

DOI: 10.1134/S004137711812012X

КОМПОНЕНТЫ ДОФАМИНОВОЙ СИСТЕМЫ В НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ КОМПЛЕКСАХ ПРЕДСЕРДИЯ УЛИТКИ

© О. А. Быстрова,¹ А. Н. Шумеев,² М. Г. Мартынова^{1,*}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, и

² Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, 199034;

* электронный адрес: mgmart14@mail.ru

Катехоламин допамин (ДА) является важным нейротрансмиттером и гормоном, задействованным во многих физиологических процессах и стресс-реакциях у позвоночных и беспозвоночных. Цель работы заключалась в выяснении наличия и локализации элементов допаминовой системы — тирозин гидроксилазы (ТГ), дофамин-бета-гидроксилазы (ДАбетаГК) и рецепторов первого типа к дофамину (ДА-Р1) — в клетках нейроэндокринных комплексов (НЭК) предсердия брюхоногого моллюска *Achatina achatina*. Предсердные НЭК улитки образованы крупными гранулярными клетками (ГК) и тесно с ними контактирующими нервными волокнами. Использовали методы гистохимии, иммунофлуоресцентного окрашивания и иммуноэлектронной микроскопии. Индуцированная глиоксильной кислотой флуоресценция показала наличие катехоламинов в нервных волокнах и ГК. ТГ-подобный и ДАбетаГ-подобный иммунореактивный материал обнаружен как в нервных волокнах, так и в гранулах ГК. ДА-Р1-позитивный материал выявлен только в нервных волокнах. Кроме того, показано, что экзогенный ДА вызывает усиленную дегрануляцию ГК *in vivo*. Полученные данные свидетельствуют об участии допаминовой системы в функционировании НЭК улитки.

Ключевые слова: гранулярные клетки, допамин, тирозин гидроксилаза, дофамин-бета-гидроксилаза, рецепторы к дофамину

Принятые сокращения: ГК — гранулярные клетки, ДА — допамин, ДА-бета-Г — дофамин-бета-гидроксилаза, НЭК — нейроэндокринные комплексы, ТГ — тирозин гидроксилаза, ДА-Р1 — рецепторы первого типа к дофамину, ЭМ — электронная микроскопия.

Биогенный амин допамин (ДА) выполняет в организме животных роль гормона и нейротрансмиттера, входящего в группу катехоламинов. ДА образуется из L-тирозина, который под действием тирозин гидроксилазы (ТГ) превращается в дигидроксифенилаланин (L-ДОФА), который в свою очередь под действием L-ДОФА-декарбоксилазы превращается в ДА. Сам ДА является биохимическим предшественником норадреналина и адреналина. Превращение ДА в норадреналин происходит при участии дофамин-бета-гидроксилазы (ДА-бета-Г). В качестве нейромедиатора синтезируемый нейронами ДА задействован в передаче нервного импульса через синаптическую щель и является главным трансммиттером ЦНС. Важная его роль в нормальной работе мозга и ее нарушениях привлекает внимание исследователей в области нейрофармакологии, неврологии и психиатрии (Marsden, 2006). Активность ДА не ограничивается ЦНС. Он также осуществляет гормональные функции и участвует в регуляции многих физиологических процессов. Хорошо известны фармакологические свойства ДА по отношению к кардиоваскулярной и ренальной системам (Casagrande, 1991).

Гормон воздействует на соматические клетки через дофаминовые рецепторы (ДА-Р), принадлежащие к клас-

су трансмембранных G-белоксвязанных рецепторов. К настоящему времени у позвоночных идентифицировано пять подтипов ДА-Р. ДА является эволюционно консервативным гормоном и обнаруживается у не имеющих нервной системы губок (Hongwei Liu et al., 2004). У беспозвоночных, обладающих нервной системой, начиная с нематод, ДА участвует в формировании поведенческих реакций (Barron et al., 2010). У насекомых ДА является единственным физиологически значимым катехоламином (Mustard et al., 2005; Verlinden, 2018). Сравнительно просто устроенную нервную систему *Caenorhabditis elegans* широко используют для изучения механизмов действия ДА (McDonald et al., 2006).

ДА определяют как основной и предположительно единственный катехоламин брюхоногих моллюсков (Журавлев, 1999). В их гемолимфе содержание ДА меняется при воздействии стрессовых факторов; при этом направленность этого изменения носит противоречивый характер. Так, разные виды воздействия (высокая температура, пониженная соленость и выдержка на воздухе) вызывают падение концентрации ДА в гемолимфе морского гребешка (Chen et al., 2008). В то же время у устрицы вследствие схожих воздействий происходит повышение уров-

ня ДА в гемолимфе (Lacoste et al., 2001). ДА обнаружен как в центральной, так и в периферической нервной системе моллюсков (Faller et al., 2008). Показано его участие во многих биологических процессах — питании (Wieland, Gelperin, 1983; Quinlan et al., 1997), дыхании (Moroz, Winlow, 1992), откладывании яиц (Werkman et al., 1990) и секреции альбуминовых желез (Saleuddin et al., 2000; Kiehn et al., 2001). Фермент ДА-бета-Г, для которого ДА служит необходимым для синтеза норадреналина субстратом, выявлен у пресноводного брюхоногого моллюска *Viviparus* (Ottaviani et al., 1993) и у белой креветки *Litopenaeus vannamei* (Cheng et al., 2016), а Т-Г, участвующая в биосинтезе ДА, — в нервной системе двух представителей рода *Biomphalaria* (Vallejo et al., 2014).

