

КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ

УДК 576:35 . 612.017

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЭНДОТОКСИНА НА МИГРАЦИЮ НЕЙРОНОВ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ГОНАДОТРОПИН-РИЛИЗИНГ ГОРМОН, В ЭМБРИОНАЛЬНОМ РАЗВИТИИ КРЫС¹

© 2011 г. В. С. Шарова, М. С. Извольская, С. Н. Воронова, Л. А. Захарова

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,

119991 ГСП-1, Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: zakharova-l@mail.ru

Поступила в редакцию 26.06.10 г.

Окончательный вариант получен 15.02.11 г.

Исследовали влияние бактериального эндотоксина липополисахарида (ЛПС), активатора иммунной системы на выход в дифференцировку нейронов, продуцирующих гонадотропин-рилизинг гормон (ГРГ), и их миграцию в эмбриональном развитии крыс. Внутривентрикулярное введение ЛПС (18 мкг/кг веса) беременным самкам на 12-е сут эмбрионального развития, в период их образования, приводило к снижению общего количества ГРГ-нейронов в переднем мозгу 17-дневных плодов на 50% и 19-дневных плодов – на 17%. В то же время, в назальной области головы количество нейронов у 17- и 19-дневных плодов увеличивалось на 40 и 50% соответственно, а в области обонятельных луковиц увеличивалось у 17-дневных плодов на 20% и практически не менялось у 19-дневных плодов. Введение ЛПС беременным самкам на 15-е сут эмбрионального развития не вызывало изменений ни общего количества нейронов, ни их распределения по областям миграции. После введения ЛПС у плодов было отмечено одиночное расположение нейронов, продуцирующих ГРГ, в переднем мозгу, в то время как в ростральных отделах они располагались группами по 3–4 нейрона. Таким образом, на ранних сроках беременности ЛПС подавляет начальные этапы дифференцировки и миграцию нейронов, продуцирующих ГРГ. Наблюдаемые эффекты могут быть опосредованы провоспалительными цитокинами, продукция которых усиливается под действием ЛПС.

Ключевые слова: нейрогенез, ГРГ-нейроны, обонятельные плакаты, передний мозг, бактериальный эндотоксин ЛПС, плоды крыс, иммуногистохимия.

Характерной особенностью нейронов, продуцирующих гонадотропин-рилизинг гормон (ГРГ), является их небольшая численность (800–2000), диффузное расположение в септо-преоптической области гипоталамуса и внемозговое онтогенетическое происхождение. ГРГ-нейроны млекопитающих образуются в эпителии обонятельных плакатов на 12–14-е сут эмбрионального развития у крыс и затем мигрируют к переднему мозгу в составе прорастающих на данном этапе развития обонятельных, терминальных и вомероназальных нервов (Schwanzel-Fukuda et al., 1985, 1989; Wray et al., 1989). После проникновения в мозг через решетчатую пластинку решетчатой кости ГРГ-нейроны продолжают мигрировать к септо-преоптической области переднего мозга по траектории вентро-каудального ответвления вомероназального нерва (Yoshida et al., 1999).

ГРГ необходим для обеспечения репродуктивных ритмов и функций, является нейромодулятором полового поведения (Wray, 2002). Немаловаж-

ную роль ГРГ играет также в развитии и функционировании иммунной системы в пре- и постнатальный периоды онтогенеза (Morale et al., 1991; Zakharova et al., 2005; Извольская и др., 2010). ГРГ-система, в свою очередь, находится под контролем нейроэндокринной и иммунной систем. Многие нейротрансмиттеры, участвующие в регуляции функций ГРГ-системы половозрелых особей, в период развития способны влиять на миграцию ГРГ-нейронов в зависимости от их пространственного или временного расположения (Simonian, Herbison, 2001; Pronina et al., 2003; Giacobini et al., 2004). Через ГРГ-нейроны различные нейротрансмиттеры и нейропептиды: моноамины, гамма-аминомасляная кислота, нейропептид Y, опиоиды, а также цитокины передают сигналы внешних стимулов, влияющих на состояние репродуктивной системы (Ciechanowska et al., 2007; Kalra et al., 1998). В то же время, исследования влияния иммунной системы на функционирование ГРГ-системы единичны. Показано, в частности, что стимуляция иммунной системы половозрелых особей бактериальным эндотоксином липополисахаридом (ЛПС), индуцирующего синтез провос-

¹ Работа поддержана Российским Фондом фундаментальных исследований (проект № 10-04-01101-а).

палительных цитокинов, вызывает снижение секреции ГРГ в гипоталамусе и лютеинизирующего гормона в гипофизе (Watanobe, Nayakawa, 2003). Воспаление, вызванное ЛПС у матери, изменяет уровень провоспалительных цитокинов в различных органах плода (Liverman et al., 2006). Мы предполагаем, что ЛПС может оказывать воздействие не только на функционирование, но и на развитие ГРГ-системы: деление предшественников, миграцию ГРГ-нейронов, прорастание волокон в срединное возвышение. К настоящему времени существуют данные о неблагоприятном влиянии ЛПС на организм на ранних этапах жизни. Введение ЛПС новорожденным крысам вызывает в гипоталамо-гипофизо-надпочечниковой системе повышенную секрецию гормонов стресса, снижение отрицательной обратной связи, чувствительной к глюкокортикоидам, и усиление реакции ГРГ-системы на стресс (Li et al., 2007).

