

## КОМПОНЕНТЫ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ КОРТИКОЛИБЕРИНА В ПРЕДСЕРДИИ УЛИТКИ

© М. Г. Мартынова,\* О. А. Петухова, Н. С. Шарлаимова,  
С. В. Шабельников, О. А. Быстрова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

\* электронный адрес: [mgmart14@mail.ru](mailto:mgmart14@mail.ru)

Кортиколиберин-сигнальная система позвоночных состоит из кортиколиберина (КЛ), рецепторов к кортиколиберину (КЛ-Р) двух типов и кортиколиберинсвязывающего белка (КЛ-СБ). Цель настоящей работы заключалась в выяснении наличия и исследовании локализации КЛ, его рецептора КЛ-Р2 и КЛ-СБ в нейроэндокринных комплексах предсердия улитки *Achatina achatina*, которые включают в себя гранулярные клетки (ГК), нервные волокна, тесно с ними контактирующие, и глиоинтерстициальные клетки, сопровождающие нервные волокна. Методами иммунофлуоресцентной и иммуноэлектронной микроскопии с использованием поликлональных антител была выявлена иммунореактивность к этим белкам в гранулах всех трех клеточных компонентов нейроэндокринных комплексов. Вестерн-блоттинг лизата белков предсердия улитки выявил КЛ-Р2-иммуноположительную полосу, соответствующую белку с мол. массой 56 кДа. Это первые данные о молекулярной массе этого рецептора у моллюсков. Кроме того, для выяснения возможных функций КЛ в нейроэндокринных комплексах в культуральную среду с ГК, изолированными из предсердия, был добавлен КЛ в конечной концентрации 50 нМ. По сравнению с контролем доля дегранулированных ГК после внесения КЛ возросла почти вдвое (45.5 % против 24.5,  $P < 0.05$ ). Полученные результаты показали наличие всех трех компонентов КЛ-сигнальной системы в нейроэндокринных комплексах предсердия улитки. Их присутствие и в секреторном, и в нервном компонентах комплекса позволяет предполагать, что КЛ-сигнальная система участвует как в нервной регуляции секреторной активности ГК, так и в передаче информации от ГК в ЦНС.

**Ключевые слова:** гранулярные клетки, нейроэндокринные комплексы, рецепторы к кортиколиберину, кортиколиберинсвязывающий белок, иммунолокализация.

**Принятые сокращения:** ГК — гранулярные клетки, ИФО — иммунофлуоресцентное окрашивание, ИЭМ — иммуноэлектронная микроскопия, КЛ — кортиколиберин, КЛ-Р2 — рецепторы второго типа к кортиколиберину, КЛ-СБ — кортиколиберинсвязывающий белок, ЭМ — электронная микроскопия.

Кортикотропин-релизинг фактор, или кортиколиберин (КЛ), — нейрополипептид, состоящий из 41 аминокислотного остатка. КЛ является первым звеном, запускающим каскад процессов так называемой оси стресса — гипоталамус—гипофиз—надпочечники. В пределах этого каскада основная функция КЛ заключается в индукции секреции адренокортикотропного гормона в гипофизе, который в свою очередь стимулирует секрецию глюкокортикоидов надпочечниками. Однако КЛ у позвоночных обнаруживается не только в ЦНС, но и в периферических нервах, а также в различных тканях, где оказывает непосредственное воздействие на клетки. Так, показано, что *in vitro* КЛ усиливает пролиферацию легочных раковых клеток и реорганизацию их актинового цитоскелета, их миграцию (Agranz et al., 2010), непосредственно влияет на перистальтику кишечника и функцию слизистой (Tache, Perdue, 2004; Porcher et al., 2006).

КЛ-сигнальная система включает в себя три основных компонента — сам КЛ, КЛ-рецепторы (КЛ-Р) и КЛ-связывающий белок (КЛ-СБ). КЛ-Р, через которые КЛ осуществляет свое действие, представлены двумя ти-

пами — КЛ-Р1 и КЛ-Р2. Они входят в семейство рецепторов, сопряженных с G-белком (GPCRs), кодируются разными генами, характеризуются связью с разными процессами в клетке и разной анатомической локализацией. Так, КЛ-Р1 присутствуют преимущественно в мозговой ткани и гипофизе, а КЛ-Р2 — в отдельных районах мозга и в периферических органах (Dautzenberg, 2001; Yang et al., 2010). КЛ-СБ представляет собой гликопротеин размером 37 кДа, обладающий высокой аффинностью по отношению к КЛ. Предполагают, что он модулирует биоактивность КЛ путем или понижения доступности КЛ, или содействия КЛ лигандиндуцированной активации КЛ-Р.

В царстве позвоночных уже на филогенетическом уровне рыб показано участие КЛ в иммуноэндокринных взаимодействиях (Mola et al., 2011). Компоненты КЛ-сигнальной системы обнаружены и у многих представителей беспозвоночных — КЛ химически идентифицирован у насекомых (Kataoka et al., 1989; Coast, 2007), кольчатых червей (Lubics et al., 2003) и оболочников (Lovejoy, Barsyte-Lovejoy, 2010). Выявлено и наличие КЛ-СБ у насеко-

мых (Huisling, Flik, 2005) и ракообразных (Lee et al., 2008). У моллюсков в этой связи исследованы почти исключительно клетки гемолимфы — гемоциты, которые рассматривают в качестве их главных иммунокомпетентных клеток. Показано, что гемоциты двусторчатого моллюска *Mytilus galloprovincialis* экспрессируют КЛ-подобную иммунореактивность, а также КЛ-Р1- и КЛ-Р2-подобную иРНК (Malagoli et al., 2000, 2007). Относительно функций данной сигнальной системы у беспозвоночных имеются данные о том, что КЛ вызывает изменение формы иммуночитов (Malagoli et al., 2000), индуцирует выделение биогенных аминов (норэпинефрина, эфирефрина и допамина) из гемоцитов брюхоногого моллюска роговой катушки *Planorbarius corneus* (Ottaviani et al., 1994), а также о том, что у насекомых он функционирует как диуретический пептид (Kataoka et al., 1989; Coast, 2007). Выяснено также, что одни фрагменты молекулы КЛ стимулируют миграцию гемоцитов моллюсков, тогда как другие фрагменты этой молекулы ее подавляют (Genedani et al., 1994).

