

*В.И. Дунай*

## **Становление но-зависимых структур переднего гипоталамуса в пренатальном онтогенезе**

*Белорусский государственный медицинский университет*

Целью данной работы явилось выявление корреляции в становлении NO-ергической системы переднего гипоталамуса эмбрионов птиц и плодов человека. В ходе выполненных экспериментов установлено, что гипоталамическая область эмбрионов уток содержит НАДФН-д/СНО – позитивные нейроны начиная с 23-го дня, что соответствует третьему триместру развития. Также установлено, что у 90-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/СНО стало возможным более совершенное развитие нервной системы у человека. Ключевые слова: пренатальный онтогенез, NO-синтеза, гипоталамус.

Большое количество экспериментальных данных, накопленных 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.

Материал и методы

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 никотинамидаденинди-нуклеотидфосфат-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 Hore 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, 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 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-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 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-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.

Результаты и обсуждение

Опыты показали, что в период между 20-м и 28-м 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. Гипоталамическая область 23-х и 28-дневных эмбрионов уток содержит НАДФН-д/СНО-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 (рис. 1). 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 небольшой плотностью расположения нервных клеток. Наряду с этим выявлены незначительные области концентрации нейронов с формированием одиночных групп клеток, состоящих из 4 – 5 единиц.

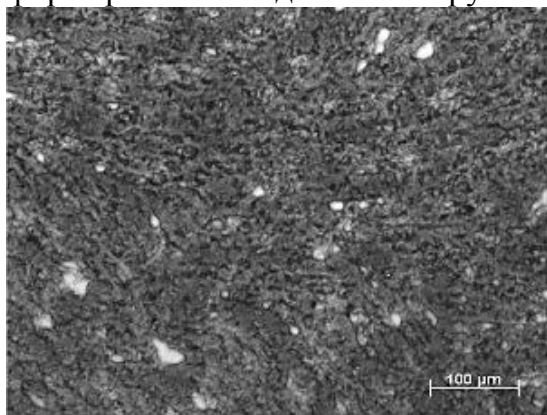


Рис. 1 – НАДФН-д-позитивные нервные клетки в переднем гипоталамусе 23-х дневного эмбриона утки. Микрофото (? 40)

При изучении серийных срезов переднего гипоталамуса эмбрионов уток в возрасте 28-ми дней, наблюдается увеличение степени дифференцировки нервных клеток (рис. 2). Нейроны начинают группироваться в ядра. Изменяется характер окрашивания цитоплазмы, ее объем увеличивается, по сравнению с объемом ядра. 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.

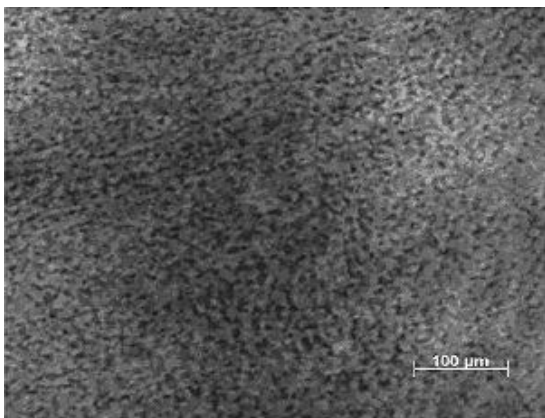


Рис. 2 – НАДФН-д-позитивные нервные клетки в переднем гипоталамусе 28-ми дневного эмбриона утки. Микрофото (? 40)

Полученные результаты хорошо коррелируют с полученными ранее данными 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 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 глии плотно прилежат друг к другу и к нейролемме (рис. 3).



Рис. 3 – Передний гипоталамус 15- дневного эмбриона утки. Микрофото (? 12. 500)

У 21-дневного эмбриона отмечается увеличение плотности расположения цистерн гранулярной эндоплазматической сети и количества митохондрий в нейроплазме (рис. 4).

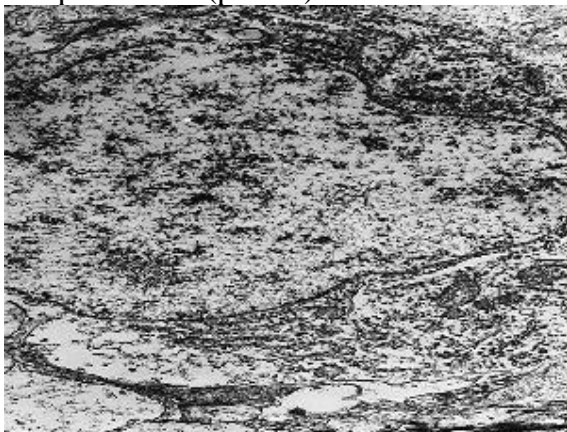


Рис. 4 – Передний гипоталамус 21- дневного эмбриона утки. Микрофото (? 18. 000)

У 33-дневных эмбрионов наблюдается крупное ядро, большое количество митохондрий и рибосом (рис. 5).

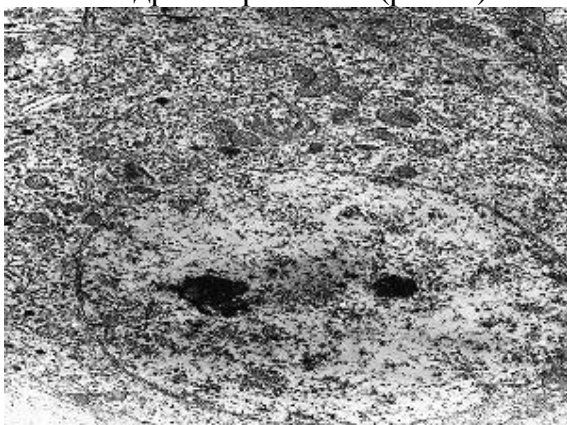


Рис. 5 – Передний гипоталамус 33- дневного эмбриона утки. Микрофото (? 24. 500)

У 90-дневного плода человека в ядрах переднего гипоталамуса нейроны располагаются диффузно (рис. 6). 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.

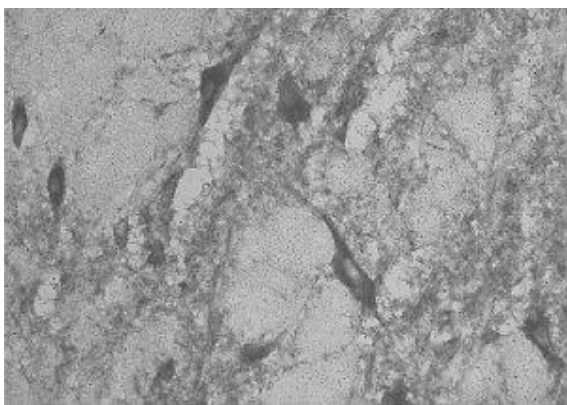


Рис. 6 – НАДФН-д-позитивные нервные клетки в переднем гипоталамусе 90-то дневного плода человека. Микрофото (? 400)

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 тёмно-фиолетового, причём наибольшая активность NO наблюдается у дифференцирующихся и растущих нейронов.

#### Заключение

Гипоталамическая область 23-х 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.

#### 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.