Цель нашей работы – исследование влияния ЛПС на выход ГРГ-нейронов в дифференцировку и их миграцию из обонятельных плакод в передний мозг в онтогенезе крыс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Условия эксперимента. В качестве экспериментальной модели были использованы беременные крысы Вистар (16 самок) (Питомник “Столбовая”, РАН). Беременных самок содержали в стандартных лабораторных условиях с контролируемыми режимами температуры (20°C) и освещения (в течение 12 ч) и со свободным доступом к воде и пище. Для получения датированной беременности самцов подсаживали на ночь к самкам, при обнаружении сперматозоидов во влагалищных мазках этот день считали первым днем беременности. Беременным самкам (4 группы, по 4 самки в опытной и контрольной группах) внутривенно вводили ЛПС *E. coli* (10000 ед/кг или 18 мкг/кг веса в 0.5 мл 0.9%-ного раствора NaCl, pH 7.2; “Sigma”, США) на 12-е или 15-е сут эмбрионального развития (Э12, Э15). Контрольной группе животных на Э12 или Э15 вводили 0.9%-ный раствор NaCl. Доза вводимого ЛПС была выбрана в соответствии с литературными данными и вызывала смертность не более 25–30% плодов (Ling et al., 2002).

Фиксация и иммуногистохимия. На 17-е и 19-е сут беременности у двух самок из каждой группы под пентобарбиталовым наркозом (100 мг/кг веса) извлекали плоды. Пол плодов не определяли. Плоды перфузировали через сердце сначала 0.02 М фосфатно-солевым буфером (ФСБ, 0.02 М фосфатный буфер с 0.9%-ным NaCl, pH 7.4) в течение 1 мин, а затем 4%-ным раствором параформальдегида на 0.1 М фосфатном буфере в течение 5 мин. Далее животных декапитировали, головы дофиксировали в 4%-ном параформальдегиде при 4°C в течение ночи, после чего отмывали в 0.02 М ФСБ в

течение 30 мин и помещали на 36 ч в 25%-ный раствор сахарозы в 0.02 М ФСБ для криопротекции. Головы замораживали в изопентане при –40°C и хранили при –80°C. Далее приготавливали сагитальные серийные срезы толщиной 14 мкм на криостате “Leica” (Германия).

Для иммуногистохимической реакции каждый второй срез опытных и контрольных групп инкубировали во влажной камере последовательно в 0.02 М ФСБ с: 1) 0.1%-ной перекисью водорода и 0.3%-ным тритоном X-100 (“Sigma”, США), 20 мин при комнатной температуре; 2) первичными кроличьими антителами против синтетического ГРГ (1 : 5000), при 4°C с 1%-ной нормальной сыровороткой козы и 0.3%-ным тритоном X-100, 48 ч; 3) вторичными козьими биотинилированными антителами против иммуноглобулинов кролика (1 : 200) (“Vector Laboratories”, BIOSYS, США), 2 ч при комнатной температуре; 4) авидин-биотин-пероксидазным комплексом (“Vector Laboratories”, BIOSYS, США), 1 ч при комнатной температуре. Срезы промывали в ФСБ после каждой инкубации. Специфичность первых антител проверяли ранее (Beauvillain, Tramu, 1980). На последнем этапе срезы промывали 0.05 М трис-буфером (pH 7.6), пероксидазную реакцию выявляли в том же буфере, содержащем 0.03% 3,3'-диаминобензидина тетрагидрохлорида (“Sigma”, США) и 0.01% перекиси водорода. Затем срезы обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в пермаунт.

Анализ результатов. Серии срезов (каждая из пяти анализированных серий содержала срезы голов плодов контрольной и опытной группы) просматривали и на каждом срезе подсчитывали все ГРГ-иммунореактивные (ГРГ-ир) нейроны. Данные пяти анализируемых серий объединяли, учитывая анатомические макроориентиры. Для этого были выделены следующие зоны вдоль пути миграции ГРГ-ир нейронов: 1) назальная область головы от роstralной части вомероназального органа до роstralного окончания обонятельных луковиц; 2) область обонятельных луковиц, в которой располагался также хрящевой зачаток решетчатой пластинки решетчатой кости; 3) область переднего мозга от каудальной части обонятельных луковиц до переднего гипоталамуса (рис. 1). Поправки двойного подсчета нейронов не вводили, так как основной задачей нашей работы являлось сравнение полученного количества нейронов у животных различных групп, а не точное определение общего количества ГРГ-ир нейронов.

Статистическая обработка. Для данных по количеству нейронов подсчитывали стандартную ошибку среднего значения. Для определения достоверности различий между опытом и контролем использовали непараметрический двусторонний критерий Манна-Уитни (*U*-тест).

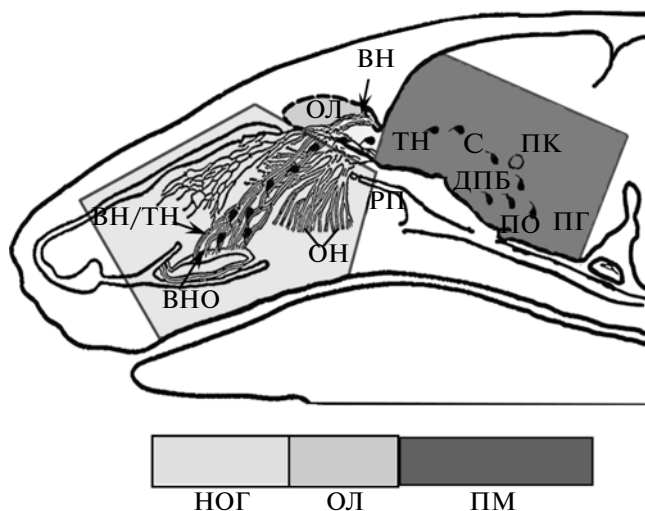


Рис. 1. Участки миграции ГРГ-нейронов у крыс, соответствующие с макростологическими ориентирами.

