

*В.И. Дунай*

## **Развитие центральных по-зависимых структур в постнатальном онтогенезе**

*Белорусский государственный университет*

Целью данной работы явилось изучение созревания NO-ергических систем ствола головного мозга в раннем постнатальном онтогенезе у цыплят, как представителей выводковых птиц. Установлено, что у цыплят к десятому дню постнатального развития формируются основные черты в распределении предполагаемых NO-синтезирующих нервных клеток, характерные для взрослого организма. Ключевые слова: онтогенез, NO-синтеза, гипоталамус.

В настоящее время установлено, что NO-синтезирующие нейроны широко распространены в ЦНС млекопитающих. Большое количество таких нервных клеток содержат мозжечок, гиппокамп и ряд других структур головного мозга [2]. Доказано также участие NO в регуляции различных физиологических функций [1, 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 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 совершенно неизученным.

Целью данной работы явилось изучение созревания NO-ергических систем мозга в раннем постнатальном онтогенезе у цыплят как представителей класса птиц.

### Материал и методы

Эксперименты выполнены на 48 цыплятах и 6 взрослых особях. Первая группа животных включала цыплят 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.

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 Норе и Vincent [5].

Для выделения гипоталамуса у животных 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 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.

Структуры гипоталамуса и продолговатого мозга идентифицировали при помощи стереотаксического атласа Orlan M. Junzy & Richard F. Phillips.

Результаты и обсуждение

Опыты показали, что гипоталамическая область кур содержит большое количество НАДФН-д/CNO – позитивных нейронов (рисунок 1 и 2).

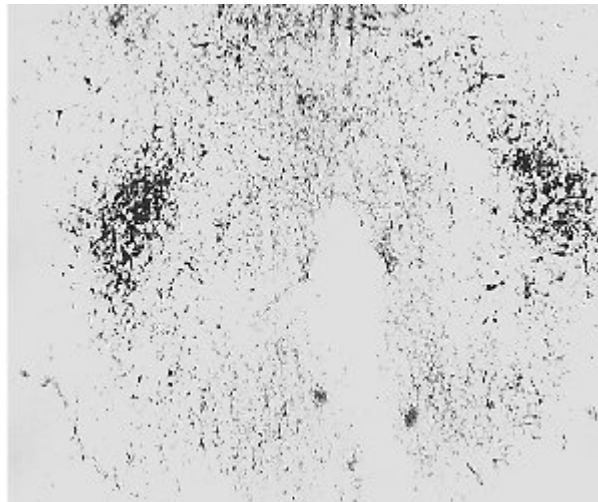


Рис. 1. НАДФН-д – позитивные нервные клетки в переднем гипоталамусе курицы. Микрофото (x40)

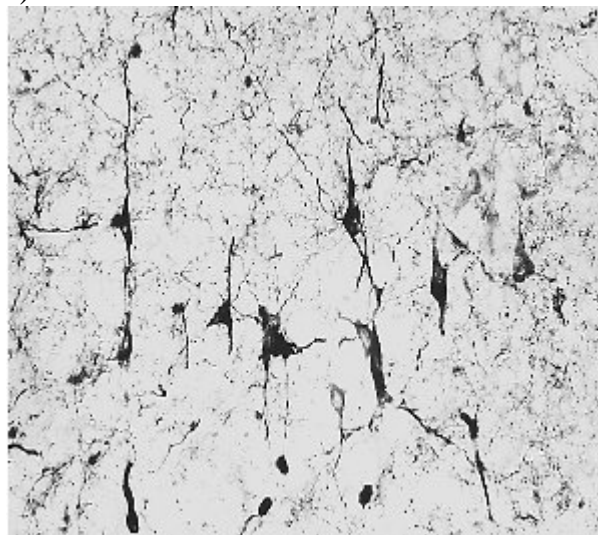


Рис.2. НАДФН-д – позитивные нервные клетки в заднем гипоталамусе курицы. Микрофото (x100)

Установлено, что в первые дни и недели после рождения в гипоталамической области происходят значительные изменения в распределении НАДФН-д/CNO – позитивных нейронов (табл. 1).

Таблица 1

Распределение нервных клеток, содержащих НАДФН-д / CNO, в структурах гипоталамуса у цыплят в разные сроки постнатального онтогенеза

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

«+» – структура содержит НАДФН-д /CNO – позитивные нервные клетки;

«-» – структура не содержит НАДФН-д /CNO – позитивные нервные клетки.

