

УДК [612.017.2+612.014.464]:594.117  
DOI: 10.34215/1609-1175-2022-1-36-45

## Роль серотонина, ацетилхолина, оксида азота и FMRF-амида в адаптации морских гребешков к гипоксии

Е.П. Коцюба, В.А. Дячук

Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук (ННЦМБ ДВО РАН), г. Владивосток, Россия

Проблема адаптации к кислородной недостаточности, ее роль в развитии заболеваний многие десятилетия изучается на моделях животных с разной устойчивостью к гипоксии. В данном обзоре обсуждаются данные литературы и результаты собственных исследований гормональных и медиаторных систем ЦНС, а также выяснение их роли в адаптивных физиологических и поведенческих реакциях у двусторчатых моллюсков. Анализ материалов по топографии серотонина (5-HT), ацетилхолина (ACh), оксида азота (NO) и FMRF-амид-содержащих нейронов в висцеральном ганглии и динамике их активности свидетельствует об участии нейротрансмиттеров и ферментов их синтеза в устойчивости и пластичности нервной системы морских гребешков при гипоксии.

**Ключевые слова:** нейротрансмиттеры, двусторчатые моллюски, стресс, гипоксия

Поступила в редакцию 15.02.2022. Получена после доработки 21.02.2022. Принята к печати 28.02.2022.

**Для цитирования:** Коцюба Е.П., Дячук В.А. Роль серотонина, ацетилхолина, оксида азота и FMRF-амида в адаптации морских гребешков к гипоксии. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2022;1: 36–45. doi: 10.34215/1609-1175-2022-1-36-45

**Для корреспонденции:** Коцюба Елена Пантелеймоновна – ст. научный сотрудник, Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (ННЦМБ ДВО РАН); (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17); ORCID: 0000-0003-0887-0257; e-mail: epkotsuba@mail.ru

## The role of serotonin, acetylcholine, nitric oxide and FMRF-amide in the adaptation of scallops to hypoxia

E.P. Kotsyuba, V.A. Dyachuk

A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

**Summary:** The problem of adaptation to oxygen deficiency and its role in the development of diseases have been studied for many decades on animal models having different level of resistance to hypoxia. This review discusses the literature data and the results of our own studies of hormonal and mediator systems of the central nervous system, as well as the clarification of their role in adaptive physiological and behavioral reactions in bivalves. The analysis of data on serotonin topography (5-HT), acetylcholine (ACh), nitric oxide (NO) and FMRF-amide-containing neurons in the visceral ganglion and the dynamics of their activity provides evidence of the participation of neurotransmitters and enzymes of their synthesis in the stability and plasticity of the nervous system of scallops suffering hypoxia.

**Keywords:** neurotransmitters, bivalves, stress, hypoxia

Received 15 February 2022; Revised 21 February 2022; Accepted 28 February 2022

**For citation:** Kotsyuba E.P., Dyachuk V.A. The role of serotonin, acetylcholine, nitric oxide and FMRF-amide in the adaptation of scallops to hypoxia. *Pacific Medical Journal*. 2022;1:36–45. doi: 10.34215/1609-1175-2022-1-36-45

**Corresponding author:** Elena P. Kotsyuba, A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences (17 Palchevsky str., Vladivostok, 690041, Russian Federation); ORCID: 0000-0003-0887-0257; e-mail: epkotsuba@mail.ru

Проблема адаптации к кислородной недостаточности, ее роль в развитии заболеваний многие десятилетия изучается на моделях животных с разной устойчивостью к гипоксии. Многие беспозвоночные, такие, как морские двусторчатые моллюски, в процессе эволюции приобрели способность адаптироваться к низкому содержанию кислорода [1] и могут выступать в качестве модельных объектов для изучения клеточных и молекулярных механизмов устойчивости ЦНС к гипоксии. Эффективным механизмом адаптации к стрессу, в том числе гипоксии у моллюсков, является нейроэндокринная стресс-реакция [2], которая вызывает перестройки физиологических функций и адаптивные изменения

поведения, обусловленные процессами, индуцированными стрессорами в нервных ганглиях.

Для решения проблемы устойчивости организма и его адаптации к гипоксии необходимы детальные исследования молекулярных и клеточных механизмов участия центральной нервной системы (ЦНС), в том числе ее гормональных и медиаторных систем, а также выяснение их роли в адаптивных физиологических и поведенческих реакциях у разных классов животных. Особое место в изучении нервной системы беспозвоночных занимают исследования, которые проводились под руководством профессора П.А. Мотавкина [3]. П.А. Мотавкиным и его учениками были получены

интересные результаты гистофизиологии нервной системы двустворчатых моллюсков и ее роли в регуляции размножения у промысловых видов моллюсков [4, 5, 6, 7, 8]. Были представлены данные об ультраструктуре нейронов, строении ганглиев и механизмах иннервации гонад. Особое внимание уделялось изучению NO-ергических структур в различных отделах центральной и периферической нервной системы и роли оксида азота у двустворчатых моллюсков [4, 5, 8, 9]. П.А. Мотавкин и его ученики исследовали взаимоотношения между нейронами, продуцирующими оксид азота и классические медиаторы в нервной системе позвоночных и беспозвоночных животных. Одновременно выяснялась роль NO в реакциях двустворчатых моллюсков на стрессовые факторы среды [10, 11, 12].

В настоящее время у беспозвоночных идентифицированы различные гормоны, нейротрансмиттеры, а также их рецепторы и ключевые ферменты их синтеза, которые имеют схожую молекулярную основу с позвоночными животными и участвуют в регуляции кислородного гомеостаза [13]. Молекулярные компоненты нейроэндокринной системы высоко консервативны у беспозвоночных и позвоночных животных [13]. Имеющиеся в литературе данные посвящены в основном исследованию механизмов устойчивости толерантных к гипоксии видов. Вместе с тем известно, что чувствительные к гипоксии виды по сравнению с толерантными, отличаются спецификой регуляции физиологических, метаболических процессов и поведенческих реакций [14, 15]. К таким видам относится гребешок *Azumapecten farreri* (Jones, Preston, 1904). Характерной особенностью этих моллюсков является способность при неблагоприятных условиях (аномальная температура, наличие хищников и, в том числе низкие концентрации кислорода в морской воде) к экстренной организации локомоторной реакции – «реакции избегания», которая обеспечивается сокращением аддукторного мускула. Иннервация аддукторного мускула у морских гребешков осуществляется нейритами висцерального ганглия. Его анатомическая организация у гребешка считается одной из самых сложных среди двустворчатых моллюсков и состоит из пяти основных долей: парных дорсо-центральных (передние), непарной вентроцентральной (задние) и парной латеральной доли, а также содержит два малых добавочных ганглия, которые располагаются между церебровисцеральной коннективой и жаберным нервом (аксессуарные ганглии) [16]. У двустворчатых моллюсков висцеральный ганглий является физиологическим центром [6], который участвует в регуляции дыхания и висцерокардиальных рефлексов, контролирует двигательное поведение и играет важную роль в метаболических процессах. Известно, что в регуляции всех этих процессов участвует несколько определенных нейротрансмиттеров и нейрогормонов. В настоящее время установлено, что при стрессовых воздействиях их уровень изменяется, однако до сих пор малоизвестно о наличии и распределении

синтезирующих их нейронов в нервных центрах двустворчатых моллюсков и их роли в стрессоустойчивости и пластичности. В данном обзоре представлены результаты собственных исследований и литературные данные по топографии серотонин (5-НТ), ацетилхолин (ACh), оксид азота (NO) и FMRF-амид-содержащих нейронов в висцеральном ганглии и динамике их синтеза в разных отделах ганглия при гипоксии. Освещены данные, и приведено обсуждение о возможном участии их в устойчивости морских гребешков к гипоксии.

