

## NADPH-ДИАФОРАЗА, НЕЙРОНАЛЬНАЯ NO-СИНТАЗА И ТИРОЗИНГИДРОКСИЛАЗА В ЯДРАХ ПРОМЕЖУТОЧНОГО МОЗГА ГОРЧАКА *RHODEUS SERICEUS* (CYPRYNIDAE: TELEOSTEI)

© Е. В. Пуцина,<sup>1</sup> Д. К. Обухов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии моря ДВО РАН, Владивосток, и <sup>2</sup>Кафедра цитологии и гистологии С.-Петербургского государственного университета;  
электронный адрес: [puschina@mail.ru](mailto:puschina@mail.ru), [dkobukhov@yandex.ru](mailto:dkobukhov@yandex.ru)

Методами гистохимического маркирования NADPH-диафоразы и иммуногистохимического маркирования нейрональной NO-синтазы (nNOS) и тирозингидроксилазы (TH) у представителя карпообразных Амурского обыкновенного горчака *Rhodeus sericeus* в промежуточном мозге исследовано распределение нитроксидергических и катехоламинергических нейронов. Показано наличие катехоламинергических и нитроксидергических клеток в преоптической области, заднем бугорке, паравентрикулярном органе и гипоталамусе. В гипофизотропных ядрах промежуточного мозга горчака были выявлены nNOS-иммунореактивные (nNOS-ир) и NADPH-d позитивные нейроны. В преоптической области NO-ергических нейронов были обнаружены в крупноклеточном и в мелкоклеточном ядрах. В ядрах преоптического комплекса распределение активности NADPH-d сходно с NOS-иммунолокализацией, но на параллельных срезах колокализации NADPH-d и nNOS в нейронах заднего и переднего мелкоклеточных преоптических ядер не выявили. В преоптических, заднетуберальных и гипоталамических перивентрикулярных нейронах горчака nNOS может быть корегionalизована с TH, а в перивентрикулярном ядре заднего бугорка nNOS может быть колокализована с TH в мелких округлых клетках первого типа. Большинство ликвороконтактирующих клеток (ЛКК) перивентрикулярных областей диэнцефалона горчака являются TH-иммунопозитивными. В перивентрикулярных областях вдоль диэнцефалического желудочка (преоптическом ядре, паравентрикулярном органе и перивентрикулярном гипоталамусе) у горчака были выявлены многочисленные NADPH-d позитивные нитроксидергические ЛКК. Полученные данные подтверждают гипотезу о существовании нитроксидергической циркумвентрикулярной системы у костистых рыб. Оксид азота (NO), продуцируемый ЛКК, может играть существенную роль в поддержании и регуляции циркумвентрикулярного гомеостаза посредством модуляции мозговой гемодинамики.

**Ключевые слова:** гипофизотропные ядра промежуточного мозга, карпообразные, нейрональная синтаза окиси азота, тирозингидроксилаза, регуляция мозговой гемодинамики, NADPH-диафораза.

**Принятые сокращения:** КЭ — катехоламинергические клетки, ЛКК — ликвороконтактирующие клетки, NADPH-d — никотинамедадениндинуклеотидфосфат-диафораза, nNOS — нейрональная синтаза окиси азота, TH — тирозингидроксилаза, nNOS-ир — nNOS-иммунореактивные клетки, TH-ир — TH-иммунореактивные клетки.

Данные разных авторов (Holmqvist et al., 1994; Bruning et al., 1995; Bordiri et al., 2003) и результаты собственных наблюдений показали, что перивентрикулярные клеточные скопления промежуточного мозга костистых рыб представляют собой гипофизотропные ядра, содержащие нитроксидергические нейроны. Наличие NO-синтезирующих клеточных групп в ядрах перивентрикулярного диэнцефалона у костистых рыб, несмотря на межвидовые различия, наиболее постоянно (Arevalo et al., 1995; Villani, Guarnieri, 1995; Anken, Rahmann, 1996; Jadaho et al., 1999). Интересно, что именно эта область промежуточного мозга телеостей содержит также и катехоламинергические (дофаминсинтезирующие) группы клеток (Meek, 1994; Rink, Wullimann, 2001; Пуцина, 2009). На нейрогенетической модели *Danio rerio* было показано, что дофаминсинтезирующие нейроны промежуточного мозга являются источником восходящих афферентов в

вентральный телэнцефалон, рассматривающийся в настоящее время как функциональный аналог стриатума млекопитающих (Rink, Wullimann, 2001). Афференты вентральной тегментальной области млекопитающих формируются из различных источников, что обуславливает высокую нейрхимическую гетерогенность клеток этого региона (Smeets, Gonzalez, 2000; Klejbor et al., 2004). Результаты исследований показали, что нейроны вентральной тегментальной области млекопитающих характеризуются высокой нейрональной пластичностью (Le Moal, Simon 1991; Kalivas, 1993). Среди различных многочисленных медиаторов в дофаминсинтезирующей вентральной тегментальной области млекопитающих был обнаружен NO (Rodrigo et al., 1994). Показано, что именно NO выступает в качестве фактора, модулирующего синаптическую пластичность в вентральной тегментальной области амниот (Dawson et al., 1994; Keihoff et al., 1996).

Ранее у представителя карпообразных рыб горчака *Rhodeus sericeus* нами было исследовано распределение ТН-иммунопозитивных нейронов в конечном и промежуточном отделах головного мозга (Пущина, 2009). В вентральном телэнцефалоне горчака мы обнаружили ТН-иммунопозитивные нейроны и волокна. В промежуточном мозге горчака преоптическая область, заднетуберальное ядро и медиобазальный гипоталамус содержат наибольшее число ТН-иммунопозитивных клеток. Целью настоящей работы явился анализ нейробиохимических (медиаторно-модуляторных) взаимоотношений между NO-синтезирующими и ТН-иммунопозитивными нейронами в промежуточном мозге представителя карпообразных горчака *R. sericeus*.

### Материал и методика

В работе были использованы 25 взрослых особей горчака *R. sericeus* длиной тела 9.5—10.0 см. Животных анестезировали с помощью 0.1%-ного раствора трикаин метан сульфоната (MS-222, Sigma, США) в течение 10—15 мин, после чего транскардиально перфузировали раствором 4%-ного параформальдегида, приготовленного на 0.1 М фосфатном буферном растворе (рН 7.2). Головной мозг животных извлекали из черепа и постфиксировали в течение 5 ч при 4 °С, далее в течение ночи выдерживали в 30%-ном растворе сахарозы для криопротекции. Поперечные срезы промежуточного мозга толщиной 50 мкм изготавливали на криостате.

Для идентификации нитроксидергических структур промежуточного мозга горчака использовали гистохимическое маркирование NADPH-диафоразы и иммуногистохимическое выявление nNOS. Для гистохимической реакции на NADPH-диафорузу (НФ 1.6.99.1) срезы инкубировали в течение 1 ч при 37 °С в буферном растворе, содержащем 0.5 мМ β-NADPH (Sigma, США), 0.5 мМ нитросинего тетразолиевого (Sigma, США), 0.3 % Тритона X-100 и 0.15 М Трис-НСl, рН 8.0 (Hope, Vincent, 1989). Контрольные препараты помещали в такой же буферный раствор в присутствии NOS-ингибитора 10 мМ N-монометил-L-аргинина.

