

ПРЕНАТАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ NO-ЗАВИСИМЫХ СТРУКТУР ПЕРЕДНЕГО ГИПОТАЛАМУСА УТКИ

Целью данной работы явилось изучение становления NO-ергических систем переднего гипоталамуса эмбрионов утки, как представителя гомойотермных животных в период эмбрионального развития, а также влияния температурного фактора и блокады NO-зависимых механизмов на этот процесс. В ходе выполненных экспериментов установлено, что гипоталамическая область 23-дневных эмбрионов уток содержит НАДФН-д/СНО-позитивные нейроны. Также установлено, что у 20-дневных эмбрионов, которые инкубировались при низких температурах наблюдалась активация СНО. Установлено, что у однодневных уток, которым на 28 день эмбрионального развития вводился блокатор NO-синтазы наблюдалось уменьшение активности фермента. Данный факт следует учитывать для дальнейшего изучения влияния блокады NO-зависимых механизмов в эмбриональном онтогенезе на терморегуляцию при действии холода, тепла, с целью корреляции сроков эмбрионального развития.

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

Экспериментальные данные, полученные в последние годы, 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].

Несмотря на обилие фактического материала, свидетельствующего об участии NO в регуляции различных физиологических функций, а также в развитии центральной нервной системы, становление центральных NO-ергических систем остается недостаточно изученной.

Целью данной работы явилось изучение становления NO-ергических систем переднего гипоталамуса эмбрионов утки в пренатальном онтогенезе, а также влияния температурного фактора и блокады NO-зависимых механизмов на этот процесс.

Материалы и методы исследования

В экспериментальной части работы использовались эмбрионы утки в возрасте 20, 23, 28 и 33 дней. 1 группа (48 животных) – контрольная, эмбрионы уток инкубировались при температуре 37°C; 2 группа (24 животных) – эмбрионы уток

инкубировались при температуре 39°C в течение 3 часов; 3 группа (24 животных) – эмбрионы уток инкубировались при температуре 34°C в течение 3 часов; 4 группа (24 животных) – однодневные утки, которым на 28 день эмбрионального развития в кровеносный сосуд яйца вводили метиловый эфир N ω -нитро-L-аргинина (L-МЭНА) в дозе 20 мкг/г яйца согласно Villamor E, Kessel C. et al. (2005); 5 группа (24 животных) – однодневные утки, которым на 28 день эмбрионального развития в кровеносный сосуд яйца вводили метиловый эфир N ω -нитро-D-аргинина (D-МЭНА) в дозе 20 мкг/г яйца; 6 группа (24 животных) – однодневные утки, которым на 28 день эмбрионального развития в кровеносный сосуд яйца вводили донор NO - L-аргинин в дозе 20 мкг/г яйца.

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 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 Hope и Vincent [5].

Для выделения гипоталамуса у эмбрионов 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, pH 7,4). Участки мозга шесть раз по 30 минут отмывали на холоде с использованием 0,1 М раствора Трис-НСl (pH 8,0) и инкубировали в 10% и 25% растворах сахарозы на Трис-НСl (0,1 М, pH 8,0) 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 (pH 8,0) в течение 5 минут. Гистохимическая процедура заключалась в инкубации срезов в растворе 0,1 М Трис-НСl (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 часов при 22 °C и относительной влажности 95-100%. По окончании гистохимической реакции срезы промывали в растворе Трис-НСl в течение 5 минут, обезживали 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 реак-

ции заключается в образовании преципитата формаза на 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

Опыты показали, что в период между 20 и 33 днем эмбрионального развития в переднем гипоталамусе уток происходят изменения в распределении НАДФН-д/CNO-позитивных нейронов. При изучении серийных срезов гипоталамуса эмбрионов уток в возрасте 20 дней не обнаружены НАДФН-д/CNO-позитивные нейроны в переднем гипоталамусе.

