

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА uNOS-ПОЗИТИВНЫХ СТРУКТУР В ЦНС НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РАКООБРАЗНЫХ

© В. М. Черток¹, * Е. П. Коцюба²

¹ Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, 690002, и

² Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток, 690033;

* электронный адрес: chertokv@mail.ru

Проведено сравнительное исследование NO-ергической системы в ЦНС 10 видов ракообразных подкласса Malacostraca, принадлежащих к отрядам Stomatopoda и Decapoda, имеющих общий ареал обитания в Уссурийском заливе (Японское море). Установлены общие признаки и межвидовые различия содержания и распределения универсальной NO-синтазы (uNOS) в головном и туловищном мозге у исследованных видов ракообразных. Обсуждаются участие оксида азота в регуляции физиологических функций десятиногих ракообразных и его роль в процессах приспособления к условиям среды обитания.

Ключевые слова: оксид азота, NO-синтаза, центральная нервная система, ракообразные.

Принятые сокращения: NO — оксид азота, NOS — NO-синтаза, uNOS — универсальная NO-синтаза.

Открытие нового класса биологически активных веществ, так называемых газообразных посредников, к которым относится и оксид азота (NO), заметно изменило представление о химических свойствах и механизме действия нейротрансмиттеров (Wang, 2004; Olson, Donald, 2009; Kajimura et al., 2010). NO является универсальным регулятором метаболизма и высокочувствительным сенсором гипоксических, травматических, шоковых реакций у позвоночных животных (Moncada et al., 1991; Реутов и др., 2012), маркером устойчивости к стрессовым воздействиям у беспозвоночных (Casares, Mantione, 2006; Romano et al., 2011). Это один из важнейших газообразных посредников в регуляции внутри- и межклеточной сигнализации в ЦНС у позвоночных и беспозвоночных животных (Chen et al., 2004; Palumbo, 2005; Benton et al., 2007; Ott et al., 2007; Коцюба, Черток, 2010). Для NO установлены субстраты синтеза и специфические ферменты, участвующие в его продукции, что позволило показать наличие этого газа во многих структурных образованиях позвоночных и беспозвоночных животных, включая ЦНС (Garthwaite, Boulton, 1995; Zhang et al., 2001; Gibbs, 2003; Черток, Коцюба, 2010). В структурных элементах нервной системы эта газообразная молекула синтезируется преимущественно с участием конститутивных форм NO-синтазы (NOS).

У беспозвоночных животных идентифицировано несколько конститутивных изоформ NOS, имеющих сходство с Ca²⁺-кальмодулинзависимыми nNOS- и eNOS-изоформами млекопитающих (Davies, 2000; Bogdan, 2001; Imamura et al., 2002; Kim et al., 2004; Rodriguez-Ramos et al., 2010), наиболее точным топомимическим маркером которых является универсальная NO-синтаза (uNOS) (Christie et al., 2003; Kim et al., 2004; Goy et al., 2005; Ott

et al., 2007). В нервной системе ракообразных наличие uNOS подтверждено с помощью молекулярно-генетических методов (Kim et al., 2004; McDonald et al., 2011; Li et al., 2012). Однако о локализации в ЦНС ракообразных NO-позитивных структур обычно судят по наличию в них NADPH-d, хотя известно, что распределение этого фермента и uNOS в одноименных образованиях мозга довольно часто не совпадает (Zou et al., 2002; Ott et al., 2007). Исследования топомимии uNOS в ЦНС беспозвоночных единичны, к тому же выполнены главным образом на головном или туловищном мозге лангустов и омаров (Johansson, Mellon, 1998; Benton et al., 2007; Ott et al., 2007).

Целью настоящей работы являлось сравнительное исследование uNOS-позитивных структур в головном и туловищном мозге у представителей 10 видов ракообразных подкласса Malacostraca, обитающих в Уссурийском заливе (Японское море).

Материал и методика

Работа выполнена на взрослых мужских особях 10 видов ракообразных, относящихся к отрядам Stomatopoda (*Oratosquilla oratoria*) и Decapoda (*Eriocheir japonicus*, *Hemigrapsus sanguineus*, *H. penicillatus*, *Hapalagaster dentate*, *Paralithodes camtschatica*, *Pugettia quadridens*, *Erimacrus isenbeckii*, *Cancer amphioetus* и *Charybdis japonica*), отловленных в одном районе — Уссурийском заливе (Японское море), в один сезон — в мае 2011 г. После отлова животных содержали в аквариумах с аэрируемой морской водой при естественном освещении и температуре 18 °С в течение нескольких суток для адаптации. Нервные ганглии у всех животных брали в одно время су-