Для иммуногистохимического выявления локализации нитроксидергических и катехоламинергических нейронов и волокон использовали метод непрямого стрептавидин-биотинового маркирования nNOS и авидин-биотин-пероксидазного маркирования ТН. Для ингибирования активности эндогенной пероксидазы свободноплавающие срезы в течение 30 мин при комнатной температуре инкубировали с 1%-ным раствором перекиси водорода на 0.1 М фосфатном буфере. В целях устранения неспецифического окрашивания срезы инкубировали с 1%-ной неиммунной сывороткой лошади на 0.1 М фосфатном буфере при комнатной температуре в течение 1 ч. Срезы инкубировали с моноклональными антителами мыши против ТН (Vector Laboratories, США) в разведении 1 : 10 000 и с поликлональными антителами кролика против nNOS (ICN, США) в разведении 1 : 5000 при 4 °С в течение 2 сут. Для иммуномечения ТН срезы инкубировали с вторичными биотинилированными антителами лошади против иммуноглобулинов мыши (Vector Laboratories, США), а для иммуномечения nNOS — с вторичными биотинилированными антителами козы против иммуноглобулинов кролика (Biomedicals, Германия) при комнатной температуре в течение 2 ч. Для визуализации

иммуногистохимического маркирования ТН использовали стандартный набор ABC (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories, США), а маркирование nNOS выявляли с помощью стрептавидин-пероксидазного комплекса (Biomedicals, Германия). Продукты реакции визуализировали при помощи субстрата красного цвета (VIP Substrate Kit, Vector Laboratories, США), контролируя процесс развития окраски под микроскопом. Все срезы промывали в воде, монтировали на предметные стекла, обезжовкивали по стандартной методике и заключали в бальзам.

Для оценки специфичности иммуногистохимической реакции использовали метод негативного контроля. Срезы мозга горчака вместо первичных антител к ТН и nNOS инкубировали с 1%-ной неиммунной сывороткой лошади в течение 48 ч, после чего повторяли все этапы, описанные выше. Во всех контрольных экспериментах иммунопозитивная реакция отсутствовала.

### Результаты

Ядра промежуточного мозга горчака классифицировали в соответствии с ранее приведенной схемой (Пущина, 2009). Схематическое распределение нитроксидергических (позитивных к NADPH-диафорузе и nNOS-ир) и ТН-иммунореактивных (ТН-ир) элементов в ядрах промежуточного мозга горчака показано на рис. 1.

Преоптическая область. В переднем и заднем мелкоклеточных и крупноклеточном преоптических ядрах горчака были обнаружены NADPH-d позитивные нейроны (рис. 2, а—в). Интенсивность гистохимического маркирования NADPH-диафоразы в этих ядрах изменялась от умеренной до сильной. Тела NADPH-d позитивных нейронов и волокна практически всегда определялись в проксимальной зоне преоптического желудочка (рис. 2, а—в). NADPH-диафоруза маркировала мелкие округлые нейроны, расположенные в перивентрикулярной области переднего мелкоклеточного преоптического ядра, и ЛКК (рис. 2, а). Интенсивно маркированные латеральные волокна, как правило, проходили тангенциально или перпендикулярно по отношению к просвету III желудочка (рис. 2, а). Дорсальнее постоптической комиссуры в заднем мелкоклеточном ядре NADPH-диафоруза маркировала мелкие униполярные нейроны (рис. 2, б). В заднем мелкоклеточном преоптическом ядре также обнаружили большое количество NADPH-d позитивных волокон, часть которых являлась отростками клеток этой области (рис. 2, б). NADPH-d позитивные тела нейронов также обнаружены в крупноклеточном преоптическом ядре горчака (рис. 2, в). Во всех преоптических ядрах были выявлены NOS-ир нейроны (рис. 2, г, д). В переднем и заднем мелкоклеточных ядрах NOS-ир нейроны расположены в перивентрикулярном слое (рис. 2, г, д). В перивентрикулярном клеточном слое крупноклеточного преоптического ядра тела крупных нейронов маркировались NOS (рис. 2, д). Распределение nNOS в целом сходно с распределением NADPH-диафоразы, что свидетельствует о присутствии NOS-иммунолокализации и NADPH-диафоразы в ядрах преоптического комплекса. При этом NADPH-диафоруза маркирует большее количество клеток и волокон, в то время как NOS-иммунолокализацию выявили в ограниченном количестве клеток, расположенных преимущественно в перивентрикулярной области. Таким образом, в нейронах преоптической области горчака

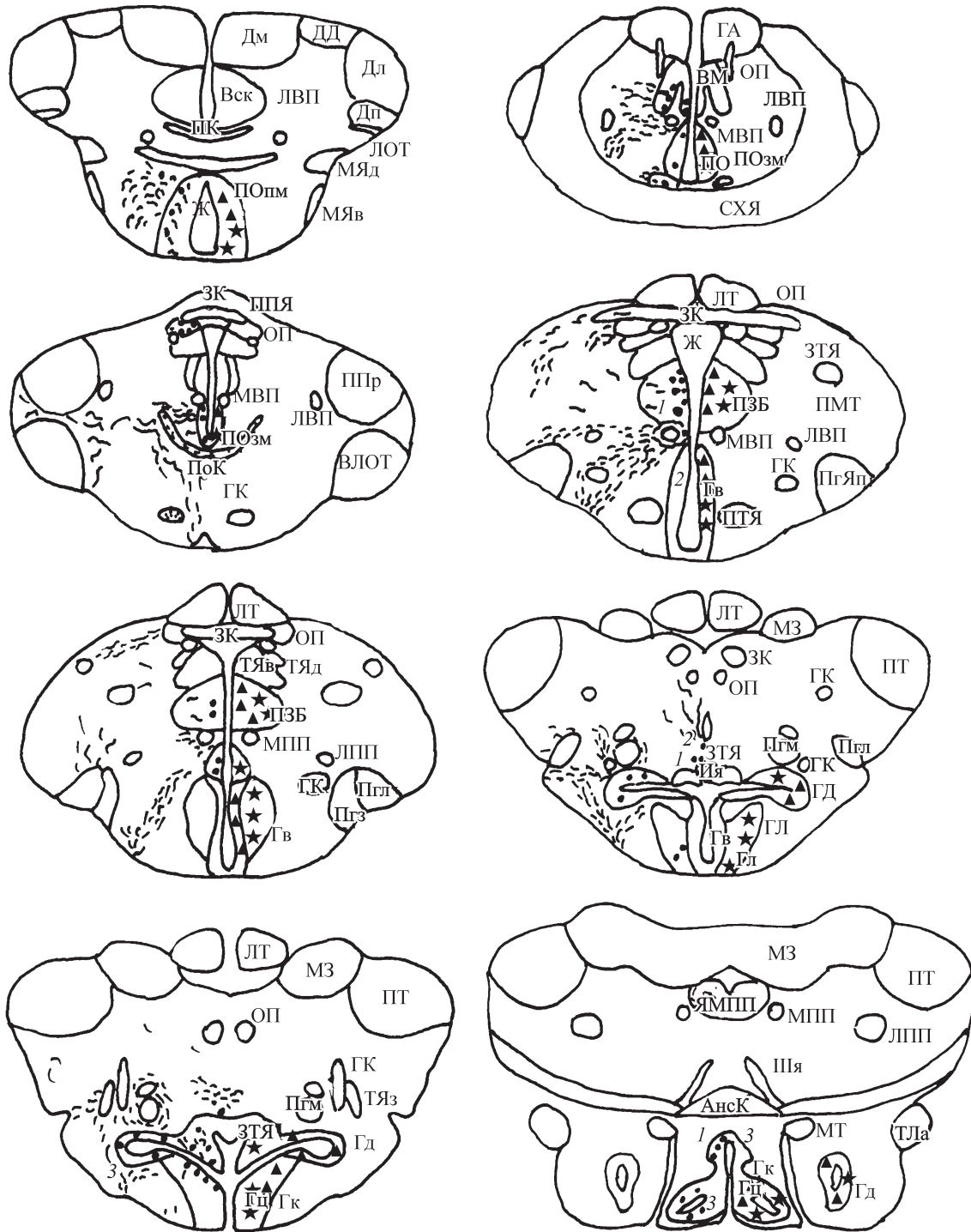


Рис. 1. Схема распределения TH-иммунореактивных (черные круги), nNOS-иммунореактивных (треугольники) и позитивных к NADPH-диафореазе нейронов в промежуточном мозге горчака *Rhodeus sericeus*.