Ранее мы показали наличие ДА в гемолимфе интактных ахатин и резкое возрастание его концентрации при стрессе, обусловленном кратковременной гравитационной нагрузкой; среди катехоламинов в гемолимфе ахатины ДА присутствует в наибольшей концентрации, которая составляет 1200 пг/мл в норме и более чем в 4 раза увеличивается при стрессе (Martynova et al., 2015).

В гормональной регуляции физиологических процессов у брюхоногих моллюсков участвуют нейроэндокринные комплексы (НЭК), расположенные в предсердии между эндотелиальными клетками и мышечными волокнами и состоящие из крупных гранулярных клеток (ГК) и тесно с ними контактирующих нервных волокон, сопровождаемых интерстициальными клетками. Все эти клеточные элементы содержат гранулы, в которых выявлен целый ряд биоактивных веществ, таких как предсердный натрийуретический пептид (Мартынова и др., 2004), белок теплового шока Hsp70 (Martynova et al., 2007), субстанция Р и FRMFамид (Шабельников и др., 2008), серотонин, гистамин (Bystrova et al., 2014) и кортиколиберин (Мартынова и др., 2018). Задача настоящей работы заключалась в исследовании наличия и локализации компонентов дофаминовой системы — ТГ, ДА-бета-Г и ДА-Р1 — в предсердных НЭК ахатины. Кроме того, было протестировано влияние экзогенного ДА на дегрануляцию ГК *in vivo*.

Материал и методика

Животные. В качестве экспериментального материала использовали предсердия гигантской африканской улитки *Achatina achatina*. Популяция улиток в течение нескольких лет содержится в лаборатории при постоянной температуре (около 25 °С), искусственном световом режиме (12-часовом освещении), на вегетарианской диете. В опыт брали взрослых ахатин массой 15—20 г.

Гистофлуоресцентное окрашивание тканей. Гистохимическое выявление моноаминов с помощью глиоксиловой кислоты проводили по описанной методике (De la Torre, Surgeon, 1976) в модификации Зайцевой с коллегами (Zaitseva et al., 2015). Изолированное предсердие моллюска инкубировали 1.5 ч при 4 °С в 1 М глиоксиловой кислоте (Sigma G10601, США), свежеприготовленной на растворе, содержащем 1 М гидрокарбонат натрия, 0.3 М сахарозу и 0.1 М HEPES, pH 7.4. После инкубации ткань расправляли препаровальными иглами на покровном стекле, сушили сначала 30 мин при комнатной температуре, затем 40 мин при 60 °С, после чего заключали в парафиновое масло. Регистрацию флуоресценции проводили камерой Leica DFC420c (Leica Microsys-

tem, Германия) на микроскопе AxioVert 200V (Carl Zeiss, Германия), оборудованном фильтром Filter Set02 (Carl Zeiss, Германия); длина волны возбуждения и эмиссия — соответственно 365 и 420 нм.

Иммунофлуоресцентное окрашивание ткани. Анализ проводили, следуя стандартному иммуноцитохимическому протоколу. Изолированные предсердия растягивали препаровальными иглами на предметном стекле и фиксировали 4%-ным ПФА в течение 1 ч при 4 °С. После 3-кратной промывки в PBS ткань обрабатывали DMSO с карбинолом (1 : 4) в течение 1 ч и помещали в чистый карбинол на 1 сут при –25 °С. Вновь промывали в PBS 3 раза по 5 мин ткань и обрабатывали 10%-ной фетальной сывороткой для блокировки неспецифического связывания антител. После этого ткань инкубировали с первыми антителами в течение 1 сут при 4 °С и затем со вторыми антителами. Изображения получали с помощью микроскопа Axiovert 200 M (Carl Zeiss, Германия), оснащенного цифровой камерой Leica DFC 420C (Leica Microsystems, Германия) при увеличении объектива 40×.

Иммуноэлектронная микроскопия. Изолированные предсердия фиксировали в 2.5%-ном глутаральдегиде на 0.1 М какодилатном буфере, pH 7.2, с содержанием сахарозы 2 % в течение 1.5 ч при 4 °С. Постфиксацию проводили в 1%-ном OsO₄ на 0.1 М какодилатном буфере, pH 7.4, с содержанием сахарозы 5 % в течение 1 ч при 4 °С. Затем образцы ткани обезвоживали в серии растворов этанола с повышающейся концентрацией и заключали в смесь Аралдита и Эпона. Ультратонкие срезы изготавливали с помощью алмазного ножа на LKB-Ultratome. Для проведения иммунохимических тестов ультратонкие срезы собирали на никелевые сеточки, обрабатывали 3%-ной перекисью водорода в течение 20 мин для разрыхления смолы, 1 сут инкубировали с первыми антителами при 4 °С во влажной камере и после промывки в PBS инкубировали со вторыми антителами в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего окрашивали уранил-ацетатом и цитратом свинца и просматривали на электронном микроскопе Zeiss Libra 120 (Carl Zeiss, Германия) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Антитела: для иммунофлуоресцентного окрашивания применяли поликлональные антитела к ТГ (Abcam, ab112, США) в разведении 1 : 100, поликлональные антитела к ДА-бета-Г (Enzo, BML-DZ1020) в разведении 1 : 50 и моноклональные антитела к ДА-Р1 (Sigma, D2944, США) в разведении 1 : 50. В качестве вторых антител использовали ALEXA 488 (Abcam, ab150115, США) в разведении 1 : 600 (в случае первых моноклональных антител) и кроличьи антитела против иммуноглобулинов крысы, конъюгированные с FITC (Sigma, F9887, США), в разведении 1 : 200 (в случае первых поликлональных антител). Для ЭМ-иммуноцитохимических реакций использовали поликлональные антитела против ДАбетаГ (Enzo, BML-DZ1020) в разведении 1 : 100 и моноклональные антитела против ДА-Р1 (Sigma, D2944, США) в разведении 1 : 1000. В качестве вторых антител применяли антитела против иммуноглобулинов кролика (для поликлональных антител) или против иммуноглобулинов мыши (для моноклональных антител), конъюгированные с коллоидным золотом (Sigma, G7402, США), в разведении 1 : 10.

