

ОНТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗВИТИЕ NO-ЗАВИСИМЫХ СИСТЕМ СТВОЛА ГОЛОВНОГО МОЗГА У ГОМОЙОТЕРМНЫХ ОРГАНИЗМОВ

ДУНАЙ В.И.

*УО «Белорусский государственный университет»;
кафедра психофизиологии*

Резюме. Согласно данным литературы 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.

Целью данной работы явилось изучение созревания NO-ергических систем ствола головного мозга в раннем постнатальном онтогенезе у цыплят, как представителей выводковых птиц.

Эксперименты выполнены на 48 цыплятах и 6 взрослых особях. Первая группа животных включала цыплят в возрасте 1 дня, вторая группа животных - в возрасте 3 дней, третья группа животных - в возрасте 10 дней, четвертая группа животных - в возрасте 20 дней.

В работе использован метод идентификации НАДФН-д-содержащих нейронов, разработанный Scherer-Singler *et al*, в модификации Hore и Vincent.

Установлено, что у цыплят к десятому дню постнатального развития формируются основные черты в распределении предполагаемых NO-синтезирующих нервных клеток, характерные для взрослого организма.

Ключевые слова: онтогенез, NO-синтеза, гипоталамус.

Abstract. The aim of the paper is to study the maturation of NO-ergic systems of the brainstem in early postnatal ontogeny in chickens as representatives of breeding birds. It was found out that in chickens the basic features in the distribution of probable NO-synthesizing nerve cells have been formed by the tenth day of the postnatal development. These features are typical of the adult organism.

Keywords: ontogenesis, NO-synthesis, hypothalamus.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, г. Минск, проспект Рокоссовского 17, кв.154. т. р. 209-58-65
e-mail: dunay_wal@bk.ru

Рецензия

на статью В.И. Дунай «ОНТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗВИТИЕ NO-ЗАВИСИМЫХ СИСТЕМ СТВОЛА ГОЛОВНОГО МОЗГА У ГОМОЙОТЕРМНЫХ ОРГАНИЗМОВ»

NO является одним из важнейших факторов, обеспечивающих развитие нервной системы. NO является эффекторной молекулой, вызывающей гибель определенных клеточных структур, а также играет важную роль в механизмах роста нервных окончаний и формирования синаптических контактов. Также имеются сведения, указывающие на участие NO в центральных механизмах регуляции важных автономных функций: дыхания и кровообращения. Показано, что NG-метил-L-аргинин, ингибитор CNO, при системном введении стимулирует активность симпатического почечного нерва как примера вазоконстрикторного нерва.

Автор предполагает, что становление NO-зависимых систем в гипоталамусе у птиц, по-видимому, играет важную роль в развитии системы терморегуляции, поскольку полученные результаты хорошо коррелируют с данными о том, что температура тела у цыплят, характерная для взрослых животных, устанавливается к 14-му дню жизни.

Таким образом, начальное становление системы терморегуляции в процессе индивидуального развития цыплят может быть связано с развитием NO-зависимых систем нервных центров гипоталамуса. Полученные результаты дополняют существующие представления о механизмах становления терморегуляции в онтогенезе у гомойотермных животных, и будут способствовать дальнейшему углубленному изучению проблемы участия монооксида азота в развитии системных функций.

Считаю, что излагаемый автором материал представляет научный интерес и может быть опубликован в журнал « Вестник ВГМУ».

Рецензент, профессор С.Н. Занько
30 апреля 2007 года

Данные литературы указывают на то, что монооксид азота (NO) является нейромедиатором и нейромодулятором в нервной системе [1, 2]. Установлено, что NO является одним из важнейших факторов, обеспечивающих развитие нервной системы. NO является эффекторной молекулой, вызывающей гибель определенных клеточных структур, а также играет важную роль в механизмах роста нервных окончаний и формирования синаптических контактов [3]. Также имеются сведения, указывающие на участие NO в центральных механизмах регуляции важных автономных функций: дыхания и кровообращения [5]. Показано, что NG-метил-L-аргинин, ингибитор CNO, при системном введении стимулирует активность симпатического почечного нерва как примера вазоконстрикторного нерва [7]. Сходные результаты были получены и при

центральном введении ингибитора NO-синтетазы. NG-метил-L-аргинин при введении в большую цистерну мозга анестезированным крысам достоверно повышает кровяное давление и значительно увеличивает активность симпатического почечного нерва [8]. Эти данные позволяют сделать вывод о том, что NO принимает участие в центральной регуляции кровообращения, ингибируя эфферентный симпатический тонус.

