

© В. М. Черток, А. Е. Коцюба, А. Г. Черток
УДК 577.1:611.13:611.819.1:599.323.4

В. М. Черток, А. Е. Коцюба, А. Г. Черток

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕМОКСИГЕНАЗ В СТЕНКЕ АРТЕРИЙ МЯГКОЙ ОБОЛОЧКИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

Кафедра анатомии человека (зав. — проф. В. М. Черток), Тихоокеанский государственный медицинский университет, г. Владивосток

Изучена локализация изоформ гемоксигеназы-2 (ГО-2) и гемоксигеназы-1 (ГО-1) в стенке ветвей артерий I–V порядка в мягкой оболочке головного мозга у нормотензивных крыс и животных с вызванной реноваскулярной гипертензией (РВГ). Иммуногистохимическое выявление гемоксигеназ проведено на 40 крысах-самцах линии Вистар. Установлено, что вазомоторная функция СО в артериях III–V порядков связана главным образом с эндотелием, в ветвях I–II порядков — с миоцитами. У нормотензивных животных в образовании СО принимает участие ГО-2, у гипертензивных — ГО-2 и ГО-1. Наибольшее количество сосудов с экспрессией ГО-1 наблюдается на 16-й неделе РВГ, когда доля сосудов, маркированных ГО-2, наименьшая, что совпадает по времени со стабилизацией артериального давления на новом более высоком уровне.

Ключевые слова: головной мозг, мягкая оболочка, артерии, монооксид углерода, гемоксигеназы

В ЦНС монооксид углерода (СО) играет важную роль, обеспечивая эффект долговременной синаптической потенциации, обучение, ноцицептивную сигнализацию, память и ряд других функций [8, 10, 16, 17]. На этом основании считалось, что распространение СО в мозгу ограничивается нейронами, глией и отдельными капиллярами [2, 6–8]. В последние годы появились сообщения, позволяющие рассматривать эту сигнальную молекулу в качестве ключевого звена в кардиоваскулярной патологии, при которой газ может выступать как аутокринный и/или паракринный регулятор вазомоторики, оказывая на резистивные сосуды не столь мощное, как оксид азота, но более длительное действие [6, 12, 21].

Субстратом для эндогенного образования СО является молекула гема, продукция которого в организме катализируется в основном двумя изоформами гемоксигеназы: 1 (ГО-1), являющейся индуцибельной формой энзима, и 2 (ГО-2) — ее конститутивной формой [16, 17]. Сведения о функциональных свойствах и распределении этих ферментов в церебральных артериях ограничены и крайне противоречивы. По одним данным, экспрессия ГО-1 и ГО-2 в стенке артерий мягкой оболочки (МО) головного мозга наблюдается постоянно [16], по другим — индукция ГО-1 в них происходит только под влиянием стрессорных факторов [11, 13], а в артериях легких, почек, брыжеек при гипертензии и воспалительных заболеваниях [13, 18–21]. Столь же неопределен-

ные сведения имеются и о топохимии ГО-1 и ГО-2 в стенке крупных и мелких артерий МО [9].

Цель данной работы — изучение локализации ГО-1 и ГО-2 в стенке артерий МО головного мозга разного калибра у крыс в обычных условиях жизнедеятельности организма и при развитии гипертензии.

Материал и методы. Исследование выполнено на 40 крысах-самцах линии Вистар массой 200–240 г.: 35 — с вызванной реноваскулярной гипертензией (РВГ), у которых артерии МО изучали через 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 нед после операции (по 5 животных в каждой группе) и 5 — ложно оперированных животных (контрольная группа — КГ) с показателями артериального давления (АД) 110 ± 3 мм рт. ст. Всех крыс содержали на стандартном рационе в одинаковых условиях лабораторного вивария. Систолическое давление измеряли при помощи системы неинвазивного мониторинга ML U/4c501 методом хвостовой манжеты (MedLab). Животных усыпляли внутрибрюшинным введением 3% раствора тиопентала натрия, после чего декапитировали. Объектом исследования служили ветви I–V порядков бассейна средней мозговой артерии диаметром: 108–86 мкм, 74–46 мкм, 42–34 мкм, 30–12 мкм, 10–8 мкм соответственно. Экспериментальные манипуляции проводили в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР).

