

На правах рукописи

СТАРЦЕВА
Марина Сергеевна

**ГИСТОФИЗИОЛОГИЯ ГАЗОТРАНСМИТТЕРНЫХ НЕЙРОНОВ
В ВАЗОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ПРОДОЛГОВАТОГО МОЗГА
У НОРМО- И ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном образовательном учреждении высшего образования «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Черток Виктор Михайлович**

Официальные оппоненты:

Обухов Дмитрий Константинович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», профессор кафедры цитологии и гистологии

Рыжавский Борис Яковлевич, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой биологии и гистологии

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов»

Защита диссертации состоится « 28 » февраля 2017 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Национальный научный центр морской биологии» Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17.

Факс: (423) 2310-900, e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Национальный научный центр морской биологии» Дальневосточного отделения Российской академии наук: <http://www.imb.dvo.ru/misc/dissertations/index.php/soviet-d-005-008-01/29-startseva-marina-sergeevna>

Автореферат разослан « ___ » _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук

Ващенко

Ващенко Марина Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В центральных механизмах управления гемодинамикой немаловажная роль принадлежит вазомоторной области продолговатого мозга, морфологическим воплощением которого является небольшой участок ромбовидного мозга, лежащий позади нижнего четверохолмия. Анализ литературы дает достаточное количество доказательств решающей роли этого участка мозга в регуляции гемодинамики (Ma et al., 2003; Черток, Коцюба, 2013).

Более полувека тому назад в нейронах вазомоторного центра впервые обнаружено присутствие норадреналина (Dahlstrom, Fuxe, 1964). Позднее здесь были выявлены нервные клетки, содержащие и другие классические медиаторы нервного импульса (ацетилхолин, адреналин, допамин, серотонин), благодаря которым, по мнению большинства исследователей, и осуществляется центральная регуляция гемодинамики (Jones et al., 2010; Threlfell, Cragg, 2012; Palkovits et al., 2013). Однако после открытия нового класса биологически активных веществ – газообразных посредников (NO, CO, H₂S), принимающих участие, как в межклеточной, так и внутриклеточной регуляции разнообразных физиологических процессов, появились предположения об их возможном значении в центральных механизмах регуляции гемодинамики (Huang et al., 2003; Черток и др., 2010, 2016; Pushchina et al., 2015). В отличие от классических мессенджеров, они являются простыми молекулами, обладающими липофильными свойствами. Эти сигнальные молекулы не накапливаются в синаптических пузырьках, не освобождаются экзоцитозом, могут выделяться из любого участка клетки (Wang, 2004; Kim et al., 2011). Они химически модифицируют внутриклеточные протеины, изменяя клеточный метаболизм более быстрым, чем классические медиаторы способом, что позволяет им эффективно участвовать в передаче нервного импульса.

Учитывая, что газообразные посредники выполняют особенно важные функции в межклеточных коммуникациях, они могли бы обеспечивать работу любого нервного центра. Однако имеющиеся гипотезы об участии газотрансмиттеров в центральных механизмах регуляции гемодинамики базируются в основном на результатах физиологических исследований и лишены материального подтверждения. Морфологические данные о наличии и распределении этих веществ в вазомоторной области продолговатого мозга немногочисленны и противоречивы. Особенно мало таких сведений в отношении CO и H₂S.

Экспериментальные материалы, полученные в последние годы, свидетельствуют, что газообразные посредники принимают активное участие в

пластических перестройках нейронов в норме и при различных патологических процессах (Skovgaard et al., 2011; Wang, 2011). Тем не менее, в отношении вазомоторного центра эти вопросы практически не изучены.

Степень разработанности. Топохимию нейронов продолговатого мозга несколько лет назад стали изучать особенно интенсивно. Не так давно появились работы по исследованию нейронов сердечно-сосудистого центра, экспрессирующих нейрональную NO-синтазу (nNOS), гемоксигеназу-2 (HO-2) и цистатионин β -синтазу (CBS) (Ma et al., 2003; Mustafa et al., 2009; Kotsyuba et al., 2014). Однако при описании вазомоторной области продолговатого мозга объектом исследования обычно служат внутриядерные нейроны. Вместе с тем, между ядрами находятся клетки, которые, как показали физиологические исследования (McDavid et al., 2008; Elliot et al., 2013), обладают особыми функциональными свойствами, отличающими их от внутриядерных нейронов. Нельзя исключить, что межъядерные интернейроны структурно и нейрохимически также отличаются от внутриядерных клеток. Однако в известной нам литературе мы не встретили сравнительных материалов по локализации и количественной оценке газотрансмиттеров в указанных двух популяциях клеток. Отсутствуют морфологические данные, свидетельствующие об участии межъядерных интернейронов в регуляции мозговой гемодинамики, несмотря на постоянное присутствие этих клеток в вазомоторной области мозга.

Цель исследования. Изучить закономерности распределения газотрансмиттерных нейронов в вазомоторной области продолговатого мозга у крыс в обычных условиях функционирования организма и при развитии у них экспериментальной гипертензии.

Задачи исследования:

1) С помощью гистохимических и иммуногистохимических методов изучить распределение nNOS-, HO-2- и CBS-иммунопозитивных нейронов в вазомоторных ядрах продолговатого мозга.

2) Исследовать качественные и количественные характеристики межъядерной популяции газотрансмиттерных нейронов.

3) Изучить динамику преобразований внутриядерных и межъядерных популяций газотрансмиттерных нейронов в процессе развития реноваскулярной гипертензии (РВГ).

4) Изучить пространственную организацию NO-, CO- и H₂S-продуцирующих нейронов в вазомоторной области продолговатого мозга в норме и при развитии артериальной гипертензии.

5) Провести математический анализ изменений количественных параметров внутриядерных и межъядерных популяций газотрансмиттерных нейронов в различные временные отрезки развития реноваскулярной гипертензии.

Научная новизна. В работе новыми являются материалы по качественной и количественной характеристике nNOS, HO-2 и CBS-иммунопозитивных межъядерных нейронов продолговатого мозга крысы. Впервые установлены качественные и количественные характеристики межъядерных интернейронов в норме и их преобразования в процессе развития РВГ. Проведен сравнительный анализ внутриядерных и межъядерных нейронов продолговатого мозга, их топомии в норме и при гипертензии. Впервые выявлены характерные особенности реакции крупных и мелких межъядерных интернейронов на повышение артериального давления.

С использованием методов математического анализа представлены дополнительные доказательства различий реакции межъядерных и внутриядерных газотрансмиттерных нейронов в процессе развития РВГ.

