

В.И. Дунай

Влияние температурного фактора на распределение надфн-д/спозитивных нейронов в гипоталамусе у гомойотермных организмов

Белорусский государственный университет

Целью данной работы явилось изучение влияния температурного фактора на распределение НАДФН-д/CNO – позитивных нервных клеток в гипоталамусе у птиц и млекопитающих.

Ключевые слова: онтогенез, NO-синтаза, гипоталамус.

В последнее время появились сведения, что NO может участвовать в гипоталамической нейроэндокринной регуляции, модулировать активность гипоталамических нейронов, и, в том числе влиять на синтез и секрецию ими различных биологических веществ [1]. Данные о возможности участия NO в регуляции секреции вазопрессина и кортикотропин-рилизинг факторов свидетельствует о том, что NO, образуемый CNO-позитивными нервными клетками гипоталамуса, может вовлекаться в терморегуляторные реакции гомойотермного организма при действии высоких внешних температур [2]. Hull и Lorrain [3] установили, что нервные клетки, содержащие синтазу оксида азота, генерируют NO, который модулирует активность дофаминергических и серотонинергических систем медиальной преоптической области гипоталамуса, которые играют важную роль в центральных механизмах терморегуляции.

Целью данной работы явилось изучение влияния экспериментальной гипотермии и гипертермии на распределения NO-позитивных нервных клеток в гипоталамусе птиц и млекопитающих.

Материал и методы

В экспериментальной части работы использованы 20 взрослых особей кур домашних (*Gallus gallus*) и 20 взрослых особей крыс (*Rattus rattus*).

Специальными исследованиями было убедительно доказано, что нейронная синтаза NO (CNO) является никотинамидаденинди-нуклеотидфосфат-диафоразой [4]. 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 [5], 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 [6], в модификации Hope и Vincent [7].

У животных целиком извлекали головной мозг. Отделяли изучаемые структуры и дополнительно их фиксировали согласно рекомендации Matsumoto [5] 90 минут в 4 % параформальдегиде на фосфатном буфере (0,1 М, pH 7,4).

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.

Срезы отмывали от сахарозы в 0,1 М растворе Трис-НСI (pH 8,0) в течение 5 минут. 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 часов 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 формазана 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.

Перегревание животных осуществляли в термокамере при температуре воздуха $37,0+0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 10 часов. Охлаждение животных осуществляли в термокамере при температуре воздуха $12,0 + 0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 10 часов.

Результаты и обсуждение

Как показали опыты, гипоталамическая область птиц и млекопитающих содержит значительное количество NO-синтезирующих нервных клеток, которые обнаруживаются в пределах ряда ядер и областей.

При изучении серийных срезов гипоталамуса кур обнаружены крупные, интенсивно окрашенные НАДФН-д/CNO – позитивные нейроны во всех исследуемых структурах: латеральной преоптической области (Lateral preoptic area) и медиальной преоптической области (Medial preoptic area) – плотность расположения 40 – 80 в мм², супраоптическом ядре (Supraoptic nucleus) и паравентрикулярном ядре (Paraventricular nucleus) – плотность расположения 280 – 400 в мм², перивентрикулярном ядре (Periventricular nucleus) – плотность расположения 12 – 18 в мм², вентромедиальном ядре (Nucleus ventromedialis), дорсомедиальном ядре (Nucleus dorsomedialis) – плотность расположения 210 – 480 в мм², латеральной гипоталамической области (Lateral hypothalamic area) – плотность расположения 320 – 600 в мм², латеральном маммилярном ядре (Lateral mammillary nucleus), медиальном маммилярном ядре (Medial mammillary nucleus) – плотность расположения 560 – 820 в мм² и супрамаммилярном ядре (Supramammillary nucleus) – плотность расположения 360 – 440 в мм².

