

POSTNATAL DÖNEMDE RATLARDA CANALIS CENTRALIS'İN EPENDİM HÜCRELERİNDEKİ NİTRİK OKSİT SENTEZİ VARLIĞI ÜZERİNDE BİR ARAŞTIRMA

Zafer SOYGÜDER¹, Mümtaz NAZLI², Gürsoy AKSOY¹

¹Yüzüncüyl Üniveritesi Veteriner Fakültesi, Van-TÜRKİYE

²Kafkas Üniveritesi Veteriner Fakültesi, Kars-TÜRKİYE

Geliş Tarihi:14.06.2000

An Investigation on the Expression of Nitric Oxide Synthase In Ependymal Cells of The Central Canal In Newborn Rats

SUMMARY

In the present study, expression of neuronal nitric oxide synthase (n-NOS) was investigated during postnatal development of ependymal cells which line the central canal of the rat spinal cord. In ependymal cells, progressive decrease was seen in NOS expression with increasing postnatal age. Low level of NOS expression was present from day 2 and this expression totally disappeared by postnatal 20 (P20) days. Formation of the central canal was also found to be completed at P16. These observations suggest that NO may play a role in the formation of ependymal cells and consequently in the formation of the central canal.

Key words: *NOS, ependyma cells, rat.*

ÖZET

Bu çalışmada postnatal dönemde ratın medulla spinalis’indeki ependim hücrelerinde neuronal nitrik oksit sentezinin (n-NOS) varlığı incelendi. Ependim hücrelerindeki NOS varlığında doğum sonrası yaş artışı zit olarak sürekli bir azalma görüldü. Postnatal 2. (P2) günde az miktardaki NOS varlığı P20. günde tamamen kayboldu. Canalis centralis'in şekillenmesinin P16. günde tamamlandığı gözlandı. Bu bulgular nitrik oksit'in ependim hücrelerinin dolayısıyla canalis centralis'in postnatal gelişiminde ve şekillenmesinde rol alabileceğini akla getirmektedir.

Anahtar Kelimeler: *NOS,ependim hücreleri, rat*

GİRİŞ

Nitrik oksit (NO) bir serbest radikal gazdır. Küçük ve aktive bir gaz olduğundan difüzyon yoluyla hücre membranlarını kolaylıkla geçer. Milisaniye ile saniye arasında değişen bir yarı ömre sahiptir. NO, L-arginin'den NOS aracılığıyla oluşturulur. Elektron donor olarak nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)'ta ihtiyaç duyar (7,17). NO, soluable quanilate siklusu

aktive ederek cGMP'nin çoğalmasına sebep olur (12).

Nitrik oksit bir çok memeli omuriliğinde gözlenmiştir (2,5,9,18,27). NO'nun glia hücrelerinde birliği bildirimler arasındadır (3,4,13,16). NO'nun kan hücrelerinde tümörosit ve bakterisit olarak, kan damar endotelinde gevşetici olarak, sinir sisteminde ise bir neurotransmitter gibi rol aldığı iyi bilinmektedir (17). Diğer taraftan NO'nun medulla spinalis'te ağrı

olayında rol aldığı rapor edilmiştir (16,17,20,21). Medulla spinalis'in pars lumbalis'indeki lamina II hücrelerinde doğum sonrası yaşın artmasına paralel olarak NO varlığının arttığı (15,25) ve bu artışın *c-fos* proto-oncogeni ile aynı hücrelerde paralel geliştiği, dolayısıyla NO'nun postnatal ağrı gelişiminde de rol alabileceği vurgulanmıştır (25). Bunlara ilaveten, daha önceki çalışmalar NO'nun sinir hücresi yenilenmesinde (10,29,30), farklılaşmasında (8,23) ve korunmasında (14); glia hücrelerinin ise, yapılanması ve şekillenmesinde rol alabileceğini ileri sürmüştür (11).

