

Wpływ długotrwałego niedotlenienia na gęstość optyczną receptorów μ -opiodowych w mózgu płodów szczurzych

Influence of chronic hypoxia on optical density of μ -opioid receptors in fetal rat brain

Janusz Jacek Kraczkowski, Katarzyna Karwasik-Kajszczyk, Jacek Marcin Robak

Katedra i Klinika Położnictwa i Patologii Ciąży, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Polska

Streszczenie

Mózg płodu jest najważniejszym organem, jaki decyduje o późniejszej jakości życia człowieka. Obserwuje się występowanie zmian w zachowaniu u potomstwa narażonego na niedotlenienie w okresie ciąży, wywołane zmianami w komórkach nerwowych mózgu płodu. U płodów narażonych na działanie podwyższonego poziomu opiodów stwierdza się zmiany strukturalne w tkance mózgowej.

Cel pracy: Celem pracy było określenie wpływu długotrwałego niedotlenienia w ciąży na ekspresję receptorów μ -opiodowych w wybranych strukturach mózgu płodów szczurzych obu płci.

Materiał i metody: W badaniu określano gęstość optyczną receptorów μ -opiodowych w mózgu płodów szczurzych w 21. dniu ciąży (E-21) pod wpływem długotrwałego niedotlenienia stosowanego od 15. do 21. ciąży (E-15 do E-21). Gęstość optyczną receptorów mierzono w wybranych regionach mózgu: kompleksie jądra ogoniastego i skorupy (Caudate Putamen- CPu), strefie rozrodczej (Zona Germinata- ZG), jądrze półleżącym (Nucleus Accumbens- NA), wzgórkę węchowym (Olfactory Tubercle- OT), polu przedwzrokowym przyśrodkowym (Median Part Medial Preoptic Area- MMPoA) oraz polu przedwzrokowym bocznym (Lateral Part Medial Preoptic Area- LMPoA) i odnosiła się ona do odpowiadających wartości wiązań radioizotopu. Anatomiczną weryfikację lokalizacji receptorów przeprowadzono przez porównywanie autoradiograficznego obrazu komputerowego z odpowiadającym mu obrazem mikroskopowym preparatu skrawków mózgu. Zastosowanie modelu doświadczalnego w połączeniu z metodą autoradiografii, pozwoliło precyzyjnie ocenić zmiany w komórkach mózgowych płodu szczurzego pod wpływem niedotlenienia oraz mechanizmy adaptacji ośrodkowego układu nerwowego w odpowiedzi na niedotlenienie.

Wyniki: Stwierdzono, że długotrwałe niedotlenienie istotnie obniża wartość gęstości optycznej receptorów μ -opiodowych w kompleksie jądra ogoniastego i skorupy oraz strefie rozrodczej poprzez wpływ na stężenie endogennych peptydów opiodowych w mózgu płodów szczurzych ($p < 0.05$).

Adres do korespondencji:

Janusz Jacek Kraczkowski
Katedra i Klinika Położnictwa i Patologii Ciąży, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Polska, 20-081 Lublin, ul. Staszica 16
tel./fax. 81 5326612
e-mail: jacek@umlub.pl

Otrzymano: 18.11.2013
Zaakceptowano do druku: 14.05.2014

Janusz Jacek Kraczkowski et al. Wpływ długotrwałego niedotlenienia na gęstość optyczną receptorów μ -opiodowych w mózgu płodów szczurzych.

Wnioski: Takie wyniki ekspresji receptorów μ -opiodowych w wybranych strukturach mózgu płodu szczurzego związanych z zachowaniami seksualnymi można łączyć ze zmianami w zachowaniu zwierząt doświadczalnych po przebytych narażeniu na niedotlenienie w okresie ciąży.

Słowa kluczowe: **mózg / receptory μ -opiodowe / niedotlenienie / ciąża /
/ autoradiografia /**

Abstract

Fetal brain is considered to be the major body organ, critical for the future quality of human life. Offspring exposed to prenatal hypoxia has been evidenced to experience behavioral abnormalities as a result of the injury sustained by neuronal cells in the brain. The relatively early appearance of opioid receptors proved susceptible to endogenous and exogenous factors. Increased concentrations of neurotransmitters in the maternal circulation and amniotic fluid induced by hypoxic exposure imply their role in the regulation of cellular division and differentiation processes. Endogenous neuropeptides and specific opioid receptors are distributed in those brain structures that are associated with behavior and reproduction. Fetuses exposed to the adverse effects of increased opioid level incur structural brain tissue abnormalities.

Objectives: The present study seeks to determine the effects of long-term hypoxic exposure during gestation on the expression of opioid receptors in specific brain regions in both sexes. **Material and methods:** The study was conducted on pregnant Sprague-Dawley rats, (120 days old, body weight between 250 and 300 g). Experiments were carried out in order to determine the effect of long-term hypoxia on μ -opioid receptor density in selected structures of fetal central nervous system: caudate-putamen (CPu), zona germinata (ZG), nucleus accumbens (NA), olfactory tubercle (OT), Median Part Medial Preoptic Area (MMPoA) and Lateral Part Medial Preoptic Area (LMPoA). Pregnant female rats were assigned to two research groups: the control group (N=6) and the experimental group subject to prolonged hypoxia for 24 hours from the gestational day 15 to gestational day 20 (E-15- E20). At E-21 rats were sacrificed, their fetuses were removed and their brains were incubated with radioligands. The μ -opioid receptor incubation in selected brain structures was performed with a specific radioisotope [3 H]DAMGO [tyrosyl-3,5,- 3 H(N)-D-Ala-Gly-N-methyl-Phe-Gly-enkephalin]. Optical density of μ -opioid receptors was determined at E-21 of gestation during long-term exposure to chronic hypoxia induced from E-15 to E-21 of gestation. Experimental model coupled with an innovative autoradiography allowed for a precise assessment of the lesions sustained by fetal brain tissues due to hypoxia and the adaptive mechanisms of the central nervous system in reaction to hypoxic exposure.

Results: Statistically significant chronic hypoxia ($p < 0.05$) downregulated the values of μ -opioid receptors optical density in relation to control group in CPu and ZG. Chronic hypoxia in ZG substantially reduces the values of μ -opioid receptors optical density in males ($p < 0.05$). The differences among remaining groups did not show to be statistically significant.

Conclusions: The obtained results of μ -opioid receptor expression can be detected in specific fetal brain regions that mediate sexual behavior and may be attributable to behavioral changes of experimental animals due to hypoxic exposure during gestation.

