

УДК 611.814.1:612.432

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОЗРЕВАНИЕ NO-ЗАВИСИМЫХ СИСТЕМ В ОНТОГЕНЕЗЕ

В.И. Дунай, К.Б.Н.

Кафедра психофизиологии гуманитарного факультета
УО «Белорусский государственный университет»

Целью данной работы явилось изучение особенностей созревания NO-эргических систем мозга в раннем постнатальном онтогенезе, а также изучение влияния ингибитора синтазы NO, введенного в неонатальном периоде, на становление устойчивой температуры тела, деятельность сердечно-сосудистой и ноцицептивной систем у взрослых животных. В ходе выполненных экспериментов установлено, что NO в неонатальном периоде участвует в развитии механизмов, ответственных за становление устойчивой температуры тела, характерной для взрослых животных, и изменении температуры тела в течение суток, а также принимает участие в становлении ноцицептивной системы.

Ключевые слова: онтогенез, NO-синтеза, гипоталамус.

The aim of this work was studying specialties of maturation of NO-ergic systems of a brain in an early postnatal ontogenesis, and also studying of effect of synthase NO inhibitor, injected in the neonatal period, on a founding of a resistant body temperature, on an activity cardiovascular and nociceptive systems to mature animals. During the executed experiments it was positioned, that NO in the neonatal period participates in evolution of the mechanisms which are responsible for a founding of a resistant body temperature, concerning with mature animals, and changing of a body temperature during the day, and also shares in a becoming of nociceptive system.

Keywords: ontogenesis, NO-synthesis, hypothalamus.

Имеющиеся в литературе данные указывают на то, что монооксид азота (NO) является нейромедиатором и нейромодулятором в нервной системе [1, 2]. Он является одним из важнейших факторов, обеспечивающих развитие нервной системы. NO является эффекторной молекулой, вызывающей гибель определенных клеточных структур, а также играет важную роль в механизмах роста нервных окончаний и формирования синаптических контактов [3]. Указывается на участие NO в центральных механизмах регуляции важных автономных функций: дыхания и кровообращения [5]. Показано, что N^G-метил-L-аргинин, ингибитор CNO, при системном введении стимулирует активность симпатического почечного нерва как примера вазоконстрикторного нерва [7]. Сходные результаты были получены и при центральном введении ингибитора NO-синтазы. 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 нейрохимических 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 функциональной активности центральных NO-зависимых механизмов и процессов. В условиях гипертермии, вызываемой пирогенами, NO может участвовать и 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, о чем свидетельствуют немногочисленные, но убедительные данные [4], а также у взрослого организма принимает участие в центральной регуляции большинства физиологических функций. Однако, несмотря на это, роль данного низкомолекулярного передатчика в становлении функциональных систем, в частности, системы терморегуляции, остается не изученной. Выяснение роли NO мозга в развитии системы терморегуляции в онтогенезе гомойотермных животных позволило бы получить данные, необходимые для понимания общих принципов становления функциональных систем с участием низкомолекулярных полифункциональных молекул.

Целью данной работы явилось изучение особенностей созревания NO-эргических систем мозга в раннем постнатальном онтогенезе у морских свинок, как представителей зрелорождающихся млекопитающих, а также изучение влияния ингибитора синтазы NO, введенного в неонатальном периоде, на становление устойчивой температуры тела, деятельность сердечно-сосудистой и ноцицептивной систем у взрослых животных.

Материалы и методы исследования

Для изучения структурного созревания NO-ергической системы мозга в качестве объекта исследования использовались морские свинки (24 животных). 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 был использован метод идентификации содержащих NOC/НАДФН-d нейронов, разработанный Scherer-Singler et al. (1983) [9]. Для выделения гипоталамуса и продолговатого мозга у морских свинок после трепанации черепа целиком извлекали головной мозг. Отделяли гипоталамус и продолговатый мозг и фиксировали, согласно рекомендации Matsumoto et al. (1993), 60–90 минут в 4% параформальдегиде на фосфатном буфере (0,1 М, рН 7,4). Гистохимическая процедура заключалась в инкубации микротомных срезов (25 мкм) в растворе 0,1М Трис-НСI (рН 8), содержащем НАДФН (1мМ), нитросиний тетразолий (0,5мМ), Тритон X-100 (0,3 %) на протяжении 1–2 часов при температуре 22°C.