Для иммуногистохимического выявления гемоксигеназ мозг вместе с сосудами мягкой оболочки фиксировали в течение 1 ч в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) при 4 °С. Из кусочков мозга готовили серийные криостатные срезы толщиной 20 мкм, один из которых обрабатывали для иммуногистохимического выявления ГО-1, следующий за ним — ГО-2. После этого срезы последовательно инкубировали

Сведения об авторах:

Черток Виктор Михайлович (e-mail: chertokv@mail.ru), Коцюба Александр Евгеньевич (e-mail: akotc@mail.ru), Черток Алла Геннадьевна, кафедра анатомии человека, Тихоокеанский государственный медицинский университет, 690002, г. Владивосток, пр. Острякова, 2

в 1% нормальной сыворотке лошади 1 ч при комнатной температуре (Abscam, Великобритания), затем либо с мышинными моноклональными антителами к ГО-1 в разведении 1:100 (Abscam, Великобритания), либо мышинными моноклональными антителами к ГО-2 (Abscam, Великобритания) в разведении 1:1000 при температуре 4 °C в течение 18 ч, с биотинилированными антителами лошади к IgG мыши в разведении 1:100 (Vestor Labs, США) 2 ч и с авидин-пероксидазным комплексом (Vectastain Elite ABC Kit, Vestor Labs, США) 1 ч при комнатной температуре. Для выявления продуктов реакции под контролем микроскопа срезы инкубировали в субстрате для обнаружения пероксидазы (VIP Substrate Kit, Vestor Labs, США). Затем срезы промывали, обезживали по стандартной методике и заключали в полистерол. Для оценки специфичности реакции проводили окрашивание отдельных срезов без первичных или вторичных антител. На контрольных срезах иммунопозитивная реакция отсутствовала.

У каждого животного вычисляли долю энзимпозитивных сосудов от общего числа встретившихся сосудов соответствующего порядка ветвления (диаметра) по опубликованной ранее методике [1]. Локализацию ферментов исследовали не менее чем на 5 последовательных срезах сосудов каждой размерной группы. Значимость различий оценивали по t-критерию Стьюдента. Критическим ее уровень считали при $p < 0,05$.

Результаты исследования. У крыс КГ в стенке артерий МО головного мозга иммуногистохимический маркер ГО-1 не определялся, тогда как экспрессия ГО-2 наблюдалась в артериальных ветвях I–V порядков (рис. 1, а–в). В этих случаях мелкогранулярный осадок коричневого цвета откладывался в структурных компонентах стенки сосудов, окрашивая их в зависимости от плотности отложения преципитата, в различные оттенки коричневого цвета. Локализация и обильность продукта реакции во многом зависели от калибра сосудов. В ветвях I–II порядка с многослойной средней оболочкой плотный гранулярный осадок, маркирующий ГО-2, определяется преимущественно в миоцитах (см. рис. 1, а), в ветвях III порядка диаметром около 40 мкм экспрессия фермента, наряду с гладкими миоцитами, наблюдались в эндотелии (см. рис. 1, б, в). Доля сосудов с иммунопозитивным эндотелием среди ветвей I–II порядка в 2–3 раза была ниже, чем среди ветвей III порядка ($P < 0,05$), в которых продукт реакции одинаково часто откладывался в сократительных клетках и эндотелии (рис. 2, а). В ветвях IV–V порядков диаметром менее 30 мкм, имевших один, зачастую непостоянный, слой гладких миоцитов, маркер ГО-2 определялся преимущественно в эндотелии (см. рис. 1, г, д). На долю таких артерий приходилось около 30%, тогда как среди ветвей I–II порядка с ГО-2-позитивным эндотелием было не более 5–7% (см. рис. 2, а).