#### Роль серотонина

В настоящее время наличие 5-НТ в ЦНС установлено у всех видов двустворчатых моллюсков с помощью фармакологических, биохимических и иммунохимических исследований [17, 18]. Методами иммуногистохимии и конфокальной микроскопии в физиологических условиях в висцеральном ганглии гребешков *A. farreri* 5-НТ выявляется в варикозных волокнах нейропиля, церебровисцеральных коннективах, в жаберных и мантийных нервах и в нейронах добавочных ганглиев (рис.1, а–в). Источником 5-НТ-позитивных волокон в нейропиле висцерального ганглия являются 5-НТ-позитивные нейроны церебральных ганглиев, волокна которых проходят через ганглий к жабрам, и заканчиваются там, по-видимому, на нескольких видах клеток [18]. В жаберных нервах 5-НТ идентифицирован у нескольких видов двустворчатых моллюсков, включая морских гребешков [17]. Имеются данные, что у моллюска *Mercenaria mercenaria* серотонинергические нейроны участвуют в иннервации жаберных мышц и ресничек [19], а также установлена роль серотонина в регуляции активности ресничек у нескольких видов двустворчатых моллюсков. Жаберные нервы моллюсков содержат 5-НТ и NO [19]. По нашим данным, 5-НТ- и uNOS-иммунопозитивные нервные волокна в нервах и нейропиле у *A. farreri* не соколизированы, но uNOS-lir нейроны в вентро-центральных долях находятся в непосредственной близости от 5-НТ-иммунопозитивных нервных волокон (рис. 1, в), что не исключает возможности взаимодействия 5-НТ- и NO-ергических медиаторных систем у моллюсков. В свете теории объемной нейротрансмиссии нейропиле является единым информационным пространством, интегративной системой, включающей гетерогенные волокна от разных нервных клеток. Известно, что нитроксидергическая сигнализация не ограничивается определенными синапсами. Поскольку фермент NO-синтаза присутствует во всем объеме тела и отростков нейрона, является регуляторным цитозольным ферментом [20], то NO может синтезироваться и выделяться из любого участка тела и отростков нейрона и оказывать влияние на соседние нервные элементы.

При экспериментальной гипоксии у *A. farreri* уровень 5-НТ иммунореактивности постепенно снижается в нейропиле по сравнению с интактными животными, оставаясь значимым только в нервах, отходящих от висцерального ганглия и в дополнительных ганглиях

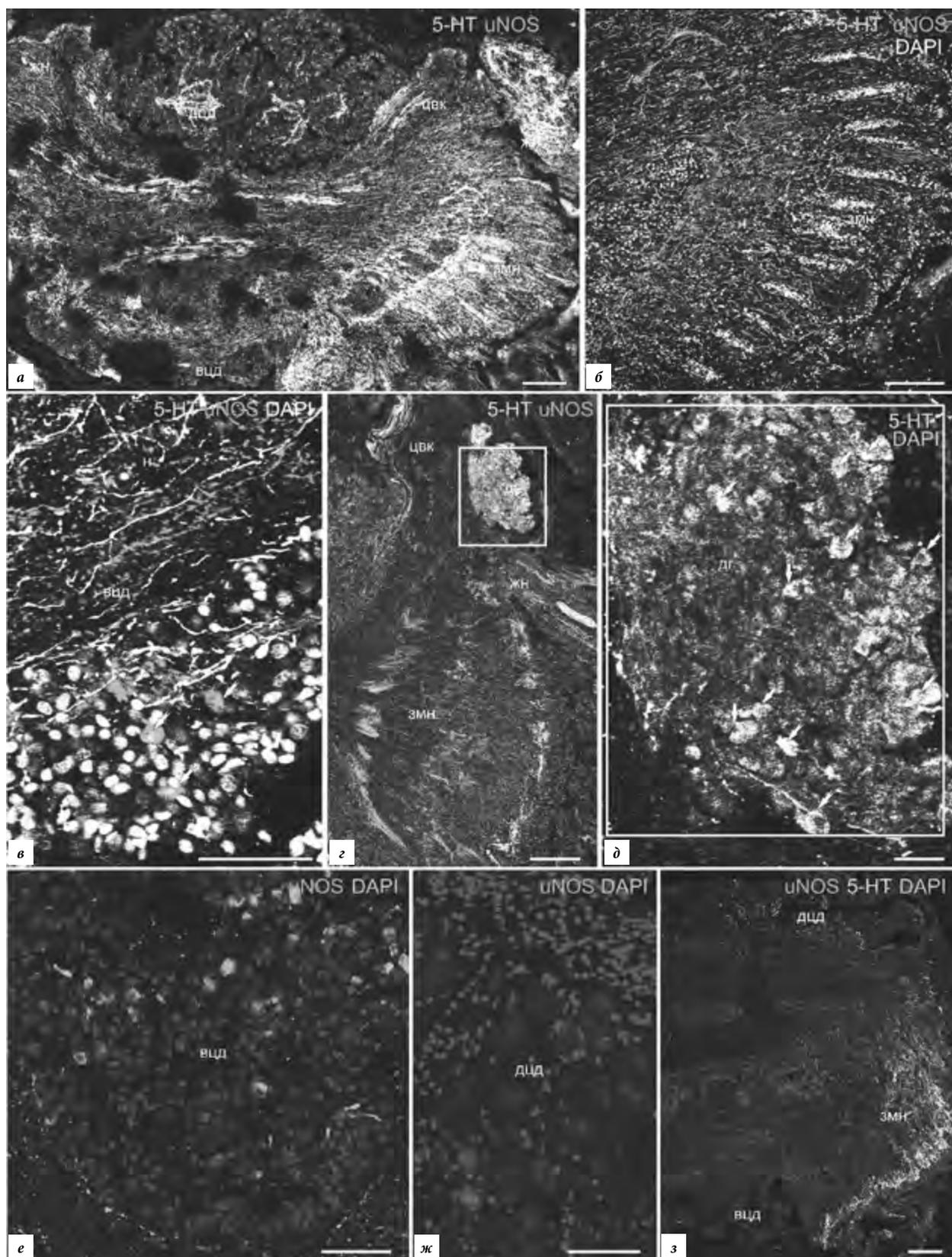


Рис. 1. Распределение 5-HT- и uNOS-иммунореактивности в висцеральном ганглии *A. fargesi* в контроле и при гипоксии: а, б, в – контроль, стрелками обозначены uNOS – иммунореактивные нейроны, г, д – гипоксия 1 ч, стрелками обозначены 5-HT- иммунореактивные нейроны, е, ж – гипоксия 6 ч, з – гипоксия 12 ч.

дцд – дорсо-центральная доля, вцд – вентроцентральная доля, лд – латеральная доля, н – нейропил, дг – добавочный ганглий, цвк – церебро-висцеральная коннектива, жн – жаберный нерв, змн – задние мантийные нервы. а – д, з – флуоресценция вторичных антител Alexa 488, е, ж – флуоресценция вторичных антител Alexa 555, в, д, е, ж, з – ядра клеток докрасены DAPI. Мультифотонная сканирующая лазерная микроскопия. Масштаб: 100 мкм.