Key words: **brain / μ -opioid / receptors / hypoxia / pregnancy / autoradiography /**

Wstęp

Niedotlenienie to stan niedostatecznego dostępu tlenu we wdychanym powietrzu lub w tkankach z powodu niskiej zawartości lub niskiego ciśnienia parcjalnego tlenu. Stopień niedotlenienia zależy od nasilenia kwasicy, hipoksemii, hiperkapni i ilości zasad. Większość płodów rodzi się z mieszaną formą kwasicy oddechowej i metabolicznej, a średnia wartość pH we krwi tętnicy pępowinowej wynosi 6,92 (SD \pm 0,16), ze średnią wartością zasad 24,1 mM (SD \pm 6,6) [1]. Skutki niedotlenienia dotyczą przede wszystkim ośrodkowego układu nerwowego (OUN) płodu. Niedotlenienie w ciąży zaburza funkcje OUN płodu prowadząc do wystąpienia objawów neurologicznych, zaburzeń kontroli ruchów, nieprawidłowości w zachowaniu się oraz trudności w uczeniu się [2, 3, 4, 5].

Epizody przedporodowego niedotlenienia wpływają na przemiany biochemiczne, neurochemiczne i endokrynologiczne płodów, co prowadzi do zahamowania wewnątrzmacicznego rozwoju płodu, wylewów i krwawień dokomorowych oraz powikłań dotyczących funkcjonowania serca, płuc i mózgu [6].

Podczas epizodów niedotlenienia w OUN płodu pojawiają się zwiększone ilości amin katecholowych, peptydów opiodowych i aminokwasów pobudzających, co wskazuje na czynny udział neuroprzekazników w regulacji procesów zachodzących w komórkach nerwowych. Mechanizmy kompensacyjne płodu początkowo umożliwiają odwrócenie uszkodzeń mózgu, jednak dłużej trwające epizody niedotlenienia przekraczają możliwości adaptacji i prowadzą do trwałych uszkodzeń [7].

Janusz Jacek Kraczkowski et al. Wpływ długotrwałego niedotlenienia na gęstość optyczną receptorów μ -opiodowych w mózgu płodów szczurzych.

W latach 70. XX wieku odkryto receptory błonowe, łączące się z ligandami opiodowymi oraz opisano kilkanaście typów wewnątrzpocho-nych peptydów opiodowych [8,9]. Potwierdzono istnienie receptorów opiodowych w tkance nerwowej [10,11,12] oraz odkryto pierwszy endogen-ny opiod- enkefalinę [9]. Kolej- no znajdowano endogenne peptydy opiodowe i ich prekursor- y związane z wieloma funkcjami w OUN oraz w tkankach obwo- dowych [13, 14, 15]. Zarówno fizjologiczne krótkotrwałe efekty synaptyczne, jak i długotrwałe efekty wzrostu, przeżywalności i plastyczności mózgu zależą od lokalizacji systemów opiodo- wych. Zmiany w zachowaniu pod wpływem opiodów inspi- rują do poszukiwania wysoce wybiórczych receptorów i wewnątrz- pochodnych peptydów opiodowych w mózgu. Wiele badań sugeruje hamujący wpływ enkefaliny [16, 17] i β -endorfiny [18] na wzrost mózgu, podczas gdy blokada receptorów opiodowych przyspie- sza wzrost mózgu i proliferację komórek mózgowych [17, 19, 20, 21]. Met-enkefalina hamuje proliferację komórek mózgowych [22] i mózgowych [23], co może być blokowane przez naltrekson i zależy od czasu trwania blokady receptora [24]. Morfina hamuje syntezę DNA [25], wzrost dendrytów [26] i wyrostków aksonów [27], co może być odwracalne przez podawanie naltreksonu [26]. Efekty te są wywołane za pośrednictwem interakcji peptydów opiodowych ze specyficznymi receptorami μ -opiodowymi. Ich pobudzenie hamuje aktywność komórkową i obniża wydzielanie neuroprze-kaźników [28]. System opiodowy jest systemem ha- mującym, co oznacza, że połączenie się agonisty opiodowego z receptorem opiodowym powoduje hiperpolaryzację, obniżenie poziomu pobudzania włókna nerwowego oraz zahamowanie wy- dzielania hormonów i neuroprze-kaźników. Narażenie w okresie perinatalnym na wewnątrz- i zewnątrzpocho-odne opioidy wpływa na populację komórek nerwowych, co prowadzi do głębokich zmian morfologicznych w mózgu. Zmiany w budowie mózgu pod wpływem morfiny obserwujemy zarówno pre- jak i postna- talnie.

Lokalizacja receptorów w mózgu człowieka może być mie- rzona ilościowo przy użyciu technik z zastosowaniem kome- pencyjnych radioizotopów, zawierających tryt [^3H], a będących agonistami receptorów μ , δ , κ [29]. Główną metodą używaną do lokalizacji receptorów w OUN jest autoradiografia z zasto- sowaniem promieniotwórczego ligandu [30]. W kresomózgowiu wy- sokie nasycenie miejsc wiązania receptora μ -opiodowego obser- wuje się w opuszce węchowej, dodatkowej opuszce węchowej i dodatkowym jądrze węchowym, które są zlokalizowane wysep- kowo i sugerują rolę opiodów w procesie wąchania. Takie samo rozmieszczenie miejsc wiązania jest obecne w jądrze półleżącym przegrody (NA). W kompleksie jądra ogoniastego i skorupy (*Caudate-putamen* – CPu) miejsca wiązania receptora μ -opio- idowego są zlokalizowane wysepkowo, z umiarkowaną gęstością wiązania w macierzy. Ekspresja receptorów μ -opiodowych jest ważnym wyznacznikiem budowy tej struktury [31].

Z klinicznego i patofizjologicznego punktu widzenia, ce- lowym wydaje się poznanie wpływu niedotlenienia w ciąży na rozwój mózgu płodu, a szczególnie tych jego struktur, w których zmiany powodują długotrwałe następstwa w późniejszym życiu, a także wyjaśnienie mechanizmów, odpowiedzialnych za zmiany morfologiczne i czynnościowe w mózgu. Przy zastosowaniu no- woczesnych technik badawczych można wyjaśnić wiele zjawisk zachodzących w ośrodkowym układzie nerwowym płodu pod wpływem niedotlenienia.

Cel pracy

Celem pracy było określenie wpływu długotrwałego niedo- tlenienia w ciąży na ekspresję receptorów μ -opiodowych w wy- branych strukturach mózgu płodów szczurzych obu płci. W tym celu określano gęstość optyczną receptorów μ -opiodowych w móz- gach płodów w 21. dniu ciąży (E-21) pod wpływem niedo- tlenienia długotrwałego stosowanego od 15. do 21. dnia ciąży (E- 15 do E-21). Zastosowanie modelu doświadczalnego w połącze- niu z nowoczesną metodą autoradiografii, pozwoliło precyzyjnie ocenić zmiany w komórkach mózgowych płodu pod wpływem niedotlenienia oraz mechanizmy adaptacji ośrodkowego układu nerwowego w odpowiedzi na niedotlenienie.