ВН – вомероназальный нерв, ВНО – вомероназальный орган, ДПБ – диагональный пучок Брока, НОГ – назальная область головы, ОН – обонятельный нерв, ОЛ – обонятельные луковицы, ПГ – передний гипоталамус, ПК – передняя комиссура, ПМ – передний мозг, ПО – преоптическая область, РП – решетчатая пластинка решетчатой кости, С – септум, ТН – терминальный нерв.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение ГРГ-ир нейронов на Э17. У плодов контрольной группы животных на Э17 большая часть ГРГ-ир нейронов была веретеновидной формы и располагалась в переднем мозгу: в септуме, диагональном пучке Брока и преоптической области. Небольшое количество ГРГ-ир нейронов об-

наруживали в назальной области головы, между вомероназальным органом и обонятельными луковицами, а также в области самих обонятельных луковиц (рис. 3).

После введения ЛПС беременным самкам на Э12 общее количество ГРГ-ир нейронов у плодов достоверно снижалось (рис. 2). В то же время, количество ГРГ-ир нейронов в назальной области головы и области обонятельных луковиц увеличилось на 40 и 20% соответственно, а в области переднего мозга их количество достоверно снижалось (рис. 3). У животных опытной группы было отмечено одиночное расположение ГРГ-ир нейронов в переднем мозгу, в то время как в ростральных отделах они располагались группами по 3–4 нейрона (рис. 4).

Распределение ГРГ-ир нейронов на Э19. Общее количество ГРГ-ир нейронов у плодов контрольной группы на Э19 возросло по сравнению с Э17 (рис. 2). Нейроны были веретеновидной формы, с крупным неокрашенным ядром, расположенным в центре тела нейрона подобно Э17. Наибольшее количество ГРГ-ир нейронов было обнаружено в переднем мозгу. На Э19 ГРГ-ир нейроны выявлены также в области переднего гипоталамуса, их волокна прорастали до срединного возвышения.

После введения ЛПС беременным самкам на Э12 общее количество ГРГ-ир нейронов у плодов на Э19 достоверно не изменялось (рис. 2). Наблюдалось увеличение их количества в назальной области головы на 50% по сравнению с контролем (рис. 5, 6). В области переднего мозга количество ГРГ-ир нейронов достоверно снижалось.

Распределение ГРГ-ир нейронов после введения ЛПС на Э15. После введения ЛПС беременным

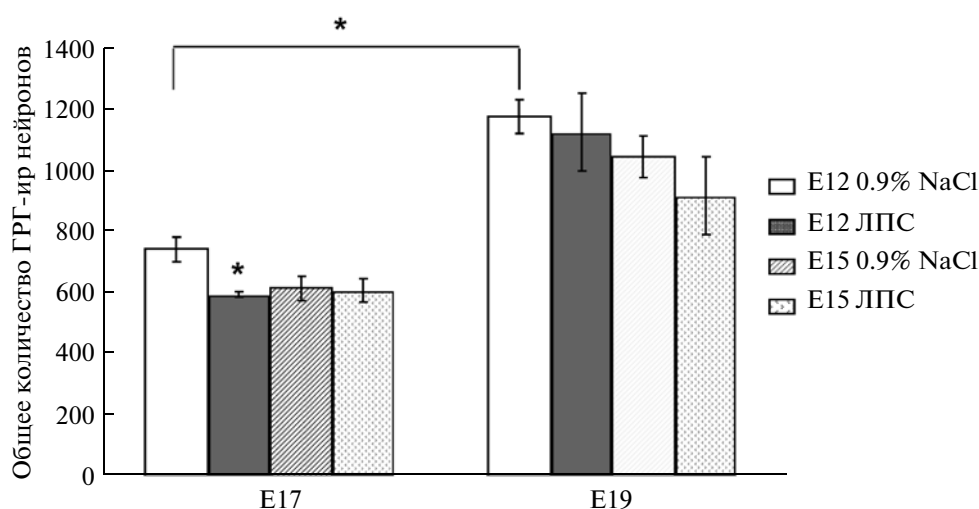


Рис. 2. Общее количество ГРГ-иммунореактивных нейронов у плодов крыс на 17-е (Э17) и 19-е (Э19) сут эмбрионального развития после введения ЛПС или 0.9% раствора NaCl на Э12 и Э15. По оси абсцисс – возраст плодов, по оси ординат – общее количество нейронов. Число плодов в каждой группе на Э12 $n = 6$, на Э15 $n = 3$; общее число плодов 36. Достоверность различия между опытной и контрольной группами: $M \pm SEM$; * $p < 0.05$.

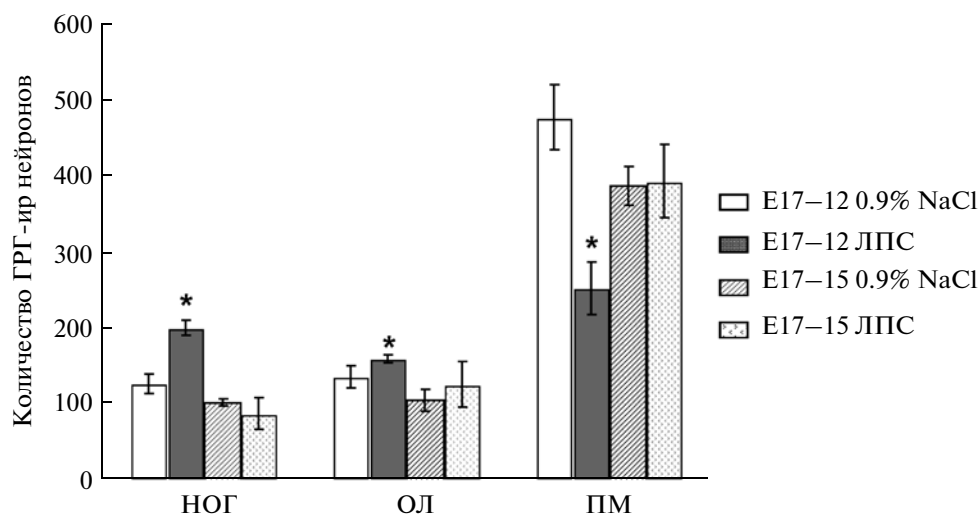


Рис. 3. Содержание ГРГ-иммунореактивных нейронов в различных зонах миграции у плодов крыс на 17-е (Э17) сут эмбрионального развития после введения ЛПС или 0.9% раствора NaCl на Э12 и Э15. По оси абсцисс – области миграции: НОГ – назальная область головы, ОЛ – обонятельные луковицы, ПМ – передний мозг; по оси ординат – количество нейронов. Число плодов в каждой группе на Э12 $n = 6$, на Э15 $n = 3$; общее число плодов 36.

