

УДК 591.48:591.88:574.23

ТОПОГРАФИЯ NO-СИНТАЗЫ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ В НОРМЕ И ПРИ ДЕЙСТВИИ СТРЕСС-ФАКТОРОВ

М.А. Ващенко, Е.П. Коцюба

Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17)

Ключевые слова: оксид азота, нейроны, цитосомы, антропогенное загрязнение.

TOPOGRAPHY OF NO-SYNTASE IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF BIVALVE MOLLUSCS UNDER NORMAL AND STRESS CONDITIONS

M.A. Vaschenko, E.P. Kotsyuba

A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences (17 Palchevsky St. Vladivostok 690041 Russian Federation)

Summary. This brief review article summarizes the results of the studies of the nitric oxide component of the central nervous system (CNS) of bivalve mollusks obtained by using aldehyde-resistant NADPH-dependent diaphorase (NADPH-d) as a marker for NO-synthase. The data are given on the influence of several environmental stress factors (hyperthermia, hypoxia and anthropogenic pollution) on the topography and quantitative characteristics of NADPH-d-positive neurons and activity of NADPH-d (determined as an optical density of formazan precipitate in the cells) in the CNS of bivalve mollusks, as well as on the neuron ultrastructure, synaptic plasticity and subcellular localization of NADPH-d.

Keywords: nitric oxide, neurons, cytosomes, anthropogenic pollution.

Pacific Medical Journal, 2016, No. 2, p. 34–41.

Проблема устойчивости организма и его адаптации к экстремальным факторам среды – одна из центральных в биологии и медицине. Для ее решения необходимы детальные исследования молекулярных и клеточных механизмов центральной нервной системы (ЦНС), в том числе ее медиаторных систем, а также выяснение их роли в адаптации к факторам среды у разных классов животных. Морские беспозвоночные, обитающие в мелководной прибрежной зоне Мирового океана, подвержены действию постоянно меняющихся факторов окружающей среды (температура, соленость, концентрация кислорода в воде), а также антропогенного загрязнения. Двустворчатые моллюски семейства Mytilidae хорошо адаптированы к изменчивости этих факторов, поэтому могут выступать в качестве модельного объекта для изучения клеточных и молекулярных механизмов устойчивости ЦНС к стрессу, вызванному воздействием абиотических факторов среды [15, 22, 42, 48].

В Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук работы по изучению нервной системы у морских беспозвоночных были начаты в 1970-х годах по инициативе профессора П.А. Мотавкина [20]. Под его руководством проводились исследования структурной организации, а также роли нервной системы в регуляции размножения у промысловых видов моллюсков и иглокожих [4, 6, 9, 10, 16]. С открытием нового класса

межклеточных посредников – газотрансмиттеров – исследование нервной системы беспозвоночных получило новый импульс. Изучались топохимия и количественное распределение нитроксида азота (NO-ергических) структур в различных отделах нервной системы у нескольких видов двустворчатых моллюсков и ракообразных [1, 2, 6, 19, 46]. П.А. Мотавкин и его ученики исследовали взаимоотношения нитроксида азота системы с классическими трансмитами нервной системы у позвоночных и беспозвоночных животных [5, 7, 8, 14, 18, 27, 28, 36]. Одновременно выяснялась роль NO-ергических механизмов в реакциях двустворчатых моллюсков на стрессовые факторы среды [4–6, 37, 51]. Большая часть данных была получена при изучении мидии Грея *Crenomytilus grayanus*, которую часто используют в различных экологических исследованиях. Это широко распространенный долгоживущий вид семейства Mytilidae, обитающий в зал. Петра Великого (Японское море).

Топография и активность NO-синтазы в ЦНС двустворчатых моллюсков

В настоящее время установлено, что в нервной системе беспозвоночных и позвоночных животных оксид азота синтезируется преимущественно с участием конститутивных форм NO-синтазы [17–19, 21, 26, 29, 32, 35]. Все формы этого фермента используют восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADPH) в качестве кофактора. NADPH-диафоразы (NADPH-d, EC 1.6.99.1) локализованы в нервных клетках с NO-синтазой, поэтому гистохимическая реакция на NADPH-d широко применяется в исследованиях как маркер данной синтазы [1, 30, 32, 40, 43]. У *C. grayanus* NADPH-d-позитивные нейроны выявлены во всех ганглиях. Наибольшее их количество (около 1,5% от общего числа) обнаружено в педальных ганглиях. В цереброплевральных и висцеральных ганглиях таких нейронов в 7–13 раз меньше [1, 4, 51]. В педальных ганглиях NADPH-d-позитивные нейроны формируют кластеры, наибольший из которых локализован в дорсомедиальной части ганглия (рис. 1, а), где наиболее интенсивно окрашиваются грушевидные клетки размером 20–25 мкм. Интенсивность окраски NADPH-d-позитивных нейронов в педальных ганглиях достоверно выше, чем в цереброплевральных и висцеральных [51]. Мелкие (3–8 мкм) и средние (10–15 мкм) нейроны имеют овальную, грушевидную или веретенообразную форму, меньшую интенсивность окраски и располагаются между