Materiał i metody

W badaniu wykorzystano ciężarne samice szczurów rasy Sprague-Dawley (Charles River Laboratory, Portage, Minnesota) w wieku około 120 dni i masie ciała 250-300 g. Badania były prowadzone za zgodą Komisji Bioetycznej Akademii Medyc- nej w Lublinie. Zwierzęta do doświadczeń dobierano losowo po 6 samic w każdej grupie. Zwierzęta przebywały w oddzielnych plastikowych klatkach przy zapewnionym cyklu 12 godzin świa- tło- ciemność, przy dostępie do żywności i wody, w temperatu- rze 23°C i wilgotności powietrza 45-50%. Podczas doświadczeń zwierzęta przebywały w komorze hipoksycznej, do której do- prowadzano przewodami plastikowymi mieszaninę tlenu i azotu o określonym składzie procentowym monitorowanym za pomocą analizatora tlenu (Beckman Inst. Model OM 14, Anaheim, CA). We krwi płodów poddanych różnym warunkom niedotlenienia w okresie ciąży określano wartości gazometryczne. Krew ba- dano za pomocą analizatora (Radiometer ABL2, Copenhagen, Denmark), a wyniki gazometrii przedstawione są w tabeli I.

Przeprowadzono badania dotyczące wpływu długotrwałego niedotlenienia na gęstość optyczną receptorów μ -opiodowych w wybranych strukturach ośrodkowego układu nerwowego pło- du. Ciężarne samice podzielone zostały na dwie grupy: kontro- lną (N=6) i badaną (N=6) poddaną długotrwałemu niedotlenie- niu mieszaniną powietrza o zawartości 10,5% O_2 przez okres 24 godzin od 15. do 20. dnia ciąży (E-15 do E-20). W 21. dniu ciąży (E-21) uśmiercano samice obu grup, wydobywano pło- dy, określano ich płeć, dzielono na grupy (N=6), uśmiercano, a następnie wydobyte mózgi zamrażano. Mózgi zwierząt kro- jono w kriostacie i umieszczano na szkiełkach podstawowych, a następnie inkubowano z radioligandami. W dalszej kolejności szkiełka eksponowano pod światłoczułym filmem, który wy- woływano i utrwalano. Inkubację μ -receptorów opiodowych przeprowadzono ze specyficznym radioizotopem [^3H]DAMGO [tyrosyl-3,5,- ^3H (N)-D-Ala-Gly-N-methyl-Phe-Gly-enkepha- lin], S.A.=55,0 Ci/mmol. W dalszej kolejności tkanki mózgo- we umieszczano w probówkach i poddawano analizie spektro- fotometrycznej, celem potwierdzenia efektywności inkubacji tkanki mózgowej z radioizotopem i obliczenia stosunku wiązań specyficznych do ogólnej ilości wiązań. Następnie tkanka mó- zgowa wraz ze standardami firmy Amersham była eksponowana w kasecie z zastosowaniem czułego filmu (Amersham Hyperfil- m-3H) przez okres 21 dni w temperaturze pokojowej. Gęstość optyczną receptorów obliczano używając systemu komputero- wego (MCID, Imaging Res.Inc., St.Catharine, Ontario, Canada) i mierzono w wybranych regionach mózgu: kompleksie jądra ogoniastego i skorupy (CPu – *Caudate Putamen*), strefie rozrod-

Janusz Jacek Kraczkowski et al. Wpływ długotrwałego niedotlenienia na gęstość optyczną receptorów μ -opiodowych w mózgu płodów szczurzych.**Tabela I.** Analiza gazometryczna krwi płodów poddanych długotrwałemu niedotlenieniu między 15. a 21. dniem ciąży (E-15 do E-21). Badanie wykonano w 21. dniu ciąży (E-21).

Zawartość tlenu w wdychanym powietrzu	PO ₂	PCO ₂	HCO ₃	BE	PH	Hb	Sat	O ₂ cont	N
Grupa kontrolna 21%O ₂	40.2±4.5	57.4±4.2	22.3±1.1	-5.4±1.5	7.208±0.03	9.1±0.5	57.4±5.1	7.5±0.9	11
Grupa badana 10.5%O ₂ /24/h	23.8±1.3	35.1±1.4	16.2±1.2	-9.4±1.6	7.280±0.03	9.2±0.4*	34.1±3.5	4.4±0.4	7

czej (ZG – *Zona Germinata*), jądrze półęzającym (NA – *Nucleus Accumbens*), guzku węchowym (OT – *Olfactory Tubercle*), polu przedwzrokowym przyśrodkowym (MMPoA – *Medial Preoptic Area*) oraz polu przedwzrokowym bocznym (LMPoA – *Lateral Preoptic Area*) i odnosiła się ona do odpowiadających wartości wiązań radioizotopu przez interpolację z krzywą wzorcową. Anatomiczną weryfikację lokalizacji receptorów przeprowadzono przez porównywanie autoradiograficznego obrazu komputerowego z odpowiadającym mu obrazem mikroskopowym preparatu skrawków mózgu oraz z rycinami atlasów mózgow szczone Paxinosa i Watsona (1986, 1991). Dla każdego autoradiogramu wyznaczano oddzielnie krzywą wzorcową gęstości optycznej dla kilkunastu wartości stężenia radioligandu (fmol/mg mokrej masy tkanki), a wartości odczytywanej gęstości optycznej radioligandu na autoradiogramie były zależne linearnie w odniesieniu do widocznych ziarnistości wynikających z gęstości autoradiogramu.

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej. Wartości analizowanych parametrów gęstości optycznej receptorów, związanych z [³H]DAMGO, [³H]SCH 23390, [I¹²⁵]-iodosulpiride i [³H]mazindolu, w wybranych badanych strukturach mózgu szczone w zależności od płci i wieku zwierzęcia oraz rodzaju niedotlenienia, mierzonych w skali ilorazowej, scharakteryzowano wykorzystując średnią arytmetyczną i błąd standardowy średniej (S.E.M). Zgodność z rozkładem normalnym badanych zmiennych oceniono testem W. Shapiro-Wilka. Do wykrycia istotności różnic między średnimi w porównywanych grupach użyto analizy wariancji (ANOVA) dla klasyfikacji pojedynczej, po uprzednim zbadaniu jednorodności wariancji testem Levene'a. Przyjęto poziom istotności $p < 0,05$. Wyniki badań przedstawiono graficznie w tabelach i na rycinach. Analizę danych przeprowadzono z użyciem oprogramowania komputerowego Statistica 5.0.

Wyniki

Zbadano gęstość optyczną receptorów μ -opiodowych w CPu, ZG, NA, OT, MMPoA oraz LMPoA mózgow płodów pod wpływem długotrwałego niedotlenienia w 21. dniu ciąży (E-21). Wyniki w badanych grupach z uwzględnieniem płci przedstawia, odpowiednio, tabela II, III, IV, V, VI i VII.

