

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© В.М. Черток, А.Е. Коцюба, 2013
УДК 611.818.018.8:599.323.4

В.М. Черток и А.Е. Коцюба

РАСПРЕДЕЛЕНИЯ NADPH-ДИАФОРАЗЫ И НЕЙРОНАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ В ЯДРАХ ПРОДОЛГОВАТОГО МОЗГА КРЫСЫ

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

Распределение нитроксидергических нейронов в ядрах продолговатого мозга у крыс линии Вистар (n=8) исследовано гистохимическим (NADPH-диафораза) и иммуногистохимическим методом с использованием антисыворотки к нейрональной форме синтазы окиси азота (nNOS). Установлено, что NADPH-диафораза определяется в крупных и мелких нейронах чувствительных, вегетативных и двигательных ядер. В последних обнаружено особенно много нейронов с активностью этого фермента. В отличие от NADPH-диафоразы, nNOS в одноименных ядрах всегда выявляется в меньшем количестве преимущественно небольших по размеру нейронов. В чувствительных ядрах (ядро одиночного пути, ретикулярные мелко-клеточное и латеральное ядра, спинномозговое ядро тройничного нерва) находится в 1,5–3 раза больше nNOS-нейронов, чем в двигательных ядрах. В некоторых ядрах (двойное ядро, ядро подъязычного нерва), включающих многочисленные NADPH-диафороазо-позитивные нейроны, иммунореактивные клетки выявляются особенно редко.

Ключевые слова: ядра продолговатого мозга, нитроксидергические нейроны, NADPH-диафораза, нейрональная NO-синтаза, крыса

В настоящее время накоплен большой объем информации о нейронной организации нитроксидергических систем мозга. Повышенный интерес исследователей к оксиду азота (NO) во многом объясняется его участием в обеспечении многообразных функций нейрона [2, 5, 6, 8, 12, 17, 21]. В связи с этим приобретают особую важность знания о распределении NO-ергических нейронов в мозгу. Однако пока не сложилось единого мнения ни о топографии, ни о численности нейронов, в которых экспрессируются ферменты синтеза NO, и, прежде всего, нейрональная форма синтазы NO (nNOS), которая в физиологических условиях участвует в синтезе этого газа в нервных клетках [8, 9, 12].

О локализации nNOS в структурных образованиях мозга часто судят по наличию в них активности NADPH-диафоразы, поскольку в некоторых нейронах последняя колокализована с nNOS [11, 14–16]. Хотя результаты гистохимического выявления NADPH-диафоразы и иммуногистохимического — nNOS довольно часто не совпадают [13, 19, 21], для изучения NO-ергических систем мозга до сих пор широко используется гистохимическая реакция на NADPH-диафоруазу.

Цель настоящего исследования — сравнительное исследование топографии и численности

NADPH-диафороазо- и nNOS-позитивных нейронов в некоторых ядрах продолговатого мозга крыс.

Материал и методы. Исследование проведено на крысах линии Вистар (n=8) массой 240–280 г, содержащихся в условиях лабораторного вивария на стандартном рационе. Экспериментальные манипуляции производили в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1077 г. МЗ СССР). Животных выводили из эксперимента передозировкой 3% раствора тиопенталнатрия. Из полости черепа извлекали головной мозг, отделяли продолговатый мозг, фиксировали его в течение 1 ч в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,4) при 4 °С, после чего на криостате делали срезы толщиной 30 мкм.

NADPH-диафоруазу в нейронах выявляли гистохимическим (ГХ) методом В.Т.Норе и S.R. Vincent [16]. Специфичность реакции проверяли инкубацией нескольких срезов в растворах, не содержащих NADPH или содержащих NADP вместо NADPH. Для иммуногистохимического (ИГХ) исследования использовали поликлональные антитела кролика против nNOS (ICN, Biomedicals, США, 1:5000). Для выявления продукта реакции срезы инкубировали, используя стрептовидинпероксидазный комплекс (Biomedicals, Германия), стандартную avidин-биотиную систему визуализации ABC-комплекса (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Labs, Burlingame, США). Оценку специфичности реакции проводили при окрашивании срезов без первичных или вторичных антител.