При изучении серийных срезов гипоталамуса цыплят в возрасте одного дня после рождения обнаружены НАДФН-д/CNO – позитивные нейроны в латеральной преоптической области, паравентрикулярном ядре, латеральной гипоталамической области, в латеральном маммилярном ядре и в супрамаммилярном ядре.

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

У цыплят в возрасте трех дней после рождения так же, как и у однодневных цыплят, гипоталамус не содержит НАДФН-д/CNO – позитивных нейронов в медиальной преоптической области, супраоптическом ядре и перивентрикулярном ядре.

Гипоталамическая область трехдневных цыплят содержит НАДФН-д/CNO – позитивные нейроны в тех же структурах, что и у однодневных (в латеральной преоптической области, паравентрикулярном ядре, латеральной гипоталамической области, в латеральном маммилярном ядре и в супрамаммилярном ядре). А также НАДФН-д/CNO – позитивные нейроны обнаружены в медиальном маммилярном ядре, дорсомедиальном и вентромедиальном ядрах.

В период между третьим и десятым днем формируются основные черты в распределении НАДФН-д/CNO – позитивных нейронов гипоталамической области, характерные для взрослого организма.

Так, у десятидневных цыплят выявляются НАДФН-д/CNO – позитивные нейроны почти во всех структурах гипоталамуса, содержащих такие нервные клетки у взрослых птиц. В отличие от третьего дня, к 10-му дню развития НАДФН-д/CNO – позитивные нейроны, появляются в перивентрикулярном ядре. Обнаружено, что гипоталамус десятидневного цыпленка не содержит НАДФН-д/CNO – позитивных клеток в супраоптическом ядре.

Крупные, интенсивно окрашенные НАДФН-д/CNO-позитивные нейроны появляются в супраоптическом ядре в период между десятым и двадцатым днем после вылупления. Таким образом, не существует различий в распределении НАДФН-д/CNO – позитивных нейронов в гипоталамусе 20-дневного цыпленка 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 цыплят.

При изучении серийных срезов продолговатого мозга, окрашенных на НАДФН-д, у цыплят, в разные сроки после рождения, НАДФН-д/CNO – позитивные нервные клетки обнаружены во всех изучаемых структурах

(таблица 2).

Таблица 2

Распределение нервных клеток, содержащих НАДФН-д / CNO, в продолговатом мозге у цыплят в разные сроки постнатального онтогенеза

№ п/п	Структура	1-й день	3-й день	10-й день	20-й день
1	Paragigantocellular reticular nucleus	+	+	+	+
2	Gigantocellular reticular nucleus	+	+	+	+
3	Medial vestibular nucleus	+	+	+	+
4	Nucleus tractus solitarii	+	+	+	+
5	Paratrigeminal nucleus	+	+	+	+
6	Paramedian reticular nucleus	+	+	+	+
7	Cuneate nucleus	+	+	+	+
8	Reticular nucleus medulla dorsal	+	+	+	+
9	Reticular nucleus medulla ventral	+	+	+	+

«+» – структура содержит НАДФН-д /CNO-позитивные нервные клетки;

«-» – структура не содержит НАДФН-д /CNO-позитивные нервные клетки.

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).

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 механизмах роста нервных окончаний и формирования синаптических контактов.

Установлено, что в первые дни и недели после рождения у цыплят в гипоталамической области происходят значительные изменения в распределении НАДФН-д/CNO – позитивных нервных клеток. Так, между третьим и десятым днем постнатального развития формируются основные черты в распределении предполагаемых NO-синтезирующих нервных клеток, характерные для взрослого организма, а между десятым и двадцатым днем, по-видимому, происходит окончательное структурное формирование NO-зависимых систем нервных центров гипоталамуса цыпленка.

Можно предполагать, что становление NO-зависимых систем в гипоталамусе у птиц, по-видимому, играет важную роль в развитии системы терморегуляции, поскольку полученные результаты хорошо коррелируют с данными о том, что температура тела у цыплят, характерная для взрослых животных, устанавливается к 14-му дню жизни.

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

Полученные результаты дополняют существующие представления о механизмах становления терморегуляции в онтогенезе у гомойотермных животных, и будут способствовать дальнейшему углубленному изучению проблемы участия монооксида азота в развитии системных функций.

Полученные в работе данные желательно учитывать в ситуациях, связанных с применением NO-активных соединений в практической медицине.

### **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 nly 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.