

LOKALIZÁCIA NADPH-d POZITÍVNYCH BUNIEK V TÝMUSOCH BAŽANTA A MYŠI

DORKO F., KOČIŠOVÁ M., GREGOR A., *DORKO E.

LOCALIZATION OF NADPH-d POSITIVE CELLS IN THYMUSES OF PHEASANT AND MICE

The presented study was designed to clarify the localization and distribution of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d) activity, a marker of NO synthase, in pheasant and mouse thymuses. To provide a morphological basis for understanding the role of nitric oxide (NO) in the thymus. The NADPH-d histochemistry revealed dark blue stained cell structures.

In the pheasant thymus, NADPH-d positive cells were present as clusters which were distributed in the medulla and the corticomedullar area.

NADPH-d positive cells were observed mostly in the medulla of the mouse thymus. They were round, oval or irregular in shape, with various intensity of staining. There were found NADPH-d positive nerve fibres in the perivascular location in both groups of experimental animals. (Fig. 4, Ref. 14.)

Key words: thymus, NADPH-d, pheasant, mouse.

Bratisl Lek Listy 1998; 99: 104–107

Nikotínamidadenín-dinukleotidhydrogénfosfátdiaforázová (NADPH-d) histochemická reakcia predstavuje prenos vodíka zo substrátu NADPH na tetrazóliovú soľ, ktorá sa mení na nerozpustný tmavomodrý formazan (Scherer-Singler a spol., 1983; Mizukawa, 1990). Dôležitosť tejto reakcie narástla po objave, že neuronálna NADPH-d je natoľko podobná syntáze oxidu dusíka (nitric oxide synthase — NOS), že môže byť identická (Dawson a spol., 1991; Hope a spol., 1991). NOS je enzým zodpovedný za syntézu oxidu dusíka (nitric oxide — NO) konverziou L-arginínu na citrulín. Pretože NO je plyn, voľný radikál s polčasom 5 sekúnd, môže ľahko difundovať do tkanív (Kiechle a spol., 1993). Jeho detekcia je zameraná na určovanie enzýmu NOS. Práce mnohých autorov potvrdzujú,

Táto práca je zameraná na určenie lokalizácie nikotínamidadenín-dinukleotidfosfátdiaforázovej (NADPH-d) aktivity ako markera pre syntézu oxidu dusíka (nitric oxide synthase — NOS) v týmusu bažanta a myši. Uvedené výsledky môžu poskytnúť morfológický základ pre pochopenie úlohy oxidu dusíka (nitric oxide — NO) v týmusu. NADPH-d histochemia znázorňovala tmavomodro zafarbené štruktúry buniek a ukázala odlišnú distribúciu diaforázovopozitívnej reaktivity u oboch druhov experimentálnych zvierat.

V týmusu bažanta sme NADPH-d pozitívne bunky oválneho a nepravidelného tvaru pozorovali v dreni a kortikomedulárnej oblasti v strapcovitých zoskupeniach.

V týmusu myši sme pozorovali NADPH-d pozitívne bunky hlavne v dreni. Tieto bunky boli rôznej intenzity sfarbenia a mali oválne, okrúhle a nepravidelné telá. V perivaskulárnej lokalizácii sme zistili NADPH-d pozitívne nervové vlákna u oboch druhov experimentálnych zvierat. (Obr. 4, lit. 14.)

Kľúčové slová: týmus, NADPH-d, bažant, myš.

Bratisl. lek. Listy, 99, 1998, č. 2, s. 104–107

že endotelová a neuronálna forma NOS je lokalizovaná spolu s NADPH-d v tkanivách fixovaných 4 % paraformaldehydom.

Narastajúci počet údajov potvrdzuje, že NO sprostredkúva určité funkcie v autonómnom nervovom systéme (Boeckxstaens a spol., 1992; Grozdanovič a spol., 1992). V našej práci sme sa zamerali na prítomnosť NO v týmusu bažanta a myši histochemickým sledovaním NADPH-d buniek.

