

УДК 612.55:577.334.61

Становление центральных NO-ергических структур в эмбриогенезе птиц

В.И. Дунай

Белорусский государственный университет

Экспериментальные данные, полученные в последние годы, свидетельствуют об участии NO в регуляции различных физиологических функций [1–3]. В настоящее время известно о том, что NO может являться одним из важнейших факторов, участвующих в развитии структуры и функции центральной нервной системы, являясь эффекторной молекулой, вызывающей гибель определенных клеточных структур, а также играя важную роль в механизмах роста нервных окончаний и формирования синаптических контактов [4]. Получены доказательства участия NO в центральных механизмах терморегуляции при перегревании и экспериментальной лихорадке [5].

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 у гомойотермных организмов в эмбриогенезе остается совершенно не изучено.

Адрес для корреспонденции: 220000, г. Минск, пр-т Рокоссовского, 17, кв. 154, e-mail: dunay_wal@bk.ru
– Дунай В.И.

Целью данной работы явилось изучение становления NO-ергических систем гипоталамуса эмбрионов утки как представителя класса птиц в период эмбрионального развития.

Материал и методы. В экспериментальной части работы использовались эмбрионы утки в возрасте 20, 23, 28 и 33 дней.

Специальными исследованиями было убедительно доказано, что нейронная синтаза NO (CNO) является никотинамидадениндинуклеотидфосфат-диафоразой [6]. 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 [6], 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.* [7], в модификации Норе и Vincent [8].

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, pH7,4). Участки мозга шесть раз по 30 минут отмывали на холоде с использованием 0,1 М раствора Трис-НСI (pH 8,0) и инкубировали в 10% и 25% растворах сахарозы на Трис-НСI (0,1М, pH8,0) 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-НСI (pH8.0) в течение 5 мин. 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 (0,1мМ) на протяжении 1–2 ч при 22°C 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.

Результаты и их обсуждение. Опыты показали, что в период между 20-м и 33-м днем эмбрионального развития в гипоталамусе уток происходят изменения в распределении НАДФН-д/СНО-позитивных нейронов (табл.).

Таблица

Распределение нервных клеток, содержащих НАДФН-д/СНО, в структурах гипоталамуса у эмбрионов уток в разные сроки пренатального онтогенеза

№ п/п	Структура	20-й день	23-й день	28-й день	33-й день
1.	n. preopticus	–	–	–	–
2.	n. paraventricularis	–	–	–	–
3.	n. anterior hypothalami	–	+	+	+
4.	Regio lateralis hypothalami	–	+	+	+
5.	n. ventromedialis hypothalami	–	–	–	–

Примечание. «+» – структура содержит НАДФН-д/СНО – позитивные нервные клетки; «–» – структура не содержит НАДФН-д/СНО – позитивные нервные клетки.

При изучении серийных срезов гипоталамуса эмбрионов уток в возрасте 20-ти дней не обнаружены НАДФН-д/СНО-позитивные нейроны в переднем гипоталамусе (рис. 1).

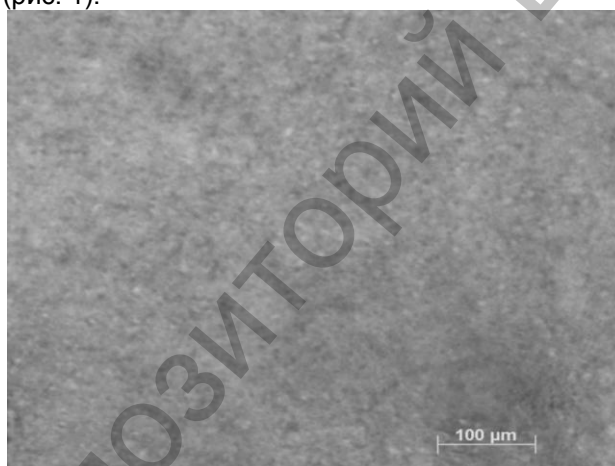


Рис. 1. Передний гипоталамус 20-дневного эмбриона утки, окрашенный на НАДФН-д/СНО. Микрофото (× 40).

