

В.И. Дунай¹, С.Л. Кабак²

Созревание NO-ергических и холинергических нейронов ствола головного мозга у курицы в постнатальном онтогенезе

Белорусский государственный университет¹

Белорусский государственный медицинский университет¹

Целью данной работы явилось сопоставление данных о созревании (по срокам) NO-ергических и холинергических нейронов в стволе головного мозга у птиц. Установлено, что у цыплят основные черты в распределении нервных клеток, содержащих ацетилхолинэстеразу в гипоталамусе, характерные для взрослого организма, формируются заметно раньше, чем созревание NO-ергических нейронов.

Ключевые слова: онтогенез, NO-синтаза, ацетилхолин, гипоталамус.

По данным O. Filogamo и P. S. Marchisio для ацетилхолина (АХ) так же, как и для других медиаторов, установлено наличие двух функций во время развития. Вначале холинергическая система участвует в регуляции структурного созревания нейронов и только позднее начинает обеспечивать передачу возбуждения в синапсах [1]. Также установлена роль холинергических механизмов в терморегуляции. Так, центральное действие холиномиметиков проявляется понижением температуры тела, а центральное действие холиноблокаторов способствует повышению температуры тела в условиях, способствующих развитию гипертермии [2]. Имеются предположения о том, что монооксид азота (NO) может являться одним из важнейших факторов, участвующих в развитии структуры и функции центральной нервной системы [3], являясь эффекторной молекулой, вызывающей гибель определенных клеточных структур, а также играя важную роль в механизмах роста нервных окончаний и формирования синаптических контактов [4, 5]. Получены доказательства участия NO в центральных механизмах терморегуляции при перегревании [6] и экспериментальной лихорадке [7].

Принимая во внимание, что АХ и NO принимают участие в развитии центральной нервной системы и оказывают модулирующее действие на работу центров терморегуляции, представлялось перспективным выявить корреляцию между сроками появления холинергических и NO-ергических нейронов в стволе головного мозга у цыплят в раннем постнатальном онтогенезе.

Материалы и методы исследования

Эксперименты выполнены на 24 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. Все эксперименты выполнены с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.).

В работе был использован метод идентификации, содержащих НАДФН-диафоруазу/NO-синтазу (никотинамидадениндинуклеотидфосфат-диафоруазу) нейронов, разработанный Scherer-Singler et al. (1983) [8], в модификации Норе и Vincent (1989) [9]. У цыплят после трепанации черепа целиком извлекали

головной мозг. Отделяли гипоталамус и продолговатый мозг и фиксировали согласно рекомендации Matsumoto et al. (1993) 90 минут в 4 % параформальдегиде на фосфатном буфере (0,1 М, pH 7,4). Гистохимическая процедура заключалась в инкубации микротомных срезов (25 мкм) в растворе 0,1М Трис-НСl (pH 8), содержащем НАДФН (1мМ), нитросиний тетразолий (0,5мМ), Тритон X-100 (0,3 %) на С.°протяжении 1–2 часов при температуре 22

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. Активность ацетилхолинэстеразы выявляется с ацетилхолиниодидом по Гомори [10]. Инкубация срезов, прикрепленных на предметные стекла осуществлялась на протяжении 10–60 минут при + 37° С в свежеприготовленном инкубационном растворе, содержащем 20 мг ацетилтиохолиниодида растворенного в нескольких каплях дистиллированной воды с добавлением 10 мл маточного раствора (сульфат меди ($CuSO_4 \times 5H_2O$) – 0,3 г, глицин – 0,375 г, хлорид магния ($MgCl_2 \times H_2O$) – 1,0 г, малеиновая кислота – 1,75 г, NaOH (4 %) – 30 мл, $Na_2S_0_4$ (40 %, насыщенный при подогреве) pH 6,0 – 170 мл). Активность ацетилхолинэстеразы проявляется окрашиванием различных оттенков – от коричневого до черного. Специфичность гистохимической реакции проверялась инкубацией нескольких срезов в растворах без субстрата; инкубацией с 10 - 4 М эзеринном (физостигмин-салицилат) в инкубационной среде без субстрата (предварительная инкубация) и в среде с субстратом (основная инкубация) для подавления ацетилхолинэстеразной и холинэстеразной активности.

Препараты изучали с помощью светового микроскопа «Olimpus». Подсчет количества нервных клеток на единицу площади среза проводили с помощью системы текстурного анализа Leitz-TAS (ФРГ) по специально разработанной программе. Изображение препарата при помощи видеокамеры выводили на экран монитора и подсчитывали количество нейронов на один мм². Количество серийных срезов, получаемых от каждого объекта колебалось от 6 до 12, а количество учитываемых полей в каждом срезе – 12.