В работе использован авторский метод изучения пространственной организации нейронов различной медиаторной принадлежности – метод компьютерного совмещения изображений (Черток и др., 2014), метод определения интенсивности гисто- и иммуногистохимической реакции в клетках (Старцева, Черток, 2012; Черток и др., 2012), а также метод системного анализа для оценки значимости изменений нитроксидергических нейронов при экспериментальной гипертензии (Старцева и др., 2011).

Теоретическое и практическое значение работы. Проведенные исследования о закономерностях распределения nNOS-, HO-2- и CBS-иммунопозитивных нейронов в вазомоторной области продолговатого мозга являются частью фундаментальных исследований в области нейробиологии. Полученные в работе данные могут служить теоретической базой для понимания роли газотрансмиттерных систем в механизмах регуляции мозговой гемодинамики в обычных условиях жизнедеятельности организма и некоторых видах сосудистой патологии. Результаты исследования могут быть использованы при проведении занятий на кафедрах гистологии, нормальной и патологической анатомии, нормальной и патологической физиологии, неврологии.

Методология и методы диссертационного исследования. В данной работе использовали гистохимический метод на NADPH-диафорузу для выявления NO нейронов, а также иммуногистохимические методы для выявления нейрональной NO-синтазы (nNOS), гемоксигеназы-2 (HO-2) и цистатионин β-синтазы (CBS), которые определяли непрямим иммунопероксидазным методом.

Для изучения распределения газотрансмиттеров в продолговатом мозге крысы при патологии, воспроизводили модель реноваскулярной гипертензии, для чего проводили хирургическую операцию по перевязке левой почечной ножки. Операция приводила к уменьшению почечной массы и увеличению АД.

Положения, выносимые на защиту:

1) В вазомоторной области продолговатого мозга находятся внутриядерные и межъядерные популяции газотрансмиттерных нейронов, отличающиеся качественными и количественными характеристиками.

2) Реакция газотрансмиттерных нейронов, расположенных в вазомоторной области продолговатого мозга, на повышение артериального давления зависит от их локализации, медиаторной принадлежности, размеров.

3) В процессе развития реноваскулярной гипертензии происходят изменения пространственных отношений между nNOS-, NO-2- и CBS-иммунопозитивных нейронами, которые можно описать уравнениями множественной линейной регрессии.

Степень достоверности результатов. Достоверность данных, полученных в работе, обеспечена современными методами исследования и использованием современных методов статистической обработки, которые соответствуют поставленным целям и задачам. Интерпретация результатов и выводов подкреплена данными, приведенными в таблицах и рисунках. Математический аппарат, используемый в работе, позволил подтвердить выводы, полученные морфологическими методами.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на XII Тихоокеанской научно-практической конференции студентов и молодых ученых (Владивосток, 2011, 2012), IV Всероссийской научной конференции с международным участием «Микроциркуляция в клинической практике» (Москва, 2012), XIX Международной научно-практической конференции «Интеллектуальный капитал и способы его применения (Новосибирск, 2016), Международной научной конференции (Чехия, Карловы-Вары, 2016).

Публикации результатов работы. По материалам диссертации опубликовано 9 работ в рецензируемых журналах.

Объем и структура диссертации. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания, материалов и методов, 6 глав собственных исследований, результатов и выводов. Объем диссертации составляет 227 страниц. Работа иллюстрирована 125 рисунками, 49 таблицами. Указатель литературы включает 196 источников, из них 91 иностранный.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на 128 крысах-самцах линии Wistar массой 230-250 г, которых разделили на три группы: интактные (15 крыс), ложно оперированные (38 крыс) и с реноваскулярной гипертензией (75 крыс). Реноваскулярную

гипертензию (РВГ) вызывали описанным ранее методом (Харин, Крандышева, 2004, Коцюба и др., 2010).

Исследования проводили согласно Правилам проведения работ и использования экспериментальных животных (Приложение 3 к приказу МЗ СССР №755 от 12.08.1977 г.) и Стандарта отрасли «Правила проведения качественных клинических испытаний в Российской Федерации» (утверждены МЗ РФ 29.12.1998 г. и введены в действие с 01.01.1999 г.). Животных содержали в виварии в соответствии с «Санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник» (№1045-73 от 06.04.1973 г.). Кормление крыс осуществлялось в соответствии с нормами, утвержденными МЗ СССР от 10.03.1986 г. №163.

В работе использовались гистологические, иммуногистохимические, гистохимические, морфометрические и статистические методы. Объектом для исследования служил продолговатый мозг крысы, который брали целиком непосредственно после наступления смерти животного. Эвтаназию животным производили передозировкой введенного внутривенно 3% раствора тиопентала Na.

Систолическое давление измеряли при помощи системы неинвазивного мониторинга кровяного давления у крыс ML U/4c501 методом хвостовой манжеты (MedLab, China).

В серии из не менее 16 последовательных сагиттальных или фронтальных срезов (толщина среза 30-40 мкм) продолговатого мозга каждого животного, первый срез окрашивали метиленовым синим или на NADPH-d, второй – для исследования nNOS (NO-нейроны), третий – CBS (H₂S-нейроны), четвертый – NO-2 (CO-нейроны). Местоположение и границы уточняли на препаратах, окрашенных метиленовым синим. Исследовали внутриядерные (ВЯ) нейроны в ядре солитарного тракта (ЯСТ), ретикулярных латеральном (РЛЯ), мелкоклеточном (РМЯ) и гигантоклеточном (РГЯ) ядрах, и межъядерные клетки (МЯ), находящиеся между ретикулярным гигантоклеточным и ретикулярным мелкоклеточным ядрами (группа 1), ретикулярным мелкоклеточным ядром и ядром солитарного тракта (группа 2), в окружении ретикулярного латерального ядра (группа 3). При определении локализации исследуемых ядер использовали цитоархитектоническую карту, приведенную в «The Rat Brain» (Paxinos, 1982).

Для выявления нитроксидазгических нейронов применяли два метода: гистохимический Норе а. Vincent (Норе, Vincent S, 1989) для выявления NADPH-диафоразы (NADPH-d), и иммуногистохимический – для определения локализации нейрональной NO-синтазы. В первом случае материал инкубировали в среде, содержащей 0,5 мМ β-NADPH, 0,5 мМ нитросинего тетразолиевого и 0,3 % Тритона Ч-100 в 0,15 М Трис-HCL-буфере (pH 8,0) в течение 1 ч в термостате

при 37°C. После инкубации препараты промывали в дистиллированной воде, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заключали в канадский бальзам. Контрольные образцы помещали в среду с добавлением ингибитора NO-синтазы – N-нитро-L-аргинина (10 мМ).