Сведения об авторах:

Черток Виктор Михайлович (e-mail: chertokv@mail.ru), Коцюба Александр Евгеньевич (e-mail: akotc@mail.ru), кафедра анатомии человека, Тихоокеанский государственный медицинский университет, 690990, Владивосток, пр. Острякова, 2

Изучали ядро одиночного пути (ЯОП), ретикулярные гигантоклеточное (РГЯ), парагигантоклеточное (РПГЯ), мелкоклеточное (РМЯ) и латеральное (РЛЯ) ядра, дорсальное ядро блуждающего нерва (ДЯБН), двойное ядро (ДЯ), ядро подъязычного нерва (ЯПН), спинномозговое ядро тройничного нерва (СПМЯ). Для этого в серии из последовательных срезов мозга один — окрашивали раствором метиленового синего, 2-й — использовали для ГХ, третий — для ИГХ-исследования. В проекции среза каждого ядра определяли площадь профильного поля нейронов (мкм^2), общее количество клеток, выявленных при окраске метиленовым синим, долю, приходящуюся отдельно на NADPH-диафоразо- и pNOS-позитивные нейроны, а также количество этих клеток из расчета на $0,01 \text{ мм}^3$ (относительную плотность), как это было описано нами ранее [6]. Все нейроны в соответствии с площадью их тела были разделены на 3 размерные группы: мелкие ($50\text{--}250 \text{ мкм}^2$), средние ($251\text{--}680 \text{ мкм}^2$) и крупные (свыше 681 мкм^2). Количественную обработку материала проводили с использованием компьютерных программ автоматизированной системы анализа изображений Allegro-MS [1]. Данные количественного анализа представляли в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего, полученных при обработке не менее 12 срезов каждого ядра. Для оценки значимости цифровых данных применяли t-критерий Стьюдента. Различия считали значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования. Во всех изученных ядрах мозга выявляются NO-позитивные нейроны, которые различаются по форме, размеру, плотности расположения, интенсивности реакции (рис. 1). Большинство тел нейронов имеют округлую, веретеновидную или треугольную форму. Реже наблюдаются клетки полигональной, а в единичных случаях звездчатой формы. В отдельных ядрах (РГЯ, РПГЯ) или между ними встречается ограниченное количество (около 1%) гигантских пирамидных нейронов с площадью сечения тела свыше $2\text{--}2,5 \text{ тыс. мкм}^2$, которые обладают активностью NADPH-диафоразы, но не выявляются при реакции на pNOS. Иммунонегативными являются многие отростки нейронов и капилляры, а также более крупные сосуды, которые при ГХ-исследовании нередко в большом количестве наблюдаются в проекции ядер (см. рис. 1, а, в).

При сопоставлении данных, полученных при ГХ- и ИГХ-исследовании одноименных ядер, в ряде случаев определяются существенные различия доли мелких, средних и крупных нейронов

