ФИЛОГЕНЕЗ NO-ЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА

В.И. Дунай, Б.В. Лысый, С.Б. Мельнов // Весці БДПУ. – 2007. – № 4 (54). – С. 40-43.

Введение. В настоящее время установлено, что NO-синтезирующие нейроны широко распространены в центральной нервной системе (ЦНС) млекопитающих [1]. Имеются предположения о том, что NO может являться одним из важнейших факторов, участвующих в развитии структуры и функции центральной нервной системы, а также молекулой, вызывающей гибель определенных клеточных структур, которая играет важную роль в механизмах роста нервных окончаний и формирования синапсов [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/СЫО-позитивных нервных клеток в головном мозге у анамний, сохранивших тесную связь в развитии с водной средой и амниот, освоивших сухопутные условия.

В задачи исследований, результаты которых представлены в данной работе, входило изучить распределение НАДФН-д/CnO-позитивных нервных клеток в головном мозге у рыб и земноводных (имеющих мезенцефало-церебеллярный и архипаллиальноталамический тип головного мозга), сохранивших тесную связь в развитии с водной средой, а также у птиц и млекопитающих (стриатарный и кортикальный тип головного мозга), освоивших сухопутные условия. Таким образом, можно было предполагать, 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.

Материалы и методы исследования. В экспериментальной части работы использованы 20 взрослых особей карпа чешуйчатого (*Cyprinus carpio*) – представителей надкласса *Рыбы*, 20 взрослых особей лягушки озерной (*Rana ridibunda*) – представителей класса Земноводные, 12 домашних кур (*Gallus gallus*) – представителей класса Птицы и 20 морских свинок (*Cavia porcellus*) – представителей 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 никотинамидадениндинуклеотидфосфат-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 иммуно-химические и биохимические свойства. В-третьих, НАДФН-д активность выявляется de novo у клеток с трансформированной к ДНК 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 пара- формальдегида 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 Hope 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 (0,1 М, pH 7,4). Участки мозга шесть раз по 30 мин. отмывали на холоде с использованием 0,1 М раствора Трис-HCI (pH 8,0) и инкубировали в 10% и 25% растворах сахарозы на Трис-HCI (0,1 М, pH 8,0) 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-HCI (pH 8,0) в течение 5 минут. Гистохимическая процедура заключалась в инкубации срезов в растворе 0,1 М Трис-HCI (pH 8,0), содержащем НАДФН (1 мМ), нитросиний тетразолий (0,5 мМ), Тритон Х-100 (0,3%) и дикумарол (0,1 мМ) на протяжении 1-2 часов при 22 °С и относительной влажности 95-100%. По окончании гистохимической реакции срезы промывали в растворе Трис-HCI 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 (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 не велика -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).

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

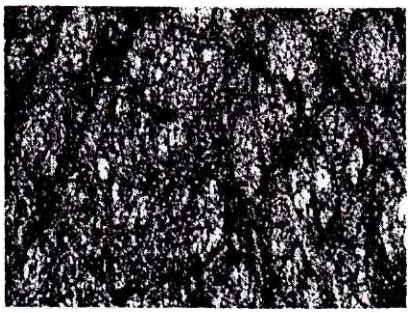

Рисунок 1 - НАДФН-д-позитивные нервные клетки в переднем отделе гипоталамуса карпа. Микрофото (х 40).

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^2.

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

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^2 (рисунок 2).

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. Опыты показали, что

гипоталамическая область кур и морских свинок содержит большое количество НАДФН-д/CNO-позитивных нейронов (рисунок 3-4).

При изучении серийных срезов гипоталамуса кур обнаружены крупные, интенсивно окрашенные НАДФН-д/CNO-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 ventromedial is),* 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 каммиссуральное ядро (*Anterior commissural nucleus),* содержит НАДФН-д/CNO- 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^2) 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^2) 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 cincularis)* 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^2).