Цель настоящей работы заключалась в выявлении, локализации и функции компонентов КЛ-сигнальной системы в предсердии улитки с фокусированием внимания на расположенных в предсердии брюхоногих моллюсков нейроэндокринных комплексах, состоящих из крупных секреторных гранулярных клеток (ГК), нервных волокон, тесно с ними контактирующих, и глиоинтерстициальных клеток, сопровождающих эти волокна. Ранее мы показали, что гранулы предсердных ГК содержат целый ряд биоактивных веществ, таких как белок теплового шока Hsp70 (Мартынова и др., 2004; Martynova et al., 2007), субстанция Р и FRMF-амид (Шабельников и др., 2008), серотонин и гистамин (Bystrova et al., 2014), что позволяет обоснованно предполагать участие этих комплексов в процессах адаптации к стрессорным воздействиям и поддержания гомеостаза. Мы предполагаем также, что КЛ может быть включен в регуляцию секреторной активности нейроэндокринных комплексов предсердия улитки.

## Материал и методика

**Животные.** В качестве экспериментального материала использовали предсердия гигантской африканской улитки ахатины *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 эксперимент брали взрослых ахатин массой 15—20 г.

**Вестерн-иммуоблоттинг.** Исследовали тотальный лизат белков предсердия улитки. Электрофорез проводили в 12%-ном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия согласно общепринятой методике (Laemmli, 1970). После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану методом полусухого переноса (Towbin et al., 1979). Иммунодетекцию проводили при помощи поликлональных антител против КЛ-Р2 (Sigma, США) в разведении 1 : 1700 и метода усиленной хемилюминесценции. В качестве вторых антител использовали козьиные антитела против антигенов крысы, конъюгированные с пероксидазой, в разведении 1 : 20 000. Для определения молекулярной массы исследуемого белка использовали набор маркерных белков PAGE RULER (Thermo Scientific, США).

**Иммуофлуоресцентное окрашивание** ткани (ИФО). Анализ проводили, следуя стандартному иммуногистохимическому протоколу. Изолированные предсердия растягивали препаровальными иглами на предметном стекле и фиксировали 4%-ным параформальдегидом 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 ткань промывали трижды по 5 мин в PBS 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 (1 ч при комнатной температуре). Для проверки специфичности окрашивания был проведен тест на нейтрализацию антител методом адсорбции специфическим антигеном — окрашивание проводили смесью раствора антител к КЛ (20 пМ/мл) и раствора КЛ (200 пМ/мл) в соотношении 1 : 1.

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 (ИЭМ).** Изолированные предсердия фиксировали в 2.5%-ном глутаральдегиде на 0.1 М какодилатном буфере, pH 7.2, с 2%-ным содержанием сахарозы в течение 1.5 ч при 4 °С. Постфиксацию проводили в 1%-ном OsO<sub>4</sub> на 0.1 М какодилатном буфере, pH 7.4, с 5%-ным содержанием сахарозы 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 изготавляли с помощью алмазного ножа на LKB-Ultratome (Швеция). 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 буфере (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.

**Использованные реактивы:** для ИЭМ-реакций использовали поликлональные антитела против КЛ в разведении 1 : 2000, поликлональные антитела против КЛ-Р2 в разведении 1 : 1000 и поликлональные антитела против КЛ-СБ в разведении 1 : 50. В качестве вторых антител применяли антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированных с коллоидным золотом в разведении 1 : 10. Для ИФО применяли те же антитела в разведении 1 : 2000 (анти-КЛ) и 1 : 100 (анти-КЛ-СБ), в качестве вторых антител в данном случае использовали кроличьи антитела против иммуноглобулинов крысы, конъюгированные с FITC в разведении 1 : 200. Все антитела фирмы Sigma (США).

**Изоляция и культивирование предсердных ГК.** Для исследования влияния КЛ на гранулоциты в условиях *in vitro* суспензии клеток предсердия выделяли из 12 особей *A. fulica*. Раковины животных перед экспериментом тщательно промывали и обрабатывали хлоргексидином. В 1 мл смеси ферментов помещали по 2 предсердия и инкубировали при комнатной температуре при покачивании в течение 2 ч. Смесь ферментов со-