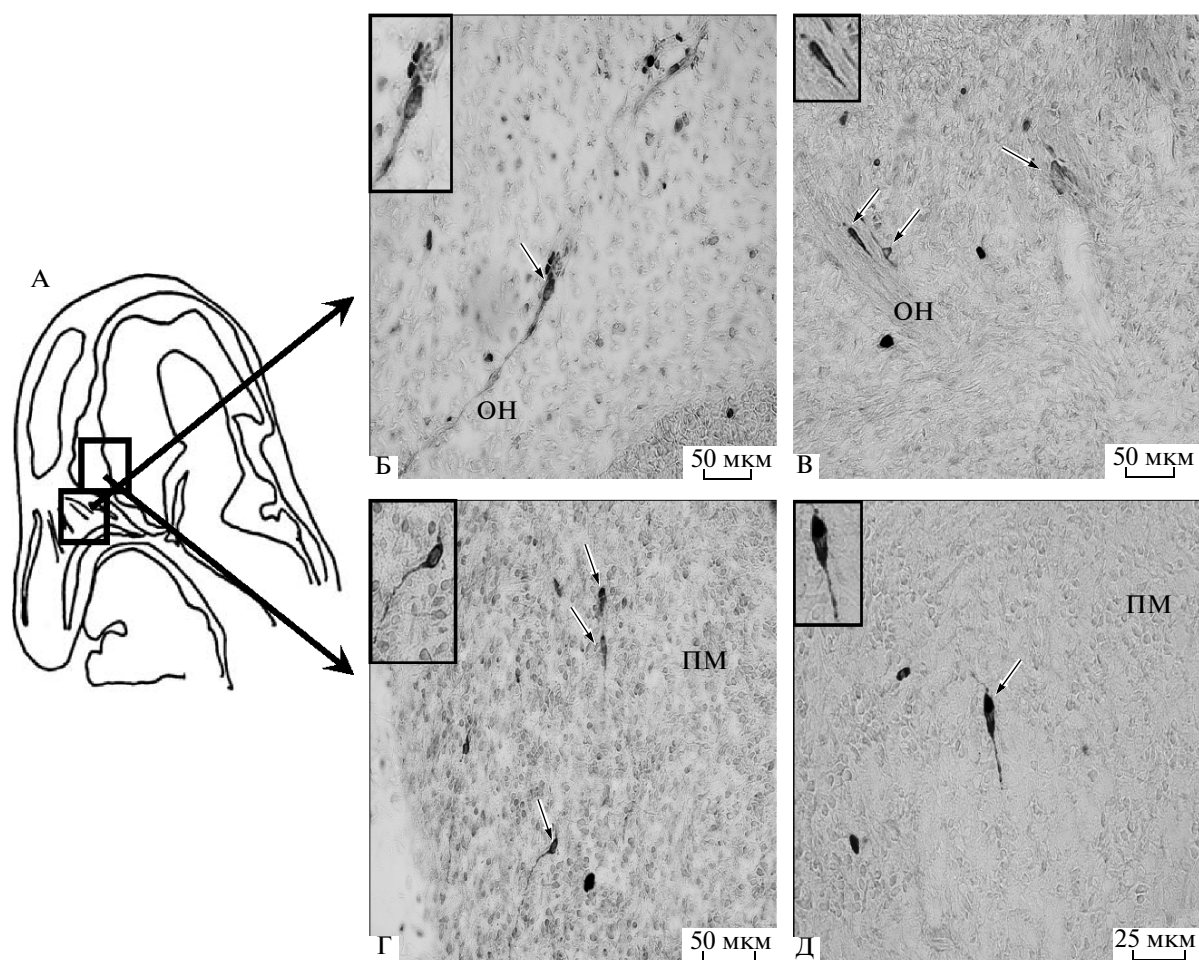


Рис. 4. ГРГ-иммунореактивные нейроны в назальной области головы и в переднем мозгу у плодов крыс на Э17 после введения ЛПС на Э12 в контрольной (Б, Г) и опытной группах (В, Д). А – Схематическое изображение сагиттального среза головы плода крысы на Э17. Сокращения: ОН – обонятельный нерв, ПМ – передний мозг.

