

УДК 575.322:611.814.1)-092.9

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ NO-ПОЗИТИВНЫХ НЕЙРОНОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ У ПОЙКИЛОТЕРМНЫХ ОРГАНИЗМОВ

В.И. Дунай, К.Б.Н.

Кафедра психофизиологии гуманитарного факультета
УО «Белорусский государственный университет»

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

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.

Ключевые слова: онтогенез, NO-синтеза, гипоталамус.

The aim of this research was to study the distribution of NADPH-d/CNO-positive nervous cells of the brain in fish and amphibians as representatives of poikilothermal animals.

It has been established that all the studied structures of the brain of carp and frog have NADPH-d/CNO-positive nervous cells. A large amount of NADPH-d/CNO-containing neurons was observed in the medulla oblongata of the investigated animals as compared with the other studied parts of the brain. The increase of the number of NADPH-d/CNO-containing neurons in the medulla oblongata of amphibians as compared with fish has also been determined.

Key words: ontogenesis, NO-synthase, hypothalamus.

Оксид азота (NO) в последнее время привлекает пристальное внимание биологов и медиков. NO образуется в результате окисления аминокислоты аргинина с одновременным синтезом другой аминокислоты цитрулина под влиянием фермента NO-синтазы (CNO) [1].

В настоящее время доказано участие NO в регуляции различных физиологических функций [2, 3]. Имеются предположения о том, 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]. Установлено, что NO-синтезирующие нейроны широко распространены в ЦНС млекопитающих [5]. В нервной системе NO имеет большое значение как в нормальных физиологических условиях, так и при различной патологии. Нейроны, содержащие NO-синтазу, находятся во многих отделах ЦНС и большинстве изученных периферических ганглиев нервной системы. Большое количество таких нервных клеток содержат мозжечок, гиппокамп и ряд других структур головного мозга [5]. Значение NO в ЦНС в нормальных условиях связывают с тремя процессами (так называемая NO-гипотеза): 1) участие в межнейронной связи в качестве своеобразного нейромедиатора, причем, основное значение, как полагают, NO имеет в синаптической пластичности, под которой понимают эффективность синаптической передачи; 2) регу-

ляция церебрального кровотока и 3) установление межнейронных синаптических взаимосвязей во время развития нервной системы [6].

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 остаются неизученными.

Целью данной работы явилось изучение распределения НАДФН-д/CNO-позитивных нервных клеток в головном мозге у рыб и земноводных, как представителей пойкилотермных организмов, что является важным для понимания филогенетических закономерностей в развитии центральной NO-ергической системы.

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.

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

Специальными исследованиями было убедительно доказано, что нейронная синтаза NO (CNO) является никотинамидадениндинуклеотидфосфат-

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 [8], в модификации Норе и Vincent [9].

У животных целиком извлекали головной мозг. Отделяли изучаемые структуры и дополнительно их фиксировали, согласно рекомендации Matsumoto [10], 90 минут в 4% параформальдегиде на фосфатном буфере (0,1M, pH7,4). Участки мозга шесть раз по 30 минут отмывали на холоде с использованием 0,1 M раствора Трис-НСI (pH 8,0) и инкубировали в 10% и 25% растворах сахарозы на Трис-НСI (0,1M, pH8,0) в течение 1,5 и 12 часов, соответственно.

Объекты помещали на охлажденные металлические блоки, которые ставили в криостат (-25°C) на 20 минут 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 M растворе Трис-НСI (pH 8,0) в течение 5 мин. Гистохимическая процедура заключалась в инкубации срезов в растворе 0,1 M Трис-НСI (pH 8,0), содержащем НАДФН (1 mM), нитросиний тетразолий (0,5 mM), Тритон X-100 (0,3 %) и дикумарол (0,1mM) на протяжении 1-2 ч. при 22°C 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 формаза 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 небольшие размеры 6-12 мкм, плотность их расположения – 48-64 в мм^2 .

В среднем мозге карпа наблюдается увеличение размеров нервных клеток, содержащих НАДФН-д/CNO до 10-16 мкм. Однако плотность их расположения невелика – 12-20 в мм^2 .

НАДФН-д/CNO – позитивные нервные клетки в переднем и заднем отделах гипоталамуса имеют размеры 6-10 мкм, плотность их расположения – 22-34 в мм^2 (рисунок 1).

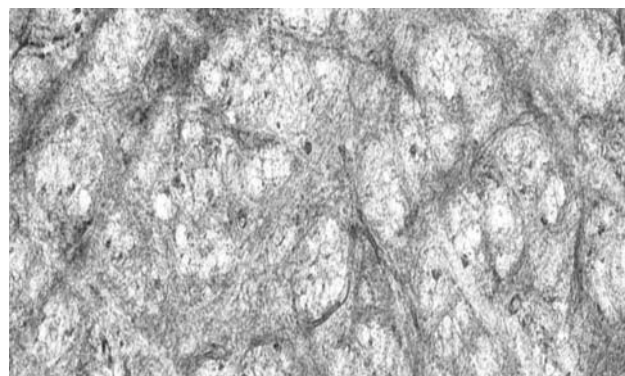


Рисунок 1 – НАДФН-д – позитивные нервные клетки в переднем отделе гипоталамуса карпа.
Микрофото (x40)

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 мм^2).

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 (рисунок 2).

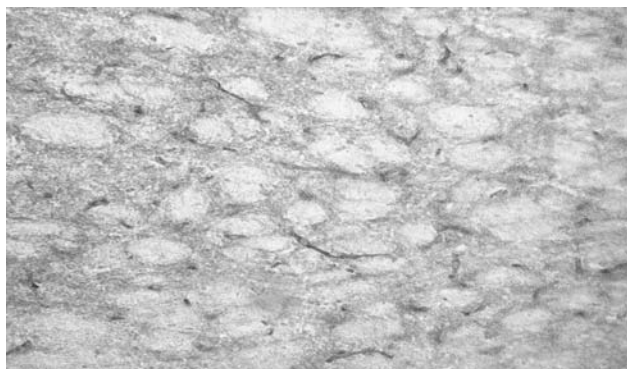


Рисунок 2 – НАДФН-д – позитивные нервные клетки в переднем отделе гипоталамуса лягушки. Микрофото (x40)

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 мм².

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 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 следствием, с выходом на сушу предков современных земноводных.

Литература

1. Реутов, В.П. Цикл окиси азота в организме млекопитающих / В.П. Реутов // Успехи биол. химии. – 1995. – Т. 35. – С. 189-228.
2. 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.
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. 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.
6. Сосунов, А. А. Оксид азота как межклеточный посредник / А. А. Сосунов // Соросовский Образовательный Журнал. – 2000. – № 12. – С. 27-32.
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. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry / U. Scherer-Singler [et al.] // J. Neurosci. Methods. – 1983. – Vol. 9, N. 3. – P. 229-234.
9. Hope, B. T. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase / B. T. Hope, S. R. Vincent // J. Histochem. Cytochem. – 1989. – Vol. 37. – P. 653-661.
10. 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.

Поступила 27.08.07