Ependim hücreleri sinir destek dokusundan sayılmaktadır. Yani bir glia hücresi olarak bilinirler. Bu hücreler beyin ventrikuluslarının iç yüzünü ve medulla spinalis'in canalis centralis'ini döşerler. Ratlarda doğumdan sonraki erken dönemde ependim hücrelerinin cinsiyete bağlı bir gelişim göstermedikleri (28) ve bu hücrelerin gelişiminin postnatal dönemde birçok türde devam ettiği bildirilmiştir (6).

NO'nun postnatal dönemde ratlarda ependim hücrelerinin ve dolayısıyla canalis centralis'in şekillenmesinde rol alıp olmadığı bilinmemektedir. Bu araştırmada gelişen ependim hücrelerinde NOS varlığının immunohistokimyasal yolla araştırılması planlanmıştır.

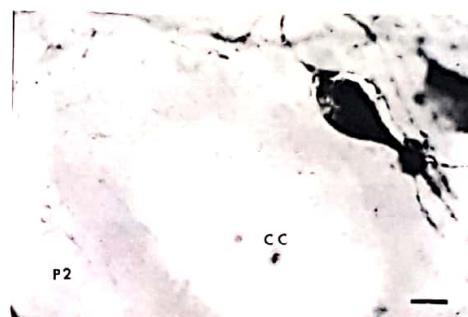
MATERIAL VE METOD

Bu çalışmada, her iki cinsten 2,7,11,16,20 günlük Wistar rat'ı kullanıldı. Hayvanlar halothane (%4 hava içerisinde) ile anestezi edildi. Intracardial olarak 5-10 ml Krebs solusyonu ile perfüzyonlarını takiben aynı yolla phosphate buffered saline (PBS) içinde hazırlanan 10-20 ml %4 lük paraformaldehyde ile tespitleri yapıldı. Medulla spinalis'in pars lumbalis'i diske edilerek aynı tespit edicide 2 saat tutuldu. Alınan dokular cryoprotection için PBS ile hazırlanan %20 lik sukroz'da 12 saat bekletildi. Dokuların transversal kesitleri (40μ kalınlığında) bir freez knife mikrotomunda alındı. PBS içinde serbest olarak yüzen kesitler bu solusyondan alınarak primer antikor (type-1 NOS antibodisi, 1:200) içerisinde 12 saat inkübe edildi. Çalışmada kullanılan tüm antiseralar %0.5 Triton-X ve %2.5 sığır serum albumini içeren PBS içerisinde dilute edildi. Kesitler, daha sonra, Amersham firmasından temin edilen ve 1:1000 dilusyonda hazırlanan biotinile edilmiş anti rabbit antisera'sı ve streptavidin horseradish peroxidase (HRP) içerisinde 1-2 saat oda sıcaklığında sırasıyla bekletildi. HRP'nin dağılımı Shu ve ark. (24)'nın chromogen protokolü

użyılarak açığa çıkarıldı. Kontrol deneylerinde primer antikor boyama prosedüründe kullanılmadı.

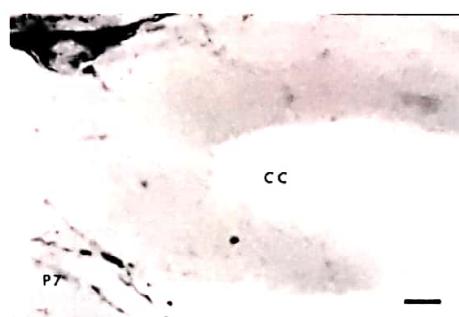
BULGULAR

P2. günde ependim hücrelerinde bulunan NOS varlığı canalis centralis'in etrafındaki çok kutuplu sinir hücrelerinde nazaran daha azdır (Şekil 1).