(рис. 1, г, д). Количественный анализ флуоресцентной активности показал снижение концентрации серотонина после 6 ч гипоксии ( $1185,04 \pm 88,69$ ) по сравнению с контрольным значением ( $2644,83 \pm 254,60$ ), а после 12 ч гипоксии уровень 5-НТ-иммунореактивности в ганглии снижался ниже контрольного уровня ( $317,97 \pm 43,43$ ).

Снижение 5-НТ иммунореактивности в нейропиле висцерального ганглия и повышении иммунореактивности серотонина в мантийных и жаберных нервах при гипоксии, возможно, связано с увеличением активности аксонального транспорта 5-НТ в периферические органы и гемолимфу моллюсков. Экспериментально доказано, что концентрация 5-НТ значительно увеличилась в гемолимфе и мантии устриц *Crassostrea gigas* при содержании их в течение 1 сут. на воздухе [21]. Кроме того, показано, что после введения *C. gigas* экзогенного серотонина, скорость апоптоза гемоцитов при гипоксии у них значительно снижалась, а активность супероксиддисмутазы в гемолимфе значительно повышалась [21]. При этом выживаемость устриц на 4–6-й день после инъекции серотонина была выше. Полученные данные указывают на то, что серотонин может модулировать апоптотический эффект и окислительно-восстановительное состояние моллюсков для защиты их от гипоксии. Существенное снижение 5-НТ иммунореактивности в висцеральном ганглии *A. farreri* после 12 ч гипоксии свидетельствует о снижении функциональной активности 5-НТ системы у гребешка.

Увеличение 5-НТ-иммунопозитивности в жаберных нервах *A. farreri* после 6-часовой гипоксии может быть связано с участием 5-НТ в регуляции активности ресничек в жабрах двустворчатых моллюсков [19]. Увеличение частоты биения ресничек и сокращений сердца в сочетании с расширением сосудов, вызванных сокращением жаберных мышц, являются центральными механизмами, с помощью которых моллюски могут стабилизировать частоту дыхания при недостатке кислорода [22]. Данные нескольких экспериментальных исследований указывают на участие серотонина в механизмах адаптации к гипоксии у беспозвоночных животных [23]. Показано, что у инкапсулированных эмбрионов брюхоногого моллюска *Helisoma* определенные серотонинергические нейроны опосредуют индуцированное гипоксией увеличение двигательной активности ресничек, что вызывает быстрое вращение эмбрионов и более эффективную диффузию кислорода из-за усиленного перемешивания. У млекопитающих и человека серотонин также является важным медиатором гипоксических реакций в чувствительных к кислороду легочных нейроэпителиальных телах и в клетках I типа каротидных тел [24].

Повышение 5-НТ-иммунопозитивности в нейронах добавочных ганглиев при аноксии согласуется с результатами исследований, в которых установлено, что под действием факторов среды сенсорные клетки осфрадиев индуцируют активность нейросекреторных

клеток и аксональный транспорт серотонин-содержащего нейросекрета в гонады [25]. Известно, что у моллюсков серотонин участвует в регуляции репродуктивной функции [17] и служит индуктором нереста у двустворчатых моллюсков, в том числе у морских гребешков.

#### Роль оксида азота

Оксид азота (NO) является важной внутри- и внеклеточной сигнальной молекулой, и его роль в качестве физиологического посредника установлена во многих группах беспозвоночных и у млекопитающих [26]. Оксид азота синтезируется с помощью фермента NO-синтазы (NOS). У моллюсков NOS имеет большее сходство с nNOS (нейрональная форма) позвоночных по структуре, с nNOS и iNOS (индуцибельная форма) по биохимическим характеристикам и iNOS по иммунологическим особенностям [27], наиболее точным топомеханическим маркером считается универсальная NO-синтаза (uNOS).

В настоящее время оксид азота (NO) идентифицирован у брюхоногих, головоногих и двустворчатых моллюсков, включая и гребешков [26, 27]. Сравнительный морфологический анализ показал, что в висцеральном ганглии морских гребешков NO-позитивных нейронов значительно меньше, чем у изученных ранее гипоксия-толерантных видов митилид *Crenomytilus grayanus* и *Modiolus kurilensis* [5, 12].

В физиологических условиях у *A. farreri* uNOS иммунореактивность выявляется только в небольшой популяции нейронов в вентроцентральных долях, в волокнах нейропиля висцерального ганглия, в церебровисцеральных коннективах и у выхода жаберных, мантийных и осфрадиальных нервов (рис. 1, а, в, г).

Наши результаты показали, что экспрессия uNOS увеличивается в ответ на 1 ч гипоксии в нейронах вентро- и дорсо-центральной долей и нервных волокнах, особенно у выхода мантийных и жаберных нервов (рис. 1, г, е, ж), но после 3 ч гипоксии количество uNOS-иммунопозитивных клеток и волокон в вентро- и дорсо-центральных долях и в нервных волокнах уменьшалось. Количественный анализ показал, что пик числа uNOS-позитивных клеток приходится на 1 ч гипоксии ( $46,66 \pm 2,20$  клеток), а через 6 ч гипоксии падает ( $2,11 \pm 0,63$  клетки) в сравнении с контролем ( $11,88 \pm 0,84$  клеток). Таким образом, экспериментальная гипоксия у морского гребешка вызывает увеличение количества uNOS-иммунопозитивных клеток, которое достигает своего максимума в течение часа, тогда как дальнейшее воздействие приводит к уменьшению количества и полному отсутствию uNOS-иммунопозитивных клеток в висцеральном ганглии после 12 ч гипоксии (рис. 1, з).

В последние десятилетия все большее число сообщений свидетельствует о том, что оксид азота участвует в реакциях на стресс как у позвоночных, так и у беспозвоночных животных [28]. Активация NO-ергической системы представляет собой универсальное следствие воздействия на организм

разнообразных экстремальных агентов и лежит в основе устойчивости и адаптационных возможностей организмов к различным факторам среды [28, 12]. Вместе с тем недавние исследования на моллюсках выдвигают на первый план основную функцию NO – улучшение перфузии тканей при гипоксии [22, 29], что является механизмом толерантности к дефициту кислорода в окружающей среде.