В литературе имеются сведения об участии NO в центральных нейрхимических механизмах терморегуляции [6]. Так, NO, синтезируемый нейронами терморегуляторных центров головного мозга, участвует в регуляции активности периферических эффекторов теплоотдачи и теплопродукции [6]. Установлено, что формирование терморегуляторных реакций организма на действие высоких и низких температур зависит от функциональной активности центральных NO-зависимых механизмов и процессов. Показано также, что в условиях гипертермии, вызываемой пирогенами, NO может участвовать в центральных механизмах терморегуляции как один из компонентов эндогенной антипиретической системы.

Таким образом, литературные данные свидетельствуют о том, что NO, выделяемый CNO-позитивными нервными клетками, участвует в становлении структуры и функции нервной системы в онтогенезе, о чем свидетельствуют немногочисленные, но убедительные данные [4], а также у взрослого организма принимает участие в центральной регуляции большинства физиологических функций. Однако, несмотря на это, роль этого низкомолекулярного передатчика в становлении функциональных систем, и в частности, системы терморегуляции, остается мало изученной. Выяснение роли NO мозга в развитии системы терморегуляции в онтогенезе гомойотермных животных позволило бы получить данные, необходимые для понимания общих принципов становления функциональных систем с участием низкомолекулярных полифункциональных молекул.

Целью данной работы явилось изучение особенностей созревания NO-ергических систем ствола головного мозга в раннем постнатальном онтогенезе у цыплят, как представителей гомойотермных животных.

Методы

Эксперименты выполнены на 48 цыплятах и 6 взрослых особях. Первая группа животных включала цыплят в возрасте 1 дня, вторая группа животных - в возрасте 3 дней, третья группа животных - в возрасте 10 дней, четвертая группа животных - в возрасте 20 дней.

Специальными исследованиями было убедительно доказано, что нейронная синтаза NO (CNO) является никотинамидадениндинуклеотидфосфат-диафоразой [8]. 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 иммунохимические и биохимические свойства. В-третьих, НАДФН-д активность выявляется *de novo*

у клеток с трансформированной кДНК к СНО. Использование гистохимической реакции на НАДФН-д для идентификации СНО-содержащих нейронов возможно только при условии, что исследуемая ткань проходит фиксацию в параформальдегиде. Установлено [8], что при фиксации с использованием параформальдегида инактивируются все НАДФН-зависимые ферменты-окислители, за исключением СНО. Таким образом, при условии фиксации ткани в параформальдегиде, использование гистохимической реакции на НАДФН-д для идентификации НО-синтезирующих нервных клеток является адекватным методом и широко используется в настоящее время.

В работе использован метод идентификации НАДФН-д-содержащих нейронов, разработанный Scherer-Singler *et al* [9], в модификации Норе и Vincent [5].

Для выделения гипоталамуса у животных целиком извлекали головной мозг. Отделяли гипоталамус и дополнительно фиксировали согласно рекомендации Matsumoto *et al.* [7] 90 минут в 4% параформальдегиде на фосфатном буфере (0,1М, рН7,4). Участки мозга шесть раз по 30 мин. отмывали на холоде с использованием 0,1 М раствора Трис-НСl (рН 8,0) и инкубировали в 10% и 25% растворах сахарозы на Трис-НСl (0,1М, рН8,0) в течение 1,5 и 12 часов соответственно.

Объекты помещали на охлажденные металлические блоки, которые ставили в криостат (-25°C) на 20 минут 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-НСl (рН8,0) в течение 5 мин. Гистохимическая процедура заключалась в инкубации срезов в растворе 0,1 М Трис-НСl (рН8,0), содержащем НАДФН (1 мМ), нитросиний тетразолий (0,5 мМ), Тритон Х-100 (0,3%) и дикумарол (0,1мМ) на протяжении 1-2 ч. при 22°C и относительной влажности 95-100%. По окончании гистохимической реакции срезы промывали в растворе Трис-НСl в течение 5 минут, 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 (СНО) 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.

Структуры гипоталамуса и продолговатого мозга идентифицировали при помощи стереотаксического атласа Orlan M. Junzy & Richard F. Phillips.

Результаты

Опыты показали, что гипоталамическая область кур содержит большое количество НАДФН-д/СНО – позитивных нейронов (рис. 1 и 2).

