

© А. Е. Коцюба, В. М. Черток, 2012
УДК 612.015.1:611.81:599.323.4

А. Е. Коцюба и В. М. Черток

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕМОКСИГЕНАЗЫ-2 В ЯДРАХ СТВОЛА ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ

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

Иммуноцитохимическим методом изучено распределение нейронов, экспрессирующих гемоксигеназу-2 (ГО-2), в ядрах различных отделов ствола головного мозга 16 крыс-самцов линии Вистар. В различных ядрах определяли размеры нейронов и оптическую плотность продукта гистохимической реакции в их цитоплазме. В ядрах продолговатого мозга, моста и среднего мозга выявлены ГО-2-позитивные нейроны, различающиеся формой, количеством и размерами. Установлено, что в чувствительных ядрах ГО-2-позитивные клетки встречаются в 3–5 раз чаще, чем в двигательных. Между тем, имеется относительно большое количество как чувствительных, так и двигательных ядер, в которых ГО-2-позитивные нейроны не выявляются или определяются лишь в виде единичных клеток.

Ключевые слова: ядра ствола головного мозга, нейроны, монооксид углерода, гемоксигеназа-2

В последние годы получены весомые доказательства в пользу того, что монооксид углерода (СО) играет роль в различных функциях ЦНС [7, 9, 13, 14]. Субстратом для эндогенного образования СО является молекула гема, расщепление которой в мозгу катализируется главным образом гемоксигеназой-2 (ГО-2) [8, 10, 12]. В головном мозгу крыс определяется высокая концентрация этого фермента, но наибольший уровень экспрессии ГО-2 обнаружен в нейронах мозжечка, гиппокампа и обонятельной луковицы [15, 17].

Вместе с тем, иммуногистохимические исследования ГО-2-позитивных нейронов единичны и ограничиваются демонстрацией таких клеток в мозжечке и гиппокампе [13]. Цель настоящей работы — изучение локализации нейронов, экспрессирующих ГО-2, в ядрах различных отделов ствола головного мозга крысы.

Материал и методы. Работа выполнена на 16 крысах-самцах линии Вистар массой 240–280 г, содержавшихся в условиях лабораторного вивария на стандартном рационе. Экспериментальные манипуляции производили в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Крыс выводили из эксперимента внутривенным введением раствора нембутала (5 мг на 100 г массы). Из полости черепа извлекали головной мозг, отделяли от него продолговатый мозг, мост и средний мозг, которые фиксировали в течение 1 ч в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) при 4 °С.

Из образцов мозга готовили криостатные срезы толщиной 30 мкм, которые обрабатывали для иммуноцитохимического выявления ГО-2. Для этого их последовательно инкубиро-

вали в 1% нормальной сыворотке лошади в течение 1 ч при комнатной температуре, затем с моноклональными антителами мыши против ГО-2 (Abcam, Великобритания) в разведении 1:1000 при температуре 4 °С в течение 18 ч, с биотинилированными антителами лошади против IgG мыши (Vector Labs, США) в разведении 1:100 в течение 2 ч и с авидин-пероксидазным комплексом (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Labs, США) 1 ч при комнатной температуре. Между инкубациями препараты отмывали фосфатным буфером. Для выявления продуктов реакции под контролем микроскопа срезы инкубировали в субстрате для обнаружения пероксидазы (VIP Substrate Kit, VectorLabs, США). Затем срезы промывали, обезживали по стандартной методике и заключали в полистирол. Для оценки специфичности реакции проводили окрашивание срезов без первичных или вторичных антител. В серии из последовательных срезов один обрабатывали 0,5% раствором метиленового синего, другой — использовали для иммуноцитохимического выявления в нём ГО-2. Для оценки специфичности реакции проводили окрашивание срезов без первичных или вторичных антител.

