

УДК 595.124:591.88

**NADPH-ДИАФОРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ  
В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ  
БЕЛОМОРСКИХ НЕМЕРТИН**

*О.В. Зайцева, Т.Г. Маркосова*

**Аннотация**

С помощью гистохимического метода, позволяющего выявлять NADPH-диафоразную активность (NADPHd), впервые было исследовано распределение NO-ергических элементов в периферической нервной системе представителей разных филогенетических групп немертин на примере *Cephalotrix linearis* (кл. Anopla, отр. Palaeonemertini), *Lineus viridis*, *Lineus ruber* (кл. Anopla, отр. Heteronemertini) и *Amphiporus lactifloreus* (кл. Eopla, отр. Hoplonemertini). Показано, что оксид азота является широко распространенным у немертин нейротрансмиттером и (или) нейромодулятором. NADPHd присутствует в нервных элементах, иннервирующих мускулатуру стенки всего тела, хобота и мышечные клетки пищеварительного тракта, что свидетельствует о активном участии оксида азота в регуляции мышечных сокращений основных отделов тела и органов у представителей разных филогенетических ветвей немертин. NADPHd выявляется также в целом ряде клеток ресничных эпителиев немертин, имеющих как экто-, так и энтодермальное происхождение: в кожных покровах, в эпителии ринхоцеля и хобота, в эпителии глотки, средней и задней кишок. Предполагается, что у немертин эпителиальные NO-ергические клетки могут представлять собой рецепторные элементы, участвующие, как и у других беспозвоночных и позвоночных животных, в регуляции работы ресничного аппарата клеток, экзо- и эндокринной секреции и в иммунологической защите организма. Обсуждается возможная колокализация оксида азота с катехоламинами или серотонином в ряде регуляторных клеток стенки тела и пищеварительного тракта немертин.

Последние годы отмечены пристальным вниманием к открытому в 80-е годы прошлого века новому биологически активному веществу – оксиду азота (окси азота). Оксид азота (NO) является газом и синтезируется в клетках с помощью фермента NO-синтазы. Он действует как неспецифический нейротрансмиттер и нейромодулятор в центральной и периферической нервной системе, является универсальным эндогенным регулятором клеточного и тканевого метаболизма животных и человека. Установлена его важная роль в регуляции респираторной и репродуктивной функции, тонуса гладких мышц, работы ресничного аппарата клеток, в пищевом поведении, в иммунологической защите, эндокринной и экзокринной секреции у позвоночных и отдельных представителей беспозвоночных животных. Распределение и функциональная значимость NO-ергических элементов в нервной системе позвоночных животных интенсивно исследуется. Аналогичных данных по беспозвоночным животным значительно

меньше. Имеются сведения о локализации NADPH-диафоразы (NADPHd), являющейся топографическим маркером структур, содержащих NO-синтазу, в периферической и центральной нервных системах только отдельных представителей плоских червей, морских звезд, членистоногих, двусторчатых и брюхоногих моллюсков. Немертины в этом плане еще не исследовались.

Немертины являются своеобразной группой беспозвоночных животных с не выясненными еще до конца филогенетическими связями. Исследование нервной системы подобных групп животных представляется принципиально важным как для разработки системы животного царства, так и для понимания закономерностей эволюции нервной и сенсорных систем в целом. Поэтому целью настоящей работы стало изучение распределения NADPHd в периферической нервной системе представителей разных филогенетических групп немертин. Объектами исследования являлись четыре вида беломорских немертин: *Cephalotrix linearis* (кл. Anopla, отр. Palaeonemertini), *Lineus viridis*, *Lineus ruber* (кл. Anopla, отр. Heteronemertini) и *Amphiporus lactifloreus* (кл. Enopla, отр. Hoplonemertini). Животные были собраны на литорали Чупинской губы Белого моря в районе Беломорской биологической станции Зоологического института РАН. После анестезии с хлористым магнием целых немертин фиксировали в течение 45–90 мин в 4%-ном растворе параформальдегида, приготовленном на 0.1%-ном фосфатном буфере (pH 7.2), при 4°C. После фиксации животных промывали в течение 3 ч в 20% растворе сахарозы на 0.1 М фосфатном буфере при 4°C. Поперечные и продольные серийные срезы животных толщиной 15–20 мкм изготавливали на замораживающем микротоме и монтировали на предметные стекла, обработанные предварительно полилизинном. Для выявления NO-ергических элементов использовали гистохимический метод выявления NADPHd Хоупа и Винсента. Сначала препараты выдерживали 30 мин в 0.15 М Трис-НСl буфере (pH 7.9) с добавлением 0.05% Тритона X-100. Затем их инкубировали в среде, содержащей 2–3 мМ  $\beta$ -NADPH (Sigma), 1 мМ нитросинего тетразолиевого (Sigma) и 0.05% Тритона X-100 в 0.15 М Трис-НСl буфере (pH 7.9). Инкубацию проводили при комнатной температуре в течение 1.5–4 ч либо при 4°C – от 24 до 48 ч. После инкубации срезы промывали в Трис-НСl буфере, дофиксировали в течение 10–15 мин в 4%-ном параформальдегиде, приготовленном на том же буфере, снова промывали, обезвоживали в спиртах и заключали в канадский бальзам. В контрольных опытах срезы инкубировали в среде без добавления  $\beta$ -NADPH или в среде без добавления нитросинего тетразолиевого. В работе использовали по 5 особей каждого вида немертин. При анализе результатов применяли световой микроскоп, соединенный с видеокамерой LeicaDFC 300 FX, и компьютерную систему Videotest, а также рисовально-проекторный аппарат PA-7.