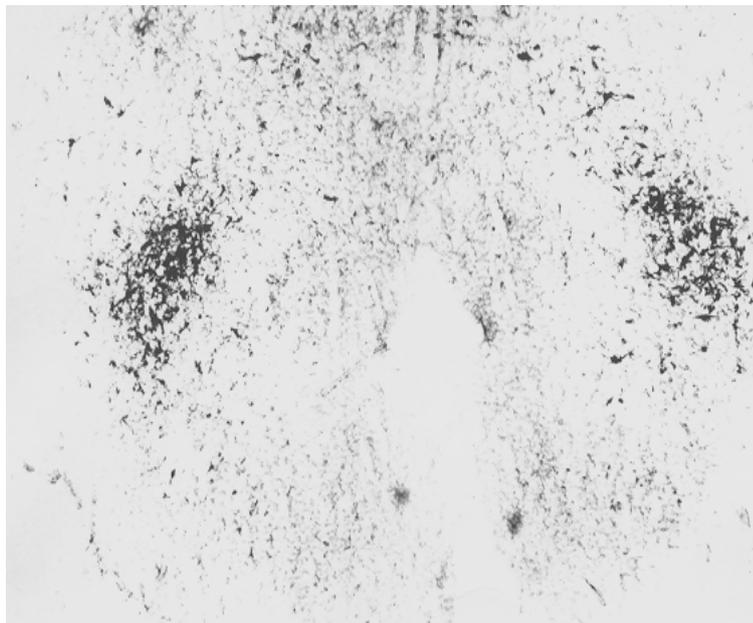


Рис. 1 НАДФН-д – позитивные нервные клетки в переднем гипоталамусе курицы. Микрофото ($\times 40$)

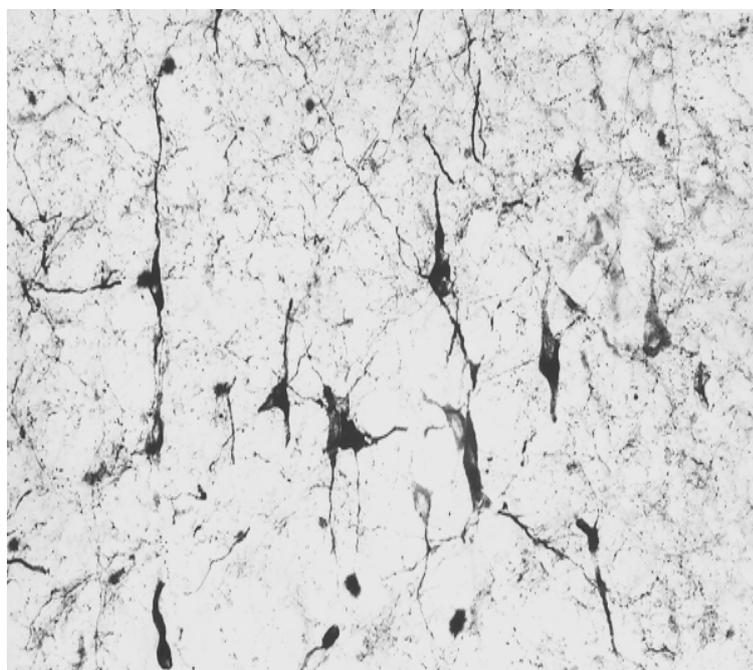


Рис. 2 НАДФН-д – позитивные нервные клетки в заднем гипоталамусе курицы. Микрофото ($\times 100$)

Установлено, что в первые дни и недели после рождения в гипоталамической области происходят значительные изменения в распределении НАДФН-д/СНО – позитивных нейронов (табл. 1).

Таблица 1

Распределение нервных клеток, содержащих НАДФН-д / CNO, в структурах гипоталамуса у цыплят в разные сроки постнатального онтогенеза

№ п/п	Структура	1-й день	3-й день	10-й день	20-й день
1	Medial preoptic area	-	-	+	+
2	Lateral preoptic area	+	+	+	+
3	Supraoptic nucleus	-	-	-	+
4	Paraventricular nucleus	+	+	+	+
5	N. ventromedialis	-	+	+	+
6	N. dorsomedialis	-	+	+	+
7	Periventricular nucleus	-	-	+	+
8	Lateral hypothalamic area	+	+	+	+
9	Medial mammillary nucleus	-	+	+	+
10	Lateral mammillary nucleus	+	+	+	+
11	Supramammillary nucleus	+	+	+	+

«+» – структура содержит НАДФН-д /CNO – позитивные нервные клетки;
 «-» – структура не содержит НАДФН-д /CNO – позитивных нервных клеток.

При изучении серийных срезов гипоталамуса цыплят в возрасте одного дня после рождения обнаружены НАДФН-д/CNO – позитивные нейроны в латеральной преоптической области, паравентрикулярном ядре, латеральной гипоталамической области, в латеральном маммилярном ядре и в супрамаммилярном ядре.

