

В.И. Дунай

**Формирование NO-ергических структур ствола головного мозга
в онтогенезе зрелорождающихся и незрелорождающихся
млекопитающих**

Белорусский государственный медицинский университет

Целью данной работы явилось изучение созревания NO-ергических систем ствола головного мозга в раннем постнатальном онтогенезе у морских свинок, как представителей зрелорождающихся млекопитающих и у крыс, как представителей незрелорождающихся млекопитающих. В ходе выполненных экспериментов установлено, что у морских свинок в период между третьим и десятым днем постнатального развития формируются основные черты в распределении предполагаемых NO-синтезирующих нервных клеток, характерные для взрослого организма, а у крыс между десятым и двадцатым днем. Ключевые слова: онтогенез, NO-синтеза, гипоталамус.

NO-синтезирующие нейроны широко распространены в ЦНС млекопитающих [2]. Установлено участие NO в регуляции различных физиологических функций [1, 6] и в развитии структуры и функции центральной нервной системы [4]. Получены доказательства вовлечения NO в центральные механизмы терморегуляции при перегревании и экспериментальной лихорадке [3].

Несмотря на обилие фактов, свидетельствующих об участии NO в регуляции различных физиологических функций, а также в развитии центральной нервной системы, становление центральных NO-ергических систем в онтогенезе остается неизученным. Принимая во внимание участие NO в терморегуляции, представляется важным изучить становление NO-ергических систем ствола головного мозга у зрелорождающихся млекопитающих и незрелорождающихся млекопитающих.

Целью данной работы явилось изучение созревания NO-ергических систем мозга в раннем постнатальном онтогенезе у морских свинок, как представителей зрелорождающихся млекопитающих и у крыс, как представителей незрелорождающихся млекопитающих.

Материал и методы

Эксперименты выполнены на 40 морских свинках и 44 крысах. Первая группа – животные 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 настоящее время доказано, что нейронная синтаза NO (CNO) является никотинамидадениндинуклеотидфосфат-диафоразой [8]. Во-первых, локализация в центральной и периферической нервной системе НАДФН-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 CNO. Использование гистохимической реакции на НАДФН-д для идентификации CNO-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 CNO. 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 Hore и Vincent [5].

Для выделения гипоталамуса у животных целиком извлекали головной мозг. Отделяли гипоталамус и продолговатый мозг и дополнительно фиксировали согласно рекомендации Matsumoto et al. [7] 90 минут в 4% параформальдегиде на фосфатном буфере (0.1М, pH7.4). 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 (0,1М, pH8,0) в течение 1,5 и 12 часов соответственно.

Объекты помещали на охлажденные металлические блоки, которые ставили в криостат (– 25 оС) 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-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 (0,1мМ) на протяжении 1-2 ч. при 22 оС и относительной влажности 95-100 %. По окончании гистохимической реакции срезы промывали в растворе Трис-НСI 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 формаза при восстановлении солей тетразолия НАДФН-диафоразой (CNO) 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 и обсуждение

Опыты показали, что у морских свинок в первые дни после рождения в гипоталамической области происходят значительные изменения в распределении нервных клеток, содержащих НАДФН-диафорузу/НОС (табл. 1).

Таблица 1. Распределение нервных клеток, содержащих НАДФН-диафорузу/НОС, в структурах гипоталамуса у морских свинок в разные сроки постнатального онтогенеза

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

"+" - структура содержит НАДФН-диафоруза/НОС-позитивные нервные клетки;

"-" - структура не содержит НАДФН-диафоруза/НОС-позитивные нервные клетки.

При изучении серийных срезов гипоталамуса морских свинок в возрасте одного дня после рождения обнаружены НАДФН-д/СНО – позитивные нейроны в латеральной преоптической области, паравентрикулярном ядре, латеральной гипоталамической области, супрамаммилярном ядре и в переднем гипоталамусе.

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

У морских свинок в возрасте трех дней после рождения так же, как и у однодневных морских свинок, гипоталамус не содержит НАДФН-д/СНО – позитивных нейронов в супраоптическом ядре и перивентрикулярном ядре.

Гипоталамическая область трехдневных морских свинок содержит НАДФН-д/СНО – позитивные нейроны в тех же структурах, что и у однодневных (в латеральной преоптической области, паравентрикулярном ядре, латеральной гипоталамической области, в переднем гипоталамусе и в супрамаммилярном ядре). А также НАДФН-д/СНО – позитивные нейроны обнаружены в медиальной преоптической области и медиальном маммилярном ядре.

В период между третьим и десятым днем формируются основные черты в распределении НАДФН-д/СНО – позитивных нейронов гипоталамической области, характерные для взрослых морских свинок.

