeg et al., 1980; Dockray, Williams, 1983).

Методом иммуногистохимии некоторые нейропептиды, характерные для позвоночных, включая субстанцию P (SP), были обнаружены в тканях беспозвоночных (Haynes, 1980; Schot et al., 1982). SP относится к семейству тахикининов — возбуждающих нейропептидов, участвующих в синаптической передаче, ноцицепции и нейроиммунорегуляции у позвоночных (Łazarczyk et al., 2007). В работах Бойд с соавторами (Boyd et al., 1986) и Осборн (Osborne, 1982) была показана локализация SP в центральной и периферической нервной системе виноградной улитки *Helix*. Было продемонстрировано, что SP локализована в нервных окончаниях предсердия и оказывает положительный хроноинотропный эффект на сердце виноградной улитки (Boyd et al., 1984).

Целью настоящей работы являлось установление медиаторной специфичности нервных окончаний, контактирующих с ГК, в связи с чем была исследована локализация FMRФамид- и SP-подобного иммунореактивного материала в предсердии *A. fulica*.

### Материал и методика

**Животные.** Гигантских африканских улиток *Achatina fulica* (Gastropoda, Pulmonata) содержали в террариуме при постоянном температурном и световом режиме на овощной диете, с добавлением сухого молока и мела. В опыт брали взрослых половозрелых особей.

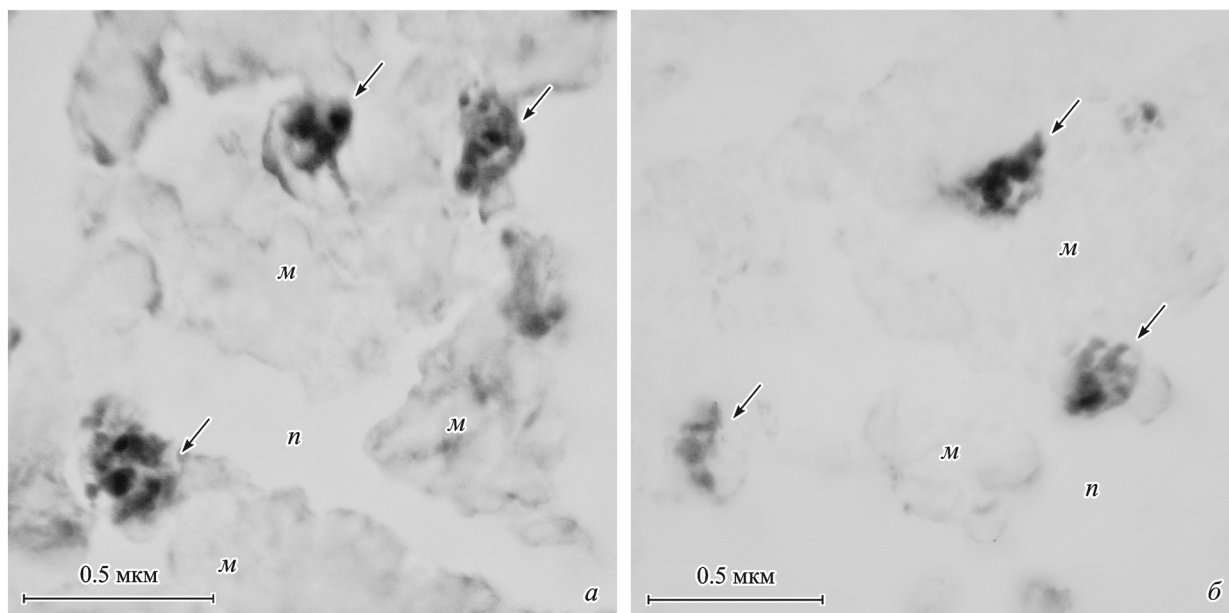


Рис. 1. Иммуногистохимическая локализация нейрпептидов SP (а) и FMRFамида (б) в предсердии *Achatina fulica*. м — мышечные трабекулы; n — полость предсердия; стрелки — гранулярные клетки, показавшие положительную реакцию.

