

В. И. Дунай

Белорусский государственный университет,
г. Минск, Республика Беларусь

РАЗВИТИЕ NO-ЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ПЕРЕДНЕГО ГИПОТАЛАМУСА В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ ПТИЦ И ЧЕЛОВЕКА

Аннотация

Изучены корреляции в становлении NO-ергической системы переднего гипоталамуса эмбрионов птиц и плодов человека. Установлено, что гипоталамическая область эмбрионов уток содержит НАДФН-д/CNO – позитивные нейроны начиная с 23-го дня, что соответствует третьему триместру развития. Также установлено, что у 90-го дневного плода человека (первый триместр развития) в ядрах переднего гипоталамуса обнаружены NO-содержащие нейроны. Полученные данные свидетельствуют об относительно более раннем возникновении NO-ергической системы переднего гипоталамуса человека по сравнению с птицами. Принимая во внимания данные о том, что NO является одним из важнейших факторов, участвующих в развитии центральной нервной системы, можно предположить, что благодаря раннему появлению НАДФН-д/CNO стало возможным более совершенное развитие нервной системы у человека.

➤ **Ключевые слова:** пренатальный онтогенез, NO-синтеза, гипоталамус.

Введение

Данные, полученные в течение последних лет, свидетельствуют об участии NO в регуляции различных физиологических функций [1, 2, 6]. Имеются предположения о том, что NO может являться одним из важнейших факторов, участвующих в развитии структуры и функции центральной нервной системы, являясь молекулой, вызывающей гибель определенных клеточных структур, а также играя важную роль в механизмах роста нервных окончаний и формирования синапсов [4]. Получены доказательства участия NO в центральных механизмах терморегуляции при перегревании и экспериментальной лихорадке [3]. Установлено, что у представителей млекопитающих и птиц NO-синтезирующие нейроны содержатся в нервных центрах гипоталамуса и продолговатого мозга, которые участвуют в регуляции различных автономных функций [3]. Сходство в распределении нервных клеток, содержащих NO-синтазу (NOS) в гипоталамусе и продолговатом мозге у представителей млекопитающих и птиц, отражает общие черты структурной организации NO-зависимых систем высших автономных центров двух разных классов организмов.

Несмотря на обилие фактического материала, свидетельствующего об участии NO в регуляции различных физиологических функций, а также в развитии центральной нервной системы и механизмах терморегуляции, становление центральных NO-ергических систем в пренатальном онтогенезе гомойотермных организмов не изучено.

Целью данной работы явилось изучение становления NO-ергических систем переднего гипоталамуса у эмбрионов утки и у плодов человека как представителей гомойотермных организмов.

Материалы и методы исследования

В экспериментальной части работы использовались эмбрионы утки в возрасте 20, 23, 28 дней и 90-дневные плоды человека.

Специальными исследованиями было убедительно доказано, что нейронная синтаза NO (CNO) является никотинамидаденин динуклеотидфосфат-диафразой [8]. Во-первых, локализа-

ция в центральной и периферической нервной системе НАДФН-д-содержащих нейронов, окрашенных гистохимически, соответствует локализации нервных клеток, содержащих СНО, окрашенных с применением методов иммуногистохимии. Во-вторых, СНО 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 NO-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 эмбрионов целиком извлекали головной мозг. Отделяли гипоталамус и дополнительно фиксировали согласно рекомендации Matsumoto *et al.* [7] 90 мин. в 4 % параформальдегиде на фосфатном буфере (0,1 М, pH 7,4). Участки мозга шесть раз по 30 мин. отмывали на холоде с использованием 0,1 М раствора Трис-НСI (pH 8,0) и инкубировали в 10 % и 25 % растворах сахарозы на Трис-НСI (0,1 М, pH 8,0) в течение 1,5 и 12 ч соответственно.

Объекты помещали на охлажденные металлические блоки, которые ставили в криостат (–25 °С) на 20 мин. 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-НСI (pH 8,0) в течение 5 мин. Гистохимическая процедура заключалась в инкубации срезов в растворе 0,1 М Трис-НСI (pH 8,0), содержащем НАДФН (1 мМ), нитросиний тетразолий (0,5 мМ), Тритон X-100 (0,3 %) и дикумарол (0,1 мМ) на протяжении 1–2 ч при 22 °С и относительной влажности 95–100 %. По окончании гистохимической реакции срезы промывали в растворе Трис-НСI в течение 5 мин., 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.