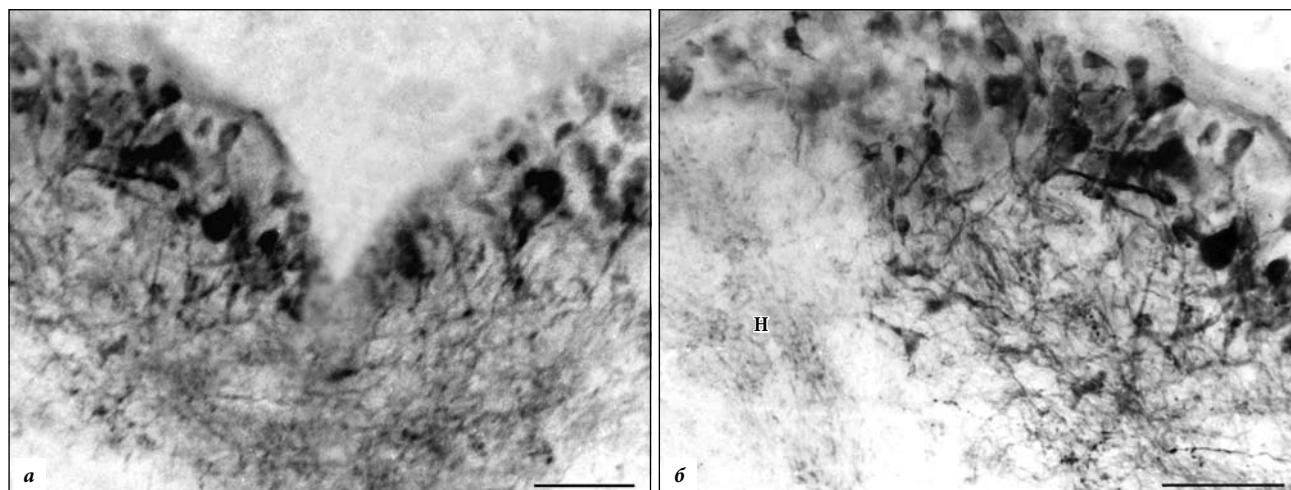


Рис. 1. Локализация NADPH-d в pedalном ганглии мидий Грея *Crenomytilus grayanus*, обитающих в относительно чистом районе зал. Петра Великого (Японское море):

а – дорсомедиальная часть ганглия, б – часть правого ганглия. Волокна в центральной части нейропиля (Н) не окрашены. Масштаб – 100 мкм.

крупными клетками. В межганглионарной комиссуре и в паракортикоидной зоне нейропиля обнаружены слабо окрашенные сплетения NADPH-d-положительных нейрональных отростков, тогда как в центральной зоне нейропиля они отсутствуют (рис. 1, б).

Сравнительный гистохимический анализ ЦНС двустворчатых моллюсков из разных семейств показал, что мидия Грея обладает хорошо развитой нитроксидергической системой [1, 4]. В ганглиях мегангулюса *Megangulus venulosus* (старое название *Peronidia venulosa*, сем. Tellinidae), выявлены единичные NADPH-d-положительные нервные волокна, а у приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* (сем. Pectinidae), реакция на NADPH-d отрицательная [2, 4]. У другого представителя сем. Pectinidae, японского гребешка *Chlamys farreri nipponensis*, NADPH-d-положительные нейроны (от 15 до 35 клеток на срез), и их отростки обнаружены в висцеральном ганглии, а в цереброплевральном и pedalном ганглиях выявлены только тонкие слабо окрашенные волокна в нейропили [5]. При этом в висцеральном ганглии японского гребешка топография NO-ергических нейронов, выявленных гистохимическими и иммуноцитохимическими методами, совпадает.

Нитроксидергическая компонента хорошо выражена в ЦНС и другого вида долгоживущих митилид, обитающего в зал. Петра Великого – модиолуса *Modiolus kurilensis* [4]. Следует отметить, что в периферической нервной системе кишечника и гонад *C. grayanus* и *M. kurilensis* также обнаружены NADPH-d-положительные нейроны и волокна [11, 12, 21, 46, 50]. Эти данные предполагают участие оксида азота в регуляции функций пищеварения и размножения у двустворчатых моллюсков.

Субклеточное распределение NADPH-d в нейронах двустворчатых моллюсков

Электронно-гистохимический метод визуализации NADPH-d отражает NADPH-зависимую активность

NO-синтазы и обеспечивает практически полную инактивацию всех других диафораз [43]. Субклеточная локализация NADPH-d в нейронах *C. grayanus* соответствует таковой у млекопитающих [17, 40, 49, 52], рыб [13] и нескольких других видов двустворчатых моллюсков [4, 6]. Нейрональная NO-синтаза, будучи водорастворимым и преимущественно цитозольным ферментом, тем не менее способна ассоциироваться с внутриклеточными мембранами [47, 52].

Ультраструктурный анализ pedalных ганглиев показал, что нейроны всех размерных групп имеют хорошо развитый эндоплазматический ретикулум, состоящий из многочисленных цистерн и вакуолей, комплекс Гольджи и большое количество свободных рибосом, полисом и митохондрий (рис. 2, а). NADPH-d-положительный осадок локализуется преимущественно в перикарионах в следующих внутриклеточных структурах: на перинуклеарной мембране, на мембранах эндоплазматического ретикулума, на внешней мембране митохондрий, в цитосомах и цитозоле. В большинстве клеток осадок расположен преимущественно в цитосомах (рис. 2, б). Последние представляют собой гетерогенную популяцию органелл, сильно варьирующую по форме, размеру, электронной плотности и количеству.

На основе морфологических признаков и особенностей распределения формазана выделены три основных типа цитосом [37]. Цитосомы типа I (0,5–2 мкм в диаметре) обычно имеют округлую или овальную форму и гетерогенную плотность (рис. 2, в). Для них характерны светлая периферическая зона и электроноплотный матрикс, в котором обнаруживаются редкие гранулы формазана. Цитосомы типа II не выявляются при обычном электронномикроскопическом исследовании, но четко видны после реакции на NADPH-d. Это окруженные элементарной мембраной органеллы диаметром 0,2–2 мкм, овальной или неправильной формы, с низкой электронной плотностью и высоким содержанием гранул формазана (рис. 2, г).