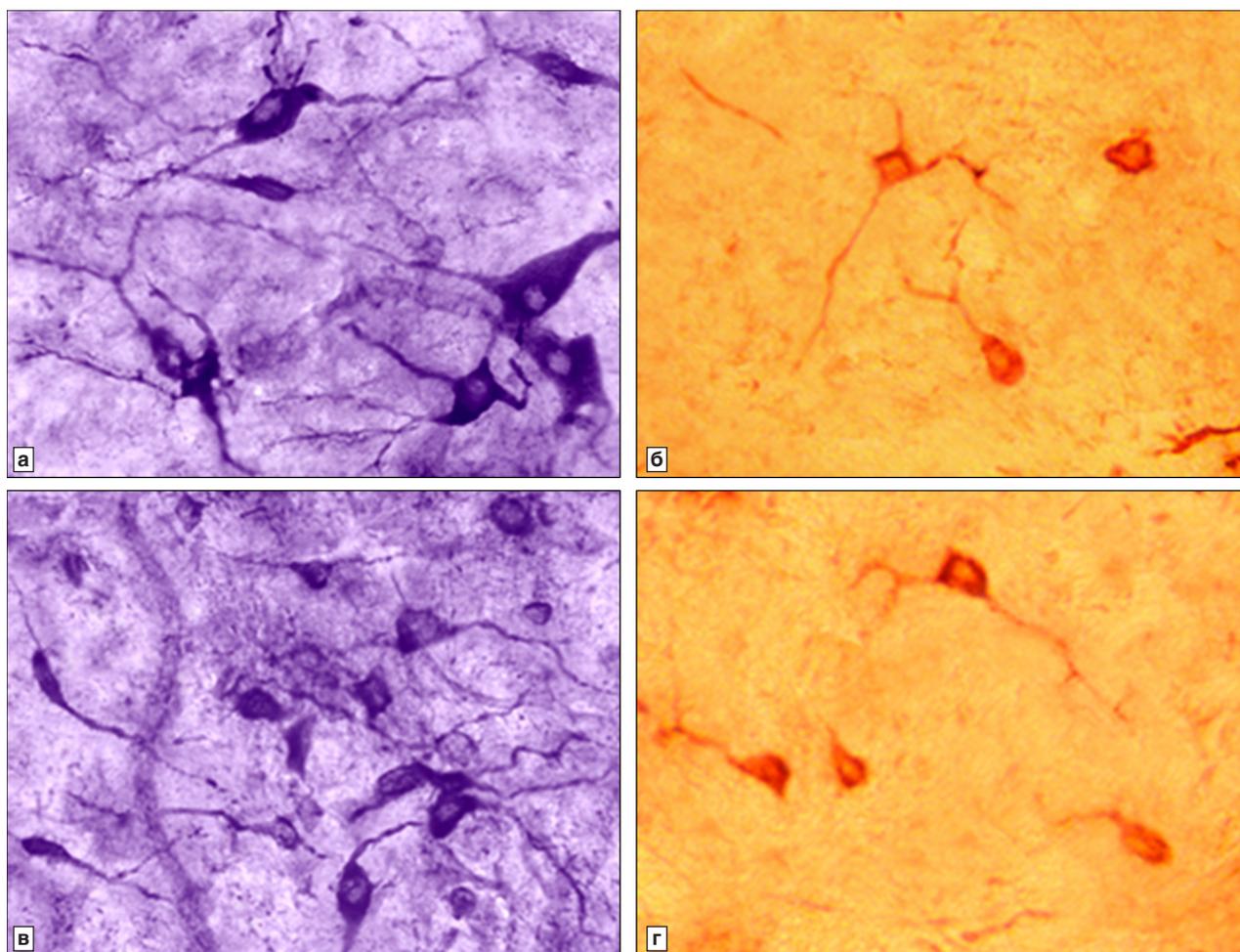


Рис. 1. Нитроксидергические нейроны ядра языкоглоточного нерва (а, б) и спинномозгового ядра тройничного нерва (в, г) крысы.

а, в — гистохимическая реакция на NADPH-диафоразу; б, г — иммуногистохимическая реакция на pNOS. Об. 20, ок. 15

(рис. 2). Как видно, экспрессия nNOS наблюдается преимущественно в мелких нейронах. Локализация NADPH-диафоразы в меньшей степени связана с их размерами: наряду с небольшими нейронами, активность фермента часто определяется в средних и крупных. Доля крупных NADPH-диафоразо-положительных нейронов выше в двигательных ядрах, в которых метиленовым синим также определяется наибольшее количество таких клеток (ДЯ, ЯПН, РГЯ, РПГЯ). В ДЯ и ЯПН на долю мелких клеток, содержащих этот фермент, приходится чуть больше 20%, но свыше 70% иммунопозитивных нейронов. В ядрах, известных своими сенсорными или ассоциативными функциями (ЯОП, РМЯ, РЛЯ, СПМЯ), крупные нейроны встречаются относительно редко при ГХ- и в единичных случаях — при ИГХ-исследовании (см. рис. 2).

