

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ NO-ПОЗИТИВНЫХ НЕЙРОНОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ РЫБ И ЗЕМНОВОДНЫХ

В.И. Дунай, С.Б. Мельнов, Б.В. Лысый // Наука и инновации. – 2008. – № 1 (59). – С. 34-36.

Аннотация: Изучено распределение НАДФН-д/CNO-позитивных нервных клеток в головном мозге у рыб и земноводных, как представителей анамний и у птиц и млекопитающих, как представителей амниот. Установлено, что в процессе филогенеза параллельно с усложнением и совершенствованием нервной системы и как следствием, приспособлением к условиям окружающей среды, наблюдается увеличение числа NO-синтезирующих нервных клеток в промежуточном мозге.

Цель данной работы – изучение распределения NO-позитивных нервных клеток в головном мозге рыб и земноводных как представителей анамний.

Литературные данные свидетельствуют, что NO, выделяемый CNO-позитивными нервными клетками, участвует в становлении структуры и функции нервной системы в онтогенезе [1], а также принимает участие в центральной регуляции большинства физиологических функций взрослого организма [2, 3, 4]. Однако, несмотря на это, филогенез и онтогенез центральной NO-ергической системы и ее роль в развитии функциональных систем остаются малоизученными.

В экспериментальной части работы использованы 20 взрослых особей карпа чешуйчатого (*Cyprinus carpio*, надкласс рыбы) и 20 взрослых особей лягушки озерной (*Rana ridibunda*, класс земноводные). Названные животные относятся к анамниям, так как у них в процессе эмбриогенеза не возникает зародышевой оболочки (амниона) и особого зародышевого органа (аллантаиса) и они связаны в своем существовании с водной средой.

У карпа и лягушки после извлечения головного мозга выделяли изучаемую структуру: продолговатый, средний, промежуточный и передний мозг.

Специальными исследованиями было доказано, что нейронная синтаза NO (CNO) является никотинамидаденинди-нуклеотидфосфат-диафоразой [5]. Во-первых, локализация в центральной и периферической нервной системе НАДФН-д-содержащих нейронов, окрашенных гистохимически, соответствует локализации нервных клеток, содержащих CNO, окрашенных с применением методов иммуногистохимии. Во-вторых, CNO и НАДФН-д обнаруживают сходные иммунохимические и биохимические свойства. В-третьих, НАДФН-д-активность выявляется *de novo* у клеток с трансформированной кДНК к CNO. использование гистохимической реакции на НАДФН-д для идентификации CNO-содержащих нейронов возможно только при условии, что исследуемая ткань проходит фиксацию в параформальдегиде. Установлено [5], что при фиксации с

параформальдегидом инактивируются все НАДФН-зависимые ферменты-окислители, за исключением СНО. таким образом, при условии фиксации ткани в параформальдегиде проведение гистохимической реакции на НАДФН-д для идентификации NO-синтезирующих нервных клеток является адекватным методом, широко применяемым в настоящее время.

В работе использован метод идентификации НАДФН-д-содержащих нейронов, разработанный Scherer-Singler [6], в модификации Hore и Vincent [7].

У животных целиком извлекали головной мозг. Отделяли изучаемые структуры и дополнительно их фиксировали, согласно рекомендации Matsumoto [8], 90 мин. в 4%-ном параформальдегиде на фосфатном буфере (0,1 М, рН 7,4). Участки мозга шесть раз по 30 мин. отмывали на холоде с использованием 0,1 М раствора трис-НСl (рН 8,0) и инкубировали в 10- и 25%-ном растворах сахарозы на трис-НСl (0,1 М, рН 8,0) в течение 1,5 и 12 часов соответственно.

Объекты помещали на охлажденные металлические блоки, которые ставили в криостат (-25°C) на 20 мин. для замораживания. из замороженной ткани готовили серийные срезы толщиной 25 мкм, которые наклеивали на предметные стекла, предварительно подвергшиеся хром-желатиновой обработке, и высушивали.

Срезы отмывали от сахарозы в 0,1 М растворе трис-НСl (рН 8,0) в течение 5 мин. Гистохимическая процедура заключалась в инкубации срезов в растворе 0,1 М трис-НСl (рН 8,0), содержащем НадФН (1 мМ), нитросиний тетразолий (0,5 мМ), тритон X-100 (0,3%) и дикумарол (0,1 мМ) на протяжении 1–2 часов при 22°C и относительной влажности 95–100 %. По окончании гистохимической реакции срезы промывали в растворе трис-НСl в течение 5 мин., обезвоживали в этаноле, заключали в канадский бальзам и накрывали покровными стеклами.