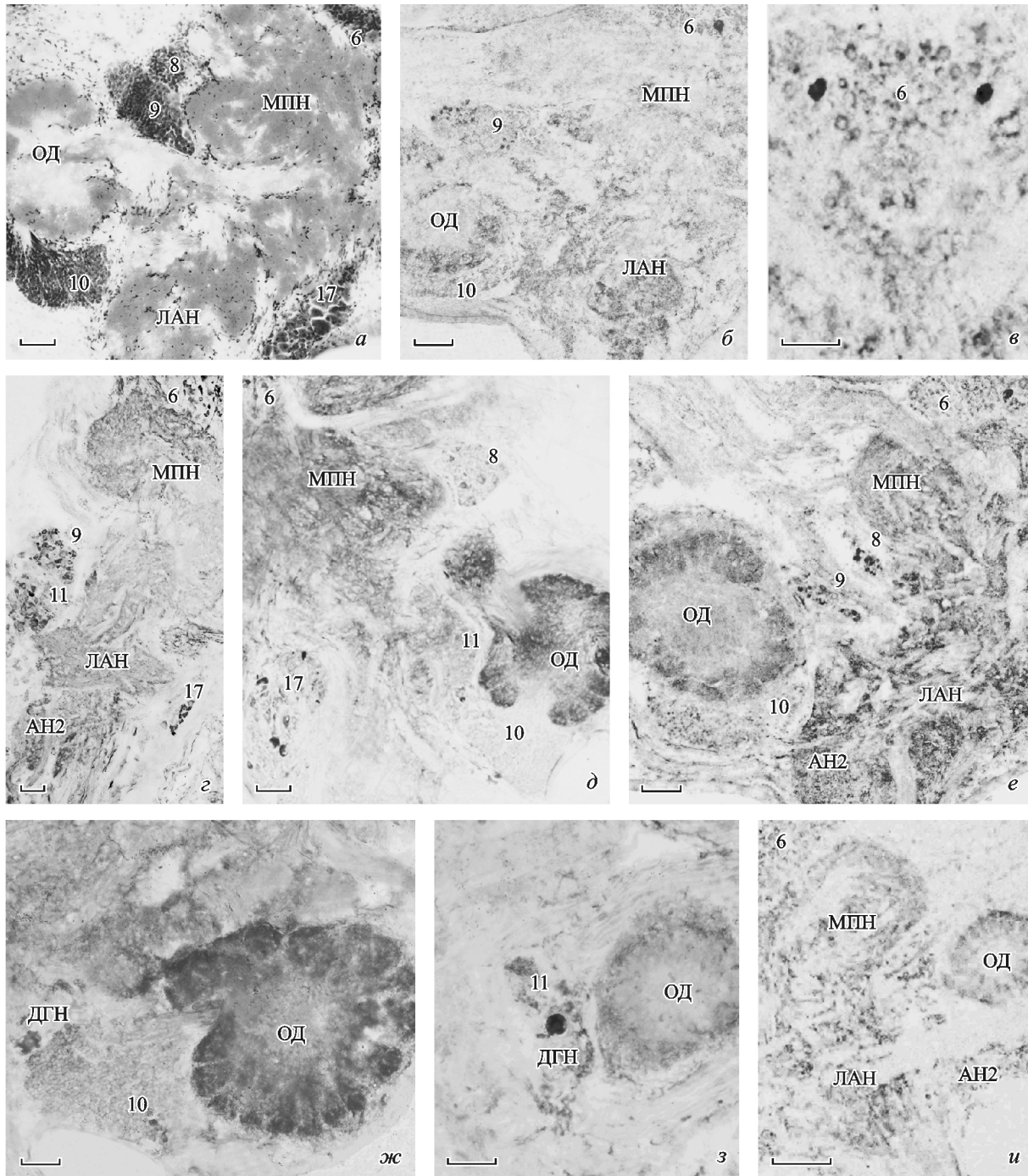


Рис. 1. Распределение *iNOS* в мозге некоторых ракообразных.

a–в — *Eriocheir japonicus*; *г, д–ж* — *Oratosquilla oratoria*; *е* — *Hemigrapsus sanguineus*; *з* — *Cancer amphioetus*; *и* — *Pugettia quadridens*. ДГН — дорсальный гигантский нейрон, МПН — медиальный протоцеребральный нейропил, ОД — ольфакторные доли, ЛАН — латеральный антеннулярный нейропил, АН2 — антенна II нейропил; числами 6, 8—11 и 17 обозначены соответствующие клеточные группы. *а* — окраска метиленовым синим, *б–и* — иммуногистохимическое выявление *iNOS*. Масштабные отрезки — 1 мкм.

ток. При работе с гидробионтами руководствовались Директивой 86/609/ЕЕС Совета ЕС от 24 ноября 1986 г.

Для Вестерн-блоттинга образцы гомогенизировали в соотношении 1 : 5 в буфере следующего состава: 20 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 0.1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), 0.5 мМ дитиотреитола (DTT) и 0.2 мМ фенолметилсульфонилфторида (PMSF). После центрифугирования (15 000 *g* при 4 °С, 20 мин) супернатант отделяли и определяли в нем концентрацию общего белка по

методу Лоури и соавторов (Lowry et al., 1951). Электрофорез белков проводили в 10%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ) по методу Леммли (Laemmli, 1970). Количество общего белка, вносимого в лунки для электрофореза, составляло 40 мкг. После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Whatman (Sigma-Aldrich, США). Для блокирования неспецифического связывания антител, мембраны инкубировали в буфере ТБС-Т (0.1 М буфер

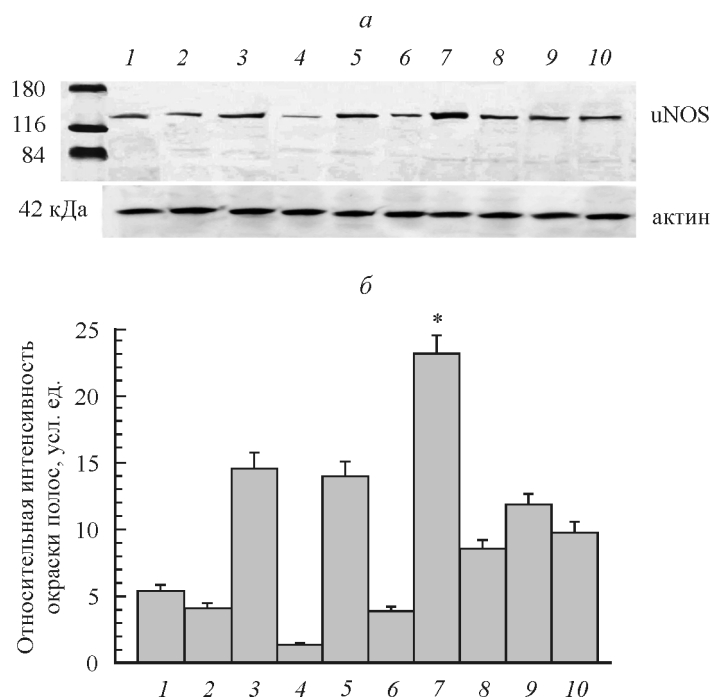


Рис. 2. Вестерн-блот-анализ uNOS в ЦНС ракообразных.