У крыс с гипертензией не установлено отличий локализации ГО-2 в стенке сосудов соответствующих размерных групп по сравнению с КГ. В

первые 6 нед РВГ значимых преобразований числа крупных и мелких сосудов с экспрессией ГО-2 также не наблюдалось ($P > 0,05$), хотя АД в этот период более чем на 1/3 был выше, чем у крыс КГ (см. рис. 2, б). Однако в процессе дальнейшего развития гипертензии содержание ГО-2-позитивных сосудов быстро сокращалось. Выраженность отмеченных изменений зависела не только от продолжительности гипертензии и величины АД, но и порядка ветвления (диаметра) сосудов (см. рис. 2, в). На 8-й неделе РВГ доля иммунопозитивных артерий ветвей I–II порядков в МО снижалась на 16–14% по сравнению с таковой в КГ ($P < 0,05$), тогда как соответствующие изменения среди ГО-2-позитивных ветвей IV–V порядков проходили между 10–12 нед РВГ, когда АД достигало наиболее высоких цифр (см. рис. 2, б). Затем, до окончания срока наблюдений, АД, как и доля ГО-2-позитивных ветвей I–III порядков, с небольшими колебаниями удерживались на постоянном уровне. В то же время число более мелких иммунопозитивных артерий продолжало сокращаться и между 14–16-й неделями РВГ достигало минимальных значений, после чего стабилизировалось (см. рис. 2, в).

Иная динамика была отмечена в отношении ГО-1, маркеры которой впервые определялись в стенке артерий МО мозга между 4–8-й неделями РВГ. Экспрессия ГО-1 чаще всего наблюдалась в гладких миоцитах ветвей артерий I–III порядков, а в более мелких сосудах — преимущественно в эндотелии (см. рис. 1, е–к). В этих случаях желтовато-коричневые пылевидные гранулы маркировали отдельные миоциты и внутреннюю выстилку сосудов по большей части периметра. Однако постоянно и в достаточном для статистического анализа количестве ГО-1-позитивные сосуды определялись только между 10–12-й неделями РВГ ($P < 0,05$). Их содержание увеличивалось до 16-й недели, после чего существенно не менялось (см. рис. 2, в).

Обсуждение полученных данных. Еще не так давно участие газотрансмиттеров в регуляции тонуса сосудов в физиологических условиях и при патологии рассматривалось исключительно в зависимости от наличия и концентрации в стенке сосудов оксида азота (NO) [4–6]. В последние годы появляются данные, свидетельствующие о том, что NO участвует в реализации быстрых, мощных, но непродолжительных реакций сосудов, тогда как СО способен обеспечить не столь выраженный, но долговременный эффект [3, 9, 12]. Тем не менее данных о наличии и распределении ферментов, участвующих в продукции СО в артериях МО мозга, немного.