Также установлено, что у крыс в передних отделах гипоталамуса НАДФН-д/СНО – позитивные нервные клетки встречаются в пределах ряда ядер и областей. Медиальное преоптическое ядро (Median preoptic nucleus) и переднее комиссуральное ядро (Anterior commissural nucleus) содержат большое количество НАДФН-д/СНО – позитивных нейронов средних размеров, которые располагаются с высокой плотностью в пределах этих ядер (100 – 200 мм²). Медиальная преоптическая область (Medial preoptic area) содержит незначительное количество (плотность 50 – 100 мм²) мелких и средних слабоокрашенных НАДФН-д/СНО – позитивных нервных клеток, что отличает ее от латеральной преоптической области (Lateral preoptic area), где с высокой плотностью (200 – 400 мм²) располагаются относительно крупные (15 – 20 мкм), интенсивно окрашенные нервные клетки, содержащие НАДФН-д/СНО. Несколько хорошо окрашенных крупных (до 20 мкм) НАДФН-д/СНО – позитивных нервных клеток содержат переднее перивентрикулярное ядро (Anterior periventricular nucleus) и преоптическое супрахиазмальное ядро (Preoptic supra-chiasmatic nucleus), некоторые из этих нейронов лежат прямо под эпендимой третьего желудочка.

В пределах супраоптического (Supraoptic nucleus), паравентрикулярного (Paraventricular nucleus) и круглого (Nucleus circularis) ядер обнаружено большое количество средних и крупных (10 – 25 мкм), очень интенсивно окрашенных НАДФН-д/СНО – позитивных нервных клеток, которые располагаются с очень высокой плотностью (500 – 1000 и более клеток в мм²).

Дорсомедиальное ядро (Dorsomedial nucleus), в особенности его вентролатеральная часть, содержат много умеренно окрашенных мелких нейронов, содержащих НАДФН-д/СНО, которые располагаются в пределах этих ядер с относительно высокой плотностью (300 – 800 в мм²).

В задних отделах гипоталамуса крысы НАДФН-д/СНО – позитивные нервные клетки располагаются в пределах нескольких ядер. Так, дорзальные и вентральные преаммилярные ядра (Nucleus pre-mammillary dorsal et ventral) содержат мелкие и средние интенсивно окрашенные НАДФН-д/СНО – позитивные нервные клетки, которые располагаются с плотностью более 1000 в мм². В латеральной части медиального аммилярного ядра (Medial mammillary nucleus lateral) сконцентрированы (плотность более 1000 в мм²) мелкие (8 – 12 мкм), слабо окрашенные нейроны, содержащие синтазу NO. НАДФН-д/СНО – позитивные слабо окрашенные мелкие и средние нервные клетки располагаются со средней плотностью (250 – 500 в мм²) и в пределах супрааммилярного ядра (Supramammillary nucleus).

Таким образом, установлено, что для распределения нейронов, содержащих синтазу NO в гипоталамусе гомеотермных организмов, характерны следующие черты: 1) наличие СНО-позитивных нервных клеток в преоптической области переднего гипоталамуса; 2) наличие СНО-позитивных нейронов в крупноклеточных нейросекреторных ядрах – супраоптическом и паравентрикулярном; 3) большое количество нервных клеток, содержащих синтазу оксида азота на всем протяжении латерального гипоталамуса; 4) наличие СНО-позитивных нейронов в ряде гомологичных образований аммилярных тел (задний гипоталамус).

При исследовании серийных срезов гипоталамуса кур, которые подвергались экспериментальной гипотермии не обнаружена статистически достоверная разница

изменения плотности НАДФН-д/СНО – позитивных нейронов по сравнению с контрольными животными (табл. 1). Крупные, интенсивно окрашенные НАДФН-д/СНО – позитивные нейроны обнаружены во всех исследуемых структурах: латеральной преоптической области (Lateral preoptic area) с плотностью расположения $58 \pm 4,48$ в мм² и медиальной преоптической области (Medial preoptic area) – плотность расположения $67 \pm 4,92$ в мм², супраоптическом ядре (Supraoptic nucleus) и паравентрикулярном ядре (Paraventricular nucleus) – плотность расположения $314 \pm 6,34$ и $406 \pm 4,08$ в мм² соответственно, перивентрикулярном ядре (Periventricular nucleus) – плотность расположения $14 \pm 3,65$ в мм², латеральной гипоталамической области (Lateral hypothalamic area) – плотность расположения $482 \pm 4,84$ в мм², латеральном маммилярном ядре (Lateral mammillary nucleus), медиальном маммилярном ядре (Medial mammillary nucleus) – плотность расположения $680 \pm 6,16$ и $760 \pm 4,58$ в мм² соответственно и супрамаммилярном ядре (Supramammillary nucleus) – плотность расположения $422 \pm 6,32$ в мм².

