

МЕДИЦИНСКИЕ НОВОСТИ

5
2007

Научно-практический
информационно-аналитический журнал

ПРЕДУКТАЛ MR

Таблетки с МОДИФИЦИРОВАННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ

2 таблетки в день

✓ **Истинный и постоянный антиангинальный эффект**

*Все время, пока существует ишемия:
... круглые сутки*



... круглый год

✓ **При длительном применении эффективность нарастает**



Становление NO-зависимых систем ствола головного мозга в онтогенезе гомойотермных организмов

Белорусский государственный университет

Данные литературы указывают на то, что монооксид азота (NO) является нейромедиатором и нейромодулятором в нервной системе [1, 2], обеспечивающим ее развитие. NO — эффекторная молекула, вызывающая гибель определенных клеточных структур, а также играющая важную роль в механизмах роста нервных окончаний и формирования синаптических контактов [3]. Имеются сведения о том, что NO участвует в центральных механизмах регуляции автономных функций: дыхания и кровообращения [5]. Показано, что N^G-метил-L-аргинин, ингибитор CNO, при системном введении стимулирует активность симпатического почечного нерва [7]. Сходные результаты получены и при центральном введении ингибитора NO-синтетазы. N^G-метил-L-аргинин при

введении в большую цистерну мозга анестезированным крысам достоверно повышает кровяное давление и значительно увеличивает активность симпатического почечного нерва [8]. Эти данные позволяют сделать вывод о том, что NO принимает участие в центральной регуляции кровообращения, ингибируя эфферентный симпатический тонус.

В литературе имеются сведения об участии NO в центральных нейрхимических механизмах терморегуляции [6]. Так, NO, синтезируемый нейронами терморегуляторных центров головного мозга, участвует в регуляции активности периферических эффекторов теплоотдачи и теплопродукции [6]. Установлено, что формирование терморегуляторных реакций организма на действие высоких и низких температур зависит от фун-

кциональной активности центральных NO-зависимых механизмов и процессов. Показано также, что в условиях гипертермии, вызываемой пирогенами, NO может участвовать в центральных механизмах терморегуляции как один из компонентов эндогенной антипиретической системы.

Таким образом, литературные данные свидетельствуют о том, что NO, выделяемый CNO-позитивными нервными клетками, участвует в становлении структуры и функции нервной системы в онтогенезе [4], а во взрослом организме — в центральной регуляции большинства физиологических функций. Однако роль этого низкомолекулярного передатчика в становлении функциональных систем, в частности системы терморегуляции, остается малоизученной. Выяснение роли NO мозга в развитии системы терморегу-

гуляции в онтогенезе гомойотермных животных позволило бы получить данные, необходимые для понимания общих принципов становления функциональных систем с участием полифункциональных молекул.

Цель данной работы — изучение особенностей созревания NO-эргических систем ствола головного мозга в раннем постнатальном онтогенезе у цыплят как представителей гомойотермных животных.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 48 цыплятах и 6 взрослых особях. В первую группу вошли цыплята в возрасте 1 день, во вторую группу — в возрасте 3 дня, в третью группу — в возрасте 10 дней, в четвертую группу — в возрасте 20 дней.

Специальные исследования убедительно доказали, что нейронная синтаза NO (CNO) является никотинамидаденинди-нуклеотидфосфат-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, что при фиксации с использованием параформальдегида инактивируются все НАДФН-зависимые ферменты-окислители, за исключением CNO [8]. Таким образом, при условии фиксации ткани в параформальдегиде гистохимическая реакция на НАДФН-д для идентификации NO-синтезирующих нервных клеток является адекватным методом и широко применяется в настоящее время.

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

Для выделения гипоталамуса у животных целиком извлекали головной мозг. Отделяли гипоталамус и дополнительно

фиксируют, согласно рекомендации T. Matsumoto et al. [7], в течение 90 минут в 4 % параформальдегиде на фосфатном буфере (0,1 М, pH 7,4). Участки мозга шесть раз по 30 минут отмывали на холоде с использованием 0,1 М раствора Трис-НСI (pH 8,0) и инкубировали в 10 % и 25 % растворах сахарозы на Трис-НСI (0,1 М, 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 М растворе Трис-НСI (pH 8,0) в течение 5 минут. Гистохимическая процедура заключалась в инкубации срезов в растворе 0,1 М Трис-НСI (pH 8,0), содержащем НАДФН (1 мМ), нитросиний тетразолий (0,5 мМ), Тритон X-100 (0,3 %) и дикумарол (0,1 мМ), на протяжении 1–2 часа 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 НАДФН вместо НАДФН. Химическая основа реакции — образование 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 НАДФН вместо НАДФН.

Структуры гипоталамуса и продолговатого мозга идентифицировали при помощи стереотаксического атласа Orlan M. Junzy & Richard F. Phillips.

Опыты показали, что гипоталамическая область головного мозга кур содержит большое количество НАДФН-д/CNO-позитивных нейронов.

В первые дни и недели после рождения в этой области происходят значительные изменения в распределении НАДФН-д/CNO-позитивных нейронов (табл. 1).

При изучении серийных срезов гипоталамуса цыплят в возрасте 1 день обнаружены НАДФН-д/CNO-позитивные нейроны в латеральной преоптической области, паравентрикулярном ядре, латеральной гипоталамической области, латеральном маммиллярном и супрамаммиллярном ядрах.

У цыплят в возрасте 1 день не обнаружены НАДФН-д/CNO-позитивные нейроны в ряде структур гипоталамуса, содержащих такие нейроны у взрослых организмов. Так, не обнаружены НАДФН-д/CNO-позитивные нейроны в медиальной преоптической области, супраоптическом, перивентрикулярном, медиальном маммиллярном, дорсомедиальном и вентромедиальном ядрах.