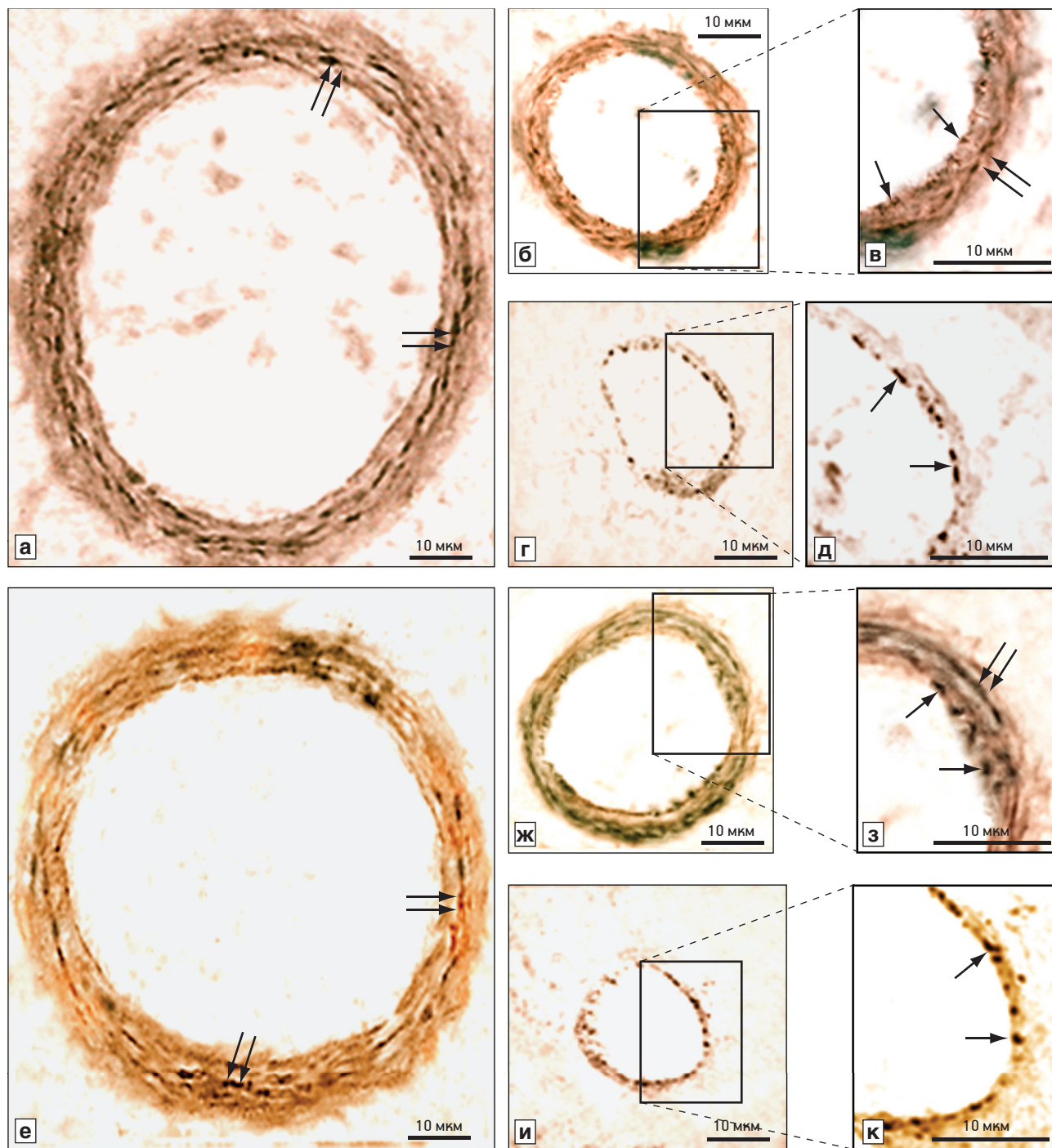
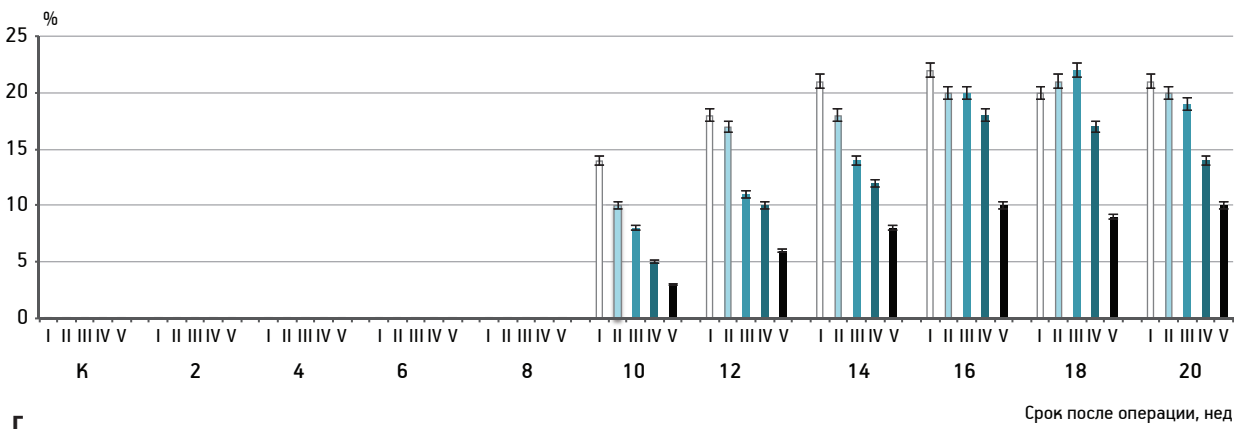
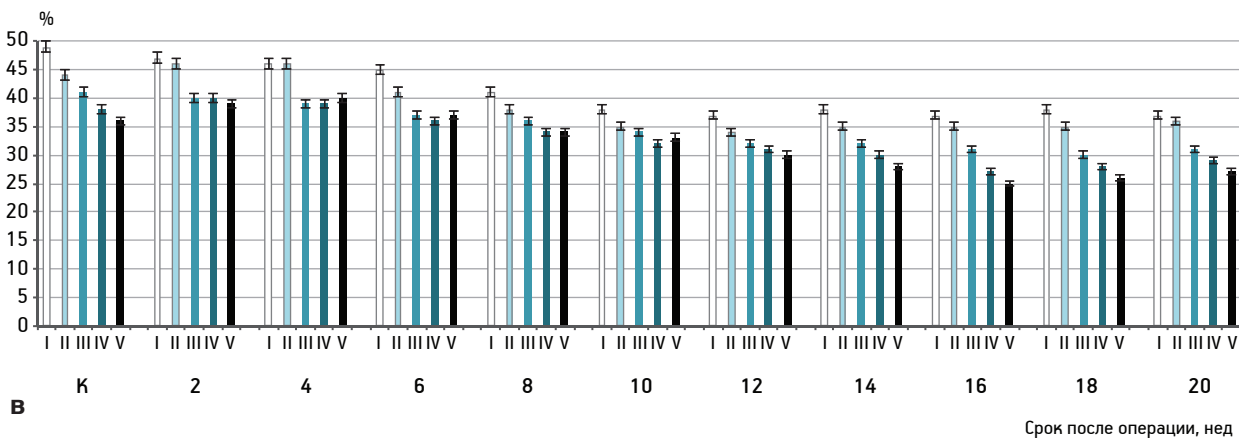