Таблица 1

Влияние экспериментальной гипертермии и гипотермии на плотность NO-синтезирующих нейронов в ядрах гипоталамуса кур

Серия	Контроль	Экспериментальная гипотермия		Экспериментальная гипертермия			
		Название ядра (область)	Контроль $x \pm t_{0,05} S$	$x \pm t_{0,05} S$	% к контролю	$x \pm t_{0,05} S$	% к контролю
		Lateral preoptic area	$55 \pm 11,04$	$58 \pm 4,48$	+5,45	$64 \pm 8,64$	+16,37*
		Medial preoptic area	$65 \pm 5,04$	$67 \pm 4,92$	+3,08	$82 \pm 6,34$	+26,15*
		Supraoptic nucleus	$310 \pm 6,46$	$314 \pm 6,34$	+1,29	$373 \pm 3,45$	+20,32*
		Paraventricular nucleus	$380 \pm 12,42$	$406 \pm 4,08$	+6,84	$460 \pm 6,22$	+21,05*
		Periventricular nucleus	$15 \pm 8,12$	$14 \pm 3,65$	-7,33	$16 \pm 10,12$	+6,67
		Lateral hypothalamic area	$460 \pm 8,61$	$482 \pm 4,84$	+4,78	$468 \pm 6,32$	+1,74
		Lateral mammillary nucleus	$640 \pm 12,44$	$680 \pm 6,16$	+6,25	$664 \pm 4,34$	+3,75
		Medial mammillary nucleus	$780 \pm 8,12$	$760 \pm 4,58$	-3,43	$812 \pm 6,22$	+4,10
		Supramammillary nucleus	$400 \pm 8,34$	$422 \pm 6,32$	+5,50	$467 \pm 5,33$	+16,75*

* – изменения достоверны по отношению к контролю; $p \ll 0,05$

При исследовании серийных срезов гипоталамуса кур, которые подвергались экспериментальной гипертермии обнаружено увеличение плотности НАДФН-д/СНО – позитивных нейронов по сравнению с контрольными животными (табл. 1) в латеральной преоптической области (Lateral preoptic area) на 16,37 % ($p \ll 0,05$), медиальной преоптической области (Medial preoptic area) на 26,15 % ($p \ll 0,05$), супраоптическом ядре (Supraoptic nucleus) на 20,32 % ($p \ll 0,05$), паравентрикулярном ядре (Paraventricular nucleus) на 21,05 % ($p \ll 0,05$) и супрамаммилярном ядре (Supramammillary nucleus) на 16,75 % ($p \ll 0,05$). В перивентрикулярном ядре (Periventricular nucleus), латеральной гипоталамической области (Lateral hypothalamic area), латеральном маммилярном ядре (Lateral mammillary nucleus) и медиальном маммилярном ядре (Medial mammillary nucleus) статистически достоверное изменение плотности НАДФН-д/СНО – позитивных нейронов по сравнению с контрольными животными не выявлено.

При исследовании серийных срезов гипоталамуса крыс, которые подвергались экспериментальной гипотермии также не обнаружена статистически достоверная разница изменения плотности НАДФН-д/СНО – позитивных нейронов по сравнению с контрольными животными (табл. 2). НАДФН-д/СНО – позитивные нейроны

обнаружены во всех исследуемых структурах: латеральной преоптической области (Lateral preoptic area) с плотностью расположения $311 \pm 11,32$ в мм² и медиальной преоптической области (Medial preoptic area) – плотность расположения $74 \pm 3,23$ в мм², супраоптическом ядре (Supraoptic nucleus) и паравентрикулярном ядре (Paraventricular nucleus) – плотность расположения $644 \pm 4,24$ и $712 \pm 3,23$ в мм² соответственно, перивентрикулярном ядре (Periventricular nucleus) – плотность расположения $17 \pm 5,33$ в мм², латеральной гипоталамической области (Lateral hypothalamic area) – плотность расположения $562 \pm 4,54$ в мм², латеральном маммиллярном ядре (Lateral mammillary nucleus), медиальном маммиллярном ядре (Medial mammillary nucleus) – плотность расположения $1060 \pm 2,42$ и $1028 \pm 4,62$ в мм² соответственно и супрамаммиллярном ядре (Supramammillary nucleus) – плотность расположения $370 \pm 3,54$ в мм².

