

each, the distance between their bodies and the capillary wall was measured within the circle of 20 μm radius, the cell body area and the length of their main processes were determined. It is found that astrocytes in the nucleus accumbens in the model of bilateral occlusion of the common carotid arteries for 7 days experienced a partial state of ischemia. Their reactive changes were manifested by the signs of the cytotoxic edema, damaging intermediate filament proteins in their bodies, processes

and in the perivascular glial membranes. The concentration of the astrocyte cell bodies near blood capillaries is the adaptation mechanism and is a condition for the survival of cells under the restriction of blood flow in the brain.

Key words: *astrocytes, the nucleus accumbens, hypoxia, reactive changes*

A.G.Knorre Department of Histology and Embryology. St. Petersburg State Pediatric Medical University

© В. М. Черток, Е. П. Коцюба, 2016
УДК 591.88:612.26:595.384.2

В. М. Черток¹, Е. П. Коцюба²

ЛОКАЛИЗАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ КИСЛОРОДЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ФАКТОРА, ИНДУЦИРОВАННОГО ГИПОКСИЕЙ 1 α В МОЗГУ МОХНАТОРУКОГО КРАБА *ERIOCHEIR JAPONICA* В НОРМЕ И ПРИ ОСТРОЙ АНОКСИИ (ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

¹ Кафедра анатомии человека (зав. — проф. В. М. Черток), Тихоокеанский государственный медицинский университет;

² лаборатория цитофизиологии (зав. — канд. биол. наук М. В. Ващенко), Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, г. Владивосток

Методами вестерн-иммуоблоттинга и иммуногистохимии изучена экспрессия фактора, индуцированного гипоксией 1 α (HIF-1 α), в мозгу мохнаторукого краба *Eriocheir japonica* в норме и при 2-, 4-, 6- и 12-часовой аноксии на модели депривации воды. У интактных крабов количество иммунопозитивных нейронов небольшое, но возрастает при увеличении продолжительности аноксии. Особенно выраженный прирост доли нейронов с экспрессией HIF-1 α установлен в клеточной группе 6. В группе 9/11 наиболее высокие значения показателя наблюдаются между 2–6 ч аноксии. В группе 17 значимые изменения доли иммунопозитивных клеток отмечены только через 2 ч аноксии. После 6-часовой аноксии доля нейронов с экспрессией HIF-1 α во всех клеточных группах сокращается, но реакция появляется в гемоцитах. Предполагается, что увеличение доли иммунопозитивных нейронов и появление экспрессии HIF-1 α в гемоцитах мозга при аноксии играет важную роль в обеспечении компенсаторных и защитных процессов, повышающих адаптивные возможности мохнаторукого краба в условиях гипоксического стресса.

Ключевые слова: *центральная нервная система, мохнаторукий краб, фактор, индуцированный гипоксией 1 α , аноксия*

В регуляции кислородного гомеостаза важная роль принадлежит семейству высококонсервативных транскрипционных факторов — факторов, индуцируемых гипоксией (HIF). Ключевую роль в этом процессе, как теперь установлено, играет кислородчувствительный транскрипционный фактор HIF-1 α [11, 17, 19]. Имеются доказательства, что HIF-1 α у млекопитающих участвует в

механизмах нейропротекции при гипоксии/ишемии и оксидативном стрессе [4, 11, 15]. Недавние исследования показали, что гипоксия стимулирует экспрессию HIF-1 α и в ряде органов беспозвоночных [7, 8, 12]. В ЦНС беспозвоночных подобные исследования проводились только биохимическими методами, не позволяющими судить о распределении таких клеток в отдельных струк-

Сведения об авторах:

Черток Виктор Михайлович (e-mail: chertokv@mail.ru), кафедра анатомии человека, Тихоокеанский государственный медицинский университет, 690990, г. Владивосток, пр. Острякова, 2

Коцюба Елена Пантелеймоновна (e-mail: erkotsuba@mail.ru), лаборатория цитофизиологии, Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17

турах мозга [9]. Вместе с тем, сведения о топографии и численности HIF-1 α -позитивных клеток в мозгу имеют принципиальное значение для понимания механизмов формирования толерантности к гипоксии у разных классов и видов животных, в том числе у японского мохнаторукого краба *Eriocheir japonica*, который отличается исключительной способностью приспосабливаться к различным экстремальным воздействиям, включая гипоксию.