Воздействие ДА на предсердные ГК улитки *in vivo*. В полость тела улитки инъецировали 0.06 мл физиологического раствора (61 mM, 3.3 mM KCl,

10.7 mM CaCl₂, 13 mM MgSO₄ и 10 mM HEPES, pH 7.4), содержащего гидрохлорид ДА (Sigma) в концентрации 4000 пг/мл. Контрольным животным вводили чистый физиологический раствор в том же объеме. Еще одним контролем служили интактные улитки. Через 1.5 ч предсердия изолировали, фиксировали и заливали в эпоксидные смолы по протоколу подготовки материала для иммуноэлектронной микроскопии (см. выше). Анализ проводили на полутонких срезах, окрашенных альциановым синим.

Статистическая обработка. Подсчет доли дегранулированных клеток проводили в нескольких случайных полях зрения (в сумме не менее 200 клеток) в препаратах, полученных в трех независимых экспериментах на 3 особях улитки в каждом. Данные представлены как среднее и его ошибка; различие оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента и считали достоверным при $P < 0.05$.

Результаты

Наличие катехоламинов в предсердии улитки выявляли гистохимически с помощью глиоксиловой кислоты. Положительную реакцию наблюдали в нервных волокнах и гранулах ГК (рис. 1, а).

Экспрессию ТГ исследовали методом флуоресцентной иммуногистохимии. ТГ-иммунореактивный материал был обнаружен в ГК и нервных волокнах (рис. 1, б, в).

Экспрессию Д-бета-Г в ткани предсердия улитки исследовали методами флуоресцентной иммуногистохимии и ЭМ-иммуноцитохимии. Иммунофлуоресцентный анализ показал наличие Д-бета-Г-иммунопозитивного материала в предсердных ГК и подходящих к ним нервных волокнах (рис. 1, г). При проведении ЭМ-иммуноцитохимического окрашивания метка была обнаружена над нейросекреторными гранулами нервных волокон, гранулами глиоинтерстициальных клеток, а также над гранулами ГК (рис. 1, д).

Экспрессию Д-Р1 в ткани предсердия улитки также исследовали методами флуоресцентной иммуногистохимии и ЭМ-иммуноцитохимии. Оба метода выявили ДА-Р1-позитивный материал только в нервных волокнах предсердия улитки (рис. 1, е, ж). Интенсивность мечения нейросекреторных гранул рядом расположенных нервных волокон одного пучка была существенно разной (рис. 1, ж).

Влияние ДА на дегрануляцию ГК *in vivo* анализировали на полутонких срезах заключенных в эпоксидные смолы предсердиях улитки. На препаратах, окрашенных альциановым синим, хорошо различимы интактные и дегранулированные ГК (рис. 2, а, б). При нормальных физиологических условиях в предсердных ГК улитки протекает спонтанный процесс дегрануляции, в части клеток присутствуют визуально пустые камеры гранул. После введения экзогенного ДА количества таких ГК резко увеличилось. В предсердиях интактных улиток доля дегранулированных ГК составила $14.9 \pm \pm 3.1$ %. После введения физиологического раствора без ДА доля дегранулированных ГК немного повысилась и составила 23.8 ± 4.1 %, что статистически не отличалось от показателя нормы. Через 1.5 ч после инъекции ДА произошло почти трехкратное увеличение доли дегранулированных ГК, которая составила 65.4 ± 0.85 %, что отличалось и от нормы, и от контроля с введением физиологи-

ческого раствора ($P < 0.01$). Кроме того, ЭМ позволила выявить в экспериментальном варианте дополнительно к частично дегранулированным ГК и ГК, подвергнувшиеся полной дегрануляции (рис. 2, в). Такие небольшого размера клетки, лишенные гранул, не поддаются идентификации на светооптическом уровне и не могли быть учтены при подсчете доли дегранулированных ГК на гистологических препаратах. Следовательно, дофамин вызывал более значительную дегрануляцию ГК, чем показал анализ на светооптическом уровне.

Обсуждение

Гистохимическая реакция выявила наличие катехоламинов в ГК и нервах предсердия. Полный состав катехоламинов в элементах НЭК не установлен, но одним из них, как показало наше исследование, является ДА; здесь обнаружены основные ферменты цепочки биохимического превращения триптофана в ДА и затем в норадреналин — ТГ и ДА-бета-Г; присутствие последней предполагает наличие в НЭК также и норадреналина. Таким образом, нервные окончания, контактирующие с ГК в составе НЭК, являются дофаминергическими. Сами ГК синтезируют и секретируют ДА, который в этом случае может функционировать в качестве гормона. С током гемолимфы ДА попадает из предсердия в желудочек и далее под действием сердечных сокращений быстро распространяется по всему организму. Одна из возможных функций ДА, секретируемого ГК, — регуляция работы самого сердца, подобно тому как это происходит у позвоночных (Polakowski et al., 2004). Кроме того, известно, что этот гормон у моллюсков участвует во многих физиологических процессах. Так, имеются данные о воздействии ДА на чувствительный эпителий органов обоняния и движение щупалец (Rosshchin, Balaban, 2012), на реснитчатые клетки вельма личинки *Mytilus edulis*, в которых он ингибирует скорость питания (Beiras, Widdows, 1995), на задержание нереста у дрейссены *Dreissena polymorpha* (Fong et al., 1993) и снижение активности волн мышечных сокращений подошвы у виноградноулитки *Helix* sp. (Pavlova, 2001). Регуляция всех этих процессов может опосредоваться ДА, секретируемым ГК в составе НЭК.

