

СТАНОВЛЕНИЕ ЦЕНТРАЛЬНЫХ NO-ЕРГИЧЕСКИХ СТРУКТУР В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ У МОРСКИХ СВИНОК

ДУНАЙ В.И.

Белорусский государственный университет; кафедра психофизиологии

Резюме. 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 совершенно неизученным.

Целью данной работы явилось изучение созревания NO-ергических систем мозга в раннем постнатальном онтогенезе у морских свинок, как представителей зрелорождающихся млекопитающих.

Эксперименты выполнены на 32 морских свинках. 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 работе использован метод идентификации НАДФН-д-содержащих нейронов, разработанный Scherer-Singler *et al* [9], в модификации Hope и Vincent [5].

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

Ключевые слова: онтогенез, NO-синтез, гипоталамус.

Abstract. In spite of the fact abundance justifying about the participation of NO in the regulation of different physiological functions and in the development of central nervous system the becoming of central NO-ergic system in ontogenesis is staying absolutely non-studied.

The aim of this work is the investigation of the mature of NO-ergic system of brain in the earlier postnatal period in guinea- pigs as the representatives of mature-birth mammalians.

Experiments are performed on 32 guinea- pigs. The first group –the animals at the age of 1 day, the second – the animals at the age of 3 days., the third group – at the age of 10 days, the fourth one – the animals at the age of 20 days.

The method of identification of NADPH-d-neuron contained, elaborated by Scherer – Singer *et al* in modification of Hope and Vincont has been used.

It is established that in guinea- pigs to the 20th day the postnatal development the main features in the distribution of supposed NO-syntheses nervous cells specific for adult organism. are formed.

Key words: ontogenesis, No-synthesis, hypothalamus

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, г. Минск, проспект Рокоссовского 17, кв.154. т. р. 209-58-65 e-mail: dunay_wal@bk.ru

Данные литературы свидетельствуют, что NO-синтезирующие нейроны широко распространены в ЦНС млекопитающих [2]. Доказано также участие NO в регуляции различных физиологических функций [1, 6]. Имеются предположения 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 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 совершенно неизученным.

Целью данной работы явилось изучение созревания NO-ергических систем мозга в раннем постнатальном онтогенезе у морских свинок, как представителей зрелорождающихся млекопитающих.

Методы

Эксперименты выполнены на 32 морских свинках. 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.

Специальными исследованиями было убедительно доказано, что нейронная синтаза NO (CNO) является никотинамидадениндинуклеотидфосфат-диафоразой [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 [8], что при фиксации с использованием параформальдегида инактивируются все НАДФН-зависимые ферменты-окислители, за исключением CNO. 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), нитросиний тетразолий (0,5 мМ), Тритон Х-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 формаза при восстановлении солей тетразолия НАДФН-диафоразой (СНО) 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 у морских свинок в первые дни после рождения в гипоталамической области происходят значительные изменения в распределении нервных клеток, содержащих НАДФН-диафору/НОС (Табл.).

Таблица

**Распределение нервных клеток, содержащих НАДФН-диафору/
НОС, в структурах гипоталамуса у морских свинок в разные сроки
постнатального онтогенеза**

| № п/п | Структура | 1 день | 3 день | 10 день | 20 день |
|-------|-------------------------|--------|--------|---------|---------|
| 1. | Medial preoptic area | - | + | + | + |
| 2. | Lateral preoptic area | + | + | + | + |
| 3. | Supraoptic nucleus | - | - | - | + |
| 4. | Paraventricular nucleus | + | + | + | + |
| 5. | Periventricular nucleus | - | - | + | + |

| № п/п | Структура | 1 день | 3 день | 10 день | 20 день |
|-------|---------------------------|--------|--------|---------|---------|
| 6. | Lateral hypothalamic area | + | + | + | + |
| 7. | Medial mammillary nucleus | - | + | + | + |
| 8. | Supramammillary nucleus | + | + | + | + |

"+" - структура содержит НАДФН-диафороза/НОС-позитивные нервные клетки;

"-" - структура не содержит НАДФН-диафороза/НОС-позитивные нервные клетки.

При изучении серийных срезов гипоталамуса морских свинок в возрасте одного дня после рождения обнаружены НАДФН-д/СНО – позитивные нейроны в латеральной преоптической области, паравентрикулярном ядре, латеральной гипоталамической области и в супрамаммилярном ядре.