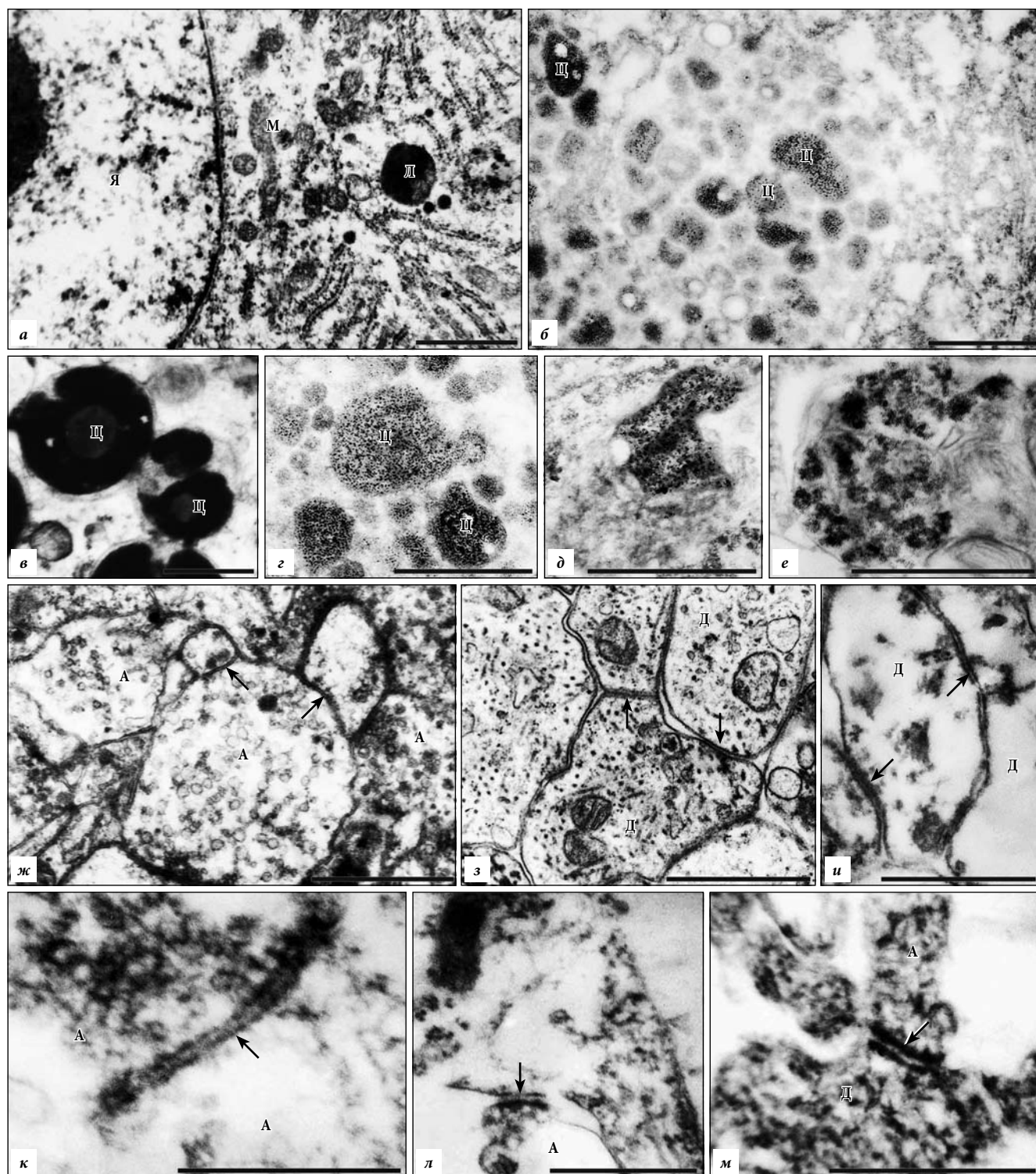


Рис. 2. Ультраструктура (а, в, ж, з) и цитохимическая реакция на NADPH-d (б, г, д, е, и, к, л, м) в педальном ганглии мидий Грея *Crepanomytilus grayanus*, обитающих в относительно чистом районе зал. Петра Великого (Японское море):

а – часть нейрона среднего размера с ядром, митохондриями, эндоплазматическим ретикуломом и липидными включениями; б – локализация гранул формазана в цитосомах; в – цитосомы типа I; г – цитосомы типа II; д, е – цитосомы типа III; ж – профили аксонов, заполненные пузырьками различной электронной плотности (стрелкой указан аксо-шиповый синаптический контакт); з – профили дендритов (стрелками указаны дендро-дендритные щелевые контакты); и – локализация гранул формазана в дендритах и дендро-дендритных щелевых контактах (указаны стрелками); к – локализация гранул формазана в аксонах и аксо-аксональном синапсе (указан стрелкой); л – локализация гранул формазана в аксо-соматическом щелевом контакте (указан стрелкой); м – локализация гранул формазана в аксо-аксональном десмосомоподобном контакте (указан стрелкой). А – аксоны, Д – дендриты, Л – липидные включения, М – митохондрии, Ц – цитосомы, Я – ядро. Масштаб – 1 мкм.

Цитосомы типа III похожи на вторичные лизосомы, возникающие в результате аутофагоцитоза как цитосом первых двух типов, так и других клеточных

органелл (рис. 2, д, е). Все три типа цитосом могут содержать осадок формазана, но в основном активность NADPH-d сосредоточена в цитосомах типа II.

Цитосомы описаны почти полвека назад как характерные цитоплазматические гранулы нейронов наземных, пресноводных и морских двустворчатых моллюсков и гастропод [9]. Тем не менее морфологические характеристики и функции этих органелл остаются предметом дискуссии до настоящего времени. Цитосомы сильно варьируют по форме, размеру и содержанию, что указывает на присутствие нескольких типов и/или стадий развития этих органелл [9, 53]. Осмиофильные цитосомы типа I (в соответствии с нашей классификацией [37]) очень похожи на цитосомы типа I, описанные ранее в нейронах *S. grayanus* [9]. Цитосомы типа II четко визуализируются после окраски на NADPH-d, их число и интенсивность окраски сильно увеличиваются в результате действия стресс-факторов (гипоксии, гипертермии) на организм моллюсков [4, 6]. Цитосомы типа III (аутофагосомы) также могут содержать осадок формаза и напоминают цитосомы типов II и III, описанные ранее [9].