Специфичность гистохимической реакции проверялась инкубацией нескольких срезов в растворах, не содержащих нитросиний тетразолий или NADPH, а также в растворе, содержащем NADP вместо NADPH.

Иммуногистохимическое выявление нейрональной NO-синтазы (nNOS), гемоксигеназы-2 (HO-2) и цистатионин β-синтазы (CBS) в структурах продолговатого мозга крысы проводили в несколько этапов. После извлечения мозга из полости черепа, и фиксации небольших (около 0,5 см³) кусочков исследуемого материала, их промывали в течение 24 ч в 0,1 М фосфатно-солевом буфере (рН 7,4). Фиксированный материал пропитывали в холодном 15 % растворе сахарозы на 0,1 М фосфатном буфере и готовили криостатные срезы толщиной 30–40 мкм. После подавления эндогенной активности пероксидазы в 1 % растворе H₂O₂ и подавления неспецифического связывания антител в 2–3 % растворе нормальной сыворотки козы, препараты инкубировали в течение 18 ч при комнатной температуре с поликлональными антителами, полученными у кролика, против nNOS, (Cayman, США) в разведении 1:200; Затем срезы отмывали в нескольких сменах забуференного (0,05 М трис-буфер, рН 7,6) физиологического раствора, проводили инкубацию в течение 1 ч при комнатной температуре в биотинилированной козьей антисыворотке против IgG кролика (Vectastain, США) для nNOS, в разведении 1:200, (Vector Labs, США). В качестве растворителя для первых и вторых антител использовали забуференный физиологический раствор, содержащий 0,03–0,1% тритон X-100 и 1–3% нормальную сыворотку козы. После отмывания, срезы инкубировали в течение 1 ч с комплексом авидин-биотинилированной пероксидазы хрена (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Labs, США) в разведении 1:50 – 1:100 в забуференном физиологическом растворе, содержащем 0,1 % тритон. Активность пероксидазы для nNOS выявляли инкубированием срезов в диаминобензидине (VIP Substrate Kit, Vector Labs, США) под контролем микроскопа.

Для иммуногистохимического выявления CBS и HO-2 криостатные срезы последовательно инкубировали с 1 % нормальной сывороткой лошади 1 ч при комнатной температуре; мышинными моноклональными антителами против CBS (Abscam, Великобритания) в разведении 1:500, против HO-2 в разведении 1:1000 при температуре 4°C в течение 18 ч; биотинилированными антителами лошади против IgG мыши (Vector Labs, США) в разведении 1:100 2 ч при комнатной температуре и с авидин-пероксидазным комплексом (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Labs, США) 1 ч при комнатной температуре. Для выявления продуктов

реакции для CBS, срезы инкубировали в субстрате красного цвета для обнаружения пероксидазы (VIP Substrate Kit, Vector Labs, США). Для определения HO-2, иммунопреципитат визуализировали как с помощью диаминбензидина (DAB Substrate Kit for Peroxidase, Vector Labs, США), так и в субстрате красного цвета (VIP Substrate Kit, Vector Labs, США). Затем срезы промывали, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в полистерол.

Для оценки специфичности иммуногистохимической реакции использовали метод негативного контроля. Для этого срезы, вместо первичных антител, инкубировали с 1% неимунной сывороткой. Во всех контрольных экспериментах иммунопозитивная реакция отсутствовала.

Пространственные отношения между исследуемыми группами клеток изучали методом компьютерного совмещения изображений [Черток В.М. с соавт., 2014]. Смежные срезы исследовались отдельно в двух микроскопах, окуляры которых оснащены одинаковыми координатными сетками с равновеликими квадратами. На предметный столик одного из микроскопов помещали препарат, окрашенный метиленовым синим. Срез, обработанный для выявления нейронов другим методом, размещался под объективом второго микроскопа. В программе Adobe Photoshop два оцифрованных изображения совмещались путем наложения друг на друга. Первый слой в совмещенном изображении занимал снимок препарата, окрашенный метиленовым синим, последующие – другими использованными в работе методами. Препараты просматривали под световым микроскопом Carl Zeiss Jena (Германия) со встроенным осветителем. Регулировку яркости и контраста цифровых фотоизображений осуществляли при помощи компьютерных программ Adobe Photoshop. Стандартизация параметров измерений освещенности при проведении исследований осуществлялась с помощью люксметра ТКА- Люкс/Эталон (Россия).

В проекции среза каждого ядра, а также в области между ядрами, определяли общее количество нейронов, выявленных метиленовым синим, NADPH-d-позитивных нейронов, а также nNOS-, HO-2 и CBS-позитивных нейронов. Для каждого исследования использовали не менее 16 срезов для каждого ядра. Кроме того, вычисляли процентное содержание энзимопозитивных нейронов от общего количества нервных клеток, выявленных метиленовым синим, отдельно для каждого фермента.

Для каждого нейрона вычисляли средние значения интенсивности реакции (средний показатель оптической плотности осадка – СПОП). Вычисления проводили в программах Adobe Photoshop и Mathcad. Для вычисления оптической плотности осадка, образующегося в результате гисто- и иммунохимической

реакции, использовали «пиксельный метод» обработки оцифрованных цветных изображений (Старцева, Черток, 2012).

Статистический анализ данных, полученных в работе, проводили с использованием программы STATISTICA 10. Проверка распределения на нормальность проводилась с помощью критерия Колмогорова-Смирнова на уровне значимости $p=0,05$. Выяснилось, что расчетное значение критерия ниже теоретического, что говорит о том, что модель нормального распределения может быть принята. Первичная статистическая обработка результатов эксперимента заключалась в определении среднего значения измеренной величины и доверительного интервала. Для определения доверительного интервала использовался t-критерий Стьюдента и величина доверительной вероятности $P=95\%$. Данные количественного анализа представлялись в виде: $x = \bar{x} \pm ts$, где \bar{x} – среднее значение изучаемой величины, t – коэффициент Стьюдента, s – среднеквадратичное отклонение.

Для исследования взаимосвязи между изучаемыми количественными показателями, а также для построения математической модели связи между независимой переменной и влияющими на нее факторами был использован метод множественной линейной регрессии. Применялось следующее регрессионное уравнение:

$$Y = \sum_{i=1}^n b_i x_i + b_0 + e,$$

где b_i – регрессионные коэффициенты, b_0 – свободный член, e – член содержащий ошибку. Оценка значимости коэффициентов регрессии проводилась с помощью t-распределения при заданном уровне значимости $p=0,05$.

Для вычисления силы связи между исследуемыми факторами вычислялся множественный коэффициент корреляции и коэффициент детерминации.