Z analizy wynika, że na gęstość optyczną receptorów μ -opiodowych w CPu istotny wpływ ma niedotlenienie ($F=10,3$; $p=0,003$). Dwuczynnikowy efekt okazał się statystycznie nieistotny ($F=0,05$; $p=0,82$) (Rycina 1.).

Podobnie, żaden z czynników nie wpłynął istotnie statystycznie na gęstość optyczną receptorów μ -opiodowych w NA, OT, MMPoA i LMPoA. Wartości statystyczne wynosiły odpowiednio: $F=1,1$ ($p=0,3$), $F=0,09$ ($p=0,76$), $F=3,1$ ($p=0,09$), $F=0,13$ ($p=0,72$). Z analizy wynika, że na gęstość optyczną receptorów

μ -opiodowych w ZG istotny wpływ ma niedotlenienie ($F=5,12$; $p=0,03$) oraz interakcja niedotlenienia i płci ($F=4,84$; $p=0,03$). Analiza statystyczna potwierdza również, że długotrwałe niedotlenienie obniża wartość gęstości optycznej receptorów μ -opiodowych w ZG tylko u samców. Stwierdzono istotne statystycznie różnice ($p < 0,05$) między grupą niedotlenionych samców a grupami: kontrolną samców i samic oraz niedotlenionych samic.

Następnie porównano procentowe średnie wartości gęstości optycznej receptorów μ -opiodowych w różnych strukturach mózgu w stosunku do średnich wartości w grupie kontrolnej przyjętych za 100%, uwzględniając płć i niedotlenienie. Otrzymano nieco obniżone, w stosunku do grupy kontrolnej, wartości gęstości optycznej receptorów μ -opiodowych w CPu, OT i LMPoA zarówno u samców, jak i samic, niższe w NA u samców i nieco podwyższone w MMPoA u samców, natomiast niższe u samic poddanych długotrwałemu niedotlenieniu. Różnice nie okazały się jednak istotne statystycznie ($p > 0,05$) (Rycina 2).

W przypadku analizy procentowej średnich wartości gęstości optycznej receptorów μ -opiodowych w ZG w stosunku do średnich wartości w grupie kontrolnej, wykazano obniżone, w stosunku do grupy kontrolnej, wartości gęstości optycznej receptorów μ -opiodowych w ZG u samców. Różnice te były istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Długotrwałe niedotlenienie statystycznie istotnie ($p < 0,05$) obniża wartości gęstości optycznej receptorów μ -opiodowych w stosunku do grupy kontrolnej w CPu i ZG. Długotrwałe niedotlenienie w ZG istotnie obniża wartości gęstości optycznej receptorów μ -opiodowych u samców ($p < 0,05$). Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic ($p > 0,05$) między pozostałymi grupami.

Dyskusja

Badając wpływ niedotlenienia na OUN korzystano z różnych modeli doświadczalnych o zmiennych wartościach poziomu tlenu we wdychanym powietrzu i przeprowadzono doświadczenia na różnych gatunkach zwierząt, głównie na gryzoniach i owcach oraz kotach i małpach. Badacze, inspirowani objawami porażenia mózgowego u dzieci, badali reakcje neurobiologiczne u płodów kocich i świnek morskich w terminie porodu zamykając naczynia pępowiny i macicy.

We wczesnych latach 80. zaczęto stosować doświadczenia łączące podawanie powietrza o zawartości 8% O₂ z zamykaniem światła tętnicy szyjnej u noworodków szczurów w 7. dniu po porodzie. Podobne doświadczenia stosowano w badaniach na zwierzętach dorosłych, przy czym zmniejszony przepływ mózgowy krwi prowadził do znaczących zniszczeń w niedotlenionej połowie mózgu i pozwalał ocenić zaistniałe różnice morfologiczne pomiędzy obydwojma półkulami tego samego mózgu [32].

Janusz Jacek Kraczkowski et al. Wpływ długotrwałego niedotlenienia na gęstość optyczną receptorów μ -opiodowych w mózgu płodów szczurzych.

Tabela II. Porównanie gęstości optycznej receptorów μ -opiodowych w kompleksie jądra ogoniastego i skorupy (CPu) mózgow samców i samic pod wpływem długotrwałego niedotlenienia w 21. dniu ciąży (E-21).

Struktura	Płeć	Grupa	N	Średnia	SEM	95% CI
CPu [fmol/mg]	samce	kontrola	6	118,5	6,3	104,7-132,3
		niedotlenienie	6	86,7	5,4	74,7-98,6
	samice	kontrola	6	116,8	10,5	92,5-141,2
		niedotlenienie	6	89,2	15,1	54,4-124,1

Tabela III. Porównanie gęstości optycznej receptorów μ -opiodowych w strefie rozrodczej (ZG) mózgow samców i samic pod wpływem długotrwałego niedotlenienia w 21. dniu ciąży (E-21).

Struktura	Płeć	Grupa	N	Średnia	SEM	95% CI
ZG [fmol/mg]	samce	kontrola	6	73,6	4,2	64,3-82,9
		niedotlenienie	6	58,2	2,1	51,8-64,7
	samice	kontrola	6	71,6	2,1	66,6-76,5
		niedotlenienie	6	71,4	3,3	63,7-79,0

Tabela IV. Porównanie gęstości optycznej receptorów μ -opiodowych w jądrze półleżącym (NA) mózgow samców i samic pod wpływem długotrwałego niedotlenienia w 21. dniu ciąży (E-21).

Struktura	Płeć	Grupa	N	Średnia	SEM	95% CI
NA [fmol/mg]	samce	kontrola	6	153,3	6,6	138,7-167,8
		niedotlenienie	6	130,1	8,0	112,3-147,8
	samice	kontrola	6	137,3	15,7	101,1-173,5
		niedotlenienie	6	136,4	12,9	106,6-166,2

Tabela V. Porównanie gęstości optycznej receptorów μ -opiodowych we wzgórku węchowym (OT) mózgow samców i samic pod wpływem długotrwałego niedotlenienia w 21. dniu ciąży (E-21).

Struktura	Płeć	Grupa	N	Średnia	SEM	95% CI
OT [fmol/mg]	samce	kontrola	6	119,2	11,2	94,5-143,9
		niedotlenienie	6	104,5	9,6	83,2-125,7
	samice	kontrola	6	120,6	13,5	89,3-151,8
		niedotlenienie	6	99,0	9,2	77,7-120,3

Tabela VI. Porównanie gęstości optycznej receptorów μ -opiodowych w polu przedwzrokowym przyśrodkowym (MMPoA) mózgow samców i samic pod wpływem długotrwałego niedotlenienia w 21. dniu ciąży (E-21).