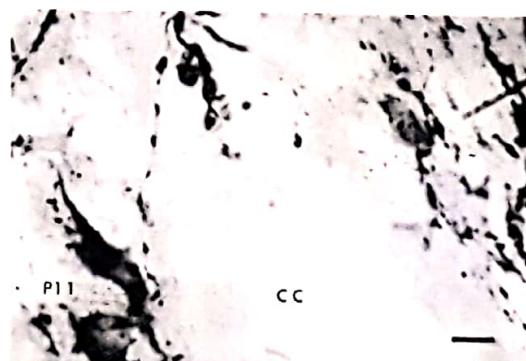
Şekil 1. P2. günde NOS varlığı: NOS en üst seviyede

İncelenen postnatal dönemde substantia grisea'nın lamina X bölgesinde bulunan bazı NOS pozitif sinir hücrelerinin ependim hücrelerine bitiş olduğu gözlemlendi. P7. günde ependim hücrelerindeki NOS boyamasının, P2. gündekinden daha zayıf olduğu gözlemdi (Şekil 2).



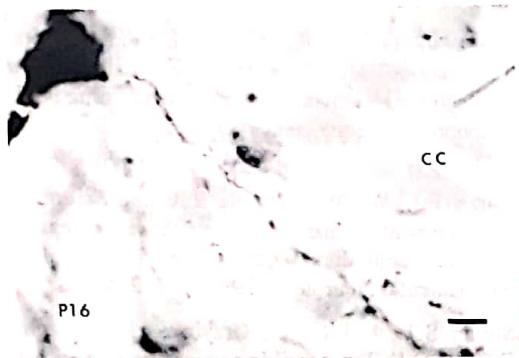
Şekil 2. P7. günde NOS varlığı: NOS P2. güne göre daha düşük.

P11. günde hala çok az bir NOS varlığı bu hücrelerde mevcuttu (Şekil 3).



Şekil 3. P11. günde NOS varlığı: NOS P2. ve P7. güne kıyasla oldukça düşmüş durumda.

P16. günden itibaren NOS boyamasının ortadan kaybolmaya başladığı (Şekil 4) ve P20. günde tamamen yok olduğu gözlendi (Şekil 5).



Şekil 4. P16. günde NOS varlığı: P16. günde hem ependim hücrelerinde NOS miktarı hemen hemen yok gibi, hem de canalis centralis'in duvarının şekillendiği görülmektedir.



Şekil 5. P20. günde ise NOS tamamen kaybolmuştur. (Tüm şekillere için scale bar 10 μm dir.)

Bu bulgular doğumu takiben NOS'un ependim hücrelerindeki varlığının yaşın artışıyla azaldığını göstermektedir. Bu çalışmada ayrıca P16. günde canalis centralis'in şekillenmesinin tamamlandığı görüldü.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, NOS'in doğumu takiben ependim hücrelerindeki miktarının gittikçe azaldığı gözlendi. Bu hücrelerde P16. günde çok az bir NOS immunoreaktivitesi belirlenirken P20. günde NOS'in tamamen kaybolduğu gözlendi. Doğumdan sonraki erken dönemde (0-15 günler arası) ratin ventriculus tertius'unu (19,28) ve farenin canalis centralis'ini döşeyen ependim hücrelerinde (26) gelişmenin devam ettiği rapor edilmiştir. Tavşanda P15. günde ventriculus lateralis'teki ependim hücrelerinin lumene bakan yüzlerinde

ultramikroskopik değişikliklerin varlığı yine bildirimler arasındadır (1). Bu bulguların tümü göz önüne alındığında doğumdan sonra ependim hücrelerinde NOS varlığındaki tedrici azalmanın NO'nun bu hücrelerin gelişimi ile alakalı bir işlevi olabileceğini akla getirmektedir. Fakat NO'nun glia hücrelerinin gelişiminde kesin bir rolünün olduğu bilinmemektedir.