Проведенное исследование показало, что у представителей всех исследованных видов немертин NADPHd локализуется в целом в сходных нервных структурах в одних и тех же отделах тела и внутренних органах. NADPHd выявляется в стенке тела – в нервных элементах эпидермиса, кутиса (у Heteronemertini) и мускулатуры, а также в эпителии ринхоцеля и хобота, в нервных волокнах, иннервирующих мускулатуру хобота, и в нервных клетках и волокнах стенки всего пищеварительного тракта. Однако, в целом, более интенсивную реакцию на NADPHd удалось получить у линеусов, а самую слабую – у *C. linearis*.

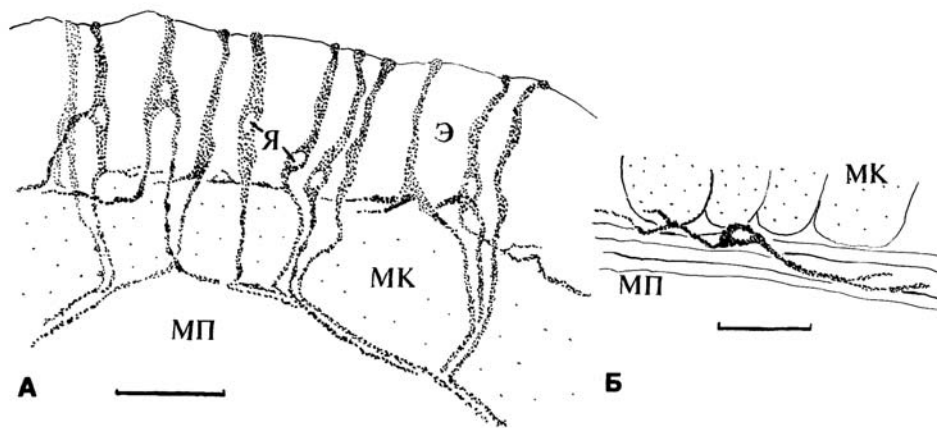


Рис. 1. NADPHd-позитивные нервные клетки в эпидермисе (А) и на границе кольцевого и продольного мышечных слоев (Б) в стенке тела *A. lactifloreus*: э – эпителий, я – светлая ядродержащая часть NADPHd-п клеток, мк – и мп – кольцевая и продольная мускулатура соответственно. Масштаб: 250 мкм

Установлено, что в эпидермисе практически всего тела немертин довольно равномерно располагаются NADPHd-позитивные (NADPHd-п) интраэпителиальные нервные клетки (рис. 1, А). Большая часть этих клеток относится к открытому типу и имеет вытянутую цилиндрическую или веретеновидную форму. Многие клетки имеют обособленную ядродержащую часть и длинный периферический отросток, образующий у поверхности эпидермиса булавовидное расширение. От базальной части клеток отходит один или несколько отростков, распределяющихся в основании эпителия и образующих варикозные расширения и терминальные окончания у эпителиальных и, особенно, железистых клеток. Интенсивность NADPHd-активности и ее локализация в интраэпителиальных клетках связаны, по всей видимости, с функциональным состоянием клеток. У разных особей одного и того же вида немертин и в разных (иногда соседних) участках эпидермиса наблюдаются клетки более интенсивно и равномерно окрашенные по всей длине своего тела, так и клетки, у которых тела почти не выявляются, поскольку вся NADPHd-активность оказывается сосредоточенной в базальной и апикальной частях клеток и их отростках.