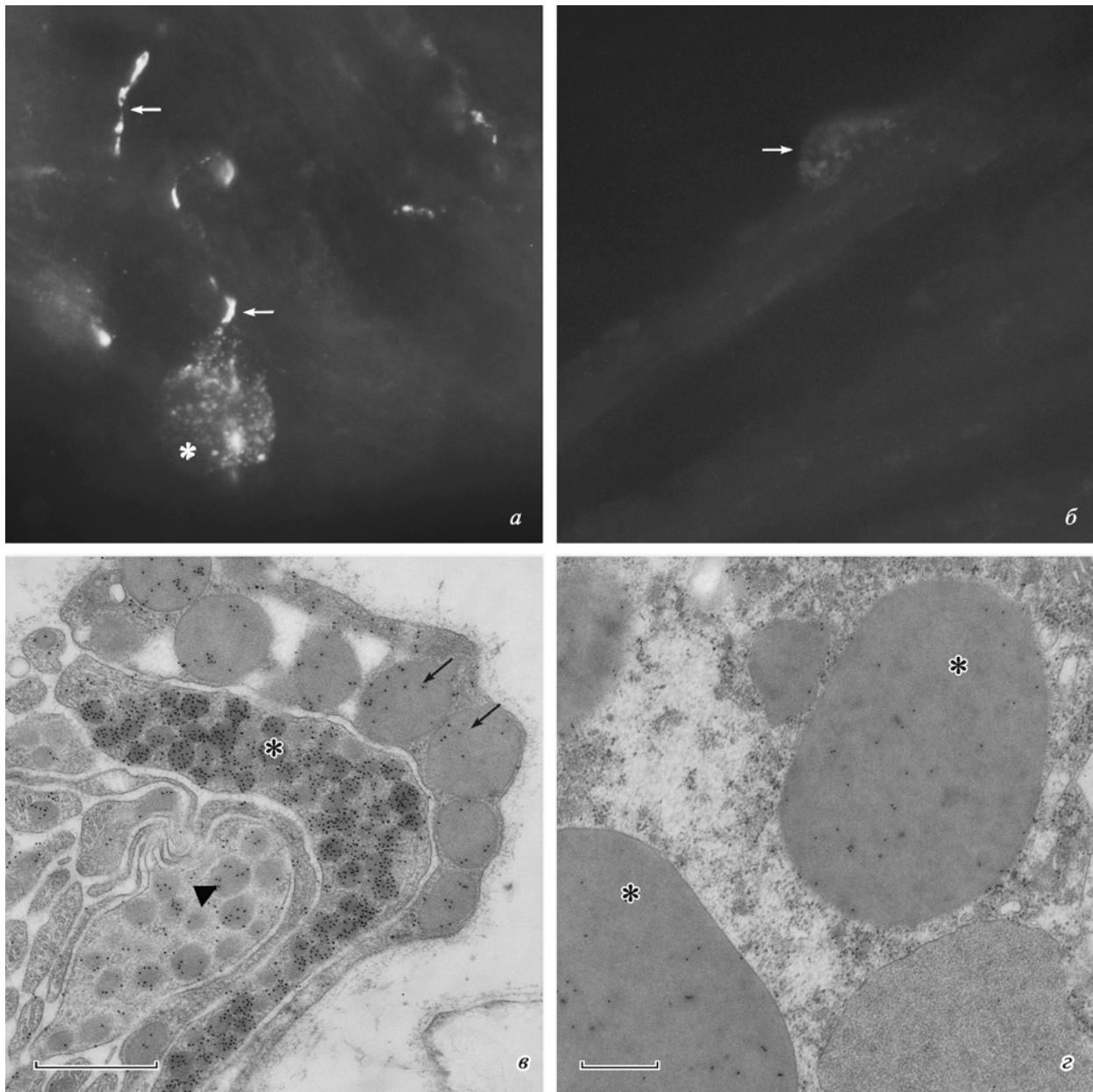


Рис. 1. Кортиколиберин (КЛ) в предсердии *Achatina achatina*.

*a* — иммунофлуоресцентное выявление КЛ, *стрелки* указывают на нервные волокна, *звездочкой* отмечена гранулярная клетка (ГК), окрашенные с помощью поликлональных антител к КЛ; об. 40×. *б* — тест на специфичность окрашивания. Адсорбция антител специфическим антигеном привела к отсутствию реакции; *стрелка* указывает на ГК; об. 40×. *в* — на ЭМ-уровне иммунореактивность к антителам против КЛ продемонстрировали гранулы глиоинтерстициальных клеток (*стрелки*) и нейросекреторные гранулы нервных волокон; при этом в рядом расположенных нервных волокнах одного нервного пучка содержались более (*звездочка*) и менее (*треугольник*) интенсивно окрашенные нейросекреторные гранулы. *з* — иммунореактивность к антителам против КЛ была выявлена и в гранулах ГК; *звездочками* отмечены окрашенные гранулы; *масштабные отрезки* на электронограммах — 0,5 мкм.

стояла из коллагеназы печени краба (10 мг/мл; Росмедбио, Россия) и протеазы *Streptomyces griseus* (10 мг/мл; Sigma, США) в физиологическом растворе для *Achatina* (4 мМ КСl, 61 мМ NaCl и 10 мМ HEPES). Обработанные ферментом предсердия переносили в 1 мл питательной среды L-15 (Sigma, США) с добавками (5 мМ глюкозы, 14 мМ HEPES, 10 мМ CaCl<sub>2</sub> и 10 мМ MgCl<sub>2</sub>). Ткани инкубировали в среде в течение 1–2 ч при легком покачивании для высвобождения гранулоцитов, затем удаляли нераспавшуюся ткань предсердия, фильтровали полученную суспензию клеток через нейлоновое ситечко с диаметром отверстий 40 мкм, после чего центрифугиро-

вали 3 мин при 800 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в 1 мл питательной среды. Суспензии клеток каждого образца, полученного при диссоциации двух предсердий, наносили на 2 лунки 4-луночных плат (Nunc) в 500 мкл L-15. Выделенные гетерогенные суспензии клеток включали в себя кардиомиоциты, клетки эпикарда, эндотелиоподобные клетки и гранулоциты. Число гранулоцитов в 1 мл суспензий составляло около 1000. Первичные культуры содержали при 25 °С в течение 20 ч перед добавлением КЛ. Для подсчета соотношения нормальных и дегранулированных гранулоцитов в каждом из трех контрольных образцов