Специфичность гистохимической реакции проверялась инкубацией нескольких срезов в растворах, не содержащих нитросиний тетразолий или НАДФН, а также в растворе, содержащем НАДФ вместо НАДФН. Химическая основа реакции заключается в образовании преципитата формазана при восстановлении солей тетразолия НАДФН-диафоразой (СНО) в присутствии НАДФН. таким образом, гистохимическая реакция не должна наблюдаться в случае отсутствия в инкубационной среде любого из основных компонентов (нитросиний тетразолий, НАДФН), а также в случае использования НАДФ вместо НАДФН.

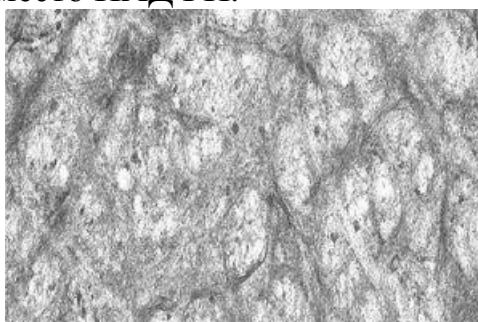


Рис.1. НАДФН-д-позитивные нервные клетки в переднем отделе гипоталамуса карпа. Микрофото (x100)

При микроскопическом исследовании срезов головного мозга карпа, окрашенных на НАДФН-д/CNO, установлено, что все его изучаемые структуры содержат НАДФН-д /CNO-позитивные нейроны.

При изучении продолговатого мозга, окрашенного на НАДФН-д /CNO, установлено, что НАДФН-д/CNO-позитивные нервные клетки имеют небольшие размеры – 6–12 мкм, плотность их расположения – 48–64 в мм².

В среднем мозге карпа наблюдается увеличение размеров нервных клеток, содержащих до 10–16 мкм НАДФН-д/CNO. Однако плотность их расположения невелика – 12–20 в мм².

НАДФН-д/CNO-позитивные нервные клетки в переднем и заднем отделах гипоталамуса имеют размеры 6–10 мкм, плотность их расположения – 22–34 в мм² (рис. 1).

НАДФН-д/CNO-позитивные нервные клетки у карпа обнаружены в переднем мозге, нейроны слабоокрашенные, мелких размеров (4–6 мкм), с невысокой плотностью расположения (2–6 в мм²).

Головной мозг лягушки также содержит НАДФН-д/CNO-позитивные нейроны во всех изучаемых структурах.

Установлено, что НАДФН-д/CNO-позитивные нервные клетки продолговатого мозга у лягушки имеют размеры 10–16 мкм, плотность их расположения – 74–82 в мм².

В среднем мозге лягушки наблюдаются НАДФН-д/CNO-содержащие нейроны размером 8–14 мкм. Плотность их расположения – 18–26 в мм².

Передние и задние отделы гипоталамуса лягушки содержат слабоокрашенные НАДФН-д/CNO-позитивные нейроны мелких размеров (6–10 мкм), плотность их расположения – 40–48 в мм² (рис. 2).

При изучении срезов переднего мозга лягушки, окрашенных на НАДФН-д/CNO, установлено наличие в них НАДФН-д/CNO-позитивных нейронов размером 6–12 мкм. Плотность расположения – 4–12 в мм².

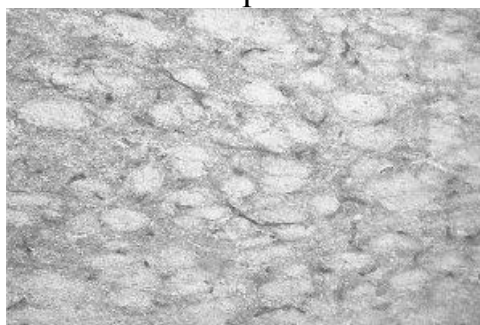


Рис. 2. НАДФН-д-позитивные нервные клетки в переднем отделе гипоталамуса лягушки.

Таким образом, установлено, что все изучаемые структуры головного мозга карпа и лягушки содержат НАДФН-д/CNO-позитивные нервные клетки. В продолговатом мозге у исследованных животных наблюдалось

большее количество НАДФН-д/CNO-содержащих нейронов по сравнению с другими изученными отделами мозга, также обнаружено увеличение количества НАДФН-д/CNO-содержащих нейронов в продолговатом мозге земноводных по сравнению с рыбами (рис. 3).