У цыплят в возрасте 3 дня, так же как и у однодневных цыплят, гипоталамус не содержит НАДФН-д/CNO-позитивных нейронов в медиальной преоптической области, супраоптическом и перивентрикулярном ядрах.

Гипоталамическая область головного мозга трехдневных цыплят содержит НАДФН-д/CNO-позитивные нейроны в тех же структурах, что и у однодневных (в латеральной преоптической области, паравентрикулярном ядре, латеральной гипоталамической области, латеральном маммиллярном и супрамаммиллярном ядрах). НАДФН-д/CNO-позитивные нейроны обнаружены также в медиальном маммиллярном, дорсомедиальном и вентромедиальном ядрах.

В период между третьим и десятым днем жизни формируются характерные для взрослого организма основные черты в распределении НАДФН-д/CNO-позитивных нейронов гипоталамической области. Так, у десятидневных цыплят выявляются НАДФН-д/CNO-позитивные нейроны почти во всех структурах гипоталамуса, содержащих такие нервные клетки у взрослых птиц. В отличие от третьего дня, к 10-му дню развития НАДФН-д/CNO-позитивные нейроны появляются в перивентрикулярном ядре. Обнаружено, что гипоталамус десятидневного цыпленка не содержит НАДФН-д/CNO-позитивных клеток в супраоптическом ядре.

Крупные, интенсивно окрашенные

Таблица 1

Распределение нервных клеток, содержащих НАДФН-д / CNO, в структурах гипоталамуса у цыплят в разные сроки постнатального онтогенеза

Структура	1-й день	3-й день	10-й день	20-й день
Medial preoptic area	-	-	+	+
Lateral preoptic area	+	+	+	+
Supraoptic nucleus	-	-	-	+
Paraventricular nucleus	+	+	+	+
N. ventromedialis	-	+	+	+
N. dorsomedialis	-	+	+	+
Periventricular nucleus	-	-	+	+
Lateral hypothalamic area	+	+	+	+
Medial mammillary nucleus	-	+	+	+
Lateral mammillary nucleus	+	+	+	+
Supramammillary nucleus	+	+	+	+

Здесь и в табл. 2: «+» – структура содержит НАДФН-д /CNO-позитивные нервные клетки; «-» – структура не содержит НАДФН-д /CNO-позитивные нервные клетки.

Таблица 2

Распределение нервных клеток, содержащих НАДФН-д/CNO, в продолговатом мозге у цыплят в разные сроки постнатального онтогенеза

Структура	1-й день	3-й день	10-й день	20-й день
Paragigantocellular reticular nucleus	+	+	+	+
Gigantocellular reticular nucleus	+	+	+	+
Medial vestibular nucleus	+	+	+	+
Nucleus tractus solitarii	+	+	+	+
Paratrigeminal nucleus	+	+	+	+
Paramedian reticular nucleus	+	+	+	+
Cuneate nucleus	+	+	+	+
Reticular nucleus medulla dorsal	+	+	+	+
Reticular nucleus medulla ventral	+	+	+	+

НАДФН-д/CNO-позитивные нейроны являются в супраоптическом ядре в период между десятым и двадцатым днем после вылупления. Таким образом, не существует различий в распределении НАДФН-д/CNO-позитивных нейронов в гипоталамусе 20-дневного цыпленка по сравнению со взрослыми птицами. 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 цыплят.

При изучении серийных срезов продолговатого мозга, окрашенных на НАДФН-д, у цыплят в разные сроки после

рождения НАДФН-д/CNO-позитивные нервные клетки обнаружены во всех изучаемых структурах (табл. 2).

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

Результаты выполненных исследований свидетельствуют о том, что у птиц в раннем постнатальном онтогенезе появление предполагаемых NO-синтезирующих нервных клеток в ряде структур гипоталамической области мозга совпа-

дает по времени со становлением температуры тела, характерной для взрослых животных (рисунок).

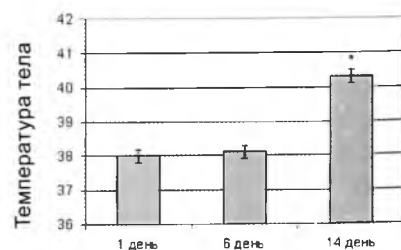
Таким образом, функциональное созревание NO-зависимых механизмов, участвующих в терморегуляции, в онтогенезе у цыплят завершается к 14-му дню, что подтверждается морфологическими исследованиями, указывающими на формирование основных черт в распределении нервных клеток, содержащих CNO в гипоталамической области, между 3-м и 10-м днем жизни (табл. 1).

Обсуждение результатов

Предпосылкой к постановке задач настоящего исследования служили 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.

Установлено, что в первые дни и недели после рождения у цыплят 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 цыпленка.

Можно предполагать, что становление NO-зависимых систем в гипоталамусе у птиц играет немалую роль в развитии системы терморегуляции, поскольку полученные результаты хорошо коррели-



Становление температуры тела, характерной для взрослых животных, в раннем постнатальном онтогенезе (1, 6 и 14 дней после рождения) у цыплят

руют с данными о том, что температура тела у цыплят, характерная для взрослых животных, устанавливается к 14-му дню жизни.

Итак, начальное становление системы терморегуляции в процессе индивидуального развития цыплят может быть связано с развитием NO-зависимых систем нервных центров гипоталамуса.

Полученные результаты дополняют существующие представления о механизмах становления терморегуляции в онтогенезе у гомойотермных животных

и будут способствовать дальнейшему углубленному изучению проблемы участия монооксида азота в развитии системных функций.

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.