Результаты работы позволяют добавить ДА в уже имеющийся обширный список биоактивных веществ, присутствующих в клетках НЭК.

В течение последних 20 лет разрабатывается концепция ДА как регулятора иммунных реакций; показано его влияние на активность лимфоцитов и иммунных эффекторных клеток позвоночных (Basu, Dasgupta, 2000). Группа Оттавиани с сотрудниками в своих многочисленных работах показала сходство набора биоактивных молекул, участвующих в формировании иммунного ответа, стресс-реакции и нейроэндокринной регуляции у беспозвоночных, в частности моллюсков, и позвоночных; при этом клетки гемолимфы гемоциты авторы рассматривают в качестве главных иммунокомпетентных клеток моллюсков (Blom, Ottaviani, 2017; Malagoli, Ottaviani, 2017). Предполагают существование у моллюсков единой нейроэндокринно-иммунной регуляторной сети, в которой ДА и ферменты его биохимических превращений занимают ключевую позицию (Cheng et al., 2016, 2017). В частности, показано, что ДА модулирует иммунный ответ на введение бактерий у морского гребешка (Zhou et al., 2011). Обнаружение компонентов ДА-системы в клетках

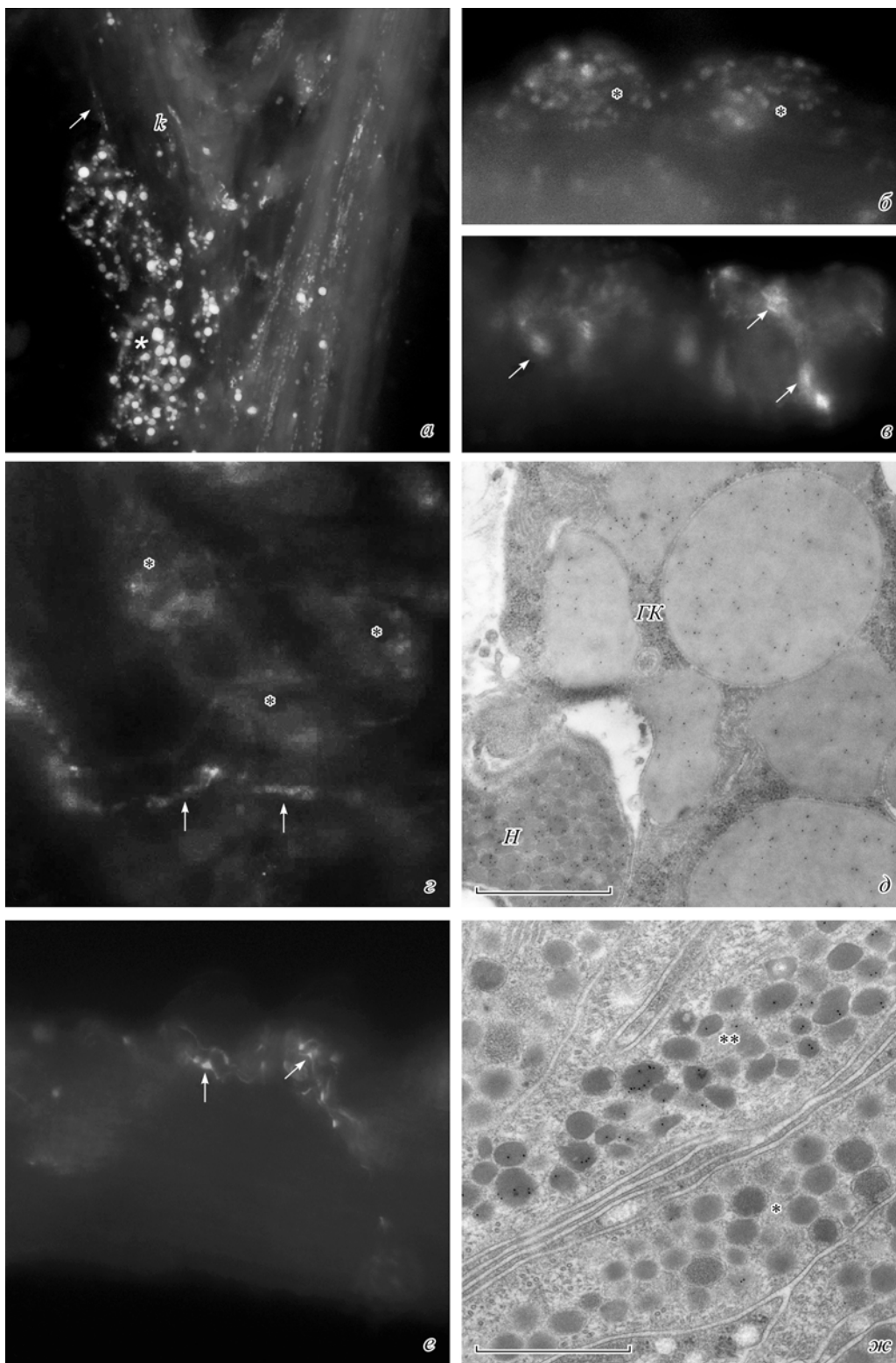


Рис. 1. Компоненты дофаминовой системы в предсердии *Achatina achatina*: гистохимическое выявление катехоламинов (а), иммунофлуоресцентное (б—г, е) и ЭМ-иммуоцитохимическое (д, ж) окрашивание.