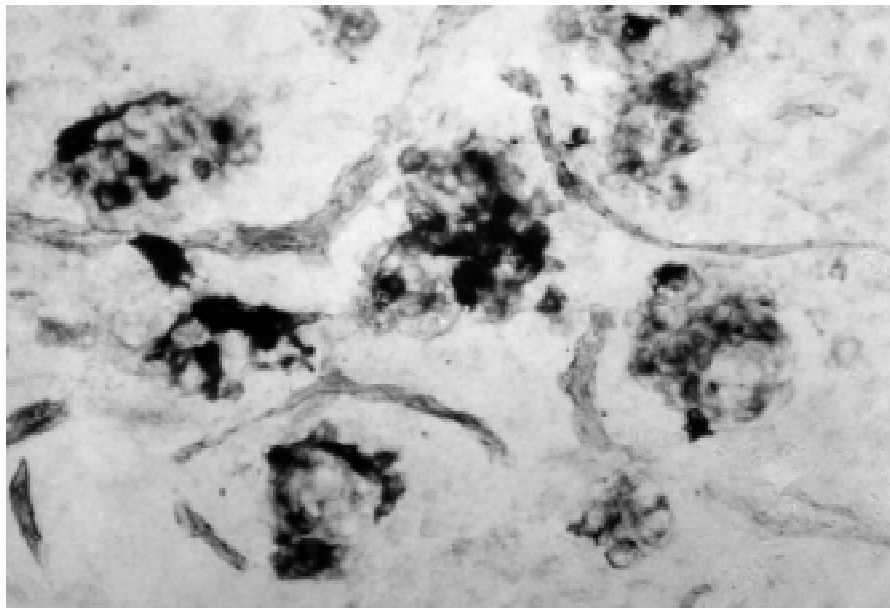
Materiál a metodika

V práci sme použili 10 myši oboch pohlaví s celkovou hmotnosťou 40–50 g a 5 bažantov—samcov s hmotnosťou 250 až 300 g. Zvieratá sme anestetizovali pentobarbitalom. Potom sme ich usmrtili intrakardiálnou perfúziou fyziologickým roztokom a následnou perfúziou 4 % paraformaldehydom s 0,1 % glutaraldehydom v 0,1 M vo fosfátovom tlmivom roztoku, pH 7,4. Roztoky boli pripravené tesne pred perfúziou. Po perfúzii sme týmusy vyoperovali z hrudnej dutiny a uložili v rovnakom fixatíve na 3–4 h. Nasledovalo ich umiestnenie v 30 % sacharóze v tom is-

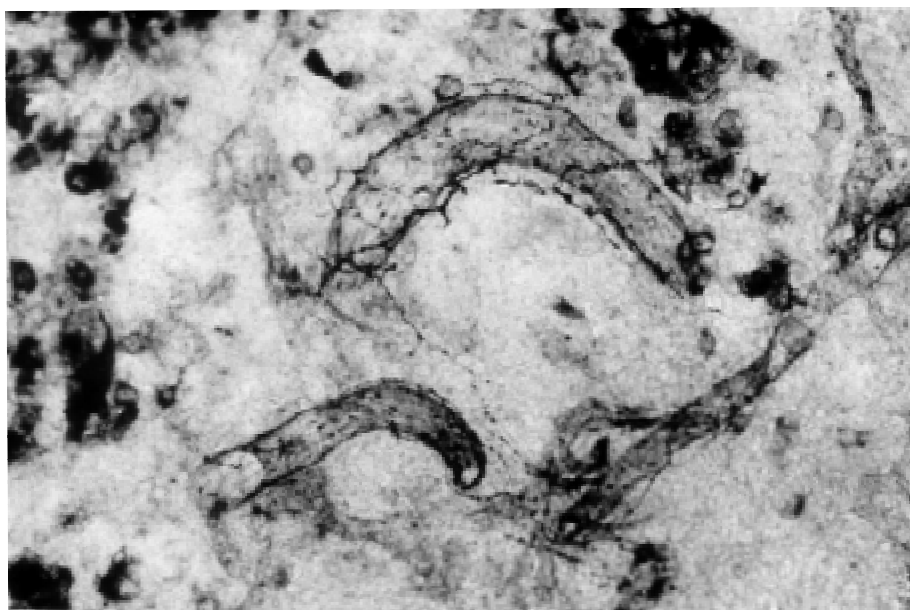
Ústav anatómie a *Ústav mikrobiológie Lekárskej fakulty Univerzity P.J. Šafárika v Košiciach