В продолговатом мозгу изучали ядро солитарного тракта (ЯСТ), ретикулярные гигантоклочечное (РГЯ), парагигантоклочечное (РПГЯ), мелкоклочечное (РМЯ) и латеральное (РЛЯ) ядра, дорсальное ядро блуждающего нерва (ДЯБН), в мосту — оральное (РОМЯ) и каудальное (РКМЯ) мостовые ядра, в среднем мозгу — клиновидное (КЯ) и подклиновидное (ПКЯ) ядра. При изучении топографии ядер каждый из двух срезов исследовали отдельно в двух микроскопах, в окуляры которых помещали одинаковые сетки с равновеликими квадратами. Каждое ядро ориентировали по характерным признакам в сагиттальной и фронтальной плоскостях, после чего его контуры воспроизводили на экране монитора в соответствии с положением ядер относительно координат сетки. Для уточнения положения ядер использовали атлас мозга крысы [16].

Сведения об авторах:

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

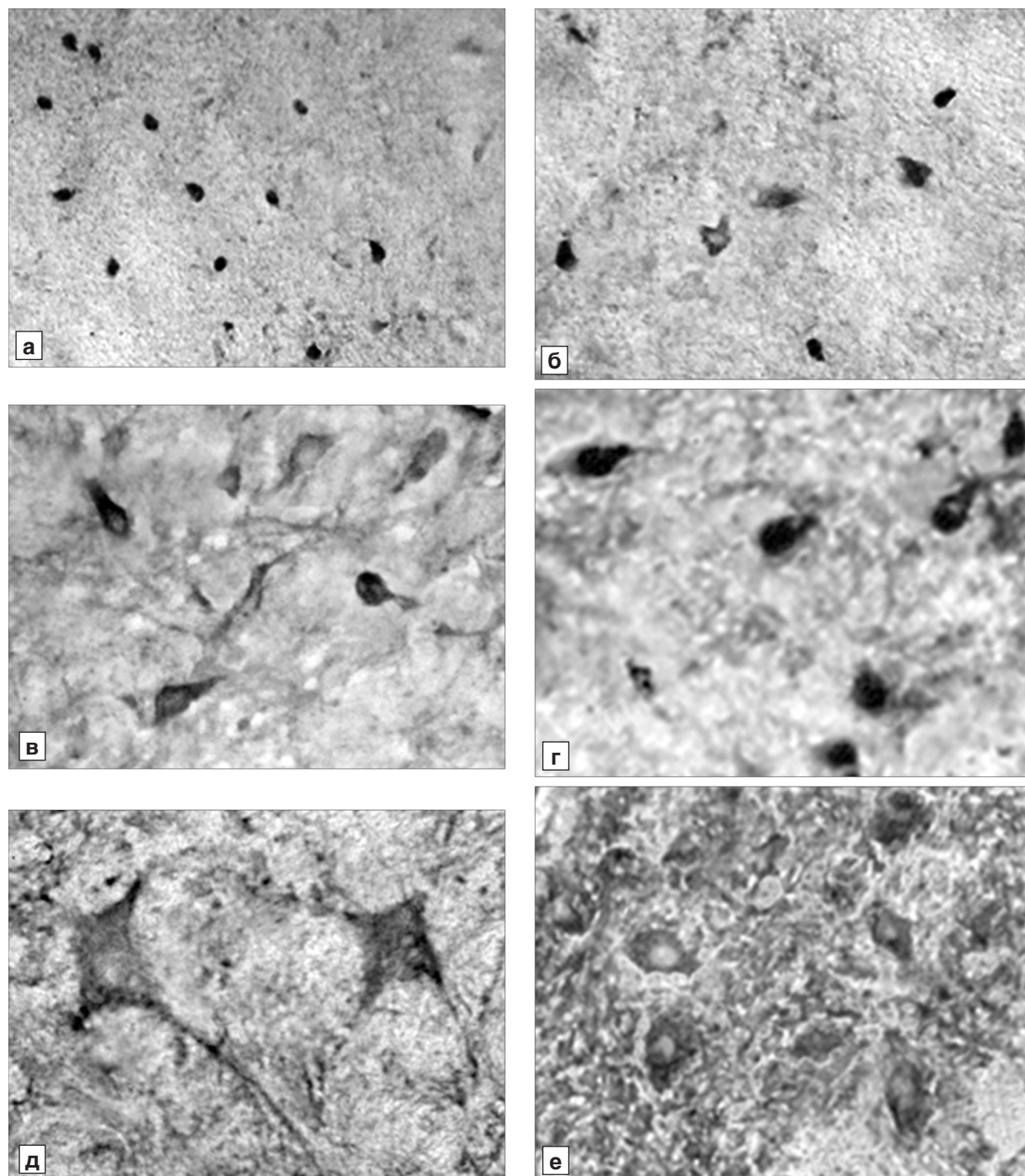


Рис. 1. Гемоксигеназо-2-позитивные нейроны в различных ядрах головного мозга крысы.

Каудальная (а) и ростральная (б) части ядра солитарного тракта; в — дорсальное ядро блуждающего нерва; г — ретикулярное оральное мостовое ядро; д — ретикулярное гигантоклеточное ядро; е — подклиновидное ядро. Иммуноцитохимическая реакция. а, б — об. 10, ок. 10; в-е — об. 40, ок. 10

На срезах каждого ядра определяли общее число нейронов, выявленных при окраске метиленовым синим и вычисляли долю, приходящуюся на ГО-2-позитивные нейроны. Среди последних определяли: размеры, среднее значение оптической плотности продукта реакции (ОПР) — по сумме яркости пикселей образующегося преципитата при сканировании профиля каждого нейрона [3]. По этому признаку выделяли иммунопозитивные нейроны с характерным для каждого из них уровнем ОПР: низкой (30–50 усл. ед.), умеренной (51–70 усл. ед.) и высокой (свыше 71 усл. ед.). Количественную

обработку материала проводили с использованием компьютерных программ автоматизированной системы анализа изображений Allegro MC только в тех ядрах, в которых постоянно и в достаточном количестве для статистической обработки определялись ГО-2-позитивные нейроны. Данные количественного анализа представляли в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего, полученных при обработке не менее 12 срезов каждого отдела мозга. Различия оценивали по t-критерию Стьюдента и считали значимыми при $P < 0,05$.