Struktura	Płeć	Grupa	N	Średnia	SEM	95% CI
MMPoA [fmol/mg]	samce	kontrola	6	23,1	2,0	18,6-27,6
		niedotlenienie	6	25,4	4,0	16,5-34,3
	samice	kontrola	6	38,6	5,1	26,7-50,5
		niedotlenienie	6	25,2	6,7	9,8-40,5

Tabela VII. Porównanie gęstości optycznej receptorów μ -opiodowych w polu przedwzrokowym bocznym (LMPoA) mózgow samców i samic pod wpływem długotrwałego niedotlenienia w 21. dniu ciąży (E-21).

Struktura	Płeć	Grupa	N	Średnia	SEM	95% CI
LMPoA [fmol/mg]	samce	kontrola	6	21,3	1,5	17,8-24,7
		niedotlenienie	6	18,4	2,4	13,2-23,6
	samice	kontrola	6	22,2	2,7	16,1-28,4
		niedotlenienie	6	17,8	2,5	12,1-23,5

Janusz Jacek Kraczkowski et al. Wpływ długotrwałego niedotlenienia na gęstość optyczną receptorów μ -opiodowych w mózgu płodów szczurzych.**Tabela VIII.** Podsumowanie wyników wpływu niedotlenienia długotrwałego na gęstość receptorów μ -opiodowych w różnych strukturach mózgu płodu szczurzego

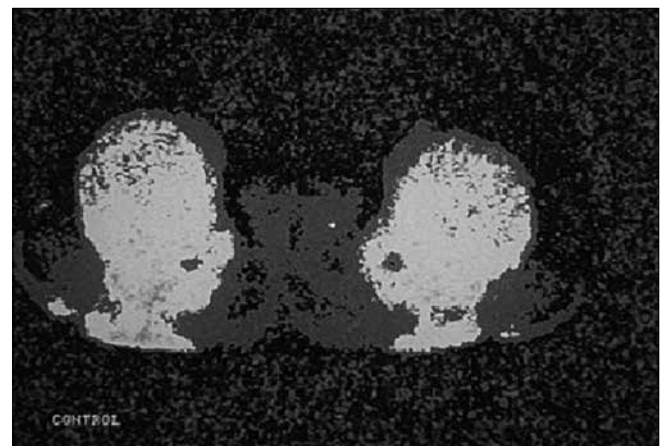
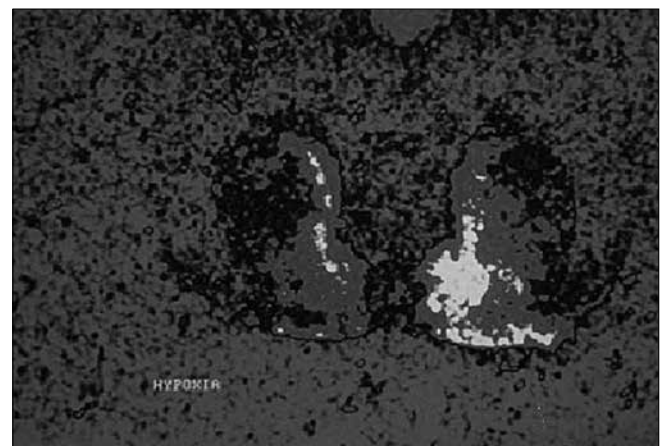
Struktura	Płeć	Niedotlenienie	Interakcja Płeć/ Niedotlenienie
Jądro ogoniaste – skorupa (CPu)	NS	*↓	NS
Strefa rozrodcza (ZG)	NS	*↓	*♂↓
Jądro półleżące (NA)	NS	NS	NS
Wzgórek węchowy (OT)	NS	NS	NS
Pole przedwzrokowe przyśrodkowe (MMPoA)	NS	NS	NS
Pole przedwzrokowe boczne (LMPoA)	NS	NS	NS

Legenda:

* – istotne statystycznie ($p < 0,05$); NS – brak istotności statystycznej; ♀ – samice; ♂ – samce; ↑ – wzrost; ↓ – spadek

Doświadczenia oceniające wpływ długotrwałego niedotlenienia uwzględniały mniej głębokie niedotlenienie, o większej zawartości tlenu (10% O_2) we wdychanym powietrzu, trwające kilkanaście godzin na dobę lub stosowane w sposób ciągły przez 24 godziny [33]. Szczury badane w 59. dniu życia (P-59) po przebyciu ciężkiego niedotlenienia przy stężeniu tlenu 6.2% O_2 przez 2 godziny, które spowodowało śmierć 12 ciężarnych samic, wykazywały upośledzoną szybkość pływania, nauki labiryntu, zapamiętywania labiryntu, odróżniania jasności. Możliwości zapamiętywania labiryntu zależały od wielkości ciąży w chwili niedotlenienia. W testach przeprowadzonych na szczurach w 55. dniu życia (P-55) po podawaniu ciężarnym samicom powietrza o zawartości 13% O_2 przez 2 godziny dziennie od 8. do 21. dnia ciąży (E-8 do E-21), stwierdzono przedwczesne otwarcie oka i podwyższoną liczbę błędów w teście labiryntu [34]. Niedotlenienie o mniejszym nasileniu (16.8% O_2 przez 14 minut, 7 razy dziennie od 2. do 20. dnia ciąży (E-2 do E-20) wywoływało zwiększoną śmiertelność noworodków i opóźnienie ich rozwoju emocjonalnego. Podobnie, ekspozycja ciężarnych samic szczura na powietrze zawierające od 9 do 12% O_2 przez 10 godzin dziennie, od 16. do 21. dnia ciąży (E-16 do E-21) powodowało obniżone uwarunkowanie uczenia się i unikania [35]. U szczurów, główne następstwa niedotlenienia to wzmożona aktywność, obniżona zdolność rozwiązywania problemów i obniżona emocjonalność. Towarzyszy im obniżenie wagi ciała i wagi mózgu oraz zaburzenia w rozwoju. Zmiany w zachowaniu pod wpływem niedotlenienia we wczesnej ciąży były bardziej nasilone lub dłużej trwały niż pod wpływem niedotlenienia w ciąży późnej [36].

Dane literaturowe wskazują, że niedotlenienie podczas rozwoju płodowego u szczurów wywołuje wiele zmian w zachowaniach seksualnych, zarówno reprodukcyjnych, jak i niereprodukcyjnych. Ostatni tydzień ciąży u szczurów stanowi krytyczny okres w organizacji tkanki mózgowej. Podczas niedotlenienia dochodzi do uwalniania się zwiększonej ilości peptydów opiodowych, które mają wpływ na rozwijający się mózg płodu, inny niż na ukształtowany mózg osobnika dorosłego. System opiodowy reguluje rozwój i wzrost OUN oraz funkcje fizjologiczne mózgu poprzez system receptorów opiodowych. Peptydy opiodowe odpowiadają za zachowania reprodukcyjne samców i samic. Nie ma precyzyjnych informacji na temat głębokości zmian, jakim podlega system receptorów pod wpływem długotrwałego niedotlenienia, ponieważ dotychczasowe dane literaturowe wskazywały zarówno na zwiększenie się, jak i również zmniejszenie się gęstości receptorów opiodowych. Nowoczesne metody ba-

**Rycina 1.****Rycina 2.**

dawcze pozwalają precyzyjnie opisywać mechanizmy zachodzące w OUN płodu pod wpływem niedotlenienia. Hipotezy wyjaśniające mechanizmy zaburzeń funkcjonalnych biorą pod uwagę zmiany w neuroprzebieżności układu.