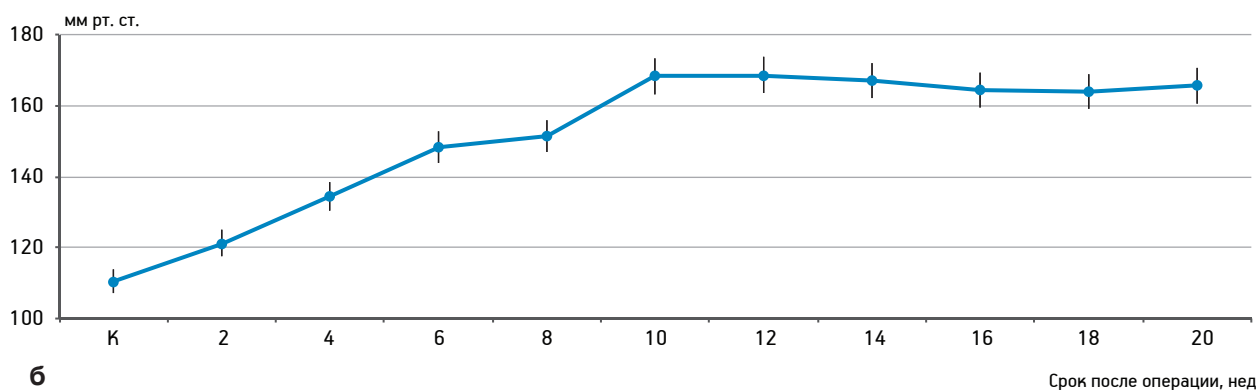
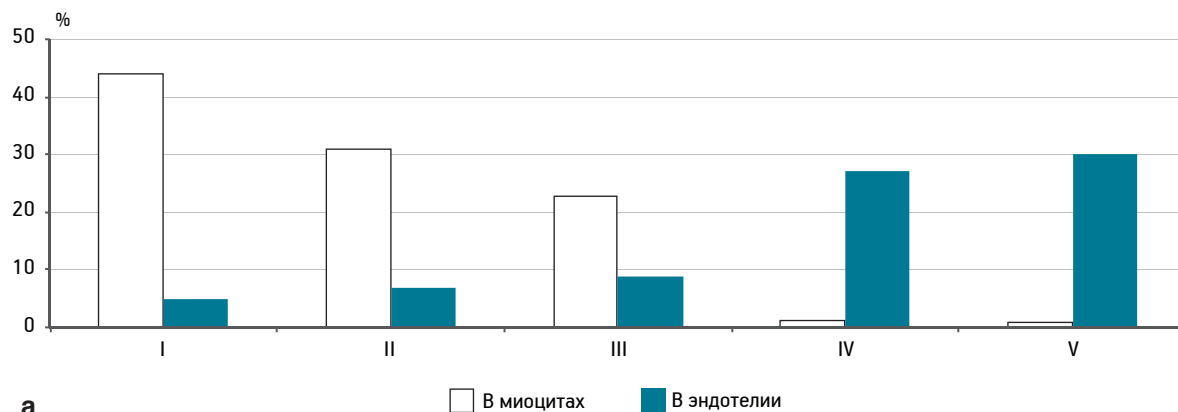