**Иммуногистохимия.** На светомикроскопическом уровне локализация SP и FMRFамида была исследована с помощью иммунопероксидазной техники с использованием пероксидазного комплекса биотин—экстравадин. Изолированные сердца фиксировали в течение 24 ч при комнатной температуре в растворе, содержащем 0.5 % ацетата цинка, 0.5 % хлорида цинка, 0.05 % ацетата кальция и 0.1 М Трис (Beckstead, 1994). Затем образцы обезжировали, проводя их через ряд спиртов возрастающей концентрации, и заключали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм депарафинировали, промывали 10 мин в растворе, содержащем 5 % DMSO и 0.1 М Трис-HCl, pH 7.4, и инкубировали 5 мин в 3%-ной перекиси водорода для инактивации эндогенной пероксидазы. После промывки Трис-буфером срезы инкубировали 30 мин с поликлональными антителами против SP (1 : 400) или FMRFамида (1 : 400) (Peninsula Lab. Inc., Vachem), разведенными на Трис-буфере с добавлением 1 % БСА. Далее срезы обрабатывали биотинилированными вторыми антителами в течение 20 мин и экстравадин—пероксидазой в течение 20 мин. В качестве хромогена использовали 3,3'-диаминобензидин. Контролем служили срезы, обработанные только вторыми антителами.

**Электронно-микроскопическая иммуноцитохимия.** Изолированные сердца улитки фиксировали в 2.5%-ном глутаральдегиде на 0.05 М какодилатном буферном растворе с 10%-ным содержанием сахарозы в течение 2 ч. После промывки в какодилатном буферном растворе и постфиксации в 1%-ном OsO<sub>4</sub> на какодилатном буферном растворе с 4%-ным содержанием сахарозы в течение 1 ч материал проводили через ряд спиртов возрастающей концентрации с добавлением замещающего спирт ацетона на конечных стадиях проводки. В качестве заливающей смолы использовали смесь Аралдита и Эпона-812. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме ЛКВ-III с помощью алмазного ножа. Срезы, помещенные на никелевые сеточки, обрабатывали 3%-ной перекисью водорода в течение 20 мин для разрыхления смолы и повышения иммунореактивности ткани. Срезы инкубировали

последовательно в растворе первых антител против SP (1 : 1000) или FMRFамида (1 : 2000) (Peninsula Lab. Inc., Vachem) в течение 24 ч при 4 °С и в растворе белка А (1 : 20), конъюгированного с 10-нанометровым коллоидным золотом (Sigma). Срезы контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца. Материал просматривали на электронном микроскопе JEM-7 при ускоряющем напряжении 80 кВ. Контролем служили срезы, обработанные только вторыми антителами.

## Результаты

**Морфология предсердия улитки.** Сердце брюхоногого моллюска *Achatina fulica* состоит из предсердия и желудочка, заключенных в перикардиальный мешок. Стенка предсердия образует мышечные трабекулы, впячивающиеся в просвет органа и покрытые прерывистым слоем эндокардиальных клеток. Предсердие богато иннервировано разветвлениями сердечного нерва. Нервные волокна окружены отростками сопровождающих их глиоинтерстициальных клеток. Под эндокардиальными клетками предсердия расположены многочисленные секреторные гранулярные клетки (ГК). ГК представляют собой гигантские клетки (около 50 мкм диаметром) округлой формы, заполненные секреторными гранулами (0.5—2.0 мкм в диаметре). На электронограммах можно различить светлые гранулы с гомогенным содержанием и более или менее темные гранулы с фибриллярной структурой. Нервные окончания тесно контактируют как с кардиомиоцитами, так и с ГК, образуя с последними особые нейроэндокринные комплексы.

**Иммунолокализация SP и FMRFамида.** Методом иммунопероксидажной гистохимии SP- и FMRFамид-подобный иммунореактивный материал был обнаружен в ГК предсердия улитки (рис. 1, а, б). Нервные окончания не удается достоверно идентифицировать на парафиновых срезах. В связи с этим было проведено исследование на ультратонком уровне. Электронно-микро-