а — глиоксалиндуцированная флуоресценция наличествует в ГК (звездочка) и нервных волокнах (стрелка); б, в — ТГ-подобная иммуореактивность в ГК (б) и нервных волокнах (в), стрелки указывают на нервные волокна, звездочками отмечены ГК; г — экспрессия ДАбетаГ-подобного материала в ГК (звездочки) и нервных волокнах (стрелки); д — наличие ДАбетаГ-подобного материала в нейросекреторных гранулах нервных волокон (Н) и гранулах ГК (ГК); е — наличие ДА-Р1-подобного материала в нервных волокнах (стрелки); ж — наличие ДА-Р1 в нейросекреторных гранулах нервных волокон, рядом расположенные нервные волокна одного нервного пучка содержат более (две звездочки) и менее (одна звездочка) интенсивно окрашенные нейросекреторные гранулы. а—г, е: об. 40×. Масштабный отрезок — 1 мкм.

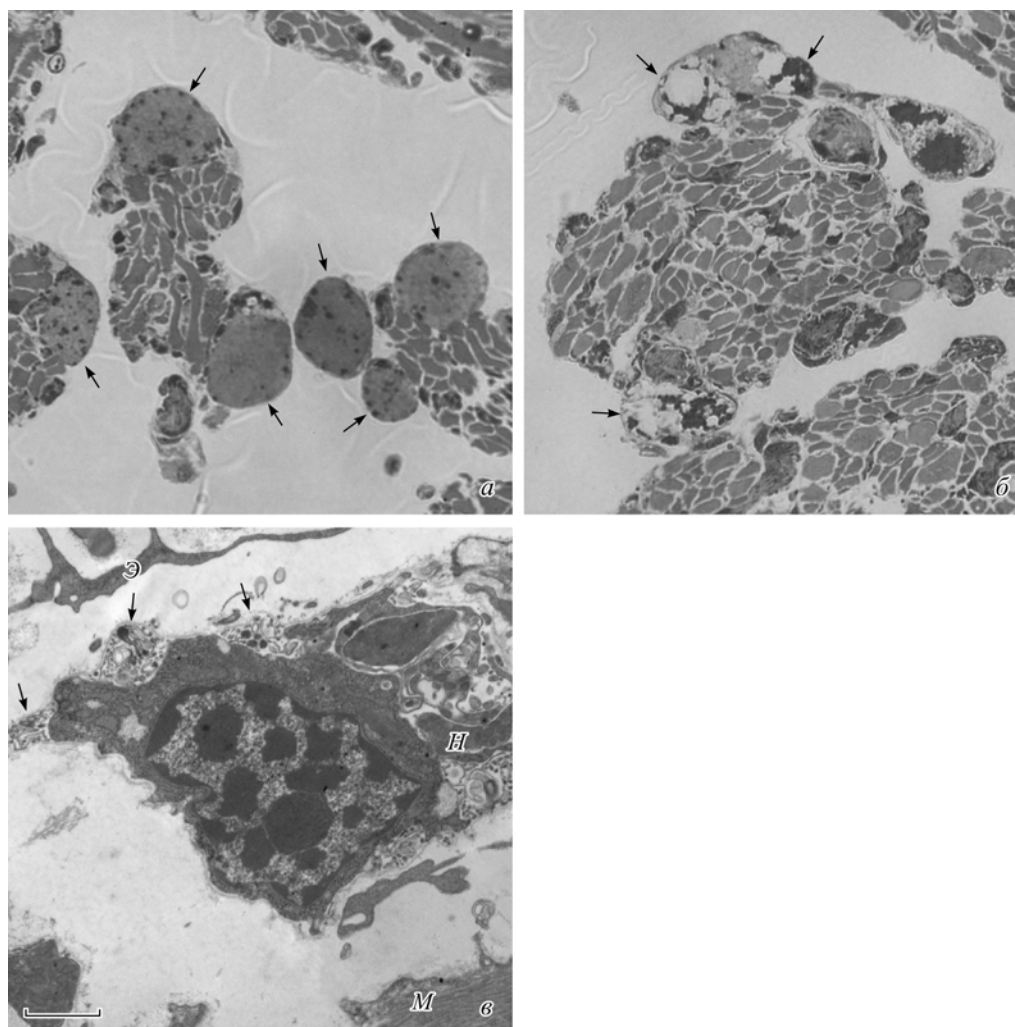


Рис. 2. Влияние дофамина на дегрануляцию предсердных ГК ахатины.

а, б — полутонкие срезы тканей предсердия, окрашенные альциановым синим; у интактных улиток предсердие содержит в основном наполненные гранулами ГК (*а*), тогда как после введения ДА в предсердии обнаруживаются большей частью дегранулированные ГК (*б*). ГК отмечены стрелками. Об. 40×. *в* — электронограмма, демонстрирующая полностью дегранулированную ГК; идентификация клетки в качестве ГК возможна по ее расположению между отростком эндотелиальной клетки (Э) и мышечным волокном (М), плотному контакту с нервным окончанием (Н), а также по характерным для ГК скоплениям мелких вакуолей и гранул под базальной пластинкой ГК (стрелки). Масштабный отрезок — 1 мкм.

