

*В.И. Дунай*

## **Изменение в распределении нейронов, содержащих НАДФН-Диафоруза/CNO в гипоталамусе и продолговатом мозге в процессе филогенеза**

*Белорусский государственный университет*

Целью данной работы явилось изучение распределения 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. Ключевые слова: онтогенез, NO-синтаза, гипоталамус.

Установлено, что NO-синтезирующие нейроны широко распространены в ЦНС млекопитающих [1]. Нейроны, содержащие NO-синтазу, показаны в эмбриональном периоде, и, как полагают, монооксид азота может являться одним из важнейших факторов, участвующих в развитии структуры и функции центральной нервной системы, являясь эффекторной молекулой, вызывающей гибель определенных клеточных структур, а также играя важную роль в механизмах роста нервных окончаний и формирования синаптических контактов [2, 3]. Принимая во внимание, что в процессе филогенеза изменения в распределении NO-синтезирующих нервных клеток в головном мозге происходят параллельно с усложнением и совершенствованием нервной системы и приспособлением к условиям окружающей среды, представляется важным изучить распределение НАДФН-д/CNO – позитивных нервных клеток в головном мозге у анамний, сохранивших тесную связь в развитии с водной средой и амниот, освоивших сухопутные условия.

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

**Материал и методы**

В экспериментальной части работы использованы 20 взрослых особей карпа чешуйчатого (*Cyprinus carpio*) – представители надкласса рыбы, 20 взрослых особей лягушки озерной (*Rana ridibunda*) – представители класса земноводные, 12 домашних кур (*Gallus gallus*) – представители класса птицы и 20 морских свинок (*Cavia porcellus*) – представители класса млекопитающие.

У животных извлекали головной мозг и окрашивали на НАДФН-д изучаемые структуры.

Специальными исследованиями было убедительно доказано, что нейронная синтаза NO (CNO) является никотинамидаденинди-нуклеотидфосфат-диафоразой [4]. 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 [4], 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 [5], в модификации Норе и Vincent [6].

У животных целиком извлекали головной мозг. Отделяли изучаемые структуры и дополнительно их фиксировали согласно рекомендации Matsumoto [7] 90 минут в 4 % параформальдегиде на фосфатном буфере (0,1М, pH7.4). Участки мозга шесть раз по 30 минут отмывали на холоде с использованием 0,1 М раствора Трис-НСl (pH 8,0) и инкубировали в 10 % и 25 % растворах сахарозы на Трис-НСl (0,1М, pH8,0) в течение 1,5 и 12 часов соответственно.

Объекты помещали на охлажденные металлические блоки, которые ставили в криостат (– 25 оС) 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 М растворе Трис-НСl (pH8.0) в течение 5 мин. Гистохимическая процедура заключалась в инкубации срезов в растворе 0,1 М Трис-НСl (pH8,0), содержащем НАДФН (1 мМ), нитросиний тетразолий (0,5 мМ), Тритон X-100 (0,3 %) и дикумарол (0,1мМ) на протяжении 1-2 ч. при 22 оС 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

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 и обсуждение

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 мм<sup>2</sup>.

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

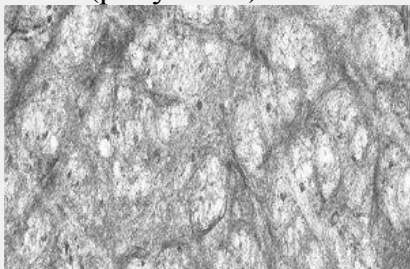


Рис.1. НАДФН-д – позитивные нервные клетки в переднем отделе гипоталамуса карпа. Микрофото (x40)

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>.

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

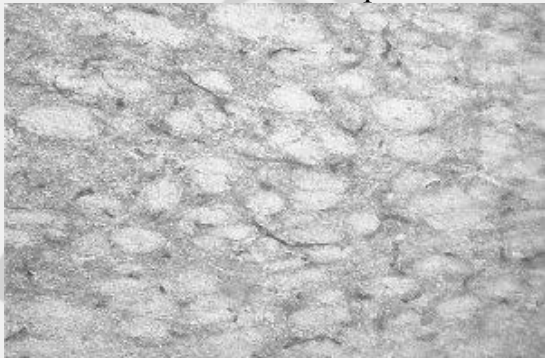


Рис. 2. НАДФН-д – позитивные нервные клетки в переднем отделе гипоталамусе лягушки. Микрофото (x40)

Опыты показали, что гипоталамическая область кур и морских свинок также содержит большое количество НАДФН-д/СНО – позитивных нейронов (рис. 3, 4).

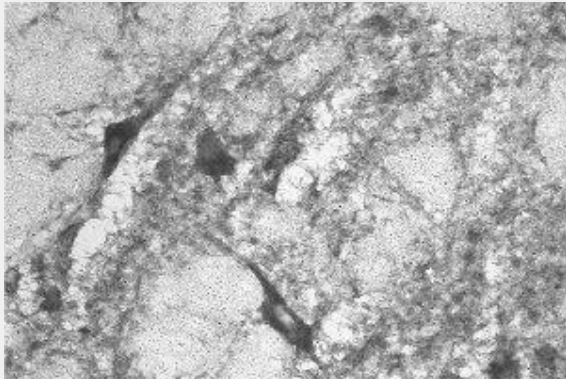


Рис. 3. НАДФН-д – позитивные нервные клетки в переднем гипоталамусе курицы. Микрофото x100)

