

ВЛИЯНИЕ ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА НА ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ NO-СИНТАЗЫ НЕЙРОНОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА В ОНТОГЕНЕЗЕ ПТИЦ

*Международный государственный экологический университет
им. А. Д. Сахарова, Минск, Республика Беларусь*

Начиная с момента открытия биологической роли оксида азота (NO), произошел существенный прорыв в понимании протекания различных физиологических и патофизиологических процессов, а так же доказана роль монооксида азота в регуляции практически всех систем организма. В статье представлены результаты исследования активности нейрональной NO-синтазы под влиянием инфекционного агента, на примере вируса болезни Ньюкасла, в период эмбрионального развития кур. При использовании биохимического метода определения стабильных метаболитов оксида азота и «пиксельного» метода определения оптической плотности продукта гистохимической реакции, было установлено угнетающее действие вируса болезни Ньюкасла на активность NO-синтазы нейронов головного мозга в онтогенезе птиц.

Ключевые слова: *NO-синтаза, пренатальный онтогенез, монооксид азота, болезнь Ньюкасла.*

V. I. Dunai, P. V. Storchak

INFLUENCE OF NEWCASTLE DISEASE VIRUSES UPON NO-SYNTASE ACTIVITY OF BRAIN NEURONS IN THE ONTOGENESIS OF BIRDS

From since the opening biological role of nitric oxide (NO), there was a significant breakthrough in understanding the flow of various physiological and pathophysiological processes, as well as proved role in the regulation of nitrogen monoxide almost all body systems. Nitrogen monoxide is one

□ Оригинальные научные публикации

of the essential factors that ensure the development of the nervous system. The article presents the results of research of activity neuronal NO-synthase under the influence of the infectious agent, on an example of Newcastle disease viruses influence in the period embryonic development of chickens. Biochemical method for the determination of stable metabolites of nitric oxide and «pixel» method of determining the optical density of the product histochemical reaction showed that Newcastle disease virus's infection of bird's embryos has led to reduced NO-synthase activity.

Key words: NO синтаза, prenatal ontogenesis, nitrogen monoxide, illness of Newcastle.

В нервной системе монооксид азота (NO) имеет большое значение, как в нормальных физиологических условиях, так и при различной патологии. Источниками NO в ЦНС являются нейроны, нейроглиальные клетки – астроциты и клетки микроглии и эндотелий кровеносных сосудов.

В организме животных монооксид азота образуется в результате окисления аминокислоты L-аргинина с одновременным синтезом цитруллинa под влиянием фермента NO-синтазы. В настоящее время известны 3 изоформы NO-синтазы: а) макрофагальная NO-синтаза; б) эндотелиальная NO-синтаза; в) нейрональная NO-синтаза. Среди вышеперечисленных изоформ данного фермента, нейрональная NO-синтаза является наименее изученной. Существует целый ряд предположений о её значении и функциях в физиологических состояниях и при патологических процессах [1].

Монооксид азота является одним из существенных факторов, обеспечивающих развитие нервной системы, а так же выполняет важную функцию в механизмах роста нервных окончаний и в формировании синаптических контактов. NO принимает участие в межнейронных связях в качестве нейромедиатора, подтверждена роль монооксида азота в формировании межнейронных синаптических взаимосвязей во время развития нервной системы [2].

Цель данного исследования – выявить влияние вируса болезни Ньюкасла на изменение активности NO-синтазы нейронов головного мозга в онтогенезе птиц.

Материалы и методы

Для исследования использовались эмбрионы кур. 1-я группа в количестве 24 эмбриона – контрольная, 2-я в количестве 28 эмбрионов – экспериментальная. Заражение экспериментальных эмбрионов осуществлялось на восьмые сутки эмбрионального развития, согласно имеющейся методике [3].

На 18 сутки эмбрионального развития у эмбрионов контрольной группы, и группы подвергшейся заражению вирусом болезни Ньюкасла был извлечён головной мозг. Далее, исследуемые образцы подверглись биохимическому методу опре-

деления стабильных метаболитов оксида азота, основанному на определении нитрата с помощью реактива Грисса [4], а также гистохимическому определению ADPH-диафоразы для последующего определения активности NO-синтазы нейронов головного мозга с помощью «пиксельного метода» [5–7].