Количество NO-ергических нейронов напрямую не связано с численностью клеток, окрашивающихся метиленовым синим (рис. 3, а). При этом ГХ-методом всегда определяется больше NO-положительных нейронов, чем при использовании ИГХ-реакции. Например, из 696 нейронов, которые выявляются при окраске метиленовым синим в проекции ЯОП, 170 (24,4%) обладают активностью NADPH-диафоразы и лишь 86 (12,6%) — являются иммунопозитивными. Тогда как в СПМЯ на долю NADPH-диафоразо-положительных нейронов приходится 18,9%, ИМХ — лишь 9,7% (из 812 клеток, окрашивающихся метиленовым синим, ГХ-методом определяются 154 нейрона, ИМХ — 79). В РМЯ из 704 клеток, окрашивающихся метиленовым синим, ГХ-методом выявля-

ются 287 (40,8%), ИМХ — 201 (28,6%). Сходные результаты получены при изучении количественного распределения NADPH-диафоразо- и иммунопозитивных нейронов в других исследованных ядрах (см. рис. 3, а).

Наиболее значительные отличия количества нейронов, связанные с методом их выявления, установлены в ДЯ и ЯПН. В первом — на долю NADPH-диафоразо-положительных клеток приходится 75,8%, маркированных при реакции на nNOS — около 8%, во втором — ГХ-методом определяется 87,9%, ИГХ — 5,8%.

В тех случаях, когда NO-ергических нейронов много и они располагаются довольно плотно, значения концентрации клеток в ядре выше (см. рис. 3, б). Поэтому в одноименных ядрах величина показателя при ИМХ-исследовании всегда ниже, чем при использовании ГХ-метода. Однако поскольку величина этого показателя зависит не только от количества нейронов, но и от их размеров, даже не самое большое количество клеток при их малых размерах приводит к существенному приросту их относительной плотности. В связи с этим, различия величины показателя, вычисленные при использовании ГХ-и ИГХ-методов, в СПМЯ и ДЯБН выражены меньше, чем в других центрах (РГЯ, РПГЯ, ДЯ), в которых определяются хотя и крупные, но многочисленные нейроны, обладающие активностью NADPH-диафоразы, однако имеется весьма ограниченное число иммунопозитивных клеток.

Обсуждение полученных данных. В начале 60-х годов E. Thomas и A. G. E. Pearse [18]

