

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 NADFH-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 NADFH-d/CNO-positive nervous cells. A large amount of NADFH-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 NADFH-d/CNO-containing neurons in the medulla oblongata of amphibians as compared with fish has also been determined.*

**Key words:** ontogenesis, NO-synthasa, 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 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 [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-НСl (pH 8,0) и инкубировали в 10% и 25% растворах сахарозы на Трис-НСl (0,1M, pH8,0) в течение 1,5 и 12 часов, соответственно.

Объекты помещали на охлажденные металлические блоки, которые ставили в криостат ( $-25^{\circ}\text{C}$ ) 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-НСl (pH 8,0) в течение 5 мин. Гистохимическая процедура заключалась в инкубации срезов в растворе 0,1 M Трис-НСl (pH 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  $22^{\circ}\text{C}$  и относительной влажности 95-100%. По окончании гистохимической реакции срезы промывали в растворе Трис-НСl 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 небольшие размеры 6-12 мкм, плотность их расположения – 48-64 в  $\text{мм}^2$ .

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  $\text{мм}^2$ .

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

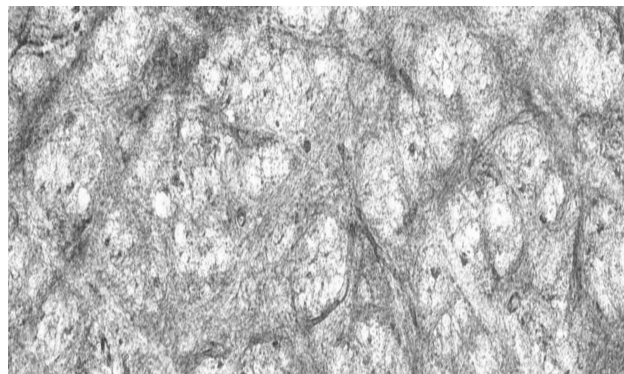


Рисунок 1 – НАДФН-д – позитивные нервные клетки в переднем отделе гипоталамуса карпа.  
Микрофото (x40)

НАДФН-д/CNO-позитивные нервные клетки у карпа обнаружены в переднем мозге, нейроны слабоокрашенные, мелких размеров (4-6 мкм), с высокой плотностью расположения (2-6 в  $\text{мм}^2$ ).

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 мм<sup>2</sup>.

В среднем мозге лягушки наблюдаются НАДФН-д/СНО-содержащие нейроны, размером 8-14 мкм. Плотность их расположения 18-26 в мм<sup>2</sup>.

Передние и задние отделы гипоталамуса лягушки содержат слабоокрашенные НАДФН-д/СНО-позитивные нейроны мелких размеров 6-10 мкм, плотность их расположения – 40-48 в мм<sup>2</sup> (рисунок 2).

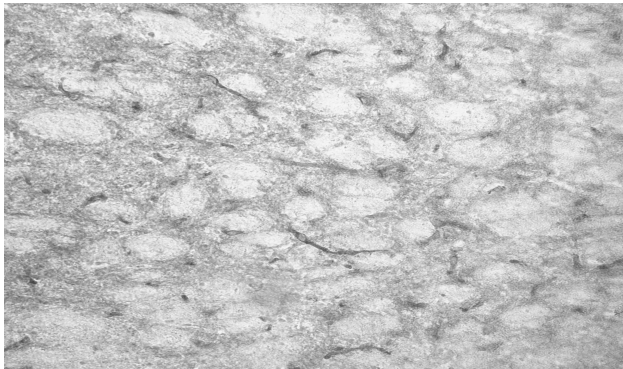


Рисунок 2 – НАДФН-д – позитивные нервные клетки в переднем отделе гипоталамуса лягушки. Микрофото (x40)

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

Таким образом, установлено, что все изучаемые структуры головного мозга карпа и лягушки содержат НАДФН-д/СНО-позитивные нервные клетки. В продолговатом мозге у исследованных животных наблюдалось большее количество НАДФН-д/СНО-содержащих нейронов по сравнению с другими изученными отделами мозга. Также установлено увеличение количества НАДФН-д/СНО-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/СНО-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/СНО-содержащих нейронов по сравнению с другими изученными 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.

#### 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<sup>G</sup>-Monomethyl-L-arginine co-injection attenuates the thermogenic and hyperthermic effects of E<sub>2</sub> 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 nly 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