Для биохимического исследования образцы гомогенизировали с последующим центрифугированием при 10000 об/мин в течение 30 минут. Далее к 0,5 мл супернатанта добавили двукратный избыток по объему 96° этанола, для депротеинизации. Образовавшийся осадок денатурата отделяли центрифугированием при 3000 оборотов в минуту, в течении 15 минут. К 0,7 мл супернатанта добавляли последовательно компоненты реактива Грисса: 0,7 мл 2,0% раствора сульфаниламида и 0,7 мл 0,1% раствора N-(1-нафтил)-этилендиамина. Пробы помещали на водяную баню на 30 минут при температуре 37 °С. После инкубации охлаждения до комнатной температуры измеряли оптическую плотность при 540 нм. Для каждого образца обязательно проводили определение фоновых значений оптической плотности проб без биологического материала [8].

Для идентификации нейронов, содержащих нейрональную NO-синтазу был использован гистохимический метод исследования, разработанный U. Scherer-Singler [6] в модификации В. Норе и S. Vincent [7]. Извлеченный головной мозг фиксировали 1 час при температуре 4 °С в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на 0,1 MNa-фосфатном буфере (pH 7,4), после чего промывали в 15% растворе сахарозы в течение 2 суток с 7–8-кратной сменой раствора. В дальнейшем головной мозг фрагментировали. Полученные фрагменты замораживали в криостате, где изготавливали срезы толщиной 20 мкм. Высушенные срезы помещали в инкубационную среду и термостатировали 1 час при 37 °С. После инкубации срезы 3-кратно промывали в дистиллированной воде, обезвоживали в спиртах и заключали в бальзам.

Для определения изменения активности NO-синтазы в нейронах головного мозга, был использован «пиксельный метод» [5]. В его основе – подсчет стандартными компьютерными програм-

мами Adobe Photoshop и Mathcad в автоматическом режиме суммы пикселей, образующих данное изображение в выделенном участке препарата. Для вычисления значений оптической плотности продукта гистохимической реакции в нейронах оцифрованное изображение препарата переносится на экран компьютера и вводится в окно программы Adobe Photoshop. Затем область фона выделяется и удаляется, а цвета инвертируются, что делает возможным автоматический подсчет суммы яркостей пикселей не только в отдельных, обведенных «световым пером» нейронах, но и автоматизированное вычисление этого показателя во всех клетках выделенного участка препарата. Кроме того, после инверсии цвета в этой программе нейроны со светлой окраской имеют более привычные для нашего восприятия меньшие значения интенсивности, а с более темной – большие, т. е. программа присваивает белому цвету – значение 1 из 256 градаций интенсивности. После пересохранения документа из формата JPEG в формат BMP изображение автоматически перемещается в программу Mathcad с помощью встроенной функции READBMP. В программе Mathcad с использованием функции imhist происходит автоматическое построение матрицы размерностью $m \times n$, где m – количество пикселей в столбце, n – количество пикселей в строке. Каждому пикселю в такой матрице соответствует свой номер яркости. Данные, приведенные в матрице, используются для вычисления суммарной яркости пикселей в выявленных нами нейронах.

Для вычисления суммарной яркости пикселей (I) используется следующая формула:

$$I = j_0 \times 0 + j_1 \times 1 + \dots + j_{255} \times 255 = \sum_{j=0}^{255} j \times j,$$

где j_i – количество пикселей с определенной яркостью [5, 9].

Полученное значение I подставляем в формулу для вычисления СПОП (средний показатель оптической плотности продукта реакции) во всех нейронах выделенного «световым пером» участка препарата:

$$\text{СПОП} = rT^2,$$

где I – суммарная яркость пикселей в выявленных нейронах, N – количество пикселей в нейронах исследуемой области, r – разрешение документа (количество пикселей в см^2), T – увеличение, при котором производилась съемка [10].