Son zamanlarda yapılan bir araştırmada NO'nun glia hücrelerinin teşkilinde, ayırimda ve şekillenmesinde rol aldığı bildirilmektedir (11). Buradan NO'nun ependim hücrelerinin ve dolayısıyla da canalis centralis'in şekillenmesinde bir rolünün olabileceği akla gelmektedir. Ratlarda postnatal dönemde canalis centralis'in duvarının ependim hücreleri tarafından tam olarak ne zaman oluşturulduğu bilinmemektedir. Fakat kedilerde bunun doğumdan sonra 2-3 ay sürdüğü bildirilmiştir (6). Yapılan çalışmada, canalis centralis duvarının P16. günden önce tam olarak şekillenmediği görüldü. Ratlarda, P16. günde NO'nun ependim hücrelerinden uzaklaşması ve canalis centralis duvarının şekillenmesi göz önünde tutulursa, erken postnatal dönemde NO'nun bir rehber molekül olarak ependim hücrelerinin teşkil ve şekillenmesinde bir rol alabileceği sonucu çıkarılabilir. Fakat, NOS'in ependim hücrelerinden uzaklaşma zamanı olan P16. günün, canalis centralis'in tamamen ependim hücreleriyle oluşturulduğu zaman olarak kabul edilebilmesi için daha ileri çalışmalarla ihtiyaç vardır.

Yapılan araştırmada, NOS pozitif çok kutuplu lamina X sinir hücrelerinden bazılarının ependim hücreleri ile komşu oldukları gözlendi. Bu hücrelerin birçoğunun ağrı olgusunda rol aldıkları bilinmektedir (22). Ependim hücrelerinde gözlenen NO belki de bu hücrelerde üretilmekte, buradan difüzyon yoluyla komşuları olan ependim hücrelerine geçmektedirler.

Sonuç olarak, erken postnatal dönemde NO'nun ependim hücrelerinde tedrici azalmasının nedeni olarak, NO'nun bu hücrelerdeki fonksiyonunun hücrelerin şekil gelişimiyle ters orantılı olduğu yani ne zaman ependim hücrelerinin şekillenmesi tamamlanırsa o zaman NO'ya orada ihtiyacın kalmadığı şeklinde yorumlanabilir.

Teşekkür: Bu çalışmanın yazarları, araştırmada kullanılan primer antikor'u bağışlayan H.H.H.W. Schmidt'e teşekkür ederler.