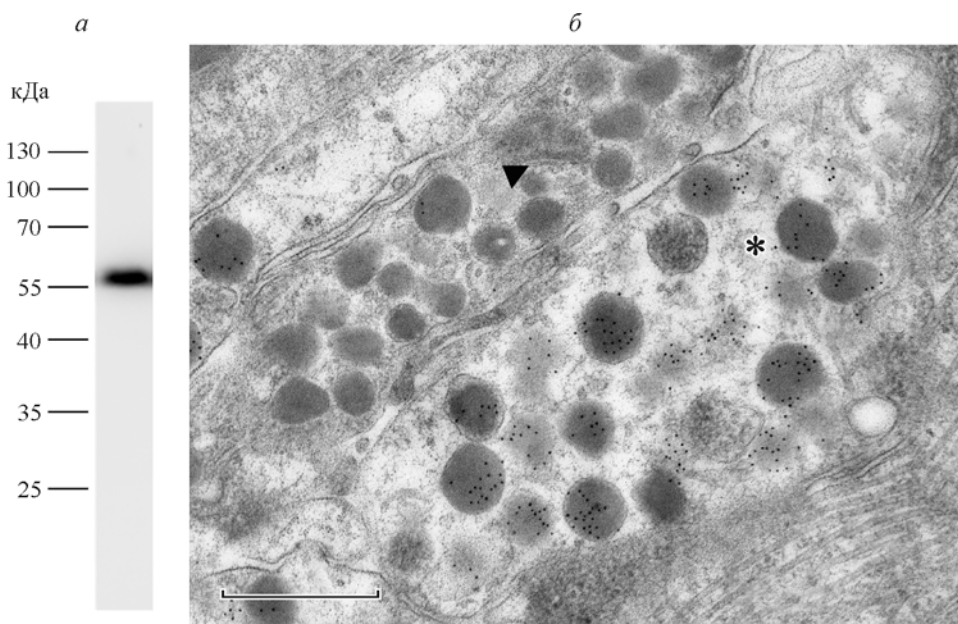


Рис. 2. Рецепторы второго типа к кортиколиберину (КЛ-P2) в предсердии *Achatina achatina*.

*а* — Вестерн-блоттинг белков из лизата предсердия улитки с использованием поликлональных антител к КЛ-K2; *справа* указаны маркеры молекулярных масс. *б* — ЭМ-иммуноцитохимическое окрашивание антителами к КЛ-P2 выявило экспрессию КЛ-P2-подобного материала в нейросекреторных гранулах нервных волокон; как и в случае окрашивания антителами к КЛ, в одном нервном пучке соседствовали волокна с более (звездочка) и менее (треугольник) интенсивной меткой. Масштабный отрезок — 0.5 мкм.

фотографировали по 20 полей зрения на микроскопе ZOE Fluorescent Cell Imager (BioRad, США) при 20 $\times$ . Затем заменяли среду L-15 на среду, содержащую КЛ до конечной концентрации 50 нМ. Через 1 ч лунки фотографировали для подсчета доли дегранулированных гранулоцитов.

Статистическая обработка. Подсчет доли дегранулированных клеток проводили в нескольких случайных полях зрения (в сумме не менее 300 клеток) в препаратах, полученных в трех независимых экспериментах на 2 особях улитки в каждом. Данные представлены как среднее и его ошибка, а на гистограмме — как среднее и стандартное отклонение; различие оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента и считали достоверным при  $P < 0.05$ .

## Результаты

Экспрессию КЛ в ткани предсердия улитки исследовали методами ИФО и ИЭМ. ИФО показало наличие КЛ-иммунопозитивного материала в предсердных ГК и подходящих к ним нервных волокнах (рис. 1, *а*). При добавлении КЛ к антителам свечение не наблюдали ни в каких элементах предсердной ткани улитки (рис. 1, *б*), что свидетельствует о специфическом взаимодействии антител против КЛ с соответствующим антигеном в исследуемой ткани. При проведении ИЭМ-окрашивания метка обнаружена над нейросекреторными гранулами нервных волокон, гранулами глиоинтерстициальных клеток (рис. 1, *в*), а также над гранулами ГК (рис. 1, *г*). Плотность метки над нейросекреторными гранулами в волокнах, входящих в один нерв, значительно различалась (рис. 1, *в*).

Экспрессию КЛ-P2 в ткани предсердия улитки исследовали при помощи электрофореза с им-

муноблоттингом и ИЭМ. Вестерн-иммуноблоттинг показал наличие в лизате белков предсердия ахатины белка с мол. массой около 56 кДа, демонстрирующего позитивную реакцию с антителами к КЛ-P2 (рис. 2, *а*). ИЭМ-исследование выявило КЛ-P2-позитивный материал в нервных волокнах предсердия улитки (рис. 2, *б*). Характер мечения был аналогичен таковому в реакции с антителами к КЛ — нейросекреторные гранулы рядом расположенных нервных волокон одного пучка метились с существенно разной интенсивностью.

Экспрессию КЛ-СБ в ткани предсердия улитки исследовали методами ИФО и ИЭМ. Флуоресцентная иммуногистохимия показала экспрессию КЛ-СБ только в предсердных ГК (рис. 3, *а*). При анализе методом ИЭМ метка была обнаружена как над гранулами ГК (рис. 3, *б*), так в небольшой степени и над нейросекреторными гранулами нервных волокон (рис. 3, *в*).