Таблица 2

Влияние экспериментальной гипертермии и гипотермии на плотность NO-синтезирующих нейронов в ядрах гипоталамуса крыс

Серия	Контроль	Экспериментальная гипотермия		Экспериментальная гипертермия	
		х _{±t} , S	% к контролю	х _{±t} , S	% к контролю
Латеральная преоптическая область (Lateral preoptic area)	$300 \pm 14,89$	$311 \pm 11,32$	+3,66	$377 \pm 5,06$	+25,66*
Медиальная преоптическая область (Medial preoptic area)	$75 \pm 6,44$	$74 \pm 3,23$	-2,66	$79 \pm 2,54$	+5,33
Супраоптическое ядро (Supraoptic nucleus)	$650 \pm 8,24$	$644 \pm 4,24$	1,08	$764 \pm 4,24$	+17,53*
Паравентрикулярное ядро (Paraventricular nucleus)	$694 \pm 5,08$	$712 \pm 3,23$	+2,59	$840 \pm 6,95$	+21,04*
Перивентрикулярное ядро (Periventricular nucleus)	$18 \pm 8,24$	$17 \pm 5,33$	6,44	$19 \pm 2,46$	+5,55
Латеральная гипоталамическая область (Lateral hypothalamic area)	$550 \pm 12,34$	$562 \pm 4,54$	+2,18	$582 \pm 6,22$	+5,81
Латеральное маммиллярное ядро (Lateral mammillary nucleus)	$1040 \pm 10,22$	$1060 \pm 2,42$	+1,92	$1064 \pm 6,12$	+2,30
Медиальное маммиллярное ядро (Medial mammillary nucleus)	$1022 \pm 8,42$	$1028 \pm 4,62$	+0,58	$1044 \pm 6,28$	+2,15
Супрамаммиллярное ядро (Supramammillary nucleus)	$375 \pm 11,34$	$370 \pm 3,54$	-2,66	$382 \pm 4,64$	+1,86

* – изменения достоверны по отношению к контролю; $p \ll 0,05$

В серийных срезах гипоталамуса крыс, которые подвергались экспериментальной гипертермии обнаружено увеличение плотности НАДФН-д/СНО – позитивных нейронов по сравнению с контрольными животными (таблица 2) в латеральной преоптической области (Lateral preoptic area) на 25,66 % ($p \ll 0,05$), супраоптическом ядре (Supraoptic nucleus) на 17,53 % ($p \ll 0,05$), паравентрикулярном ядре (Paraventricular nucleus) на 21,04 % ($p \ll 0,05$). В перивентрикулярном ядре

(Periventricular nucleus), медиальной преоптической области (Medial preoptic area), супрамаммилярном ядре (Supramammillary nucleus), латеральной гипоталамической области (Lateral hypothalamic area), латеральном маммилярном ядре (Lateral mammillary nucleus) и медиальном маммилярном ядре (Medial mammillary nucleus) статистически достоверное изменение плотности НАДФН-д/СНО – позитивных нейронов по сравнению с контрольными животными не выявлено.

Выводы

Таким образом, на основании выше изложенного можно сделать следующие выводы:

1. У представителей гомойотермных организмов NO-синтезирующие нейроны содержатся в нервных центрах гипоталамуса, которые участвуют в регуляции активности периферических терморегуляторных эффикторов. Плотность распределения NO-синтезирующих нейронов различна.

2. При экспериментальной гипотермии плотность распределения NO-синтезирующих нейронов в гипоталамусе гомойотермных организмов не изменяется.

3. При экспериментальной гипертермии наблюдается увеличение числа СНО-позитивных нервных клеток в ряде ядер гипоталамуса птиц и млекопитающих.

Литература

1. Bredt D. S., Snyder S. H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger// Neuron. – 1992. – Vol.8. – P.3 – 11.

2. Sanders K. Nitric oxide and the nervous system//Lancet. – 1992. – Vol.339, N. 8784. – P.50 – 51.

3. Hull E.M., Lorrain D.S. The nitric oxide precursor, L-arginine, increases dopamine and serotonin release in medial preoptic area of male rats//Proc.Int.Symp. «Nitric oxide». – 1993. – P.1 – 4.

4. 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.

5. 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.

6. 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.

7. Hope B. T., Vincent S.R. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase //J.Histochem.Cytochem. – 1989. – Vol.37. – P.653 – 661.