

В. И. Дунай¹, С. Б. Мельнов², Б. В. Лысый³

¹Белорусский государственный университет,

²Международный государственный экологический университет имени А. Д. Сахарова,

³Белорусский государственный педагогический университет имени М. Танка,

г. Минск, Республика Беларусь

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ НЕЙРОНОВ, СОДЕРЖАЩИХ НАДФН-ДИАФОРАЗУ/CNO В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ У АНАМНИЙ

Аннотация

Целью данной работы явилось изучение распределения НАДФН-д/CNO-позитивных нервных клеток в головном мозге у рыб и земноводных как представителей анамний.

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 установлено увеличение количества НАДФН-д/CNO-содержащих нейронов в продолговатом мозге земноводных по сравнению с рыбами.

Ø **Ключевые слова:** онтогенез, NO-синтеза, гипоталамус.

У позвоночных животных высшим координирующим центром, объединяющим и регулирующим все проявления жизнедеятельности и опосредствующим взаимосвязи организма со средой, является головной мозг. По этой причине прогрессивная эволюция животных, выражающаяся в повышении их организации, дифференцировании и специализации различных органов и систем, неразрывно связана с развитием головного мозга и дифференциацией его отделов, которая обеспечивает целостность организма.

В настоящее время установлено, что NO-синтезирующие нейроны широко распространены в ЦНС млекопитающих. Большое количество таких нервных клеток содержат мозжечок, гиппокамп и ряд других структур головного мозга [2]. Доказано также участие NO в регуляции различных физиологических функций [1]. Имеются предположения, что NO может являться одним из важнейших факторов, участвующих в развитии структуры и функции центральной нервной системы, являясь молекулой, вызывающей гибель определенных клеточных структур, а также играя важную роль в механизмах роста нервных окончаний и формирования синапсов [4]. Получены доказательства участия NO в центральных механизмах терморегуляции при перегревании и экспериментальной лихорадке [3].

Таким образом, литературные данные свидетельствуют о том, что NO, выделяемый CNO-позитивными нервными клетками, участвует в становлении структуры и функции нервной системы в онтогенезе, а также у взрослого организма принимает участие в центральной регуляции большинства физиологических функций. Однако, несмотря на это, филогенез и онтогенез центральной NO-ергической системы и ее роль в развитии функциональных систем остаются не изученными.

Целью данной работы явилось изучение распределения НАДФН-д/CNO – позитивных нервных клеток в головном мозге у рыб и земноводных, как представителей анамний.

Материалы и методы исследования

В экспериментальной части работы использованы 20 взрослых особей карпа чешуйчатого (*Cyprinus carpio*) – представитель надкласса рыбы и 20 взрослых особей лягушки озерной (*Rana ridibunda*) – представитель класса земноводные. Названные животные относятся к

анамниям, так как у них в процессе эмбриогенеза не возникает зародышевой оболочки – амниона и особого зародышевого органа – аллантаоиса и они связаны в своем существовании с водной средой.

У карпа и лягушки после извлечения головного мозга, выделяли изучаемую структуру (продолговатый мозг, средний мозг, промежуточный мозг и передний мозг). Схематично мозг карпа и лягушки представлен на рис. 1 и 2 соответственно.

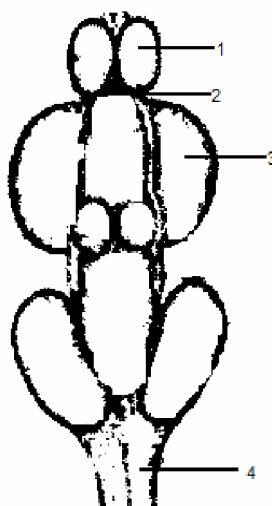


Рис. 1. Схема головного мозга карпа:

1 – передний мозг; 2 – промежуточный мозг; 3 – зрительная доля; 4 – продолговатый мозг