Влияние КЛ на дегрануляцию предсердных ГК *in vitro*. В культуре изолированных из предсердия ахатины клеток были хорошо различимы интактные и дегранулированные ГК (рис. 4, *а*). Без дополнительных воздействий доля дегранулированных ГК через 1 сут культивирования составляла  $24.5 \pm 0.8\%$ . Через 1 ч после введения в среду КЛ происходило увеличение доли дегранулированных ГК почти вдвое и составляло  $44.5 \pm 4.0\%$  ( $P < 0.01$ ).

## Обсуждение

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о присутствии всех трех компонентов КЛ-сигнальной системы в нейросекреторных комплексах предсердия улитки, из чего можно заключить, что это трио является эволюционно стабильной функционирующей ассоциацией. В пределах нейросекреторных комплексов

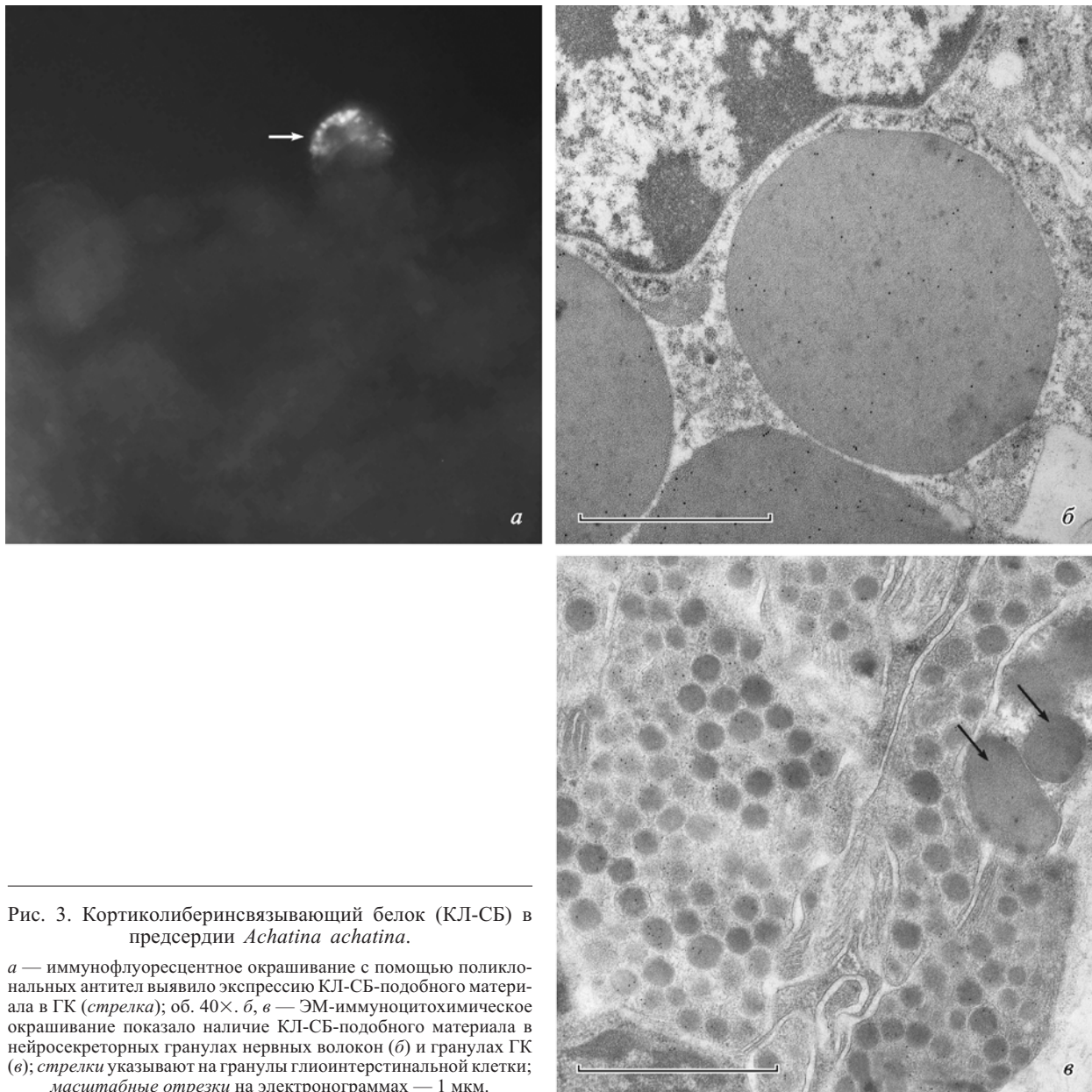


Рис. 3. Кортиколиберинсвязывающий белок (КЛ-СБ) в предсердии *Achatina achatina*.

*a* — иммунофлуоресцентное окрашивание с помощью поликлональных антител выявило экспрессию КЛ-СБ-подобного материала в ГК (стрелка); об. 40×. *б, в* — ЭМ-иммуноцитохимическое окрашивание показало наличие КЛ-СБ-подобного материала в нейросекреторных гранулах нервных волокон (*б*) и гранулах ГК (*в*); стрелки указывают на гранулы глиоинтерстициальной клетки; масштабные отрезки на электронограммах — 1 мкм.

предсердия улитки компоненты КЛ-сигнальной системы локализованы как в нейросекреторных гранулах нервных волокон и гранулах, сопровождающих нервные волокна интерстициальных клеток, так и в гранулах ГК. Такое распределение гормона и рецепторов к нему предполагает участие КЛ-сигнальной системы в сложных взаимодействиях нервных окончаний и секретирующих ГК друг на друга. Передача сигнала может идти как от ЦНС к секретирующим биоактивные вещества ГК, так и от чувствительных к состоянию своего тканевого микроокружения ГК к ЦНС.