Для изучения функционального созревания NO-ергической системы в качестве объекта исследования использовались крысы (64 животных). Первой группе животных (32 крысы) вводили подкожно L-МЭНА в дозе 750 мг/кг двухкратно на первом и третьем дне жизни. Второй контрольной группе (32 крысы) вводили подкожно D-МЭНА в дозе 750 мг/кг двухкратно на первом и третьем дне жизни. Когда животные достигали двухмесячного возраста, им для измерения температуры тела вживлялись телеметрические датчики. Температура тела регистрировалась с помощью телеметрической установки. Когда животные достигали трехмесячного возраста, у них регистрировалась частота сердечных сокращений, измерялось внутрижелудочковое давление и проводилось определение латентного периода рефлекса отдергивания хвоста в ответ на тепловое ноцицептивное раздражение.

Для определения частоты сердечных сокращений использовали телеметрическую установку MINI MITTER (США). Для измерения температуры тела использовались телеметрические датчики MINI MITTER, а также электротермометр ТПЭМ-1. С целью оценки болевой чувствительности проводилось измерение латентного периода рефлекса отдергивания хвоста у крыс по общепринятой методике. Биомеханическую активность сердца регистрировали с помощью многоканального поликардиографа «Мингограф-81» (Элема, Швеция). Измеряли и анализировали частоту сердечных сокращений (ЧСС, сокр./мин), максимальное давление в левом желудочке сердца (P_{\max} , мм рт. ст.). Крыс наркотизировали внутрибрюшинно тиопентал-натрием (80 мг/кг). Достоверность статистических различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты исследования

Опыты показали, что у морских свинок в первые дни после рождения в гипоталамической об-

ласти происходят значительные изменения в распределении нервных клеток, содержащих НАДФН-диафоруза/НOC. Так, между третьим и десятым днем жизни морских свинок формируются основные черты в распределении нервных клеток, содержащих NO-синтазу, характерных для взрослого организма (табл. 1). Установлено также, что значительных изменений в распределении NO-синтезирующих нервных клеток в продолговатом мозге не происходит. По-видимому, уже до рождения завершается формирование NO-зависимых систем нервных центров продолговатого мозга, структурное и функциональное развитие которых должно обеспечивать в первые дни жизни важнейшие вегетативные функции.

Таблица 1 — Распределение нервных клеток, содержащих НАДФН-диафоруза/НOC 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	–	–	+	+
6.	Lateral hypothalamic area	+	+	+	+
7.	Medial mammillary nucleus	–	+	+	+
8.	Supramammillary nucleus	+	+	+	+

"+" — структура содержит НАДФН-диафоруза/НOC-позитивные нервные клетки;
 "–" — структура не содержит НАДФН-диафоруза/НOC-позитивные нервные клетки.

Установлено, что у крыс, которым на первых днях жизни вводили ингибитор CNO, становление температуры тела, характерное для взрослых животных, наблюдалось позже, чем у контрольных крыс. Так у 12, 14, 16 и 18-дневных крысят, которым вводили L-МЭНА на первый и третий день жизни, температура тела была $35,9 \pm 0,41^\circ\text{C}$, $35,4 \pm 0,42^\circ\text{C}$, $36,0 \pm 0,23^\circ\text{C}$ и $36,2 \pm 0,17^\circ\text{C}$, соответственно, в то время как у контрольных животных она составляла $37,1 \pm 0,25^\circ\text{C}$, $37,3 \pm 0,24^\circ\text{C}$, $36,7 \pm 0,18^\circ\text{C}$ и $37,1 \pm 0,22^\circ\text{C}$ (рис. 1). Температура тела крыс, которым в раннем онтогенезе ингибировали CNO, достигала значений, характерных для контрольных животных, лишь к 20-му дню постнатального онтогенеза (рис. 1).

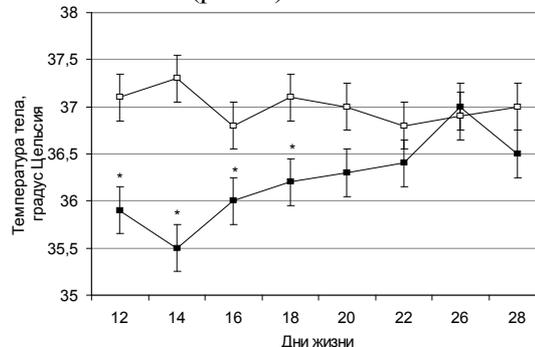


Рисунок 1 — Температура тела у крыс в разные сроки постнатального онтогенеза после подкожного введения ингибитора синтазы NO (L-МЭНА) двухкратно на первый и третий день жизни:

□ — контроль, (D-МЭНА, 750 мг/кг, n = 8);
 ■ — опыт, (L-МЭНА, 750 мг/кг, n = 8);
 n — число животных в опыте;

* — изменения достоверны по отношению к контролю: $p << 0,05$.