На срезах промежуточного мозга *цифрами* обозначены типы TH-иммунопозитивных клеток: 1 — мелкие округлые клетки, 2 — крупные грушевидные клетки, 3 — ликвороконтактирующие клетки (ЛКК). ВЛОТ — вентролатеральный оптический тракт, ВМ — вентромедиальное ядро таламуса, Вск — супракомиссуральное ядро вентральной телэнцефалической области, ГА — габенула, Гв, Гд, Гл, Гк и Гц — вентральная, дорсальная, латеральная, каудальная и центральная зоны перивентрикулярного гипоталамуса, ГК — горизонтальная комиссура, Дд, Дм, Дл и Дп — дорсальная, медиальная, латеральная и задняя зоны дорсальной телэнцефалической области, Ж — диэнцефалический желудочек, ЗК — задняя комиссура, ЗТЯ — заднетуберальное ядро, ИЯ — интермедиальные ядра, ЛВП — латеральный волокнистый пучок, ЛОТ — латеральный обонятельный тракт, ЛПП — латеральный продольный пучок, ЛТ — латеральный торец, МВП — медиальный волокнистый пучок, МЗ — мозжечковая заслонка, МПП — медиальный продольный пучок, ОП — отогнутый пучок Мейнера, Пгп, Пгл, Пгм и Пгз — переднее, латеральное, медиальное и заднее перигломерулярные ядра, ПЗБ — перивентрикулярное ядро заднего бугорка, ПК — передняя комиссура, ПМТ — претекто-мамиллярный тракт, ПОзм — заднее мелкоклеточное преоптическое ядро, ПоК — постоптическая комиссура, ПОпм — переднее мелкоклеточное преоптическое ядро, ППЯ — перивентрикулярные претектальные ядра, ПТ — полулунный торец, ПЯм — мелкоклеточная часть преоптического ядра, СХЯ — супрахиазматическое ядро, Тла — латеральный торец, ТЯц — центральные таламические ядра, ЯМПП — ядро медиального продольного пучка, Шя — ядро глазодвигательного нерва.

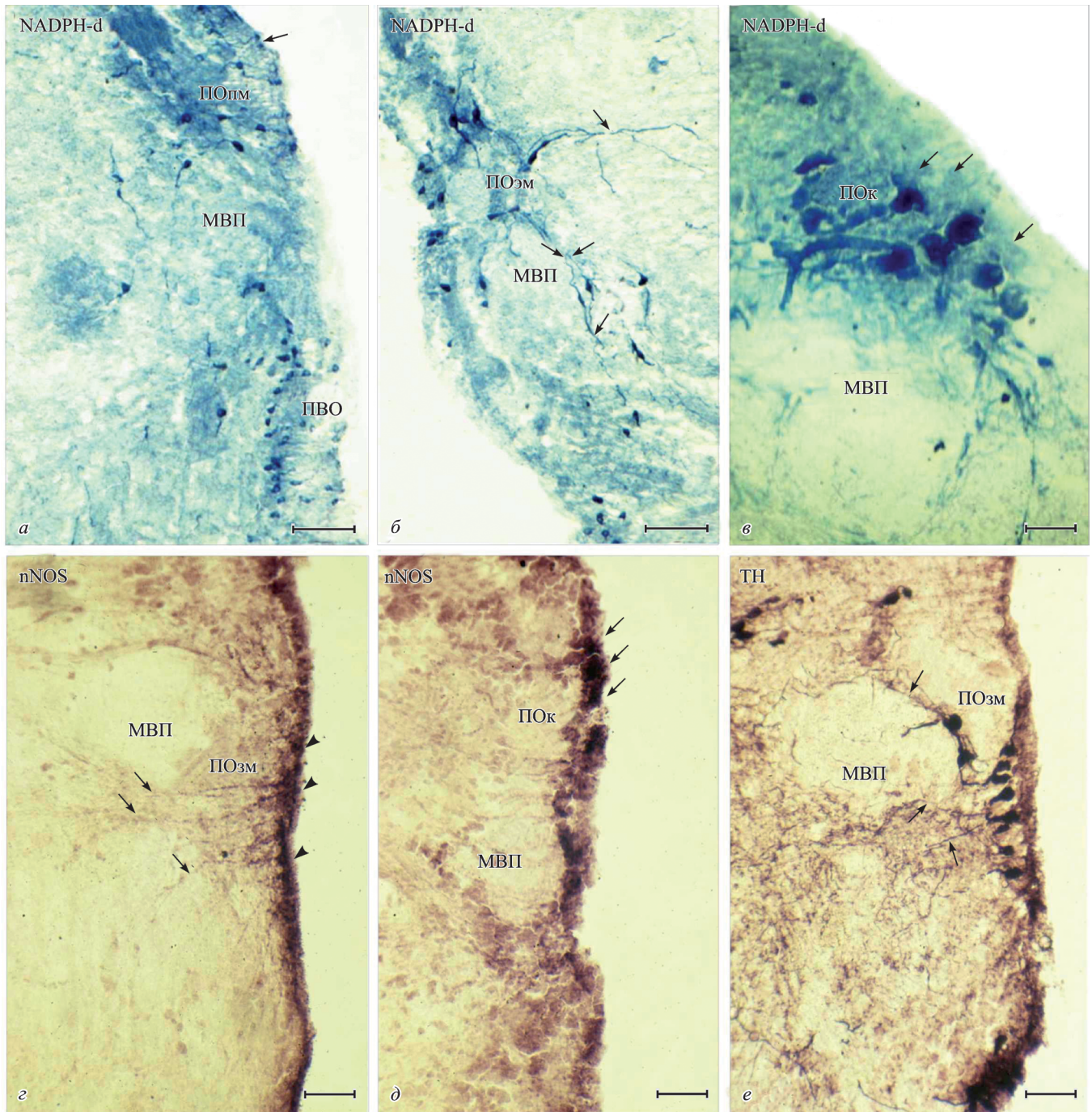
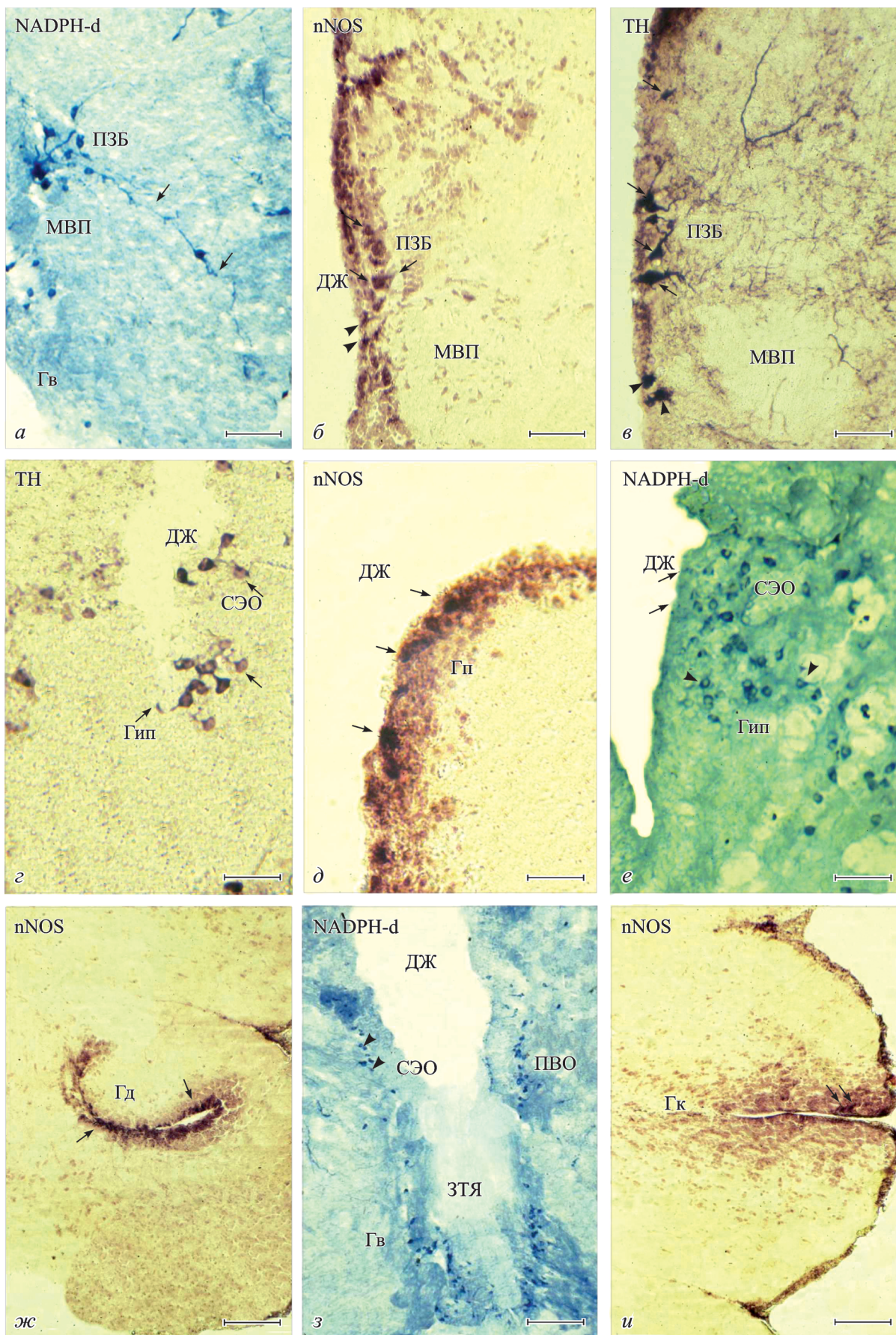