Badania układu opiodowego dotyczyły głównie mózgu szczura. Peptydy opiodowe i ich receptory pojawiają się w mózgu szczura wcześniej, już w 13. dniu ciąży (E-13). Receptory μ -opiodowe obecne są przed porodem [37, 38], pojawiają się

Janusz Jacek Kraczkowski et al. Wpływ długotrwałego niedotlenienia na gęstość optyczną receptorów μ -opiodowych w mózgu płodów szczurzych.

w wielu obszarach mózgu równocześnie z β -endorfiną. Mechanizmy działania peptydów opiodowych na rozwijający się mózg płodu wciąż nie są jasne, jakkolwiek wiadomo, że podawanie opiodów lub jego antagonistów, powoduje zmiany w systemie receptorów opiodowych. Na przykład, zmiany wywołane przez naltrexon zdarzają się postnatalnie. Dzięki temu morfina wywołuje bardziej drastyczne morfologicznie zmiany w OUN działając przez dłuższy okres czasu. Małe są szanse na regenerację OUN po narażeniu na opioidy w okresie rozwojowym. Efekt neurotoksyczny wywołany zewnątrzpochodnymi opiodami pogłębiają opioidy wewnątrzpochodne. Wydaje się, że działają one kompleksowo, modulując wzrost komórek nerwowych. Udowodniono hamujący wpływ enkefaliny [22, 39] i β -endorfiny [40] na wzrost mózgu i proliferację komórek nerwowych, natomiast blokada receptorów opiodowych przyspiesza jego wzrost [22, 41]. Opioidy zmieniają liczbę komórek i ich gęstość *in vivo*. Ciągła blokada receptorów opiodowych przez pierwsze 3 tygodnie życia zwiększa liczbę komórek nerwowych i ich gęstość w mózdzku i w hipokampie, a także gęstość w korze mózdzku [42].

Wiele czynników wpływa na liczbę komórek nerwowych i ich proliferację. Postnatalna blokada receptorów opiodowych powoduje wzrost liczby komórek w mózdzku i zakręcie zębatym, gdzie neurony są wytwarzane postnatalnie. Ponadto, wpływ opiodów na komórki nerwowe może być zależny od wieku zwierzęcia doświadczalnego. Morfina hamuje wbudowywanie [3 H]tymidyny *in vivo* u jednodniowych noworodków szczura, co sugeruje, że opioidy niebezpośrednio hamują syntezę DNA całego mózgu [38]. Porównując badania w tym zakresie należy brać pod uwagę wiek i gatunek zwierząt, czas podawania leku, warunki hodowli oraz stosowane ligandy. Wyniki badań wpływu opiodów *in vitro* na proliferację komórek pochodzą z hodowli komórek mysich, guza *neuroblastoma S20Y*, zawierających receptory opiodowe [24]. Met-enkefalina hamuje wskaźnik podwajania komórek w hodowli guza *neuroblastoma* w sposób odwracalny oraz obniża ekspresję onkogenu *N-myc* komórek mysich guza *neuroblastoma S20Y* w analizie Northern blotting, ale podwyższa ekspresję onkogenu w odpowiedzi na podawanie naltreksonu [43], co potwierdza wpływ peptydów opiodowych na podstawowe procesy wzrostu komórek nerwowych i etapów rozwojowych w cyklu komórki.

Prawidłową migrację komórek mogą zaburzać wewnątrzpochodne opioidy wywołując utratę lub zmianę w formowaniu gleju [23]. Morfina redukuje ilość komórek nerwowych we wszystkich warstwach komórek w jednakowy sposób. Strukturalne i molekularne podstawy tego zjawiska nie są znane. Opioidy wpływają na aktywność procesów komórkowych podczas krytycznych momentów rozwojowych, co wywołuje zmiany między synapsami [43]. Spadek gęstości receptorów opiodowych pod wpływem morfiny [44] w rozwijającym się mózgu odzwierciedla aktywność opiodów w synapsach. Dodatkowo, podawanie morfiny noworodkom [45], enkefaliny [46] czy metenkefaliny poporodowo [46] hamuje syntezę DNA w rozwijającym się mózgu i zmniejsza liczbę komórek nerwowych. Stymulowanie przedporodowe receptora opiodowego morfiną za pomocą pompy osmotycznej, przezskórną, w dawce 10 mg/kg/ na dobę, od 12. dnia ciąży (E-12) do 6. dnia życia (P-6) znacznie redukuje gęstość komórek nerwowych, zarówno w okolicy przedwzrokowej podwzgórza, jak i w korze somatosensorycznej [47]. Powoduje również zmniejszenie grubości i liczby komórek nerwowych [42], co prowadzi

do poważnych następstw. Korowe komórki nerwowe powstające przedporodowo, mnożą się intensywnie i wędrują ze strefy okółkomorowej wzdłuż promienistych włókien glejowych osiagając powierzchnię kory mózgowej. Do 14. dnia ciąży (E-14) bariera krew-mózg jest nieuszkodzona i dlatego wczesne podawanie morfiny powoduje wzrost jej poziomu w mózgu, wpływając na procesy neurogenezy lub migrację komórek nerwowych. Wydaje się, że β -endorfina [48] i enkefalina [49] pełnią tę rolę. Podawanie β -endorfiny czy N-acetyl- β -endorfiny, produktu acetylacji potranslacyjnej u osobników w okresie prenatalnym, zmienia aktywność dekarboksylazy ornityny, enzymu związanego ze wzrostem u osobników dorosłych [40, 50]. Przedporodowe podawanie β -endorfiny zmniejsza syntezę DNA [51], sugerując krytyczną rolę tego peptydu opiodowego w regulacji rozwoju komórki nerwowej. Dowodów tej tezy dostarczają wyniki, pochodzące z badań nad antagonistami peptydów opiodowych podawanych w dawkach blokujących miejsca ich łączenia [41, 52].