Результаты исследования и их обсуждение

Как показали наши наблюдения, во всех исследованных ядрах продолговатого мозга, а также между ними постоянно определяются NO-, СО- и H₂S-иммунопозитивные нейроны (рис. 1, а-в). Нейроны имеют различную форму, размеры, интенсивность реакции и достаточно неравномерно распределены в ядрах и межъядерных группах. Однако во всех случаях, как отмечалось, количество МЯ газотрансмиссивных нейронов намного меньше, чем внутриядерных – около 2-6% от концентрации последних, а интенсивность реакции в них, как правило, выше, чем в большинстве внутриядерных нейронов (Черток и др., 2015; Коцюба и др., 2015).

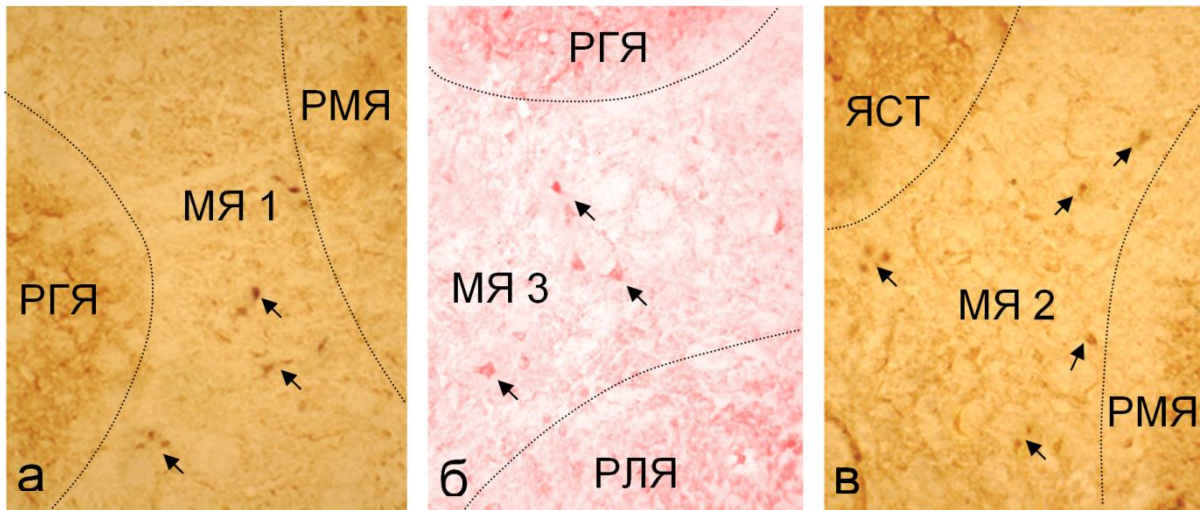
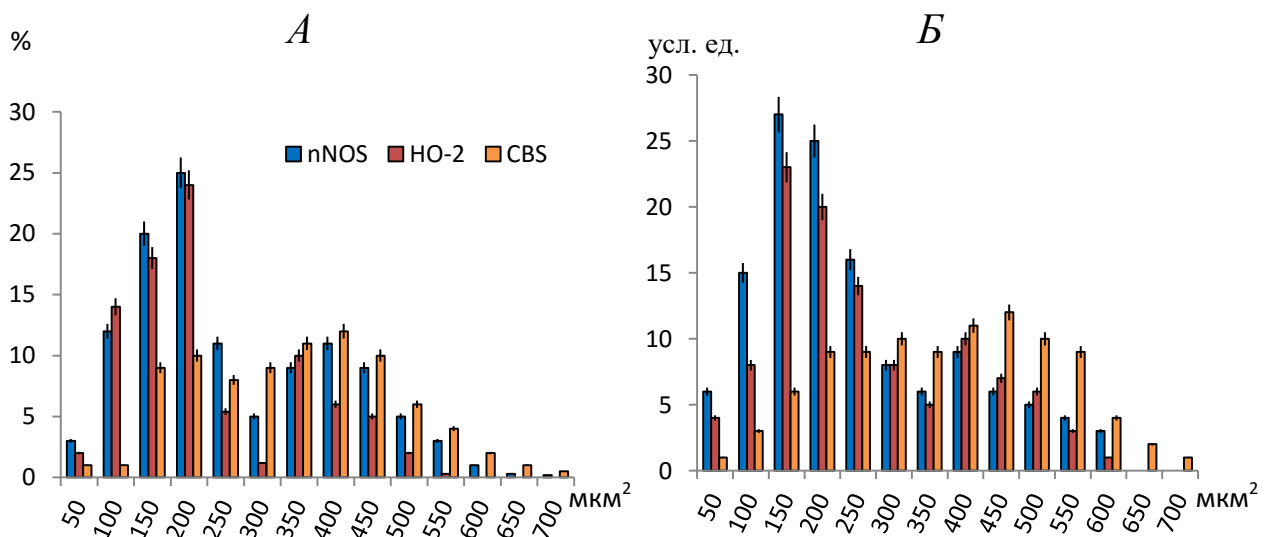


Рис. 1. Внутриядерные и межъядерные (↗) интернейроны с экспрессией nNOS (а), NO-2 (б) или CBS (в). МЯ1-3 – группы межъядерных интернейронов; РГЯ – ретикулярное гигантоклеточное ядро; РЛЯ – ретикулярное латеральное ядро; ЯСТ – ядро солитарного тракта; РМЯ – ретикулярное мелкоклеточное ядро. Иммуногистохимия.

У нормотензивных животных установлены существенные отличия топохимии внутриядерных и межъядерных нейронов. Межъядерные нейроны объемных скоплений не образуют: обычно они располагаются поодиночке или, реже, образуют группы из 2-3 клеток (рис. 1, а-в).

Большинство МЯ нейронов расположено между гигантоклеточным и мелкоклеточным ретикулярными ядрами (1 группа), между ретикулярным мелкоклеточным ядром и ядром одиночного пути (2 группа), в окружении ретикулярного латерального ядра (3 группа). МЯ нейроны 1-3 групп отличаются между собой размерами, количеством иммунопозитивных клеток, средним показателем оптической плотности нейронов с экспрессией nNOS, NO-2 и CBS (рис. 2, А-Д).