a — результаты Вестерн-блот-анализа с использованием антител, специфичных к uNOS и β -актин; β -актин использовали в качестве контроля нанесения. *б* — результаты денситометрического анализа относительного содержания uNOS в ЦНС различных представителей ракообразных. На гистограмме представлены средняя суммарная интенсивность окрашивания и стандартные отклонения для каждого вида ($n = 5$); звездочкой указаны достоверные различия при $P < 0.05$ — 0.001 . 1 — *Cancer amphioetus*, 2 — *Charybdis japonica*, 3 — *Eriocheir japonicus*, 4 — *Hapalagaster dentate*, 5 — *Hemigrapsus sanguineus*, 6 — *Paralithodes camtschatica*, 7 — *Oratosquilla oratoria*, 8 — *Pugettia quadridens*, 9 — *Hemigrapsus penicillatus*, 10 — *Erimacrus isenbeckii*.

Трис-НСl, рН 7.6, содержащий 0.15 М NaCl и 0.1 % Tween-20), содержащем 3 % обезжиренного сухого молока, в течение ночи. Затем мембраны инкубировали с моноклональными антителами мыши против uNOS (Sigma-Aldrich, США) в разведении 1 : 1000 и β -актина (Sigma, США) в разведении 1 : 1000 3 ч при 4 °С. После промывок в TBS-T мембраны помещали во вторые биотинилированные антитела лошади против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена фирмы Vector Labs (США). Для проявления активности пероксидазы мембрану окрашивали при помощи субстрата (VIP Substrate Kit, Vector Labs, США). Для измерения относительного количества белка в окрашенных полосах их сканировали, интенсивность окраски полос определяли с помощью компьютерной программы Image J (Version 1.6, National Institutes of Health, Bethesda, MD) в соответствии с рекомендациями (Kobeissy et al., 2006; Gassmann et al., 2009).

Для иммуногистохимического исследования uNOS нервные ганглии ракообразных фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида (рН 7.2) в течение 2 ч при 4 °С, промывали в 0.1 М фосфатно-солевом буфере (PBS), пропитывали в 30%-ном растворе сахарозы и замораживали. Криостатные срезы толщиной 40 мкм последовательно инкубировали с 1%-ной нормальной сывороткой лошади 1 ч при 22 °С, моноклональными антителами мыши против uNOS (в разведении 1 : 500) (Sigma-Aldrich, США) 18 ч при 4 °С, биотинилированными антителами лошади против иммуноглобулинов мыши (в разведении 1 : 200) (Vector Labs, США) 2 ч при 22 °С, а также с АВС-комплексом (Vectastain Elite АВС Kit, Vector Labs, США) 1 ч при 22 °С. После каждой инкубации, за исключением первой, срезы промывали PBS. Продукты реакции визуализировали при помощи субстрата (VIP

Substrate Kit, Vector Labs, США), после чего срезы промывали PBS, обезживали по стандартной методике и заключали в балзам. Препараты исследовали на микроскопе Axiovert 200M. Подсчет числа и определение размеров нейронов производили на монтажах срезов, сформированных программой AxioVision 4.8, только в тех структурах мозга, в которых иммунопозитивные клетки выявлялись постоянно и в достаточном количестве для статистического анализа. Учитывались только те нейроны, которые имели отчетливо видимое ядро. В контрольных экспериментах использовали метод негативного контроля, первичные антитела заменяли на эквивалентное количество 1%-ной неиммунной сыворотки. Во всех контрольных экспериментах иммунопозитивная реакция отсутствовала. Данные количественного анализа представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего, полученные при изучении соответствующих структур на 5—6 срезах головного и туловищного мозга от 5 животных каждого вида. Статистический анализ осуществляли с помощью статистико-графической программы GraphPad Prizm (версия 5.00). Находили среднее значение каждого параметра и стандартную ошибку. Достоверность различий (при $P \leq 0.05$) между выборками определяли по *t*-критерию Стьюдента.

У всех исследованных видов ракообразных распределение uNOS-позитивных структур изучали в гомологичных участках головного и туловищного мозга на серийных срезах в пределах границ, которые уточняли на препаратах, окрашенных 0.5%-ным раствором метиленового синего (рис. 1, *a*, *б*). Топографию исследуемых структур ЦНС ракообразных определяли в соответствии с имеющимися в литературе данными (Sandeman et al., 1992; Sosa et al., 2004; Stewart et al., 2013).