Обнаружение КЛ-P2 не на клеточных мембранах, а во внутриклеточных гранулах находит свою аналогию с локализацией рецепторов к лейкотриену в гранулах эндотелиальных клеток человека (Johansson et al., 2010). Имеются данные и о различном расположении подтипов КЛ-P в нейронах ядра шва продолговатого мозга крысы: тогда как КЛ-P1 локализован на плазматической мембране, КЛ-P2 локализован в цитоплазме (Waselus et al., 2009).

Мол. масса КЛ-P2-иммунореактивного материала, выявленного в лизате белков предсердия улитки, составила около 56 кДа. Показано, что рецепторы к КЛ существуют во многих изоформах, различающихся по молекулярной массе. В литературе приводятся данные о молекулярной массе КЛ-P2 овцы в 37 и 28 кДа (Lakshmanan et al., 2008), мыши и крысы в 16—32 и 62—83 кДа соответственно (Tian et al., 2006). В отношении КЛ-P2 моллюсков такие данные получены впервые.

Ранее нами была показана разная интенсивность мечения нейросекреторных гранул в соседних аксонах одного нервного пучка антителами против белка теплового шока 70 (Martynova et al., 2007), а также против субстанции P и FMRF-амида (Шабельников и др., 2008). Полученные в настоящей работе схожие результаты относительно локализации КЛ и КЛ-P2 еще раз подтверждают физиологические данные о смешанном характере нервов брюхоногих моллюсков (Журавлев, 1999).

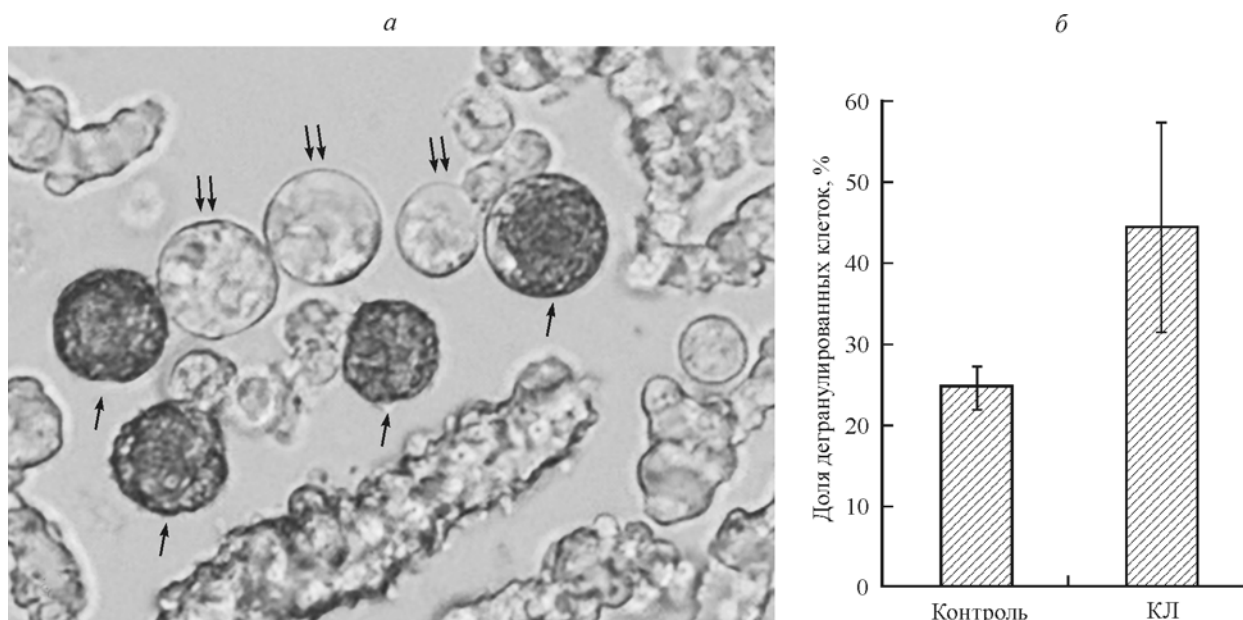


Рис. 4. Влияние кортиколиберина (КЛ) на дегрануляцию предсердных ГК улитки *in vitro*.

*a* — фотография ГК в культуре; *стрелки* указывают на интактные ГК, *двойные стрелки* — на дегранулированные ГК; об. 20×. *б* — гистограмма подсчета доли дегранулированных ГК в контроле (клетки культивировали в чистой среде) и в опыте — КЛ (клетки культивировали в течение 1 ч в среде, содержащей 50 нМ КЛ); данные представлены в виде средних значений и стандартных отклонений ( $M \pm SD$ ),  $n = 3$  в обоих случаях; различие между контролем и опытом достоверно при  $p < 0.05$ .

Выявленное присутствие компонентов КЛ-сигнальной системы в гранулах глиоинтерстициальных клеток, сопровождающих нервные волокна улитки, соответствует представлениям о роли глиальных клеток не только в качестве механической защиты нервных волокон, но и в качестве регулятора их функционирования (Chiu, Kriegler, 1994); такой модератор физиологических клеточных процессов, как КЛ, несомненно может принимать ключевое участие в такой регуляции.