Цель настоящей работы заключалась в изучении локализации и количественной оценке содержания фактора HIF-1 α в клетках мозга краба *E. japonica* в норме и при острой аноксии.

Материал и методы. Работа выполнена на половозрелых мужских особях мохнаторукого краба *Eriocheir japonica* с шириной карапакса 61–62 мм, отловленных в заливе Петра Великого (Японское море) в апреле 2013 г. После адаптации в течение нескольких суток животных разделяли на 2 группы. Контрольную группу из 5 крабов содержали в аквариуме с аэрируемой морской водой при температуре 20 °С, экспериментальную — экспонировали в условиях аноксии, вызванной депривацией воды в течение 2, 4, 6 и 12 ч (по 5 животных) при 20 °С по описанной ранее методике [5]. При работе с гидробионтами руководствовались Директивой 86/609/ЕЕС Совета ЕС от 24 ноября 1986 г.

Для вестерн-иммуоблоттинга свежeweделенные образцы мозга гомогенизировали в соотношении 1:5 в буфере следующего состава: 20 мМ трис-HCl (pH 7,5), 0,1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), 0,5 мМ дитиотреитол (DTT), 0,2 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF). После центрифугирования (15 000 g при 4 °С, 20 мин) супернатант отделяли и определяли в нем концентрацию общего белка. Электрофорез белков проводили в 12% полиакриламидном геле. Количество общего белка, вносимого в лунки для электрофореза, составляло 40 мкг. После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Для блокирования неспецифического связывания антител мембрану инкубировали в трис-HCl-буфере, содержащем 4% бычий сывороточный альбумин, в течение ночи. Иммунодетекцию проводили моноклональными антителами мыши к HIF-1 α (разведение 1:1000; Abcam, Великобритания) 3 ч при 4 °С, а затем вторичными, конъюгированными с пероксидазой хрена (Vector Labs, США). Для визуализации пероксидазной реакции использовали VIP Substrate Kit (Vector Labs, США). Затем мембраны промывали и сканировали.

Для иммуногистохимического выявления HIF-1 α мозг крабов фиксировали 2 ч в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,2) при 4 °С. Получали криостатные срезы толщиной 30 мкм. HIF-1 α выявляли на серийных срезах головного ганглия с помощью метода непрямого авидин-биотин-пероксидазного маркирования. После ингибирования эндогенной пероксидазы в 1% растворе H₂O₂ и подавления неспецифического связывания антител в 1% нормальной сыворотке лошади срезы инкубировали в течение 18 ч при 4 °С с моноклональными антителами мыши к HIF-1 α (разведение 1:500; Abcam, Великобритания). Затем срезы промывали в нескольких сменах 0,1 М фосфатно-солевого буфера (PBS) (pH 7,2) и инкубировали 2 ч в растворе вторичных биотинилирован-

ных антител (Vector Labs, США) в разведении 1:200. После отмывания срезы инкубировали в течение 1 ч с авидин-биотин-пероксидазным комплексом (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Labs, США) при температуре 22–24 °С в темноте, после чего их трижды промывали в PBS. Продукты реакции выявляли при помощи субстрата (VIP Substrate Kit, Vector Labs, США), контролируя процесс окраски под микроскопом. Затем срезы промывали в трех сменах PBS, обезвоживали по стандартной методике и заключали в балзам. Возможность применения моноклональных антител мыши к HIF-1 α для идентификации этой молекулы в различных органах и тканях беспозвоночных, в том числе в мозгу ракообразных, доказана результатами выполненных ранее молекулярно-генетических и биохимических исследований [7, 9, 12, 17].