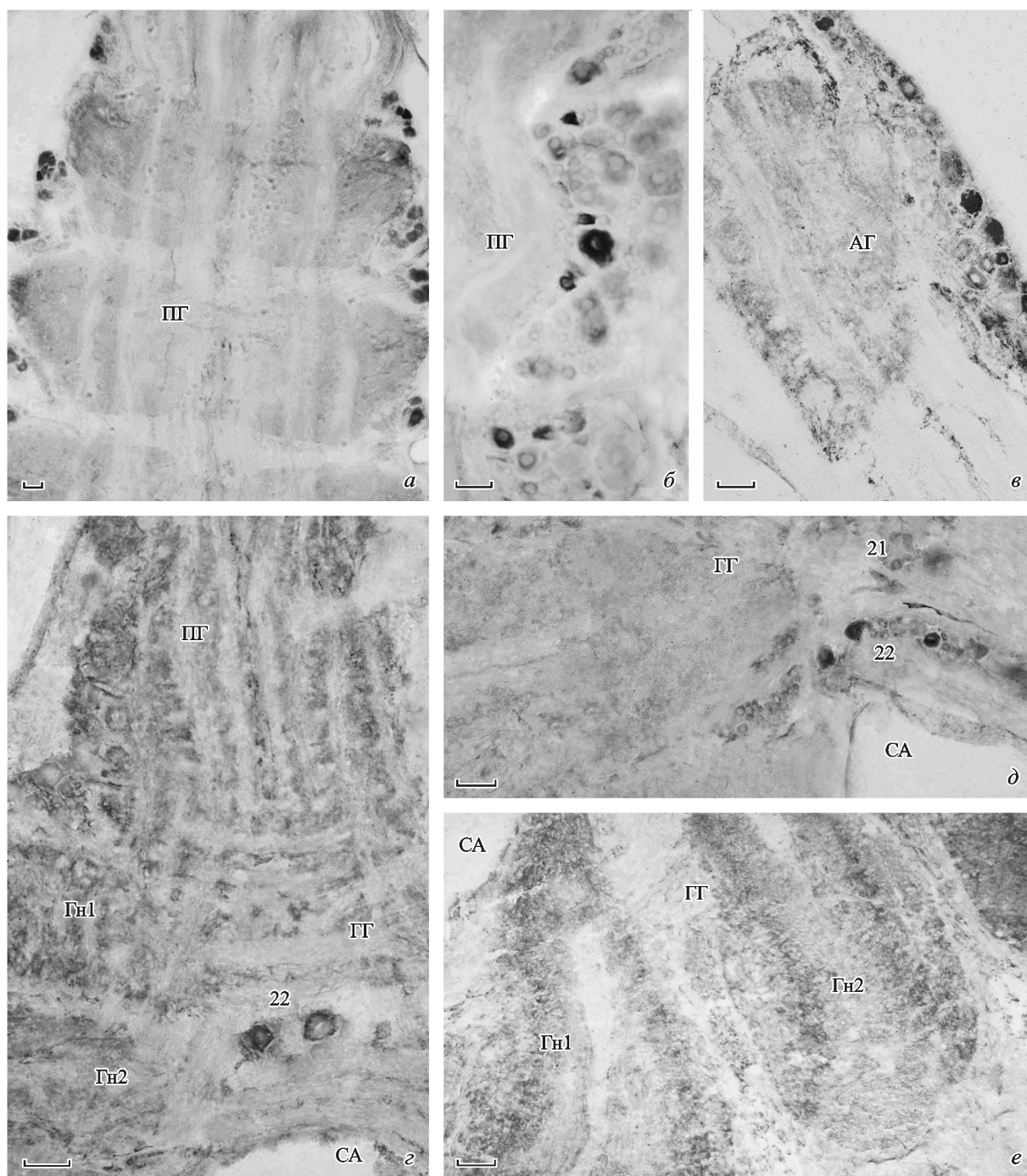


Рис. 3. Распределение uNOS в туловищном мозге некоторых ракообразных: *Oratosquilla oratoria* (а–в), *Eriocheir japonicus* (г, д) и *Hemigrapsus sanguineus* (е).

а, б — фрагмент подглоточного ганглия; в — грудной ганглий; г — подглоточный и грудной отделы; д, е — грудной отдел. АГ — абдоминальный ганглий, ПГ — подглоточный ганглий, ГГ — грудной ганглий, СА — стеральная артерия, Гн1, Гн2 — грудные нейромеры; числами 21 и 22 обозначены соответствующие клеточные группы. Масштабные отрезки — 1 мкм.

Использованные реактивы: буфер Трис-НСI, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), дитиотреитол (DTT) и фенилметилсульфонилфторид (PMSF) (AppliChem, Германия); додецилсульфат натрия и первичные антитела к uNOS и β-актину (Sigma-Aldrich, США); вторичные биотинилированные антитела лошади к IgM мыши; ABC-комплекс (Vectastain Elite ABC Kit); субстрат (VIP Substrate Kit) (Vector Labs, США).

Результаты

Методом Вестерн-блоттинга в гомогенатах мозга и брюшного ганглия у исследованных видов ракообразных выявляется антиген, перекрестно реагирующий с антителами к uNOS. Как следует из данных, представленных на рис. 2, а, молекулярные массы uNOS во всех случаях близки между собой и лежат в области 130–135 кДа. Сравнительный анализ показал, что относительное содер-

жание uNOS у разных видов различается (рис. 2, б). Наиболее высокая концентрация uNOS выявляется у *O. oratoria* и прибрежных крабов *E. japonicus*, *H. sanguineus* и *H. penicillatus*, причем у *O. oratoria* она достоверно выше ($p < 0.001$) по сравнению с другими видами ракообразных. Минимальное количество uNOS в гомогенатах мозга и брюшного ганглия было зафиксировано у *H. dentate* ($p < 0.05$).

С помощью иммуногистохимического мечения в гомологичных отделах головного и туловищного мозга ракообразных одновременно выявляются нейроны и нервные волокна (рис. 1, 3). uNOS-позитивные нервные клетки в головном мозге обычно имеют небольшие размеры, округлую или грушевидную форму, в туловищном отделе ЦНС преобладают более крупные грушевидные и полигональные нейроны. У некоторых видов ракообразных (*O. oratoria* и *E. japonicus*) они постоянно выявляются в нескольких клеточных группах.

Во всех отделах головного мозга (медиальном протоцеребруме, дейтоцеребруме и тритоцеребруме) у ракообразных наблюдаются межвидовые различия в распределении uNOS-позитивных нейронов. В медиальном протоцеребруме uNOS-позитивные нейроны в достаточном для статистического анализа количестве выявляются только у *O. oratoria* и *E. japonicus* (рис. 1, б—д). У обоих видов ракообразных маркируются нейроны в группе 6 (рис. 1, в—д). У *E. japonicus* в этой группе выявляются нейроны грушевидной формы размером 25—30 мкм (рис. 1, б, в). У *O. oratoria* маркируются клетки размерами 15—18 и 25—35 мкм, их число в этой группе варьирует от 2 до 15 на срезе. Нейроны чаще всего имеют округлую и грушевидную форму (рис. 1, з, д). Кроме того, у *O. oratoria* небольшие скопления uNOS-позитивных нейронов округлой формы и размером около 20 мкм находятся в группе 8 (рис. 1, д). У других видов ракообразных в группах 6 и 8 обычно встречаются единичные клетки (рис. 1, е). Исключение составляет *H. dentate*, у которого uNOS-позитивные нейроны не выявляются.