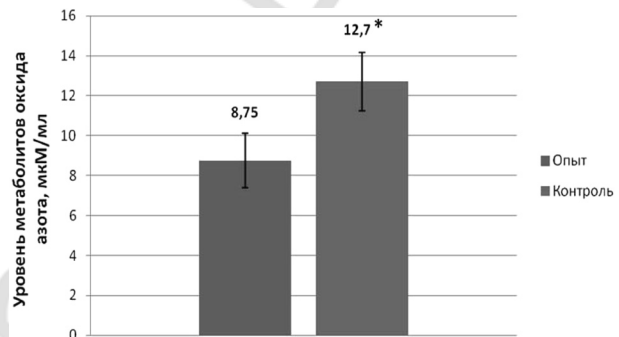
Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ Statistika 6.0, а все промежуточные расчеты выполнялись при помощи программы Microsoft Office Excel 2007.

Результаты и обсуждение

В ходе проведенного исследования установлено снижение уровня стабильных метаболитов оксида азота головного мозга эмбрионов кур, инфицированных вирусом болезни Ньюкасла ($8,75 \pm 1,36$), по сравнению с контрольной группой ($12,7 \pm 1,47$). Различия показателей в контрольной и исследуемой группах статистически значимы ($p < 0,05$) (рисунок 1).

Таким образом, инфицирование эмбрионов кур вирусом болезни Ньюкасла приводит к снижению уровня стабильных метаболитов оксида азота головного мозга на 37%.

Гистохимический анализ проводился на 18-дневных эмбрионах кур. Фотографии (рисунок 2, 3) гистологических препаратов в дальнейшем использовались для определения среднего показателя



Опыт – эмбрионы кур, инкубированные в присутствии вируса болезни Ньюкасла.

Контроль – эмбрионы кур, инкубированные без воздействия инфекционного агента.

Примечание: * – различия достоверны по отношению к контролю: $p < 0,05$.

Рисунок 1. Уровень метаболитов монооксида азота (мкМ/мл) в гомогенате головного мозга 18-дневных эмбрионов кур, инфицированных вирусом болезни Ньюкасла

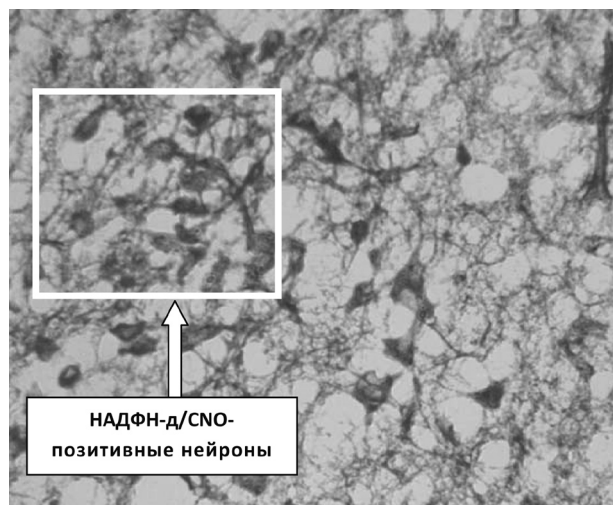


Рисунок 2. НАДФН-д-позитивные нервные клетки в переднем гипоталамусе 18-дневных эмбрионов кур. Микрофото ($\times 400$)

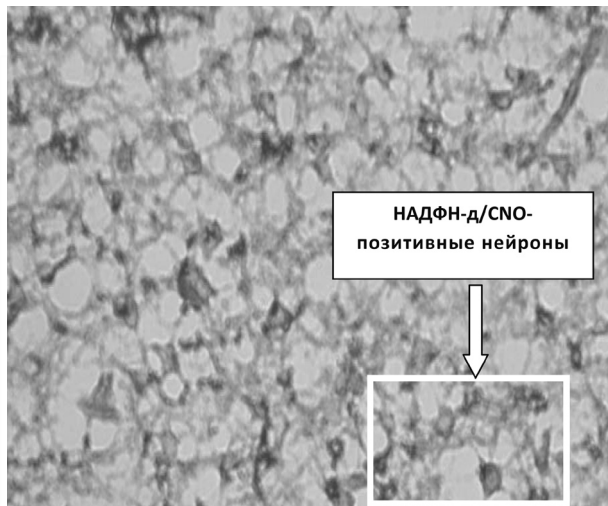
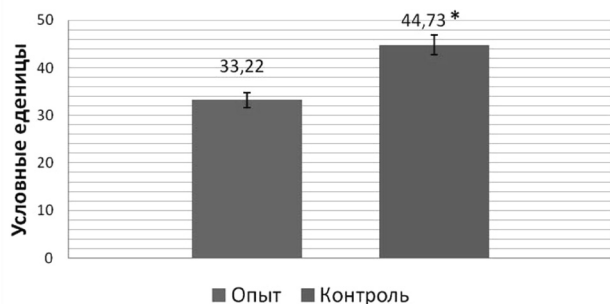