Рис. 2. Микрофотографии фронтальных срезов преоптической области горчака *Rhodeus sericeus* с гистохимической реакцией на NADPH-диафорузу (а–в) и иммунолокализацией nNOS (з–д) и TH (е).

а — ПОпм, стрелкой обозначены маркированные NADPH-диафоразой ЛКК; б — ПОзм, стрелками обозначены интенсивно маркированные волокна, распространяющиеся латерально в перпендикулярном и тангенциальном направлениях к преоптическому желудочку; в — маркированные NADPH-диафоразой нейроны крупноклеточного преоптического ядра (ПОк), стрелками обозначены негативные по NADPH-диафоразе нейроны; з — перивентрикулярные тела (головки стрелок) и дендриты (стрелки) nNOS-ир нейронов ПОзм; д — крупные нейроны nNOS-ир (стрелки) ПОк; е — TH-иммунолокализация в ПОзм, отростки нейронов TH-ир распространяются вокруг медиального переднего мозгового пучка (стрелки). Обозначения те же, что и на рис. 1. Масштабные отрезки: а–б, з–е — 100 мкм; в — 50 мкм.

Рис. 3. Распределение NADPH-диафоразы, NOS и TH в заднетуберальной и гипоталамической областях горчака *Rhodeus sericeus*.

Параллельные срезы ПЗБ, инкубированные с антителами против nNOS или NADPH-диафоразой (а, б) и окрашенные на TH (в, з), и срезы перивентрикулярного гипоталамуса, маркированные nNOS (д, ж, и) и NADPH-диафоразой (е). а — положительные к NADPH-диафоразе клетки ПЗБ: крупные положительные к NADPH-диафоразе нейроны латеральной зоны (стрелки) с маркированными дендритами ПЗБ были NOS-иммунонегативны (б). б — нейроны NOS-ир (первого типа), расположенные в медиальной зоне (стрелки) ПЗБ и в ЗТЯ (головки стрелок). в — TH в нейронах первого типа (стрелки) ПЗБ; головки стрелок показывают тела вентрально расположенных клеток. з — TH-положительные ЛКК перивентрикулярного гипоталамуса расположены в субэпендимальной области (СЭО, стрелки). д — NADPH-диафоразы (стрелки) не маркирует нейроны, расположенные в перивентрикулярном NOS-иммуноположительном слое. е — многочисленные положительные к NADPH-диафоразе субэпендимальные клетки (головки стрелок). ж, и — NOS-содержащие перивентрикулярные клетки (стрелки) в Гд и Гк. з — положительные к NADPH-диафоразе нейроны ЗТЯ и ПВО. Обозначения те же, что и на рис. 1, 2. Масштабные отрезки: а–в — 100 мкм; з–е — 50 мкм; ж–и — 200 мкм.



ка колоколизацию гистохимического (NADPH-диафоразы) и иммуногистохимического (nNOS) маркеров NO не выявили.

В преоптической области на параллельных срезах, инкубированных с антителами против nNOS или TH, распределение nNOS-ир клеток и волокон сравнивали с TH-иммунолокализацией. Передние и задние мелко-клеточные преоптические ядра содержали тела TH-иммунореактивных нейронов (рис. 2, е). В преоптическом регионе горчака зоны nNOS-иммунолокализации частично совпадают с TH-иммуногенными участками; передние и задние части преоптического ядра содержат TH-ир клетки и волокна. При TH-иммуномечении выявлялись тела и отростки преоптических нейронов, а маркирование nNOS выявляло главным образом тела нейронов, изредка содержащие отростки (рис. 2, з). Исследование иммунолокализации TH и nNOS на параллельных срезах показало, что в некоторых преоптических нейронах nNOS может корегулироваться с TH (рис. 2, з, е). Таким образом, ограниченная популяция дофаминергических нейронов ПО горчака *R. sericeus* может продуцировать оксид азота.