В дейтоцеребруме иммунопозитивные нейроны постоянно выявляются у *O. oratoria*, *E. japonicus*, *H. penicillatus* и *H. sanguineus* в группе 9 (рис. 1, б, з, е). В этой группе у *E. japonicus*, *H. penicillatus* и *H. sanguineus* маркируются небольшие скопления (от 3 до 15) глобулярных нейронов величиной 15—20 мкм (рис. 1, б, е), у *O. oratoria*, кроме того, выявляются клетки грушевидной формы размером до 40 мкм (рис. 1, з). В группе 10 только у *O. oratoria* маркируются единичные глобулярные ольфакторные интернейроны размером 10—15 мкм (рис. 1, д, ж), а в группе 11 — 5—6 клеток округлой или полигональной формы, величина которых варьируют от 12 до 40 мкм (рис. 1, з). У большинства других исследованных видов в дейтоцеребруме с разной степенью стабильности выявляется только гигантский дорсальный нейрон в группе 11 (рис. 1, ж, з), за исключением *H. dentate*, у которого экспрессии uNOS в гигантском дорсальном нейроне не наблюдается.

В тритоцеребруме uNOS-позитивные нейроны постоянно выявляются только у *O. oratoria*. В группе 17 маркируется до 15 таких клеток, которые имеют грушевидную, округлую или полигональную форму и размеры от 30 до 55 мкм (рис. 1, з, д). В нейропилях в отличие от нейронов uNOS-позитивные волокна выявляются у всех исследованных ракообразных. Однако в нейропилях медиального протоцеребрума у *O. oratoria* и *E. japonicus* иммунопозитивные волокна располагаются гуще, чем у других видов

(рис. 1, б, з—и). В дейтоцеребруме у всех исследованных видов ракообразных uNOS выявляется в нейропилях ольфакторных долей. В других структурах дейтоцеребрума uNOS чаще всего не определяется, за исключением латерального антеннулярного нейропиля, где у исследованных видов ракообразных наблюдаются существенные межвидовые и индивидуальные различия плотности расположения иммунопозитивных проводников (рис. 1, д—з). В тритоцеребруме экспрессия uNOS отмечена в волокнах антенна II и тегументарном нейропилях у *O. oratoria*, *E. japonicus*, *H. penicillatus* и *H. sanguineus*, тогда как у других видов uNOS-позитивные нейропили в этих структурах встречаются редко.

В туловищном мозге нейроны с экспрессией uNOS выявляются у *O. oratoria* и *E. japonicus*, причем их распределение и морфометрическая характеристика в одноименных отделах существенно различаются. У *O. oratoria* иммунореактивные нейроны выявляются во всех отделах ТМ — подглоточном, пяти грудных и шести абдоминальных ганглиях (рис. 3, а—в). В подглоточном ганглии во всех его отделах у *O. oratoria* маркируются нейроны размером от 35 до 100 мкм (рис. 3, а, б). В каждом грудном ганглии определяются по 4 иммунопозитивных нейрона полигональной формы размером около 60 мкм и 6—10 крупных нейронов чаще грушевидной формы размером около 80 мкм. В пяти парных абдоминальных ганглиях и терминальном абдоминальном ганглии выявляются по пять пар uNOS-позитивных полигональных или грушевидных нейронов размером около 80 мкм и одна пара нейронов размером около 55 мкм (рис. 3, в). В отличие от *O. oratoria* у крабов в нейронах туловищного мозга uNOS постоянно выявляется только у *E. japonicus* в группах 21 и 22, где обычно маркируются 2—5 крупных глобулярных нейронов диаметром 65—75 мкм (рис. 3, з, д). У остальных ракообразных uNOS-позитивных нейронов в туловищном мозге не обнаружено, хотя в нейропилях грудного отдела uNOS-позитивные волокна выявляются у всех видов в составе проводящих путей, проходящих вдоль средней линии (рис. 3, е).

Обсуждение

К настоящему времени опубликовано не так много работ о наличии в нервной системе ракообразных NOS (Kim et al., 2004; McDonald et al., 2011; Li et al., 2012). Но даже в имеющихся сообщениях о локализации NOS в структурных образованиях мозга беспозвоночных, как правило, судят по наличию в них активности NADPH-d, хотя известно, что результаты гистохимического выявления NADPH-d и иммуногистохимического — uNOS — часто не совпадают (Johansson, Carlberg, 1994; Zou et al., 2002; Ott et al., 2007). Возможно, именно по этой причине данные о распределении NOS-позитивных нервных структур в головном и туловищном отделах мозга ракообразных крайне противоречивы.

В нашей работе методами Вестерн-блоттинга и иммуногистохимии доказано наличие экспрессии конститутивной формы синтазы окиси азота в нервных образованиях ЦНС у всех исследованных нами ракообразных. Вместе с тем полученные в настоящей работе материалы сравнительного исследования показывают, что у большинства изученных видов нейроны с экспрессией uNOS находятся в ограниченном количестве или не определяются, зато в

различных образованиях головного и туловищного мозга постоянно выявляются uNOS-позитивные нейроны. Особенно часто uNOS у всех исследованных видов наблюдается в нейронах первичных ольфакторных центров. Эту особенность топохимии NOS ракообразных уже отмечали ранее другие авторы (Johansson, Carlberg, 1994; Benton et al., 2007), которые на основании этого факта пришли к заключению о том, что источником поступления в данные структуры NO могут являться отростки ольфакторных интернейронов групп 9 и 10 или гигантского дорсального нейрона. Как известно, ипсилатеральные проекции этого нейрона иннервируют ольфакторные и аксессуарные доли головного отдела мозга (Sandeman, Sandeman, 1987; Benton, Beltz, 2001). Экспериментально установлено, что активность NOS в гигантском дорсальном нейроне сильно варьирует, что позволило предположить прерывистый характер экспрессии этого фермента (Benton et al., 2007).