Как известно в настоящее время, увеличение продукции оксида азота может быть связано либо с развитием компенсаторных механизмов, направленных на поддержание аэробных процессов, либо с переключением на анаэробные пути метаболизма [14]. Согласно последним исследованиям, NO играет ключевую роль в процессе снижения скорости метаболизма у некоторых видов беспозвоночных и переходе их в состояние анабиоза (например, гибернацию) или при воздействии гипоксических или аноксических условий окружающей среды (например, в приливных и сублиторальных местообитаниях) [22]. Известно, что гипоксия индуцирует экспрессию оксида азота в NO-ергических нейронах устойчивых к гипоксии митилид, где NO участвует в торможении митохондриальной дыхательной цепи и переключении нейронов с аэробного дыхания на гликолиз при снижении концентрации внутриклеточного кислорода, что сводит к минимуму производство активных форм кислорода в клетке [29, 30]. Эти данные подтверждены экспериментальными исследованиями молекулярных механизмов устойчивости к гипоксии у митилид [14, 30] и *Arctica islandica* [29]. По нашим данным, у *A. farreri*, в отличие от митилид, uNOS в висцеральном ганглии незначительно увеличивается при гипоксии. Этот факт контрастирует с высокой NO-ергической активностью в ганглиях [12], мышечных клетках и гемолимфатических сосудах жаберных лепестков митилид как в контрольных условиях, так и при воздействии гипоксии [22]. Значительные различия в экспрессии NO между этими видами двустворчатых моллюсков могут быть связаны с их разными стратегиями экологической адаптации и образом жизни. В приливной зоне мидии подвергаются гипоксии и аноксии во время отлива, что требует быстрой метаболической адаптации при закрытии раковины [29]. У *M. edulis* зависимость от  $pO_2$  генерация NO является ключевым механизмом, позволяющим противостоять быстрым колебаниям  $O_2$  в окружающей среде [22]. Активные гребешки, в отличие от малоподвижных видов моллюсков, менее приспособлены к гипоксии. Тем не менее они способны к «реакции избегания». Сравнительные исследования дыхательного метаболизма и активности окислительных ферментов у двустворчатых моллюсков свидетельствуют, что, в отличие от *Mytilus sp.*, которые характеризуются постепенным снижением метаболизма и переходом на анаэробные пути, у *P. maximus* в начальный период гипоксии отмечено ускорение процессов вентиляции мантийной полости, увеличение частоты дыхания и сердечных сокращений, что приводит к усилению

циркуляции гемолимфы для поддержания аэробного метаболизма [31].

По сравнению с *P. maximus* гребешок *A. farreri* проявляет меньшую способность регуляции дыхания [32]. Даже в случае наиболее сильного воздействия гипоксии частота сердечных сокращений у морских гребешков *A. farreri* была лишь незначительно снижена. По данным Ли и соавторов [32], у морских гребешков сильно активируется лактатдегидрогеназа при уменьшении содержания кислорода, что может привести к избыточному накоплению лактата и, возможно, к гибели этих моллюсков в условиях гипоксии. Таким образом, индуцированное гипоксией у *A. farreri* незначительное увеличение uNOS-ергической активности в некоторых нейронах висцерального ганглия, жаберных, осфрадиальных и мантийных нервах, вероятно, отражает их роль в регуляции газообмена, осморегуляции и активации компенсаторных реакций при кратковременной гипоксии.

#### Роль ацетилхолина

Ацетилхолин (ACh) – один из наиболее важных нейротрансмиттеров у моллюсков. Несмотря на то, что иммуногистохимическая локализация ацетилхолин-синтезирующих нейронов мало изучена у двустворчатых моллюсков, многие показатели нейротрансмиссии ACh, характерные для позвоночных, были также обнаружены у моллюсков. Биохимические и гистохимические исследования продемонстрировали наличие фермента, синтезирующего ацетилхолин – холинацетилтрансферазу (ChAT) и разлагающего его фермента – ацетилхолинэстеразу (AChE) у разных таксономических групп моллюсков [33]. В физиологических условиях в висцеральном ганглии гребешков *A. farreri* идентифицированы немногочисленные крупные ChAT-иммунопозитивные нейроны в центральной части дорсо-центральных долей (рис. 2, а), где располагаются тела мотонейронов, иннервирующие аддуктор [34]. В вентро-центральных долях ChAT-иммунопозитивные нейроны образуют небольшие группы (рис. 2, а, б, в). Участие ацетилхолина в регуляции мышечных сокращений установлено у брюхоногих моллюсков [35]. А также холинергические мотонейроны идентифицированы у крылоногих моллюсков и осьминога [36]. Мотонейроны брюхоногих моллюсков могут быть вовлечены в центральные звенья сразу нескольких рефлексов и выполнять несколько функций.

Хотя ферменты, участвующие в метаболизме ACh, ChAT и AChE, не зависят от кислорода, известно, что у млекопитающих ишемия и гипоксия могут ухудшить холинергические функции либо за счет уменьшения доступности ацетил-коэнзима а либо путем ингибирования энергозависимого поглощения холина (Ch) [37].

При экспериментальной гипоксии наблюдается зависимость уровня ChAT-иммунореактивности в различных отделах висцерального ганглия от времени воздействия гипоксии. Количественная оценка ChAT-иммунопозитивных нейронов свидетельствовала об