В паренхиме передней части тела животных перед головными ганглиями обнаруживается NADPHd-п нервный плексус. Он образован сетью тонких варикозных нервных волокон и единичными мелкими нейронами 6–10 мкм в диаметре. У линеусов он располагается между и вокруг цефалических органов. Отдельные NADPHd-п нейроны такого же диаметра выявляются у линеусов и в кутисе по всей длине тела. Как правило, эти нейроны имеют мультиполярную (чаще треугольную) форму. Многие из них могут относиться к открытому типу, поскольку их единственный периферический отросток уходит в эпидермис. Другие отростки ветвятся в кутисе и иногда проходят в подлежащий наружный слой продольных мышц и направляются к ЛНС.

Вся мускулатура стенки тела немертин пронизана NADPHd-п нервными волокнами, имеющими регулярные варикозные расширения с высокой NADPHd-активностью. Эти волокна во всех мышечных слоях идут параллельно мышеч-

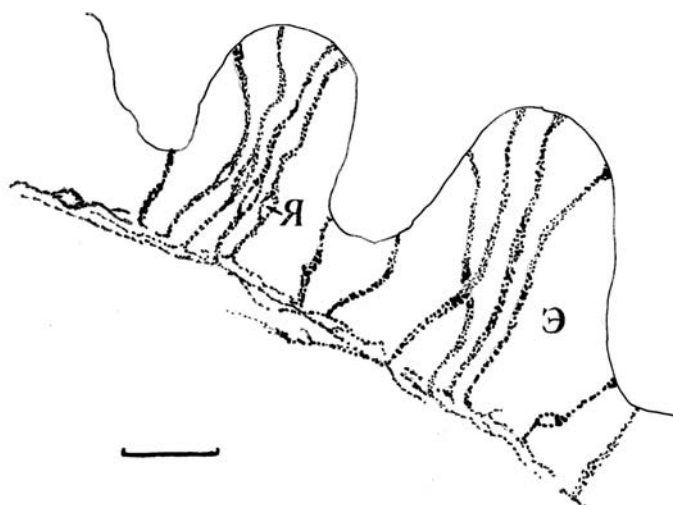


Рис. 2. NADPHd-позитивные нервные клетки в средней кишке *A. lactifloreus*, обозначения такие же, как на рис. 1

ным волокнам, образуя иногда ответвления, охватывающие мышечные волокна полукругом. Редкие NADPHd-п тела нейронов выявляются, как правило, по границе между кольцевым и продольным мышечными слоями. Диаметр нейронов составляет 9–12 мкм. Чаще они имеют биполярную форму (рис. 1, Б), но встречаются уни- и мультиполярные клетки.

Интенсивную реакцию на NADPHd дают многочисленные клетки открытого типа в эпителии всего ринхоцеля и особенно в области ринхостома. Они имеют вытянутую форму, их отростки образуют сплетение в основании эпителия и уходят за его пределы в подлежащие ткани. В эпителии и мускулатуре хобота также присутствуют NADPHd-п элементы. Однако, в отличие от стенки ринхоцеля, NADPHd-активность нервных элементов распределена по длине хобота неравномерно. Она максимальна в интраэпителиальных клетках и нервных волокнах мускулатуры самого кончика и средней части хобота. Более наглядно это выражено у линеусов и *A. lactifloreus*.

Интенсивная NADPHd-активность обнаружена в нервных элементах, расположенных по всей длине пищеварительного тракта. Причем наибольшая ее активность выявлена в эпителии пищеварительного тракта линеусов. NADPHd активность локализуется преимущественно в интраэпителиальных клетках открытого типа. Их отростки образуют интраэпителиальное нервное сплетение и уходят под эпителий к ЛНС (рис. 2). Высота и форма клеток меняются по длине тракта от ротового отверстия до ануса вместе с высотой эпителия. Реже в стенке пищеварительного тракта у немертин встречаются NADPHd-п клетки закрытого типа, не имеющие контакта с поверхностью эпителия. У них округлое тело диаметром 6–7 мкм и длинный отросток, проходящий в основании эпителия параллельно его поверхности (рис. 2). Выявляются и отдельные NADPHd-п волокна среди мышечных клеток по всей длине тракта.

Как и у описанных выше NADPHd-п клеток открытого типа, в других эпителиальных тканях активность NADPHd в клетках пищеварительного тракта не-

мертин может изменяться по своей интенсивности и локализации от равномерно распределенной по всей цитоплазме тела до интенсивной концентрации только в апикальной и базальной частях и отростках клеток. Этот факт может быть связан с перераспределением фермента в клетках в ходе процесса пищеварения и выделения оксида азота как через контакты на отростках в интра- и субэпителиальных нервных сплетениях, так и путем паракринии в просвет тракта.