Установлено, что суточная температура тела у животных, которым в раннем постнатальном онтогенезе вводили D-МЭНА, колебалась незначительно и была в пределах $37,5 \pm 0,34$ °C. У животных, у которых в раннем постнатальном онтогенезе ингибировалась синтаза NO, суточные колебания температуры были более выражены, чем у контрольных, и температура тела ночью (с 23 ч. до 1 ч.) достигала $38,5 \pm 0,13$ °C, что было на 1 °C выше, чем у контрольных животных. Таким образом, можно предполагать, что NO в раннем постнатальном онтогенезе принимает участие в развитии механизмов, ответственных за изменение температуры тела в течение суток (рис. 2).

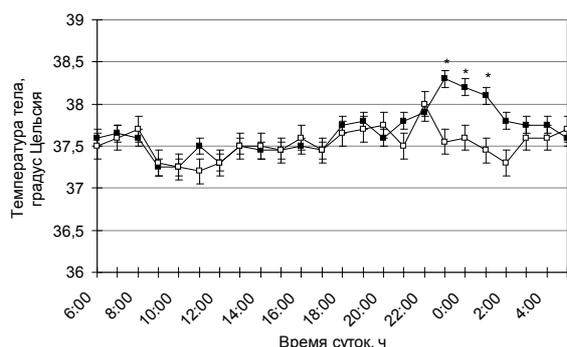


Рисунок 2 — Влияние ингибитора синтазы NO (L-МЭНА), введенного на первый и третий день жизни, на изменения температуры тела в течение суток у взрослых крыс:

□ — контроль, (D-МЭНА, 750 мг/кг, n=8);

■ — опыт, (L-МЭНА, 750 мг/кг, n=8);

n — число животных в опыте;

* — изменения достоверны по отношению к контролю: $p < 0,05$

Для воспроизведения общепринятой модели эмоционально-ориентировочной реакции, сопровождающейся повышением температуры тела, крыс помещали в «открытое поле». В ходе выполненных экспериментов установлено, что выраженность гипертермии при эмоционально-ориентировочной реакции в «открытом поле» у животных, которым в раннем постнатальном онтогенезе ингибировали синтазу NO, и у контрольных была сходной.

Таким образом, ингибирование синтазы NO в неонатальном периоде не проявляется выраженной гипертермией при эмоционально-ориентировочной реакции.

У животных, которым в неонатальном периоде вводился L-МЭНА, частота сердечных сокращений в трехмесячном возрасте не отличалась от таковой у контрольных крыс. Однако у взрослых крыс, которым на первых днях жизни ингибировали CNO, в трехмесячном возрасте латентный период реакции отдергивания хвоста на болевой раздражитель составлял $4 \pm 0,47$ с, в то время как у животных, которым на первых днях жизни вводили D-МЭНА, он составлял $13 \pm 1,2$ с. Эти данные могут свидетельствовать о том, что в неонатальном периоде NO не только участвует в развитии системы терморегуляции, но и вовлекается в становление ноцицептивной системы.

Проведенные исследования показали, что у животных, которым на раннем этапе постэмбрионального развития вводили ингибитор NO-синтазы, частота сердечных сокращений не отличалась от таковой в контроле, однако максимальное внутрижелудочковое давление сердца существенно изменялось. P_{max} у экспериментальных крыс было на 30 % меньше, чем у контрольных животных (табл. 2).

Таблица 2 — Функциональные показатели сердца зрелых крыс после применения ингибитора NO-синтазы на раннем этапе постнатального онтогенеза

Показатели	ЧСС, сок./мин	P_{max} , мм рт. ст.
Контроль	$294,8 \pm 9,2$	$120,6 \pm 6,4$
После применения L-NAME	$282,1 \pm 7,3$	$92,0 \pm 4,7^*$

Примечание: * — различия достоверны по отношению к контролю при $P < 0,05$.

Обсуждение результатов

Результаты исследований, описанные выше, свидетельствуют в пользу высказанной гипотезы, согласно которой NO может играть важную роль в становлении механизмов регуляции теплообмена в онтогенезе. Важно было изучить, как влияет ингибитор синтазы NO, введенный в неонатальном периоде, на становление устойчивой температуры тела, а также терморегуляцию, деятельность сердечно-сосудистой и ноцицептивной систем у взрослых животных. Предполагалось, что на основе полученных данных будет составлено представление о тех механизмах, в развитии которых участвует NO в раннем постнатальном онтогенезе.

Установлено, что у крыс, которым на первых днях жизни вводили ингибитор CNO, становление температуры тела, характерное для взрослых животных, наблюдалось позже, чем у контрольных крыс. Температура тела крыс, которым в раннем онтогенезе ингибировали CNO, достигала значений, характерных для контрольных животных, лишь к 20-му дню постнатального онтогенеза.