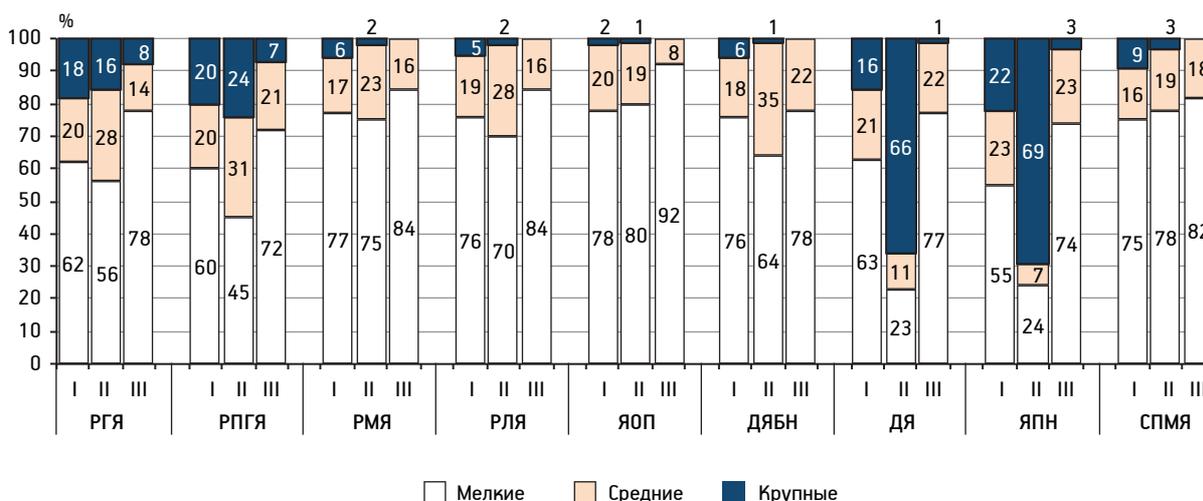


Рис. 2. Процентное соотношение мелких, средних и крупных нейронов в ядрах продолговатого мозга при окрашивании клеток метиленовым синим (I), а также при гистохимическом (II) и иммуногистохимическом (III) выявлении нитроксидергических нейронов у крысы.

РГЯ — ретикулярное гигантоклеточное ядро; РПГЯ — ретикулярное парагигантоклеточное ядро; РМЯ — ретикулярное мелкоклеточное ядро; РЛЯ — ретикулярное латеральное ядро; ЯОП — ядро одиночного пути; ДЯБН — дорсальное ядро блуждающего нерва; ДЯ — двойное ядро; ЯПН — ядро подъязычного нерва; СПМЯ — спинномозговое ядро тройничного нерва

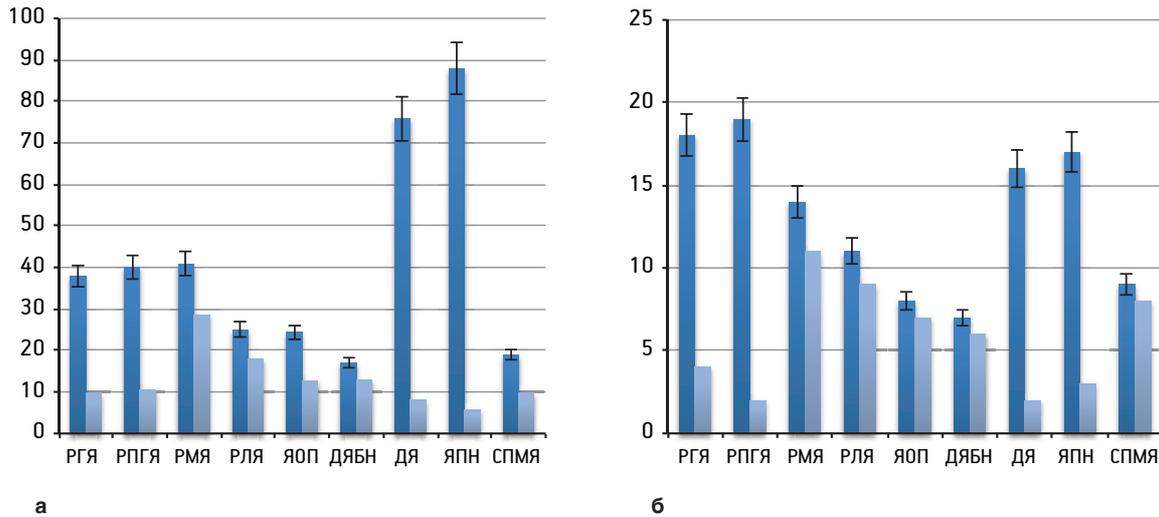


Рис. 3. Доля (а) и относительная плотность (б) нитроксидазгических нейронов в ядрах продолговатого мозга крысы.