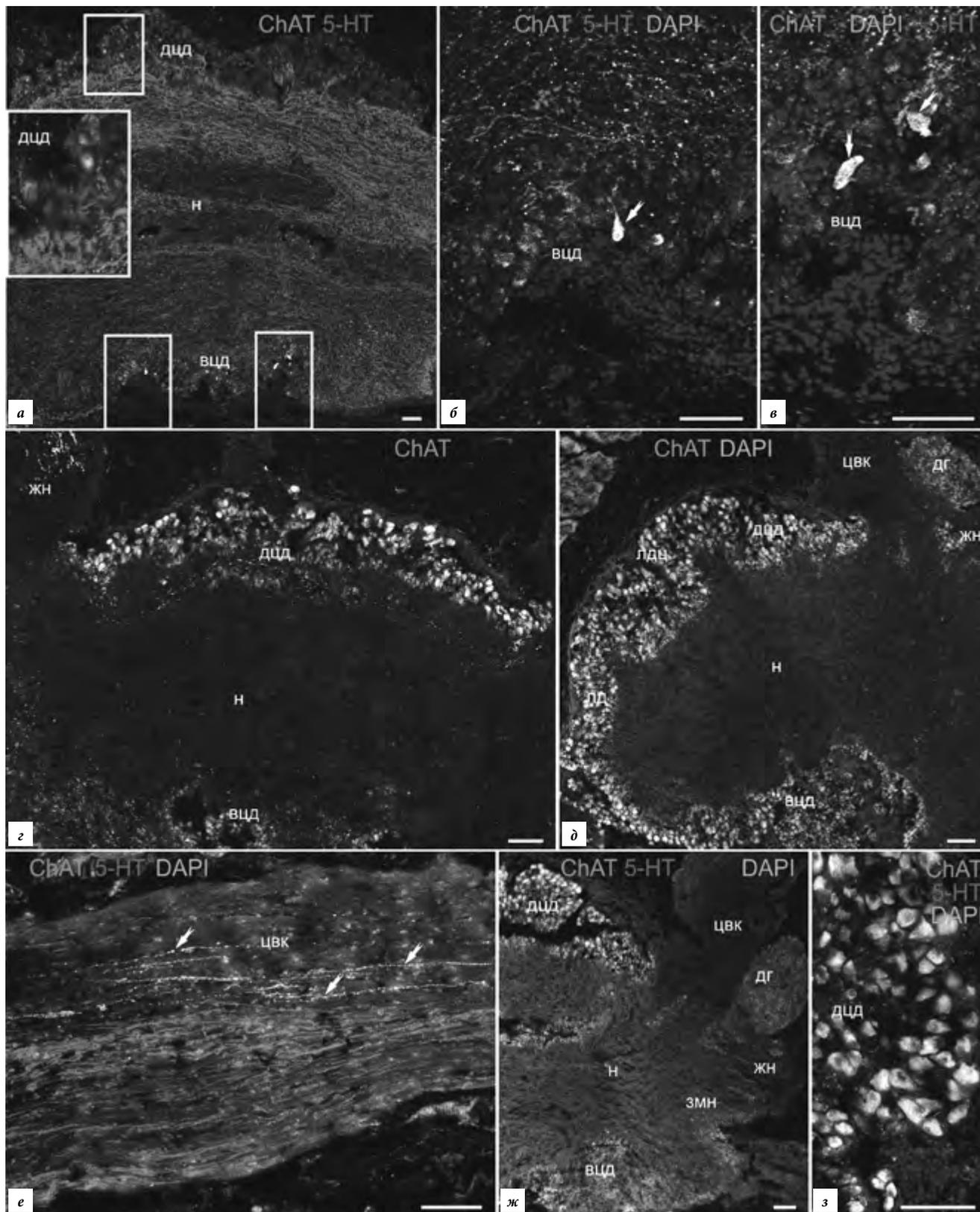


Рис. 2. Распределение 5-НТ- и ChAT-иммунореактивности в висцеральной ганглии *A. fargesi* в контроле и при гипоксии: а, б, в – контроль, стрелками обозначены ChAT-иммунореактивные нейроны, г – гипоксия 1 ч, д – з – гипоксия 6 ч, стрелками обозначены 5-НТ – иммунореактивные волокна, и – гипоксия 6 ч. дцд – дорсо-центральная доля, ицдд – центральная часть дорсо-центральной доли, лдд – латеральная часть дорсо-центральной доли, вцд – вентроцентральная доля, лд – латеральная доля, н – нейропил, дг – добавочный ганглий, цвк – церебро-висцеральная коннектива, жн – жаберный нерв, змн – задние мантийные нервы. а – з – флуоресценция вторичных антител Alexa 488; а – в, е – з – флуоресценция вторичных антител Alexa 555; б, в, е, ж, з – ядра клеток докрашены DAPI. Мультифотонная сканирующая лазерная микроскопия. Масштаб 100 мкм.

увеличении доли нейронов во всех отделах висцерального ганглия через 1 ч воздействия гипоксии ( $11,66 \pm 0,56\%$ ) и еще большем возрастании через 12 ч ( $50,30 \pm 2,21\%$ ) по сравнению с небольшим количеством нейронов в контроле ( $2,52 \pm 0,22\%$ ). При 1 ч гипоксии ChAT-иммунореактивность значительно увеличивается в центральной части дорсо-центральных долей (рис. 2, г), что предполагает участие ACh в регуляции сокращений аддуктора у *A. farreri*. После 6 ч гипоксии экспрессия ChAT обнаружена в латеральной части дорсо-центральной доли висцерального ганглия (рис. 2, д), где расположены мотонейроны, контролирующие координированные движения края мантии [34]. Кроме того, маркировались многочисленные нейроны в вентро-центральных и латеральных долях и добавочных ганглиях и нервные волокна (рис. 2, д–з). Функция ChAT-позитивных нейронов вентро-центральных долей у *A. farreri* остается неизвестной. Латеральные доли традиционно считаются функционально оптическими долями. Ранее сообщалось, что они участвуют в обработке сенсорной информации от глаз, расположенных по краю мантии [38]. При исследовании оптических долей раков самые высокие концентрации ACh были обнаружены в зрительных интернейронах [39]. Двойное иммуномечение показало, что в висцеральном ганглии гребешка экспериментальная гипоксия приводила к увеличению ChAT-иммунореактивных нейронов и уменьшению 5-НТ-иммунореактивности в нервных волокнах, кроме периферических (рис. 2, а–д, ж, з). В церебровисцеральных коннективах ChAT- и 5-НТ-иммунопозитивные волокна не сококализованы, а располагаются параллельно друг другу (рис. 2, е).

При гипоксии ChAT экспрессируется в добавочных ганглиях, эти ганглии участвуют в иннервации половых желез у моллюсков. Ранее рецепторы к ацетилхолину были идентифицированы в половых железах гребешка *Pecten maximus*, и было установлено, что ACh может участвовать в развитии гонад у гребешка [33]. Исследования рецепторов к ACh в жабрах гребешка показали, что ацетилхолин принимает участие в регуляции моторной активности ресничек в жаберных пластинках [33]. Имеются материалы, которые свидетельствуют, что ацетилхолин может быть как положительным, так и отрицательным модулятором активности ресничек в жабрах, причем этот эффект зависит от его концентрации. ChAT также был идентифицирован в осфрадальных нервах, иннервирующих осфрадии, которые участвуют в контроле качества воды и реагируют на изменение солёности, осмотического давления, гипоксию и различные химические вещества. Механизмы активации ChAT и ее функциональная роль в ганглиях моллюсков изучены недостаточно. Активность ацетилхолинэстеразы (AChE) в периферических органах и тканях двусторчатых моллюсков давно используется в качестве чувствительного биомаркера для мониторинга морской среды при антропогенном загрязнении [40]. В частности,

у двусторчатых моллюсков, подвергшихся воздействию пестицидов, тяжелых металлов и других поллютантов, было обнаружено значительное снижение активности и экспрессии AChE в таких органах, как аддукторная мышца, мантия, жабры, гепатопанкреас, почки и гонады [40]. При таких воздействиях ингибирование активности AChE вызывает накопление ацетилхолина в синапсах, что приводит к значительным физиологическим нарушениям, связанным с питанием и фильтрацией [41]. Не исключено, что повышение ChAT-иммунореактивности в висцеральном ганглии *A. farreri* при 12 ч гипоксии связано с кратковременным повышением холина (Ch).

Известно, что у позвоночных животных 10-минутная полная ишемия (двусторонняя окклюзия сонной артерии) может вызывать накопление холина в нервных клетках [42]. В холинергических нейронах фосфолипиды, содержащие холин, представляют собой крупный источник Ch, который потенциально может быть использован для синтеза ацетилхолина. Сравнительно недавно установлено, что холин защищает мозг млекопитающих от ишемического инсульта [43]. Кроме того, в экспериментах показано, что у трансгенных мышей с высоким уровнем ChAT в кардиомиоцитах уровень экспрессии ацетилхолина при ишемии выше, чем у мышей дикого типа. Также было установлено, что высокий уровень ACh влияет на энергетический обмен в кардиомиоцитах и является ключевым механизмом защиты от ишемии [44].

#### Роль FMRF-амида

FMRF-амид-подобные пептиды (FMRF-амид) идентифицированы у всех основных типов животных, от кишечнополостных до млекопитающих [45]. К настоящему времени установлено, что они участвуют у моллюсков в регуляции сердечно-сосудистой системы, модуляции мышечного сокращения, контроле двигательной активности и в регуляции водного баланса [46]. У морских гребешков распределение FMRF-амида в нейронах во всех долях висцерального ганглия, в добавочных ганглиях и нервах (рис. 3, а, б, в) отражает их роль в регуляции физиологических функций. Присутствие FMRF-амида в мотонейронах дорсо-центральных долей свидетельствует об участии FMRF-амида в регуляции мышечных сокращений. В ряде исследований показано присутствие FMRF-амида в нервно-мышечных соединениях и аддукторных мышцах моллюсков [47]. Кроме того, известно, что FMRF-амид играет также кардиорегуляторную роль у двусторчатых моллюсков [47]. В физиологических условиях у гребешка *A. farreri* FMRF-амид-иммунореактивность зарегистрирована в латеральных долях висцерального ганглия (рис. 3, б, в), которые, как сообщалось ранее, участвуют в обработке зрительной информации от глаз, расположенных по краю мантии [38]. Было установлено, что FMRF-амид присутствует в оптической доле кальмара *Loligo pealei*, а также в нескольких центрах ЦНС у *Octopus vulgaris*, где он вносит