Согласно нашим данным, uNOS-позитивные ольфакторные интернейроны в группах 9 и 11 постоянно выявляются только у *O. oratoria*, *E. japonicus*, *H. penicillatus* и *H. sanguineus*, тогда как в нейронах ольфакторных долей иммунопозитивная реакция определяется у всех видов. Поэтому более вероятно, что у большинства ракообразных основным источником NO в ольфакторных долях могут быть первичные хеморецепторные клетки антеннул. Наличие оксида азота в обонятельных центрах неоднократно демонстрировалось у позвоночных животных, но редко у беспозвоночных (Broillet, Firestein, 1996; Fujii et al., 2002; Schachtner et al., 2005). Обнаруженное нами сходство в распределении uNOS в ольфакторных долях у всех исследованных видов свидетельствует о том, что у ракообразных NO принимает активное участие в обработке обонятельной информации. Известно, что NO принадлежит важная модуляторная роль при передаче и обработке обонятельной информации в центральных и периферических хемосенсорных структурах у представителей некоторых видов беспозвоночных (Johansson, Carlberg, 1994; Johansson, Mellon, 1998; Moroz, 2006). К этому надо добавить, что у ряда ракообразных нами установлено широкое представление uNOS в клеточных группах и особенно нейронах головного мозга, которые играют важную роль в сенсорных и интегративных процессах ЦНС (медиальные протоцеребральные нейроны и латеральный антеннулярный нейрон).

В туловищном мозге у всех исследованных нами ракообразных uNOS выявляется преимущественно в нейронах. Особенно интенсивная реакция фермента определяется в области окончания и модуляции клешневых рефлексов, где содержатся дендриты мото- и интернейронов, а также заканчивается значительная часть чувствительных волокон, проходящих в составе боковых нервов (Ott et al., 2007). У большинства исследованных нами видов uNOS-позитивные нейроны в туловищном мозге не выявляются. Этот факт является косвенным доказательством того, что источником NO в нейронах являются преимущественно проприоцептивные нейроны, которые у ракообразных, как и у других членистоногих, локализируются на периферии (Ott et al., 2007). По мнению некоторых авторов (Clarac et al., 2000), наличие NO в хемотактильных центрах туловищного мозга свидетельствует о его важной роли в интеграции сенсорного и моторного контроля при организации двигательных рефлексов. Исключение составляют *O. oratoria* и *E. japonicus*, а также, по данным Отта с соавторами (Ott et al., 2007), — *P. lenisculus* и

P. clarkii, у которых высокая активность NO-синтазы обнаружена и в интернейронах туловищного мозга, что предполагает видовые особенности функционирования NO в этом отделе ЦНС ракообразных.

Тем не менее физиологическая роль NO в туловищном мозге у ракообразных в настоящее время изучена довольно слабо, что зачастую связывают с недостатком знаний о распределении этой сигнальной молекулы в структурных образованиях ЦНС (Aonuma, Newland, 2002; Araki et al., 2004). Имеются сведения о влиянии NO на синаптическую передачу в локальных нейронных цепях. В частности, экспериментальным путем установлено, что в терминальном абдоминальном ганглии раков эта сигнальная молекула модулирует синаптическую трансмиссию от механосенсорных афферентов к интернейронам путем уменьшения или увеличения амплитуды возбуждения постсинаптического потенциала в зависимости от функционального класса межсегментарных интернейронов (Aonuma, Newland, 2001; Schuppe et al., 2001a, 2001b; Schuppe, Newland, 2004). Кроме того, применение доноров или ингибиторов NOS доказало стимулирующее влияние NO на активность мотонейронов (Araki et al., 2004). Полученные нами данные о наличии uNOS в интернейронах и нейронах туловищного мозга ракообразных также свидетельствуют об участии оксида азота в обработке механосенсорной информации.

Вместе с тем высокая локальная и межвидовая вариабельность распределения uNOS-позитивных структур в ЦНС, установленная нами у 10 представителей ракообразных, по-видимому, отражает различные возможности сенсорной пластичности этих видов. В ряде исследований показано, что NO в локальных нервных цепях является одним из регуляторов синаптической пластичности межнейронных связей ЦНС, обеспечивающих адаптацию к различным стрессовым воздействиям, в том числе к меняющейся среде обитания (Aonuma, Newland, 2001; Casares, Mantione, 2006; Gonzalez et al., 2008; Romano et al., 2011). Имеются сообщения о значительном увеличении активности конститутивных NOS у ракообразных, обитающих в неблагоприятных экологических условиях (Casares, Mantione, 2006).

Более высокие значения показателей, характеризующих развитие uNOS-позитивных структур в ЦНС, выявлены у *O. oratoria* и *E. japonicus*, лучше приспособленных к обитанию в экологически неблагоприятной прибрежной зоне по сравнению с другими беспозвоночными (Hamano, Yamamoto, 2005), у которых в головном и туловищном мозге нами отмечен низкий уровень экспрессии оксида азота. Полученные нами данные также дают основание предположить наличие взаимосвязи между уровнем конститутивного синтеза uNOS в ЦНС ракообразных и их адаптивными возможностями.