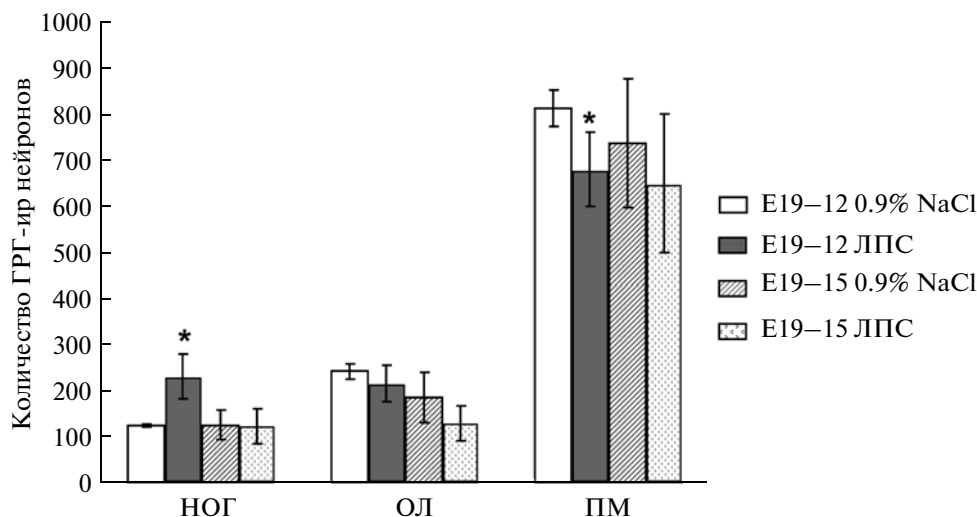


Рис. 5. Содержание ГРГ-иммуореактивных нейронов в различных зонах миграции у плодов крыс на 19-е (Э19) сут эмбрионального развития после введения ЛПС или 0.9% NaCl на Э12 и Э15. По оси абсцисс – области миграции: НОГ – назальная область головы, ОЛ – обонятельные луковицы, ПМ – передний мозг; по оси ординат – количество нейронов. Число плодов в каждой группе на Э12 $n = 6$, на Э15 $n = 3$; общее число плодов 36.

самкам на Э15 у плодов достоверных различий как по общему количеству ГРГ-ир нейронов, так и по их количеству в исследуемых областях миграции на Э17 и Э19 не наблюдалось по сравнению с контрольной группой животных (рис. 2, 3, 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Бактериальный эндотоксин ЛПС является основным компонентом наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Его часто применяют в лабораторных исследованиях для активации иммунной системы животных без заражения организма потенциально опасными бактериальными инфекциями (Bennett, Beeson, 1950). Внутрив брюшинное введение ЛПС беременным самкам вызывает нарушения развития плодов вплоть до полной остановки их развития и преждевременных родов (Fidel et al., 1994; Kaga et al., 1996). Большинство авторов придерживается мнения, что эти нарушения у плода связаны с развитием иммунного ответа на бактериальную инфекцию у матери (Cai et al., 2000; Kohmura et al., 2000; Grigsby et al., 2003; Simamura et al., 2010). Вопрос о возможности проникновения ЛПС через плаценту матери к плоду остается открытым, поскольку имеющиеся к настоящему времени данные противоречивы (Cai et al., 2000; Ashdown et al., 2006). Структура ЛПС не позволяет ему проникать через плаценту, нет также и экспериментальных данных, подтверждающих его трансмембранный транспорт (Zaga et al., 2004).

Влияние ЛПС на развитие плода может осуществляться, по-видимому, за счет изменений метаболизма различных сигнальных молекул. Показано, что введение ЛПС беременной самке вызы-

вает у нее повышение уровня провоспалительных цитокинов в крови, которые, наряду с ЛПС, также стимулируют секрецию провоспалительных цитокинов: фактора некроза опухоли (ФНО α), интерлейкина 1 (ИЛ-1 β) и лейкоингибирующего фактора (ЛИФ) плодной частью плаценты (Thiex et al., 2009; Simamura et al., 2010). Введение ЛПС беременным мышам приводит к повышенной экспрессии ФНО α , ИЛ-1 β и белка хемотаксиса моноцитов (MCP-1) у плодов (Liverman et al., 2006). В мозгу плодов крысы экспрессия ФНО α наблюдается уже через 1 ч после введения, и в течение 24 ч его уровень не изменяется, тогда как уровень ИЛ-1 β снижается (Cai et al., 2000).

В наших исследованиях доза ЛПС была выбрана как минимальная толерантная доза, вызывающая повышение температуры тела (Miller et al., 1997) и 25–30%-ную гибель плодов (Ling et al., 2002). Согласно полученным нами данным, разовое введение ЛПС беременным самкам на Э12 приводит к снижению общего количества ГРГ-ир нейронов у плодов на Э17, а к Э19 их количество возрастает до уровня контрольной группы животных (рис. 2). Выявленный эффект на Э17 можно объяснить либо общим снижением синтеза ГРГ в нейронах, либо их более поздним выходом в дифференцировку. ГРГ-нейроны у крыс начинают синтезировать ГРГ с Э15, то есть через 1–2 сут после их образования (Schwanzel-Fukuda et al., 1985). Как было показано ранее, повышенное содержание цитокинов в крови беременной самки и тканях плода наблюдается только в течение 24 ч после введения ЛПС, позже они возвращаются к прежнему уровню (Cai et al., 2000; Liverman et al., 2006). Таким образом, наблюдаемый нами сниженный уровень