Проведенное исследование показывает, что оксид азота является широко распространенным в периферической нервной системе немертин нейротрансмиттером и нейромодулятором. NADPHd присутствует в нервных элементах, иннервирующих мускулатуру стенки тела, хобота и мышечные клетки пищеварительного тракта, что свидетельствует о активном участии оксида азота в регуляции мышечных сокращений основных отделов тела и органов у представителей разных филогенетических ветвей немертин. NADPHd выявляется в ресничных эпителиях немертин, имеющих как экто-, так и энтодермальное происхождение: в кожных покровах, в эпителии ринхоцеля и хобота, в эпителии глотки, средней и задней кишок. NO-ергические клетки этих эпителиев могут участвовать, как и у других беспозвоночных и позвоночных животных, в регуляции работы ресничного аппарата клеток, экзо- и эндокринной секреции и иммунологической защиты организма. У позвоночных животных оксид азота считают одним из важнейших факторов защиты слизистой желудка.

Морфология, положение относительно эпителиального пласта и распределение отростков выявленных нами у немертин NO-ергических интраэпителиальных элементов открытого типа позволяют рассматривать их в качестве первичночувствующих рецепторных или примитивных рецепторно-эффektorных клеток, а клетки закрытого типа – как ассоциативные и эффektorные нейроны. Они могут осуществлять связи в пределах периферической нервной системы немертин и участвовать в иннервации железистых и ресничных эпителиальных клеток кожных покровов и пищеварительного тракта.

Наши более ранние иммуноцитохимические и гистохимические исследования показали, что сходные по морфологии и локализации в эпидермисе и эпителии пищеварительного тракта клетки содержат у тех же видов немертин преимущественно катехоламины и серотонин. Поскольку известно, что оксид азота находится в клетках обычно в колокализации с другими биологическими активными веществами – ацетилхолином, моноаминами или пептидами, то не исключено, что в некоторых выявленных нами NADPHd-п клетках оксид азота также находится в колокализации с катехоламинами или серотонином.

Широкое распространение NADPHd у представителей разных филогенетических ветвей немертин и ее локализация в одних и тех же отделах их тела и органах свидетельствуют о раннем появлении оксида азота в качестве универсального биологически активного вещества в их эволюции. При этом следует отметить, что у немертин, наряду с выделением оксида азота через контакты на отростках, очевидно существование более древнего типа передачи информации с помощью оксида азота по средствам паракринии на поверхность эпидермиса, в просвет пищеварительного тракта или ринхоцель.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 06-04-49096 и №06-04-48544).

### Summary

*O.V. Zaitseva, T.G. Markosova.* NADPH-diaphorase activity in the peripheral nervous system of the White Sea Nemerteans.

The distribution of NO-ergic elements in the peripheral nervous system of representatives of different phylogenetic groups of nemerteans on the example of *Cephalotrix linearis* (Anopla, Palaeonemertini), *Lineus viridis*, *Lineus ruber* (Anopla, Heteronemertini) and *Amphiporus lactifloreus* (Enopla, Hoplonemertini) was for the first time investigated by means of the histochemical method, allowing to reveal NADPH-diaphorase (NADPHd) activity. It is shown that nitrogen oxide is the neurotransmitter and (or) neuromodulator widespread in nemerteans. NADPHd is present in the nervous elements, which innervate the musculature of the wall of entire body, proboscis and muscle cells of the digestive tract, that testifies about the active participation of nitrogen oxide in regulation of muscle contractions of the basic divisions of the body and the organs in representatives of the different phylogenetic branches of nemerteans. NADPHd is revealed also in a lot of cells of the ciliary epithelia of nemerteans, which have both ecto- and entodermal origin: in the integuments, in the epithelium of rinchocoelium and proboscis, in the epithelium of pharynx, midgut and rectum. It is assumed that the epithelial NO-ergic cell in nemerteans can represent the receptory elements, which participate, as in other invertebrate and vertebrate animals, in regulation of the work of the cells ciliary apparatus, exo- and endocrine secretion and in the immunological protection of organism. The possible colocalization of nitrogen oxide with catecholamines or serotonin in a number of the regulatory cells of the body wall and the digestive tract of nemerteans is discussed.

Поступила в редакцию  
29.07.07

---

**Зайцева Ольга Викторовна** – доктор биологических наук, заведующий лабораторией Зоологического института РАН, г. Санкт-Петербург.

E-mail: [morphol@zin.ru](mailto:morphol@zin.ru), [ovzaitseva@inbox.ru](mailto:ovzaitseva@inbox.ru)

**Маркосова Тамара Григорьевна** – старший хранитель коллекции Зоологического института РАН, г. Санкт-Петербург.

E-mail: [morphol@zin.ru](mailto:morphol@zin.ru)