Рис. 1. Ветви артерий II (а, е), III (б, в, ж, з), IV (г, д, и, к) порядков у контрольных крыс (а—д), на 16-й неделе после вызванной реноваскулярной гипертензии (е—к).

а — локализация гемоксигеназы 2 (ГО-2); б — локализация гемоксигеназы 1 (ГО-1); стрелки — эндотелий; две стрелки — миоциты. а—д — иммуногистохимическая реакция на ГО-2; е—к — иммуногистохимическая реакция на ГО-1

В результате проведенного нами исследования установлено, что у КГ крыс ГО-2 выявляется в 36–49% артерий разного калибра МО мозга. В зависимости от порядка ветвления (диаметра) артерий МО ГО-2 может находиться в миоцитах, эндотелии или в тех и других структурах вместе. Впрочем, нередко утверждается, что распространение гемоксигеназы ограничивается или

эндотелием [18], или исключительно миоцитами [14]. Действительно, с помощью обратной полимеразной реакции экспрессия ГО-2 установлена в миоцитах крупных артерий МО мозга, но не выявлена в их эндотелии. СО-опосредованные эффекты не исчезали и в деэндотелизированных сосудах: аорте, подвздошных и сонных артериях [9, 19]. На этом основании роль эндотелия



в СО-зависимых реакциях этих артерий подвергалась сомнению.

Не исключено, противоречия в оценке локализации гемоксигеназы в стенке артерий обусловлены тем, что для исследований были использованы либо крупные, либо мелкие артерии. Имеются данные, что функциональное значение мышечно-го и эндотелиального компонентов в артериях разного калибра существенно различается [3, 4, 15]. Установленные нами топохимические особенности ГО-2 в структурных элементах стенки артерий МО I–V порядков отражают эти различия. В ветвях I–II порядка МО, имеющих относительно хорошо развитую среднюю оболочку, регулирующая функция СО связана главным образом с гладкими миоцитами. В ветвях III–IV порядков вазомоторика обеспечивается продукцией этой сигнальной молекулы часто одновременно в миоцитах и эндотелии, что соотносится с особенно важной ролью этих сосудов в регуляции внутримозговой гемодинамики [3, 9], в более мелких артериях, в которых миоциты постоянного слоя не образуют, — в эндотелии. По современным представлениям, именно эндотелий играет ведущую роль в инициации вазодилатации, по крайней мере, мелких артерий [5, 18]. Любое проявление их активности связано с гиперполяризацией эндотелиоцитов, после чего электрический сигнал, генерируемый в этих клетках, через мио-эндотелиальные соединения передается миоцитам сосуда. Мишенями действия СО в миоцитах могут быть циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) и Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы [14, 17]. СО увеличивает калий-зависимый ток, вызывая гиперполяризацию миоцитов и вазодилатацию. При блокировании цГМФ и Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов СО-индуцированная вазорелаксация прекращается [3, 17, 20].

В отличие от ГО-2, экспрессия индуцибельной формы гемоксигеназы в артериях МО мозга у крыс КГ нами не установлена. Другим авторам не удалось обнаружить ГО-1 у нормотензивных крыс и мышей методом Вестерн-иммуноблоттинга, причем не только в артериях мозга, но и в артериях легких и почек [9, 13]. При экспериментальной гипертензии в ветвях артерий МО разного калибра выявляются обе изоформы гемоксигеназы. Однако динамика преобразований сосудов, мар-

кированных каждым из этих ферментов, заметно различается. Так, количество ГО-2-позитивных сосудов резко уменьшается между 10–12-й неделями и достигает минимальных значений на 16-й неделе РВГ. В этот период среди иммунопозитивных артерий МО наиболее выражено сокращение доли мелких ветвей, констрикция которых вносит наиболее весомый вклад в развитие гипертензии [3, 4, 20]. Неслучайно, между 10–16-й неделями РВГ величина АД удерживается на особенно высоком уровне. Известно, что у животных с накаutom гена гемоксигеназы, а также при использовании ее специфических блокаторов продукция СО сокращается, что приводит к развитию стойкой гипертензии [12, 19]. Вазоконстрикция и повышение АД, наблюдающиеся при снижении концентрации этого газа, исчезают после введения доноров СО [7].