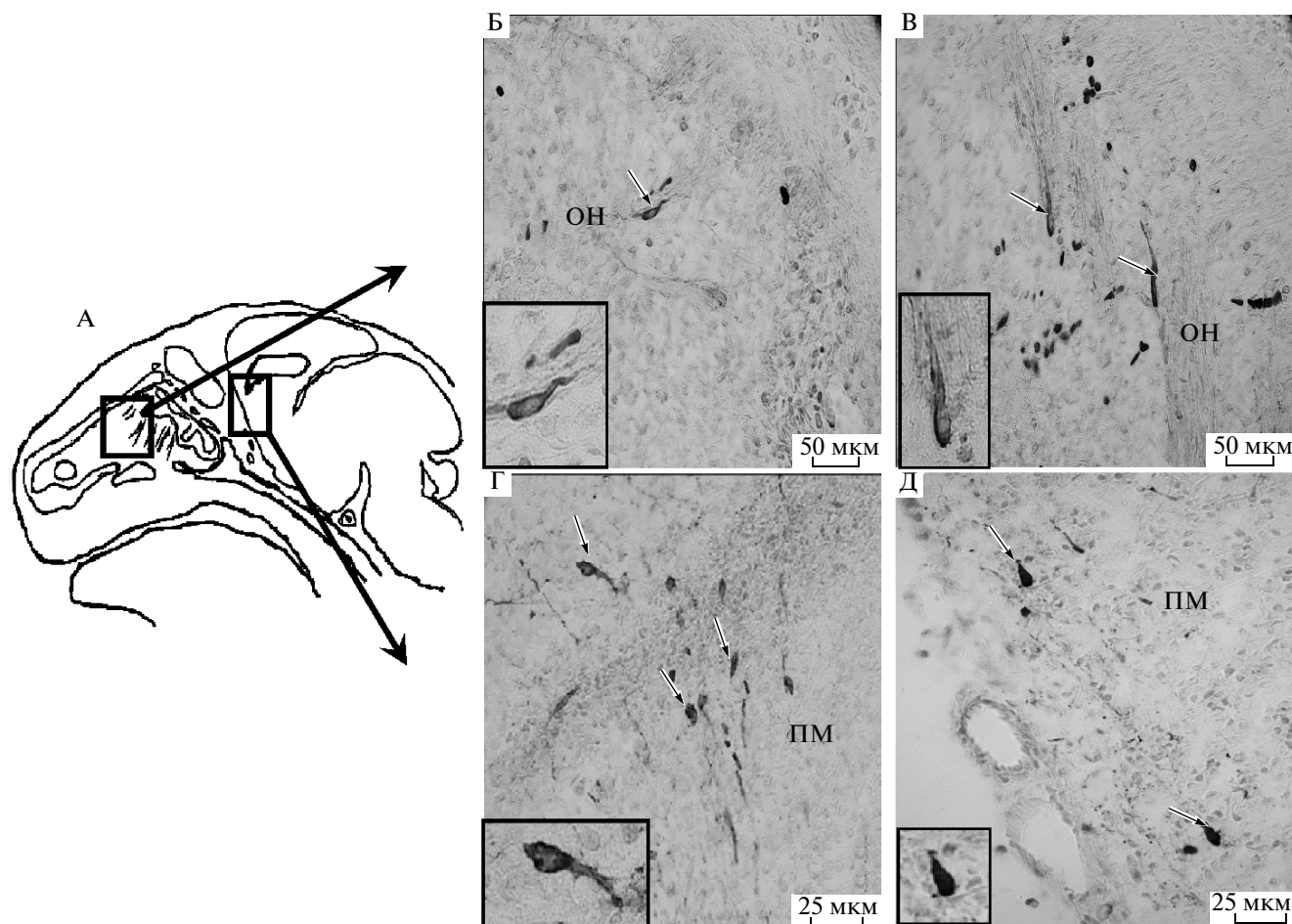


Рис. 6. ГРГ-иммунореактивные нейроны в назальной области головы и в переднем мозгу у плодов крыс на Э19 после введения ЛПС на Э12 в контрольной (Б, Г) и опытной группах (В, Д). А – Схематическое изображение сагиттального среза головы плода крысы на Э19. Сокращения: ОН – обонятельный нерв, ПМ – передний мозг.

ГРГ-нейронов через 5 сут после введения ЛПС матери не связан, по-видимому, с прямым действием провоспалительных цитокинов на синтез ГРГ в нейронах. Однако нельзя исключить опосредованное влияние ЛПС и индуцированных им цитокинов. Показано, что у половозрелых животных ИЛ-1 α и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор блокируют выделение ГРГ из аксонов ГРГ-нейронов в результате подавления активности NO-синтазы (Rettori et al., 1994). Подавление секреции ГРГ после введения ЛПС может быть опосредовано также опиоидами (He et al., 2003).

На основании полученных данных мы предполагаем, что ЛПС подавляет выход предшественников ГРГ-нейронов в дифференцировку. После введения ЛПС беременным самкам на Э15 снижения общего количества ГРГ-ир нейронов не наблюдается как на Э17, так и Э19 (рис. 2). Эти данные подтверждают наше предположение о том, что введение ЛПС на Э12, в период массового выхо-

да ГРГ-нейронов в дифференцировку, препятствует их образованию.

Следует отметить, что к рождению общее количество ГРГ-нейронов восстанавливается, что не исключает, однако, возникновения нарушений в функционировании ГРГ-системы в отдаленные периоды жизни. Так, пренатальное инфицирование плода ЛПС приводит к снижению количества моноаминэргических нейронов и повышению содержания ФНО α в черной субстанции у потомков иммунизированных крыс в постнатальном периоде (Zhu et al., 2007; Wang et al., 2009).

Наряду с провоспалительными цитокинами, ЛПС индуцирует синтез и других сигнальных молекул (Cai et al., 2000; Gilmore et al., 2003; Liverman et al., 2006). Снижение количества ГРГ-ир нейронов в пренатальный период может быть связано также с нарушениями синтеза у плодов факторов дифференцировки ГРГ-нейронов, в частности, фактора стромального происхождения (SDF-1), нейротропного фактора мозга (Gilmore et al., 2003;

Cronin et al., 2004; Toba et al., 2008) и ряда других факторов (Извольская и др., 2010).

Стимуляция иммунной системы беременных самок ЛПС на Э12 вызывает также замедление миграции ГРГ-нейронов у плодов, что выражается в расположении большего количества ГРГ-ир нейронов в ростральных областях, по сравнению с контролем (рис. 3). Однако введение ЛПС на Э15 не приводит к перераспределению ГРГ-ир нейронов вдоль траектории их миграции на Э17 и Э19. Эти данные говорят о том, что замедление выхода в дифференцировку ГРГ-нейронов приводит к смещению времени начала их миграции на более поздние сроки и замедлению темпов интрамезенхимной (интраназальной) миграции ГРГ-нейронов. В то же время, на более поздних сроках: в момент пересечения ГРГ-нейронами решетчатой пластинки решетчатой кости и миграции в переднем мозгу, вызванное ЛПС воспаление не оказывает влияния на скорость их миграции. Как было показано ранее, именно во время интрамезенхимной миграции ГРГ-нейроны экспрессируют рецепторы к цитокинам, и прежде всего, к ИЛ-6 и ЛИФ (Giacobini et al., 2007; Dozio et al., 2009). Внутримозговая миграция ГРГ-нейронов регулируется, по-видимому, другими механизмами.