НЭК предсердия улитки свидетельствует об их вероятном участии наряду с гемоцитами в функционировании нейроэндокринно-иммунной регуляторной сети, а именно в иммунной защите, нейроэндокринной регуляции физиологических процессов и стресс-реакциях, важным звеном которых является ДА.

ДА-Р1-подобная иммунореактивность была нами выявлена в нейросекреторных гранулах нервных волокон, но не в ГК. Мы использовали антитела к ДА-Р первого типа, руководствуясь имеющимися данными об их наличии в ЦНС прудовика *Lymnaea stagnalis* (Hernadi et al., 2012), альбуминовой железе улитки *Helisoma duryi* (Mukai et al., 2004) и тканях яичника устрицы *Crassostrea angulata* (Yang et al., 2013). Однако, как показано, у беспозвоночных имеется по крайней мере 3 подтипа рецепторов к ДА (Mustard et al., 2005). Возможно, предсердные ГК ахатины воспринимают воздействие ДА через ДА-Р другого подтипа. Примечательна разная интенсивность мечения нейросекреторных гранул в соседних аксонах одного нервного пучка антителами против ДА-Р1. Подобную картину мы наблюдали при работе с антителами

против белка теплового шока (Martynova et al., 2007), субстанции Р и FMRFамида (Шабельников и др., 2008), а также против кортиколиберина и его рецепторов (Мартынова и др., 2018). Это соответствует физиологическим данным о смешанном характере нервов брюхоногих моллюсков (Журавлев, 1999). Наличие ДА в секреторных гранулах ГК и ДА-Р1 в нервных волокнах свидетельствует о возможности передачи гормональных сигналов от ГК к ЦНС. В этом случае ДА выступает в качестве сенсорного нейротрансмиттера.

Имеются данные об участии дофаминергических нервов в хемо- и механорецепции у брюхоногих моллюсков (Croll et al., 2003) и передаче сигналов от периферической нервной системы в ЦНС, где они оказывают влияние на поведенческие реакции (Bédécarrats et al., 2013). Таким образом, НЭК могут определять физиологическое и психологическое состояние улитки. Для позвоночных описан процесс трансгрануляции гранулярного материала из тучных клеток в контактирующие с ними нервные окончания, который интерпретируется авторами как форма коммуникации иммунной и нервной систем (Wilhelm

et al., 2005). Предсердные ГК брюхоногих моллюсков обнаруживают много черт сходства с тучными клетками — общие содержащиеся в гранулах биоактивные вещества, тесные контакты с нервными волокнами и активное участие в ответе на стресс. В контексте настоящей работы существенно отметить обнаружение ДА и ТГ в гранулах тучных клеток (Rönnerberg et al., 2012; Rönnerberg, Pejler, 2012).

Введение экзогенного ДА вызвало значительное усиление секреторного процесса в предсердных ГК. Ранее нами методом высокоэффективной жидкостной хроматографии было показано, что при стрессе концентрация дофамина в гемолимфе ахатины возрастает до 5300 пг/мл (Martynova et al., 2015). Таким образом, выбранная нами для инъекции доза ДА (4000 пг/мл) сопоставима с концентрацией гормона в гемолимфе улитки при стрессе и не является повреждающей. Ранее мы также показали, что стрессовые воздействия вызывают дегрануляцию ГК. Полученные в настоящей работе данные позволяют предположить участие ДА в активации этого процесса. Мы не обнаружили в ГК ДА-Р1, и остается неясным, через какие рецепторы ДА осуществляет модуляцию секреторного процесса.

Таким образом, в функционировании НЭК предсердия улитки задействованы элементы дофаминовой системы (ТГ, ДбетаГК и ДА-Р1), и ее активизация ведет к усилению дегрануляции секреторных ГК в составе НЭК, что является составляющей реакции на стресс. Полученные данные обогащают наши представления о механизмах функционирования НЭК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-04-00069).