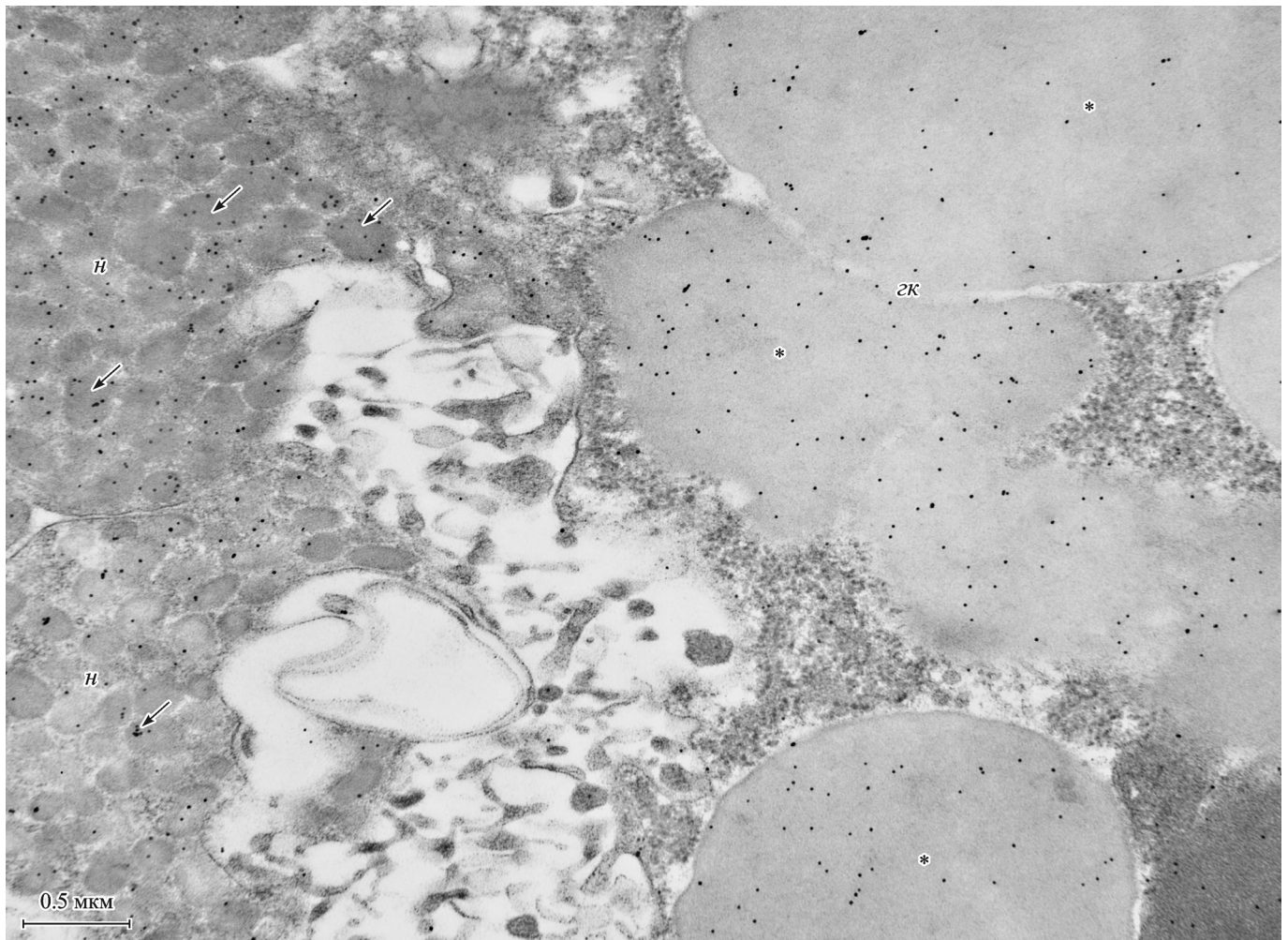


Рис. 2. Иммуноцитохимическая локализация SP в предсердии *Achatina fulica*.

Стрелки — иммунореактивные нейросекреторные гранулы нервного волокна (н), контактирующего с гранулярной клеткой (гк); звездочки — светлые гомогенные SP-иммунореактивные гранулы гранулярной клетки.

скопическая иммуноцитохимия показала, что SP- и FMRFамид-подобный иммунореактивный материал локализован главным образом в гранулах ГК с электронно-светлой гомогенной структурой (рис. 2; 3, а). Гранулы с фибриллярной структурой демонстрировали только отдельные зерна метки. Антитела к SP и FMRFамиду реагировали также с нейросекреторными гранулами нервных окончаний, входящих в нейроэндокринные комплексы предсердия улитки (рис. 2; 3, а). Нервные окончания, контактирующие с кардиомиоцитами, также содержали SP- и FMRFамид-подобный иммунореактивный материал (рис. 3, б). В нервных пучках аксоны с нейросекреторными гранулами, положительно реагирующими с антителами к SP и FMRFамиду, соседствовали с аксонами, содержащими нейросекреторные гранулы с негативной реакцией (рис. 3, в). Отдельные частицы метки были расположены над гранулами отростков интерстициальных клеток (рис. 3, б).