У цыплят в возрасте одного дня после рождения не обнаружены НАДФН-д/CNO – позитивные нейроны в ряде структур гипоталамуса, содержащих такие нейроны у взрослых организмов. Так, не обнаружены НАДФН-д/CNO – позитивные нейроны в медиальной преоптической области, супраоптическом ядре, перивентрикулярном ядре, медиальном маммилярном ядре, дорсомедиальном и вентромедиальном ядрах.

У цыплят в возрасте трех дней после рождения так же, как и у однодневных цыплят, гипоталамус не содержит НАДФН-д/CNO – позитивных нейронов в медиальной преоптической области, супраоптическом ядре и перивентрикулярном ядре.

Гипоталамическая область трехдневных цыплят содержит НАДФН-д/CNO – позитивные нейроны в тех же структурах, что и у однодневных (в латеральной преоптической области, паравентрикулярном ядре, латеральной гипоталамической области, в латеральном маммилярном ядре и в супрамаммилярном ядре). А также НАДФН-д/CNO – позитивные нейроны обнаружены в медиальном маммилярном ядре, дорсомедиальном и вентромедиальном ядрах.

В период между третьим и десятым днем формируются основные черты в распределении НАДФН-д/CNO – позитивных нейронов гипоталамической области, характерные для взрослого организма.

Так, у десятидневных цыплят выявляются НАДФН-д/CNO – позитивные нейроны почти во всех структурах гипоталамуса, содержащих такие нервные клетки у взрослых птиц. В отличие от третьего дня, к 10-му дню развития НАДФН-д/CNO – позитивные нейроны, появляются в перивентрикулярном ядре. Обнаружено, что гипоталамус десятидневного цыпленка не содержит НАДФН-д/CNO – позитивных клеток в супраоптическом ядре.

Крупные, интенсивно окрашенные НАДФН-д/CNO - позитивные нейроны появляются в супраоптическом ядре в период между десятым и двадцатым днем после вылупления. Таким образом, не существует различий в распределении НАДФН-д/CNO – позитивных нейронов в гипоталамусе 20-дневного цыпленка по сравнению с взрослыми животными. Полученные данные свидетельствуют о том, что, по-видимому, между десятым и двадцатым днем после рождения происходит окончательное структурное формирование NO-зависимых систем нервных центров гипоталамуса цыплят.

При изучении серийных срезов продолговатого мозга, окрашенных на НАДФН-д, у цыплят, в разные сроки после рождения, НАДФН-д/CNO – позитивные нервные клетки обнаружены во всех изучаемых структурах (табл. 2).

Таблица 2

Распределение нервных клеток, содержащих НАДФН-д / CNO, в продолговатом мозге у цыплят в разные сроки постнатального онтогенеза

№ п/п	Структура	1-й день	3-й день	10-й день	20-й день
1	Paragigantocellular reticular nucleus	+	+	+	+
2	Gigantocellular reticular nucleus	+	+	+	+
3	Medial vestibular nucleus	+	+	+	+
4	Nucleus tractus solitarii	+	+	+	+
5	Paratrigeminal nucleus	+	+	+	+
6	Paramedian reticular nucleus	+	+	+	+
7	Cuneate nucleus	+	+	+	+
8	Reticular nucleus medulla dorsal	+	+	+	+
9	Reticular nucleus medulla ventral	+	+	+	+

«+» – структура содержит НАДФН-д /CNO-позитивные нервные клетки;
 «-» – структура не содержит НАДФН-д /CNO-позитивных нервных клеток.

По-видимому, еще до рождения завершается формирование NO-зависимых систем нервных центров продолговатого мозга, структурное и функциональное развитие должно обеспечивать в первые дни жизни важнейшие вегетативные функции (дыхание, кровообращение).

Результаты выполненных исследований свидетельствуют о том, что у птиц в раннем постнатальном онтогенезе появление предполагаемых NO-синтезирующих нервных клеток в ряде структур гипоталамической области мозга совпадает по времени со становлением температуры тела, характерной для взрослых животных (рис. 3).