Рисунок 3. НАДФН-д-позитивные нервные клетки в переднем гипоталамусе 18-дневных эмбрионов кур, которые на 8-день инфицировали вирусом болезни Ньюкасла. Микрофото (×400)



Опыт – эмбрионы кур, инкубированные в присутствии вируса болезни Ньюкасла.
Контроль – эмбрионы кур, инкубированные в условиях без воздействия инфекционного агента.
Примечание: * – различия достоверны по отношению к контролю: $p < 0,05$.

Рисунок 4. Изменение среднего показателя оптической плотности продукта реакции определения NO-синтазы 18-дневных эмбрионов кур, инфицированных вирусом болезни Ньюкасла

оптической плотности продукта реакции, при помощи «Пиксельного метода».

«Пиксельный метод» определения активности NO-синтазы в нейронах головного мозга 18-дневных эмбрионов кур, инфицированных вирусом болезни Ньюкасла

Выявлено что, средний показатель оптической плотности продукта реакции в контрольной группе составил $44,73 \pm 2,7$, что достоверно больше ($p < 0,05$), чем в опытной группе – $33,22 \pm 1,84$. Полученные данные свидетельствует о снижении активности NO-синтазы внутри отдельно взятых нейронов в группе подверженной заражению вирусом болезни Ньюкасла (рисунок 4).

Выводы

Учитывая представленные результаты можно сделать следующие выводы:

1. Инфицирование эмбрионов кур вирусом болезни Ньюкасла приводит к снижению уровня стабильных метаболитов оксида азота головного мозга на 37%.

2. Инфицирование эмбрионов кур вирусом болезни Ньюкасла приводит к снижению среднего показателя оптической плотности продукта реакции на 25,7%, что свидетельствует об угнетающем действии инфекционного агента на развитие NO-ергической системы.

Литература

1. Зеленин, К. Н. Оксид азота (II): Новые возможности давно известной молекулы // Соросовский Образовательный Журнал. – 1997. – № 10. – С. 105–110.
2. Дунай, В. И. Роль температурного фактора в эмбриональном развитии NO-ергических структур переднего гипоталамуса у гомеотермных организмов / В. И. Дунай // Журн. Гродн. гос. мед. ун-та. – 2007. – № 3. – С. 42–44.
3. Карпуть, И. М. Профилактика иммунных дефицитов и желудочно-кишечных болезней у цыплят-бройлеров / И. М. Карпуть, М. П. Бабина // Ветеринария. – 2000. – № 11. – С. 41–44.
4. Метельская, В. А. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке / В. А. Метельская, Н. Г. Гуманова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – № 6. – С. 15–18.
5. Черток, В. М., Афанасьев А. А., Коцюба А. Е. Применение автоматизированной системы анализа изображений Allegro-MS для морфометрических исследований // Морфология. – 2003. – № 4. – С. 88–92.
6. Scherer-Singler, U., Vincent, S. R., Kimura, H., McGeer, E. G. 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.
7. Hope, B. T., Vincent, S. R. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase / B. T. Hope [et al.] // J. Histochem. Cytochem. – 1989. – Vol. 37. – P 653–661.
8. Мажитова, М. В. Спектрофотометрическое определение уровня метаболитов монооксида азота в плазме крови и ткани мозга белых крыс / М. В. Мажитова // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 3; URL: www.science-education.ru/97-4655.
9. Ирьянов, Ю. М., Силантьева Т. А., Горбач Е. В. Обработка и анализ изображений в гистологических исследованиях с применением стандартных компьютерных программ // Морфологические ведомости. – 2004. – № 12. – С. 11–13.
10. Силантьева, Т. А., Горбач Е. Н. Количественная оценка интенсивности гистологических реакций на оцифрованных изображениях гистологических препаратов с использованием градуированных стандартов // Украинский журнал телемедицины. – 2010. – № 1. – С. 68–71.

Поступила 12.01.2015 г.