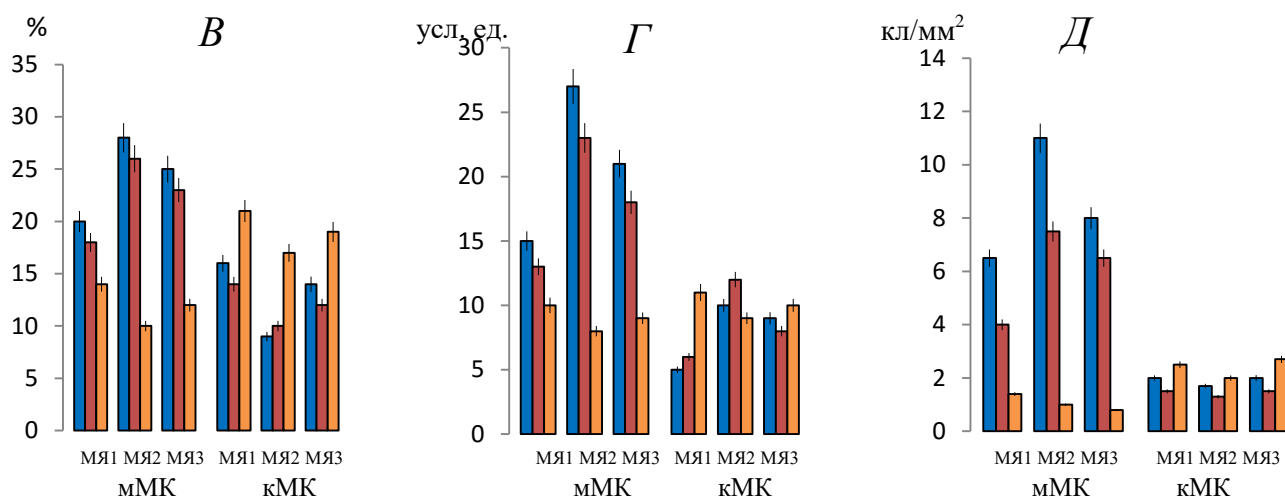


Рис. 2. Значения доли (А) и СПОП (Б) среди клеток различной медиаторной принадлежности в МЯ1-МЯ3; локальные отличия в МЯ1-МЯ3 доли мелких (мМК) и крупных межъядерных клеток (кМК) (В), СПОП (Г) и концентрация интернейронов (Д) с экспрессией pNOS, NO-2 и CBS.

Кроме того, в отличие от внутриядерных нейронов, большинство которых представляют собой средние по площади клетки, среди МЯ отчетливо выделяются две размерные группы: мелкие, площадью 50-150 мкм², и крупные нейроны, площадью 350-500 мкм², которые отличаются интенсивностью реакции (рис. 2, А, Б). Между МЯ1-МЯ3 отчетливо выражены локальные особенности исследованных показателей (рис. 2, В-Д). Среди NO- и СО-нейронов отчетливо прослеживаются отличия интенсивности реакции в межъядерных группах: в МЯ2 и МЯ3 она существенно выше, чем в МЯ1. Выраженных отличий значений СПОП между клеточными МЯ группами среди H₂S-нейронов не наблюдается.

Популяции межъядерных интернейронов сильно отличаются долей мелких и крупных клеток. Это касается всех исследуемых газотрансмиттеров. Самая большая доля мелких NO- и СО-клеток определяется в МЯ2. Наибольшее значение доли крупных H₂S-нейронов приходится на в 1-ю межъядерную группу (22,3 %). Не так давно было показано, что популяция межъядерных нейронов и функционально неоднородна (McDavid et al., 2008; Elliot et al., 2013). Исследованиями, выполненными с применением микроэлектродной техники, установлено, что реакция мелких и крупных интернейронов на раздражение афферентных систем имеет определенные особенности. Мелкие клетки, прежде всего, обеспечивают межнейрональное взаимодействие афферентных и эфферентных сигналов в локальных участках мозга. Крупные клетки, находясь в состоянии постоянного тонического возбуждения, посылают импульсы в вышележащие отделы мозга и на периферию.

Проведенное нами исследование показывает, что нейроны исследованных ядер также отличаются между собой долей иммунопозитивных клеток, содержанием среди них мелких, средних и крупных нейронов, соотношением нейронов с низкой, умеренной и высокой интенсивностью реакции, значениями СПОП и некоторыми другими признаками. Нами выявлена зависимость между функциональной принадлежностью ядер и СПОП. Оптическая плотность для СО-нейронов имеет наименьшее значение в двигательном ядре (РГЯ). В чувствительных (ЯСТ, РЛЯ) и ассоциативном (РМЯ) ядрах эта величина значительно выше. Поскольку НО-2 локализуется в основном в мелких и средних нейронах, то при увеличении доли мелких клеток и сокращении крупных возрастают значения СПОП. Так, в РМЯ доля мелких клеток составляет 27%, в РЛЯ – 30%, в ЯСТ – 35%, а СПОП соответственно: 41, 59 и 65 усл. ед. В двигательном ядре РГЯ СПОП для CBS-нейронов значительно выше, чем в чувствительных ядрах (66%, против 12-22%). В чувствительных ядрах величина этого показателя в большей степени зависит от доли мелких клеток, которые в них встречаются значительно чаще.

В ЯСТ доля крупных CBS-позитивных клеток составляет 53%, в РЛЯ – 57%, в РМЯ – 65%, а СПОП соответственно: 12, 17 и 22 усл. ед. НО-нейроны одинаково часто встречаются в РМЯ и РГЯ, но почти вдвое реже в ЯСТ. Доля СО-нейронов в ЯСТ оказалась в 2,5 раза выше, чем в РМЯ, а в последнем величина этого показателя почти в 4 раза больше, чем в РГЯ. Доля Н₂S-нейронов в РГЯ вдвое превосходит соответствующие значения в РМЯ и в 4,5 раза – в ЯСТ.

Ядра также отличаются между собой и концентрацией газотрансмиттерных нейронов, значения которой определяются не только количеством, но и размерами клеток. В РГЯ и ЯСТ, например, выявлены наибольшие значения этого показателя среди Н₂S-нейронов, так как в РГЯ чаще всего встречаются крупные клетки, а в ЯСТ они имеют меньшие размеры, но встречаются в большем количестве. Поэтому цифры относительной плотности в нем выше. Наименьшая концентрация Н₂S-нейронов наблюдается в РЛЯ, где клетки выявляются очень редко. Площадь большинства НО-нейронов колеблется от 200 до 380 мкм². Экспрессия НО-2 в ядрах наблюдается в мелких нейронах площадью 220–360 мкм², а CBS – от 350 до 500 мкм². В ЯСТ и РМЯ в основном встречаются мелкие клетки в РГЯ – крупные.

Ранее отмечалось, что подавляющее число медиаторноспецифических нейронов сконцентрировано в центральной части ядер ствола мозга (Куо, Yang, 2000; Черток, Коцюба, 2015). На схеме представлено распределение газотрансмиттерных нейронов в центральной части ЯСТ, РМЯ и РГЯ, полученное методом компьютерного совмещения изображений (рис. 3).