Uznano, że peptydy opiodowe nie wpływają na przebieg neurogenezy w korze mózgowej i wędrowkę komórek nerwowych, natomiast zaburzają różnicowanie się komórek nerwowych i wynikający z tego rozwój sieci włókien nerwowych. Podawanie peptydów opiodowych lub blokada receptorów opiodowych na rozwój gleju są zależne od miejsca działania, przy czym zarówno podawanie morfiny, jak i blokada receptorów nie wpływa na liczbę komórek glejowych. Natomiast przedporodowe podawanie morfiny zwiększa ich gęstość w okolicy przedwzrokowej [41, 42]. Działanie opiodów na rozwój układu nerwowego manifestuje się różnymi efektami w zależności od miejsca i rodzaju peptydów opiodowych. Alternatywnie, efekt wewnątrzpochodnych peptydów opiodowych na liczbę komórek mógłby być większy w miejscach, gdzie neurogeneza następuje postnatalnie (mózdzek, zakręt zębaty) w odniesieniu do rozwijającego się systemu opiodowego [38], czy też przejściowego występowania peptydów opiodowych [53] w tych miejscach. Wpływ działania peptydów opiodowych zewnątrzpochodnych podczas rozwoju okazuje się być ważniejszy od wpływu wywołanego blokadą wewnątrzpochodnych peptydów opiodowych. Podobnie rozkład i ekspresja receptorów μ -opiodowych wydaje się być istotną informacją w rozumieniu wpływu niedotlenienia długotrwałego na wzrost i proliferację komórek nerwowych mózgu [54].

Wnioski

Powyższa praca, mająca na celu określenie wpływu długotrwałego niedotlenienia w ciąży na ekspresję receptorów μ -opiodowych wydaje się być nowatorskim spojrzeniem na pracę mózgu płodu w warunkach hipoksji. Zastosowanie modelu doświadczalnego niedotlenienia w połączeniu z nowoczesną metodą autoradiografii polegającej na ilościowej wizualizacji receptorów układu opiodowego pozwoliło na precyzyjną ocenę zmian w komórkach mózgowych płodu. Wyniki wskazują, że długotrwałe niedotlenienie obniża gęstość optyczną receptorów μ -opiodowych w kompleksie jądra ogoniastego i skorupy oraz *zona germinata*, zarówno samic i samców poprzez wpływ na stężenie endogennych peptydów opiodowych. Takie wyniki ekspresji receptorów μ -opiodowych w wybranych strukturach mózgu płodu związanych z zachowaniami seksualnymi można łączyć ze zmianami w zachowaniu zwierząt doświadczalnych po przebytych narażeniu na niedotlenienie w okresie ciąży.

Janusz Jacek Kraczkowski et al. Wpływ długotrwałego niedotlenienia na gęstość optyczną receptorów μ -opiodowych w mózgu płodów szczurzych.**Oświadczenie autorów:**

1. Janusz Jacek Kraczkowski – autor koncepcji i założeń pracy, uzyskanie funduszy na realizację badań lab oratoryjnych, opracowanie koncepcji i założeń badań, wykonanie badań laboratoryjnych, opracowanie wyników badań, przechowywanie dokumentacji.
2. Katarzyna Karwasik-Kajszczarek – zebranie materiału, opracowanie wyników badań, analiza statystyczna wyników, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa – autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.
3. Jacek Marcin Robak – współautor tekstu pracy, współautor protokołu, korekta i aktualizacja literatury.

Źródło finansowania:

część projektu finansowanego z grantu KBN nr 2P05E 09129.

