

РАЗВИТИЕ NO-ЕРГИЧЕСКИХ СТРУКТУР СТВОЛА ГОЛОВНОГО МОЗГА В ОНТОГЕНЕЗЕ ГНЕЗДОВЫХ И ВЫВОДКОВЫХ ПТИЦ

Дунай В.И. // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2007. – № 3 (19). – С. 45-47.

Аннотация: Изучено созревание NO-ергических структур ствола головного мозга в раннем постнатальном онтогенезе у голубей, как представителей гнездовых птиц и 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, а у голубей к двадцатому дню.

В период пренатального и раннего постнатального онтогенеза животные в значительной степени подвержены патогенетическому влиянию внешней среды, которая сначала опосредованно, а после рождения непосредственно воздействует на молодой организм. В пренатальном и в раннем постнатальном онтогенезе происходит становление функциональных систем организма, обеспечивающих гомеостаз, как неперемное условие независимого существования. С другой стороны, незрелость ряда систем и, в частности, таких, как система терморегуляции и иммунная система делает молодой организм чрезвычайно чувствительным к экстремальным факторам внешней среды. Большое научное и научно-практическое значение имеют исследования механизмов и процессов, которые в онтогенезе обеспечивают становление системных функций. Исследования такого рода расширяют существующие представления об онтогенетическом развитии, а также будут способствовать поиску средств и подходов для минимизации последствий вредного влияния внешней среды на растущий организм.

Патогенетические факторы внешней среды, оказывающие влияние на созревание системных функций в онтогенезе, включают в себя химические соединения, которые могут попадать в организм с пищей. Такие соединения, как нитраты и нитриты, попадая в организм, могут превращаться в монооксид азота (NO), который, являясь эндогенно-синтезируемой молекулой, обладает чрезвычайно широким спектром биологических функций. NO-синтезирующие нейроны широко распространены в ЦНС млекопитающих [2]. Установлено участие NO в регуляции различных физиологических функций [1, 6] и в развитии структуры и функции центральной нервной системы [4]. Получены доказательства вовлечения NO в центральные механизмы 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 неизученным. Принимая во внимание участие

NO в терморегуляции, представляется важным изучить становление NO-ергических систем ствола головного мозга у гнездовых и выводковых птиц, как представителей гомойотермных животных.

Целью данной работы явилось изучение созревания NO-ергических структур ствола головного мозга в раннем постнатальном онтогенезе у голубей, как представителей гнездовых птиц и у цыплят, как представителей выводковых птиц.

Материалы и методы исследования

Эксперименты выполнены на 32 голубях и 40 цыплятах. Первая группа – животные 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.

В настоящее время доказано, что нейронная синтаза NO (CNO) является никотинамидаденин-ди-нуклеотидфосфат-диафоразой [8]. Установлено, что при фиксации с использованием параформаль-дегида инактивируются все НАДФН-зависимые ферменты-окислители, за исключением CNO [8]. 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 продолговатый мозг 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°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-НСl (рН 8.0) в течение 5 мин. Гистохимическая процедура заключалась в инкубации срезов в растворе 0,1 М Трис-НСl (рН 8,0), содержащем НАДФН(1 мМ), нитросинийтетразолий(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-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 (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

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

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 венгромедиальном 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.

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.

Гипоталамическая область трехдневных цыплят содержит НАДФН-д/СМО-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/СНО-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/СНО-позитивных нейронов гипоталамической области, характерные для взрослого организма.

Так, у десятидневных цыплят выявляются НАДФН-д/СНО-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/СМО-позитивные нейроны, появляются в перивентрикулярном ядре. Обнаружено, что гипоталамус десятидневного цыпленка не содержит НАДФН-д/СНО-позитивных клеток в супраоптическом ядре.

Крупные, интенсивно окрашенные НАДФН-д/СНО-позитивные нейроны появляются в супраоптическом ядре в период между десятым и двадцатым днем после вылупления. Таким образом, не существует различий в распределении НАДФН-д/СНО-позитивных нейронов в гипоталамусе 20-дневного цыпленка по сравнению со взрослыми животными. Полученные данные свидетельствуют о том, что, по-видимому, к десятому дню после рождения происходит окончательное структурное формирование NO-зависимых структур нервных центров гипоталамуса цыплят.

При изучении серийных срезов продолговатого мозга, окрашенных на НАДФН-д, у цыплят, в разные сроки после рождения, НАДФН-д/СНО-позитивные нервные клетки обнаружены во всех изучаемых структурах. По-видимому, еще до рождения завершается формирование NO-зависимых структур нервных центров продолговатого мозга, структурное и функциональное развитие должно обеспечивать в первые дни жизни важнейшие вегетативные функции (дыхание, кровообращение).

При изучении серийных срезов мозга голубей установлено, что в первые дни после рождения в гипоталамической области происходят значительные изменения в распределении нервных клеток, содержащих НАДФН-диафоруазу/НОС. Так, между десятым и двадцатым днем жизни голубей формируются основные черты в распределении нервных клеток, содержащих NO-синтазу, характерных для взрослого организма (табл. 2). Установлено также, что значительных изменений в распределении NO-синтезирующих нервных клеток в продолговатом мозге не происходит. 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.

Таблица 2. Распределение нервных клеток, содержащих НАДФН-диафоруза/NOC, в структурах гипоталамуса у голубей 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.	Periventricular nucleus	–	–	–	+
6.	Lateral hypothalamic area	+	+	+	+
7.	Medial mammillary nucleus	–	–	–	+
8.	Lateral mammillary nucleus	+	+	+	+
9.	Supramammillary nucleus	+	+	+	+

«+» – структура содержит НАДФН-диафоруза/NOC-позитивные нервные клетки;

«-» – структура не содержит НАДФН- диафоруза/NOC-позитивные нервные клетки.

Обсуждение результатов

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 терморегуляции.

Установлено, что у цыплят к десятому дню постнатального развития формируются основные черты в распределении предполагаемых NO-синтезирующих нервных клеток, характерные для взрослого организма, а у голубей к двадцатому дню.

Можно предполагать, что становление NO-зависимых систем в гипоталамусе у цыплят и голубей, по-видимому, играет важную роль в развитии системы терморегуляции, поскольку более раннее созревание NO-зависимых систем позволяет цыплятам сразу после рождения вести активный образ жизни, а голубям необходим период созревания.

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

Литература

1. Amir S De Blasio E., English A. M. N^G-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. N17. - 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 fixation//*Neurosci.Lett.* - 1993. - Vol. 155, N.I. - 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.