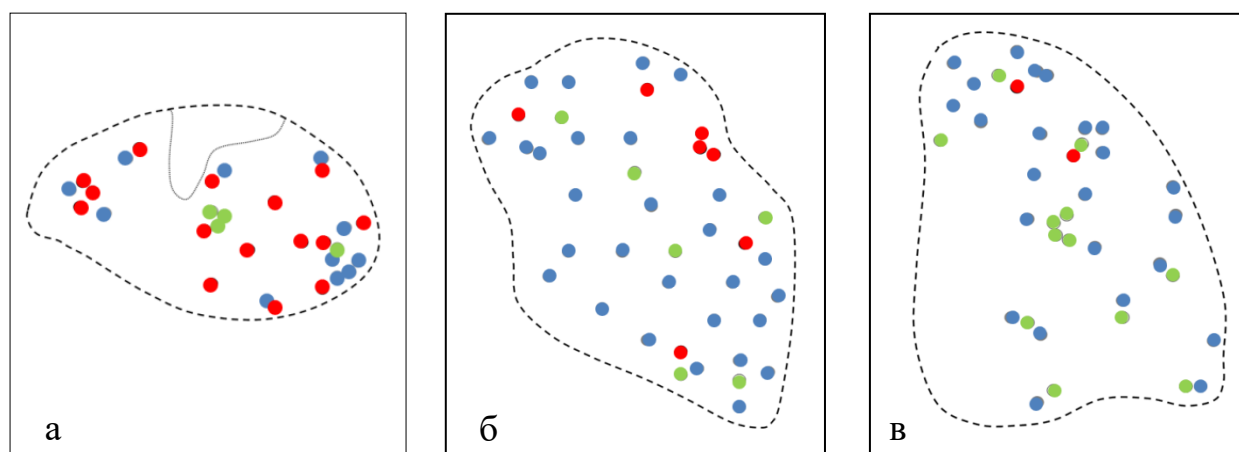


Рис. 3. Пространственная организация газотрансмиттерных нейронов в центральной части ЯСТ (а), РМЯ (б) и РГЯ (в). ● – nNOS-, ● – NO-2-, ● – CBS-иммунопозитивные нейроны.

Однако наши наблюдения показывают, что пространственная организация этих нейронов в каждом ядре имеет свои особенности. Например, в краниальной части ЯСТ определяется ограниченное число NO- и CO-нейронов, и встречаются они в основном у рострального полюса, тогда как H₂S-нейронов в этой части ядра выявляется относительно много и распределены они довольно равномерно. В проекции центральной части ЯСТ нитроксидаергические нейроны нередко формируют группы из 4-6 клеток в вентролатеральной области, в РМЯ нейроны располагаются относительно равномерно, а в РГЯ – наиболее объемные скопления газотрансмиттерных клеток выявляются в его дорсомедиальной области. Большинство H₂S- и CO-нейронов находятся в тех же участках ядра, что и NO-нейроны. H₂S-нейроны в ЯСТ и РГЯ формируют скопления и в центральной части ядра, а в РМЯ относительно плотные группы NO-2-иммунопозитивных нейронов находятся в латеральной области, т.е. там, где клетки с экспрессией nNOS встречаются редко. В каудальной части ЯСТ NO-нейроны образуют компактное скопление только в дорсомедиальной области, где редко встречаются клетки, экспрессирующие два других газотрансмиттера. В РГЯ наблюдается другая структура пространственных отношений нейронов: в краниальной и каудальной частях преобладают H₂S-нейроны, которые в основном концентрируются в вентромедиальной области ядра, где NO- и CO-нейроны встречаются очень редко.

Следовательно, структурные предпосылки для взаимодействия газотрансмиттерных нейронов прослеживаются не только в центральной части, но и в краниальной или каудальной областях ядер. При этом большая часть энзимопозитивных клеток в ядрах располагаются в непосредственной близости друг к другу, образуя небольшие скопления нейронов различной медиаторной принадлежности. Множественность и разнообразие эффектов классических нейромедиаторов во многом обеспечивают газовые посредники – NO, CO и H₂S.

Как межъядерные, так и внутриядерные NO-, CO- и H₂S-нейроны могут взаимодействовать не только между собой, но и с клетками, продуцирующими классические медиаторы нервного импульса, создавая новые пространственные отношения в нейрoхимических кластерах (Bohlen, 2006; Pushchina et al., 2015; Nagpure, Bian, 2016). Воздействуя на нейроны, включающие ацетилхолин, норадреналин или серотонин, они создают условия для объединения отдельных нейронов в функциональные нервные центры, расширяя возможности мозга по управлению сложными процессами в организме.

Несмотря на то, что рассматриваемые нами ядра входят в единую интегративную систему центральной регуляции гемодинамики, в каждом из них установлена собственная динамика преобразований количественных параметров при РВГ, выраженность и направленность которых тесно связана с типом нейронов, исследуемым показателем и продолжительностью гипертензии. Однако до 4-й недели РВГ достоверных изменений количественных параметров среди NO-, CO- и H₂S-нейронов в исследуемых ядрах не происходит, хотя уже на 2-й неделе регистрируется значительное повышение АД. По-видимому, в этот период главная роль в регуляции кровообращения принадлежит местным рефлекторным и сосудистым механизмам (Бокерия, Лищук, 2008; Yang et al., 2008). Между 4-8 неделями появляются значимые изменения исследуемых параметров среди газотрансмиссивных нейронов в ядрах. На повышение АД в первую очередь реагируют NO-нейроны, позднее выявляется реакция CO- и H₂S-нейронов. Причем, у H₂S-нейронов соответствующие изменения показателей выражены в меньшей степени, чем среди nNOS-позитивных клеток. В результате этих процессов при развитии РВГ происходят изменения пространственных отношений между NO-, CO- и H₂S-нейронами в ядре, что приводит к перераспределению нейронов различной медиаторной принадлежности от «очаговой» их локализации к относительно равномерному расположению, что свойственно мозгу более примитивных организмов.

В процессе развития реноваскулярной гипертензии у крыс наблюдается изменение количественных показателей и среди внутриядерных нейронов (рис. 4). Несмотря на то, что в МЯ1-МЯ3 установлены локальные особенности динамики преобразований исследованных показателей, во всех случаях они уступают выявленным изменениям среди внутриядерных нейронов. Например, среди межъядерных нейронов, происходит стабилизация количественных параметров между 10-14 неделями РВГ, в то время как среди внутриядерных – на 4-8 недель позднее. На рисунке 5 показаны преобразования СПОП среди соответствующих по размеру нитроксидергических нейронов ЯСТ и МЯ3 в процессе развития РВГ. Как видно, при повышении АД значения доли и СПОП в NO-нейронах ЯСТ уменьшается соответственно в 2,8 и 3,2 раза, а в МЯ нейронах – в 1,6 и 2,4 раза.