Список литературы

- Журавлев В. Л. 1999. Механизмы нейрогуморального контроля сердца гастропод. Журн. эволюц. биохим. физиол. 35 (2) : 65—77. (Zhuravlev V. L. 1999. Mechanisms of neurohumoral control of gastropod's heart. J. Evol. Biochem. Physiol. 35 (2) : 65—77.)
- 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. (Martynova M. G., Krylova M. I., Bystrova O. A. 2004. Immunocytochemical localization of atrial natriuretic peptide in endothelial and granular cells of the heart of lophotrochozoa. Tsitologiya 46 (5) : 448—455.)
- Мартынова М. Г., Петухова О. А., Шарлаимова Н. С., Шабельников С. В., Быстрова О. А. 2018. Компоненты сигнальной системы кортиколиберина в предсердии улитки. Цитология. 60 (3) : 200—207. (Martynova M. G., Petukhova O. A., Sharlaimova N. S., Shabelnikov S. V., Bystrova O. A. 2018. Components of corticotropin-releasing factor (CRF) signaling system in snail atria. Cell Tissue Biol. 12 (4) : 342—349.)
- Шабельников С. В., Быстрова О. А., Мартынова М. Г. 2008. Иммунолокализация субстанции Р и FRMFамида в предсердии брюхоногого моллюска *Achatina fulica*. Цитология. 50 (5) : 388—393. (Shabel'nikov S. V., Bystrova O. A., Martynova M. G. 2008. Immunolocalization of the substances P- and FMRFamide in the atrium of the snail *Achatina fulica*. Cell Tissue Biol. 2 (4) : 451—454.)
- Barron A. B., Sovik E., Cornish J. L. 2010. The roles of dopamine and related compounds in reward-seeking behavior across animal phyla. Front Behav. Neurosci. 4 : 163 (Doi: 10.3389/fnbeh.2010.00163).
- Basu S., Dasgupta P. S. 2000. Dopamine, a neurotransmitter, influences the immune system. J. Neuroimmunol. 102 : 113—124.
- Bédécarrats A., Cornet C., Simmers J., Nargeot R. 2013. Implication of dopaminergic modulation in operant reward learning and the induction of compulsive-like feeding behavior in *Aplysia*. Learn Mem. 20 : 318—327.
- Beiras R., Widdows J. 1995. Effect of the neurotransmitters dopamine, serotonin and norepinephrine on the ciliary activity of mussel (*Mytilus edulis*) larvae. Marine Biol. 122 : 597—603.
- Blom J. M. C., Ottaviani E. 2017. Immune-neuroendocrine interactions: evolution, ecology, and susceptibility to illness. Med. Sci. Monit. Basic Res. 23 : 362—367.
- Bystrova O. A., Shabelnikov S. V., Martynova M. G. 2014. The process of granule exocytosis in non-stimulated atrial granular cells of the snail, *Achatina achatina*: an ultrastructural, histochemical and immunocytochemical study. Acta Histochem. 116 : 14—19.
- Casagrande C. 1991. Dopamine and the kidney in heart failure. Herz. 16 : 102—115.
- Chen M., Yang H., Xu B., Wang F., Liu B. 2008. Catecholaminergic responses to environmental stress in the hemolymph of Zhikong scallop *Chlamys farreri*. J. Exp. Zool. Ecol. Genet. Physiol. 309 : 289—296.
- Cheng W., Ka Y. W., Chang C. C. 2016. Dopamine beta-hydroxylase participate in the immunendocrine responses of hypothermal stressed white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 59 : 166—178.
- Cheng W., Ka Y. W., Chang C. C. 2017. Involvement of dopamine beta-hydroxylase in the neuroendocrine-immune regulatory network of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 68 : 92—101.
- Croll R. P., Boudko D. Y., Pires A., Hadfield M. G. 2003. Transmitter contents of cells and fibres in the cephalic sensory organs of the gastropod mollusc *Phestilla sibogae*. Cell Tissue Res. 314 : 437—448.
- De la Torre J. C., Surgeon J. W. 1976. A methodological approach to rapid and sensitive monoamine histofluorescence using a modified glyoxylic acid technique: the SPG method. Histochemistry. 49 : 81—93.
- Faller S., Stauback S., Klussman-Kolb A. 2008. Comparative immunohistochemistry of the cephalic sensory organs in Opisthobranchia (Mollusca, Gastropoda). Zoomorphology. 127 : 227—239.
- Fong P. P., Noordhuis R., Ram J. L. 1993. Dopamine reduces intensity of serotonin-induced sprouting in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). J. Exp. Zool. 266 : 79—83.
- Hernádi L., Vehovszky Á., Serfözö Z. 2012. Immunological and pharmacological identification of the dopamine D1 receptor in the CNS of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. Acta Biol. Hung. 63 (Suppl 2) : 151—159.
- Hongwei Liu, Yuri Mishima, Takeshi Fujiwara, Hiroshi Nagai, Akira Kitazawa, Yuji Mine, Hisayoshi Kobayashi, Xincheng Yao, Junko Yamada, Taiko Oda, Michio Namikoshi. 2004. Isolation of araguspongine M, a new stereoisomer of an araguspongine/xestopongin alkaloid, and dopamine from the marine sponge *Neopetrosia exigua* collected in Palau. Mar. Drugs. 2 : 154—163.
- Kiehn L., Saleuddin S., Lange A. 2001. Dopaminergic neurons in the brain and dopaminergic innervation of the albumen gland in mated and virgin helisoma duryi (Mollusca: Pulmonata). BMC Physiol. 1 : 9.
- Lacoste A., Malham S. K., Cueff A., Poulet S. A. 2001. Stress-induced catecholamine changes in the hemolymph of the oyster *Crassostrea gigas*. Gen. Comp. Endocrinol. 122 : 181—188.
- Malagoli D., Ottaviani E. 2017. Cross-talk among immune and neuroendocrine systems in molluscs and other invertebrate models. Horm. Behav. 88 : 41—44.
- Marsden C. A. 2006. Dopamine: the rewarding years. Br. J. Pharmacol. 147 (Suppl. 1) : 136—144.
- Martynova M. G., Bystrova 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.
- Martynova M. G., Shabelnikov S. V., Bystrova O. A. 2015. Long-term consequences of a short-term hypergravity load in a snail model. Int. J. Astrobiol. 14 : 489—495.