Для идентификации нервных клеток испозовали стереотаксический атлас под редакцией W. Kuenzel & M. Masson [11].

Результаты

Как нами раньше упоминалось [12] у цыплят в первые дни после рождения в гипоталамической области происходят значительные изменения в распределении нервных клеток, содержащих НАДФН-диафоруазу/CNO. В период между третьим и десятым днями жизни формируются основные закономерности распределения НАДФН-д/CNO-позитивных нейронов в гипоталамической области, характерные для взрослого организма. Так, у 10-дневных цыплят НАДФН-д/CNO-

позитивные нейроны выявляются почти во всех структурах гипоталамуса, содержащих такие нервные клетки у взрослых птиц. Полученные данные свидетельствуют о том, что, по-видимому, к десятому дню после рождения происходит структурное формирование NO-зависимых систем нервных центров гипоталамуса цыплят.

Установлено также, что значительных изменений в распределении NO-синтезирующих нервных клеток в продолговатом мозге не происходит [12]. По-видимому, уже до вылупливания завершается формирование NO-зависимых систем нервных центров продолговатого мозга, структурное и функциональное развитие которых должно обеспечивать в первые дни жизни важнейшие вегетативные функции.

При изучении серийных срезов гипоталамуса цыплят в возрасте одного дня после рождения обнаружены АХЭ-позитивные нейроны в медиальной преоптической области (Medial preoptic area), латеральной преоптической области (Lateral preoptic area) (рисунок), паравентрикулярном ядре (Paraventricular nucleus), латеральной гипоталамической области (Lateral hypothalamic area), а также в медиальном маммилярном (Medial mammillary nucleus), латеральном маммилярном (Lateral mammillary nucleus) и супрамаммилярном ядрах (Supramammillary nucleus) (таблица 1). У цыплят в возрасте одного дня после рождения не обнаружены АХЭ-позитивные нейроны в ряде структур гипоталамуса, содержащих такие нейроны у взрослых организмов. Так, не обнаружены АХЭ-позитивные нейроны в супраоптическом (Supraoptic nucleus) и перивентрикулярном (Periventricular nucleus) ядрах. Гипоталамическая область 3-дневных цыплят содержит АХЭ-позитивные нейроны в тех же структурах, что и у 1-дневных. Также АХЭ-позитивные нейроны обнаружены в супраоптическом (Supraoptic nucleus) и перивентрикулярном (Periventricular nucleus) ядрах.

Таким образом, к третьему дню жизни цыплят формируются основные черты в распределении нервных клеток, содержащих АХЭ, характерных для взрослого организма.