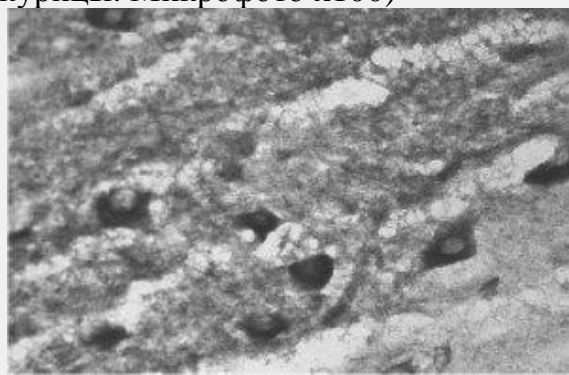


Рис. 4. НАДФН-д – позитивные нервные клетки в переднем гипоталамусе морской свинки. Микрофото (x100)

При изучении серийных срезов гипоталамуса кур обнаружены крупные, интенсивно окрашенные НАДФН-д/СНО – позитивные нейроны во всех исследуемых структурах: латеральной преоптической области (Lateral preoptic area) и медиальной преоптической области (Medial preoptic area) – плотность расположения 40-80 в мм-2, супраоптическом ядре (Supraoptic nucleus) и паравентрикулярном ядре (Paraventricular nucleus) – плотность расположения 280-400 в мм-2, перивентрикулярном ядре (Periventricular nucleus) – плотность расположения 12-18 в мм-2, вентромедиальном ядре (Nucleus ventromedialis), дорсомедиальном ядре (Nucleus dorsomedialis) – плотность расположения 210-480 в мм-2, латеральной гипоталамической области (Lateral hypothalamic area) – плотность расположения 320-600 в мм-2, латеральном маммилярном ядре (Lateral mammillary nucleus), медиальном маммилярном ядре (Medial mammillary nucleus) – плотность расположения 560-820 в мм-2 и супрамаммилярном ядре (Supramammillary nucleus) – плотность расположения 360-440 в мм-2.

У морских свинок медианное преоптическое ядро (median preoptic nucleus), также как и переднее комиссуральное ядро (anterior commissural nucleus) содержит НАДФН-д/СНО – позитивные нейроны средних размеров, которые располагаются с высокой плотностью в пределах этих ядер (140-220 в мм-2).

Медиальная преоптическая область (medial preoptic area) содержит незначительное количество (плотность 60-120 в мм<sup>-2</sup>) мелких и средних слабоокрашенных НАДФН-д/CNO – позитивных нервных клеток, что отличает ее от латеральной преоптической области (lateral preoptic area), где с высокой плотностью (340-400 в мм<sup>-2</sup>) располагаются относительно крупные (16-20 мкм), интенсивно окрашенные нервные клетки. Несколько хорошо окрашенных крупных (до 24 мкм) НАДФН-д/CNO – позитивных нервных клеток содержат переднее перивентрикулярное ядро (anterior periventricular nucleus) и преоптическое супрахиазмальное ядро (preoptic suprachiasmatic nucleus).

В пределах супраоптического (supraoptic nucleus), паравентрикулярного (paraventricular nucleus) и круглого (nucleus circularis) ядер обнаружено большое количество средних и крупных (16-26 мкм), интенсивно окрашенных НАДФН-д/CNO – позитивных нервных клеток, которые располагаются с очень высокой плотностью (640-800 в мм<sup>-2</sup>).

Дорсомедиальное ядро (dorsomedial nucleus), в особенности его вентролатеральная часть, содержат много умеренно окрашенных мелких нейронов, содержащих НАДФН-д/CNO, которые располагаются в пределах этих ядер с плотностью 300-600 в мм<sup>-2</sup>.

В задних отделах гипоталамуса морской свинки НАДФН-д/CNO – позитивные нервные клетки располагаются в пределах нескольких ядер. Так, дорзальные и вентральные преаммилярные ядра (nucleus preammillary dorsal et ventral) содержат мелкие и средние интенсивно окрашенные НАДФН-д/CNO – позитивные нервные клетки, которые располагаются с плотностью более 1000 в мм<sup>-2</sup>. В латеральной части медиального аммилярного ядра (medial mammillary nucleus lateral) сконцентрированы (плотность более 1000 в мм<sup>-2</sup>) мелкие (10-14 мкм), слабо окрашенные нейроны, содержащие НАДФН-д/CNO.

НАДФН-д/CNO – позитивные, слабо окрашенные, мелкие и средние нейроны располагаются с плотностью 200-400 в мм<sup>-2</sup> и в пределах супрааммилярного ядра (supramammillary nucleus).

При изучении серийных срезов продолговатого мозга, окрашенных на НАДФН-д у кур и морских свинок, НАДФН-д/CNO – позитивные нейроны обнаружены во всех изучаемых структурах.

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 синапсов. 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.

В ходе выполненной работы 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 связано с изменениями в дыхательной, сердечно-сосудистой системах и с выходом на сушу предков современных земноводных.

Также 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.

#### Литература

1. Dunai, V. I. Development of the central NO-ergic systems in ontogenesis of maturenate mammals // Basic and Applied Thermophysiology. – Minsk. – 2000. – P.183-184.
2. Дунай, В. И. Становление NO-зависимых структур переднего гипоталамуса в пренатальном онтогенезе // Медицинский журнал. – 2007. – №2. – С. 32-34.
3. Gourine, A. V. Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced fever in conscious rabbits // J.Physiol. – 1994. – Vol. 475. – P.28.
4. 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. – N.2. – P. 155-160.
5. 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. – N.3. – P. 229-234.
6. Hope, B. T., Vincent, S.R. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase // J.Histochem.Cytochem. – 1989. – Vol.37. – P.653-661.
7. 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. – N.1. – P. 61-64.