У морских свинок в возрасте одного дня после рождения не обнаружены НАДФН-д/СНО – позитивные нейроны в ряде структур гипоталамуса, содержащих такие нейроны у взрослых организмов. Так, не обнаружены НАДФН-д/СНО – позитивные нейроны в медиальной преоптической области, супраоптическом ядре, перивентрикулярном ядре и медиальном маммилярном ядре.

У морских свинок в возрасте трех дней после рождения так же, как и у однодневных морских свинок, гипоталамус не содержит НАДФН-д/СНО – позитивных нейронов в супраоптическом ядре и перивентрикулярном ядре.

Гипоталамическая область трехдневных морских свинок содержит НАДФН-д/СНО – позитивные нейроны в тех же структурах, что и у однодневных (в латеральной преоптической области, паравентрикулярном ядре, латеральной гипоталамической области и в супрамаммилярном ядре). А также НАДФН-д/СНО – позитивные нейроны обнаружены в медиальной преоптической области и медиальном маммилярном ядре.

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 морских свинок выявляются НАДФН-д/СНО – позитивные нейроны почти во всех структурах гипоталамуса, содержащих такие нервные клетки у взрослых животных. В отличие от третьего дня, к 10-му дню развития НАДФН-д/СНО – позитивные нейроны, появляются в перивентрикулярном ядре. Обнаружено, что гипоталамус десятидневного животного 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 рождения. Таким образом, не существует различий в распределении НАДФН-д/CNO – позитивных нейронов в гипоталамусе 20-дневного животного по сравнению с взрослыми животными. Полученные данные свидетельствуют о том, что, по-видимому, между десятым и двадцатым днем после рождения происходит окончательное структурное формирование NO-зависимых систем нервных центров гипоталамуса морских свинок.

При изучении серийных срезов продолговатого мозга, окрашенных на НАДФН-д, у морских свинок, 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 систем нервных центров продолговатого мозга, структурное и функциональное развитие должно обеспечивать в первые дни жизни важнейшие вегетативные функции (дыхание, кровообращение).

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 механизмах роста нервных окончаний и формирования синаптических контактов.

Заключение

Установлено, что в первые дни после рождения у морских свинок в гипоталамической области происходят значительные изменения в распределении НАДФН-д/CNO – позитивных нервных клеток. Так, между третьим и десятым днем постнатального развития формируются основные черты в распределении предполагаемых NO-синтезирующих нервных клеток, характерные для взрослого организма, а между десятым и двадцатым днем, по-видимому, происходит окончательное структурное формирование NO-зависимых систем нервных центров гипоталамуса морских свинок.

Можно предполагать, что становление NO-зависимых систем в гипоталамусе у морских свинок, по-видимому, играет важную роль в развитии системы терморегуляции, поскольку полученные результаты хорошо коррелируют с данными о том, что температура тела животных, которым в раннем онтогенезе ингибировали CNO, достигала значений, характерных для контрольных животных, лишь к 20-му дню постнатального онтогенеза.

Таким образом, есть основания предположить, что начальное становление системы терморегуляции в процессе индивидуального

развития млекопитающих может быть связано с развитием NO-зависимых систем нервных центров гипоталамуса.

Литература

1. Amir S., De Blasio E., English A. M. NG-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 nly 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-diapho-rase// *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.

Рецензия

на статью В.И. Дунай «СТАНОВЛЕНИЕ ЦЕНТРАЛЬНЫХ NO-ЕРГИЧЕСКИХ СТРУКТУР В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ У МОРСКИХ СВИНОК»

Данные литературы свидетельствуют, что NO-синтезирующие нейроны широко распространены в ЦНС млекопитающих. Имеются предположения 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. 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 совершенно неизученным.

Установлено, что между третьим и десятым днем постнатального развития формируются основные черты в распределении предполагаемых NO-синтезирующих нервных клеток, характерные для взрослого организма, а между десятым и двадцатым днем, по-видимому, происходит окончательное структурное формирование NO-зависимых систем нервных центров гипоталамуса морских свинок. становление NO-зависимых систем в гипоталамусе у морских свинок, по-видимому, играет важную роль в развитии системы терморегуляции, поскольку полученные результаты хорошо коррелируют с данными о том, что температура тела животных, которым в раннем онтогенезе ингибировали CNO, достигала значений, характерных для контрольных животных, лишь к 20-му дню постнатального онтогенеза. Становление системы терморегуляции в процессе индивидуального развития млекопитающих может быть связано с развитием NO-зависимых систем нервных центров гипоталамуса.

Предлагаемая автором статья представляет несомненный интерес и может быть опубликована в журнале «Вестник ВГМУ».

Рецензент,

профессор

С.Н. Занько

28 апреля 2007 года