Гипоталамус и задний бугорок. В заднетуберальной области и перивентрикулярной зоне гипоталамуса, содержащих нейроэндокринные гипофизотропные клетки (Holmqvist, Extrom, 1995), у горчака были выявлены активности NADPH-диафоразы и nNOS. В латеральной зоне перивентрикулярного ядра заднего бугорка (рис. 1, з) были идентифицированы немногочисленные крупные NADPH-d позитивные нейроны (рис. 3, а). В медиальной зоне перивентрикулярного ядра заднего бугорка на параллельных срезах мы находили нейроны, как NADPH-d позитивные (рис. 3, а), так и nNOS-ир (рис. 3, б). Эти же клетки перивентрикулярного ядра маркировались TH (рис. 3, б). Мелкие nNOS-ир нейроны были также локализованы вдоль инфундибулома в составе перивентрикулярного слоя заднетуберальной колонны клеток. Такие клетки были негативными по NADPH-диафоре, однако ЛКК с положительной реакцией на NADPH-диафору с длинным апикальным отростком были обнаружены в субэпендимальном слое паравентрикулярного органа (рис. 3, з). В перивентрикулярном гипоталамусе горчака TH-ир и NADPH-d позитивные ЛКК были также локализованы в субэпендимальном слое (рис. 3, з, е). Вдоль всей rostrocaudальной протяженности паравентрикулярного гипоталамуса расположены перивентрикулярные nNOS-ир нейроны (рис. 3, д). Такие клетки были негативными по TH и NADPH-диафоре (рис. 3, з, е). Паравентрикулярные нейроны заднетуберального ядра, вентральной, дорсальной и каудальной зон перивентрикулярного гипоталамуса всегда маркированы NADPH-диафоразой и TH (рис. 1, д—з; 3, е; Пущина, 2009). В этих ядрах были выявлены активность NADPH-диафоразы, nNOS-ир (рис. 1, е—з) и TH-иммунолокализация (Пущина, 2009). Однако иммуномаркирование nNOS ограничивалось клетками перивентрикулярной области и изредка в субэпендимальной (рис. 3, д, ж, и), тогда как большая часть NADPH-d позитивных и TH-иммуногенных клеток была расположена в субэпендимальной области (рис. 3, з, е, з). В заднетуберальной области горчака идентифицировали шесть популяций TH-ир клеток (Пущина, 2009), относящихся к трем типам: мелкие округлые клетки (первый тип), крупные грушевидные и биполярные клетки (второй тип) и биполярные ЛКК (третий тип). Детальное описание TH-ир популяций клеток заднетуберальной и гипота-

ламической областей горчака было рассмотрено ранее (Пущина, 2009).

В настоящей работе данные по маркированию TH в этих областях горчака мы рассмотрели в контексте иммуногистохимического и гистохимического маркирования nNOS и NADPH-диафоразой соответственно. Исследование параллельных срезов заднетуберальной области, альтернативно инкубированных с антителами против nNOS или TH, показало, что в некоторых перивентрикулярных областях nNOS может быть колокализована с TH. Результаты маркирования nNOS и TH показали, что в перивентрикулярном ядре заднего бугорка горчака TH-ир нейроны первого типа могут также содержать и nNOS (рис. 2, б, в). TH-ир нейроны и волокна выявлялись в заднем туберальном и перивентрикулярном ядрах гипоталамуса, а также в клетках заднего бугорка и в районе паравентрикулярного органа (Пущина, 2009), тогда как nNOS-ир преимущественно локализована в перикарионах клеток, и лишь очень немногочисленные отростки содержали nNOS (рис. 3, б, д, ж, и). Колокализацию nNOS и TH обнаружили в клетках первого типа в перивентрикулярном ядре заднего бугорка (рис. 3, б, в). Колокализация nNOS и NADPH-диафоразы наблюдалась в биполярных клетках третьего типа в вентральной, дорсальной и каудальной зонах перивентрикулярного гипоталамуса (рис. 3, з, е), но отсутствовала в крупных клетках второго типа. Нейроны паравентрикулярного органа, принадлежащие к заднему туберальному ядру и перивентрикулярному гипоталамусу, были позитивными всегда только к NADPH-диафоре (рис. 3, е, з).

Итак, результаты исследования показали, что две перивентрикулярные популяции TH-ир клеток *R. sericeus* — мелкие округлые (первого типа) и ЛКК (третьего типа) — могут продуцировать NO.

## Обсуждение

Результаты настоящего исследования показывают наличие катехоламинергических и нитроксидаергических клеток в преоптической области, заднем бугорке, паравентрикулярном органе и гипоталамусе горчака *R. sericeus*. Методами гистохимического маркирования NADPH-диафоразы и иммуногистохимии nNOS во всех основных гипофизотропных ядрах промежуточного мозга горчака были выявлены NO-содержащие нейроны. В преоптической области NO-ергические клетки обнаружены как в крупноклеточном, так и в мелкоклеточном ядрах. В этих ядрах распределение активности NADPH-диафоразы сходно с NOS-иммунопозитивностью. Тем не менее на параллельных срезах мы не обнаружили колокализации NADPH-диафоразы и nNOS. Отсутствие маркирования NADPH-диафоразы можно объяснить тем, что в некоторых нейронах NO-синтезирующие ферменты присутствуют, но они малоактивны или дезактивированы. Действительно, интенсивность маркирования NADPH-диафоразы в преоптической области значительно варьирует в мелкоклеточном и крупноклеточном ядрах, плотность выпадающего в цитоплазме нейронов преципитата также неодинакова в различных клетках. Подобная нейрорхимическая гетерогенность может быть связана с половым диморфизмом, сезонной изменчивостью и (или) общим физиологическим статусом животного, как ранее было показано у сома (Jadaho et al., 1999). Кроме того, соотношение между NADPH-диафоразой и NOS-позитив-

ными структурами изменяется в различных функциональных субпопуляциях преоптических нейронов. В настоящей работе данные о репродуктивном состоянии и сезонных особенностях функционирования нейроэндокринной системы горчака не учитывались, поэтому мы не принимаем их во внимание при обсуждении результатов гистохимического маркирования NADPH-диафоразы.

Методами ретроградного маркирования было показано, что нитроксидергические нейросекреторные нейроны паравентрикулярного (69 %) и супраоптического (67 %) ядер проецируются в заднюю долю гипофиза (Vanhatalo, Soinila, 1995). Предполагается, что NO в нейронах этих областей участвует в регуляции функциональной активности задней доли гипофиза. В таких экспериментах мелкие не нейросекреторные NO-ергические нейроны медиальной преоптической области и перивентрикулярного ядра также оказались ретроградно маркированными. Это позволило сделать предположение о нитроксидергической модуляции процесса высвобождения вазопрессина и окситоцина в нервных окончаниях задней доли гипофиза (Lorrain, Hull, 1993; Vanhatalo, Soinila, 1995). В экспериментах на стриатуме крыс при введении метаболического предшественника NO L-аргинина и доноров гидроксилана и нитропруссиды показали стимулирующее влияние NO на синтез и выделение дофамина (Zhu, Luo, 1992; Ohkuma, Katsura, 2001). Введение L-аргинина через микродиализный зонд стимулировало высвобождение дофамина в медиальном преоптическом ядре крыс, а применение ингибитора NOS L<sup>G</sup>-мометил-L-аргинина подавляло этот эффект (Lorrain, Hull, 1993). Приведенные данные указывают на то, что NO является фактором, стимулирующим высвобождение дофамина в гипофизотропных ядрах млекопитающих. Подобные результаты были получены на ядрах гипоталамо-гипофизарной системы *Oreochromis niloticus* (Bordieri et al., 2003), где экспрессия nNOS была зарегистрирована в преоптическом ядре, ядрах вентрального таламуса и питуитарной железе.