Тёмные столбики — при гистохимической реакции на NADPH-диафорузу; светлые столбики — при иммуногистохимической реакции на pNOS. По горизонтальной оси — ядра продолговатого мозга (обозначения см. на рис. 2); по оси ординат — исследованные параметры (%). За 100% принята величина показателей в одноименных ядрах при окраске препаратов метиленовым синим. Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки

при изучении мозга использовали новый тогда гистохимический метод для выявления активности NADPH-диафоразы, способной восстанавливать окисленную форму NADP. В различных отделах мозга авторами было выявлено небольшое количество (около 2%) редко расположенных нейронов с интенсивной ферментной реакцией, за что они получили название «одиночные активные клетки». Однако интерес к этому ферменту вновь возродился после появления публикаций (прежде всего, В.Т.Норе и S.R.Vincent — авторов усовершенствованной версии использованного ранее метода) — о том, что высокой активности NADPH-диафоразы в отдельных нейронах сопутствует экспрессия конститутивных форм NOS, участвующих в синтезе одного из важнейших представителей нового класса передатчиков нервного импульса — NO [11, 15, 16]. Нашлось и объяснение этому феномену. Оказалось, что в некоторых случаях конститутивные NOS, кроме способности катализировать образование NO, обладают NADPH-диафоразной активностью, используя восстановленную форму NADPH как кофактор в качестве донора электронов при синтезе NO. Позднее как-то забылось, что речь шла об «отдельных клетках» и о «высокой активности NADPH-диафоразы», явление распространили на всю популяцию NO-ергических нейронов. NADPH-диафорузу стали отождествлять с конститутивными NOS, в частности, с pNOS, несмотря на то, что они отличаются не только функционально и биохимически [8, 12, 17], но и распре-

делением на клеточном и субклеточном уровнях [9, 10, 13, 20, 21]. Неслучайно многие клетки, обладающие активностью NADPH-диафоразы, при двойном маркировании остаются иммунонегативными после использования антисыворотки к pNOS, что нашло подтверждение на материале, полученном от различных видов животных при изучении нескольких отделов головного, а также спинного мозга и некоторых других органов [10, 13, 17, 19, 21]. Однако эти, несомненно, интересные наблюдения оставляли сомнения, поскольку в большинстве случаев не были подкреплены количественными данными.

Восполняя этот пробел, мы провели сравнительное изучение топографии и количественного распределения нейронов, выявленных каждым из указанных методов, в ядрах продолговатого мозга крыс. Полученные данные показывают, что в стволе мозга NO-ергические нейроны распределены крайне неравномерно, но во всех ядрах, наряду с NADPH-диафоразо-позитивными, находятся нейроны с положительной реакцией на pNOS. Вместе с тем, установлены существенные отличия локализации и численности каждого из этих двух типов нейронов в исследованных нами ядрах. Так, в двигательных ядрах доля нейронов, обладающих активностью NADPH-диафоразы, всегда выше, чем в чувствительных и ассоциативном ядрах. В некоторых ядрах (ДЯ, яПН), включающих многочисленные NADPH-диафоразо-позитивные нейроны, клетки, экспрессирующие pNOS, выявляются особенно редко. При ИГХ-

исследовании наблюдается обратная зависимость: в чувствительных и ассоциативном ядрах (ЯОП, РЛЯ, СПМЯ, РМЯ) содержание таких нейронов выше, чем в двигательных ядрах. Во всех случаях в одноименных ядрах ГХ-методом определяется в 1,5–3 раза больше клеток, чем ИГХ. Причину этих различий еще предстоит выяснить, но стоит заметить, что специфичность ИГХ-метода для определения локализации pNOS доказана многочисленными работами и сомнений не вызывает, в связи с чем для идентификации NO-ергических нейронов он имеет несомненное преимущество перед ГХ-методом, при котором количество выявленных клеток зависит от большого числа факторов [3, 14–16].