Гипоталамическая область 23-, 28- и 33-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. 2). 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, смещаясь к одному из полюсов клетки. В некоторых нейронах цитоплазма имеет вид узкого ободка серповидной

формы, окружающего 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.

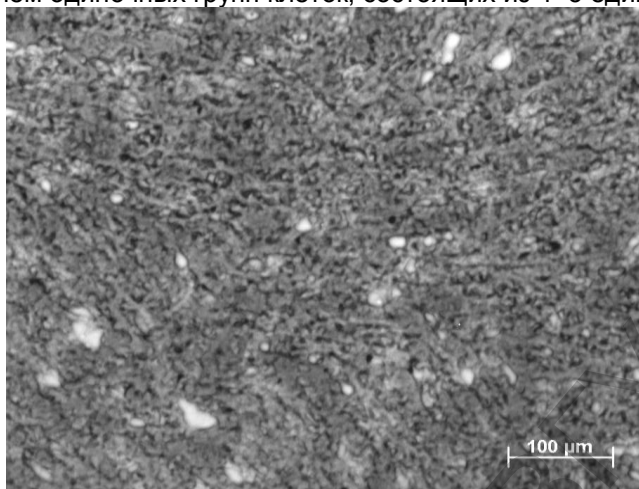


Рис. 2. НАДФН-д-позитивные нервные клетки в переднем гипоталамусе 23-дневного эмбриона утки. Микрофото (× 40).

При изучении серийных срезов переднего гипоталамуса эмбрионов уток в возрасте 28-ми дней, наблюдается увеличение степени дифференцировки нервных клеток. Нейроны начинают группироваться в ядра (рис. 3). 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.

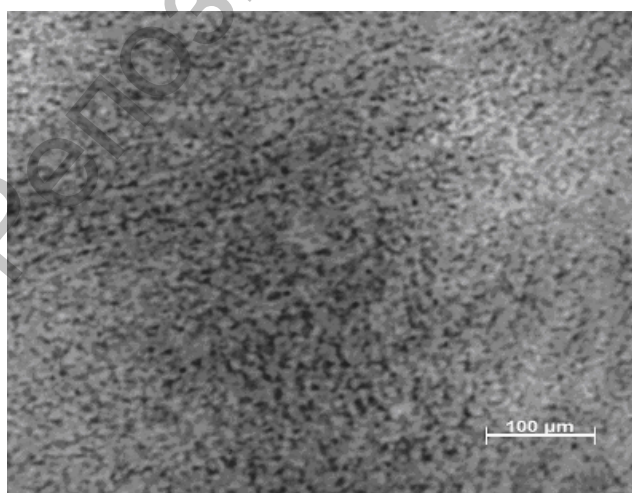


Рис. 3. НАДФН-д-позитивные нервные клетки в переднем гипоталамусе 28-дневного эмбриона утки. Микрофото (× 40).

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 прилежат друг к другу и к нейролемме (рис. 4).



Рис. 4. Передний гипоталамус 15-дневного эмбриона утки. Микрофото (× 12500).

У 21-дневного эмбриона отмечается увеличение плотности расположения цистерн гранулярной эндоплазматической сети и количества митохондрий в нейроплазме (рис. 5).

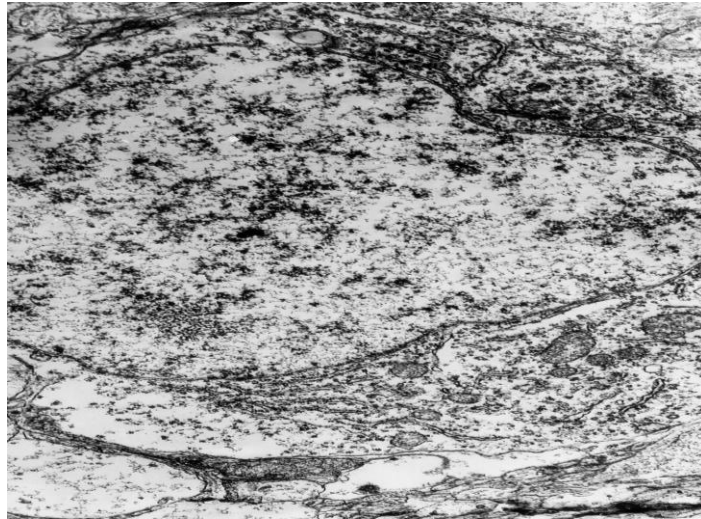


Рис. 5. Передний гипоталамус 21-дневного эмбриона утки.
Микрофото ($\times 18000$).