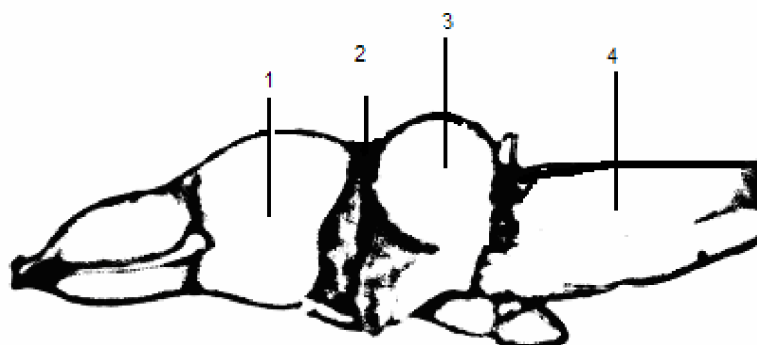


Рис. 2. Схема головного мозга лягушки:

1 – передний мозг; 2 – промежуточный мозг; 3 – средний мозг; 4 – продолговатый мозг

Специальными исследованиями было убедительно доказано, что нейронная синтаза NO (CNO) является никотинамидаденин-нуклеотидфосфат-диафоразой [7]. 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 [7], что при фиксации с использованием параформальдегида инактивируются все НАДФН-зависимые ферменты-окислители, за исключением CNO. Таким образом, при условии фиксации ткани в параформальдегиде, использование гистохимической реакции на

НАДФН-д для идентификации NO-синтезирующих нервных клеток является адекватным методом и широко используется в настоящее время.

В работе использован метод идентификации НАДФН-д-содержащих нейронов, разработанный Scherer-Singler *et al* [8], в модификации Норе и Vincent [5].

У животных целиком извлекали головной мозг. Отделяли изучаемые структуры и дополнительно их фиксировали согласно рекомендации Matsumoto *et al.* [6] 90 минут в 4 % параформальдегиде на фосфатном буфере (0,1М, рН7,4). Участки мозга шесть раз по 30 минут отмывали на холоде с использованием 0,1 М раствора Трис-НСI (рН 8,0) и инкубировали в 10 % и 25 % растворах сахарозы на Трис-НСI (0,1М, рН8,0) в течение 1,5 и 12 часов соответственно.

Объекты помещали на охлажденные металлические блоки, которые ставили в криостат (– 25 °С) 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-НСI (рН 8,0) в течение 5 мин. Гистохимическая процедура заключалась в инкубации срезов в растворе 0,1 М Трис-НСI (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 ч при 22 °С и относительной влажности 95–100 %. По окончании гистохимической реакции срезы промывали в растворе Трис-НСI в течение 5 минут, 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 (CNO) 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.

Результаты

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

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

В среднем мозге карпа наблюдается увеличение размеров нервных клеток, содержащих НАДФН-д/CNO до 10–16 мкм. Однако плотность их расположения не велика – 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. 3).

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. 4).

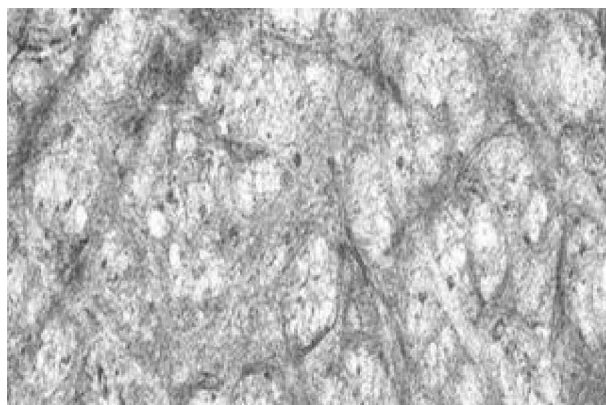


Рис. 3. НАДФН-д – позитивные нервные клетки в переднем отделе гипоталамуса карпа. Микрофото (×40)