- McDonald P. W., Jessen T., Field J. R., Blakely R. D. 2006. Dopamine signaling architecture in *Caenorhabditis elegans*. Cell Mol. Neurobiol. 26 : 593—618.
- Moroz L. I., Winlow W. 1992. Respiratory behaviour in *Lymnaea stagnalis*: pharmacological and cellular analyses. Acta Biol. Hung. 43 : 421—429.
- Mukai S. T., Kiehn L., Saleuddin A. S. 2004. Dopamine stimulates snail albumen gland glycoprotein secretion through the activation of a D1-like receptor. J. Exp. Biol. 207 : 2507—2518.
- Mustard J. A., Beggs K. T., Mercer A. R. 2005. Molecular biology of the invertebrate dopamine receptors. Arch. Insect Biochem. Physiol. 59 : 103—117.
- Ottaviani E., Caselgrandi E., Franchini A., Franceschi C. 1993. CRF provokes the release of norepinephrine by hemocytes of *Viviparus ater* (Gastropoda, Prosobranchia) : further evidence in favour of the evolutionary hypothesis of the mobile immune-brain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 193 : 446—452.
- Pavlova G. A. 2001. Effect of serotonin? Dopamine and ergometrine on locomotion in the pulmonate mollusk *Helix lucorum*. J. Exp. Biol. 204 : 1625—1633.
- Polakowski J. S., Segreti J. A., Cox B. F., Hsieh G. C., Kolasia T., Moreland R. B., Brioni J. D. 2004. Effects of selective dopamine receptor subtype agonists on cardiac contractility and regional haemodynamics in rats. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 31 : 837—841.
- Quinlan E. M., Arnett B. C., Murphy A. D. 1997. Feeding stimulants activate an identified dopaminergic interneuron that induces the feeding motor program in *Helisoma*. J. Neurophysiol. 78 : 812—824.
- Rönnerberg E., Calounova G., Pejler G. 2012. Mast cells express tyrosine hydroxylase and store dopamine in a serglycin-dependent manner. Biol. Chem. 393 : 107—112.
- Rönnerberg E., Pejler G. 2012. Serglycin: the master of the mast cell. Methods Mol. Biol. 836 : 201—217.
- Roshchin M., Balaban P. M. 2012. Neural control of olfaction and tentacle movements by serotonin and dopamine in terrestrial snail. J. Comp. Physiol. Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol. 198 : 145—158.
- Saleuddin A. S. M., Mukai S. T., Almeida K., Hatiras G. 2000. Membrane transduction pathway in the neuronal control of protein secretion by the albumen gland in *Helisoma* (Mollusca). Acta Biol. Hung. 51 : 243—253.
- Vallejo D., Habib M. R., Delgado N., Vaasjo L. O., Croll R. P., Miller M. W. 2014. Localization of tyrosine hydroxylase-like immunoreactivity in the nervous systems of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria alexandrina*, intermediate hosts for schistosomiasis. J. Comp. Neurol. 522 : 2532—2552.
- Verlinden H. 2018. Dopamine signalling in locusts and other insects. Insect. Biochem. Mol. Biol. 97 : 40—52.
- Werkman T. R., De Vlieger T. A., Stoof J. C. 1990. Indications for a hormonal function of dopamine in the central nervous system of the snail *Lymnaea stagnalis*. Neurosci. Lett. 108 : 167—172.
- Wieland S. J., Gelperin A. 1983. Dopamine elicits feeding motor program in *Limax maximus*. J. Neurosci. 3 : 1735—1745.
- Wilhelm M., Silver R., Silverman A. J. 2005. Central nervous system neurons acquire mast cell products via transgranulation. Eur. J. Neurosci. 22 : 2238—2248.
- Yang B., Ni J., Zeng Z., Shi B., You W., Ke C. 2013. Cloning and characterization of the dopamine like receptor in the oyster *Crassostrea angulata*: expression during the ovarian cycle. Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol. 164 : 168—175.
- Zaitseva O. V., Shumeev A. N., Korshunova T. A., Martynova A. V. 2015. Heterochronies in the formation of the nervous and digestive systems in early postlarval development of opisthobranch mollusks: organization of major organ systems of the arctic dorid *Cadlina laevis*. Biol. Bul. 42 : 186—195.
- Zhou Z., Wang L., Shi X., Zhang H., Gao Y., Wang M., Kong P., Qiu L., Song L. 2011. The modulation of catecholamines to the immune response against bacteria *Vibrio anguillarum* challenge in scallop *Chlamys farreri*. Fish Shellfish Immunol. 31 : 1065—1071.

Поступила 10 VII 2018

COMPONENTS OF THE DOPAMINE SYSTEM IN THE NEUROENDOCRINE COMPLEXES OF THE SNAIL ATRIUM

O. A. Bystrova,¹ A. N. Shumeev,² M. G. Martynova^{1,*}

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, and

² Institute of Zoology RAS, St. Petersburg, 199034;

* e-mail: mgmart14@mail.ru

The catecholamine dopamine (DA) is an important neurotransmitter and hormone involved in many physiological processes and stress reactions in both vertebrates and invertebrates. The present study was designed to investigate the presence and distribution of the dopamine system' elements — tyrosine hydroxylase (TH), dopamine-beta-hydroxylase (DbetaH) and type 1 DA-receptors (DA-R1) — in the cells of neuroendocrine complexes (NEC) of gastropoda mollusk *Achatina achatina* which consist of great granular cells (GCs) and tightly contacted with them nerve fibers. The investigation was carried out by the methods of histochemistry, immunofluorescence staining and immunoelectron microscopy. The glyoxylate-induced fluorescence indicative of catecholamines was localized in the GCs and nerve fibers. TH-like and DbetaH-like immunoreactivity was also revealed both in nerve fibers and granules of GCs. DA-R1-positive material was only found in nerve fibers; no labeling was observed in the GCs. Furthermore, it has been shown that application of exogenous dopamine induced enhanced degranulation of the atrial GCs *in vivo*. Taken together, the data obtained here suggest dopamine system participation in the operation of the snail atrial NEC.

Key words: granular cells, dopamine, tyrosine hydroxylase, dopamine-beta-hydroxylase, dopamine receptors