Установлено, что суточная температура тела у животных, которым в раннем постнатальном онтогенезе вводили D-МЭНА, колебалась незначительно. У животных, у которых в раннем постнатальном онтогенезе ингибировалась синтаза NO, суточные колебания температуры были более выражены, чем у контрольных, и температура тела ночью (с 23 ч. до 1 ч.) была на 1 °C выше, чем у контрольных животных.

Таким образом, можно предполагать, что NO в раннем постнатальном онтогенезе принимает участие в развитии механизмов, ответственных за изменение температуры тела в течение суток.

Установлено, что выраженность гипертермии при эмоционально-ориентировочной реакции в «открытом поле» у животных, которым в раннем постнатальном онтогенезе ингибировали синтазу NO, не отличалась от таковой у контрольных животных.

Поскольку было установлено, что NO может принимать участие в становлении терморегуляции

в онтогенезе, и принимая во внимание имеющиеся в литературе сведения, указывающие, что NO, синтезируемый нервными клетками структур ствола головного мозга, обладает способностью оказывать гипотензивное действие за счет центрального торможения тонуса сосудосуживающих симпатических нервов, необходимо было определить, в какой степени этот передатчик вовлекается в развитие других функциональных систем. В отдельной серии исследований было изучено влияние ингибитора CNO, вводимого в неонатальном периоде, на частоту сердечных сокращений. Так как полученные в последние годы данные свидетельствуют о том, что NO может являться одним из медиаторов в передаче ноцицептивной информации и в определенных условиях может принимать участие в развитии гипералгезии, следовало изучить влияние ингибирования синтазы NO в неонатальном периоде на развитие нервных структур, вовлеченных в ноцицептивную систему.

У животных, которым в неонатальном периоде вводился L-МЭНА, частота сердечных сокращений в трехмесячном возрасте не отличалась от таковой у контрольных крыс. Однако у взрослых крыс, которым на первых днях жизни ингибировали CNO, в трехмесячном возрасте латентный период реакции отдергивания хвоста на болевой раздражитель был достоверно меньше, чем у животных, которым на первых днях жизни вводили D-МЭНА. Эти данные могут свидетельствовать о том, что в неонатальном периоде NO не только участвует в развитии системы терморегуляции, но и вовлекается в становление ноцицептивной системы.

Таким образом, полученные данные дают достаточные основания полагать, что NO в неонатальном периоде участвует в развитии механизмов, от-

ветственных за становление устойчивой температуры тела, характерной для взрослых животных, и изменении температуры тела в течение суток, а также принимает участие в становлении ноцицептивной системы.

Литература

1. Реутов, В. П. Цикл окиси азота в организме млекопитающих // Успехи биологической химии / В. П. Реутов. — 1995. — Т. 35. — С. 189–228.
2. Bredt, D. S. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide / D. S. Bredt, P. M. Hwang, S. H. Snyder // Nature. — 1990. — V. 347. — P. 768–770.
3. Dawson, T. M. Gases as biological messengers: Nitric oxide and carbon monoxide in the brain / T. M. Dawson, S. H. Snyder // J. Neurosci. — 1994. — Vol. 14. — P. 5147–5159.
4. Galea, E. Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures / E. Galea, D. L. Feinstein, D. J. Reis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1992. — Vol. 89, N. 22. — P. 10945–10949.
5. Goodson, A. R. Inhibition of nitric oxide synthesis augments centrally-induced sympathetic coronary vasoconstriction in cats / A. R. Goodson, J. M. Leibold, D. D. Gutterman // Circulation. — 1992. — Vol. 86, N. 4. — P. 509.
6. Gourine, A. V. Does central nitric oxide play a role in thermoregulation? / A. V. Gourine // In: Thermal balance in health and disease: Recent basic research and clinical progress / Eds. E. Zeisberger, E. Schonbaum, P. Lomax. Birkhauser Verlag AG. — 1994. — P. 491–495.
7. Sakuma, I. N^G-Methyl-L-arginine, an inhibitor of L-arginine-derived nitric oxide synthesis, stimulates renal sympathetic nerve activity in vivo — a role for nitric oxide in the central regulation of sympathetic tone / I. Sakuma, S. S. Gross, R. Levi // Circulation Res. — 1992. — Vol. 70, N. 3. — P. 607–611.
8. Togashi H., Yasuda H., Levi R. A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation / H. Togashi, H. Yasuda, R. Levi // J. Pharmac. Exp. Ther. — 1992. — Vol. — 262. — P. 343–347.
9. Scherer-Singler, U. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry / U. Scherer-Singler, S. R. Vincent, H. Kimura // J. Neurosci. Methods. — 1983. — Vol. 9, N. 3. — P. 229–234.

Поступила 07.03.07