Institute of Anatomy and *Institute of Microbiology, Faculty of Medicine, Safarikians University, Košice

Address for correspondence: F. Dorko, MD, PhD, Ústav anatómie LF UPJŠ, Šrobárova 2, 040 01 Košice, Slovakia.



Obr. 1. Týmus bažanta s NADPH-d pozitívnymi bunkami v strapcovitých zoskupeniach.
Fig. 1. Thymus of pheasant: NADPH-d positive cells organized in clusters.



Obr. 2. Týmus bažanta. V perivaskulárnej topografii NADPH-d pozitívne nervové vlákna s typickými varikozitami.
Fig. 2. Thymus of pheasant: NADPH-d positive nerve fibers with typical varicosities in perivascular topography.

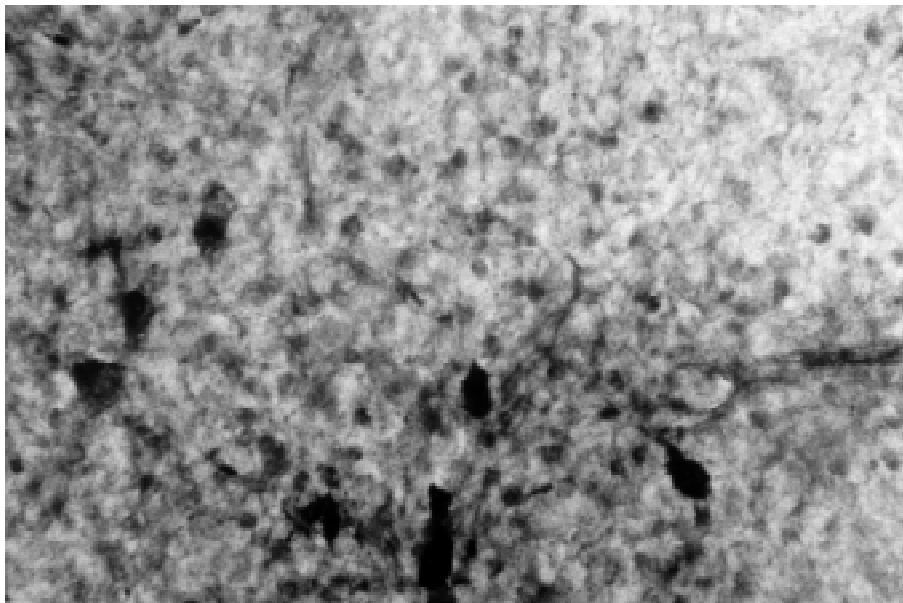
tom fosfátovom tlmivom roztoku cez noc pri 4 °C. Potom sa týmusy narezali na zmrazovacom mikrotóme 45 µm hrubé.