В нейропиях нервных ганглиев *S. grayanus*, как и других двустворчатых моллюсков, найдена сложно переплетенная сеть из нервных отростков диаметром 1–3 мкм и выявлены различные типы межнейрональных контактов (рис. 2, ж, з). Аксо-аксональные соединения преобладают среди химических синапсов, в их пресинаптических зонах присутствуют скопления различных пузырьков (рис. 2, ж). Обнаружены также контакты между аксонами и дендритами, их отростками и шипиками. По нашим данным, доля NADPH-d-позитивных нервных терминалей составляет в среднем 4,8 % от общего числа межнейрональных контактов в педальном ганглии мидии Грея. В терминалях аксонов и дендритах осадок формаза ассоциирован с митохондриями и микрофиламентами, включая филаментозный материал пре- и постсинаптических мембран (рис. 2, и–м). Активность NADPH-d выявляется в основном в щелевых и десмосомоподобных контактах (рис. 2, и, л, м), среди которых наиболее часто встречаются щелевые соединения, сформированные смежными плазматическими мембранами отростков разных диаметров (рис. 2, и, л). Десмосомоподобные контакты, состоящие из двух симметричных электроноплотных утолщений плазматических мембран (рис. 2, м), встречаются реже. Осадок формаза локализован главным образом в пре- и постсинаптических мембранах синапсодобных контактов, и лишь небольшое число его гранул найдено в аксо- и дендроплазме.

Влияние стресс-факторов среды на активность NADPH-d и ультраструктуру нейронов

Имеются данные о том, что оксид азота участвует в адаптивных реакциях ЦНС на действие различных стресс-факторов у позвоночных и беспозвоночных животных. Как показали наши наблюдения, гипертермия вызывала увеличение доли NADPH-d-позитивных

нейронов в педальном ганглии в 1,5 раза и повышение числа NADPH-d-позитивных нервных волокон в его дорсомедиальной области [4]. Комбинированное воздействие гипертермии и гипоксии приводило к увеличению доли NADPH-d-позитивных нейронов в этом ганглии в 2,5 раза. Ультраструктурное исследование нервных ганглиев мидий *S. grayanus*, подвергнутых гипертермии, выявило незначительные изменения некоторых нейронов – краевую конденсацию хроматина в ядрах. Интересен тот факт, что в висцеральных ганглиях мегангулюса *M. venulosus* после воздействия повышенной температуры появились единичные NADPH-d-позитивные нейроны, тогда как в норме они отсутствовали. У гребешка *M. yessoensis* гипертермия не индуцировала активность NADPH-d в ЦНС. У двух последних видов наблюдали модификацию митохондрий – вместо фибриллярных органелл появлялись набухшие округлые митохондрии, особенно в околоядерной зоне. Для *S. grayanus* и *M. venulosus* характерно увеличение плотности мелкозернистого NADPH-d-позитивного осадка в аксонах нейропия [4].

Воздействие гипертермии в сочетании с гипоксией вызвало более значительные изменения в структуре нервных клеток. В NADPH-d-позитивных нейронах наблюдали увеличение числа и размеров NADPH-d-позитивных цитосом, в некоторых из них выявлены расширение и вакуолизация цистерн эндоплазматического ретикула, единичные разрушенные митохондрии и миелоноподобные тела. В NADPH-d-негативных нейронах, особенно у *M. yessoensis* и *M. venulosus*, наблюдали округление и расширение цистерн эндоплазматического ретикула, набухание и гипертрофию митохондрий, просветление и отек цитоплазмы, хотя ядра не были изменены. В аксонах и дендритах появлялись светлые вакуоли разной величины, лизосомы и многочисленные миелоноподобные структуры. Терминали NADPH-d-негативных аксонов приобретали вид цистерн неправильной формы с просветленной аксоплазмой. В то же время NADPH-d-позитивные аксоны сохраняли свою структурную целостность [4].

При изучении влияния антропогенного загрязнения на структуру нейронов и активность NADPH-d в ЦНС у мидий *S. grayanus* было установлено, что: 1) сразу после отлова в водах контрольной (о-в Русский) и четырех загрязненных станций в Амурском и Уссурийском заливах (зал. Петра Великого Японского моря) их ганглии достоверно различались по числу NADPH-d-позитивных нейронов и активности фермента; 2) наибольшие значения этих показателей выявлены в педальных ганглиях моллюсков, которые находились в водах сильно загрязненной станции (район Второй Речки в Амурском заливе); 3) после 3-суточного содержания в аэрируемой воде у моллюсков, независимо от места отлова, эти показатели достоверно не отличались от установленных сразу после отлова. Однако достоверные различия сохранялись между соответствующими показателями

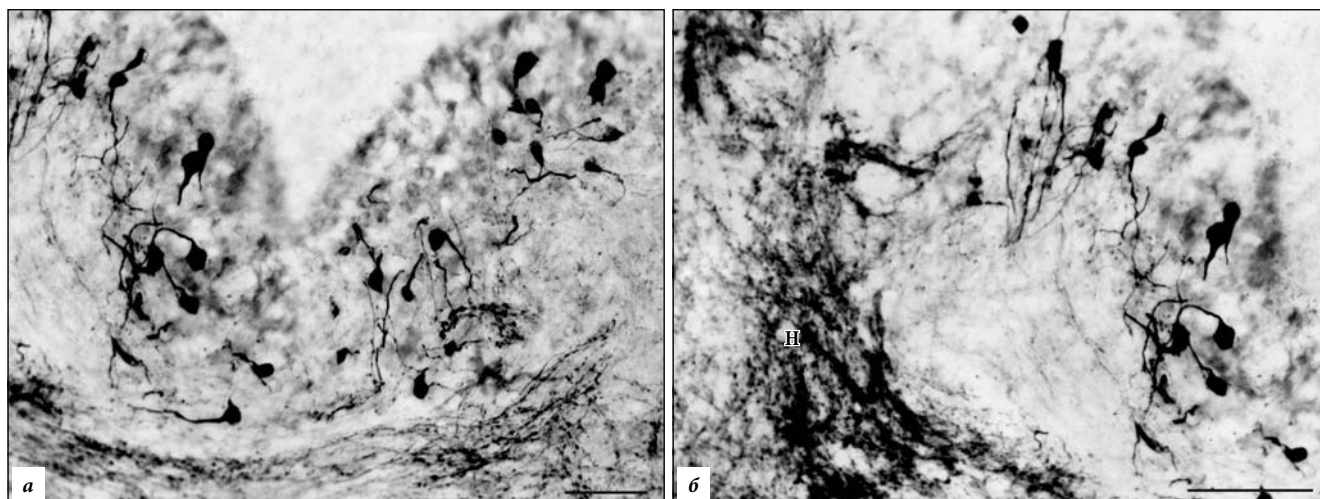


Рис. 3. Локализация NADPH-d в педальном ганглии мидий Грея *Crenomytilus grayanus*, обитающих в сильно загрязненном районе зал. Петра Великого (Японское море):

а – дорсомедиальная часть ганглия, *б* – часть правого ганглия. Волокна в центральной части нейропиля интенсивно окрашены. Н – нейропиле. Масштаб – 100 мкм.