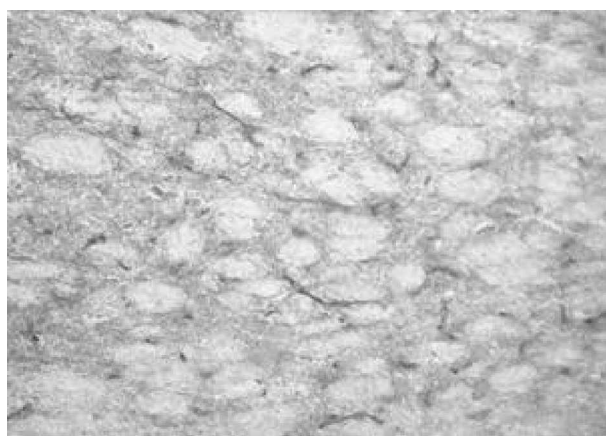


Рис. 4. НАДФН-д – позитивные нервные клетки в переднем отделе гипоталамуса лягушки. Микрофото (×40)

При изучении срезов переднего мозга лягушки, окрашенных на НАДФН-д/CNO, установлено наличие в них НАДФН-д/CNO-позитивных нейронов, с размерами от 6 до 12 мкм. Плотность расположения от 4 до 12 в мм⁻².

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 установлено увеличение количества НАДФН-д/CNO-содержащих нейронов в продолговатом мозге земноводных по сравнению с рыбами.

Обсуждение результатов

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 у рыб и земноводных, как организмов сохранивших тесную связь с водной средой.

Установлено, что в продолговатом мозге у исследованных животных наблюдалось большее количество НАДФН-д/CNO-содержащих нейронов по сравнению с другими изучен-

ными отделами мозга. Также установлено увеличение количества НАДФН-д/СНО-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/СНО-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 следствием с выходом на сушу предков современных земноводных.

Список литературы

1. Amir, S. N^G-Monomethyl-L-arginine co-injection attenuates the thermogenic and hyperthermic effects of E₂ prostaglandin microinjection into the anterior hypothalamic preoptic area in rats / S. Amir., E. De Blasio, A. M. English // *Brain Res.* – 1991. – Vol. 556. – P. 157–160.
2. Dawson, T. M. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues / T. M. Dawson, P. M. Hwang, S. H. Snyder // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* – 1991. – Vol. 88, N.17. – P. 7797–7801.
3. Dunai, V. I. Effect of the NO synthase inhibitor, L-NAME, on body temperature in birds in different periods of postnatal ontogenesis / V. I. Dunai, A. V. Gourine // *Recent advances in thermal biology.* Edited by V. N. Gourine. – Minsk. – 1999. – P. 18–19.
4. Gourine, A. V. Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced fever in conscious rabbits / A. V. Gourine // *J. Physiol.* – 1994. – Vol. 475. – P. 28.
5. Hope, B. T. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase / B. T. Hope, S. R. Vincent // *J. Histochem.Cytochem.* – 1989. – Vol. 37. – P. 653–661.
6. Matsumoto, T. A correlation between soluble brain nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase activity is only seen after exposure of the tissue to fixative / T. Matsumoto, J. E. Kuk, U. Forstermann // *Neurosci. Lett.* – 1993. – Vol. 155, N. 1. – P. 61–64.
7. Pasqualotto, B. A. Citrulline in the rat brain – immunohistochemistry and coexistence with NADPH-diaphorase / B. A. Pasqualotto, B. T. Hope, S. R. Vincent // *Neurosci.Lett.* – 1991. – Vol. 128, N. 2. – P. 155–160.
8. Scherer-Singler, U. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry / U. Scherer-Singler, S. R. Vincent, H. Kimura, E. G. McGeer // *J. Neurosci.Methods.* – 1983. – Vol. 9, N. 3. – P. 229–234.

V. I. Dunaj, S. B. Mel'nov, B. V. Lysyj

ALLOCATION OF THE NERVE CELLS

CONTAINING NADFH-DIAPHORASE/NO-SYNTASE IN CEPHALON AT ANAMNIA

The aim of this work was studying of the distribution of NADFH-d/CNO – positive nervous cells in brain with fishes and Amphibia such as representatives of anamnes.

It has been positioned that all of studying structures of the brain of carp and frog have NADFH-d/CNO – positive nervous cells. In intermediate brain with the investigated animals it was observed a lot of numbers NADFH-d/CNO neurons in the comparing with other studied parts of the brain. Also it was positioned increasing of numbers NADFH-d/CNO neurons in intermediate brain with Amphibia with the comparing with fishes.