

УДК 598.2:611.814.1

## РОЛЬ ТЕМПЕРАТУРНОГО ФАКТОРА В ЭМБРИОНАЛЬНОМ РАЗВИТИИ NO-ЕРГИЧЕСКИХ СТРУКТУР ПЕРЕДНЕГО ГИПОТАЛАМУСА У ГОМОИОТЕРМНЫХ ОРГАНИЗМОВ

В.И. Дунай

УО «Белорусский государственный университет»



ДУНАЙ Валерий Иванович -  
заведующий кафедрой  
психофизиологии  
гуманитарного факультета  
Белгосуниверситета,  
кандидат биологических  
наук.  
[e-mail: dunay\\_wal@bk.ru](mailto:dunay_wal@bk.ru)

Целью работы было изучение становления NO-ергических структур переднего гипоталамуса эмбрионов утки как представителя гомотермных птиц в период эмбрионального развития. Эксперименты показали, что субталамическая область 23-дневного эмбриона утки имела НАДФН-д-содержащие нейроны. Также было установлено, что 20-дневный эмбрион, инкубированный при низкой температуре, обладал CNO активностью. Этот факт следует учитывать при дальнейшем исследовании влияния NO-зависимых механизмов на терморегуляцию в эмбриональном онтогенезе под воздействием тепла, холода с целью корреляции сроков эмбрионального развития.

**Ключевые слова:** онтогенез, NO-синтез, гипоталамус.

The aim of this work was the study of the formation of NO-ergic structures of the frontal hypothalamus of duck embryos as the representative of homoiothermic birds within the period of embryo development in this process. The experiments showed that the subthalamic area of 23-day-old duck embryos contained NADPH-d/CNO-positive neurons. It was also found out that 20-day-old embryos incubated at low temperature had CNO activity. This fact should be taken into account for the further investigation of influence of NO-dependent mechanisms in embryonic ontogenesis on thermoregulation under the influence of warmth, cold with the aim of correlation of embryonic development.

**Keywords:** ontogenesis, NO-synthesis, hypothalamus.

Монооксид азота (NO) принимает участие в регуляции различных физиологических функций [1, 2, 6]. Имеются данные 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 фактического материала, свидетельствующего об участии NO в регуляции различных физиологических функций, а также в развитии центральной нервной системы, становление центральных NO-ергических структур в эмбриональном периоде остается неизученным.

Целью данной работы явилось изучение становления NO-ергических структур переднего гипоталамуса эмбрионов утки в пренатальном онтогенезе, а также влияния температурного фактора на этот процесс.

### Материалы и методы исследования.

В экспериментальной части работы использовались эмбрионы утки в возрасте 20, 23, 28 и 33

дней. Группа животных № 1 – контрольная, эмбрионы уток инкубировались при температуре 37°C; 2-я группа животных – эмбрионы уток инкубировались при температуре 39°C в течение 3-х часов; 3-я группа животных – эмбрионы уток инкубировались при температуре 34°C в течение 3-х часов.

Специальными исследованиями было убедительно доказано, что нейронная синтаза NO (CNO) является никотинамидаденин-нуклеотидфосфатдиафоразой [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, что при фиксации с использованием параформальдегида инактивируются все НАДФН-зависимые ферменты-окислители, за исключением CNO [8]. Таким образом, при условии фикса-

ции 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 эмбрионов целиком извлекали головной мозг. Отделяли гипоталамус и дополнительно фиксировали согласно рекомендации Matsumoto *et al.* 90 минут в 4 % параформальдегиде на фосфатном буфере (0,1M, pH7.4) [7]. Участки мозга шесть раз по 30 мин. отмывали на холоде с использованием 0,1 M раствора Трис-НСI (pH 8,0) и инкубировали в 10 % и 25 % растворах сахарозы на Трис-НСI (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-НСI (pH8,0) в течение 5 мин. Гистохимическая процедура заключалась в инкубации срезов в растворе 0,1 M Трис-НСI (pH8,0), 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, закрывали 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

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

При изучении серийных срезов гипоталамуса эмбрионов уток в возрасте 20 дней не обнаружены

**Таблица.** Распределение нервных клеток, содержащих НАДФН-д/CNO, в структурах гипоталамуса у эмбрионов уток в разные сроки пренатального онтогенеза