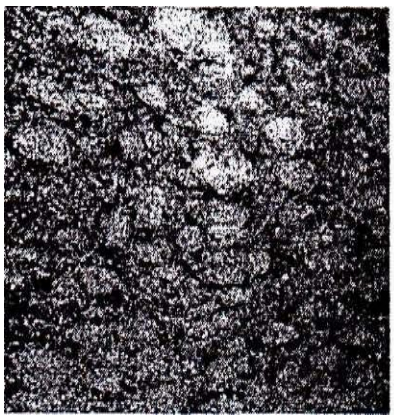

Рисунок *2* - НАДФН-д-позитивные нервные клетки в переднем отделе гипоталамусе лягушки. Микрофото (х 40)

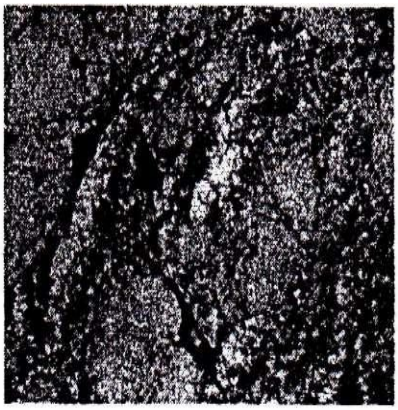

Рисунок 3 - НАДФН-д-позитивные нервные клетки в переднем гипоталамусе курицы. Микрофото (х 100).

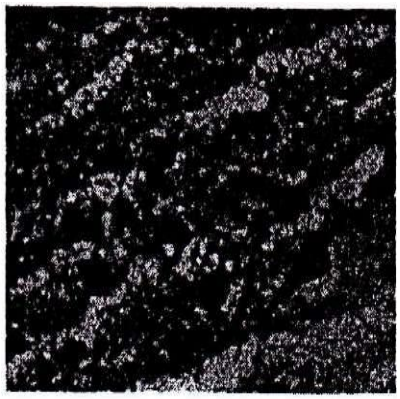

Рисунок 4 - НАДФН-д-позитивные нервные клетки в переднем гипоталамусе морской свинки. Микрофото (х 100).

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^2.

В задних отделах гипоталамуса морской свинки НАДФН-д/СЫО-позитивные нервные клетки располагаются в пределах нескольких ядер. Так, дорзальные и вентральные премаммиллярные ядра (*Nucleus premammillary dorsal et ventral)* содержат мелкие и средние интенсивно окрашенные НАДФН-д/CNO-позитивные нервные клетки, которые располагаются с плотностью более 1000 в мм^2. В латеральной части медиального маммиллярного ядра *(Medial mammillary nucleus lateral)* сконцентрированы (плотность более 1000 в мм^2) мелкие (10-14 мкм), слабоокрашенные нейроны содержащие НАДФН-д/CNO.

НАДФН-д/CNO-позитивные слабоокрашенные мелкие и средние нервные клетки располагаются со средней плотностью (200-400 в мм) и в пределах супрамаммиплярного 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.

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 распределении 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 морфем 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.

Таким образом, 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 I V.I. Dunai II Basic and Applied Thermophysiology. - Minsk. - 2000. - P. 183-184.
2. *Дунай, В.И.* Становление NO-зависимых структур переднего гипоталамуса в пренатальном онтогенезе / В.И. Дунай *II* Медицинский журнал. - 2007. - № 2. - С. 32-34
3. Gourine, A.V. Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced fever in conscious rabbits / AV. Gourine *II* 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- diapho-rase / B A. Pasqualotto [et al.] // Neurosa. 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 *I* U. Scherer-Singler [et. al] *II* J. Neurosci. Methods. -1983. - Vol. 9. - N. 3. - P. 229-234
6. *Hope, B.T., Vincent, S.R.* Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase / B.T. Hope [et al] // J. Histochem. Cytochem. - 1989. - Vol. 37. - P 653-661
7. *Matsumoto, T., Кик, IE., Forstennann, U.A* correlation between soluble brain nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase activity is nly seen after exposure of the tissue to fixative / T. Matsumoto [et. al.] // Neurosci. Lett - 1993 - Vol 155 - N. 1.-P. 61-64.