### Обсуждение

В настоящей работе с помощью методов светооптической и электронно-микроскопической иммунохимии в нервных волокнах предсердия улитки обнаружено нали-

чие SP- и FMRFамид-подобного иммунореактивного материала. Эти результаты согласуются с литературными данными о локализации этих пептидов в периферической нервной системе беспозвоночных (Boer et al., 1980; Haynes, 1980; Schot et al., 1982; Dockray, William, 1983; Fujiwara-Sacata, Kobayashi, 1994). К настоящему времени установлено, что у беспозвоночных присутствует богатый набор пептидов, гомологичных по аминокислотным последовательностям тахикининам позвоночных и, в частности, SP. Пептиды, выделенные из тканей беспозвоночных и идентифицированные как SP-иммунореактивные пептиды, имеют общий С-концевой участок (-FX<sub>1</sub>GX<sub>2</sub>Рамид), однако эти пептиды идентичны тахикинину позвоночных не более чем по 40 % аминокислотных остатков. Эти пептиды беспозвоночных были объединены в группу тахикинин-подобных пептидов (Nassel, 1999). С учетом этих данных нельзя исключить, что SP-иммунореактивный материал, обнаруженный нами в предсердии улитки, относится к тахикинин-подобным пептидам и не идентичен полностью SP млекопитающих.

Наличие SP характерно для чувствительных нервных волокон позвоночных; и можно предположить, что содержащие SP нервные волокна, контактирующие с ГК, являются афферентными; следовательно, ГК могут оказывать