у контрольной группы моллюсков и у мидий, которые находились в водах сильно загрязненной станции. Кроме того, установлено, что транспортировка мидий в течение 3 часов приводила к достоверному увеличению доли и интенсивности окраски NADPH-d-положительных нейронов во всех ганглиях [51].

Следует отметить, что у мидий с сильно загрязненной станции интенсивно маркировались не только тела нейронов и их отростки (рис. 3, а), но и волокна нейропиля (рис. 3, б), что не наблюдалось у контрольных животных (рис. 2, б). Резкое повышение числа NADPH-d-положительных нейронов и активности фермента у моллюсков через 3 часа после отлова было, скорее всего, вызвано гипоксией, обусловленной транспортировкой в ограниченном объеме воды. Сходные изменения NO-ергической активности выявлены в ЦНС двустворчатых моллюсков при гипоксии в условиях лабораторного эксперимента [4, 6].

Электронно-гистохимическое исследование педальных ганглиев мидий *S. grayanus*, отобранных на двух станциях – о-в Русский (контрольная) и Вторая Речка (сильно загрязненная) – в начале августа (температура воды, соответственно, 18 и 19 °С), и в конце августа (температура воды 21 и 23 °С), определило различия в ультраструктуре NADPH-d-положительных и NADPH-d-негативных нейронов [37]. Эти изменения могут быть отнесены либо к нейропластическим, либо к нейродегенеративным (деструктивным). Наиболее характерные нейропластические видоизменения происходили в NADPH-d-положительных нейронах и характеризовались чередованием содержания цитосом (главным образом типа II) и митохондрий. Число цитосом типа II в таких нейронах возрастало в 5–10 раз в контрольной группе, исследованной в начале и конце августа, а также у мидий, отловленных в эти же сроки у загрязненной станции [37]. Одновременно наблюдалось резкое (более чем в 10 раз) снижение

числа митохондрий. Важно отметить, что в NADPH-d-положительных нейронах у мидий контрольной группы в оба срока отлова дегенеративных преобразований не выявлено. У мидий с загрязненной станции, отловленных в начале августа, в таких нейронах отмечены дегенеративные изменения – фрагментация и набухание цистерн эндоплазматического ретикулума и вакуолизация цитоплазмы [37]. В перикарионах NADPH-d-негативных нейронов число митохондрий и аутофагосом было в три раза выше, чем в NADPH-d-положительных нейронах. В нервных отростках и терминалях последних дегенеративные изменения отсутствовали. В то же время для NADPH-d-негативных терминалей характерно снижение электронной плотности матрикса, уменьшение числа синаптических пузырьков, нейрофиламентов, микротрубочек и появление вакуолей. Доля нервных терминалей с деструктивными изменениями составляла около 8%.

В перикарионах NADPH-d-положительных нейронов мидий, отловленных в конце августа в водах загрязненной станции, практически отсутствовали митохондрии. Цитосомы типа II, хотя и выявлялись, но в значительно меньшем количестве, чем в начале августа, и отличались низкой активностью фермента [37]. Кроме того, в цитоплазме нейронов наблюдали электропрозрачные полости и вакуоли разных размеров, а также многочисленные аутофагосомы, содержащие концентрические миелиноподобные структуры. В NADPH-d-негативных нейронах число аутофагосом увеличивалось в три раза. В нейропиле выявлялись пластические изменения щелевых и десмосомоподобных контактов в виде повышения электронной плотности примембранного материала и увеличения протяженности контактов. Структура NADPH-d-негативных аксонов и дендритов была сильно нарушена, а их доля у разных особей варьировала от 3 до 34%.

Нейропластические изменения в ЦНС двустворчатых моллюсков при действии стресс-факторов

Результаты исследований влияния экологического стресса на состояние нитроксидергической компоненты и ультраструктуру ЦНС двустворчатых моллюсков и митилид свидетельствуют о высокой пластичности нервной ткани этих животных, ее способности адаптироваться к неблагоприятным факторам среды [4–6, 37, 51]. Механизмы, лежащие в основе устойчивости нервных клеток двустворчатых моллюсков к этим факторам, до сих пор мало изучены. Полученные в наших работах данные позволяют с большой долей вероятности предположить участие оксида азота в формировании адаптационной защиты нервных клеток двустворчатых моллюсков в условиях высокой изменчивости среды.

Наиболее интересны, на наш взгляд, результаты анализа ультраструктуры нейронов и субклеточного распределения NADPH-d в межклеточных контактах, позволяющие судить о некоторых клеточных и молекулярных механизмах нейропластичности [4, 37]. Факты свидетельствуют, что реорганизация синапсоархитектоники при хроническом загрязнении идет в двух направлениях: уменьшение числа химических синапсов в результате повреждения NADPH-d-негативных отростков и сохранение, а также структурная перестройка NADPH-d-позитивных синапсоподобных контактов. Пластическая реорганизация синапсов обеспечивает адаптацию нейронов к изменениям информационного потока, проходящего через его афференты, оптимизирует работу нейронных сетей и, как следствие, предоставляет возможность приспособляться к новым условиям функционирования нервных центров. Кроме того, резкое увеличение числа NADPH-d-позитивных цитосом типа II и активности в них фермента, видимо, является неспецифической реакцией нейронов двустворчатых моллюсков на действие стресс-факторов окружающей среды. В конце 70-х годов прошлого века было показано, что цитосомы представляют собой гранулы, содержащие желтый пигмент, которые появляются в нейронах моллюсков при аноксии [53]. Ультраструктурными и цитохимическими исследованиями, а также абсорбционным спектральным анализом было установлено, что цитосомы содержат каротиноиды, миоглобин и гемопротеиновые дыхательные ферменты. Было высказано предположение, что эти органеллы – внутриклеточные источники кислорода в условиях гипоксии [33]. Другая предполагаемая функция цитосом – это обратимая аккумуляция Ca^{2+} [45]. Биохимические и биофизические исследования подчеркнули конформационные изменения каротиноидов цитосом под влиянием серотонина, ацетилхолина и оксида азота – нейромедиаторов, представленных в нервной системе моллюсков так же широко, как и у млекопитающих [3, 23]. Воздействие экзогенного оксида азота вызывало снижение вязкости мембран цитосом и двухстадийное уменьшение количества