К настоящему времени сложился взгляд на КЛ-СБ как на консервативный белок в эволюции от насекомых до человека (Ketchesin et al., 2017). В нашей работе впервые показано его присутствие у моллюсков, где он обнаружен в тех же клеточных структурах, что и КЛ, и КЛ-Р2, с которым он, очевидно, функционально и связан, модулируя биоактивность КЛ.

ГК, входящие в состав нейроэндокринных комплексов предсердия улитки, отвечают на раздражение сердечного нерва (Shabelnikov et al., 2009) и гипергравитационную нагрузку (Martynova et al., 2015) усиленной секрецией биоактивных веществ, содержащихся в их гранулах. По морфологии, содержанию в гранулах биоактивных веществ, тесному контакту с нервными окончаниями и участию в процессах адаптации и ответа на стрессовые воздействия предсердные ГК улитки демонстрируют очевидную аналогию с тучными клетками позвоночных. В контексте данной работы следует отметить продуцирование тучными клетками КЛ и наличие у них КЛ-Р (Kempuraj et al., 2004; Saraffa et al., 2016). Относительно характера действия КЛ на тучные клетки имеются противоречивые данные: показано, что внутрибрюшинное введение КЛ инициирует дегрануляцию тучных клеток кишки крысы через КЛ-Р1 и КЛ-Р2 (Larauche et al., 2009) и селективно индуцирует секрецию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) тучными клетками человека, экспрессирующими КЛ-Р (Cao et al., 2005). Однако в исследовании на

тучных клетках кожи мыши было выявлено ингибирующее дегрануляцию действие КЛ (Shimoda et al., 2010).

Таким образом, КЛ-сигнальная система, которая у позвоночных вовлечена в стресс-реакции и может осуществлять свое воздействие через регуляцию активности тучных клеток, у моллюсков также включена в стресс-реакции благодаря участию в функционировании нейроэндокринных комплексов предсердия. Результаты наших экспериментов по влиянию КЛ на дегрануляцию изолированных ГК поддерживают предположение о том, что функция этого гормона в нейроэндокринных комплексах предсердия улитки по крайней мере частично может быть связана с регуляцией секреторной активности ГК.

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 лопотрохофорных. 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.)
- 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