Результаты настоящего исследования показывают, что nNOS может быть корегionalизована с TH в преоптических, заднетуберальных и гипоталамических перивентрикулярных нейронах горчака *R. sericeus*. Колокализация nNOS или NADPH-диафоразы с TH и (или) дофамином ранее была показана для нейронов вентральной тегментальной области (Klejbor et al., 2004) и гипоталамического крупноклеточного ядра млекопитающих (Blanco et al., 1997). NO-продуцирующие нейроны были идентифицированы в заднетуберальном регионе и перивентрикулярном слое клеток гипоталамуса горчака. В перивентрикулярном ядре заднего бугорка и гипоталамуса маркирование NADPH-диафоразы и nNOS не совпадало. Большинство нитроксидергических мелких нейронов перивентрикулярного слоя задней туберальной клеточной колонны были NOS-ир, но не обнаруживали активности NADPH-диафоразы. Возможно несколько объяснений для обнаруженных нами расхождений между NOS-ир и активностью NADPH-диафоразы. Так, согласно первой гипотезе, в диэнцефалических ядрах горчака могут экспрессироваться различные изоформы nNOS, которые могут иметь различающийся уровень активности NADPH-диафоразы. Мы установили, что активность NADPH-диафоразы в вентральной зоне перивентрикулярного гипоталамуса зависит от времени альдегидной фиксации мозга. Это наблюдение показывает, что NADPH-диафоразная активность нейрональной NOS, экспрессируемой в этом регионе мозга, зависима от фиксации. Напротив,

распределение активности NADPH-диафоразы в преоптическом и заднетуберальном регионах не было связано со временем фиксации. Отсутствие маркирования NADPH-диафоразы в некоторых pNOS-иммунопозитивных нейронах, согласно другой гипотезе, может быть связано с тем, что ферменты, синтезирующие NO, экспрессируются в данных клетках, но неактивны. Наконец, в тех случаях, когда маркированные NADPH-диафоразой нейроны были pNOS-иммунонегативными, реакция на NADPH-диафорузу частично может быть обеспечена отличными от NOS оксидоредуктазами. В некоторых исследованиях сообщалось, что маркирование NADPH-диафоразы не совпадает с NOS-иммунолокализацией (Brüning et al., 1995; Lema, Nevitt, 2001; Bodieri et al., 2003). Несовпадение между диафоразным маркированием и NOS-иммуномаркированием было показано разными авторами. В частности, наличие негативных по NADPH-диафоразе и NOS-ир нейронов было показано в супрахиазматических ядрах мыши и крысы (Wang, Morris, 1996) и в гиппокампе человека (Doyle, Slater, 1997). Несмотря на то что для выяснения различий между активностью NADPH-диафоразы и NOS-ир в ядрах промежуточного мозга горчака необходимы дальнейшие исследования, представленные результаты показывают необходимость с осторожностью использовать NADPH-диафорузу в качестве единственного маркера NOS.

Среди нейронов заднетуберальной колонны горчака были найдены NOS-продуцирующие клетки. Мы полагаем, что в перивентрикулярном ядре заднего бугорка pNOS может быть колокализована с TH. Экспериментальные исследования показали токсическое действие NO на нигростриатарную дофаминергическую систему (Dawson et al., 1991). Тела нейронов восходящей дофаминергической системы млекопитающих локализованы в области базального мезэнцефалона (вентральная тегментальная область A9 и компактная часть черного вещества A10) и проецируются в базальные ганглии, включающие в себя дорсальный стриатум и хвостатое ядро и внешнюю часть лентиформного ядра (мезостриатарная система) и вентральный стриатум и прилежащее ядро (nucl. accumbens) (мезолимбическая система), а также в кортекс (мезокортикальная система). У костистых рыб в среднем мозге дофаминергических нейронов не обнаружено, но популяции TH-ир клеток были найдены в области заднего бугорка (Ma, 1997; Rink, Wullimann, 2002; Пушина, 2009). Исследования распределения катехоламинсинтезирующего фермента TH в промежуточном мозге горчака показали наличие нескольких популяций TH-ир клеток в разных ядрах промежуточного мозга (Пушина, 2009). Шесть популяций TH-иммунопозитивных нейронов обнаружено в области заднего бугорка горчака, три из них проецируются в вентральный телэнцефалон (Пушина, 2008). Первая группа содержит мелкие округлые клетки в перивентрикулярном ядре заднего бугорка, две дополнительные группы образованы крупными грушеобразными клетками, расположенными непосредственно за перивентрикулярным ядром заднего бугорка. Результаты настоящего исследования позволяют предположить, что только в мелких округлых клетках перивентрикулярного ядра заднего бугорка NOS может быть корегionalизована с TH. Отличительной особенностью этих нейронов является их ростральное местоположение по отношению к заднетуберальной области, поскольку у амфибий такие нейроны встречаются каудальнее заднего бугорка в области базального мезэнцефалона. У амфибий отсутствует пространствен-

ное разделение сенсомоторных и лимбических клеток (Marin et al., 1998). У горчака в заднетуберальной области идентифицированы две популяции дофаминергических клеток: мелкие округлые и крупные грушеобразные, являющиеся возможными функциональными эквивалентами мезостриатарной и мезолимбической систем млекопитающих. В настоящее время прилежащее ядро у костистых рыб не идентифицировано. Предполагаемым источником восходящих мезокортикальных проекций в мозге карпообразных рыб является заднетуберальное ядро. Это ядро у горчака и других карпообразных рыб содержит NO-иммунопозитивные клетки (Brüning et al., 1995), проецируется в паллиальную область телэнцефалона (Wullimann, Meyer 1993) и содержит тела TH-иммунопозитивных нейронов (Rink, Wullimann, 2001; Пущина, 2008, 2009). За исключением заднетуберального ядра, у костистых рыб более нигде не описаны TH-иммунопозитивные нейроны, проецирующиеся в конечный мозг. Таким образом, заднетуберальное ядро горчака может выступать в качестве потенциального источника мезокортикальной системы.