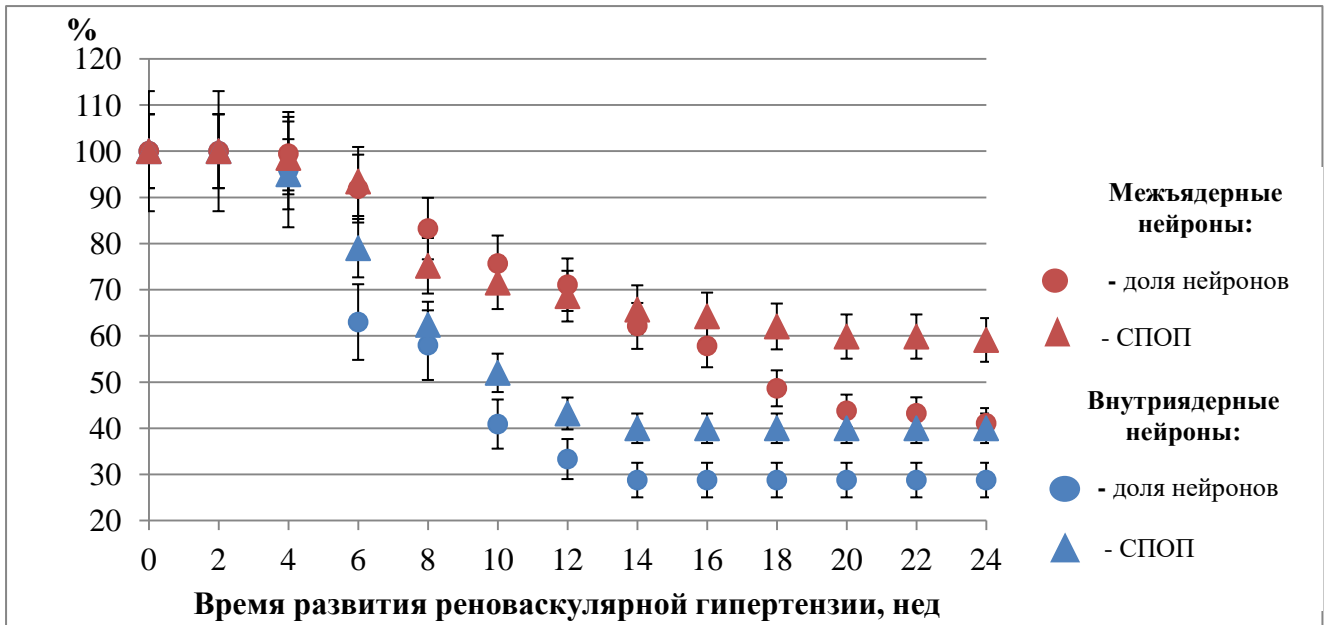


Рис. 4. Сравнительная характеристика преобразований значений доли и СПОП в соответствующих по размеру nNOS-позитивных нейронах ЯСТ и МЯЗ в процессе развития РВГ. За 100% принята величина соответствующих показателей у контрольных животных.

По нашим данным, в реакции мелких и крупных межъядерных NO-, CO- и H₂S-нейронов на изменение АД также наблюдаются существенные отличия. Среди мелких МЯ клеток значительных изменений доли, концентрации и СПОП при РВГ не установлено. В группе крупных МЯ нейронов, начиная с 8-й недели РВГ, наблюдается все более выраженное снижение доли клеток и СПОП (рис. 5).

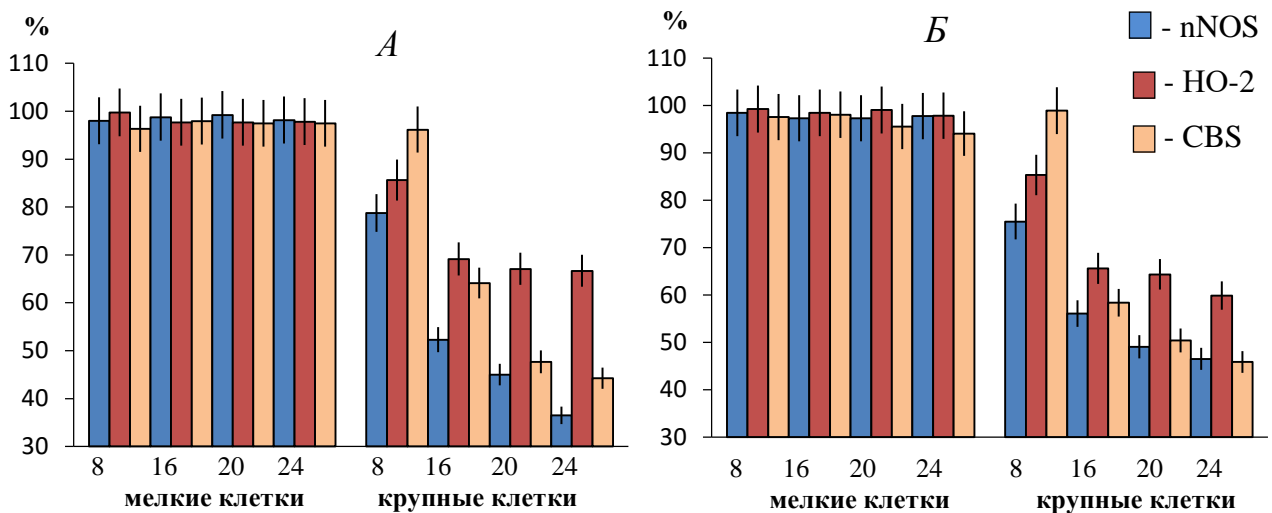


Рис. 5. Изменения значений доли (А) и СПОП (Б) среди мелких и крупных nNOS-, NO-2- и CBS-позитивных нейронов в МЯЗ у крыс при развитии РВГ. За 100% принята величина соответствующих показателей у контрольных животных.

Приведенные выше данные позволяют предположить, что в центральные механизмы управления гемодинамикой могут быть вовлечены обе популяции нейронов: внутриядерные и межъядерные. Среди последних следует выделить

крупные и мелкие нейроны, которые отличаются между собой не только рядом топомимических характеристик, но и функционально – различной устойчивостью к изменению АД.