У всех животных мозг изучали в пределах границ клеточных групп 6, 9/11, 17, топографию которых уточняли по данным D.C.Sandeman и соавт. [13]. Исследование проводили на серии последовательных срезов, один из которых обрабатывали 0,5% раствором метиленового синего для определения общего количества нейронов, каждый второй — использовали для иммуногистохимического исследования. Препараты просматривали под микроскопом Axiovert 200M (Zeiss, Германия). Подсчитывали число и определяли размеры нейронов на монтажах срезов, сформированных программой AxioVision 4.8, только в тех клеточных группах ганглия, в которых иммунопозитивные нейроны выявлялись постоянно и в достаточном количестве для статистического анализа. При этом учитывали только те нейроны, которые имели отчетливо видимое ядро. Для оценки специфичности реакции проводили обработку срезов без первичных или вторичных антител. На контрольных срезах иммунопозитивная реакция отсутствовала.

Для количественного анализа нейронов использовали пакет компьютерных программ автоматизированной системы анализа изображений Allegro-МС. Определяли долю маркированных клеток от общего числа нейронов в каждой клеточной группе, учитывая только те нейроны, плотность окраски которых была выше окраски фона не менее 1,5 раз. Количественные результаты, полученные при обработке не менее 10 серийных срезов ганглия от каждого исследуемого животного, представляли в виде среднего значения и его стандартной ошибки. Их различия оценивали по t-критерию Стьюдента и считали значимыми при P<0,05.

Результаты исследования. Методом вестерн-иммуоблоттинга в тотальном белковом экстракте мозга как у интактных крабов *Eriocheir japonica*, так и после аноксии, вызванной депривацией воды, выявляется полипептидный антиген с молекулярной массой около 116 килодальтон, перекрестно реагирующий с антителами к HIF-1 α мыши (рис. 1).

Иммуногистохимическое исследование мозга интактных крабов показало наличие HIF-1 α в клеточных группах 6 и 9/11. В группе 17 нейроны, экспрессирующие HIF-1 α , постоянно не выявляются. Большинство иммунопозитивных клеток имеют овальную, грушевидную или полигональную форму, относительно крупные размеры (около 800 мкм²) и невысокую интенсивность реакции (рис. 2, а). Однако плотность отложе-

ния преципитата существенно повышается в мелких нейронах площадью тела 70–250 мкм². Как правило, они имеют округлую и грушевидную форму, крупное ядро и узкий ободок цитоплазмы. Подсчеты показали, что доля HIF-1 α -позитивных нейронов наиболее высока в клеточной группе 6, но и в ней величина показателя не превышает 4% от общего числа клеток, выявленных в этой группе окраской метиленовым синим (рис. 3, а). Еще ниже доля иммунопозитивных нейронов в клеточной группе 9/11 ($P \leq 0,05$).

При аноксии во всех клеточных группах мозга наблюдается значимое увеличение доли иммунопозитивных нейронов. Вместе с тем, динамика количественных преобразований нейронов, экспрессирующих HIF-1 α в исследованных группах, имеет существенные различия. В клеточной группе 6 уже через 2 ч аноксии наблюдается резкое увеличение доли таких нейронов, а через 6 ч их относительное содержание достигает максимальных цифр, снижаясь к 12 ч эксперимента (см. рис. 3, б). Особенно существенно в указанной группе возрастет количество клеток, содержащих

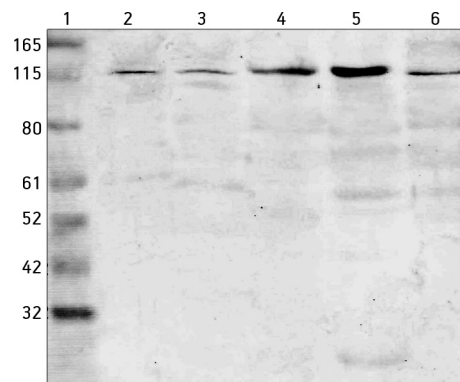


Рис. 1. Вестерн-иммуноблоттинг HIF-1 α в гомогенатах мозга *E. japonica* в контроле и при аноксии.

1 — маркер молекулярной массы, килодальтон; 2 — контрольная группа; 3 — 2-часовая, 4 — 4-часовая, 5 — 6-часовая, 6 — 12-часовая аноксия

HIF-1 α , в центральной части дорсальной поверхности и переднемедиальной части вентральной поверхности мозга. При этом увеличение значений показателя происходит, преимущественно, за счет мелких нейронов, многие из которых отличаются высоким уровнем экспрессии HIF-1 α

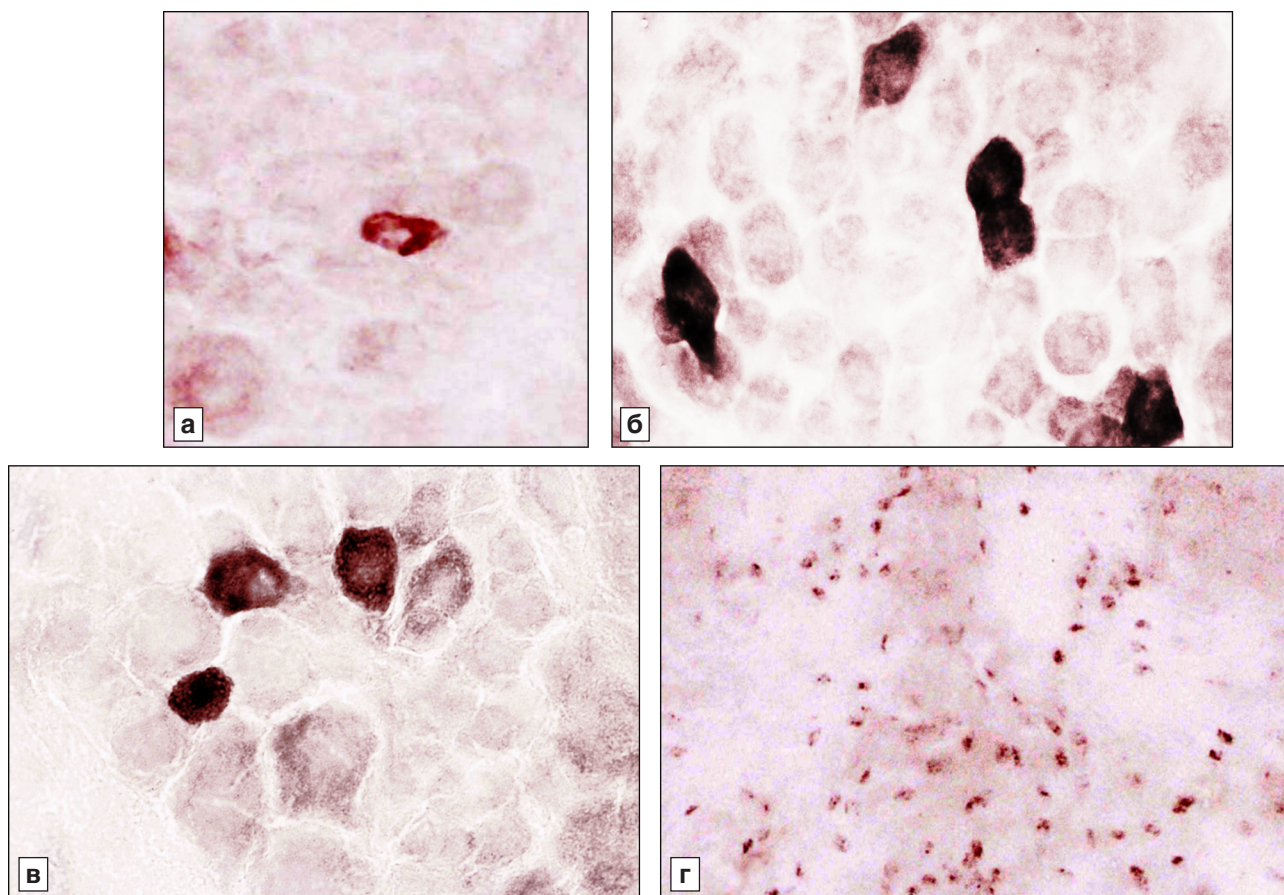


Рис. 2. HIF-1 α -позитивные нейроны (а–в) и гемоциты (г) мозга *E. japonica*. HIF-1 α -позитивные нейроны в клеточной группе 6 у интактных крабов (а) и после 2- (б) и 6-часовой (в) аноксии, вызванной депривацией воды; г — гемоциты в клеточной группе 17.

Иммуногистохимическая реакция. а, г — об. 20, ок. 15; б–в — об. 40, ок. 15

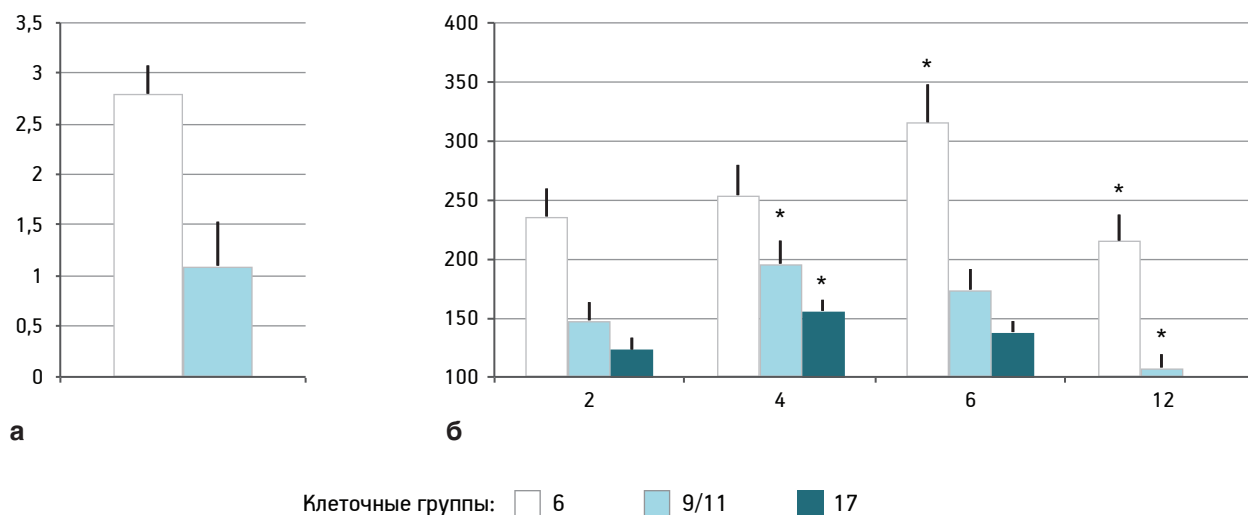


Рис. 3. Относительное содержание HIF-1α-позитивных нейронов в различных клеточных группах мозга у intactных *E. japonica* (а) и после ано́ксии (б).

б — по горизонтальной оси — продолжительность ано́ксии (ч); по осям ординат: а — доля HIF-1α-позитивных нейронов от общего числа нейронов при окраске препаратов метиленовым синим (%); б — изменения доли HIF-1α-позитивных нейронов (%) по сравнению с показателем в соответствующей клеточной группе у контрольной группы животных, принятым за 100%. Звездочки — различия значимы при $P \leq 0,05$ по сравнению с показателями в предыдущей группе; вертикальные отрезки — с показателями в контрольной группе

(см. рис. 2, б). Однако, начиная с 4 ч, прирост доли нейронов обеспечивается и более крупными клетками, в части которых наблюдается повышение плотности продукта реакции (см. рис. 2, в). В клеточной группе 9/11 изменение значений доли иммунопозитивных нейронов имеет другую динамику (см. рис. 3, б). К 4 ч ано́ксии наблюдается значительное увеличение доли иммунопозитивных клеток, а затем постепенное её снижение. В этой группе прирост числа HIF-1α-позитивных нейронов не столь значителен, как в предыдущей группе, и происходит примерно в равной степени за счет мелких и крупных нейронов.

В клеточной группе 17 иммунопозитивные нейроны постоянно выявляются через 2 ч ано́ксии. Как правило, это клетки округлой или полигональной формы с площадью тела от 600 до 900 мкм², расположенные, преимущественно, в каудальной части вентральной поверхности мозга. Хотя их количество в этот период невелико, к 4 ч оно существенно возрастает, к 6 ч — вновь сокращается, а после 12 ч ано́ксии HIF-1α-позитивные нейроны в этой группе не выявляются. Вместе с тем, к 6 ч ано́ксии экспрессия HIF-1α появляется в многочисленных мелких (площадью 50–70 мкм²) гемцитоподобных клетках, лежащих в основном по ходу сосудов в области медиального антеннулярного нейропила (рис. 2, г).

Обсуждение полученных данных. Представленные материалы свидетельствуют, что фактор, индуцированный гипоксией HIF-1α, определяется в мозгу у краба *Eriocheir japonica*

как в обычных условиях жизнедеятельности организма, так и при экспериментальном воздействии. В мозгу методом вестерн-иммуноблоттинга нами показано присутствие полипептидного антигена с молекулярной массой 116 килодальтон, перекрестно реагирующего с антителами к HIF-1α мыши. Экспрессия этого белка в последние годы установлена во многих органах и тканях у позвоночных и беспозвоночных животных [7, 10, 17], однако в ЦНС ракообразных наличие HIF-1α показано исключительно биохимическими методами [9]. При изучении распределения нейронов, содержащих HIF-1α в нескольких клеточных группах мозга у краба *E. japonica*, обнаружено, что у intactных животных экспрессия наблюдается в небольшом количестве нейронов головного ганглия и существенно возрастает в некоторых участках мозга при ано́ксии, вызванной депривацией воды. Вполне вероятно, что увеличение концентрации HIF-1α в нейронах экспериментальной группы животных связано с его нейропротективным действием. Недавно было показано, что повышение уровня экспрессии HIF-1α в клетках мозга у крыс защищает их от гибели, вызванной кислородным голоданием [11, 18]. Выявлена зависимость концентрации HIF-1α от тяжести и длительности гипоксии: при непродолжительном и умеренном ее действии наблюдается быстрое и значительное повышение содержания HIF-1α в мозгу, в результате чего запускается каскад нейропротективных механизмов, защищающих нейроны, макро- и микроглию, эндотелий сосудов мозга от повреждений, вызванных кислородным

голоданием [11, 15, 18]. При хронической и тяжелой гипоксии экспрессия HIF-1 α в мозгу у крыс снижается за счет увеличения скорости его деградации и апоптоза нейронов [4, 18].

В ЦНС у морских беспозвоночных механизмы активации HIF-1 α и его роль в формировании толерантности к гипоксии мало изучены. Нам известна лишь одна такая работа, в которой приводятся материалы об усилении экспрессии HIF-1 α в мозгу рака богомола (*Oratosquilla oratoria*) при хронической гипоксии, вызванной антропогенным загрязнением среды обитания [9]. Вместе с тем, имеются сообщения об изменениях содержания этой сигнальной молекулы при гипоксии в других органах и тканях морских беспозвоночных [7, 8, 12]. Активация HIF-1 α при гипоксии обычно сопровождается экспрессией генов, регулирующих энергетический обмен [10, 12, 17].

В отличие от позвоночных обязательным условием выживания у беспозвоночных при гипоксии является снижение общего уровня потребления аденозинтрифосфата за счет метаболической депрессии, связанной с изменениями белкового обмена [6, 19]. Однако не все нейроны уменьшают свои метаболические потребности при гипоксии в равной степени. У некоторых видов позвоночных, устойчивых к гипоксии, например окрашенной черепахи, большая часть нейронов мозга при ограниченном поступлении кислорода резко сокращают свои метаболические потребности, другие нейроны, контролирующие критические функции организма, необходимые для его выживания, не только не сокращают, но, наоборот, наращивают свой метаболический потенциал, действуя аналогично центральным хемосенсорам кислорода у млекопитающих [3]. В этих, по авторской терминологии, «бдительных» нейронах, которые особенно важны как для краткосрочных, так и долгосрочных адаптаций к гипоксии, уровень экспрессии HIF-1 α особенно высок.

По нашим данным, у *E. japonica* такие нейроны находятся, прежде всего, в группе 6, клетки которой играют важную роль в интегративных процессах ЦНС, в частности, в формировании двигательных программ поведения в экстремальных ситуациях [16]. Уже после 2-часовой аноксии в этой клеточной группе резко увеличивается число иммунопозитивных нейронов, достигая максимума через 6 ч экспериментального воздействия. Некоторые из этих нейронов отличаются очень высоким уровнем экспрессии HIF-1 α . Между 2–4 ч аноксии возрастает, хотя и не так значительно, число HIF-1 α -позитивных нейронов и в группе 9/11, где находятся клетки, участвующие в обработке мультимодальной информации,

поступающей в мозг [14]. Известно, что у млекопитающих экспрессия HIF-1 α в нейронах во многом обеспечивает быстрые и адекватные ответы на гипоксический стресс стимуляцией центров дыхания и вазомоторики, а также включением генов, отвечающих за энергетический метаболизм, ангиогенез и апоптоз, повышая устойчивость к гипоксии [18]. В клеточной группе 17, участвующей в иннервации внутренних органов краба, количество HIF-1 α -позитивных нейронов повышается к 4 ч аноксии, но затем быстро сокращается. После 6-часовой аноксии доля HIF-1 α -позитивных нейронов во всех клеточных группах сокращается (в группе 17 в этот период они не определяются), но HIF-1 α появляется в гемоцитах. Недавно представлены доказательства того, что у ракообразных гемоциты обладают свойствами стволовых клеток [1, 2]. При различных экстремальных воздействиях, в том числе при гипоксии, они могут мигрировать из органов иммунной системы — места своего образования — в мозг, где при сокращении числа нейронов формируют популяцию клеток-предшественников, способных восполнить дефицит нейронов.

Таким образом, в мозгу краба *E. japonica* имеются, по крайней мере, две популяции клеток, экспрессирующих HIF-1 α : нейроны и гемоциты. С их помощью фактор HIF-1 α может участвовать в реализации центральных механизмов регуляции кислородного гомеостаза при адаптации к краткосрочной и долгосрочной гипоксии путем изменения метаболизма и локомоторных поведенческих реакций. Гемоциты не только обеспечивают более высокий уровень содержания HIF-1 α в мозгу, способствуя усилению нейропротекции, но и, возможно, восполняют часть нейронов, утраченных в процессе развития хронической гипоксии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 13-04-01664.

ЛИТЕРАТУРА

1. Beltz B.S., Zhang Y., Benton J.L., Sandeman D.C. Adult neurogenesis in the decapod crustacean brain: a hematopoietic connection? // Eur. J. Neurosci. 2011. Vol. 34. P. 870–883.
2. Benton J.L., Kery R., Li J. et al. Cells from the immune system generate adult-born neurons in crayfish // Dev. Cell. 2014. Vol. 30, № 3. P. 322–333.
3. Bickler P.E., Donohoe P.H., Buck L.T. Molecular adaptations for survival during anoxia: lessons from lower vertebrates // Neuroscience. 2002. Vol. 8. P. 234–242.
4. Bruick R.K. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway, regulation of the hypoxia-inducible transcription factor // Genes Dev. 2003. Vol. 17. P. 2614–2623.
5. Frenkel L., Maldonado H., Delorenzi A. Memory strengthening by a real-life episode during reconsolidation: an outcome of water

- deprivation via brain angiotensin II // *Eur. J. Neurosci.* 2005. Vol. 22. P. 1757–1766.
6. Gorr T.A., Wichmann D., Hu J. et al. Hypoxia tolerance in animals: biology and application // *Physiol. Biochem. Zool.* 2010. Vol. 83. P. 733–742.
 7. Hardy K.M., Follett C.R., Burnett L.E., Lema S.C. Gene transcripts encoding hypoxia-inducible factor (HIF) exhibit tissue- and muscle fiber type-dependent responses to hypoxia and hypercapnic hypoxia in the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus* // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2012. Vol. 163, № 1. P. 137–146.
 8. Kawabe S., Yokoyama Y. Role of Hypoxia-inducible factor α in response to hypoxia and heat shock in the pacific oyster *Crassostrea gigas* // *Mar. Biotechnol.* 2012. Vol. 14. P. 106–119.
 9. Kodama K., Rahman M.S., Horiguchi T., Thomas P. Assessment of hypoxia-inducible factor-1 α mRNA expression in mantis shrimp as a biomarker of environmental hypoxia exposure // *Biol. Lett.* 2012. Vol. 8, № 2. P. 278–281.
 10. Li T., Brouwer M. Hypoxia-inducible factor, gsHIF, of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*: molecular characterization and response to hypoxia // *Comp. Biochem. Physiol.* 2007. Vol. 147. P. 11–19.
 11. López-Hernández B., Posadas I., Podlesniy P. et al. HIF-1 α is neuroprotective during the early phases of mild hypoxia in rat cortical neurons // *Exp. Neurol.* 2012. Vol. 233, № 1. P. 543–544.
 12. Piontkivska H., Chung J.S., Ivanina, A.V. et al. Molecular characterization and mRNA expression of two key enzymes of hypoxia-sensing pathways in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin): hypoxia-inducible factor α (HIF- α) and HIF-prolyl hydroxylase (PHD) // *Comp. Biochem. Physiol.* 2011. Vol. 6. P. 103–114.
 13. Sandeman D.C., Sandeman R.E., Derby C., Schmidt M. Morphology of the brain of crayfish, crabs, and spiny lobsters: a common nomenclature for homologous structures // *Biol. Bull.* 1992. Vol. 183. P. 304–326.
 14. Schmidt M., Derby C.D. Cytoarchitecture and ultrastructure of neural stem cell niches and neurogenic complexes maintaining adult neurogenesis in the olfactory midbrain of spiny lobsters, *Panulirus argus* // *Comp. Neurol.* 2011. Vol. 519, № 12. P. 2283–2319.
 15. Sharp F.R., Bernaudin M. HIF-1 and oxygen sensing in the brain // *Nat. Rev. Neurosci.* 2004. Vol. 5. P. 437–448.
 16. Shirinyan D., Teshiba T., Taylor K. et al. Rostral ganglia are required for induction but not expression of crayfish escape reflex habituation: role of higher centers in reprogramming low-level circuits // *J. Neurophysiol.* 2006. Vol. 95. P. 2721–2724.
 17. Soñanez-Organis J.G., Peregrino-Uriarte A.B., Gómez-Jiménez S. et al. Molecular characterization of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and tissue specific expression under hypoxia // *Comp. Biochem. Physiol.* 2009. Vol. 150. P. 395–405.
 18. Vangeison G., Carr D., Federoff H.J., Rempe D.A. The good, the bad, and the cell type-specific roles of hypoxia inducible factor-1 α in neurons and astrocytes // *J. Neurosci.* 2008. Vol. 28. P. 1988–1993.
 19. Zarembek K.A., Malech H.L. HIF-1 α : a master regulator of innate host defenses? // *J. Clin. Invest.* 2005. Vol. 115. P. 1702–1704.

Поступила в редакцию 27.06.2015

LOCALIZATION AND QUANTITATIVE ASSESSMENT OF OXYGEN-DEPENDENT HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR 1 α IN THE BRAIN OF MITTEN CRAB ERIOCHEIR JAPONICA IN NORM AND IN ACUTE ANOXIA (AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY)

V.M.Chertok¹, Ye.P.Kotsyuba²

Using immunoblotting and immunocytochemistry, the expression of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) was studied in the brain of the mitten crab *Eriocheir japonica* in norm and at 2, 4, 6 and 12 hours of anoxia on the model of water deprivation. In intact crabs, the number of immunopositive neurons was small, but it increased with anoxia duration. Particularly pronounced increase in the proportion of neurons with the HIF-1 α expression was found in cell group 6. In group 9/11, the highest expression index was observed between 2–6 hours of anoxia. In group 17, significant changes in the proportion of immunopositive cells was observed only after 2 hours of anoxia. After 6 hours of anoxia, proportion of neurons with HIF-1 α expression within all cell groups was reduced, but the reactions appeared in the blood cells. It is assumed that the increase in the proportion of immunopositive neurons and the appearance of the expression of HIF-1 α in blood cells in the anoxic brain play an important role in providing compensatory and protective processes, enhancing adaptive capacity of mitten crab under the conditions of hypoxic stress.

Key words: *central nervous system, the mitten crab, hypoxia-inducible factor 1 α , anoxia*

¹ Department of Human Anatomy, Vladivostok State Medical University; ² A.V.Zhirmunskiy Institute of Marine Biology, RAS Far-Eastern Branch, Vladivostok