Совместная локализация NO и TH в преоптическом ядре, заднем бугорке и гипоталамусе горчака дает возможность для реализации межклеточных коммуникаций за счет классических нейротрансмиттерных и диффузных (объемных) механизмов. Таким образом, в то время как индукция потенциала действия в нейроне может стимулировать высвобождение нейротрансмиттера из его окончания, возможно также высвобождение NO из его тела, оказывающее влияние на активность нейронов, расположенных в непосредственной близости. Наши результаты согласуются с данными об атлантическом лососе (Holmqvist et al., 1994) и тилапии (Bordineri et al., 2003). Однако результаты экспериментов на горчаке резко контрастируют с наблюдениями на золотой рыбке (Brüning et al., 1995). Отсутствие nNOS в некоторых гиподиффузных ядрах золотой рыбки может являться показателем межвидовых различий в распределении nNOS. Кроме того, возможно, что в исследованиях на золотой рыбке использованы антитела с низкой чувствительностью. Физиологические различия не исключают каждое из двух объяснений. Фактически экспрессия NOS в гиподиффузных областях телеостей может модулироваться в зависимости от физиологических условий, как это было показано на млекопитающих (Ceccatelli, 1997). Однако паттерн экспрессии NADPH-диафоразы в главных гиподиффузных ядрах горчака *R. sericeus* напоминает таковой для золотой рыбки (Villani, Guarnieri, 1995), линия *Tinca tinca* (Arevalo et al., 1995), меченосца *Xiphophorus helleri* (Anken, Rahmann, 1996) и сомообразных рыб (Jadhao et al., 1999). ЛКК является наиболее общим типом КЭ (катехоламинергических) клеток, обнаруженных в паравентрикулярном органе млекопитающих позвоночных. Такие клетки найдены у миноги (Pierre et al., 1997), хрящевых (Stuesse et al., 1994) и костистых рыб (Hornby et al., 1987; Roberts et al., 1989). ЛКК преимущественно расположены в перивентрикулярных областях гипоталамуса, преоптического ядра и в субэпендимальном слое паравентрикулярного органа. Такие клетки имеют биполярную морфологию, их короткий отросток обращен в просвет желудочка, а длинный направлен вентролатерально. У карася *Carassius* (Hornby et al., 1987), угря *Anguilla* (Roberts et al., 1989) и *Danio* (Rink, Wullimann, 2001) в составе паравентрикулярного органа встречаются КЭ (преимущественно дофаминергические) ЛКК. Большинство ЛКК перивентрикулярных областей диэнцефалона горчака являются TH-иммунопозитивными (Пущина, 2009). Именно в этих областях вдоль всего диэнцефалического желудочка, включающих в себя преоптическое ядро, паравентрикулярный орган и перивентрикулярный гипоталамус, у горчака были выявлены многочисленные NADPH-d позитивные ЛКК. Полученные данные подтверждают гипотезу о существовании нитроксидазной циркумвентрикулярной системы у костистых рыб, как это предполагалось ранее (Holmqvist, Extrom, 1997). Считается, что у костистых рыб, как и у птиц, ЛКК вовлечены в осморегуляторные функции в качестве осмочувствительных нейронов (Vigh et al., 1976). В соответствии с химическими свойствами молекулы NO, продуцируемые этими клетками, NO может играть существенную роль в поддержании и регуляции циркумвентрикулярного гомеостаза посредством модуляции мозгового кровообращения, как это было показано на млекопитающих (Rodrigo et al., 1997).

## Заключение

Результаты настоящего исследования показывают наличие катехоламинергических и нитроксидазных клеток в преоптической области, заднем бугорке, паравентрикулярном органе и гипоталамусе горчака *R. sericeus*. Методами гистохимического маркирования NADPH-диафоразы и иммуногистохимии nNOS во всех основных гиподиффузных ядрах промежуточного мозга горчака были выявлены NO-содержащие нейроны. В преоптической области NO-ергические нейроны были обнаружены как в крупноклеточном, так и в мелкоклеточном ядрах. В этих ядрах распределение активности NADPH-диафоразы сходно с NOS-иммунолокализацией, но на параллельных срезах колокализацию NADPH-диафоразы и nNOS в преоптических ядрах горчака *R. sericeus* не выявили. В преоптических, заднетуберальных и гипоталамических перивентрикулярных нейронах горчака nNOS может быть корегулирована с TH. В перивентрикулярном ядре заднего бугорка nNOS также может быть колокализована с TH в мелких округлых клетках первого типа. Совместная локализация NO и TH в преоптическом ядре, перивентрикулярном ядре заднего бугорка и гипоталамусе горчака дает возможность для реализации межклеточных коммуникаций посредством классических нейротрансмиттерных и диффузных (объемных) механизмов. ЛКК перивентрикулярных областей диэнцефалона горчака являются TH-иммунопозитивными. В перивентрикулярных областях вдоль всего диэнцефалического желудочка (преоптическом ядре, паравентрикулярном органе и перивентрикулярном гипоталамусе) у горчака были выявлены многочисленные нитроксидазные NADPH-d позитивные ЛКК. Полученные данные подтверждают гипотезу о существовании нитроксидазной циркумвентрикулярной системы у костистых рыб, а продуцируемый этими клетками NO может играть существенную роль в поддержании и регуляции циркумвентрикулярного гомеостаза посредством модуляции мозговой гемодинамики.

## Список литературы

Пущина Е. В. 2008. Дофаминергическая иннервация вентрального телэнцефалона костистых рыб. В кн.: Механизмы нервных и нейроэндокринных регуляций. М.: Фирма «Слово». 90—91.