Histochemickú reakciu na znázornenie NADPH-d aktivity, ktorú sme použili, sme modifikovali podľa Scherera-Singlera (1983). Podľa nej sme rezy inkubovali 1 h pri 37 °C v roztoku 1,5 mM nitroblue tetrazólia (NBT, Sigma Chemicalo, N-6876), 1,0 mM betanikotínamidadeníninukleotidfosfátu (NADPH, Sigma Chemicals, N-1630, 10,0 mM monosodiummalátu (Malic acid, Sigma Chemicals, M-1125), 0,5 % Tritonu X-100 rozpustného v 0,1 M fosfátovom

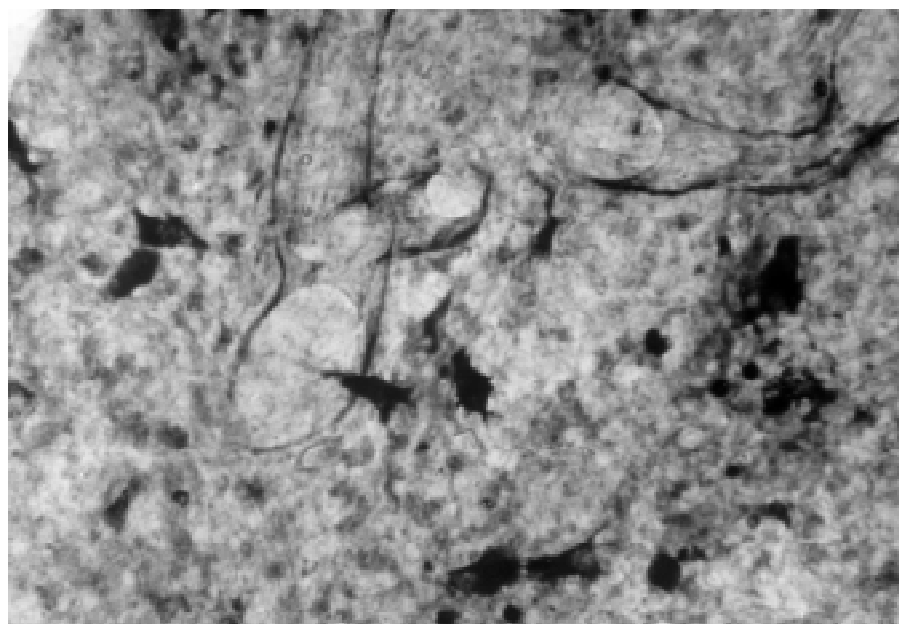
tlmivom roztoku, pH-8,0. Po inkubačnej reakcii sme rezy prepierali v 0,1 M fosfátovom tlmivom roztoku (pH 7,4), montovali do Entellanu a prezerali vo svetelnom mikroskope.

Výsledky

NADPH-d histochemia týmusov bažanta a myši ukázala odlišnú distribúciu diaforázovo-pozitívnej reaktivity v dreni a v kôre znázornenú ako tmavomodro zafarbené bunkové štruktúry.



Obr. 3. Týmus myši. Rôzne druhy NADPH-d pozitívnych nervových buniek v dreňi týmusu.
Fig. 3. Mouse thymus: Various forms of NADPH-d positive cells in thymic medulla.



Obr. 4. Týmus myši. Bunky nepravidelného tvaru s krátkymi výbežkami v blízkosti ciev s vysokou NADPH-d pozitivitou. V perivaskulárnej lokalizácii prebiehajú NADPH-d pozitívne nervové vlákna.
Fig. 4. Mouse thymus: Irregular shaped cells and their processes with high-levelled NADPH-d positivity along vessels. The thin NADPH-d positive nerve fibers are in perivascular localization.

Týmus bažanta

NADPH-d aktivita v kôre týmusu oboch sledovaných experimentálnych zvierat bola v podstate podobná. Diaforázovo-pozitívne bunky preukazovali len slabú intenzitu a vyskytovali sa ojedinele v parenchýme kôry. V kôre radiálne prebiehajúce tenšie a hrubšie cievy mali známky NADPH-d pozitivitu endotelových