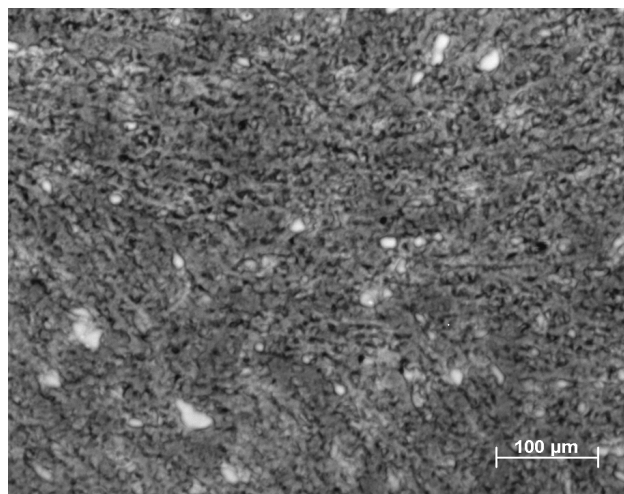
№ п/п	Структура	20-й день	23-й день	28-й день	33-й день
1	n. preopticus	-	-	-	-
2	n. paraventricularis	-	-	-	-
3	n. anterior hypothalami	-	+	+	+
4	Regio lateralis hypothalami	-	+	+	+
5	n. ventromedialis hypothalami	-	-	-	-

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

НАДФН-д/CNO – позитивные нейроны в паравентрикулярном ядре, латеральной гипоталамической области, в медиальной преоптической области, в переднем гипоталамусе, вентромедиальном ядре.

Гипоталамическая область 23, 28 и 33-дневных эмбрионов уток содержит НАДФН-д/CNO-позитивные нейроны в переднем гипоталамусе, латеральной гипоталамической области.

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. 1). Форма нейронов округлая, овальная, веретенообразная, а также приближающаяся к треугольной. Крупное ядро, имеющее округлую 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. 1.** НАДФН-д-позитивные нервные клетки в переднем гипоталамусе 23-дневного эмбриона утки. Микрофото (x 40)

При изучении серийных срезов переднего гипоталамуса эмбрионов уток в возрасте 28 дней наблюдается увеличение степени дифференцировки нервных клеток. Нейроны начинают группироваться в ядра. 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.

При изучении серийных срезов мозга 20, 23, 28 и 33-дневных эмбрионов утки, которые инкубировались в течение 3-х часов, непосредственно перед извлечением мозга при температуре 39°C не обнаружены изменения в распределении НАДФН-д/СНО-положительных нейронов в переднем гипоталамусе. Однако наблюдалось выявление меньшего числа нейронов, которые располагаются диффузно по сравнению с контролем. Также уменьшается интенсивность окрашивания нервных клеток из-за более низкой плотности расположения гранул фермента в цитоплазме нейронов за счет уменьшения активности фермента.

При изучении влияния переохлаждения установлено, что у эмбрионов, которые инкубировались при температуре 34°C, НАДФН-д/СНО – положительные нейроны обнаружены в переднем гипоталамусе в возрасте 20 дней (рис. 2), а также наблюдалось незначительное увеличение активности фермента в нервных клетках ядер переднего гипоталамуса у 23, 28 и 33-дневных эмбрионов.

Таким образом, опыты показали, что гипоталамическая область 23-дневных эмбрионов уток содержит НАДФН-д/СНО – положительные нейроны. Также установлено, что у 20-дневных эмбрионов, которые инкубировались при низких температурах, наблюдалась активация СНО. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что низкие температуры стимулируют активность НАДФН-д/СНО – положительных нейронов и NO может выступать сигнальной молекулой охлаждения эмбрионов для взрослых животных. Данный факт следует учитывать для дальнейшего изучения роли NO-зависимых механизмов в эмбриональном онтогенезе на терморегуляцию при действии холода, теп-

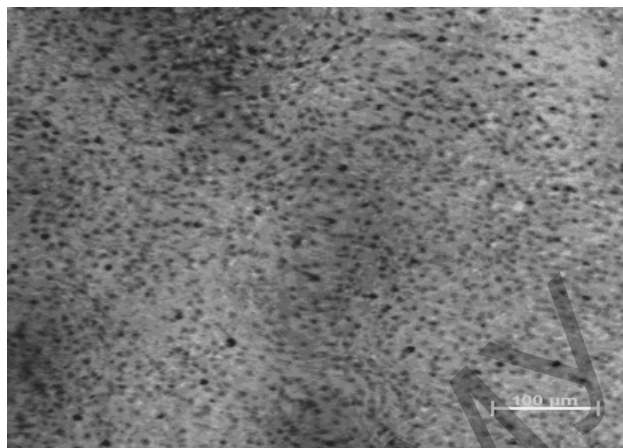


Рис. 2. НАДФН-д-положительные нервные клетки в переднем гипоталамусе 20-дневных эмбрионов утки, которые инкубировались в течение 3-х часов, непосредственно перед извлечением мозга при температуре 34°C. Микрофото (x 40)

ла и с целью корреляции сроков эмбрионального развития.

#### Литература

- 1 Amir S., De Blasio E., English A. M. N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-arginine co-injection attenuates the thermogenic and hyperthermic effects of E<sub>2</sub> 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 22.03.07