- Пуцина Е. В. 2009. Тирозин-гидроксилаза в ядрах конечного и промежуточного мозга горчача *Rhodeus sericeus* (Cyprinidae). Цитология. 51 (1) : 61—75.
- Anken R. H., Rahmann H. 1996. An atlas of the distribution of NADPH-diaphorase in the brain of the highly derived swordtail fish *Xiphophorus helleri* (Atheriniformes: Teleostei). J. Brain Res. 37 : 421—449.
- Arevalo R., Alonso J. R., Garcia-Ojeda A., Brinon J. G., Crespo C., Aijón J. 1995. NADPH-diaphorase in the central nervous system of the tench (*Tinca tinca* L., 1758). J. Comp. Neurol. 352 : 398—420.
- Blanco E., Jirikowski G. F., Riesco J. M., Juanes J. A., Vazquez R. 1997. Coexistence of NADPH-diaphorase with tyrosine hydroxylase in hypothalamic magnocellular neurons of the rat. Neuroreport. 8 : 227—230.
- Bordieri L., Persichini T., Venturini G., Cioni C. 2003. Expression of nitric oxide synthase in the preoptic-hypothalamo-hypophysial system of the teleost *Oreochromis niloticus*. Brain Behav. Evol. 62 : 43—55.
- Brüning G., Katzbach R., Mayer B. 1995. Histochemical and immunocytochemical localization of nitric oxide synthase in the central nervous system of the goldfish, *Carassius auratus*. J. Comp. Neurol. 358 : 353—382.
- Ceccatelli S. 1997. Expression and plasticity of NO synthase in the neuroendocrine system. Brain Res. Bull. 44 : 533—538.
- Dawson T. M., Zhang J., Dawson V. L., Snyder S. H. 1994. Nitric oxide: cellular regulation and neuronal injury. Prog. Brain Res. 103 : 365—369.
- Dawson V. L., Dawson T. M., London E. D., Brecht D. S., Snyder S. H. 1991. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 88 : 6368—6371.
- Doyle C. A., Slater P. 1997. Localization of neuronal and endothelial nitric oxide synthase isoforms in the human hippocampus. Neuroscience. 76 : 387—395.
- Holmqvist B., Extröm P. 1997. Subcellular localization of neuronal nitric oxide synthase in the brain of a teleost; an immunoelectron and confocal microscopical study. Brain Res. 745 : 67—82.
- Holmqvist B., Östholm T., Alm P. 1994. Nitric oxide synthase in the brain of a teleost. Neurosci. Lett. 171 : 205—208.
- Hope B. T., Vincent S. R. 1989. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase. J. Histochem. Cytochem. 37 : 653—661.
- Hornby P. J., Piekut D. T., Demski L. S. 1987. Localization of immunoreactive tyrosine hydroxylase in the goldfish brain. J. Comp. Neurol. 261 : 1—14.
- Jadaho A. G., Wilke I., Meyer D. L. 1999. NADPH-diaphorase expression in the hypothalamo-hypophysial system of different catfish. Brain Res. 39 : 513—523.
- Kalivas P. W. 1993. Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. Brain Res. Rev. 18 : 75—113.
- Keilhoff G., Seidel B., Noack H., Tischmeyer W., Stanek D., Wolf G. 1996. Patterns of nitric oxide synthase at the messenger RNA and protein levels during early rat brain development. Neuroscience. 75 : 1193—1201.
- Klejbor I., Domaradzka-Pytel B., Ludkewich B. 2004. The relationships between neurons containing dopamine and nitric oxide synthase in the ventral tegmental area. Folia histochem. cytobiol. 42 : 83—87.
- Lema S. C., Nevitt G. A. 2001. Re-evaluating NADPH-diaphorase histochemistry as an indicator of nitric oxide synthase: an examination of the olfactory system of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Neurosci. Lett. 313 : 1—4.
- Le Moal M., Simon H. 1991. Mesolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. Physiol. Rev. 71 : 155—234.
- Lorrain D. S., Hull E. M. 1993. Nitric oxide increase dopamine and serotonin release in the medial preoptic area. Neuroreport. 5 : 87—89.
- Ma P. M. 1997. Catecholaminergic systems in the zebrafish. III. Organization and projection pattern of medullary dopaminergic and noradrenergic neurons. J. Comp. Neurol. 381 : 411—427.
- Marín O., Smeets W. J. A. J., González A. 1998. Evolution of the basal ganglia in tetrapods: a new perspective based on recent studies in amphibians. Tins. 21 : 487—494.
- Meek J. 1994. Catecholamines in the brains of osteichthyes (bony fishes). In: Phylogeny and development of catecholamine systems in the CNS of vertebrates. Cambridge: Cambridge Univ. Press. 49—76.
- Ohkuma S., Katsura M. 2001. Nitric oxide and peroxynitrite as factors to stimulate neurotransmitter release in the CNS. Progress Neurobiol. 64 : 97—108.
- Pierre J., Mahouche M., Suderevskaya E. I., Repérant J., Ward R. 1997. Immunocytochemical localization of dopamine and its synthetic enzymes in the central nervous system of the lamprey *Lampetra fluviatilis*. J. Comp. Neurol. 380 : 119—135.
- Rink E., Wullimann M. F. 2001. The teleostean (zebrafish) dopaminergic system ascending to the subpallium (striatum) is located in the basal diencephalon (posterior tuberculum). Brain Res. 889 : 316—330.
- Rink E., Wullimann M. F. 2002. Connections of the ventral telencephalon and tyrosine hydroxylase distribution in the zebrafish brain (*Danio rerio*) lead to identification of an ascending dopaminergic system in a teleost. Brain Res. Bull. 57 : 385—387.
- Roberts B. L., Meredith G. E., Maslam S. 1989. Immunocytochemical analysis of the dopamine system in the brain and spinal cord of the European eel, *Anguilla anguilla*. Anat. Embryol. 180 : 401—412.
- Rodrigo J., Riveros-Moreno V., Bentura M. L., Uttenthal L. O., Higgs E. A., Fernandez A. P., Polak J. M., Moncada S., Martinez-Murillo R. 1997. Subcellular localization of nitric oxide synthase in the cerebral ventricular system, subfornical organ, area postrema and blood vessels of rat brain. J. Comp. Neurol. 378 : 522—534.
- Rodrigo J., Springall D. R., Uttenthal O., Bentura M. L., Abadía-Molina F., Riveros-Moreno V., Martinez-Murillo R., Polak J. M., Moncada S. 1994. Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.). 345 : 175—221.
- Smeets W., Gonzalez A. 2000. Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. Brain Res. Rev. 33 : 308—379.
- Stuesse S. L., Cruce W. L. R., Northcutt R. G. 1994. Localization of catecholamines in the brains of Chondrichthyes (cartilaginous fishes). In: Phylogeny and development of catecholamine systems in the CNS of Vertebrates. Cambridge: Cambridge Univ. Press. 21—47.
- Vanhatalo S., Soinila S. 1995. Nitric oxide synthase in the hypothalamo-pituitary pathways. J. Chem. Neuroanat. 8 : 165—173.
- Vigh B., Vigh-Teichmann I., Aros B. 1976. Cerebro-spinal fluid-contacting neurons, ciliated perikarya and «peptidergic» synapses in the magnocellular preoptic nucleus of teleostean fishes. Cell Tissue Res. 165 : 397—413.
- Villani L., Guarnieri T. 1995. Localization of NADPH-diaphorase in the goldfish brain. Brain Res. 679 : 261—266.
- Wang H., Morris J. F. 1996. Constitutive nitric oxide synthase in hypothalamus of normal and hereditary diabetes insipidus rats and mice: role of nitric oxide in osmotic regulation and its mechanism. Endocrinology. 137 : 1745—1751.
- Wullimann M. F., Meyer D. L. 1993. Possible multiple evolution of indirect telencephalo-cerebellar pathways in teleosts: studies in *Carassius auratus* and *Pantodon buchholzi*. Cell Tissue Res. 274 : 447—455.
- Zhu X.-Z., Luo L.-G. 1992. Effect of nitroprusside (nitric oxide) on endogenous dopamine release from rat striatal slices. J. Neurochem. 59 : 932—935.

NADPH-DIAPHORASE, NITRIC OXIDE SYNTHASE, AND TYROSINE HYDROXYLASE  
IN THE DIENCEPHALON OF THE *RHODEUS SERICEUS* (CYPRYNIDAE: TELEOSTEI)E. V. Pushchina,<sup>1</sup> D. K. Obukhov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Marine Biology, Far East Branch of RAS, Vladivostok,  
and <sup>2</sup> Department of Cytology and Histology, St. Petersburg State University;  
e-mail: pushchina@mail.ru, dkobukhov@yandex.ru

The presence and distribution of nitric oxide synthase (NOS)-like neurons as well as tyrosine hydroxylase-immunoreactive (TH) neurons was studied in the diencephalon of the cypriniform teleost *Rhodeus sericeus*. The anatomical relationships between tyrosine hydroxylase (TH)- and nitric oxide synthase (NOS)-containing cells were visualized both by NOS-immunohistochemistry and NADPH-histochemistry. Immunohistochemical labeling and morphological studies were performed on the same sections. The results reported in this paper show that both a NOS and TH activity are present in the preoptic region, posterior tuberculum, paraventricular organ and hypothalamus of *R. sericeus*. Putative nitrenergic neurons were identified in all major hypophysiotrophic nuclei of the *R. sericeus* brain using both NADPH-d histochemistry and nNOS immunohistochemistry. In the preoptic region, nitrenergic neurons were found in both the parvocellular and the magnocellular nuclei. Within these nuclei, the distribution of NADPH-d reactivity was similar to that of nNOS immunoreactivity. However, we found no evidence of colocalization of NADPH-d and nNOS in consecutive sections. NOS- and TH-containing neurons were observed in all the nuclei under study (hypothalamus, posterior tuberculum, ventral thalamus) and telencephalon (preoptic region), although most neurons showing the coexistence of both substances were mainly located in the preoptic nucleus and hypothalamus, some labelled neurons were found in the posterior tuberculum. Most of the cerebrospinal liquor-contacting cells (LCNs) in diencephalic periventricular area of *R. sericeus* were TH-immunoreactive. Also, a large number of nitrenergic small LCNs distributed throughout the third ventricle were observed in these regions. The data obtained supports the existence of a nitrenergic circumventricular system in teleost. LCNs in *R. sericeus* are thought to be involved in osmoregulatory functions as osmosensitive neurons. Due to their chemical properties, NO produced by these cells might play an important role in the maintenance and regulation of CSF homeostasis through the modulation of cerebral blood flow.

**Key words:** tyrosine hydroxylase, neuronal nitric oxide synthase, NADPH-diaphorase, *Cyprynidae*, diencephalic hypophysiotrophic nuclei, cerebral blood flow regulation.

---