KAYNAKLAR

1. Abbate F., Laura R., Muglia U. and Bronzetti P. Differentiation of ependymal surface of lateral ventricles in fetus and newborn rabbits: observations by SEM. *Anatomy Histology and Embryology*, 1993, 22(4): 348-354.
2. Anderson C.R. NADPH diaphorase-positive neurons in the rat spinal cord include a subpopulation of autonomic preganglionic neurons. *Neuroscience Letters*, 1992, 139: 280-284.
3. Aoki E., Semba R., Mikoshiba K. and Kashiwamata S. Predominant localization in glial cells of free L-arginine. Immunocytochemical evidence. *Brain Research*, 1991, 547: 190-192.
4. Aoki E., Semba R. and Kashiwamata S. Evidence for the presence of L-arginine in the glial components of the peripheral nervous system. *Brain Research*, 1991, 559: 159-162.
5. Blottner D. and Baumgarten H-G. Nitric oxide synthase (NOS)-containing sympathoadrenal cholinergic neurons of the rat IML-cell column: Evidence from histochemistry, immunohistochemistry and retrograde labeling. *J. Comparative Neurology*, 1992, 316: 45-55.
6. Bohme G. Formation of the central canal and dorsal glial septum in the spinal cord of the cat. *J. Anatomy*, 1987, 432(1): 97-110.
7. Bredt D.S. and Synder S.H. Review, Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*, 1992, 8: 3-11.
8. Bruni J.E. Ependymal development, proliferation, and functions: a review. *Microsc. Res. Tech.* 1998, 41(1): 2-13.
9. Dun N.J., Dun S.L., Forstermann U. And Tseng L.F. Nitric oxide synthase reactivity in rat spinal cord. *Neuroscience Letters*, 1992, 147: 217-220.
10. Fiallos-Estrada C.E., Kummer W., Mayer B., Bravo R., Zimmermann M. and Herdegen T. Long-lasting increasing of nitric oxide synthase immunoreactivity, NADPH-diaphorase reaction and c-JUN co-expression in the rat dorsal root ganglion neurons following sciatic nerve transection. *Neuroscience Letters*, 1993, 150: 169-173.
11. Gally, J.A., Monteque P.R., Reeke G.N. and Edelman G.M. The NO hypothesis: Possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87: 3547-3551.
12. Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell signalling in the nervous system. *Trends Neuroscience*, 1991, 14: 60-67.
13. Garthwaite J., Southam E. and Morris R. Inter-cellular signalling by nitric oxide. In: Fedorof et al. Editor. *Biology and Pathology of Astrocyte-neuron Interaction*. Plenum Press, New York, 1993, 67-73.
14. Ikeda J., Ochiai K., Morita I. and Murota S. Endogenous nitric oxide blocks calcium influx induced by glutamate in neurons containing NADPH diaphorase. *Neuroscience Letters*, 1993, 158: 193-196.
15. Liuzzi F.J., Wu W., Scoville S.A. and Schinco F.P. Development of nitric oxide synthase expression in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *Experimental Neurology*, 1993, 121: 275-278.
16. Meller S.T., Dykstra C., Grzybycki D., Murphy S. Gebhart G.F. The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. *Neuropharmacology*, 1994, 33: 1471-1478.
17. Meller S.T. and Gebhart G.F. Topical review, Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain*, 1993, 52: 127-136.
18. Mizukawa K., Vincent S.R., McGeer P.L. and McGeer E.G. Distribution of reduced-nicotinamide-adenin-dinucleotide-phosphate diaphorase-positive cells and fibers in the cat central nervous system. *J. Comparative Neurology*, 1989, 279: 281-311.
19. Monroe B.G. and Holmes E.M. The freeze-fractured median eminence. I. Development of inter cellular junctions in the ependyma of the 3rd ventricle of the rat. *Cell Tissue Research*, 1982, 222(2): 389-408.
20. Morris R., Southam E., Gittins S.R., de Vente J. and Gartwaite J. Short communication, the NO-cGMP pathway in neonatal rat dorsal horn. *European J. Neuroscience*, 1993, 6: 876-879.
21. Morris R., Southam E., Braid D. J. and Gartwaite J. Nitric oxid may act as a messenger between dorsal root ganglion neurones and their satellite cells. *Neuroscience Letters*, 1992, 137: 29-32.
22. Nahin R.L. Madsen A.M. and Giesler G.J. Anatomical and physiological studies of the gray matter surrounding the spinal cord central canal. *J. Comparative Neurology*, 1983, 220: 321-335.
23. Ogura T., Nakayama K., Fujisawa H. and Esumi H. Neuronal nitric oxide synthase expression in neuronal cell differentiation. *Neuroscience Letters*, 1996, 204: 89-92.
24. Shu S., Ju G. and Fan L. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neuroscience Letters*, 1988, 85: 169-171.
25. Soygüder Z., Schmidt H. H. H. W. and Morris R. Postnatal development of nitric oxide synthase type 1 expression in the lumbar spinal cord of the rat: a comparison with the induction of c-fos in response to peripheral application of mustard oil. *Neuroscience Letters*, 1994, 180: 188-192.

26. Sturrock R.R. An electron microscopic study of the development of the ependyma of the central canal of the mouse spinal cord. *J. Anatomy*, 1981, 132: 119-136.
27. Valschanoff J.G., Weinberg R.J. and Rustioni A. NADPH diaphorase in the spinal cord of rats. *J. Comparative Neurology*, 1992, 321: 209-222.
28. Walsh R.J. Braver J.R. and Lin P.L. Early postnatal development of ependyma in the third ventricle of male and female rats. *American J. Anatomy*, 1978, 151(3): 377-407.
29. Wu W. Expression of nitric oxide synthase (NOS) in injured CNS neurons as shown by NADPH diaphorase histochemistry. *Experimental Neurology*, 1993, 120: 153-159.
30. Wu W. and Scott D.E. Increased expression of nitric oxide synthase in hypothalamic neuronal regeneration. *Experimental Neurology*, 1993, 121: 279-283.