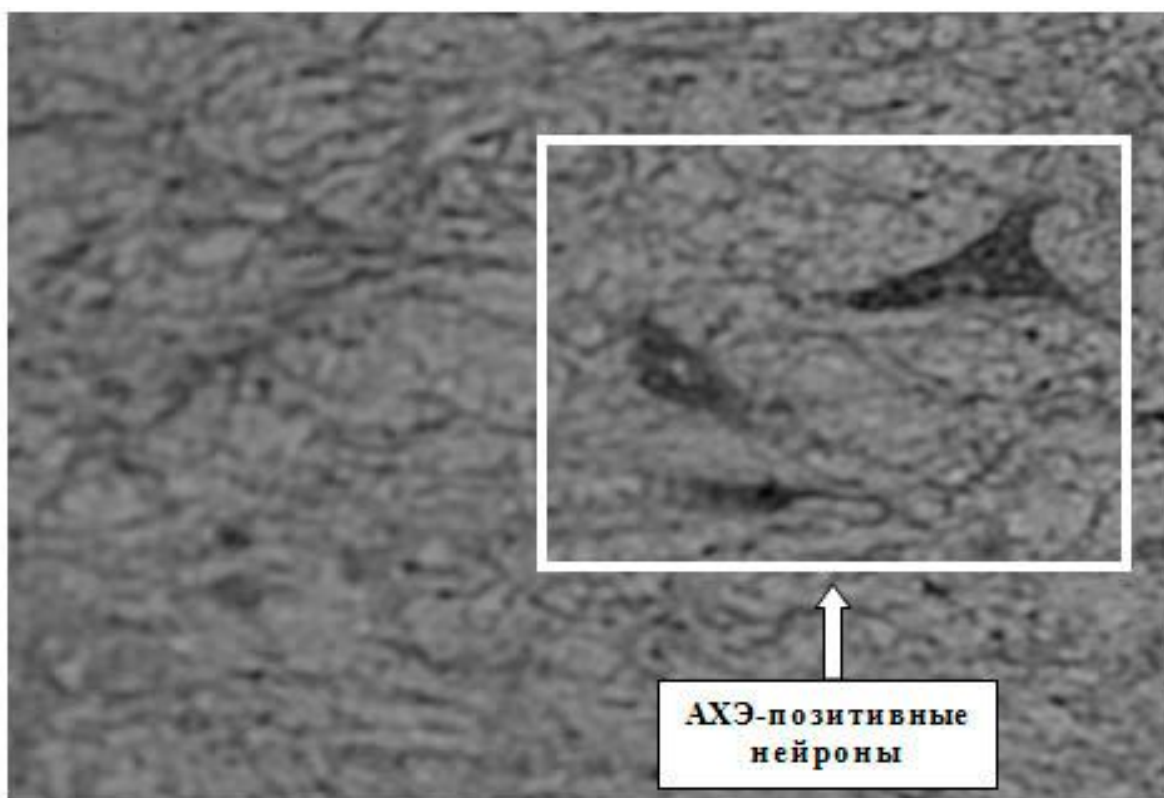


Рисунок – АХЭ-позитивные нервные клетки в латеральной преоптической области гипоталамуса у 1-дневного цыпленка. Микрофото (× 400)

Таблица 1 – Распределение нервных клеток, содержащих АХЭ, в структурах гипоталамуса у цыплят в разные сроки постнатального онтогенеза

№ п/п	Структура	1 день	3 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.	Lateral mammillary nucleus	+	+
9.	Supramammillary nucleus	+	+

Примечание: «+» – структура содержит АХЭ-позитивные нейроны;

«-» структура не содержит АХЭ-позитивные нейроны.

При изучении серийных срезов продолговатого мозга цыплят различных возрастов, окрашенных на АХЭ, АХЭ-позитивные нервные клетки обнаружены во всех изучаемых структурах (таблица 2). По-видимому, еще до рождения завершается формирование АХ-зависимых систем нервных центров продолговатого мозга, структурное и функциональное развитие которых должно обеспечивать в первые дни жизни важнейшие вегетативные функции (дыхание, кровообращение).

Таблица 2 – Распределение нервных клеток, содержащих АХЭ, в продолговатом мозге цыплят в разные сроки постнатального онтогенеза

№ п/п	Структура	1 день	3 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	+	+

Примечание: «+» – структура содержит АХЭ-позитивные нейроны.

Полученные результаты позволяют утверждать, что у цыплят между 1-ым и 3-ым днем жизни формируются основные черты в распределении нервных клеток, содержащих ацетилхолинэстеразу в гипоталамусе, характерные для взрослого организма. Это становление идет заметно раньше, чем становление НО-ергических механизмов (после 10 дней). Поскольку последние оказывают модулирующее влияние на работу центров терморегуляции, то предстоит выяснить в дальнейшем зависимость активности холинергических механизмов, проявляющейся в определенных условиях гипотермическими эффектами [2], от функционирования цепи аргинин-монооксид азота в этих центрах.

Литература

1. Filogamo, O. Acetylcholine system and neural development / O. Filogamo, P. C. Marchisio // *Neurosci. Res.* 1971. Vol. 4. P. 389–398.
2. Гурин, В. Н. Центральные механизмы терморегуляции / В. Н. Гурин // Минск: Беларусь, 1980. 130 с.
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. 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, № 17. P. 7797–7801.
5. Dawson, T. M. Gases as biological messengers: Nitric oxide and carbon monoxide in the brain / T. M. Dawson, S. H. Snyder // *J. Neurosci.* 1994. Vol. 14. P. 5147–5159.
6. Taylor, W. F. A role for nitric oxide in active thermoregulatory vasodilation / W. F. Taylor, V. S. Bishop // *Am. J. Physiol.* 1993. Vol. 264. P. 1355–1359.
7. Amir, S. NG-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.
8. Scherer-Singler, U. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry / U. Scherer-Singler, S. R. Vincent, H. Kimura, E. G. McGeer // *J. Neurosci. Methods.* 1983. Vol. 9, № 3. P. 229–234.
9. Hope, B. T. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase / B. T. Hope, S. R. Vincent // *J. Histochem. Cytochem.* 1989. Vol. 37. P. 653–661.
10. Лупа, X. Основы гистохимии / X. Лупа. М.: Мир, 1980. 343 с.
11. Kuenzel, W. A Steriotaxis atlas of the brain of the chick (*Gallus domesticus*) / W. Kuenzel, M. Masson // University Press, Baltimore and London, 1988. 243 с.
12. Дунай, В. И. Изменения в распределении нейронов, содержащих НАДФН-диафоруазу/НО-синтазу, в гипоталамусе и продолговатом мозге у птиц / В. И. Дунай // *Здоровье и окружающая среда: сб. науч. тр. / Респ. науч.-практ. центр гигиены; гл. ред. С. М. Соколов. Минск, 2007. Вып. 10. С. 1061–1067.*