внутриклеточных связанных ионов кальция. На основании этих фактов высказано предположение, что цитосомы участвуют в комплексе процессов, индуцированных нейротрансмиттерами и сопряженных с перераспределением ионов кальция в цитоплазме нейрона в процессе его функционирования [3, 23].

Согласно нашим данным, в ЦНС двустворчатых моллюсков NADPH-d-позитивные цитосомы типа II служат важным поставщиком оксида азота. При этом NADPH-d-позитивные цитосомы и митохондрии являются метаболически связанными органеллами: в нейронах мидий Грея, обитавшей в условиях сильного загрязнения и гипоксии, наблюдалось резкое увеличение числа цитосом и столь же выраженное снижение количества митохондрий, вплоть до их полного исчезновения [37]. В последние годы накапливается все больше фактов, позволяющих считать, что реакция клетки на повреждение различной природы приводит к митохондриальной дисфункции, которая способствует развитию многих патологических процессов, включая нейродегенеративные заболевания [31, 34, 41]. Митохондриальная дисфункция сопровождается увеличением уровня активных форм кислорода и развитием окислительного стресса в клетке. Многочисленные сигнальные молекулы, появление которых в клетке связано с дисфункцией митохондрий и окислительным стрессом (активные формы кислорода, белки семейства Bcl-2, цитохром C и др.), определяют судьбу нейрона при гипоксии и нейродегенерации – выживание или смерть путем апоптоза или некроза [31, 44].

Еще одной функцией эндогенного оксида азота в нейронах моллюсков может быть его участие в регуляции митохондриального дыхания. В опытах с изолированными митохондриями, нервными терминалями и нейронами мозга наномолярные концентрации этого соединения быстро и обратимо ингибировали цитохромоксидазу, конкурируя с кислородом [24, 25]. Вполне вероятно, что оксид азота, продуцируемый цитосомами в NO-ергических нейронах ЦНС митилид, устойчивых к гипоксии, участвует в ингибировании митохондриальной дыхательной цепи и переключении нейронов с аэробного дыхания на гликолиз в условиях понижения внутриклеточной концентрации кислорода [37]. Эта гипотеза находит подтверждение в экспериментальных работах по изучению молекулярных механизмов устойчивости клеток других органов митилид (жабр, мантии) к действию гипоксии и загрязняющих веществ [38, 39]. Вероятно, гипоксия запускает продукцию оксида азота, который ингибирует цитохром C-оксидазу и переключает поток электронов на альтернативный окислительный процесс, что сводит к минимуму продукцию активных форм кислорода в клетке [39]. Кроме того, оксид азота способен реагировать с восстановленным глутатионом [39]. В этом случае продукт реакции активирует гуанилатциклазу, в результате чего увеличивается синтез циклического гуанозинмонофосфата, активирующего

его протеинкиназу. Последняя, в свою очередь, активизирует так называемую стресс-киназу – р38-зависимую митоген-активируемую протеинкиназу, в функции которой входит активация/деактивация метаболических и окислительно-восстановительных процессов в клетке. В соответствии с этой гипотезой, сигналы, запускаемые в клетках аноксией, генерируют быструю метаболическую реакцию, которая завершает или усиливает регуляцию энергетических и окислительно-восстановительных процессов у устойчивых к аноксии видов двусторчатых моллюсков [39]. Стресс-киназа, видимо, играет ключевую роль в модуляции реакций клеток двусторчатых моллюсков на окислительный стресс, которые могут быть направлены как на увеличение устойчивости клеток (запуск синтеза белков теплового шока), так и на проапоптотические процессы, в частности, на активацию каспаз.

Заключение

В пользу предположения о нейропротективной роли нейропластических изменений в ЦНС двусторчатых моллюсков при воздействии негативных факторов среды свидетельствует несколько фактов: 1) увеличение числа и размеров NADPH-d-позитивных цитосом в нейронах и связанное с этим увеличение продукции эндогенного оксида азота; 2) структурная реорганизация синапсов и синапсоподобных контактов; 3) резкое снижение числа митохондрий вплоть до их полного исчезновения. Отсутствие апоптотически или некротически погибших нейронов в ЦНС мидий Грея, обитающих в загрязненной среде или экспериментально подвергнутых действию стресс-факторов, позволяет считать, что резкое снижение числа митохондрий в нейронах играет важную нейропротективную роль. С одной стороны, это может предохранять нейроны от избытка активных форм кислорода и от апоптоза, поскольку исключает так называемый внутренний (митохондриальный) путь его активации. С другой стороны, исчезновение митохондрий может быть связано с переключением аэробного энергетического метаболизма нейронов на анаэробный.

Важную роль в адаптации нервной системы к изменяющимся условиям внешней среды играет оксид азота ввиду того, что выявленные нами деструктивные изменения в нервной системе мидий Грея при хроническом воздействии загрязнения среды связаны в основном с NADPH-d-негативными нейронами, их отростками и терминалями, тогда как структура NADPH-d-позитивных нейронов практически не меняется. Действие дополнительных неблагоприятных факторов (повышенной температуры и/или гипоксии), очевидно, приводит к срыву адаптационных механизмов и вызывает выраженные нейродегенеративные изменения в ЦНС двусторчатых моллюсков.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований ДВО РАН «Дальний Восток» (проекты 15-1-6-007 и 15-1-6-010).