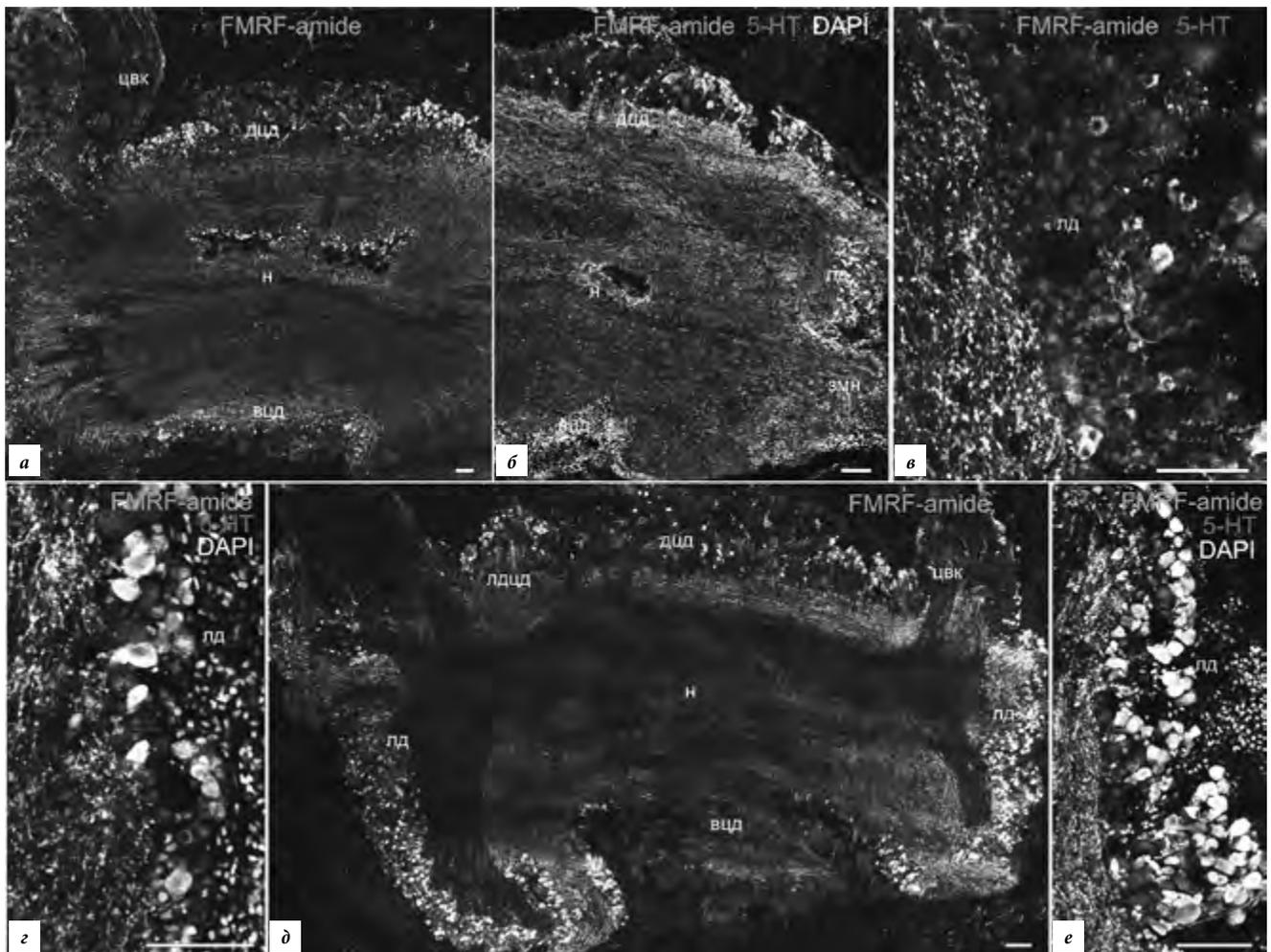


Рис. 3. Распределение 5-HT- и FMRFамид-иммунореактивности в висцеральном ганглии *A. farreri* в контроле и при гипоксии: а, б – контроль, в – гипоксия 1 ч, д, е – гипоксия 12 ч.

дцд – дорсо-центральная доля, ицвк – центральная часть дорсо-центральной доли, лдцд – латеральная часть дорсо-центральной доли, вцд – вентроцентральная доля, лд – латеральная доля, н – нейротиль, дг – добавочный ганглий, цвк – церебро-висцеральная коннектива, жн – жаберный нерв, змн – задние мантийные нервы. а – е – флуоресценция вторичных антител Alexa 488; б, в, г, д, е – флуоресценция вторичных антител Alexa 555, б, г, е – ядра клеток докрашены DAPI. Мультифотонная сканирующая лазерная микроскопия. Масштаб 100 мкм.

свой вклад в обработку обонятельных, химических и зрительных сигналов. Стимуляция изолированной сетчатки глаз *O. vulgaris* показала, что FMRF-амид в сочетании с дофамином индуцирует экстремальную световую адаптацию сетчатки при освещении [48]. В зрительном нерве морского брюхоногого моллюска *Bulla goldiana* некоторые эфферентные волокна также содержат FMRF-амид.

FMRF-амид-иммунореактивные волокна идентифицированы в жаберных нервах и жабрах у нескольких видов моллюсков, как взрослых, так и личинок. В этих органах FMRF-амид оказывает стимулирующее и ингибирующее действие на частоту биений ресничек [23], что указывает на участие FMRF-амида в регуляции дыхания. Высокая активность FMRF-амида регистрировалась в осфрадиальных нервах, иннервирующих осфрадии. Имеются свидетельства того, что FMRF-амид, оказывает антидиуретическое действие и участвует в осморегуляции [49]. В экспериментах показано, что в различных осмотических

условиях уровень FMRF-амида в ЦНС, гемолимфе и почках у моллюска *Melampus bidentatus* варьировал: в гиперосмотических условиях он был выше, чем в гипоосмотических [49]. Также установлено, что уровень FMRF-амида возрастал в ЦНС, гемолимфе и почках при увеличении потери воды.

При экспериментальной гипоксии у *A. farreri* количество FMRF-амид-положительных клеток оценить сложно, так как пептид экспрессируется в большом количестве нейронов во всех отделах висцерального ганглия как при 1 ч, так и при 12 ч гипоксии (рис. 3, г-е). Количественная оценка (процента иммуно-положительных клеток по отношению к общему числу клеток в ганглии) показала, что число FMRF-амид-положительных нейронов увеличилось в дорсо-центральных долях при 1 ч гипоксии, а в латеральных и центральных отделах при 12 ч аноксии (контроль  $32,94 \pm 1,97\%$ ; 1 ч аноксии  $45,99 \pm 1,87\%$ ; 12 ч воздействия аноксии,  $42,62 \pm 1,97\%$ ). Известно, что при стрессовых воздействиях уровень FMRF-амида увеличивается

у беспозвоночных [49]. Однако в настоящее время нам известна одна работа об участии FMRF-амида в адаптации к гипоксии у ракообразных [50], где показаны динамические изменения содержания этих нейропептидов у краба *Callinectes sapidus*, при различной степени тяжести гипоксии.