ВЫВОДЫ

1) nNOS-, NO-2- и CBS-иммунопозитивные нейроны, выявленные в ядрах продолговатого мозга, отличаются формой, площадью профильного поля, значениями интенсивности реакции, концентрацией и локализацией в ядре. nNOS и NO-2 чаще маркирует небольшие нейроны округлой, веретеновидной или треугольной формы с высокой и умеренной плотностью отложения продукта реакции в ЯСТ и РЛЯ. CBS чаще выявляется в крупных интенсивно окрашенных полигональных клетках РГЯ.

2) Между гигантоклеточным и мелкоклеточным ретикулярными ядрами, ретикулярным мелкоклеточным ядром и ядром одиночного пути, а также в окружении ретикулярного латерального ядра постоянно находятся одиночные и небольшие группы nNOS-, NO-2- и CBS-иммунопозитивных нейронов. Среди них наиболее часто встречаются клетки площадью 150-200 мкм² (62-73 %) и 350-500 мкм² (24-32 %). В мелких клетках интенсивность иммуногистохимической реакции при выявлении nNOS и NO-2 в 1,5-4 раза выше, чем в крупных нейронах.

3) Дендриты межъядерных нейронов площадью до 200 мкм² контактируют с ветвями или телами соименных клеток, а также нейронами вазомоторных ядер, участвуя в образовании локальных нейронных цепей. Дендриты более крупных клеток, как правило, организуются в пучки, которые отдают несколько более тонких горизонтальных, восходящих или нисходящих отростков, в выше- и нижележащие отделы мозга.

4) В процессе развития реноваскулярной гипертензии во всех исследованных ядрах продолговатого мозга установлено уменьшение доли иммунопозитивных нейронов, значений их относительной плотности, интенсивности реакции. Наиболее ранние изменения выявлены среди nNOS-позитивных нейронов и в ядре одиночного пути.

5) Динамика изменений внутриядерных и межъядерных нейронов при развитии реноваскулярной гипертензии существенно отличается: внутриядерные нейроны обнаруживают более высокую чувствительность к повышению артериального давления, по сравнению с межъядерными нейронами, среди которых наиболее выраженные изменения количественных параметров установлены среди крупных клеток.

6) Большинство внутриядерных нейронов, экспрессирующих nNOS, находятся в тех же участках ядер, что и NO-2- и CBS-иммунопозитивные нейроны. При развитии артериальной гипертензии изменения количественных

показателей среди CO- и H₂S-продуцирующих нейронов в ядрах наступают позднее и выражены не так значительно, как среди нитроксидаергических нейронов. В результате этих процессов происходят преобразования пространственного положения различных типов газотрансмиттерных нейронов в ядрах вазомоторной области продолговатого мозга.

7) Зависимость интенсивности иммуногистохимической реакции, доли, концентрации и площади NO-, CO- и H₂S-нейронов от времени развития реноваскулярной гипертензии для внутриядерных нейронов описывается полиномом 3-ей степени вида: $y=b_1t^3+b_2t^2+b_3t+b_0$, между величиной СПОП и другими исследованными характеристиками нейронов описывается уравнениями множественной линейной регрессии вида: $СПОП = B_0 + B_1D + B_2S + B_3C$. Для межъядерных нейронов зависимость от времени прослеживается только для крупных клеток. Показатели мелких газотрансмиттерных нейронов остаются в пределах контрольных значений.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Старцева М.С., Коцюба А.Е., Колдаев В.М. Применение методов системного анализа для оценки значимости изменений нитроксидаергических нейронов в ядрах продолговатого мозга крыс при экспериментальной гипертензии // Тихоокеанский медицинский журнал. 2011. № 3. С. 61–64.

2. Старцева М.С., Черток В.М. Количественная оценка интенсивности гистохимических и иммуногистохимических реакций с применением стандартных компьютерных программ // Тихоокеанский медицинский журнал. 2012. № 1. С. 120–123.

3. Старцева М.С., Шуматова Л.А., Маркина Л.Д., Мотавкин П.А. Сравнительная характеристика NADPH-позитивных нейронов в ядрах продолговатого мозга человека и крысы // Тихоокеанский медицинский журнал. 2012. № 3. С. 74–76.

4. Черток В.М., Старцева М.С., Коцюба А.Е., Применение пиксельного метода в количественной оценке результатов гистохимических исследований // Морфология. 2012. Т. 142, № 5. С. 71–75.

5. Черток В.М., Коцюба А.Е., Старцева М.С. Применение метода компьютерного совмещения изображений для топохимического картирования нейронов мозга // Тихоокеанский медицинский журнал. 2014. № 3. С. 77–79.

6. Старцева М.С., Коцюба А.Е., Черток В.М. Пространственная организация газотрансмиттерных нейронов в мозге // Тихоокеанский медицинский журнал. 2015. № 2. С. 39–43.

7. Черток В.М., Коцюба А.Е., **Старцева М.С.** Топохимия межъядерных и внутриядерных интернейронов вазомоторной области продолговатого мозга у гипертензивных крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т. 160, № 9. С. 374–378.

8. Черток В.М., Коцюба А.Е., Коцюба Е.П., **Старцева М.С.** Два пула интернейронов в бульбарном отделе сердечно-сосудистого центра крыс // Доклады Академии наук. 2015. Т. 463, № 5. С. 619–623.

9. Черток В.М., Коцюба А.Е., **Старцева М.С.** Коцюба Е.П. Иммунолокализация газотрансмиттеров в межъядерных интернейронах продолговатого мозга у крыс // Нейрохимия. 2016. Т. 33, № 2. С. 95–102.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АД – артериальное давление;

ВЯ – внутриядерные нейроны

кМК – крупные межъядерные клетки

мМК – мелкие межъядерные клетки

МЯ – межъядерные нейроны

РВГ – реноваскулярная гипертензия;

РГЯ – ретикулярное гигантоклеточное ядро;

РЛЯ – ретикулярное латеральное ядро;

РМЯ – ретикулярное мелкоклеточное ядро;

СПОП – средний показатель оптической плотности;

ЯСТ – ядро солитарного тракта;

CBS – цистатионин β-синтаза;

СО – углекислый газ (монооксид углерода);

H₂S – сероводород;

НО-2 – гемоксигеназа-2;

NADPH – никотинамидаденин-динуклеотид фосфат;

NADPH-d – никотинамидаденин-динуклеотид фосфат-диафороза;

NO – оксид азота;

nNOS – нейрональная нитрооксидсинтаза.

СТАРЦЕВА
Марина Сергеевна

**ГИСТОФИЗИОЛОГИЯ ГАЗОТРАНСМИТТЕРНЫХ НЕЙРОНОВ
В ВАЗОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ПРОДОЛГОВАТОГО МОЗГА
У НОРМО- И ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук