

УДК 611.818:611.1

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СЕРТОНИНЕРГИЧЕСКИХ И НИТРОКСИДЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ В НЕКОТОРЫХ ЯДРАХ БУЛЬБАРНОГО ОТДЕЛА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОГО ЦЕНТРА ЧЕЛОВЕКА

А.Е. Коцюба, В.М. Черток

Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Ключевые слова: серотонинергические и нитроксидаергические нейроны, бульбарный отдел сердечно-сосудистого центра.

В ядрах продолговатого мозга человека на материале 14 аутопсий выявляли серотонин- и нитроксидаергические нейроны. Установлено, что нейроны, в которых серотонин солокализован с нитроксидазой, наиболее часто встречались в ядрах шва, ретикулярных гигантоклеточном и медиальном ядрах, где их доля превышает 50%. Между ядрами, а также между ядрами и проводящими путями выявлены 2–6% нейронов, которые предположительно выполняют интегративные функции в регуляции гемодинамики. Среди этой популяции клеток особенно часто (до 68%) встречались нейроны, в которых серотонин солокализован с нитроксидазой.

В современных исследованиях серотонин (SN) нередко рассматривается в качестве активного участника центральной регуляции функций сердечно-сосудистой системы [4]. Предполагается, что гемодинамические эффекты данного моноамина во многом зависят от взаимодействия в мозге SN-ергических и NO-ергических нейронов, где оксид азота может выступать не только модулятором, но и модификатором действия SN [2]. Однако мы не встретили работ, в которых был бы представлен анализ пространственного распределения этих нейронов в бульбарном отделе сердечно-сосудистого центра у человека.

Целью настоящей работы явился анализ топохимического и количественного распределения SN- и NO-ергических нейронов у человека в ядрах продолговатого мозга, участвующих в центральной регуляции кровообращения.

Материал и методы. Работа выполнена на материале 14 аутопсий практически здоровых людей мужского пола в возрасте 18–36 лет, погибших в результате дорожно-транспортных происшествий, не связанных с повреждением центральной нервной системы. Для исследования забирали продолговатый мозг, кусочки которого толщиной 4–7 мм фиксировали при 4°C в течение 4 часов в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на 0,1 М натриево-фосфатном буфере (pH 7,4), а затем в течение 24 часов промывали в 0,1 М фосфатно-солевом буфере (pH 7,4). Фиксированный материал пропитывали холодным 30% раствором сахарозы на 0,1 М фосфатном буфере, готовили криостатные срезы толщиной 30–40 мкм, которые обрабатывали для выявления серотонинергических и нитроксидаергических нейронов. Затем срезы промывали, обезжизняли, просветляли в ксилоле и заключали в канадский балзам.

Коцюба Александр Евгеньевич – канд. мед. наук, доцент кафедры анатомии человека ВГМУ; тел.: 8 (4323) 43-75-29; e-mail: akotc@mail.ru

Для иммуоцитохимического выявления SN срезы последовательно инкубировали в фосфатном буфере, содержащем следующие компоненты [6]:

- 1) 1% нормальную сыворотку лошади (в течение 1 часа при комнатной температуре);
- 2) первичные кроличьи поликлональные антитела против SN (ImmunoStar, США) в разведении 1:500 (при температуре 4°C в течение 18 часов);
- 3) вторичные биотинилированные антитела козы против IgG кролика (Vestor Labs, США) в разведении 1:250 (2 часа при комнатной температуре);
- 3) авидин-пероксидазный комплекс Vectastain Elite ABC Kit (1 час при комнатной температуре в темноте).

Для выявления продуктов реакции срезы инкубировали с субстратом для обнаружения SN (VIP Substrate Kit, Vestor Labs, США) под визуальным контролем. Контроль специфичности реакции проводили путем исключения стадии инкубирования в специфической и нормальной кроличьих антисыворотках.

Для гистохимического выявления NO-ергических нейронов срезы 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 термостате при 37°C в течение 1 часа [15]. Плотность образующегося осадка диформаза пропорциональна здесь молекулярному содержанию нитроксидазы (NOS) в нейроне, что позволяет судить об активности фермента в клетках исследуемых ядер. Специфичность гистохимической реакции проверялась инкубацией нескольких срезов в растворе, содержащем NADP вместо NADPH. Изучали ядро солитарного тракта, дорсальное ядро блуждающего нерва, а также ретикулярные ядра – латеральное, гигантоклеточное, мелкоклеточное и ядра шва задней группы – бледное, темное и крупное.