Таким образом, введение ЛПС на Э12, имитирующее заражение матери во время беременности различного рода инфекциями, приводит к замедлению выхода в дифференцировку и замедлению темпов интрамезенхимной миграции ГРГ-нейронов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Извольская М.С., Шарова В.С., Захарова Л.А. Механизмы регуляции гипоталамо-гипофизарной и иммунной систем: роль гонадотропин-рилизинг гормона и иммуномедиаторов // Известия РАН. Серия Биологическая. 2010. № 4. С. 451–461.
- Ashdown H., Dumont Y., Ng M. et al. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia // Mol. Psychiatry. 2006. V. 11. № 1. P. 47–55.
- Beauvillain J.C., Tramu G. Immunocytochemical demonstration of LHRH, somatostatin, and ACTH-like peptide in osmium-postfixed, resin-embedded median eminence // J. Histochem. Cytochem. 1980. V. 28. № 9. P. 1014–1017.
- Bennett I.L. Jr., Beeson P.B. The properties and biologic effects of bacterial pyrogens // Medicine. 1950. V. 29. P. 365–400.
- Cai Z., Pan Z.L., Pang Y. et al. Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration // Pediatr. Res. 2000. V. 47. № 1. P. 64–72.
- Ciechanowska M., Lapot M., Malewski T. et al. Effect of stress on the expression of GnRH and GnRH receptor (GnRH-R) genes in the preoptic area-hypothalamus and GnRH-R gene in the stalk/median eminence and anterior pituitary gland in ewes during follicular phase of the estrous cycle // Acta Neurobiol. Exp. (Wars.). 2007. V. 67. P. 1–12.
- Cronin A.S., Horan T.L., Spergel D.J. et al. Neurotrophic effects of BDNF on embryonic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons // Eur. J. Neurosci. 2004. V. 20. № 2. P. 338–344.
- Dozio E., Ruscica M., Galliera E. et al. Leptin, ciliary neurotrophic factor, leukemia inhibitory factor and interleukin-6: class-I cytokines involved in the neuroendocrine regulation of the reproductive function // Curr. Protein Pept. Sci. 2009. V. 10. № 6. P. 577–584.
- Fidel P.L., Jr., Romero R., Wolf N. et al. Systemic and local cytokine profiles in endotoxin-induced preterm parturition in mice // Am. J. Obstet. Gynecol. 1994. V. 170. № 5. P. 1467–1475.
- Giacobini P., Kopin A.S., Beart P.M. et al. Cholecystokinin modulates migration of gonadotropin-releasing hormone-1 neurons // J. Neurosci. 2004. V. 24. № 20. P. 4737–4748.
- Giacobini P., Messina A., Wray S. et al. Hepatocyte growth factor acts as a motogen and guidance signal for gonadotropin hormone-releasing hormone-1 neuronal migration // J. Neurosci. 2007. V. 27. № 2. P. 431–445.
- Gilmore J.H., Jarskog L.F., Vadlamudi S. Maternal infection regulates BDNF and NGF expression in fetal and neonatal brain and maternal-fetal unit of the rat // J. Neuroimmunol. 2003. V. 138. № 1–2. P. 49–55.
- Grigsby P.L., Hirst J.J., Scheerlinck J.P. et al. Fetal responses to maternal and intra-amniotic lipopolysaccharide administration in sheep // Biol. Reprod. 2003. V. 68. № 5. P. 1695–1702.
- He D., Sato I., Kimura F. et al. Lipopolysaccharide inhibits luteinizing hormone release through interaction with opioid and excitatory amino acid inputs to gonadotropin-releasing hormone neurons in female rats: possible evidence for a common mechanism involved in infection and immobilization stress // Neuroendocrinol. 2003. V. 15. № 6. P. 559–563.
- Kaga N., Katsuki Y., Obata M. et al. Repeated administration of low-dose lipopolysaccharide induces preterm delivery in mice: a model for human preterm parturition and for assessment of the therapeutic ability of drugs against preterm delivery // Am. J. Obstet. Gynecol. 1996. V. 174. № 2. P. 754–759.
- Kalra P.S., Edwards T.G., Xu B. et al. The anti-gonadotropic effects of cytokines: the role of neuropeptides // Domest. Anim. Endocrinol. 1998. V. 15. P. 321–332.
- Kohmura Y., Kirikae T., Kirikae F. et al. Lipopolysaccharide (LPS)-induced intra-uterine fetal death (IUFD) in mice is principally due to maternal cause but not fetal sensitivity to LPS // Microbiol. Immunol. 2000. V. 44. № 11. P. 897–904.
- Li X.F., Kinsey-Jones J.S., Knox A.M. et al. Neonatal lipopolysaccharide exposure exacerbates stress-induced suppression of luteinizing hormone pulse frequency in adulthood // Endocrinology. 2007. V. 148. № 12. P. 5984–5990.
- Ling Z., Gayle D.A., Ma S.Y. et al. In utero bacterial endotoxin exposure causes loss of tyrosine hydroxylase neurons in the postnatal rat midbrain // Mov. Disord. 2002. V. 17. № 1. P. 116–124.
- Liverman C.S., Kaftan H.A., Cui L. et al. Altered expression of pro-inflammatory and developmental genes in the fetal