У 33-дневных эмбрионов наблюдается крупное ядро, большое количество митохондрий и рибосом (рис. 6).

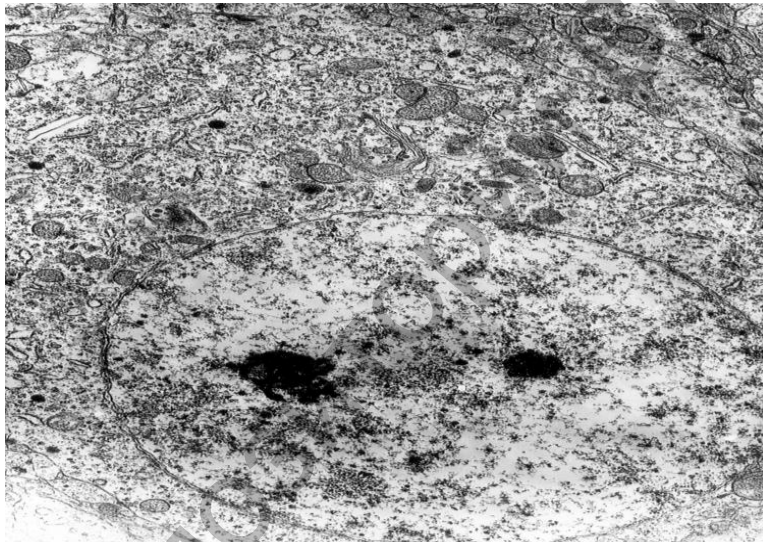


Рис. 6. Передний гипоталамус 33-дневного эмбриона утки.
Микрофото ($\times 24500$).

Заключение. Показано, что гипоталамическая область 23-дневных эмбрионов уток содержит НАДФН-д/СНО-позитивные нейроны. Принимая во внимание доказательства участия NO в центральных механизмах терморегуляции при перегревании, следует учитывать роль NO-зависимых механизмов в эмбриональном онтогенезе на терморегуляцию при действии холода, тепла и с целью корреляции сроков эмбрионального развития.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Amir, S.** N^G-Monomethyl-L-arginine coinjection 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, № 17. – P. 7797–7801.
3. **Kapas, L.** Inhibition of nitric oxide synthesis suppresses sleep in rabbits / L. Kapas, M. Shibata, J.M. Krueger // *Am. J. Physiol.* – 1994. – Vol. 266. – P. 151–157.
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. **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.
6. **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, № 2. – P. 155–160.
7. **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, № 3. – P. 229–234.
8. **Hope, B.T.** Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase / B.T. Hope, S.R. Vincent // *J. Histochem. Cytochem.* – 1989. – Vol. 37. – P. 653–661.
9. **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, № 1. – P. 61–64.

S U M M A R Y

The aim of this work was to study the formation of NO-ergic systems of the frontal hypothalamus of duck embryos as the representative of homoiothermic birds in the period of embryo development and the influence of temperature and blockade of NO-dependent mechanisms on this process. The experiments showed that the subthalamic area of 23-day-old duck embryos contains NADPH-d/CNO – positive neurons. It was also found out that 20-day-old embryos incubated at a low temperature had CNO activity. The results of the experiments have proved that one-day-old ducks injected by NO-synthase on the 28th day of embryonic development had less ferment activity. This fact should be taken into account for the further investigation of the influence of NO-dependent mechanisms in embryonic ontogenesis on thermoregulation under the influence of warmth, cold with the aim of embryonic development correlation.