Результаты

Опыты показали, что в период между 20 и 28 днем эмбрионального развития в переднем гипоталамусе уток происходят изменения в распределении НАДФН-д/СНО – позитивных нейронов. При изучении серийных срезов гипоталамуса эмбрионов уток в возрасте 20-ти дней не обнаружены НАДФН-д/СНО-позитивные нейроны в переднем гипоталамусе (рис. 1).

Гипоталамическая область 23- и 28-дневных эмбрионов уток содержит НАДФН-д/СНО-позитивные нейроны в переднем гипоталамусе.

У эмбрионов двадцатитрехдневного возраста нейроны, входящие в состав ядер переднего гипоталамуса, имеют различные размеры, колеблющиеся от 10–12 до 20–25 мкм (рис. 2). Форма нейронов округлая, овальная, веретенообразная, а также приближающаяся к треугольной. Ядро округлой формы занимает большую часть клетки и находится в большинстве случаев в эксцентричном положении, смещаясь к одному из полюсов клетки. В некоторых нейронах цитоплазма имеет вид узкого ободка серповидной формы окружающей с одной стороны ядро. Гранулы фермента в цитоплазме нейронов у эмбрионов 23 суток располагаются диффузно по всей цитоплазме, плотность расположения их невелика. Начальные отделы отростков нейронов не прокрашиваются. В составе ядер нейроны располагаются, как правило, диффузно с неболь-

шой плотностью расположения нервных клеток. Наряду с этим выявлены незначительные области концентрации нейронов с формированием одиночных групп клеток, состоящих из 4–5 единиц.

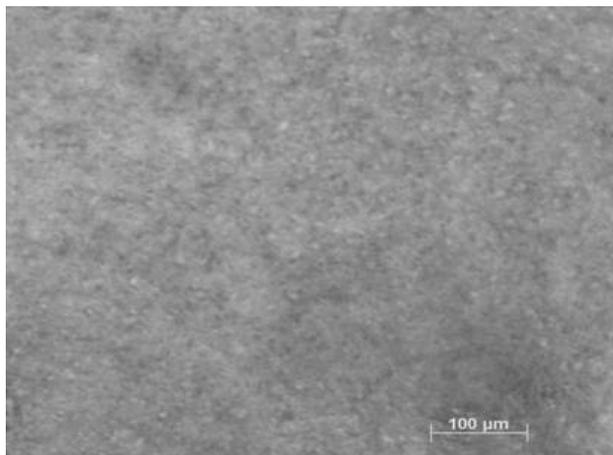


Рис. 1. Передний гипоталамус 20-дневного эмбриона утки, окрашенный на НАДФН-д/СНО. Микрофото (× 40)

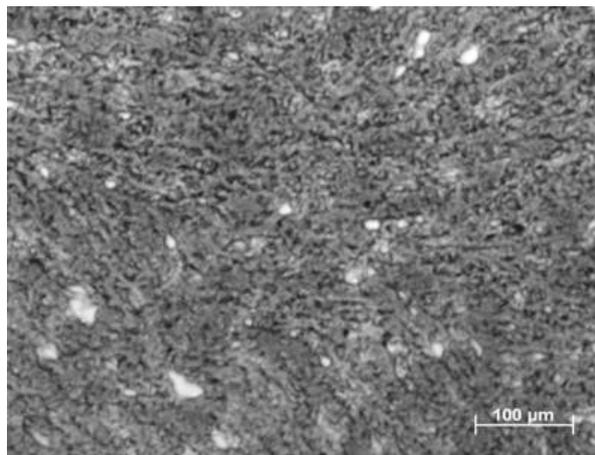


Рис. 2 – НАДФН-д-позитивные нервные клетки в переднем гипоталамусе 23-дневного эмбриона утки. Микрофото (× 40)

При изучении серийных срезов переднего гипоталамуса эмбрионов уток в возрасте 28-ми дней, наблюдается увеличение степени дифференцировки нервных клеток. Нейроны начинают группироваться в ядра. Наряду с увеличением размеров клеток происходит изменение ядерно-цитоплазменного отношения вследствие увеличения объема цитоплазмы по сравнению с объемом ядра. Изменяется и характер окрашивания цитоплазмы; плотность расположения гранул фермента увеличивается. Наряду с диффузным расположением гранул фермента в нейронах наблюдаются их конгломераты, образующие более крупные структуры. Начинают окрашиваться начальные отделы отростков нервных клеток.