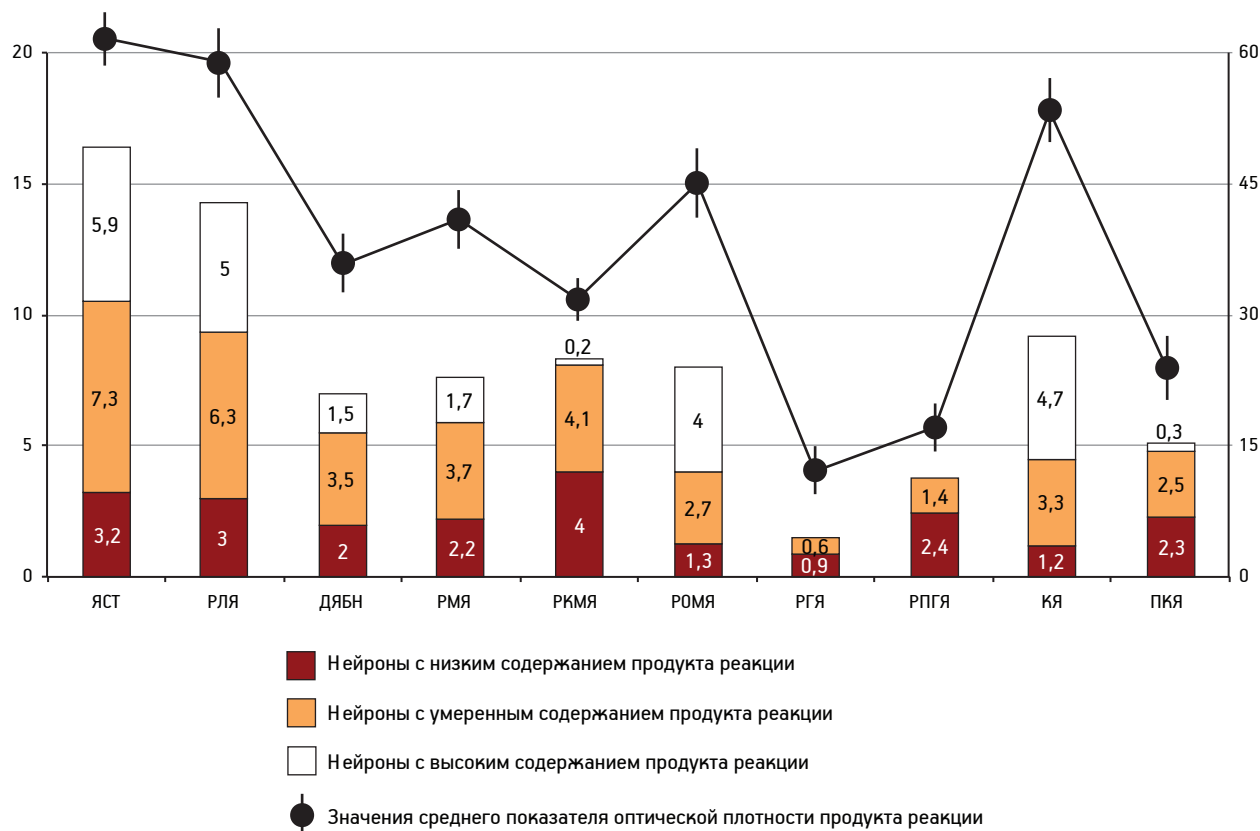


Рис. 2. Количественная характеристика гемоксигеназо-2 (ГО-2)-позитивных нейронов в различных ядрах головного мозга крысы.

По горизонтальной оси: ЯСТ — ядро солитарного тракта; РЛЯ — ретикулярное латеральное ядро; ДЯБН — дорсальное ядро блуждающего нерва; РМЯ — ретикулярное мелкоклеточное ядро; РКМЯ — ретикулярное каудальное мостовое ядро; РОМЯ — ретикулярное оральное мостовое ядро; РГЯ — ретикулярное гигантоклеточное ядро; РПГЯ — ретикулярное парагигантоклеточное ядро; КЯ — клиновидное ядро; ПКЯ — подклиновидное ядро; по осям ординат: слева — доля ГО-2-позитивных нейронов (%); справа — оптическая плотность продукта реакции (усл. ед.); вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки

Результаты исследования. При иммуноцитохимической реакции во всех исследованных отделах головного мозга выявляются ГО-2-позитивные нейроны, различающиеся формой, размерами, плотностью расположения (рис. 1, а–е).

Большая часть энзимпозитивных нейронов имеют овальную или веретеновидную форму и размеры от 9 до 30 мкм. Значительно реже встречаются более крупные клетки звездчатой или треугольной формы. Мелкогранулярный осадок, выпадающий в местах локализации фермента, в зависимости от интенсивности реакции окрашивает нейроны в различные оттенки коричневого цвета. В нейронах с более интенсивной иммуноцитохимической реакцией гомогенный осадок темно-коричневого цвета равномерно заполняет большую часть цитоплазмы, оставляя свободной лишь зону ядра. В нейронах с низким и умеренным содержанием продукта реакции в цитоплазме осадок концентрируется в основном на периферии их тел. В таких случаях он — светло-коричневого

или коричневого цвета и образует отдельно расположенные небольшие скопления в виде гранул. Доля ГО-2-позитивных нейронов, а также количественное соотношение клеток с высоким, умеренным или низким содержанием продукта реакции в исследованных ядрах значительно различаются, что приводит к соответствующим изменениям в них величины ОППР (рис. 2).