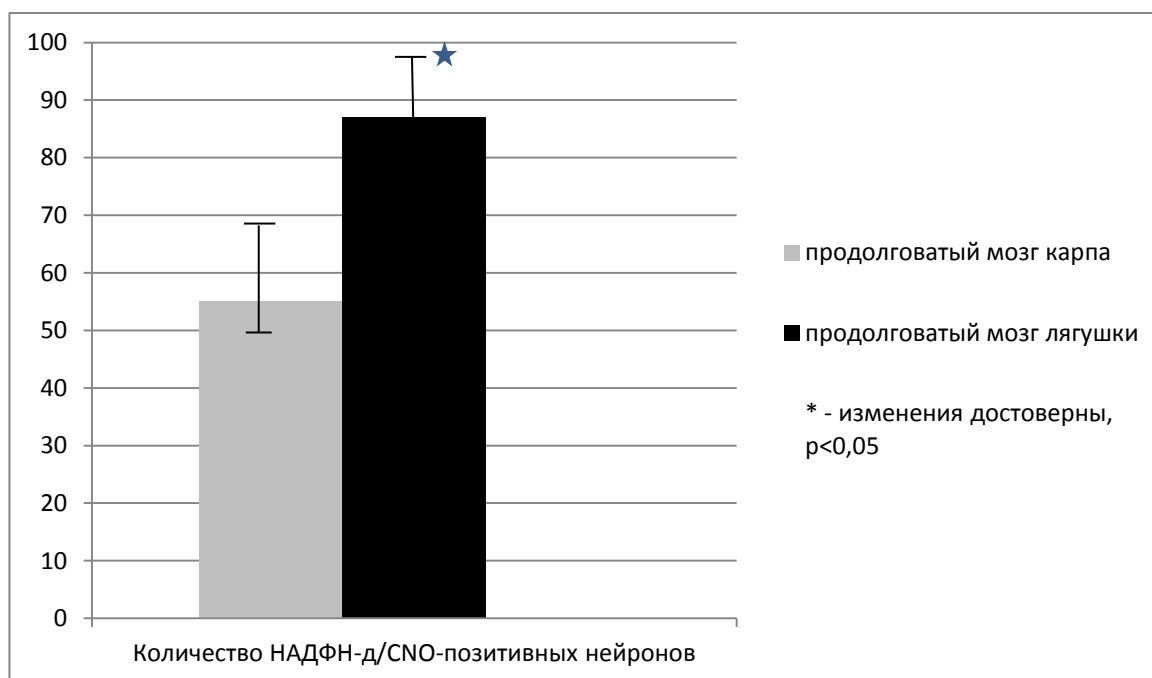


Рис. 3. Количество НАДФН-д/CNO-позитивных нервных клеток в продолговатом мозге карпа и лягушки в мм²

Предпосылкой к постановке задач настоящего исследования служили развиваемые представления о том, что NO, синтезируемый нервными клетками, может участвовать в развитии структуры и функции ЦНС, являясь эффекторной молекулой, вызывающей гибель определенных клеточных структур, а также играя важную роль в механизмах роста нервных окончаний и формирования синаптических контактов. Процесс эволюции сопровождается усложнением организации нервной системы. Для понимания филогенеза центральной NO-ергической системы представляло интерес изучить распределение НАДФН-д/CNO-позитивных нервных клеток в головном мозге рыб и земноводных как организмов, сохранивших тесную связь с водной средой.

Доказано, что в продолговатом мозге у исследованных животных наблюдалось большее количество НАДФН-д/CNO-содержащих нейронов по сравнению с другими изученными отделами мозга. также установлено увеличение количества НАДФН-д/CNO-содержащих нейронов в продолговатом мозге земноводных по сравнению с рыбами. Учитывая, что NO является одним из важнейших факторов, обеспечивающих развитие нервной системы, можно предположить, что увеличение количества НАДФН-д /CNO-содержащих нейронов в продолговатом мозге коррелирует с морфо-функциональным усложнением продолговатого мозга земноводных по сравнению с рыбами, что также связано с изменениями в дыхательной и

сердечно-сосудистой системах и, как следствие, с выходом на сушу предков современных земноводных.

Литература

1. Dawson T.M., Hwang P.M., Snyder S.H. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues // Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1991, vol. 88, №17. P. 7797–7801.
2. Gourine A.V. Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced fever in conscious rabbits // J. Physiol, 1994, vol. 475. P. 28.
3. Amir S., De Blasio E., English A. M. NG-Monomethyl-L-arginine co-injection attenuates the thermogenic and hyperthermic effects of E2 prostaglandin microinjection into the anterior hypothalamic preoptic area in rats // Brain Res, 1991, vol. 556. P. 157–160.
4. Dunai V.I. Development of the central NO-ergic systems in ontogenesis of maturenate mammals // Basic and Applied Thermophysiology, Minsk, 2000. P. 183–184.
5. Pasqualotto B.A., Hope B.T., Vincent S.R. Citrulline in the rat brain immunohistochemistry and coexistence with NADPH-diaphorase // Neurosci. Lett, 1991, vol. 128, №2. P. 155–160.
6. Scherer-Singler U., Vincent S.R., Kimura H., McGeer E.G. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry // J. Neurosci. Methods, 1983, vol. 9, №3. P. 229–234.
7. Hope B.T., Vincent S.R. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase // J. Histochem. Cytochem, 1989, vol. 37. P. 653–661.
8. Matsumoto T., Kuk J.E., Forstermann U. 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, №1. P. 61–64.