Приведенные материалы свидетельствуют, что гипоксия у морских гребешков *A. farreri* вызывает изменения экспрессии нейротрансмиттеров (пептида FMRF-амида и моноамина 5-НТ) и ферментов (ChAT и uNOS), участвующих в синтезе ацетилхолина и NO в висцеральном ганглии. По нашим данным, локализация и уровень синтеза тестируемых нейромолекул, а также количество экспрессирующих эти молекулы клеток в ЦНС морского гребешка в условиях аноксии меняются, что указывает на их возможное участие в механизмах устойчивости к гипоксии. Обнаруженные эффекты снижения уровня 5-НТ и uNOS иммунореактивности и увеличения числа ChAT-позитивных клеток после 12 ч гипоксии могут быть связаны с высвобождением, деградацией и/или накоплением этих ферментов, что позволяет предположить различные физиологические роли, которые они играют у моллюсков в стрессовых условиях. Таким образом, увеличение количества ChAT-позитивных нейронов в висцеральном ганглии можно объяснить кратковременным повышением в них холина, что свидетельствует о важной роли холинергической системы ЦНС в ответе на гипоксию. Особого внимания заслуживают вариации количества 5-НТ, ChAT, uNOS и FMRF-амида в некоторых нейронах висцерального ганглия, брахиальных, осфрадиальных и мантийных нервах, что, вероятно, отражает их ключевую роль в регуляции газообмена, кардиорегуляции, осморегуляции и активации компенсаторных реакций у морских гребешков при кратковременной гипоксии.

**Конфликт интересов:** авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Источник финансирования:** работа выполнена за счет средств Российского научного фонда (Грант № 21-74-30004).

#### Литература / References

- Spicer J.I. What can an ecophysiological approach tell us about the physiological responses of marine invertebrates to hypoxia? *J. Exp. Biol.* 2014;217:46–56.
- Lacoste A., Jalabert F., Malham S. K., Cuffe A., Poulet, S.A. Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67:2304–2309.
- Черток В.М., Реутов В.П., Охотин В.Е. Павел Александрович Мотавкин – человек, педагог, ученый. *Тихоокеанский мед. журнал.* 2012;3:7–8. [Chertok V.M., Reutov V.P., Okhotin V.E. Pavel Alexandrovich Motavkin - a person, pedagogue, researcher. *Pacific Medical Journal.* 2012;(2):7–8. (In Russ).]
- Анникова Л.В., Пименова Е.А., Дюйзен И.В., Вараксин А.А. Локализация NO-ергических элементов в центральной нервной системе двустворчатого моллюска *Crenomytilus grayanus*// *Ж. эвол. биохим. физиол.* 2000; 36(5):452–457. [Annikova L.V., Pimenova E.A., Dyuzhen I.V., Varaksin A.A. Localization of NO-ergic elements in the central nervous system of the bivalve mollusk *Crenomytilus grayanus*. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2000;36:588–594. (in Russ).]
- Дюйзен И.В., Анникова Л.В., Мотавкин П.А. Локализация NO-синтазы в центральной нервной системе двустворчатых моллюсков *Mizuhopecten yessoensis* и *Modiolus kurilensis*. *Биол. моря.* 1999;25(3):243–245. [Dyuzhen, I.V.; Annikova, L.V.; Motavkin, P.A. NO-synthase localization in the central nervous system of the bivalve mollusks *Mizuhopecten yessoensis* and *Modiolus kurilensis*. *Russ. J. Mar. Biol.* 1999;25:277–279. (in Russ).]
- Мотавкин П.А., Вараксин А.А. *Гистофизиология нервной системы и регуляция размножения у двустворчатых моллюсков.* М.: Наука. 1983. 208 с. [Motavkin P.A., Varaksin A.A. *Histophysiology of the nervous system and regulation of reproduction in bivalves.* М.: Nauka. 1983. 208 p. (in Russ).]
- Мотавкин П.А., Хотимченко Ю.С., Деридович И.И. *Регуляция размножения и биотехнология получения половых клеток у двустворчатых моллюсков.* М.: Наука, 1990. 217 с. [Motavkin P.A., Khotimchenko Yu.S., Deridovich I.I. *Regulation of reproduction and biotechnology for obtaining germ cells in bivalve molluscs.* М.: Nauka. 1990. 217 p. (in Russ).]
- Annikova L.V., Dyuzhen I.V., Paltseva Y.N. Putative nitric oxide synthase containing nervous elements in male and female gonads of some marine bivalve mollusks revealed by NADPH-diaphorase histochemistry. *Invertebr. Reprod. Dev.* 2001;40:69–77.
- Пименова Е.А., Вараксин А.А. Локализация NO-ергических элементов в ротовых лопастях, губах и пищеводе двустворчатого моллюска *Crenomytilus grayanus*. *Ж. эвол. биохим. физиол.* 2003;39(5):476–481. [Pimenova E.A., Varaksin A.A. Localization of NO-ergic elements in the oral lobes, lips and esophagus of the bivalve mollusk *Crenomytilus grayanus* // *J. Evol. biochem. physiol.* 2003;39(5):476–481. (in Russ).]
- Коцюба Е.П. Влияние повышенной температуры и гипоксии на активность NO в центральной нервной системе двустворчатых моллюсков. *Ж. эвол. биохим. физиол.* 2008; 44(2):200–208. [Kotsyuba E.P. Effect of elevated temperature and of hypoxia on NO activity in the central nervous system of bivalve molluscs. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2008;44:237–246. (in Russ).]
- Коцюба Е.П. Влияние температурного стресса на активность NO-синтазы и тирозингидроксилазы в центральной нервной системе двустворчатых моллюсков. *Ж. эвол. биохим. физиол.* 2009;45(1):122–129. [Kotsyuba E.P. Influence of temperature stress on the activity of NO-synthase and tyrosine hydroxylase in the central nervous system of bivalves. *J. Evol. biochem. physiol.* 2009;45(1):122–129. (in Russ).]
- Vaschenko M.A., Kotsyuba E.P. NADPH-diaphorase activity in the central nervous system of the Gray mussel *Crenomytilus grayanus* (Dunker) under stress conditions: a histochemical study. *Mar. Environ. Res.* 2008;66:249–258.
- Wang L., Song X., Song L. The oyster immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 2018; 80:99–118.
- Larade K., Storey K.B. A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrates. Cell and molecular response to stress 3: sensing, signaling and cell adaptation. Elsevier. Amsterdam, 2002. pp 27–46.
- Wu R.S.S. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses *Mar. Pollut. Bull.* 2002;45:35–45.
- Dakin W.G. The visceral ganglion of *Pecten*, with some notes on the physiology of the nervous system, and an inquiry into the innervation of the osphradium in Lamellibranchia. *Mitt.Zool. Stn.Neapel.* 1910;20:1–40.
- Alavi S.M.H., Nagasawa K., Takahashi K.G., Osada M. 'Structure-Function of Serotonin in Bivalve Molluscs. In Serotonin - A Chemical Messenger Between All Types of Living Cells. InTech: London, UK, 2017; doi:10.5772/intechopen.69165.
- Stefano G.B., Aiello E. Histochemical localization of serotonin and dopamine in the nervous system and gill of *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Biol. Bull.* 1975; 148:141–156.

