

М МЕДИЦИНСКИЕ ОВОСТИ 6 2007

Научно-практический
информационно-аналитический журнал

Жизнь – это путешествие






 **МОНОПРИЛ®**
(фозиноприл натрия)

Ваш надежный спутник

Более 1000 российских врачей, принявших участие в научных программах по изучению Моноприла

Более 8000 российских пациентов, включенных в эти программы

-  Эффективность в лечении артериальной гипертензии и хронической сердечной недостаточности
-  Малое число побочных эффектов
-  Удобный прием 1 раз в сутки



Перед назначением препарата ознакомьтесь, пожалуйста, с инструкцией по применению.

РУ МЗ РБ № 3042/97/02/06 до 01.06.2011 г.



Bristol-Myers Squibb

В.И. Дунай

Становление центральных NO-ергических структур в эмбриогенезе зрелорождающихся млекопитающих

Белорусский государственный университет

***Аннотация.** Изучено созревание NO-ергических систем мозга в раннем постнатальном онтогенезе у морских свинок как представителей гомойотермных организмов. Установлено, что в первые дни и недели после рождения в гипоталамической области у морских свинок происходят значительные изменения в распределении НАДФН-д/CNO-позитивных нервных клеток. 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, по-видимому, происходит окончательное структурное формирование NO-зависимых систем нервных центров гипоталамуса морских свинок.*

Данные литературы свидетельствуют о том, что NO-синтезирующие нейроны широко распространены в ЦНС млекопитающих [2]. Доказано также участие NO

в регуляции различных физиологических функций [1, 6]. Высказано предположение, что NO — один из важнейших факторов, участвующих в развитии структуры и функции центральной нервной системы.

Эта молекула вызывает гибель определенных клеточных структур, а также играет 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 совершенно не изучено.

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

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 32 морских свинках. Первую группу составили животные в возрасте 1 день, вторую группу — в возрасте 3 дня, третью группу — в возрасте 10 дней, четвертую группу — в возрасте 20 дней.

Специальные исследования убедительно доказали, 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 иммуногистохимических методов. 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 применением параформальдегида инактивируются все НАДФН-зависимые ферменты-окислители, за исключением CNO. Таким образом, при условии фиксации ткани в параформальдегиде гистохимическая реакция на НАДФН-д для идентификации NO-синтезирующих нервных клеток — адекватный метод, который широко применяется в настоящее время.

В работе использован метод идентификации НАДФН-д-содержащих нейронов, разработанный U. Scherer-Singler et al. [9], в модификации B. Hope и S. Vincent [5].

Для выделения гипоталамуса у животных целиком извлекали головной мозг. Отделяли гипоталамус и продолговатый мозг и дополнительно фиксировали согласно рекомендации T. Matsumoto et al. [7] в течение 90 минут в 4% параформальдегиде на фосфатном буфере (0,1M, pH 7,4). Участки мозга шесть раз по 30 минут 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 (0,1 M, pH 8,0) 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 (pH 8,0) в течение 5 минут. Гистохимическая процедура заключалась в инкубации срезов в растворе 0,1 M Трис-НСI (pH 8,0), содержащем НАДФН (1 mM), нитросиний тетразолий (0,5 mM), Тритон X-100 (0,3 %) и дикумарол (0,1 mM), 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, 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 на при восстановлении солей тетразолия НАДФН-диафоразой (CNO) в присутствии НАДФН. Таким образом, в случае отсутствия в инкубационной среде любого из основных компонентов (нитросиний тетразолий, НАДФН), а также при использовании НАДФ вместо НАДФН гистохимическая реакция не должна наблюдаться

Результаты и обсуждение

Опыты показали, что в первые дни после рождения в гипоталамической области морских свинок происходят значительные изменения в распределении нервных клеток, содержащих НАДФН-диафорузу/НОС (таблица).

При изучении серийных срезов гипоталамуса морских свинок в возрасте 1 день обнаружены НАДФН-д/CNO-позитивные нейроны в латеральной преоптической области, паравентрикулярном ядре, латеральной гипоталамической области и в супрамаммилярном ядре. У морских свинок в возрасте 1 день не обнаружены НАДФН-д/CNO-позитивные нейроны в ряде структур гипоталамуса, содержащих такие нейроны у взрослых организмов: в медиальной преоптической области, супраоптическом ядре, перивентрикулярном ядре и медиальном маммилярном ядре.

У морских свинок в возрасте 3 дня, так же как и у однодневных морских свинок, гипоталамус не содержит НАДФН-д/CNO-позитивных нейронов в супраоптическом ядре и перивентрикулярном ядре. В гипоталамической области трехдневных морских свинок содержатся НАДФН-д/CNO-позитивные нейроны в тех же структурах, что и у однодневных (в латеральной преоптической области, паравентрикулярном ядре, латеральной гипоталамической области и супрамаммилярном ядре). НАДФН-д/CNO-позитивные нейроны обнаружены также в медиальной преоптической области и медиальном маммилярном ядре.

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

Структура	1 день	3 день	10 день	20 день
Medial preoptic area	–	+	+	+
Lateral preoptic area	+	+	+	+
Supraoptic nucleus	–	–	–	+
Paraventricular nucleus	+	+	+	+
Periventricular nucleus	–	–	+	+
Lateral hypothalamic area	+	+	+	+
Medial mammillary nucleus	–	+	+	+
Supramammillary nucleus	+	+	+	+

“+” — структура содержит НАДФН-диафоруза/НОС-позитивные нервные клетки;
 “–” — структура не содержит НАДФН-диафоруза/НОС-позитивные нервные клетки.

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 морских свинок выявляются НАДФН-д/CNO-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/CNO-позитивные нейроны появляются в перивентрикулярном ядре. Обнаружено, что гипоталамус десятидневного животного 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 рождения. Таким образом, не существует различий в распределении НАДФН-д/CNO-позитивных нейронов в гипоталамусе 20-дневного животного по сравнению со взрослыми. 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 структурах.

По-видимому, еще до рождения завершается формирование NO-зависимых систем нервных центров продолговатого мозга, структурное и функциональное развитие которого должно обеспечивать в первые дни жизни важнейшие вегетативные функции (дыхание, кровообращение).

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, вероятно, 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, 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. // *Brain Res.* — 1991. — V. 556. — P. 157–160.
2. Dawson T. M., Hwang P. M., Snyder S. H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1991. — V. 88, N 17. — P. 7797–7801.
3. Dunai V. I., Gourine A. V. // *Recent advances in thermal biology*/ed. by V. N. Gourine. — Minsk, 1999. — P. 18–19.
4. Gourine A. V. // *J. Physiol.* — 1994. — V. 475. — P. 28.
5. Hope B. T., Vincent S.R. // *J. Histochem. Cytochem.* — 1989. — V. 37. — P. 653–661.
6. Kapas L., Shibata M., Krueger J.M. // *Amer. J. Physiol.* — 1994. — V. 266. — P. 151–157.
7. Matsumoto T., Kuk J. E., Forstermann U. // *Neurosci. Lett.* — 1993. — V. 155, N 1. — P. 61–64.
8. Pasqualotto B. A., Hope B. T., Vincent S. R. // *Neurosci. Lett.* — 1991. — V. 128, N 2. — P. 155–160.
9. Scherer-Singler U., Vincent S. R., Kimura H., McGeer E. G. // *J. Neurosci. Methods.* — 1983. — V. 9, N 3. — P. 229–234.