Список литературы

- Коцюба А. Е., Черток В. М. 2010. Пространственная организация серотонинергических и нитроксидаергических нейронов в некоторых ядрах бульбарного отдела сердечнососудистого центра человека. Тихоокеан. мед. журн. 42 (4) : 43—46. (Kotsyuba A. E., Chertok V. M. 2010. Spatial positioning of serotonergic and nitroxidergic neurons in some nuclei of human cardiovascular bulbar centre. Pacific Med. J. 42 (4) : 43—46.)
- Реутов В. П., Сорокина Е. Г., Швалев В. Н., Космачевская О. В., Крушинский А. Л., Кузенков В. С., Свинов М. М., Коцицын Н. С. 2012. Возможная роль диоксида азота, образую-

- щегося в местах бифуркации сосудов, в процессах их повреждения при геморрагических инсультах и образовании атеросклеротических бляшек. Успехи физиол. наук. 43 (4) : 73—93. (Reutov V. P., Sorokina E. G., Shvalev V. N., Kosmachevskaya O. V., Krushinsky A. L., Kuzenkov V. S., Svinov M. M., Kositsyn N. S. 2012. The possible role of nitrogen dioxide produced in the field of bifurcation of vessels, in the processes of their damage in hemorrhagic strokes, and the formation of atherosclerotic plaques. Usp. Fiziol. Nauk. 43 (4) : 73—93.)
- Черток В. М., Коцюба А. Е. 2010. Локальные особенности возрастных изменений нитроксидазнейронов в некоторых ядрах продолговатого мозга крысы. Онтогенез. 41 (4) : 292—299. (Chertok V. M., Kotsyuba A. E. 2010. Age-related changes in nitrooxidergic neurons in some nuclei of rat medulla oblongata. Russ. J. Develop. Biol. 41 (4) : 247—254.)
- Aonuma H., Newland P. L. 2001. Opposing actions of nitric oxide on synaptic inputs of identified interneurons in the central nervous system of the crayfish. J. Exp. Biol. 204 : 1319—1332.
- Aonuma H., Newland P. L. 2002. Synaptic inputs onto spiking local interneurons in crayfish are depressed by nitric oxide. J. Neurobiol. 52 : 144—155.
- Araki M., Schuppe H., Fujimoto S., Nagayama T., Newland P. L. 2004. Nitric oxide modulates local reflexes of the tailfan of the crayfish. J. Neurobiol. 60 : 176—186.
- Benton J., Beltz B. S. 2001. Serotonin, nitric oxide and neuronal proliferation in the olfactory pathway in lobsters. Soc. Neurosci. Abstr. 622 : 620.
- Benton J. L., Sandeman D. C., Beltz B. S. 2007. Nitric oxide in the crustacean brain: regulation of neurogenesis and morphogenesis in the developing olfactory pathway developmental dynamics. Develop. Dyn. 236 : 3047—3060.
- Bogdan C. 2001. Nitric oxide and the regulation of gene expression. Trends Cell Biol. 11 : 66—75.
- Broillet M. C., Firestein S. 1996. Gaseous second messengers in vertebrate olfaction. J. Neurobiol. 30 : 49—57.
- Casares F. M., Mantiene K. J. 2006. Pesticides may be altering constitutive nitric oxide release, thereby compromising. Med. Sci. Mon. Int. Med. J. Exp. Clin. Res. 12 : 235—240.
- Chen J., Tu Y., Moon C., Matarazzo V., Palmer A. M., Ronnett G. V. 2004. The localization of neuronal nitric oxide synthase may influence its role in neuronal precursor proliferation and synaptic maintenance. Develop. Biol. 269 : 165—182.
- Christie A. E., Edwards J. M., Cherny E., Clason T. A., Graubard K. 2003. Immunocytochemical evidence for nitric oxide- and carbon monoxide-producing neurons in the stomatogastric nervous system of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. J. Comp. Neurol. 467 : 293—306.
- Clarac F., Cattaert D., Le Ray D. 2000. Central control components of a «simple» stretch reflex. Trends Neurosci. 23 : 199—208.
- Davies S. A. 2000. Nitric oxide signalling in insects. Insect Biochem. Mol. Biol. 30 : 1123—1138.
- Fuji S., Aonuma H., Ito I., Gelperin A., Ito E. 2002. The nitric oxide/cyclic GMP pathway in the olfactory processing system of the terrestrial slug *Limax marginatus*. Zool. Sci. 19 : 15—26.
- Garthwaite J., Boulton C. L. 1995. Nitric oxide signalling in the central nervous system. Ann. Rev. Physiol. 57 : 683—706.
- Gassmann M., Grenacher B., Rohde B., Vogel J. 2009. Quantifying western blots: pitfalls of densitometry. Electrophoresis. 30 : 1845—1855.
- Gibbs S. M. 2003. Regulation of neuronal proliferation and differentiation by nitric oxide. Mol. Neurobiol. 27 : 107—120.
- Gonzalez P. M., Abele D., Puntarulo S. 2008. Iron and radical content in *Mya arenaria*: possible sources of NO generation. Aquat. Toxicol. 89 : 122—128.
- Goy M. F. 2005. Nitric oxide: an inhibitory retrograde modulator in the crustacean heart. Comp. Biochem. Physiol. A. 142 : 151—163.
- Hamano T., Yamamoto K. 2005. Rheotaxis and tolerance to oxygen deficiency as factors affecting the spatial pattern and the stock of the Japanese mantis shrimp *Oratosquilla oratoria* in fishing grounds. J. Nat. Fish. Univ. 53 : 117—129.
- Imamura M., Yang J., Yamakawa M. 2002. cDNA cloning, characterization and gene expression of nitric oxide synthase from the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Mol. Biol. 11 : 257—265.
- Johansson K. U., Carlberg M. 1994. NADPH-diaphorase histochemistry and nitric oxide synthase activity in deutocerebrum of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Crustacea, Decapoda). Brain Res. 649 : 36—42.
- Johansson K. U., Mellon D., jr. 1998. Nitric oxide as a putative messenger molecule in the crayfish olfactory midbrain. Brain Res. 807 : 237—242.
- Kajimura M., Fukuda R., Bateman R. M., Yamamoto T., Suetatsu M. 2010. Interactions of multiple gas-transducing systems: hallmarks and uncertainties of CO, NO and H₂S gas biology. Antioxidants & Redox Signaling. 13 : 157—193.
- Kim H. W., Batista L. A., Hoppes J. L., Lee K. J., Mykles D. L. 2004. A crustacean nitric oxide synthase expressed in nerve ganglia, Y-organ, gill and gonad of the tropical land crab, *Gecarcinus lateralis*. J. Exp. Biol. 207 : 2845—2857.
- Kobeissy F. H., Ottens A. K., Zhang Z., Liu M. C., Denslow N. D., Dave J. R., Tortella F. C., Hayes R. L., Wang K. K. W. 2006. Novel differential neuroproteomics analysis of traumatic brain injury in rats. Mol. Cell. Proteomics. 5 : 1887—1898.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.
- Li S., Zhang Z., Li C., Zhou L., Liu W., Li Y., Zhang Y., Zheng H., Wen X. 2012. Molecular cloning and expression profiles of nitric oxide synthase (NOS) in mud crab *Scylla paramamosain*. Fish Shellfish Immunol. 32 : 503—512.
- Lowery O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. 1951. Protein measured with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265—275.
- McDonald A. A., Chang E. S., Mykles D. L. 2011. Cloning of a nitric oxide synthase from green shore crab, *Carcinus maenas*: a comparative study of the effects of eyestalk ablation on expression in the molting glands (Y-organs) of *C. maenas*, and blackback land crab, *Gecarcinus lateralis*. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 158 : 150—162.
- Moncada S., Palmer R. M. J., Higgs E. A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharm. Rev. 43 : 109—142.
- Moroz L. L. 2006. Localization of putative nitroergic neurons in peripheral chemosensory areas and the central nervous system of *Aplysia californica*. J. Comp. Neurol. 495 : 10—20.
- Olson K. R., Donald J. A. 2009. Nervous control of circulation — the role of gasotransmitters NO, CO and H₂S. Acta Histochem. 111 : 244—256.
- Ott S. R., Aonuma H., Newland P. L., Elphick M. R. 2007. Nitric oxide synthase in crayfish walking leg ganglia: segmental differences in chemo-tactile centers argue against a generic role in sensory integration. J. Comp. Neurol. 501 : 381—399.
- Palumbo A. 2005. Nitric oxide in marine invertebrates: a comparative perspective. Comp. Biochem. Physiol. A. 142 : 241—248.
- Rodríguez-Ramos T., Carpio Y., Bolívar J., Espinosa G., Hernández-López J., Gollás-Galvan Ramos L., Pendón C., Estrada M. P. 2010. An inducible nitric oxide synthase (NOS) is expressed in hemocytes of the spiny lobster *Panulirus argus*: cloning, characterization and expression analysis. Fish Shellfish Immunol. 29 : 469—479.
- Romano G., Costantini M., Buttino I., Ianora A., Palumbo A. 2011. Nitric oxide mediates the stress response induced by diatom aldehydes in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. PLoS ONE. 6 : doi: 10.1371/journal.pone.0025980.
- Sandeman D., Sandeman R., Derby C., Schmidt M. 1992. Morphology of the brain of crayfish, crab, and spiny lobster: a common nomenclature for homologous structures. Biol. Bull. 183 : 304—326.
- Sandeman R. E., Sandeman D. C. 1987. Serotonin-like immunoreactivity of giant olfactory neurons in the crayfish brain. Brain Res. 403 : 371—374.
- Schachtner J., Schmidt M., Homberga U. 2005. Organization and evolutionary trends of primary olfactory brain centers in tetracornata (crustacea + hexapoda). Arthr. Struct. Develop. 34 : 257—299.

