

УДК 611.814.1:575.332)-092.9

ИЗМЕНЕНИЯ В РАСПРЕДЕЛЕНИИ НЕЙРОНОВ, СОДЕРЖАЩИХ СИНТАЗУ NO В ГИПОТАЛАМУСЕ И ПРОДОЛГОВАТОМ МОЗГЕ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ У ЗРЕЛОРОЖДАЮЩИХСЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

В.И. Дунай, К.Б.Н.

Кафедра психофизиологии гуманитарного факультета
УО «Белорусский государственный университет»

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-синтаза, гипоталамус.

It has been found out that in guinea-pigs the basic features in the distribution of probable NO-synthesizing nerve cells have been formed by the twentieth day of the postnatal development. These features are typical of the adult organism.

Keywords: ontogenesis, NO-synthesis, hypothalamus.

Оксид азота (NO) является одним из наиболее важных биологических медиаторов, который вовлечен во множество физиологических и патофизиологических процессов. Он представляет собой уникальный по своей природе и механизмам действия вторичный мессенджер в большинстве клеток организма. В частности, оксид азота участвует в реализации многих физиологических функций, таких как вазодилатация, нейротрансмиссия, снижение агрегации тромбоцитов, реакции иммунной системы, регуляция тонуса гладких мышц, состояние памяти и др., а также некоторых патологических процессов [1-4]. В организме NO синтезируется клетками из аминокислоты L-аргинин [5, 6]. Этот процесс представляет собой комплексную окислительную реакцию, катализируемую ферментом синтазой NO (CNO), которая присоединяет молекулярный кислород к конечному атому азота в гуанидиновой группе L-аргинина.

Данные литературы свидетельствуют, что NO-синтезирующие нейроны широко распространены в ЦНС млекопитающих [7]. 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 [8]. Получены доказательства участия NO в центральных механизмах терморегуляции при перегревании и экспериментальной лихорадке [9].

Несмотря на обилие фактов, свидетельствующих об участии NO в регуляции различных физио-

логических 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.

Материалы и методы исследования.

Эксперименты выполнены на 32 морских свинках. Первая группа – животные в возрасте 1 дня, вторая группа – в возрасте 3 дней, третья группа – в возрасте 10 дней, четвертая – в возрасте 20 дней.

Специальными исследованиями было доказано, что нейронная синтаза NO является никотинамиддениндинуклеотидфосфат-диафоразой (НАДФН-д) [10]. 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 для идентификации CNO-содержащих нейронов возможно только при условии, что исследуемая ткань проходит фиксацию в параформальдегиде. Установлено [10], что при фиксации с использованием параформальдегида инактивируются все НАДФН-зависимые ферменты-окислители, за исключением CNO. Таким об-

разом, 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. [11], в модификации Норе и Vincent [12].

Для выделения гипоталамуса у животных целиком извлекали головной мозг. Отделяли гипоталамус и продолговатый мозг и дополнительно фиксировали, согласно рекомендации Matsumoto et al. [13] 90 минут в 4% параформальдегиде на фосфатном буфере (0.1M, pH 7.4). Участки мозга шесть раз по 30 мин. 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 (0,1M, pH8,0) 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 мин. Гистохимическая процедура заключалась в инкубации срезов в растворе 0,1 M Трис-НСI (pH 8,0), содержащем НАДФН (1 мМ), нитросиний тетразолий (0.5 мМ), Тритон X-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-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 формазана при восстановлении солей тетразолия НАДФН-диафоразой 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 об-

ласти происходят значительные изменения в распределении нервных клеток, содержащих НАДФН-д/CNO (таблица).

Таблица. Распределение нервных клеток, содержащих НАДФН-д/CNO, 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-д/CNO-позитивные нервные клетки;
«-» - структура не содержит НАДФН-д/CNO-позитивные нервные клетки.

При изучении серийных срезов гипоталамуса морских свинок в возрасте одного дня после рождения обнаружены НАДФН-д/CNO-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/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 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/CNO-позитивных нейронов в супраоптическом ядре и перивентрикулярном ядре.

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

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 ги-

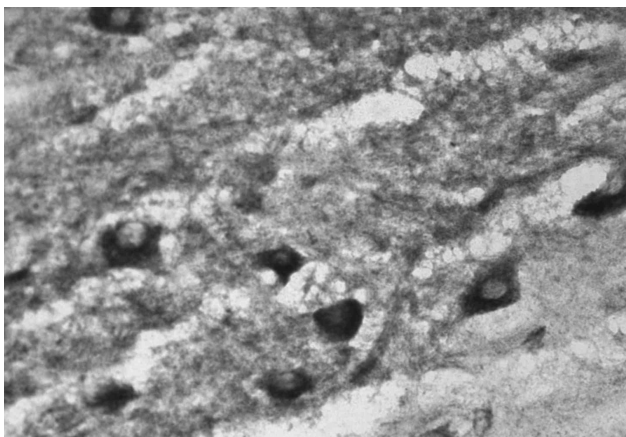


Рисунок – НАДФН-д-позитивные нервные клетки в переднем гипоталамусе морской свинки. Микрофото (x100)

поталамус 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 с взрослыми животными (рисунок).

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 которых должно обеспечивать в первые дни жизни важнейшие вегетативные функции (дыхание, кровообращение).

Обсуждение результатов

В ходе выполненных экспериментов установлено, что в первые дни после рождения у морских свинок в гипоталамической области происходят значительные изменения в распределении НАДФН-д/CNO-позитивных нервных клеток. 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 зрелорождающихся млекопитающих.

Литература

1. Lowenstein C.J., Dinerman J.L., Snyder S.H. Nitric oxide: a physiologic messengers. *Ann. intern.Med.* – 1994. – Vol. 120. – P. 227-237.
2. Moncada S., Higgs A. Mechanisms of disease: the L-arginine - nitric oxide pathway. *New Engl.J.Med.* – 1993. – Vol. 329. – P. 2002-2012.
3. Nakaki T. Physiological and clinical significance of NO (nitric oxide) - a review. *Keio J.Med.* – 1994. – Vol. 43. – P. 15-26.
4. Snyder S.H. Janus faces of nitric oxide. *Nature.* – 1993. – Vol. 364. – P. 577.
5. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* – 1992. – Vol. 6. – P. 3051-3064.
6. Wang Y., Marsden P.A. Nitric oxide synthases: biochemical and molecular regulation. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* – 1995. – Vol. 4. – P. 12-22.
7. 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.
8. Gourine A. V. Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced fever in conscious rabbits// *J.Physiol.* – 1994. – Vol. 475. – P.28.
9. 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.
10. Pasqualotto B. A., Hope B. T., Vincent S. R. Citrulline in the rat brain - immunohistochemistry and coexistence with NADPH-diaphorase// *Neurosci.Lett.* –1991. – Vol. 128, N.2. – P. 155–160.
11. 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.
12. Hope B. T., Vincent S.R. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase // *J.Histochem.Cytochem.*–1989. – Vol.37. – P.653–661.
13. Matsumoto T., Kuk J. E., Forstermann U. A correlation between soluble brain nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase activity is only seen after exposure of the tissue to fixative// *Neurosci.Lett.* – 1993. – Vol. 155, N.1. – P. 61–64.

Поступила 27.08.07