Konflikt interesów:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

Piśmiennictwo

1. Low JA, Panagiotopoulos C, Derrick EJ. Newborn complications after intrapartum asphyxia with metabolic acidosis in the preterm fetus. *Am J Obstet Gynecol.* 1995, 172 (3), 805-810.
2. Arpino C, Domizio S, Carrieri MP, [et al.]. Prenatal and perinatal determinants of neonatal seizures occurring in the first week of life. *J Child Neurol.* 2001, 16 (9), 651-656.
3. Ives P, Lintrop M, Metsvaht T, [et al.]. Cerebral blood-flow velocities in predicting outcome of asphyxiated newborn infants. *Acta Paediatr.* 2004, 93 (4), 523-528.
4. Kirimi E, Tuncer O, Atas B, [et al.]. Clinical value of color Doppler ultrasonography measurements of full-term newborns with perinatal asphyxia and hypoxic ischemic encephalopathy in the first 12 hours of life and long-term prognosis. *Tohoku J Exp Med.* 2002, 197 (1), 27-33.
5. Murray DM, Ryan CA, Boylan GB, [et al.]. Prediction of seizures in asphyxiated neonates: correlation with continuous video-electroencephalographic monitoring. *Pediatrics.* 2006, 118 (1), 41-46.
6. Longo LD, Hull AD, Long DM, Pearce WJ. Cerebrovascular adaptations to high altitude hypoxemia in fetal and adult sheep. *Am J Physiol.* 1993, 264 (1 Pt 2), 65-72.
7. Carter BS, Haverkamp AD, Merenstein GB. The definition of acute perinatal asphyxia. *Clin Perinatol.* 1993, 20 (2), 287-304.
8. Goldstein A, Grevert P. Placebo analgesia, endorphins, and naloxone. *Lancet.* 1978, 2 (8104-5), 1385.
9. Hughes J, Kosterlitz HW, Leslie FM. Effect of morphine on adrenergic transmission in the mouse vas deferens. Assessment of agonist and antagonist potencies of narcotic analgesics. *Br J Pharmacol.* 1975, 53 (3), 371-381.
10. Pert CB, Snyder SH. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science.* 1973, 179 (4077), 1011-1014.
11. Simon EJ, Hiller JM, Edelman I, [et al.]. Opiate receptors and their interactions with agonists and antagonists. *Life Sci.* 1975, 16 (12), 1795-1800.
12. Terenius L. Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 1973, 32 (3), 317-320.
13. Olson GA, Olson RD, Kastin AJ. Endogenous opiates: 1991. *Peptides.* 1992, 13 (6), 1247-1287.
14. Olson GA, Olson RD, Kastin AJ. Endogenous opiates: 1992. *Peptides.* 1993, 14 (6), 1339-1378.
15. Olson GA, Olson RD, Kastin AJ. Endogenous opiates: 1993. *Peptides.* 1994, 15 (8), 1513-1556.
16. Sándor P, Gotoh F, Tomita M, [et al.]. Effects of a stable enkephalin analogue, (D-Met2,Pro5)-enkephalinamide, and naloxone on cortical blood flow and cerebral blood volume in experimental brain ischemia in anesthetized cats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1986, 6 (5), 553-558.
17. Zagon IS. Endogenous opioids, opioid receptors, and neuronal development. *NIDA Res Monogr.* 1987, 78, 61-71.
18. Bartolome JV, Bartolome MB, Lorber BA, [et al.]. Effects of central administration of beta-endorphin on brain and liver DNA synthesis in preweaning rats. *Neuroscience.* 1991, 40 (1), 289-294.
19. Hauser KF, Houdi AA, Turbek CS, [et al.]. Opioids intrinsically inhibit the genesis of mouse cerebellar granule neuron precursors in vitro: differential impact of mu and delta receptor activation on proliferation and neurite elongation. *Eur J Neurosci.* 2000, 12 (4), 1281-1293.
20. Hauser KF, McLaughlin PJ, Zagon IS. Endogenous opioid systems and the regulation of dendritic growth and spine formation. *J Comp Neurol.* 1989, 281 (1), 13-22.
21. Zagon IS, McLaughlin PJ. Opioid antagonist-induced modulation of cerebral and hippocampal development: histological and morphometric studies. *Brain Res.* 1986, 393 (2), 233-246.
22. Zagon IS, McLaughlin PJ. Endogenous opioid systems regulate cell proliferation in the developing rat brain. *Brain Res.* 1987, 412 (1), 68-72.
23. Stiene-Martin A, Hauser KF. Opioid-dependent growth of glial cultures: suppression of astrocyte DNA synthesis by met-enkephalin. *Life Sci.* 1990, 46 (2) 91-98.
24. Zagon IS, McLaughlin PJ. Naloxone modulates body and organ growth of rats: dependency on the duration of opioid receptor blockade and stereospecificity. *Pharmacol Biochem Behav.* 1989, 33 (2), 325-328.
25. Kornblum HI, Hurlbut DE, Leslie FM. Postnatal development of multiple opioid receptors in rat brain. *Brain Res.* 1987, 465 (1-2), 21-41.
26. Ricalde AA, Hammer RP Jr. Perinatal opiate treatment delays growth of cortical dendrites. *Neurosci Lett.* 1990, 115 (2-3), 137-143.
27. Sakellariadis N, Vernadakis A. An unconventional response of adenylate cyclase to morphine and naloxone in the chicken during early development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986, 83 (8), 2738-2742.
28. Schoffeleers AN, Van Vliet BJ, De Vries TJ, [et al.]. Regulation of brain neurotransmitter release and of adenylate cyclase activity by opioid receptors. *Biochem Soc Trans.* 1992, 20 (2), 449-453.
29. Pfeiffer A, Pasi A, Mehraein P, Hesz A. Opiate receptor binding sites in human brain. *Brain Res.* 1982, 248 (1), 87-96.
30. Leslie FM. Methods used for the study of opioid receptors. *Pharmacol Rev.* 1987, 39 (3), 197-249.
31. Graybiel AM, Chesselet MF. Compartmental distribution of striatal cell bodies expressing [Met] enkephalin-like immunoreactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984, 81 (24), 7980-7984.
32. Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol.* 1960, 36, 1-17.
33. Hermans RH, McGivern RF, Chen W, Longo LD. Altered adult sexual behavior in the male rat following chronic prenatal hypoxia. *Neurotoxicol Teratol.* 1993, 15 (6), 353-363.
34. McCullough ML. The behavioral effects of prenatal hypoxia in the rat. *Dev Psychobiol.* 1976, 9 (4), 335-342.
35. Lun A, Gruetzmann H, Wustmann C, [et al.]. Effect of pyritinol on the dopaminergic system and behavioural outcome in an animal model of mild chronic postnatal hypoxia. *Biomed Biochim Acta.* 1989, 48 (2-3), 237-242.
36. North RA. Cellular actions of opiates and cocaine. Cellular actions of opiates and cocaine. *Ann N Y Acad Sci.* 1992, 654, 1-6.
37. Kent JL, Pert CB, Herkenham M. Ontogeny of opiate receptors in rat forebrain: visualization by in vitro autoradiography. *Brain Res.* 1981, 254 (4), 487-504.
38. Kornblum HI, Loughlin SE, Leslie FM. Effects of morphine on DNA synthesis in neonatal rat brain. *Brain Res.* 1987, 428 (1), 45-52.
39. Vértés Z, Melegh G, Vértés M, Kovács S. Effect of naloxone and D-met2-pro5- enkephalinamide treatment on the DNA synthesis in the developing rat brain. *Life Sci.* 1982, 31 (2), 119-126.
40. Bartolome JV, Bartolome MB, Daltner LA, [et al.]. Effects of beta-endorphin on ornithine decarboxylase in tissues of developing rats: a potential role for this endogenous neuropeptide in the modulation of tissue growth. *Life Sci.* 1986, 38 (25), 2355-2362.
41. Zagon IS, McLaughlin PJ. Opioid antagonist-induced modulation of cerebral and hippocampal development: histological and morphometric studies. *Brain Res.* 1986, 393 (2), 233-246.
42. Hammer RP Jr, Seatzir JV, Ricalde AR. Regional dependence of morphine-induced mu-opiate receptor downregulation in perinatal rat brain. *Eur J Pharmacol.* 1991, 209 (3), 253-256.
43. Hauser KF, McLaughlin PJ, Zagon IS. Endogenous opioids regulate dendritic growth and spine formation in developing rat brain. *Brain Res.* 1987, 416 (1), 157-161.
44. Tempel A, Habas J, Paredes W, Barr GA. Morphine-induced downregulation of mu-opioid receptors in neonatal rat brain. *Brain Res.* 1988, 469 (1-2), 129-133.
45. Gill R, Foster AC, Woodruff GN. Systemic administration of MK-801 protects against ischemia-induced hippocampal neurodegeneration in the gerbil. *J Neurosci.* 1987, 7 (10), 3343-3349.
46. Vértés Z, Környei JL, Kovács S, Vertes M. Role of opioid peptides in the regulation of DNA synthesis in immature rat uterus. *Eur J Pharmacol.* 1995, 291 (2), 115-120.
47. Zagon IS, McLaughlin PJ. Morphine and brain growth retardation in the rat. *Pharmacology.* 1977, 15 (3), 276-282.
48. Haynes WL, Proia AD, Klintworth GK. Effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on corneal neovascularization in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989, 30 (7), 1588-1593.
49. Zagon IS, Rhodes RE, McLaughlin PJ. Distribution of enkephalin immunoreactivity in germinative cells of developing rat cerebellum. *Science.* 1985, 227 (4690), 1049-1051.
50. Bartolome JV, Bartolome MB, Harris EB, Schanberg SM. N- alpha-acetyl-beta-endorphin stimulates ornithine decarboxylase activity in preweaning rat pups: opioid and non-opioid-mediated mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther.* 1987, 240 (3), 895-899.
51. Bartolome JV, Bartolome MB, Harris EB, [et al.]. Regulation of insulin and glucose plasma levels by central nervous system beta-endorphin in preweaning rats. *Endocrinology.* 1989, 124 (5), 2153-2158.
52. Zagon IS, McLaughlin PJ. Identification of opioid peptides regulating proliferation of neurons and glia in the developing nervous system. *Brain Res.* 1991, 542 (2), 318-323.
53. Zagon IS, Rhodes RE, McLaughlin PJ. Distribution of enkephalin immunoreactivity in germinative cells of developing rat cerebellum. *Science.* 1985, 227 (4690), 1049-1051.
54. Kraczkowski JJ, Semczuk M. Comparison between -opioid receptor optical density in adult male rat brain following prenatal and postnatal hypoxia. *Ginekol Pol.* 1998, 69 (12), 963-967.