

УДК 598.2:611.81

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

В.И. Дунай

УО «Белорусский государственный университет»

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. 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.

Ключевые слова: онтогенез, NO-синтеза, гипоталамус.

The aim of the paper is to study the maturation of NO-ergic structures of the brainstem in early postnatal ontogeny in pigeons as representatives of nesting birds and in chickens as representatives of breeding birds. It has been found out that in chickens the basic features in the distribution of probable NO-synthesizing nerve cells are formed by the tenth day of the postnatal development. These features are typical of the adult organism. As to pigeons, the same is true for them by the twentieth day.

Keywords: ontogenesis, NO-synthesis, hypothalamus.

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]. Полу-

чены 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-дифосфат-диафоразой [8]. Установлено, что при фиксации с использованием параформальдегида 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 (0,1M, pH7,4). Участки мозга шесть раз по 30 мин. отмывали на холоде с использованием 0,1 M раствора Трис-НСl (pH 8,0) и инкубировали в 10 % и 25 % растворах сахарозы на Трис-НСl (0,1M, 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 M растворе Трис-НСl (pH 8,0) в течение 5 мин. Гистохимическая процедура заключалась в инкубации срезов в растворе 0,1 M Трис-НСl (pH 8,0), содержащем НАДФН (1 мМ), нитросиний тетразолий (0,5 мМ), Тритон X-100 (0,3 %) и дикумарол (0,1 мМ) 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 супрамаммилярном 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.

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 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/CNO-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-диафорузу/NOС. 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.

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

Таблица 2. Распределение нервных клеток, содержащих НАДФН-диафорузу/ NOС, 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-диафорузу/NOС-позитивные нервные клетки;

«-» - структура не содержит НАДФН-диафорузу/NOС-позитивные нервные клетки.

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, 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.

Поступила 29.03.07