Гипоталамическая область 23-, 28-, и 33-дневных эмбрионов уток содержит НАДФН-д/CNO-позитивные нейроны в переднем гипоталамусе.

У эмбрионов в возрасте 23 дня нейроны, входящие в состав ядер переднего гипоталамуса имеют различные размеры, колеблющиеся от 10–12 до 20–25 мкм. Форма нейронов округлая, овальная, веретенообразная, а также приближающаяся к треугольной. Крупное ядро, имеющее округлую, овальную форму, занимает большую часть клетки и находится в большинстве случаев в эксцентричном положении, вплоть до резкого смещения 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 небольшой плотностью расположения нервных клеток. Наряду с этим выявлены незначительные области концентрации нейронов с формированием одиночных групп клеток, состоящих из 4–5 единиц.

При изучении серийных срезов переднего гипоталамуса эмбрионов уток в возрасте 28 дней, наблюдается увеличение степени дифференцировки нервных клеток. Нейроны начинают группироваться в ядра. Наряду с увеличением размеров клеток происходит изменение ядерно-цитоплазматического отношения вследствие того, что объем цитоплазмы увеличивается, 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.

Полученные данные хорошо коррелируют с результатами электронномикроскопического исследования, ставившего целью изучить развитие гипоталамуса в эмбриональном периоде уток. С этой целью исследовался передний гипоталамус 15-, 21- и 33-дневных эмбрионов уток.

У 15-дневных эмбрионов наблюдается крупное ядро неправильной формы. В нем иногда отмечается наличие нескольких ядрышек с высокой электронной плотностью. В околядерной 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 глии плотно прилегают друг к другу и к нейролемме (рисунок 1).



Рис. 1. Передний гипоталамус 15-дневного эмбриона утки. Микрофото ($\times 12500$)

У 21-дневного эмбриона отмечается увеличение плотности расположения цистерн гранулярной эндоплазматической сети и количества митохондрий в нейроплазме (рисунок 2).

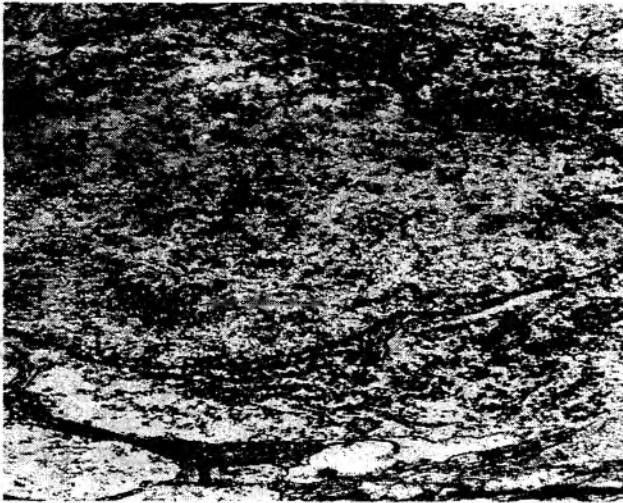


Рис. 2. Передний гипоталамус 21-дневного эмбриона утки. Микрофото ($\times 18000$)

У 33-дневных эмбрионов наблюдается крупное ядро, большое количество митохондрий и рибосом (рисунок 3).

При изучении серийных срезов мозга 20-, 23-, 28- и 33-дневных эмбрионов утки, которые инкубировались в течение 3 часов, непосредственно перед извлечением мозга при температуре 39°C не обнаружены изменения в распределении НАДФН-д/СНО-позитивных нейронов в переднем гипоталамусе. Однако наблюдалось выявление меньшего числа нейронов, которые располагаются более диффузно по сравнению с контролем. Также уменьшается интенсивность окрашивания нервных клеток из-за более низкой плотности расположения гранул фермента в цитоплазме нейронов за счет уменьшения активности фермента.