buniek. Dreň týmusu bažanta mala odlišnú distribúciu NADPH-d pozitívnych buniek. Intenzívne sfarbené bunky sa dali pozorovať prevažne v kortikomedulárnej oblasti a riedko aj vo vnútornej časti drene, kde sa vyskytovali v strapcovitých zoskupeniach (obr. 1). V dreňi sa vyskytovali aj samostatné NADPH-d pozitívne bunky. Jednotlivé bunky v strapcovitých zoskupeniach boli oválneho a ne-

pravidelného tvaru s rôznou intenzitou sfarbenia. Bunky nepravidelného tvaru mali často výbežky. Cievky vyskytujúce sa v dreni mali NADPH-d pozitívne endotelové bunky a v perivaskulárnej lokalizácii sme pozorovali nervové vlákna. NADPH-d pozitívne nervové vlákna prezentovali varikozity (obr. 2).

Týmus myši

V kôre NADPH-d pozitívne bunky sa vyskytovali v malom počte a boli difúzne rozptýlené. Jednotlivé bunky boli oválne a mali slabú intenzitu diaforázovo-pozitívneho sfarbenia. Nepozorovali sme žiadne výbežky týchto buniek. Viditeľnejšie boli znázornené len radiálne orientované cievky.

V dreni týmusu myši bol počet NADPH-d pozitívnych buniek omnoho väčší (obr. 3). NADPH-d pozitívne bunky drene mali podobný tvar ako v kôre, boli väčšinou oválne, okrúhle a nepravidelného tvaru. Intenzita sfarbenia buniek kolísala od slabej až k veľmi intenzívnej. Podľa intenzity ich sfarbenia možno rozdeliť tieto bunky do niekoľkých skupín.

— Bunky s najslabšou NADPH-d pozitivitou boli slabo sfarbené, viditeľné bolo len ohraničenie ich tiel. Vyskytovali sa roztrúsené po celej dreni.

— Iné bunky preukazovali zreteľné marginálne NADPH-d sfarbenie. Navyše v ich cytoplazme sa dali pozorovať NADPH-d pozitívne granuly. Jednotlivé bunky sa vzájomne líšili rôznou intenzitou sfarbenia týchto granúl.

— Jedna skupina dreňových buniek preukazovala obzvlášť intenzívnu NADPH-d reakciu. Išlo o bunky nepravidelného tvaru sýto tmavo a intenzívne sfarbených. Pri týchto bunkách sme pozorovali krátke výbežky. Tento typ buniek sa často vyskytoval v dreni v blízkosti ciev (obr. 4).

Krvné cievky lokalizované v dreni a v septách mali známky NADPH-d pozitivitu endotelových buniek. NADPH-d pozitívne nervové vlákna sme pozorovali v perivaskulárnej topografii (pozri obr. 4).

Diskusia

V našej práci sme sledovali histochemické znázornenie NADPH-d aktivity v týmusoch bažanta a myši. Z literatúry je známe, že NADPH-d sa môže považovať za marker NOS, enzým zodpovedný za syntézu NO (Bredt a spol., 1991; Dawson a spol., 1991; Schmidt a spol., 1992). Aktivita tohto enzýmu sa dokázala v mnohých oblastiach nervového systému u cicavcov (Aimi a spol., 1991; Anderson, 1992; Grozdanovič a spol., 1992; Scherer-Singler a spol., 1983; Valschanoff, 1992).

Práce Downinga (1994) a Gulatiho a spol. (1993) potvrdzujú distribúciu NADPH-d pozitívnych štruktúr v týmusoch u potkana a kurčáta. Naše pozorovania v týmuse bažanta ukazujú na podobnosť NADPH-d pozitívnych štruktúr v týmusoch kurčiat, ktorú pozorovali Gulati a spol. (1993). Aj my sme pozorovali NADPH-d pozitívne bunky u bažanta hlavne v kortikomedulárnej štrbine, aj v dreni v strapcovitých zoskupeniach. Intenzita sfarbenia bola rôzna. Hustota nervových vlákien u bažanta bola omnoho väčšia ako u myši. Zatiaľ sme nenašli údaje o výskyte NADPH-d v týmuse myši a o jeho možnom využití NO ako neurotransmitera. Pri sledovaní NADPH-d pozitívnych buniek v týmusoch myši sme zistili rozdiely v množstve a type týchto buniek v kôre a dreni. Kým v kôre prevládali oválne bunky difúzne rozptýlené so slabou intenzitou sfarbenia, v dreni sme pozorovali väčšie množstvo a typy NADPH-d pozitívnych buniek.