19. Gainey L.F.J., Walton J.C., Greenberg M.J. Branchial musculature of a venerid clam: pharmacology, distribution, and innervations. *Biol. Bull.* 2003; 204:81–95.
20. Bredt D.S. Molecular characterization of nitric oxide synthase. In: Nitric oxide in the nervous system. London: Acad. Press, 1995; p.1–19.
21. Dong W., Liu Z., Qiu L., Wang W., Song X., Wang X., Li Y., Xin L., Wang L., Song L. The modulation role of serotonin in Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to air exposure. *Fish Shell. fish Immunol.* 2017; 62:341–348.
22. Gonzarlez P.M., Rocchetta I., Abele D., Rivera-Ingraham G.A. Hypoxically induced nitric oxide: potential role as a vasodilator in *Mytilus edulis* gills. *Front. Physiol.* 2019; 10:1–17.
23. Goldberg J.I., Rich D.R., Muruganathan S.P., Liu M.B., Pon J.R., Tam R., Diefenbach T.J., Kuang S. Identification and evolutionary implications of neurotransmitter–ciliary interactions underlying the behavioral response to hypoxia in *Lymnaea stagnalis* embryos. *J. Exp. Biol.* 2011; 214:2660–2670.
24. Fu X. W., Nurse C. A., Wong V., Cutz E. Hypoxia-induced secretion of serotonin from intact pulmonary neuroepithelial bodies in neonatal rabbit. *J. Physiol.* 2002; 539:503–510.
25. Beninger P.G., Donval A., Le Pennec M. The osphradium in *Placopecten magellanicus* and *Pecten maximus* (Bivalvia, Pectinidae): histology, ultrastructure, and implications for spawning synchronization. *Mar. Biol.* 1995; 123:121–129.
26. Palumbo A. Nitric oxide in marine invertebrates: a comparative perspective. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 2005; 142:241–248.
27. Jiang, Q., Zhou, Z., Wang, L. Yue F., Wang J., Song L. A scallop nitric oxide synthase (NOS) with structure similar to neuronal NOS and its involvement in the immune defense // *PLoS One.* 2013; 8: e 869158.
28. Smith K.L., Galloway T.S., Depledge M.H. Neuro-endocrine biomarkers of population-induced stress in marine invertebrates. *Sci. Total Environ.* 2000; 262:185–190.
29. Strahl J., Abele D. Nitric oxide mediates metabolic functions in the bivalve *Arctica islandica* under hypoxia. *PLoS One.* 2020; 15: e0232360.
30. Letendre J., Le Boulenger F., Durand F. Oxidative challenge and redox sensing in mollusks: effects of natural and anthropic stressors. Oxidative stress in vertebrates and invertebrates: molecular aspects of cell signaling. Chpt. 26. New York: Wiley-Blackwell, 2012. p.361–376.
31. Artigaud S., Lacroix C., Pichereau V., Flye-Sainte-Marie J. Respiratory response to combined heat and hypoxia in the marine bivalves *Pecten maximus* and *Mytilus* spp. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2014; 175:135–140.
32. Li Q., Zhang F., Wang M., Li M., Sun S. Effects of hypoxia on survival, behavior, and metabolism of Zhikong scallop *Chlamys farreri* Jones et Preston 1904. *J. Ocean. Limnol.* 2020; 38: 351–363.
33. Shi X., Zhou Z., Wang L., Yue F., Wang M., Yang C., Song L. The immunomodulation of acetylcholinesterase in zhikong scallop *Chlamys farreri*. *PLoS One.* 2012; 7: e30828.
34. P.J. The sensitivity and control of the scallop mantle edge. *J. Exp. Biol.* 1978; 75:205–221.
35. Kiss T., Krajcs N., Pirger Z., Hernádi L. Nicotinic acetylcholine receptors containing the  $\alpha 7$ -like subunit mediate contractions of muscles responsible for space positioning of the snail, *Helix pomatia* L. tentacle. *PLoS One.* 2014; 9:e109538.
36. Sakaue Y., Bellier J.P., Kimura S., D'Este L., Takeuchi Y., Kimura H. Immunohistochemical localization of two types of choline acetyltransferase in neurons and sensory cells of the octopus arm. *Brain Struct. Funct.* 2014; 219:323–341.
37. Simon J.R., Kuhar M.J. High-affinity choline uptake: ionic and energy requirements. *J. Neurochem.* 1976; 27:1355–1374.
38. Kingston A.C.N., Chappell D.R., Miller H.V., Lee S.J., Speiser D.I. Expression of G proteins in the eyes and parietovisceral ganglion of the bay scallop *Argopecten irradians*. *Biol. Bull.* 2017; 233:83–95.
39. Wang-Bennett L.T., Glantz R.M. Immunocytochemical visualization of acetylcholine and glutamate in the brain and eyestalk of crayfish. *Sot. Neurosci. Abstr.* 1986; 12:243.
40. Lionetto M.G., Caricato R., Giordano M.E., Pascariello M.F., Marinosci L., Schettino T. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Mar. Pollut. Bull.* 2003; 46:324–330.
41. Ravaschiere A., Cutler C., Edleson K., Halem Z., Magun H., Meckler F., Cox R. Quantification of heat shock protein 70 and acetylcholinesterase over a time course suggests environmental adaptation in a foundational molluscan species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2017; 142:222–229.
42. Beley A., Bertrand N., Beley P. Cerebral ischemia: Changes in brain choline, acetylcholine, and other monoamines as related to energy metabolism. *Neurochem. Res.* 1991; 16:555–561.
43. Jin X., Wang R.H., Wang H., Long C.L., Wang H. Brain protection against ischemic stroke using choline as a new molecular bypass treatment. *Acta Pharmacol. Sin.* 2015; 36:1416–1425.
44. Kakinuma Y., Tsuda M., Okazaki K., Akiyama T., Arikawa M., Noguchi T., Sato T. Heart-specific over expression of choline acetyltransferase gene protects murine heart against ischemia through hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ -related defense mechanisms. *J. Am. Heart. Assoc.* 2013; 2: e004887.
45. Krajniak K.G. Invertebrate FMRFamide related peptides. *Protein Pept. Lett.* 2013; 20: 647–670.
46. Zatylny-Gaudin C, Favrel P. Diversity of the RFamide peptide family in mollusks. *Front. Endocrinol.* 2014; 5:178. doi:10.3389/fendo.2014.00178.
47. Lopez-Vera E., Aguilar M.B., Cotera E.P.H. FMRFamide and related peptides in the phylum *Mollusca*. *Peptides.* 2008; 29: 310–317.
48. Di Cosmo A., Di Cristo C. Neuropeptidergic control of the optic gland of *Octopus vulgaris*: FMRF-amide and GnRH immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.* 1998; 398:1–12.
49. Khan H.R., Price D.A., Doble K.E., Greenberg M.J., Saleuddin A.S.M. Osmoregulation and FMRFamide-related peptides in the salt marsh snail *Melampus bidentatus* (Say) (Mollusca: Pulmonata). *Biol. Bull.* 1999; 196:153–162.
50. Buchberger A.R., DeLaney K., Liu Y., Vu N.Q., Helfenbein K., Li L. Mass spectrometric profiling of neuropeptides in *Calinectes sapidus* during hypoxia stress // *ACS Chem. Neurosci.* 2020; 11:3097–3106.