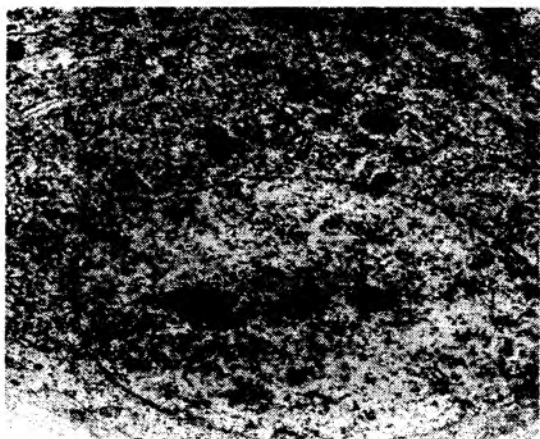


Рис. 3. Передний гипоталамус 33-дневного эмбриона утки. Микрофото ($\times 24500$)

При изучении влияния холодового фактора, установлено что у эмбрионов, которые инкубировались при температуре 34°C , НАДФН-д/СНО- позитивные нейроны обнаружены в переднем гипоталамусе в возрасте 20 дней (рисунок 4), а также наблюдалось незначительное увеличение активности фермента в нервных клетках ядер переднего гипоталамуса у 23-, 28- и 33-дневных эмбрионов.

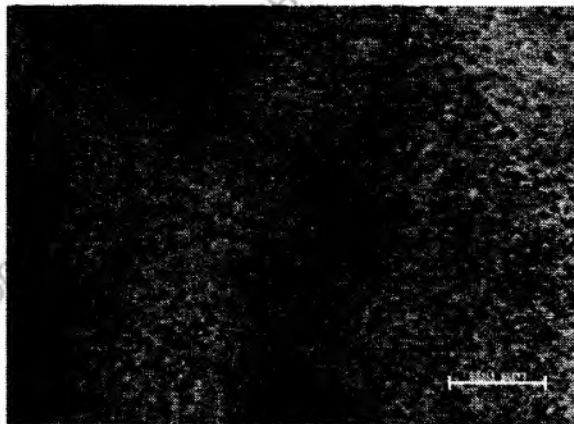


Рис. 4. НАДФН-д-позитивные нервные клетки в переднем гипоталамусе 20-дневных эмбрионов утки, которые инкубировались в течение 3 часов, непосредственно перед извлечением мозга при температуре 34°C . Микрофото ($\times 100$)

При изучении серийных срезов мозга однодневных уток, которым на 28-ой день эмбрионального развития в кровеносный сосуд яйца вводили L-NAME, наблюдалось уменьшение интенсивности окраски. На меньшем протяжении окрашиваются отростки.

При введении L-Аргинина отмечено более интенсивное окрашивание цитоплазмы нейронов. В цитоплазме наблюдается более плотное расположение гранул фермента с образованием крупных глыбок. Также отмечено окрашивание отростков нервных клеток на некотором протяжении от ее тела.

Таким образом, опыты показали, что гипоталамическая область 23- дневных эмбрионов уток содержит НАДФН-д/СНО-позитивные нейроны. Также установлено, что у 20-дневных эмбрионов, которые инкубировались при низких температурах наблюдалась активация СНО. Установлено, что у однодневных уток, которым на 28 день эмбрионального развития вводился блокатор NO-синтазы наблюдалось уменьшение активности фермента. Данный факт следует учитывать для дальнейшего изучения влияния блокады NO-зависимых механизмов в эмбриональном онтогенезе на терморегуляцию при действии холода, тепла, с целью корреляции сроков эмбрионального развития.

ЛИТЕРАТУРА

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. – 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.* 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 / 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 only 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-diaphorase / B.A. Pasqualotto, B.T. Hope, S.R. Vincent // *Neurosci.Lett.* – 1991. – Vol. 128. – N. 2. – P. 155-160.
9. **Scherer-Singler, U.** 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.