Литература

1. Анникова Л.В., Пименова Е.А., Дюйзен И.В. [и др.]. Локализация NO-ергических элементов в центральной нервной системе двусторчатого моллюска *Crenomytilus grayanus* // Ж. эвол. биохим. физиол. 2000. Т. 36, № 5. С. 452–457.
2. Дюйзен И.В., Анникова Л.В., Мотавкин П.А. Локализация NO-синтазы в центральной нервной системе двусторчатых моллюсков *Mizuhopecten yessoensis* и *Modiolus kurilensis* // Биол. моря. 1999. Т. 25, № 3. С. 243–245.
3. Ерохова Л.А., Браже Н.А., Максимов Г.В. [и др.]. Исследование конформационных изменений каротиноидов в нейронах при действии нейромедиаторов // Докл. Акад. наук. 2005. Т. 402, № 4. С. 558–560.
4. Коцюба Е.П. Влияние повышенной температуры и гипоксии на активность NO в центральной нервной системе двусторчатых моллюсков // Ж. эвол. биохим. физиол. 2008. Т. 44, № 2. С. 200–208.
5. Коцюба Е.П. Влияние температурного стресса на активность NO-синтазы и тирозингидроксилазы в центральной нервной системе двусторчатых моллюсков // Ж. эвол. биохим. физиол. 2009. Т. 45, № 1. С. 122–129.
6. Коцюба Е.П., Коцюба А.Е. NO-синтаза в центральной нервной системе пресноводного двусторчатого моллюска *Nodularia vladivostokensis* в норме и при гипоксии // Ж. эвол. биохим. физиол. 2003. Т. 39, № 2. С. 179–183.
7. Коцюба А.Е., Черток В.М. Нитроксидсодержащие элементы чувствительной иннервации артерий головного мозга // Тихоокеанский медицинский журнал. 2009. № 2. С. 69–72.
8. Коцюба А.Е., Черток В.М. Гистохимическая и иммуногистохимическая локализация холинацетилтрансфераз в ядрах продолговатого мозга крыс // Цитология. 2013. Т. 55, № 11. С. 821–827.
9. Мотавкин П.А., Варакин А.А. Гистофизиология нервной системы и регуляция размножения у двусторчатых моллюсков. М.: Наука, 1983. 208 с.
10. Мотавкин П.А., Хотимченко Ю.С., Деридович И.И. Регуляция размножения и биотехнология получения половых клеток у двусторчатых моллюсков. М.: Наука, 1990. 217 с.
11. Пименова Е.А., Хлопова А.В., Варакин А.А. Нитроксидергические клетки в кишечнике двусторчатого моллюска *Modiolus kurilensis* // Биология моря. 2002. Т. 28, № 2. С. 119–124.
12. Пименова Е.А., Варакин А.А. Локализация NO-ергических элементов в ротовых лопастях, губах и пищеводе двусторчатого моллюска *Crenomytilus grayanus* // Ж. эвол. биохим. физиол. 2003. Т. 39, № 5. С. 476–481.
13. Ружинская Н.Н., Гдовский П.А. NADPH-диафораза в обонятельной системе карпа *Cyprinus carpio* // Ж. эвол. биохим. физиол. 2002. Т. 38, № 1. С. 91–96.
14. Старцева М.С., Коцюба А.Е., Черток В.М. Пространственная организация газотрансмиттерных нейронов в мозге // Тихоокеанский медицинский журнал. 2015. № 2. С. 38–42.
15. Тищенко П.Я., Сергеев А.Ф., Лобанов В.Б. [и др.]. Гипоксия придонных вод Амурского залива // Вестник ДВО РАН. 2008. № 6. С. 115–125.
16. Хотимченко Ю.С., Деридович И.И., Мотавкин П.А. Биология размножения и регуляция гаметогенеза и нереста у иглокожих. М.: Наука, 1993. 168 с.
17. Черток В.М., Коцюба А.Е. Оксид азота в механизмах афферентной иннервации артерий головного мозга // Цитология. 2010. Т. 52, № 1. С. 24–29.
18. Черток В.М., Коцюба А.Е. Сравнительное исследование катехоламинергических и нитроксидергических нейронов в вазомоторных ядрах каудальной части ствола мозга крысы // Морфология. 2015. Т. 147, № 2. С. 26–31.
19. Черток В.М., Коцюба Е.П. Сравнительная характеристика iNOS-позитивных структур в ЦНС некоторых видов ракообразных // Цитология. 2015. Т. 57, № 8. С. 584–591.
20. Черток В.М., Реутов В.П., Охотин В.Е. Павел Александрович