- brain in a mouse model of maternal infection // *Neurosci. Lett.* 2006. V. 399. № 3. P. 220–225.
- Miller A.J., Luheshi G.N., Rothwell N.J. et al. Local cytokine induction by LPS in the rat air pouch and its relationship to the febrile response // *Am. J. Physiol.* 1997. V. 272. P. 857–861.
- Morale M.C., Batticane N., Bartoloni G. Blockade of central and peripheral luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptors in neonatal rats with a potent LHRH-antagonist inhibits the morphofunctional development of the thymus and maturation of the cell-mediated and humoral immune responses // *Endocrinology.* 1991. V. 128. P. 1073–1085.
- Pronina T., Ugrumov M., Adamskaya E. et al. Influence of serotonin on the development and migration of gonadotropin-releasing hormone neurones in rat fetuses // *J. Neuroendocrinol.* 2003. V. 15. № 6. P. 549–558.
- Rettori V., Belova N., Kamat A. et al. Blockade by interleukin-1-alpha of nitricoxidergic control of luteinizing hormone-releasing hormone release in vivo and in vitro // *Neuroimmunomodulation.* 1994. V. 1. № 1. P. 86–91.
- Schwanzel-Fukuda M., Morrell G., Pfaff D.W. Ontogenesis of neurons producing luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in the nervus terminalis of the rat // *J. comparative neurology.* 1985. V. 238. № 3. P. 348–364.
- Schwanzel-Fukuda M., Pfaff D.W. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons // *Nature.* 1989. V. 338. P. 161–164.
- Simamura E., Shimada H., Higashi N. et al. Maternal leukemia inhibitory factor (LIF) promotes fetal neurogenesis via a LIF-ACTH-LIF signaling relay pathway // *Endocrinology.* 2010. V. 151. № 4. P. 1853–1862.
- Simonian S.X., Herbison A.E. Differing, spatially restricted roles of ionotropic glutamate receptors in regulating the migration of GnRH neurons during embryogenesis // *J. Neurosci.* 2001. V. 21. № 3. P. 934–943.
- Thiex N.W., Chames M.C., Loch-Carusio R.K. Tissue-specific cytokine release from human extra-placental membranes stimulated by lipopolysaccharide in a two-compartment tissue culture system // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2009. V. 7. P. 117.
- Toba Y., Tiong J.D., Ma Q. et al. CXCR4/SDF-1 system modulates development of GnRH-1 neurons and the olfactory system // *Dev. Neurobiol.* 2008. V. 68. № 4. P. 487–503.
- Wang S., Yan J.Y., Lo Y.K. et al. Dopaminergic and serotonergic deficiencies in young adult rats prenatally exposed to the bacterial lipopolysaccharide // *Brain Res.* 2009. V. 1265. P. 196–204.
- Watanobe H., Hayakawa Y. Hypothalamic Interleukin-1 and tumor necrosis factor, but not Interleukin-6, mediate the endotoxin-induced suppression of the reproductive axis in rats // *Endocrinology.* 2003. V. 144. № 11. P. 4868–4875.
- Wray S. Development of gonadotropin-releasing hormone-1 neurons // *Front. Neuroendocrinol.* 2002. V. 23. P. 292–316.
- Wray S., Grant P., Gainer H. Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. № 20. P. 8132–8136.
- Yoshida K., Rutishauser U., Crandall J.E. et al. Polysialic acid facilitates migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons on vomeronasal axons // *J. Neurosci.* 1999. V. 19. P. 794–801.
- Zaga V., Estrada-Gutierrez G., Beltran-Montoya J. et al. Secretions of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha by whole fetal membranes depend on initial interactions of amnion or choriodecidua with lipopolysaccharides or group B streptococci // *Biol. Reprod.* 2004. V. 71. № 4. P. 1296–1302.
- Zakharova L., Ermilova I.Y., Melnikova V. et al. Hypothalamic control of the cell-mediated immunity and of the Luteinizing Hormone-Releasing Hormone level in thymus and peripheral blood of rat fetuses // *Neuroimmunomodulation.* 2005. V. 12. № 2. P. 85–91.
- Zhu Y., Carvey P.M., Ling Z. Altered glutathione homeostasis in animals prenatally exposed to lipopolysaccharide // *Neurochem. Int.* 2007. V. 50. № 4. P. 671–680.

Effect of Bacterial Endotoxin on Migration of Gonadotropin-Releasing, Hormone Producing Neurons in Rat Embryogenesis

V. S. Sharova, M. S. Izvol'skaya, S. N. Voronova, and L. A. Zakharova

Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia
e-mail: zakharova-l@mail.ru

Abstract—The effect of bacterial lipopolysaccharide endotoxin (LPS), immune system activator, on differentiation and migration of gonadotropin-releasing, hormone producing neurons in rat embryogenesis has been studied. Intraperitoneal introduction of LPS (18 µg/kg) to pregnant rats on the 12th day of pregnancy led to 50% decrease in total number of GRH-neurons in the forebrain of 17-day-old embryos and 17% decrease in 19-day-old embryos. At the same time, the number of GRH-neurons in the nasal area of the head of 17- and 19-day-old embryos increased by 40 and 50%, respectively, whereas it increased by 20% in olfactory bulbs of 17-day-old embryos and did not change in olfactory bulbs of 19-day-old embryos. Neither the total number of neurons nor their distribution patterns were affected by the introduction of LPS into pregnant rats on the 15th day of pregnancy. Singular localization of GRH-neurons in embryo forebrain was observed after LPS administration, whereas the neurons were located by groups of 3–4 cells in rostral areas. Therefore, at the early stages of pregnancy, LPS was shown to suppress initial stages of differentiation and migration of GRH producing neurons. The effects observed in our study may be mediated by LPS-induced, proinflammatory cytokines.

Keywords: neurogenesis, GRH-neurons, olfactory placodes, forebrain, LPS bacterial endotoxin, rat embryos, immunohistochemistry