Tieto bunky sa vyskytovali v hustých zoskupeniach, rôznej intenzity sfarbenia a významnú pozornosť si zasluhujú sýto sfarbené bunky nepravidelného tvaru s malými výbežkami. Tieto bunky pripomínajú nervové bunky. Vyskytovali sa v blízkej lokalizácii ciev. V perivaskulárnej topografii sme pozorovali NADPH-d pozitívne nervové vlákna. Ich prítomnosť a lokalizácia dovoľujú predpokladať, že NO sa môže zúčastňovať na neurotransmisii v týmuse.

Literatúra

Aimi Y., Fujimura M., Vincent S.R., Kimura H.: Localization of NADPH-diaphorase containing neurons in sensory ganglia of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 306, 1991, č. 1, s. 382—392.

Anderson C.R.: NADPH diaphorase-positive neurons in the rat spinal cord include a subpopulation of autonomic preganglionic neurons. *Neurosci. Lett.*, 139, 1992, s. 280—284.

Boeckxstaens G.E., Pelckmans P.A., Bult H., DeMan J.G., Herman A.G., Van Maercke: The arginine-nitric oxide pathway mediates non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission in gastrointestinal tissue. *Guanidino Compounds in Biology and Medicine. Chapter, 13*, 1992, s. 89—96.

Bredt D.S., Glatt C.E., Hwang P.M., Fotuhi M., Dawson T.M., Snyder S.H.: Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron*, 7, 1991, s. 615—624.

Dawson T.M., Bredt D.S., Fotuhi M., Hwang P.M., Snyder S.H.: Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1991, s. 7797—7801.

Downing J.E.G.: Multiple nitric oxide synthase systems in adult rat thymus revealed using NADPH diaphorase histochemistry. *Immunology*, 82, 1994, s. 659—664.

Grozdanovic Z., Baumgarten H.G., Bruning G.: Histochemistry of NADPH-diaphorase, a marker for neuronal nitric oxide synthase, in the peripheral autonomic nervous system of the mouse. *Neuroscience*, 48, 1992, s. 225—235.

Gulati P., Chan A.S., Leong S.K.: NADPH-diaphorase positive cell in the chick and rat thymus. *Thymus*, 22, 1993, s. 117—124.

Hope B.T., Michael G.J., Knigge K.M., Vincent S.R.: Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1991, s. 2811—2814.

Kiechle F.L., Maliski T.: Nitric oxide biochemistry, pathophysiology, and detection. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 100, 1993, s. 567—573.

Mizukawa K.: Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase histochemistry: Light and electron microscopic investigations. *Methods Neurosci.*, 3, 1990, s. 457—472.

Scherer-Singler U., Vincetn S.R., Kimura H., McGeer E.G.: Demonstration of a unique population of neurons with NADPH diaphorase histochemistry. *J. Neurosci. Methods.*, 8, 1993, s. 229—234.

Schmidt H.H.H.W., Gague G.D., Nakame M., Pollock J.S., Miller M.F., Murado F.: Mapping of neural NO synthase in the rat suggests frequent localization with NADPH diaphorase but not soluble guanylyl cyclase and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J. Histochem. Cytochem.*, 40, 1992, s. 1439—1456.

Valtschanoff J.G., Weinberg R.J., Rustioni A.: NADPH diaphorase in the spinal cord of rats. *J. Comp. Neurol.*, 321, 1992, s. 209—222.

Do redakcie došlo 15.8.1996.