ГО-1-позитивные артерии начинают выявляться на 4–8-й неделе РВГ. В начале их немного, однако, к 16-й неделе существенно увеличивается и до конца наблюдений удерживается на постоянно высоком уровне. Возможно, благодаря экспрессии индуцибельной формы фермента в крупных артериях, количество которых в этот период возрастает особенно значительно, достигается стабилизация АД на новом уровне, поскольку ГО-1 обеспечивает более выраженный вазодилататорный эффект, чем с ГО-2 [3, 21]. Опубликованы материалы, в которых указано, что на 16–20-й неделе гипертензии по ходу артерий МО мозга образуются булавовидные утолщения, что свидетельствует о срыве механизма ауторегуляции и ремоделировании сосудов [5, 6]. В стенке сосудистых деформаций авторами установлена экспрессия индуцибельной NO-синтазы, способной в десятки раз увеличить концентрацию оксида азота, которому, как известно, принадлежит ключевая роль в развитии гипертрофии сосудистой стенки и ее инволютивных изменений. Нельзя исключить, что и ГО-1, способствуя усилению продукции СО в артериях МО, участвует не только в регуляции вазомоторики, но и в адаптивных перестройках стенки сосудов.

Таким образом, у КГ животных в продукции СО принимает участие ГО-2, у гипертензивных — ГО-2 и ГО-1, экспрессия которых в зависимости от диаметра артерий может проходить в эндоте-

Рис. 2. Относительное содержание ветвей артерий I–V порядков в мягкой оболочке головного мозга крыс с положительной реакцией на гемоксигеназу 2 (ГО-2) в миоцитах и эндотелии у контрольной группы крыс (а), а также изменения значений артериального давления (б), относительное содержание ГО-2- (в) и ГО-1-позитивных (г) артерий у крыс в различные сроки вызванной реноваскулярной гипертензии (РВГ).

б — г — по горизонтальной оси: К — контроль, сроки после операции и порядок ветвей артерий; по осям ординат: б — артериальное давление (мм рт. ст.); в, г — относительное содержание ветвей артерий.

лии и миоцитах. Наибольшее количество ГО-1-позитивных сосудов наблюдается в то время, когда число артерий МО, маркированных ГО-2, сокращается особенно значительно, что совпадает по времени со стабилизацией артериального давления на новом более высоком уровне.