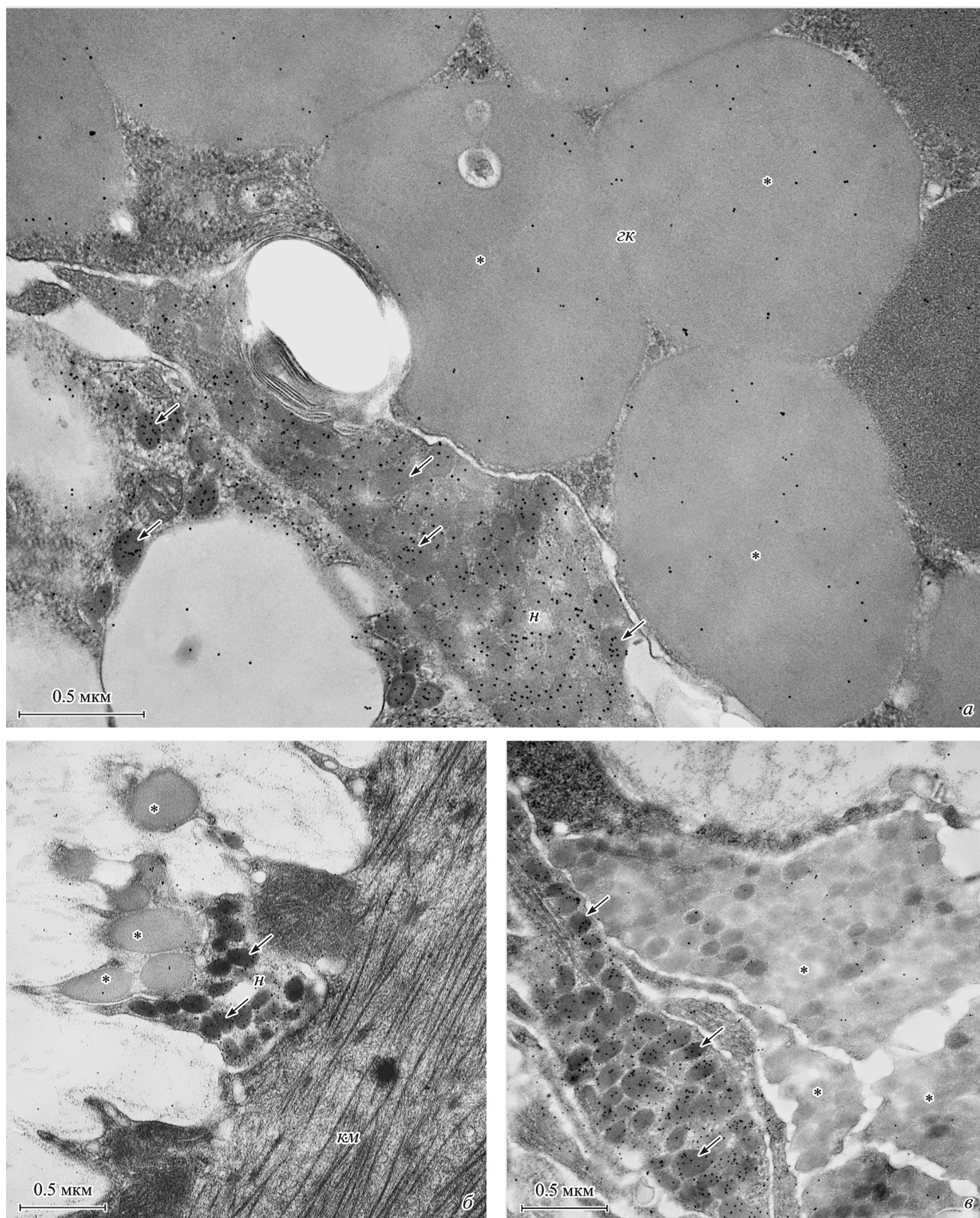


Рис. 3. Иммуноцитохимическая локализация FMRFамида в предсердии *Achatina fulica*.

*а* — контакт нервного волокна с гранулярной клеткой; FMRFамид-иммунореактивный материал содержится как гранулы ГК, так и нейросекреторные гранулы нервного окончания, контактирующего с ГК; *звездочки* — светлые гомогенные гранулы гранулярной клетки. *б* — локализация FMRFамида в нервном окончании, контактирующем с кардиомиоцитом; *звездочки* — гранулы глиоинтерстициальной клетки, сопровождающей нервной волокно. *в* — локализация FMRFамида в группе аксонов; *звездочки* — волокна, не содержащие метки; *гк* — гранулярная клетка; *км* — кардиомиоцит; *н* — нервное волокно; *стрелки* — иммунореактивные нейросекреторные гранулы.



непосредственное влияние на центральные отделы нервного аппарата моллюска. В этой связи интересны имеющиеся данные о сенсорной составляющей в дающем ответвление к сердцу интестинальном нервном стволе улитки *Helix aspersa* (Antkowiak, Chase, 2003). Химическая и тактильная сенсорная иннервация сердца была показана для *Helix*, *Limax* и *Aplysia* (Jones, 1983). Выявленное нами наличие в одном нервном пучке аксонов, как содержащих, так и не содержащих SP- и FMRFамид-иммунореактивного материала, подтверждает физиологические данные о том, что сердечные нервы брюхоногих моллюсков являются смешанными (Журавлев, 1999). Ранее нами было показано, что содержащие и не содержащие Hsp70-иммунореактивного материала аксоны соседствуют в нервных стволах предсердия *A. fulica* (Martynova et al., 2007).

SP- и FMRFамид-иммунореактивный материал был обнаружен также в электронно-светлых гомогенных гранулах самих ГК. Имеются только единичные работы, показывающие наличие SP в клетках не нервной природы. Так, локализация SP-подобного иммунореактивного материала была выявлена в эндокринных клетках средней кишки насекомых, при этом у саранчи SP в этих клетках колокализуется с FMRFамид-подобным иммунореактивным материалом. Предполагают, что эндокринные клетки кишечника выделяют SP- и FMRFамид-подобный материал, влияющий на продукцию и секрецию пищеварительных ферментов (Nässel, 1999). В литературе имеются также данные о наличии SP в гранулах тучных клеток (Toyoda et al., 2000). Следует отметить, что ГК предсердия *A. fulica* по многим морфологическим и биохимическим параметрам демонстрируют аналогичность с тучными клетками позвоночных.

Результаты настоящего исследования показали наличие и локализацию SP- и FMRFамид-подобного иммунореактивного материала во всех элементах предсердного нейроэндокринного комплекса *A. fulica*. Мы предполагаем, что пептиды SP и FMRFamide играют роль медиаторов во взаимодействии нервной системы с гранулярными клетками, причем не исключено, что наряду с выполнением локальной медиаторной функции они секретируются в гемолимфу с последующим системным эффектом.

Работа проведена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00528).