Сравнительное изучение клеточного состава ядер, проведенное нами на параллельных срезах, обработанных метиленовым синим, а также для ГХ- и ИГХ-исследования, позволило установить еще одно различие в распределении двух типов нейронов. Оказалось, что pNOS находится преимущественно в мелких клетках, тогда как NADPH-диафороза, кроме того, выявляется в довольно многочисленной группе средних и крупных нейронов. В том и другом случае соотношение мелких, средних и крупных клеток отличается от соответствующих значений, вычисленных на препаратах, окрашенных метиленовым синим. Хотя по этому поводу высказывается и другое мнение: соотношение мелких и крупных NADPH-диафороза-позитивных нейронов в ядрах мозга вполне сопоставимо со значениями численности таких клеток, выявленных метиленовым синим [4].

Отдельный вопрос — об отростках NO-позитивных нейронов. При ГХ-исследовании постоянно выявляются клетки с многочисленными длинными или короткими отростками. Наличие хорошо развитой системы чувствительных и эфферентных проводников с разной степенью активности NADPH-диафорозы неоднократно отмечалось в головном и спинном мозгу, в составе сосудистых и интрамуральных нервных сплетений, методами световой и электронной микроскопии [2, 3, 6, 7, 12]. В отличие от него, ИГХ-метод позволяет выявить ограниченное число отростков, которые, по оценкам специалистов [9, 10, 17], являются исключительно дендритами нейронов.

Таким образом, несмотря на некоторые общие признаки клеточной локализации NADPH-диафорозы и pNOS в ядрах продолговатого мозга, существуют явные различия топографии и количественного распределения нейронов, экспрессирующих эти два фермента, что заставляет с необходимой осмотрительностью относиться к мате-

риалам, полученным при изучении NO-ергических нейронов ГХ-методом на NADPH-диафорозу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Афанасьев А. А., Коцюба А. Е. и Черток В. М. Система для автоматизированного анализа изображений микро- и макроструктур Allegro-MS. Тихоокеанский мед. журн., 2002, № 4, с. 65–68.
2. Коцюба А. Е., Коцюба Е. П. и Черток В. М. Нитроксидергические нервные волокна внутримозговых сосудов. Морфология, 2009, т. 135, вып. 2, с. 27–32.
3. Порсева В. В. и Шилкин В. В. NADPH-диафороза-позитивные структуры спинного мозга и спинномозговых узлов. Морфология, 2010, т. 137, вып. 2, с. 13–17.
4. Старцева М. С., Шуматова Т. А., Маркина Л. Д. и Мотавкин П. А. Сравнительная характеристика NADPH-позитивных нейронов головного мозга человека и крысы. Тихоокеанский мед. журн., 2012, № 3, с. 74–76.
5. Черток В. М. и Коцюба А. Е. NO-позитивные нейроны в ядрах бульбарного вазомоторного центра человека при артериальной гипертензии. Бюл. exper. биол., 2009, т. 147, № 5, с. 571–575.
6. Черток В. М. и Коцюба А. Е. Оксид азота в механизмах афферентной иннервации артерий головного мозга. Цитология, 2010, № 1, с. 24–29.
7. Черток В. М., Коцюба А. Е. и Бабич Е. В. Эфферентная иннервация артерий мягкой оболочки мозга человека при артериальной гипертензии. Морфология, 2009, т. 135, вып. 3, с. 35–41.
8. Abudara V., Ferna A., Chase M. H. and Morales F. Nitric Oxide as an Anterograde Neurotransmitter in the Trigeminal Motor Pool. J. Neurophysiol., 2002, v. 88, p. 497–506.
9. Atkinson L., Batten T. F., Corbett E. K. et al. Subcellular localization of neuronal nitric oxide synthase in the rat nucleus of the solitary tract in relation to vagal afferent inputs. Neuroscience, 2003, v. 118, № 1, p. 115–122.
10. Brüning G., Katzbach R. and Mayer B. Histochemical and immunocytochemical localization of nitric oxide synthase in the central nervous system of the goldfish, *carassius auratus*. J. Comp. Neurol., 1995, v. 358, № 3, p. 353–382.
11. Dawson T. M., Bredt D. S., Fotuhi M. et al. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, v. 88, p. 7797–7801.
12. Esplugues J. V. NO as a signalling molecule in the nervous system. British J. Pharmacol., 2002, v. 135, № 5, p. 1079–1095.
13. Giraldez-Perez R. M., Gaytan S. P., Ruano D. et al. Distribution of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase reactivity in the central nervous system of the goldfish (*Carassius auratus*). J. Chem. Neuroanat., 2008, v. 35, № 1, p. 12–32.
14. González-Hernandez T., Perez de la Cruz M. A. and Mantolan-Sarmiento B. Histochemical and immunohistochemical detection of neurons that produce nitric oxide: effect of different fixative parameters and immunoreactivity against non-neuronal NOS antisera. J. Histochem., Cytochem., 1996, v. 44, p. 1399–1413.
15. Hope B. T., Michael G. J., Knigge K. M. and Vincent S. R. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, v. 88, p. 2811–2814.