ЛИТЕРАТУРА

1. Афанасьев А.А., Черток В.М. Использование автоматизированной системы анализа изображений Allegro-МС для количественной биомикроскопии микроциркуляторного русла // Тихоокеанск. мед. журн. 2004. № 2. С. 82–86.
2. Коцюба А.Е., Черток В.М. Распределение гемоксигеназы-2 в ядрах головного мозга крысы // Морфология. 2012. Т. 142, № 6. С. 15–19.
3. Коцюба А.Е., Черток В.М., Черток А.Г. Возрастные особенности СО-опосредованной реакции пиллярных артерий разного диаметра у крыс // Бюл. эксперим. биол. 2011. Т. 162, № 11. С. 612–617.
4. Черток В.М., Коцюба А.Е. Возрастные особенности вазомоторной регуляции артерий мягкой оболочки мозга у крыс // Бюл. эксперим. биол. 2010. Т. 149, № 3. С. 340–344.
5. Черток В.М., Коцюба А.Е. Изменения индуцибельной NO-синтазы в пиллярных артериях разного диаметра у гипертензивных крыс // Бюл. эксперим. биол. 2011. Т. 152, № 8. С. 220–223.
6. Черток В.М., Коцюба А.Е. Эндотелиальный (интимальный) механизм регуляции мозговой гемодинамики: трансформация взглядов // Тихоокеанск. мед. журн. 2012. № 2. С. 17–26.
7. Черток В.М., Коцюба А.Е., Коцюба Е.П. Гемоксигеназа-2 в нейронах головного и спинного мозга человека // Вестн. Росс. акад. мед. наук. 2012. № 6. С. 36–41.
8. Черток В.М., Черток А.Г. Регуляторный потенциал капилляров мозга // Тихоокеанский мед. журн. 2016. № 2. С. 72–81.
9. Andresen J. J., Shafi N. I., Durante W., Bryan R. M. Jr. Effects of carbon monoxide and heme oxygenase inhibitors in cerebral vessels of rats and mice // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2006. Vol. 291, № 1. P. H223–H230.
10. Chen Y., Huang F., Wang D. Upregulation of heme oxygenase-1 expression may facilitate memory and learning in mice // Exp. Ther. Med. 2013. Vol. 5, № 5. P. 1491–1495.
11. Ewing J. F., Maines M. D. Regulation and expression of heme oxygenase enzymes in aged-rat brain: age related depression in HO-1 and HO-2 expression and altered stress-response // J. Neural. Transm. (Vienna). 2006. Vol. 113, № 4. P. 439–454.
12. Fredenburgh L. E., Merz A. A., Cheng S. Haeme oxygenase signalling pathway: implications for cardiovascular disease // Eur. Heart. J. 2015. Vol. 36, № 24. P. 1512–1518.
13. Haines D. D., Lekli I., Teissier P. et al. Role of haeme oxygenase-1 in resolution of oxidative stress-related pathologies: focus on cardiovascular, lung, neurological and kidney disorders // Acta Physiol (Oxf). 2012. Vol. 204, № 4. P. 487–501.
14. Jones W., Durante W., Korthuis R. J. Heme Oxygenase-1 deficiency leads to alteration of soluble guanylate cyclase redox regulation // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2010. Vol. 335, № 1. P. 85–91.
15. Leffler Ch. W., Parfenova H., Jaggar J. H. Carbon monoxide as an endogenous vascular modulator // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2011. Vol. 301, № 1. P. H1–H11.
16. Levitt D. G., Levitt M. D. Carbon monoxide: a critical quantitative analysis and review of the extent and limitations of its second messenger function // Clin. Pharmacol. 2015. Vol. 26, № 7. P. 37–56.
17. Maines M. D. The Heme oxygenase system, past, present and future // Antioxidant Redox Sign. 2004. Vol. 6, № 5. P. 797–801.
18. Naik J. S., O'Donoghue Th. L., Walker B. R. Endogenous carbon monoxide is an endothelial-derived vasodilator factor in the mesenteric circulation // Am. J. Physiol. Heart and Circul. Physiol. 2009. Vol. 284, № 3. P. H838–H845.
19. Ndisang J. F., Tabien H. E., Wang R. Carbon monoxide and hypertension // J. Hypertens. 2004. Vol. 22, № 6. P. 1057–1074.
20. Tiwari S., Ndisang J. F. Heme oxygenase system and hypertension: a comprehensive insight // Curr. Pharm. Des. 2014. Vol. 20, № 9. P. 1354–1369.
21. Wu M. L., Ho Y. C., Lin C. Y., Yet S. F. Heme oxygenase-1 in inflammation and cardiovascular disease // Am. J. Cardiovasc. Dis. 2011. Vol. 1, № 2. P. 150–158.

Поступила в редакцию 20.08.2016

Получена после доработки 09.01.2017

DISTRIBUTION OF HEME-OXYGENASES IN THE WALLS OF THE PIA MATER ARTERIES IN RAT BRAIN

V.M.Chertok, A.Ye.Kotsyuba, A.G.Chertok

Localization of heme-oxygenase-2 (HO-2) and heme oxygenase-1 (HO-1) isoforms in the walls of pial arteries of I–V order was studied in normotensive rats and in animals with induced renovascular hypertension (RVH). Immunohistochemical detection of heme-oxygenases was performed on 40 male Wistar rats. It was found that the vasomotor function of CO in III–V order arteries was mainly related to the endothelium, while in I–II order branches — to the myocytes. In normotensive animals, CO formation was associated with HO-2 activity, while in hypertensive animals it was dependent on both HO-2 and HO-1. The largest number of vessels expressing HO-1 was registered in the 16th week of RVH, when the proportion of vessels labeled with HO-2 was the smallest, which coincided in time with the stabilization of blood pressure at a new, higher level.

Key words: brain, pia mater, arteries, carbon monoxide, heme oxygenases

Department of Human Anatomy, Pacific Ocean State Medical University, Vladivostok