В продолговатом мозгу и мосту самую многочисленную группу ГО-2-позитивные нейроны образуют в ЯСТ и РЛЯ (16,4 и 14,3% соответственно). В них же определяются наибольшее содержание клеток с умеренной и высокой интенсивностью реакции и значения ОППР (см. рис. 2). Энзимпозитивные нейроны чаще встречаются на периферии каудальной части ядер, где обычно имеют небольшие размеры (9–14 мкм), овальную или веретеновидную форму и дают интенсивную иммуноцитохимическую реакцию (см. рис. 1, а). В ростральной части этих ядер, наряду с мелкими округлыми или веретеновидными иммунопозитивными клетками, встречаются компактные группы

нейронов треугольной или звездчатой формы диаметром 30–40 мкм с низким и умеренным содержанием продукта реакции (см. рис. 1, б).

Почти вдвое ниже доля ГО-2-позитивных нейронов и величина ОППР в ДЯБН и РМЯ, в которых преобладают клетки с умеренным содержанием продукта реакции (см. рис. 2). Большая часть иммунопозитивных нейронов в этих ядрах имеют округлую или веретеновидную форму (см. рис. 1, в) и небольшие (9–12 мкм) размеры. В РКМЯ выявляются полигональные нейроны, преимущественно в дорсомедиальной части диаметром около 30–40 мкм с низким и умеренным содержанием продукта реакции. Среди них встречаются единичные клетки, в которых осадок образует плотные скопления. В РОМЯ энзимопозитивные нейроны концентрируются в основном в вентральной части ядра, где располагаются мелкие и средние по величине клетки веретеновидной, иногда треугольной формы, большая часть которых отличается интенсивной реакцией (см. рис. 1, г).

В РГЯ и РПГЯ выявляются минимальное количество иммунопозитивных клеток (1,5–3,8%) и наименьшие значения ОППР (см. рис. 2). В большинстве нейронов этих ядер интенсивность реакции очень низкая. В крупных (50–60 мкм) мультиполярных нейронах светло-коричневые гранулы образующегося осадка заполняют большую часть цитоплазмы, включая отростки (см. рис. 1, д). Зато в мелких клетках, которые обычно располагаются на периферии этих ядер, определяется более интенсивное отложение продукта реакции.

В среднем мозгу максимальное количество ГО-2-позитивных нейронов выявляется в ростральной и центральной частях КЯ, где их доля достигает 12–16% (в среднем в ядре — 9,2%). В этих участках преобладают мелкие округлые клетки коричневого и темно-коричневого цвета. В каудальной части ядра чаще выявляются мультиполярные нейроны с низким или умеренным содержанием преципитата. В ПКЯ наиболее плотно иммунопозитивные нейроны располагаются в дорсомедиальном отделе центральной части ядра, где определяются клетки средней величины (20–30 мкм) с низкой и умеренной интенсивностью реакции. Среди них встречаются нейроны веретеновидной формы, в которых осадок откладывается более плотно (см. рис. 1, е). Однако в целом в ПКЯ доля ГО-2-позитивных нейронов и ОППР почти в половину ниже, чем в КЯ (см. рис. 2).

Обсуждение полученных данных. Несмотря на большое значение СО в жизнедеятельности организма, его функциональные свой-

ства и механизмы действия до сих пор вызывают противоречивые оценки [7, 9, 13]. Имеются данные, что в ЦНС СО играет важную роль в обеспечении эффекта долговременной потенциации и ноцицептивной сигнализации [11, 14, 19]. Однако биохимические методы, с помощью которых был получен основной объем информации о СО, не позволяют судить о наличии и количестве энзимопозитивных нейронов в соответствующих отделах мозга, локализации и функциональной принадлежности ядер, клетки которых участвуют в синтезе СО, и других характеристиках, необходимых для формирования более полного представления о свойствах этой сигнальной молекулы.