16. Hope B.T. and Vincent S.R. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase. *J. Histochem. Cytochem.*, 1989, v. 37, p. 653–661.
17. Huynh P. and Boyd S.K. Nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase distribution in the Bullfrog (*Rana catesbeiana*) CNS: pathways and functional implications. *Brain Behav. Evol.*, 2007, v. 70, p. 145–163.
18. Thomas E. and Pearse A.G.E. The solitary active cells: histochemical demonstration of damage-resistant nerve cells with TPN-diaphorase reaction. *Acta Neuropathol.*, 1964, v. 3, p. 238–249.
19. Traub R.J., Solodkin A., Meller S.T. and Gebhart G.F. Spinal cord NADPH-diaphorase histochemical staining but not nitric oxide synthase immunoreactivity increases following carrageen in produced hind paw in amputation in the rat. *Brain Res.*, 1994, v. 668, p. 204–210.
20. Tseng C.Y., Lue J.H., Chang H.M. et al. Ultrastructural localization of NADPH-d/nNOS expression in the superior cervical ganglion of the hamster. *J. Anat.*, 2000, v. 197, № 3, p. 461–75.
21. Wolf G. Nitric oxide and nitric oxide synthase: biology, pathology, localization. *Histol. Histopathol.*, 1997, v. 12, p. 251–261.

Поступила в редакцию 31.05.2013
Получена после доработки 08.07.2013

THE DISTRIBUTION OF NADPH-DIAPHORASE AND NEURONAL NO SYNTHASE IN RAT MEDULLA OBLONGATA NUCLEI

V.M. Chertok and A.Ye. Kotsyuba

The distribution of nitroxide ergic neurons in the medulla oblongata nuclei in Wistar rats (n=8) was studied histochemically (NADPH-diaphorase) and using immunohistochemistry with an antiserum against neuronal form of nitric oxide synthase (nNOS). NADPH-diaphorase activity was found in large and small neurons of the sensory, autonomic and motor nuclei. The latter were especially rich in the cells demonstrating the activity of the enzyme. Unlike NADPH-diaphorase, nNOS in the corresponding nuclei was always detected in the fewer number of neurons, predominantly of small sizes. The sensory nuclei (nucleus of solitary tract, reticular parvocellular and lateral nuclei, spinal nucleus of the trigeminal nerve) contained 1.5–3 times more nNOS neurons than in motor nuclei. In some nuclei (nucleus ambiguus, hypoglossal nerve nucleus), containing numerous NADPH-diaphorase-positive neurons, immunoreactive cells were particularly rare

Key words: *medulla oblongata nuclei, nitroxidergic neurons, NADPH-diaphorase, neuronal NO-synthase*

Department of Human Anatomy, Vladivostok State Medical University