В клетках 21-дневного эмбриона отмечается увеличение плотности расположения цистерн гранулярной эндоплазматической сети и количества митохондрий в нейроплазме (рис. 5).

В клетках 33-дневных эмбрионов наблюдается крупное ядро, большое количество митохондрий и рибосом (рис. 6).

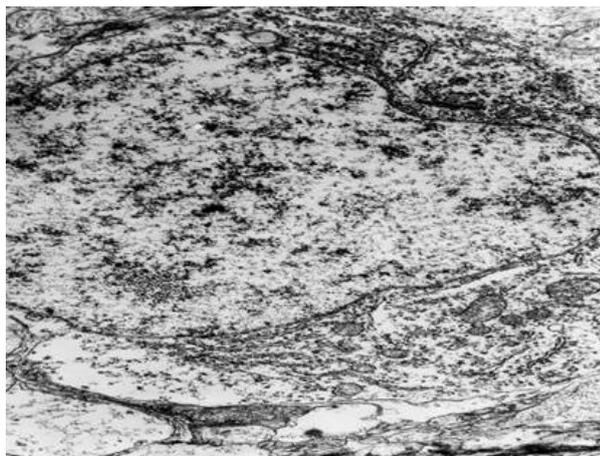


Рис. 5. Передний гипоталамус 21-дневного эмбриона утки. Микрофото (× 18 000)

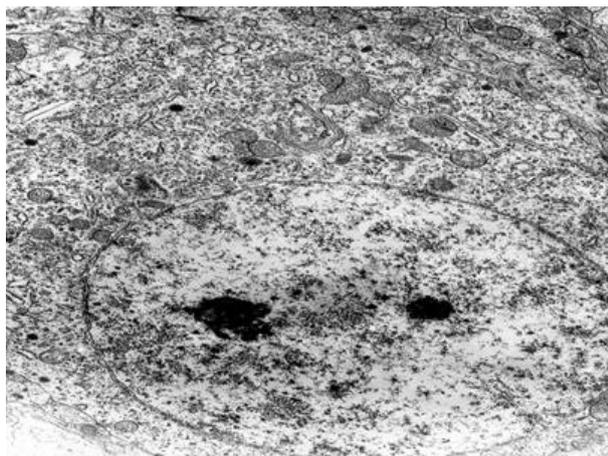


Рис. 6. Передний гипоталамус 33-дневного эмбриона утки. Микрофото (× 24 500)

Эти результаты хорошо коррелируют с полученными ранее данными электронномикроскопического исследования, ставившего целью изучить развитие гипоталамуса в эмбриональ-

ном развитии уток. С этой целью исследовался передний гипоталамус 15, 21 и 33-дневных эмбрионов уток.

В клетках 15-дневных эмбрионов наблюдается крупное ядро неправильной формы. В нем иногда отмечается наличие нескольких ядрышек с высокой электронной плотностью. В околоядерной области располагаются цистерны гранулярной эндоплазматической сети. Парануклеарно располагается пластинчатый комплекс Гольджи с булавовидными утолщениями. Отмечается наличие множества рибосом в перикарионе. В нейроплазме располагаются множественные митохондрии различной формы с выраженными кристами внутренней мембраны. Нейроны со всех сторон окружены глиальными клетками округлой, овальной, угловатой формы. Клетки глиии плотно прилежат друг к другу и к нейролемме (рис. 4).

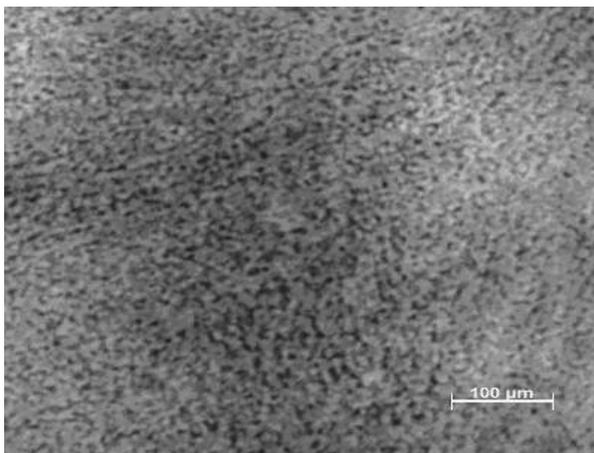


Рис. 3. НАДФН-д-позитивные нервные клетки в переднем гипоталамусе 28-дневного эмбриона утки. Микрофото ($\times 40$)