В серии из последовательных срезов продолговатого мозга, один окрашивали 0,5% раствором метиленового синего по Нисслю, другой обрабатывали для визуализации NO-ергических нейронов, третий – нейронов, аккумулирующих SN. Для более точного определения пространственной локализации нейронов каждый из трех срезов исследовали отдельно в трех микроскопах, в окуляры которых помещали одинаковые координатные сетки. Каждое ядро ориентировали по характерным признакам в сагитальной и фронтальной плоскостях, после чего его контуры воспроизводили на экране монитора в соответствии с положением ядер относительно координатных линий.

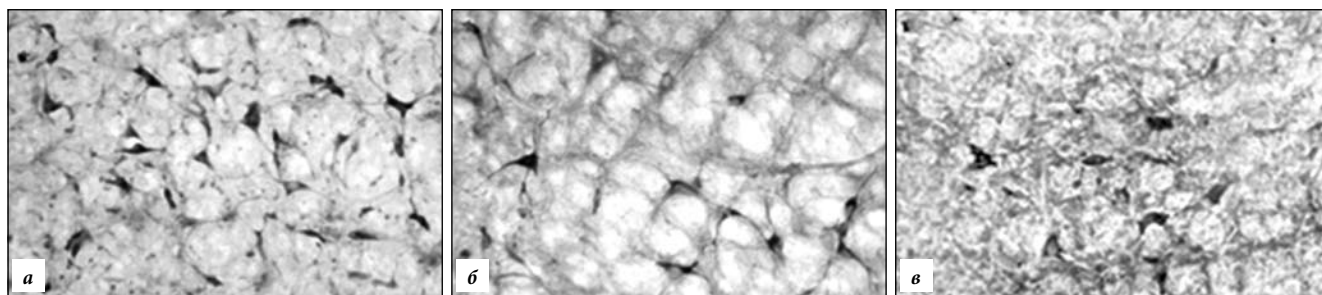


Рис. 1. Нейроны гигантоклеточного ядра:

а – окраска метиленовым синим; *б* – положительная реакция на нитроксидсинтазу; *в* – положительная реакция на серотонин. $\times 200$.

Для уточнения расположения и количества нейронов, в которых NOS солокализована с SN, изображения ядер, полученные при обработке срезов каждым из использованных методов, на экране монитора совмещали методом наложения. В каждом ядре определяли среднюю площадь профильного поля (мкм^2), абсолютное (общее) число нейронов, долю среди них, приходящуюся отдельно на SN- и NO-ергические, а также нейроны, в которых солокализованы оба медиатора. Кроме того, высчитывали количество нейронов в $0,01 \text{ мм}^3$ ядра (относительную плотность) и показатель оптической плотности преципитата в этих клетках.

Количественная обработка материала проводилась на автоматизированной системе анализа изображений Allegro MC [8]. Данные количественного анализа представляли в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего, полученных от каждого животного при обработке не менее 12 срезов на двух уровнях продолговатого мозга в соответствии со схемами, представленными ранее [9]. Для оценки значимости цифровых данных применяли методы вариационной статистики.

Результаты исследования. Независимо от способа визуализации нейронов во всех исследованных ядрах встречались клетки овальной, веретеновидной, треугольной и многоугольной формы (рис. 1, а–в). В проекции ядер также выявлялись отростки нейронов, мелкие сосуды, иногда глиальные элементы. Абсолютное количество клеток, окрашенных метиленовым синим, оказалось в несколько раз выше, чем количество SN- и NO-ергических нейронов (рис. 2, а). Клеток, экспрессирующих NOS, в ядре солитарного тракта было почти в два, а в ретикулярных ядрах – в три раза больше, чем SN-ергических нейронов.

Нейроны, аккумулировавшие SN, так же как и NO-ергические нейроны, отличались структурой и плотностью осадка (рис. 1, а–в). В нейронах с низкой интенсивностью реакции преципитат маркировал лишь контуры клетки, оставляя свободной большую часть цитоплазмы. Там, где такие клетки встречались чаще (ядро солитарного тракта, дорсальное ядро блуждающего нерва и латеральное ретикулярное ядро), средний показатель оптической плотности осадка был ниже, чем в ядрах, где преципитат заполняет большую часть цитоплазмы. Среди SN-ергических много

таких нейронов визуализировались в ядрах шва и ретикулярном гигантоклеточном ядре, где определялась наибольшая величина этого показателя. Нейронов с высокой активностью NOS больше всего было в ретикулярных ядрах, где их количество составляло не менее половины всех клеток, поэтому значения показателя в них оказались выше, чем в других ядрах.