- Мотавкин – человек, педагог, ученый // Тихоокеанский мед. журнал. 2012. № 3. С. 7–8.
21. Annikova L.V., Dyuzin I.V., Paltseva Y.N. [et al.]. 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. Vol. 40. P. 69–77.
 22. Bayne B.L. Ecological consequences of stress // *The effects of stress and pollution on marine animals*. New York: Praeger, 1985. P. 141–155.
 23. Brazhe (Ulyanova) N.A., Erokhova L.A., Churin A.A. [et al.]. The relation of different-scale membrane processes under nitric oxide influence // *J. Biol. Phys.* 2005. Vol. 31. P. 533–546.
 24. Brown G.C. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase // *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 2001. Vol. 1504. P. 46–57.
 25. Brown G.C., Borutaite V. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart // *Cardiovasc. Res.* 2007. Vol. 75. P. 283–290.
 26. Calabrese V., Mancuso C., Calvani M. [et al.]. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity // *Nat. Rev. Neurosci.* 2007. Vol. 8. P. 766–775.
 27. Chertok V.M., Kotsyuba A.E., Kotsyuba E.P. Serotonergic and nitroxidergic neurons in the nuclei of the medulla oblongata in the rat // *Neuroscience and Behavioral Physiology.* 2012. Vol. 42, No. 5. P. 526–531.
 28. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Norepinephrinergic and nitroxidergic neurons of vasomotor nuclei in hypertensive rats // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2015. Vol. 158, No. 5. P. 695–699.
 29. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Distribution of NADPH-diaphorase and neuronal NO synthase in the nuclei of the medulla oblongata in rats // *Neuroscience and Behavioral Physiology.* 2014. Vol. 44, No. 8. P. 909–913.
 30. Dawson T.M., Bredt D.S., Fotuhi M.H. [et al.]. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH-diaphorase are identical in brain and peripheral tissues // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. Vol. 88. P. 7797–7801.
 31. Fiskum G. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of acute neural cell death // *Mitochondria in pathogenesis*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001. P. 317–331.
 32. Hope B.T., Michael G.J., Knigge K.M. [et al.]. Neuronal NADPH-diaphorase is a nitric oxide synthase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. Vol. 88. P. 2811–2814.
 33. Karnaukhov V.N. Carotenoids in oxidative metabolism of molluscoid neurons // *Exp. Cell. Res.* 1971. Vol. 64. P. 301–306.
 34. Keating D.J. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, regulation of exocytosis and their relevance to neurodegenerative diseases // *J. Neurochem.* 2008. Vol. 104. P. 298–305.
 35. Kim H.W., Batista L.A., Hoppes J.L. [et al.]. A crustacean nitric oxide synthase expressed in nerve ganglia, Y-organ, gill and gonad of the tropical land crab, *Gecarcinus lateralis* // *J. Exp. Biol.* 2004. Vol. 207. P. 2845–2857.
 36. Kotsyuba A.E., Chertok V.M., Kotsyuba E.P. Comparative characteristics of serotonergic neurons in some nuclei of rat medulla // *Cell and Tissue Biology.* 2011. Vol. 5, No. 4. P. 503–510.
 37. Kotsyuba E.P., Vaschenko M.A. Neuroplastic and neuropathological changes in the central nervous system of the Gray mussel *Crenomytilus grayanus* (Dunker) under environmental stress // *Invertebr. Neurosci.* 2010. Vol. 10, No. 1. P. 35–46.
 38. 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*. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 2002. P. 27–46.
 39. Letendre J., Leboulenger 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.
 40. López-Costa J.J., Acupil C., Tagliaferro P. [et al.]. Distribution of NADPH-diaphorase in rat mesencephalon: a light and electron microscopical study // *Biocell.* 2002. Vol. 26. P. 247–252.
 41. Mancuso C., Scapagnini G., Curro D. [et al.]. Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders // *Front. Biosci.* 2007. Vol. 12. P. 1107–1123.
 42. *Marine mussels: their ecology and physiology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1976. 506 p.
 43. Matsumoto T., Nakane M., Pollock J.S. [et al.]. A correlation between soluble brain nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase activity is only seen after exposure of the tissue to fixative // *Neurosci. Lett.* 1993. Vol. 155. P. 61–64.
 44. Niizuma K., Endo H., Chan P.H. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival // *J. Neurochem.* 2009. Vol. 109, Suppl. 1. P. 133–138.
 45. Petrunyaka V.V. Localization and role of carotenoids in molluscan neurons // *Cell. Mol. Neurobiol.* 1982. Vol. 1. P. 11–20.
 46. Pimenova E.A., Varaksin A.A. Putative nitroxidergic cells in the digestive system of some mytilids (Mollusca: Bivalvia: Mytilidae) revealed by NADPH-diaphorase histochemistry // *Malacologia.* 2006. Vol. 49. P. 61–78.
 47. Rothe F., Langnaese K., Wolf G. New aspects of the location of neuronal nitric oxide synthase in the skeletal muscle: a light and electron microscopic study // *Nitric Oxide.* 2005. Vol. 13. P. 21–35.
 48. Shulkin, V.M., Presley, B.J., Kavun, V.Ya. Metal concentrations in mussel *Crenomytilus grayanus* and oyster *Crassostrea gigas* in relation to contamination of ambient sediments // *Environ. Int.* 2003. Vol. 29. P. 493–502.
 49. Tseng C.-Y., Lue J.-H., Chang H.-M. [et al.]. Ultrastructural localisation of NADPH-d/nNOS expression in the superior cervical ganglion of the hamster // *J. Anat.* 2000. Vol. 197. P. 461–475.
 50. Varaksin A.A., Pimenova E.A., Varaksina G.S. [et al.]. Localization of NADPH-diaphorase-positive elements in the intestine of the mussel *Crenomytilus grayanus* // *Malacologia.* 2002. Vol. 44. P. 135–143.
 51. 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. Vol. 66. P. 249–258.
 52. Wolf G., Würdig S., Schünzel G. Nitric oxide synthase in rat brain is predominantly located at neuronal endoplasmic reticulum: an electron microscopic demonstration of NADPH-diaphorase activity // *Neurosci. Lett.* 1992. Vol. 147. P. 63–66.
 53. Zs.-Nagy I. Cytosomes (yellow pigment granules) of mollusks as cell organelles of anoxic energy production // *Int. Rev. Cytol.* 1977. Vol. 49. P. 331–377.

Поступила в редакцию 02.11.2015.

Топография NO-синтазы в центральной нервной системе двустворчатых моллюсков в норме и при действии стресс-факторов

М.А. Ващенко, Е.П. Коцюба

Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17)

Резюме. В обзоре представлены результаты исследований нитроксидергической компоненты центральной нервной системы двустворчатых моллюсков, полученные с использованием устойчивой к альдегидам NADPH-диафоразы (NADPH-d) в качестве маркера NO-синтазы. Приведены данные о влиянии экологических стресс-факторов (гипертермии, гипоксии и антропогенного загрязнения) на топографию, количественные характеристики NADPH-d-позитивных нейронов и активность NADPH-d в центральной нервной системе двустворчатых моллюсков, а также на ультраструктуру нейронов, синаптическую пластичность и субклеточную локализацию NADPH-d.

Ключевые слова: оксид азота, нейроны, цитосомы, антропогенное загрязнение.