Так, у десятидневных морских свинок выявляются НАДФН-д/СНО – позитивные нейроны почти во всех структурах гипоталамуса, содержащих такие нервные клетки у взрослых животных. В отличие от третьего дня, к 10-

му дню развития НАДФН-д/СНО – позитивные нейроны, появляются в перивентрикулярном ядре. Обнаружено, что гипоталамус десятидневного животного не содержит НАДФН-д/СНО – позитивных клеток в супраоптическом ядре.

Крупные, интенсивно окрашенные НАДФН-д/СНО-позитивные нейроны появляются в супраоптическом ядре в период между десятым и двадцатым днем после рождения.

При изучении распределения нервных клеток, содержащих НАДФН-диафорузу/НОС в гипоталамусе у крыс в первые дни после рождения, установлено, что животные в возрасте одного дня после рождения содержат НАДФН-д/СНО – позитивные нейроны в латеральной преоптической области, латеральной гипоталамической области, и в переднем гипоталамусе (табл. 2).

Таблица 2. Распределение нервных клеток, содержащих НАДФН-диафорузу/НОС, в структурах гипоталамуса у крыс в разные сроки постнатального онтогенеза

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

"+" - структура содержит НАДФН-диафоруза/НОС-позитивные нервные клетки;

"-" - структура не содержит НАДФН-диафоруза/НОС-позитивные нервные клетки.

У крыс в возрасте одного дня после рождения не обнаружены НАДФН-д/СНО в медиальной преоптической области, супраоптическом ядре, паравентрикулярном ядре, перивентрикулярном ядре, супрамаммилярном ядре и медиальном маммилярном ядре.

У крыс в возрасте трех дней после рождения так же, как и у однодневных крыс, гипоталамус не содержит НАДФН-д/СНО – позитивных нейронов в супраоптическом ядре, паравентрикулярном ядре и перивентрикулярном ядре.

Гипоталамическая область трехдневных крыс содержит НАДФН-д/СНО – позитивные нейроны в тех же структурах, что и у однодневных. А также НАДФН-д/СНО – позитивные нейроны обнаружены в медиальной преоптической области, медиальном маммилярном ядре и супрамаммилярном ядре.

К 10-му дню развития НАДФН-д/СНО – позитивные нейроны, появляются в супраоптическом ядре и паравентрикулярном ядре. Обнаружено, что гипоталамус десятидневного животного не содержит НАДФН-д/СНО – позитивных клеток в супраоптическом ядре и перивентрикулярном ядре.

НАДФН-д/СНО-позитивные нейроны появляются в супраоптическом ядре и перивентрикулярном ядре в период между десятым и двадцатым днем после рождения. Таким образом, не существует различий в распределении НАДФН-д/СНО – позитивных нейронов в гипоталамусе 20-дневного животного 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 крыс.

При изучении серийных срезов продолговатого мозга, окрашенных на НАДФН-д, у морских свинок и у крыс, в разные сроки после рождения, НАДФН-д/СНО – позитивные нервные клетки обнаружены во всех изучаемых структурах.

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).

Выводы

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

1. 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 терморегуляции.

2. Установлено, что у морских свинок в период между третьим и десятым днем постнатального развития формируются основные черты в распределении предполагаемых NO-синтезирующих нервных клеток, характерные для взрослого организма, а у крыс между десятым и двадцатым днем.

3. Становление NO-зависимых систем в гипоталамусе у морских свинок и крыс, по-видимому, играет важную роль в развитии системы терморегуляции, поскольку более раннее созревание NO-зависимых систем позволяет морским свинкам сразу после рождения вести активный образ жизни, а крысам необходим период созревания.

Литература

1. Amir, S., De Blasio, E., English, A. M. NG-Monomethyl-L-arginine co-injection attenuates the thermogenic and hyperthermic effects of E2 prostaglandin microinjection into the anterior hypothalamic preoptic area in rats// Brain Res. – 1991. – Vol. 556. – P. 157 – 160.
2. Dawson, T. 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. – 1991. – Vol. 88, N.17. – P. 7797 – 7801.
3. Dunai, V. I., Gourine, A. V. Effect of the NO synthase inhibitor, L-NAME, on body temperature in birds in different periods of postnatal ontogenesis// Recent

advances in thermal biology. Edited 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., Vincent, S.R. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase // *J.Histochem.Cytochem.* – 1989. – Vol.37. – P.653 – 661.

6. Kapas, L., Shibata, M., Krueger, J.M. Inhibition of nitric oxide synthesis suppresses sleep in rabbits// *Am. J. Physiol.* – 1994. – V.266. – P.151 – 157.

7. Matsumoto, T., Kuk, J. E., Forstermann, U. A correlation between soluble brain nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase activity is only seen after exposure of the tissue to fixative// *Neurosci.Lett.* – 1993. – Vol. 155, N.1. – P. 61 – 64.

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

9. Scherer-Singler, U., Vincent, S. R., Kimura, H., McGeer, E. G. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry// *J.Neurosci.Methods.* – 1983. – Vol.9, N.3. – P.229 – 234