Между ядрами отмечены выраженные отличия относительной плотности нейронов (рис. 2, б). При окраске препаратов метиленовым синим в мелкоклеточном и латеральном ретикулярных, а также в ядре солитарного тракта определялись компактные группы небольших по размеру клеток, поэтому их относительная плотность здесь была выше, чем в других ядрах. Иная зависимость установлена для величины этого показателя в SN- и NO-ергических нейронах. Среди первых самые большие значения выявлены в бледном и темном ядрах шва и в гигантоклеточном ретикулярном ядре, наименьшие – в дорсальном ядре блуждающего нерва и в ядре солитарного тракта. В группе NO-ергических нейронов наиболее высокая относительная плотность клеток определялась в латеральном и мелкоклеточном ретикулярных ядрах.

В латеральном ретикулярном ядре SN-ергические нейроны с солокализованной в них NOS располагались относительно равномерно. В ядре солитарного тракта они находились в основном в дорсомедиальной части его каудального отдела на уровне верхней и средней трети нижней оливы, в гигантоклеточном и мелкоклеточном ретикулярных ядрах – преимущественно в овальных и веретеновидных клетках на периферии их вентральной и дорсальной частей, а в ядрах шва – в веретеновидных и треугольных нейронах вентролатеральной части (рис. 3). Наиболее часто (около 60–64%) клетки, аккумулирующие оба медиатора, встречались в крупном и темном ядрах шва. В гигантоклеточном и латеральном ретикулярных ядрах их доля также была велика (46–52%). В других ядрах величина этого показателя не превышала 30% (рис. 2, в). Между ядрами, а также ядрами и проводящими путями выявлялись одиночные SN- и NO-ергические нейроны звездчатой или веретеновидной формы. Среди этой популяции особенно часто (до 68%) встречались нейроны, в которых были солокализованы оба медиатора.

Обсуждение полученных данных. Долгое время считалось, что основным медиатором в продолговатом