- va M. G. 2008. Immunolocalization of the substances P- and FMRFamide-like immunoreactivity in the atrium of the snail *Achatina fulica*. *Cell Tissue Biol.* 2 (4) : 451—544.)
- Arranz A., Venihaki M., Mol B., Andrulidaki A., Dermitzaki E., Rassouli O., Ripoll J., Stathopoulos E. N., Gomariz R. P., Margioris A. N., Tsatsanis C. 2010. The impact of stress on tumor growth: peripheral CRF mediates tumor-promoting effects of stress. *Mol. Cancer.* 9 : 261. DOI: 10.1186/1476-4598-9-261.
- 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.
- Cao J., Papadopoulou N., Kempuraj D., Boucher W. S., Sugimoto K., Cetrulo C. L., Theoharides T. C. 2005. Human mast cells express corticotropin-releasing hormone (CRH) receptors and CRH leads to selective secretion of vascular endothelial growth factor. *J. Immunol.* 174 : 7665—7675.
- Caraffa A., Spinas E., Kritas S. K., Lessiani G., Ronconi G., Saggini A., Antinolfi P., Pizzicannella J., Toniato E., Theoharides T. C., Conti P. 2016. Endocrinology of the skin: intradermal neuroimmune network, a new frontier. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 30 : 339—343.
- Chiu S. Y., Kriegler S. 1994. Neurotransmitter-mediated signaling between axons and glial cells. *Glia.* 11 : 191—200.
- Coast G. 2007. The endocrine control of salt balance in insects. *Gen. Comp. Endocrinol.* 152 : 332—338.
- Dautzenberg F. M., Kilpatrick G. J., Hauger R. L., Moreau J. 2001. Molecular biology of the CRH receptors — in the mood. *Peptides.* 22 : 753—760.
- Genedani S., Bernardi M., Ottaviani E., Franceschi C., Leung M. K., Stefano G. B. 1994. Differential modulation of invertebrate hemocyte motility by CRF, ACTH, and its fragments. *Peptides.* 15 : 203—206.
- Huising M. O., Flik G. 2005. The remarkable conservation of corticotropin-releasing hormone (CRH)-binding protein in the honeybee (*Apis mellifera*) dates the CRH system to a common ancestor of insects and vertebrates. *Endocrinology.* 146 : 2165—2170.
- Johansson A. S., Haeggström J. Z., Hulthenby K., Palmblad J. 2010. Subcellular localization of leukotriene receptors in human endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 316 : 2790—2796.
- Kataoka H., Troetschler R. G., Li J. P., Kramer S. J., Carney R. L., Schooley D. A. 1989. Isolation and identification of a diuretic hormone from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 86 : 2976—2980.
- Kempuraj D., Papadopoulou N. G., Lytinas M., Huang M., Kandere-Grzybowska K., Madhappan B., Boucher W., Christodoulou S., Athanassiou A., Theoharides T. C. 2004. Corticotropin-releasing hormone and its structurally related urocortin are synthesized and secreted by human mast cells. *Endocrinology.* 145 : 43—48.
- Ketchesin K. D., Stinnett G. S., Seasholtz A. F. 2017. Corticotropin-releasing hormone-binding protein and stress: from invertebrates to humans. *Stress.* 20 : 449—464.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 : 680—685.
- Lakshmanan J., Magee T. R., Richard J. D., Liu G. L., Salido E., Sugano S. K., Ferrini M., Ross M. G. 2008. Localization and gestation-dependent pattern of corticotrophin-releasing factor receptor subtypes in ovine fetal distal colon. *Neurogastroentero. Motil.* 20 : 1328—1339.
- Larauche M., Kiank C., Tache Y. 2009. Corticotropin releasing factor signaling in colon and ileum: regulation by stress and pathophysiological implications. *J. Physiol. Pharmacol.* 60 (Suppl. 7) : 33—46.
- Lee K. W., Rhee J. S., Raisuddin S., Gi Park H., Lee J. S. 2008. A corticotropin-releasing hormone binding protein (CRH-BP) gene from the intertidal copepod, *Tigriopus japonicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 158 : 54—60.
- Lovejoy D. A., Barsyte-Lovejoy D. 2010. Characterization of a corticotropin-releasing factor (CRF)/diuretic hormone-like peptide from tunicates: insight into the origins of the vertebrate CRF family. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165 : 330—336.
- Lubics A., Reglodi D., Szeli M., Lengvari I., Kozicz T. 2003. Comparative distribution of urocortin- and CRF-like immunoreactivities in the nervous system of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Peptides.* 24 : 205—213.
- Malagoli D., Di Paolo I., Ottaviani E. 2007. Presence of and stress-related changes in urocortin-like molecules in neurons and immune cells from the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Peptides.* 28 : 1545—1552.
- Malagoli D., Franchini A., Ottaviani E. 2000. Synergistic role of cAMP and IP(3) in corticotropin-releasing hormone-induced cell shape changes in invertebrate immunocytes. *Peptides.* 21 : 175—182.
- 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.
- Mola L., Gambarelli A., Pederzoli A. 2011. Immunolocalization of corticotropin-releasing factor (CRF) and corticotropin-releasing factor receptor 2 (CRF-R2) in the developing gut of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Acta Histochem.* 113 : 290—293.
- Ottaviani E., Franchini A., Caselgrandi E., Cossarizza A., Franceschi C. 1994. Relationship between corticotropin-releasing factor and interleukin-2: evolutionary evidence. *FEBS Lett.* 351 : 19—21.
- Porcher C., Peinnequin A., Pellissier S., Meregnani J., Sinniger V., Canini F., Bonaz B. 2006. Endogenous expression and *in vitro* study of CRF-related peptides and CRF receptors in the rat gastric antrum. *Peptides.* 27 : 1464—1475.
- Shabelnikov S. V., Bystrova O. A., Ivanov V. A., Margulis B. A., Martynova M. G. 2009. Atrial granular cells of the snail *Achatina fulica* release proteins into hemolymph after stimulation of the heart nerve. *J. Exp. Biol.* 212 : 3211—3220.
- Shimoda T., Liang Z., Suzuki H., Kawana S. 2010. Inhibitory effects of antipsychotic and anxiolytic agents on stress-induced degranulation of mouse dermal mast cells. *Clin. Exp. Dermatol.* 35 : 531—536.
- Tache Y., Perdue M. H. 2004. Role of peripheral CRF signalling pathways in stress-related alterations of gut motility and mucosal function. *Neurogastroenterol. Motil.* 16 : Suppl 1 : 137—142.
- Tian J. B., Shan X., Bishop G. A., King J. S. 2006. Presynaptic localization of a truncated isoform of the type 2 corticotropin releasing factor receptor in the cerebellum. *Neuroscience.* 138 : 691—702.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon G. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 76 : 4350—4356.
- Wasselus M., Nazzaro C., Valentino R. J., Van Bockstaele E. J. 2009. Stress-induced redistribution of corticotropin-releasing factor receptor subtypes in the dorsal raphe nucleus. *Biol. Psychiatry.* 66 : 76—83.
- Yang L. Z., Tovote P., Rayner M., Kockskamper J., Pieske B., Spiess J. 2010. Corticotropin-releasing factor receptors and urocortins, links between the brain and the heart. *Eur. J. Pharmacol.* 632 : 1—6.

## COMPONENTS OF THE CRF-SIGNAL SYSTEM IN THE SNAIL ATRIUM

*M. G. Martynova,\* O. A. Petukhova, N. S. Sharlaimova, S. V. Shabelnikov, O. A. Bystrova*

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

\* e-mail: mgmart14@mail.ru

Vertebrate CRF-signaling system consists of Corticotropin-Releasing Factor (CRF), two types of receptors to CRF (CRF-R1 and CRF-R2) and CRF-Binding Protein (CRF-BP). The aim of this study was to investigate the presence and localization of CRF, CRF-R2 and CRF-BP in the snail's atrial neuroendocrine complexes that includes granular cells (GCs), tightly connecting with them nerve fibers and glio-interstitial cells. Immunofluorescence assay and immunogold electron microscopy using polyclonal antibodies against these proteins revealed immunoreactivity to them in the granules of all these kind of cells. Western blotting analysis of the snail atria lysate using a rabbit anti-CRF-R2 polyclonal antibody revealed a specific band with the weight of 56 kDa. This is the first data on the molecular weight of this receptor in molluscs. Furthermore, to clarify the possible functions of CRF in the neuroendocrine complexes, GCs were isolated from the snail atrium and the hormone was added to the cultural milieu. Compared with that in control the proportion of degranulated GCs after CRF addition increased almost twice (45.5 % vs. 24.5 %,  $P < 0.05$ ). The obtained results indicate the presence of all three components of the CRF-signaling system in the neuroendocrine complexes of snail's atrium. In addition, their presence in both secretory and nervous components of the complexes suggests that the CRF-signaling system here can participate in nerve regulation of secretory activity of GCs and in the transfer of information from GCs to the CNS.

Key words: granular cells, neuro-endocrine complexes, immunolocalization, CRF-receptors, CRF-binding protein.