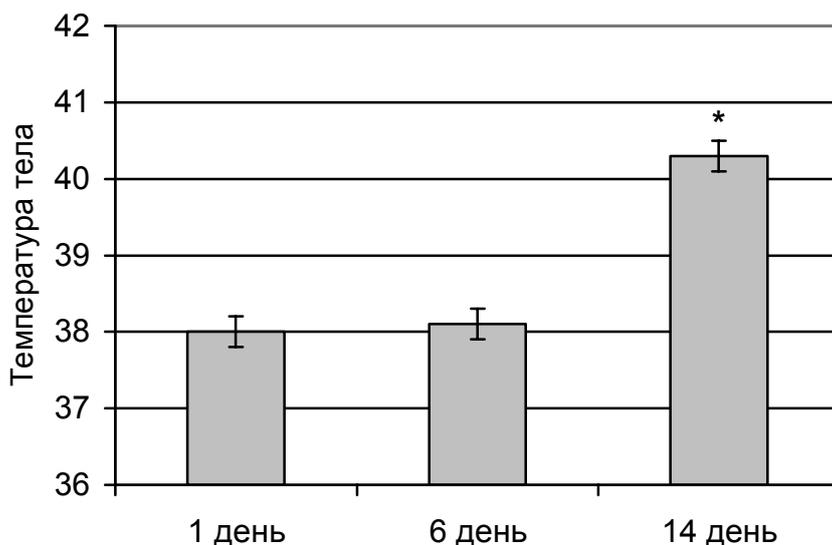


Рис. 3. Становление температуры тела, характерной для взрослых животных, в раннем постнатальном онтогенезе (1, 6 и 14 дней после рождения) у цыплят

Эти данные свидетельствуют о том, что функциональное созревание NO-зависимых механизмов, участвующих в терморегуляции, в онтогенезе у цыплят завершается к 14-му дню, что подтверждается морфологическими исследованиями, указывающими на формирование основных черт в распределении нервных клеток, содержащих CNO в гипоталамической области между третьим и десятым днем жизни (табл. 1).

Обсуждение

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.

Установлено, что в первые дни и недели после рождения у цыплят в гипоталамической области происходят значительные изменения в распределении НАДФН-д/CNO – позитивных нервных клеток. Так, между третьим и десятым днем постнатального развития формируются основные

черты в распределении предполагаемых NO-синтезирующих нервных клеток, характерные для взрослого организма, а между десятым и двадцатым днем, по-видимому, происходит окончательное структурное формирование NO-зависимых систем нервных центров гипоталамуса цыпленка.

Заключение

Можно предполагать, что становление NO-зависимых систем в гипоталамусе у птиц, по-видимому, играет важную роль в развитии системы терморегуляции, поскольку полученные результаты хорошо коррелируют с данными о том, что температура тела у цыплят, характерная для взрослых животных, устанавливается к 14-му дню жизни.

Таким образом, есть основания предположить, что начальное становление системы терморегуляции в процессе индивидуального развития цыплят может быть связано с развитием NO-зависимых систем нервных центров гипоталамуса.

Полученные результаты дополняют существующие представления о механизмах становления терморегуляции в онтогенезе у гомойотермных животных, и будут способствовать дальнейшему углубленному изучению проблемы участия монооксида азота в развитии системных функций.

Литература

1. Amir, S. NG-Monomethyl-L-arginine co-injection attenuates the thermogenic and hyperthermic effects of E2 prostaglandin microinjection into the anterior hypothalamic preoptic area in rats / S. Amir, E. De Blasio, A.M. English // *Brain Res.* – 1991. – Vol. 556. – P. 157–160.
2. Dawson, T.M. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues / T. M. Dawson, P. M. Hwang, S. H. Snyder // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* – 1991. – Vol. 88, N.17. – P. 7797–7801.
3. Dunai, V.I. Effect of the NO synthase inhibitor, L-NAME, on body temperature in birds in different periods of postnatal ontogenesis / V. I. Dunai, A.V. Gourine // *Recent advances in thermal biology* / ed. by V. N. Gourine. – Minsk, 1999. – P.18–19.
4. Gourine, A.V. Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced fever in conscious rabbits // *J. Physiol.* – 1994. – Vol. 475. – P.28.
5. Hope, B.T. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase / B. T. Hope, S. R. Vincent // *J. Histochem.Cytochem.* – 1989. – Vol.37. – P.653–661.
6. Kapas, L. Inhibition of nitric oxide synthesis suppresses sleep in rabbits / L. Kapas, M. Shibata, J. M. Krueger // *Am. J. Physiol.* – 1994. – Vol. 266. – P.151–157.
7. Matsumoto, T.A correlation between soluble brain nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase activity is nly seen after exposure of the tissue to fixative / T. Matsumoto, J. E. Kuk, U. Forstermann // *Neurosci. Lett.* – 1993. – Vol. 155, N 1. – P. 61–64.

8. Pasqualotto, B.A. Citrulline in the rat brain - immunohistochemistry and coexistence with NADPH-diapho-rase / B. A. Pasqualotto, B. T. Hope, S. R. Vincent // *Neurosci.Lett.* – 1991. – Vol. 128, N.2. – P. 155–160.

9. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry / U. Scherer-Singler [et al.] // *J. Neurosci.Methods* – 1983.–Vol.9, N.3. – P.229–234.