Проведенное исследование показало наличие морфологического субстрата для участия СО в центральной регуляции гемодинамики. ГО-2-позитивные нейроны выявлены нами во многих ядрах сосудодвигательного центра головного мозга, где их количество варьирует от 1,5 до 16 %. В отличие от нейронов, связанных с функциями других газотрансмиттеров [2, 5, 6], концентрация ГО-2-позитивных нейронов в чувствительных ядрах в 3–5 раз больше, чем в двигательных. В ЯСТ, РЛЯ и КЯ, которые относятся к латеральному, сенсорному полю ретикулярной формации [1], находится самая многочисленная популяция ГО-2-позитивных нейронов. В них же обнаружены и наиболее высокие значения ОППР, что свидетельствует о большой значимости СО в обеспечении функций этих ядер.

Есть сведения, что унилатеральная микроинъекция гемина в область ядра солитарного тракта приводит к освобождению СО и сопровождается значительным снижением кровяного давления и частоты сердечных сокращений, но при предварительном введении Zn-протопорфирина IX — ингибитора ГО-2 — такой эффект не наблюдается [12]. Исследование клеточных механизмов регуляции активности ГО-2 показало, что синтез СО увеличивается в ответ на повышение цитозольной концентрации кальция, активацию протеинкиназы С и тирозинкиназ [7]. В ЦНС в этом процессе задействованы метаболитные глутаматные рецепторы I типа [8]. Метаболитные рецепторы, активированные в ЯСТ, способны регулировать проведение нервного сигнала через специфические цГМФ-зависимые механизмы к ГО-2-позитивным нейронам тех ядер, которые, в свою очередь, обеспечивают эфферентные влияния на сердце и кровеносные сосуды. Как показали наши наблюдения, такие нейроны постоянно присутствуют в составе ДЯБН, а также в РГЯ, РПГЯ, ПКЯ и РКМЯ, которые относятся к медиальному моторному полю ретикулярной форма-

ции [1]. Мишенью для воздействий могут быть не только крупные иммунопозитивные нейроны, которые постоянно присутствуют во всех этих ядрах, но и небольшие нейроны, отличающиеся интенсивной ферментативной реакцией. Они, как указано выше, чаще располагаются на периферии ядер или между крупными нейронами. В этом случае СО может выступать в качестве модулятора, усиливающего спонтанную или вызванную секрецию ацетилхолина, норадреналина, серотонина и некоторых других медиаторов и гормонов [13, 18]. Далее сигнальная трансдукция осуществляется посредством нисходящих проводящих путей, приводя к активации преганглионарных симпатических нейронов промежуточно-латерального ядра спинного мозга и изменению кровяного давления. Ранее нами было отмечено снижение доли ГО-2-позитивных нейронов и содержания в них ГО в ядрах бульбарного отдела сердечно-сосудистого центра при артериальной гипертензии, чтошний раз подтверждает участие СО в центральных механизмах регуляции гемодинамики [4].

Исследование выполнено при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (госконтракт 4.740.11.0186).