Schuppe H., Aonuma H., Newland P. L. 2001a. NADPH-diaphorase histochemistry in the terminal abdominal ganglion of the crayfish. *Cell Tissue Res.* 303 : 289—299.

Schuppe H., Aonuma H., Newland P. L. 2001b. Distribution of NADPH-diaphorase-positive ascending interneurons in the crayfish terminal abdominal ganglion. *Cell Tissue Res.* 305 : 135—146.

Schuppe H., Newland P. L. 2004. Nitric oxide modulates pre-synaptic afferent depolarization of mechanosensory neurons. *J. Neurobiol.* 59 : 331—342.

Sosa M. A., Spitzer N., Edwards D. H., Baro D. J. 2004. A crustacean serotonin receptor: cloning and distribution in the thoracic ganglia of crayfish and freshwater prawn. *J. Comp. Neurol.* 47 : 526—537.

Stewart M. J., Stewart P., Sroyraya M., Soonklang N., Cummins S. F., Hanna P. J., Duan W., Sobhon P. 2013. Cloning of the crustacean hyperglycemic hormone and evidence for molt-in-

hibiting hormone within the central nervous system of the blue crab *Portunus pelagicus*. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 164 : 276—290.

Wang R. 2004. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.* 16 : 1792—1798.

Zhang R., Zhang L., Zhang Z., Wang Y., Lu M., Lapointe M., Chopp M. 2001. A nitric oxide donor induces neurogenesis and reduces functional deficits after stroke in rats. *Ann. Neurol.* 50 : 602—611.

Zou H. S., Chang Y. Z., Chen S. C., Yau S. M., Chen Y. L., Lee C. Y. 2002. Localization of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase activity in the eyestalk of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Zool. Stud.* 41 : 244—250.

Поступила 24 IX 2014

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF *uNOS*-POSITIVE STRUCTURES IN THE CNS OF SOME SPECIES OF CRUSTACEANS

V. M. Chertok,¹ * E. P. Kotsyuba²

¹ Pacific State Medical University, Vladivostok, 690002, and

² A. V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology,
Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690033;

* e-mail: chertokv@mail.ru

We conducted a comparative study of NO-ergic system in the CNS of 10 species of crustaceans subclass Malacostraca, belonging to orders Stomatopoda and Decapoda, with a common habitat in Ussuri Bay (Sea of Japan). Both similar characteristics and differences in content and distribution of universal NO-synthase (*uNOS*) were revealed in homologous parts of the brain and ventral nerve cord of the investigated species of crustaceans. We discuss the involvement of nitric oxide in the regulation of physiological functions of decapod crustaceans and its role in the processes of adaptation to the environmental conditions.

Key words: nitric oxide, central nervous system, crustaceans, NO-synthase.