#### Список литературы

- Журавлев В. Л. 1999. Механизмы нейрогуморального контроля сердца гастропод. Журн. эволюц. биохим. и физиол. 35 : 65—77.
- Antkowiak T., Chase R. 2003. Sensory innervation of the oviduct in the snail *Helix aspersa*. J. Exp. Biol. 206 : 3913—3921.
- Beckstead J. H. 1994. A simple technique for preservation of fixation-sensitive antigens in paraffin-embedded tissues. J. Histochem. Cytochem. 42 : 1127—1134.
- Boer H. H., Schot L. P. S., Veenstra J. A., Reichelt D. 1980. Immunocytochemical identification of neuronal elements in the central nervous system of a snail, some insects, a fish, and mammal with an antiserum to the molluscan cardio-excitatory tetrapeptide FMRF-amide. Cell and Tissue Res. 213 : 21—27.
- Boyd P. J., Osborne N. N., Walker R. J. 1984. The pharmacological actions of 5-hydroxytryptamine, FMRF-amide and substance P and their possible occurrence in the heart of the snail *Helix aspersa* L. Neurochem. Int. 6 : 633—640.
- Boyd P. J., Osborne N. N., Walker R. J. 1986. Localization of substance P-like material in the central and peripheral nervous system of the snail *Helix aspersa*. Histochemistry. 84 : 97—103.
- Cottrell G. A., Osborne N. N. 1969. Localization and mode of action of cardioexcitatory agents in molluscan hearts. In: Comparative physiology of the heart. Switzerland: Birkhauser Verlag. 220—231.
- Dockray G. J., Williams R. G. 1983. FMRFamide-like immunoreactivity in the rat brain: development of radioimmunoassay and its application in studies of distribution and chromatographic properties. Brain Res. 266 : 295—303.
- Fujiwara-Sakata M., Kobayashi M. 1994. Localization of FMRFamide- and ACEP-1-like immunoreactivities in the nervous system and heart of a pulmonate mollusk, *Achatina fulica*. Cell and Tissue Res. 278 : 451—460.
- Haynes L. W. 1980. Peptide neuroregulators in invertebrates. Prog. Neurobiol. 15 : 205—246.
- Jones H. D. 1983. Circulatory systems of Gastropods and Bivalves. In: The Mollusca. New York: Acad. Press. 5 : 189—238.
- Łazarczyk M., Matyja E., Lipkowski A. 2007. Substance P and its receptors — a potential target for novel medicines in malignant brain tumor therapies (mini-review). Folia Neuropathol. 45 : 99—107.
- Martynova M. G., Byстрова O. A., Shabelnikov S. V., Margulis B. A., Prokofjeva D. S. 2007. Hsp70 in the atrial neuroendocrine units of the snail, *Achatina fulica*. Cell Biol. Int. 31 : 413—419.
- Nässel D. R. 1999. Tachykinin-related peptides in invertebrates: a review. Peptides. 20 : 141—158.
- Nisbet R. H., Plummer J. M. 1969. Functional correlates of fine structure in the heart of *Achatinidae*. In: Comparative physiology of the heart. Switzerland: Birkhauser Verlag. 47—68.
- Osborne N. N., Dockray G. J. 1982. Bombesin-like immunoreactivity in specific neurons of the snail *Helix aspersa* and example of the coexistence of substance P and serotonin in an invertebrate neurone. Neurochem. Int. 4 : 175—180.
- Schot L. P. C., Boer H. H., Swaab D. G., van Noorden S. 1982. Immunocytochemical demonstration of peptidergic neurons in the central nervous system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* with antisera to biologically active peptides of vertebrates. Cell and Tissue Res. 216 : 273—291.
- Shabelnikov S. V., Byстрова O. A., Ivanov V. A., Margulis B. A., Martynova M. G. 2007. Nerve stimulation of snail heart evokes releasing of proteins into circulation. In: Abstracts of 11th Symposium on Invertebrate Neurobiology. 70.
- Toyoda M., Makino T., Kagoura M., Morohashi M. 2000. Immunolocalization of substance P in human skin mast cells. Arch. Dermatol. Res. 292 : 418—421.

LOCALIZATION OF SUBSTANCE P- AND FMRFAMIDE-LIKE IMMUNOREACTIVITY  
IN THE ATRIUM OF THE SNAIL *ACHATINA FULICA*

*S. V. Shabelnikov, O. A. Bystrova, M. G. Martynova*

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

By immunohistochemical and immunocytochemical methods localization of Substance P (SP) and FMRFamide in the atrium of the snail *Achatina fulica* was investigated. Nerve fibers innervating the snail atrium contact tightly with the granular cells (GC) situated between muscle and endocardial cells, forming neuroendocrine units. Both neuromediators were found in the cells of the neuroendocrine units. By immunohistochemistry SP- and FMRFamide-immunoreactive material was revealed in the granules of the atrial GC. Electronmicroscopical immunocytochemistry has confirmed the presence of SP- and FMRFamide-immunoreactive material in the granules of the GC and shown their presence in the neurosecretory granules of the nerve endings contacting both the atrial GC and cardiomyocytes.

Key words: neuromediators, granular cell.

---