ЛИТЕРАТУРА

- Амунц В. В. Развитие ретикулярной формации ствола мозга в онтогенезе низшей обезьяны по сравнению с человеком. *Арх. анат.*, 1976, т. 71, вып. 7, с. 25–29.
- Коцюба А. Е. и Черток В. М. Пространственная организация серотонинергических и нитроксидергических нейронов в некоторых ядрах бульбарного отдела сердечно-сосудистого центра человека. *Тихоокеанск. мед. журн.*, 2010, № 4, с. 43–46.
- Старцева М. С. и Черток В. М. Количественная оценка интенсивности гистохимических и иммуногистохимических реакций с применением стандартных компьютерных программ. *Тихоокеанск. мед. журн.*, 2012, № 1, с. 118–120.
- Черток В. М. и Коцюба А. Е. Иммуногистохимическое исследование H_2S -позитивных нейронов в некоторых структурах мозга человека при артериальной гипертензии. *Журн. неврол. и психиатр.*, 2012, № 1, с. 54–59.
- Черток В. М. и Коцюба А. Е. H_2S -позитивные нейроны в некоторых ядрах сердечно-сосудистого центра головного мозга крысы. *Морфология*, 2012, т. 141, вып. 1, с. 28–33.
- Черток В. М., Коцюба А. Е. и Бабич Е. В. Нитроксидергические нейроны в некоторых ядрах продолговатого мозга человека и крысы. *Цитология*, 2009, № 7, с. 612–616.
- Boehning D. and Snyder S. H. Novel neural modulators. *Annu. Rev. Neurosci.*, 2003, v. 6, p. 105–131.
- Dawson T. M. and Snyder S. H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J. Neurosci.*, 1994, v. 14, № 9, p. 5147–5159.
- Hermann Z. S. Carbon monoxide: a novel neural messenger or putative neurotransmitter? *Pol. J. Pharmacol.*, 1997, v. 49, № 1, p. 1–4.
- Jones W., Durante W. and Korthuis R. J. Heme oxygenase-1 deficiency leads to alteration of soluble guanylate cyclase redox regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2010, v. 335, № 1, p. 85–91.
- Li X. and David C. J. Chronic morphine exposure and the expression of heme oxygenase type 2. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 2000, v. 75, № 2, p. 179–184.
- Lo W. C., Lu P. J., Ho W. Y. Cystein 184 of endothelial nitric oxide synthase is involved in heme coordination and catalytic activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2006, v. 318, № 1, p. 8–16.
- Maines M. D. The heme oxygenase system, past, present and future. *Antioxid. Redox signal.*, 2004, v. 6, № 5, p. 797–801.
- Medina J. H. and Izquierdo I. Retrograde messengers, long-term potentiation and memory. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1995, v. 21, № 2, p. 185–194.
- Mustafa A. K., Gadalla M. M. and Snyder S. H. Signaling by gasotransmitters. *Sci. Signal.*, 2009, v. 68, № 2, p. 1–8.
- Paxinos G. and Watson Ch. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York. Acad. Press, 1998.
- Verma A., Hirsch D. J. and Glatt C. E. Carbon monoxide, a putative neural messenger. *Science*, 1993, v. 259, p. 381–384.
- Wang R. Signal Transduction and the Gasotransmitters. NO, CO and H₂S in Biology and Medicine. New Tersely Humana Press, 2004.
- Zhuo M., Laitinen J. T., Li X-Ch. and Hawkins R. D. On the respective roles of nitric oxide and carbon monoxide in long-term potentiation in the hippocampus. *Learn. Mem.*, 1999, v. 6, № 1, p. 63–76.

Поступила в редакцию 16.04.2012

THE DISTRIBUTION OF HEME OXYGENASE-2 IN THE BRAINSTEM NUCLEI OF RATS

A. Ye. Kotsiuba and V. M. Chertok

Immunocytochemical method was used to determine the distribution of neurons expressing heme oxygenase-2 (HO-2-positive neurons) in the nuclei of various parts of the brainstem of 16 male Wistar rats. The sizes of neurons and the optical density of the product of histochemical reaction in their cytoplasm were determined in the nuclei studied. HO-2-positive neurons, differing in shape, size and numbers, were identified in the nuclei of the medulla oblongata, pons and midbrain. HO-2-positive cells were found 3–5 times more frequently in the sensory nuclei as compared to the motor ones. At the same time, relatively large number of nuclei was detected, which contained either no or a few HO-2-positive neurons.

Key words: *brainstem nuclei, neurons, carbon monoxide, heme oxygenase-2*

Department of Human Anatomy, Vladivostok State Medical University