Рис. 4. Передний гипоталамус 15-дневного эмбриона утки. Микрофото ($\times 12\ 500$)

У 90-дневного плода человека в ядрах переднего гипоталамуса нейроны располагаются диффузно (рис. 7). Они имеют самую разнообразную форму. Нервные клетки, вступившие в дифференцировку, сохраняют ряд признаков, характерных для нейробластов: небольшие размеры, округлую, овальную форму, относительно большое, эксцентрично расположенное ядро. У более зрелых нейронов отмечается увеличение размеров, тело начинает приобретать форму, схожую с дефинитивной: треугольную, овальную, многоугольную. Ядро постепенно занимает центральное положение в нейроплазме. Из-за роста тела нейронов относительные размеры ядра уменьшаются. NO-содержащие гранулы распределяются в нейроплазме равномерно.

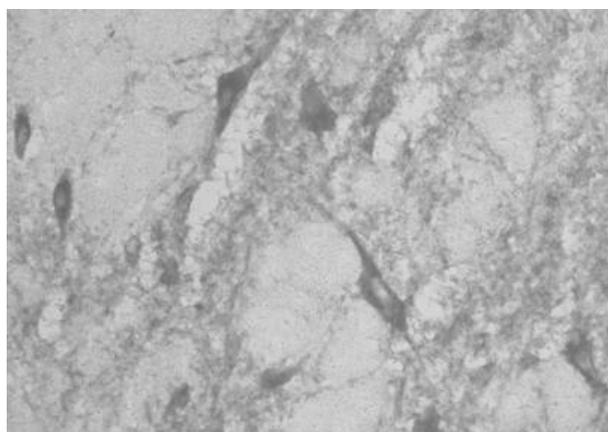


Рис. 7. НАДФН-д-позитивные нервные клетки в переднем гипоталамусе 90-дневного плода человека. Микрофото ($\times 400$)

В ходе последующей дифференцировки начинают постепенно окрашиваться начальные участки отростков (по типу аксонного холмика). В дальнейшем наблюдается окрашивание и самих отростков на некотором протяжении от тела нейрона.

Интенсивность окрашивания нейроплазмы клеток различна и изменяется от светло-фиолетового до темно-фиолетового, причем наибольшая активность NO наблюдается у дифференцирующихся и растущих нейронов.

Заключение

Гипоталамическая область 23-дневных эмбрионов уток содержит НАДФН-д/CNO-позитивные нейроны. Также установлено, что у 90-дневного плода человека в ядрах переднего гипоталамуса обнаружены NO-содержащие нейроны, что свидетельствует об относительно более раннем возникновении NO-ергической системы переднего гипоталамуса человека по сравнению с птицами. Принимая во внимания данные о том, что NO является одним из важнейших факторов, участвующих в развитии центральной нервной системы, можно предположить, что благодаря раннему появлению НАДФН-д/CNO стало возможным более совершенное развитие нервной системы у человека.

Список литературы

1. Amir, S. N^G-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, № 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 ; edited by V. N. Gourine // *Recent advances in thermal biology.* – Minsk. –1999. – P. 18–19.
4. Gourine, A. V. Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced fever in conscious rabbits / A. V. Gourine // *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. – V. 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, № 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, № 2. – P. 155–160.
9. Scherer-Singler, U. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry / U. Scherer-Singler, S. R. Vincent, H. Kimura, E. McGeer // *J. Neurosci. Methods.* – 1983. – Vol. 9, № 3. – P. 229–234.

V. I. Dunai

DEVELOPMENT OF NO-SYSTEM IN FORWARDED HYPOTHALAMUS DURING HUMAN AND BIRD EMBRIOGENESIS

We investigated the correlations in the formation of NO-ergic system of the frontal hypothalamus of bird and human embryos. It has been shown that the subthalamic area of duck embryos contains NADFH-d/CNO-positive neurons beginning from the 23-rd day, which corresponds to the third trimester of development. It was also found out that a 90-day-old human embryo (the first

trimester of development) comprises NO-containing neurons in the nucleuses of the frontal hypothalamus. The data obtained testify to rather earlier origin of NO-ergic system of the human frontal hypothalamus as compared with birds. Taking into account the data that NO is one of the major factors participating in the development of the central nervous system, it is possible to assume that due to the early appearance of NADPH-d/CNO more perfect development of the human nervous system became possible.