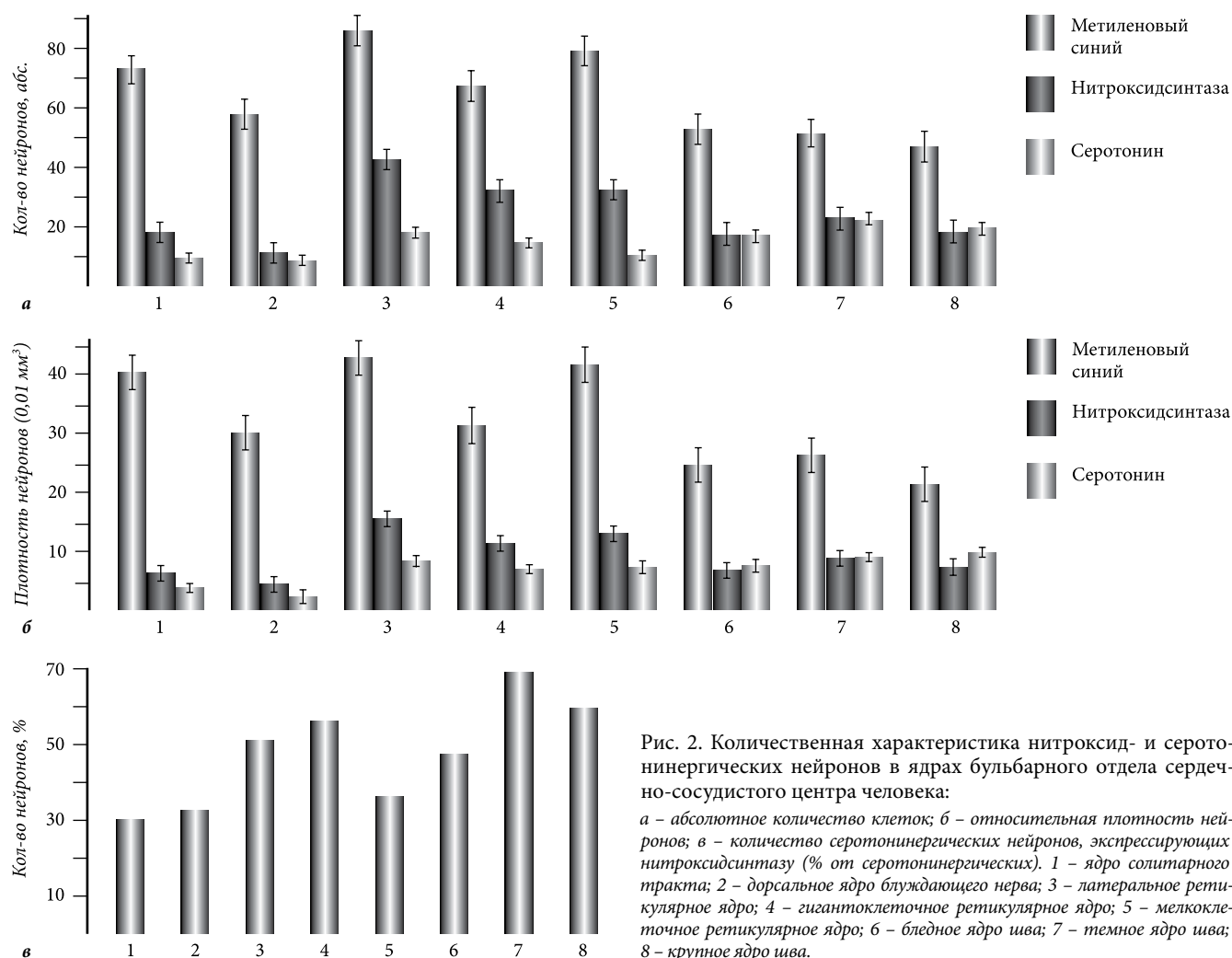


Рис. 2. Количественная характеристика нитроксид- и серотонинергических нейронов в ядрах бульбарного отдела сердечно-сосудистого центра человека:

а – абсолютное количество клеток; б – относительная плотность нейронов; в – количество серотонинергических нейронов, экспрессирующих нитроксидсинтазу (% от серотонинергических). 1 – ядро солитарного тракта; 2 – дорсальное ядро блуждающего нерва; 3 – латеральное ретикулярное ядро; 4 – гигантоклеточное ретикулярное ядро; 5 – мелкоклеточное ретикулярное ядро; 6 – бледное ядро шва; 7 – темное ядро шва; 8 – крупное ядро шва.

мозге является ацетилхолин. Действительно, количество нейронов, включенных в обмен ацетилхолина в его ядрах, по разным данным, колеблется от 49 до 97% от общего числа клеток [3, 10]. Позднее было показано, что эффекты ацетилхолина, как и некоторых других медиаторов, во многом зависят от концентрации в мозге других веществ, в частности SN и оксида азота [5].

По нашим данным, клеток, аккумулирующих SN, в ядрах этого образования достаточно много. Особенно часто они встречаются в задней группе ядер шва, где их доля превышает 50%. Относительная плотность SN-ергических нейронов здесь также выше, чем в других ядрах, где они располагаются одиночно или образуют небольшие группы. В ядрах шва определяются и наибольшие цифры оптической плотности преципитата в нейронах, что говорит о высокой концентрации в них SN [6]. Компактные группы ярко люминесцирующих клеток в этих ядрах были отмечены многими исследователями, использовавшими для идентификации моноаминергических нейронов флуоресцентно-гистохимический метод [12, 13]. На этом основании сформировалось твердое убеждение, что в продолговатом мозге многие (если не все) нейроны, аккумулирующие SN, находятся исключительно в ядрах шва [6].

Проведенное нами исследование свидетельствует об ошибочности таких представлений. Анализ полученных данных показывает, что SN-ергические нейроны определяются в проекции всех исследованных нами ядер, где их доля колеблется от 13 до 16%, а общее количество на 23,4% превышает суммарное число клеток, вычисленное для ядер шва. Больше того, нейроны гигантоклеточного ретикулярного ядра величиной соответствующих показателей практически не уступают некоторым ядрам шва. Возможно, это объясняется тем, что SN-ергические нейроны гигантоклеточного ядра, имеющие с преганглионарными нейронами спинного мозга прямые связи, оказывают непосредственное влияние на гемодинамику [2]. Впрочем, отчетливое снижение артериального давления наблюдается и при микроинъекции SN в ядро солитарного тракта и в дорсальное ядро блуждающего нерва [1], т.е. в те образования, где, по нашим данным, содержится наименьшее число SN-ергических нейронов.

Хорошо известно участие SN и во многих других физиологических процессах в центральной нервной системе [4, 12, 14]. Ключевую роль в многообразном действии SN современные исследователи отводят оксиду азота, способному выступать эффективным мессенджером, регулирующим высвобождение

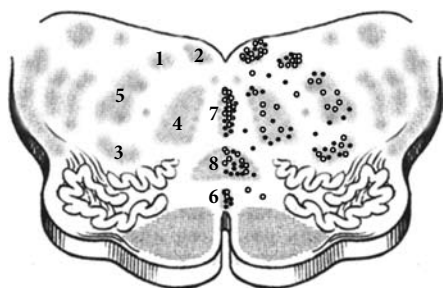


Рис. 3. Схема распределения SN-ергических нейронов (светлые точки), а также нейронов, включающих оба медиатора (темные точки), в ядрах бульбарного отдела сердечно-сосудистого центра: 1 – ядро солитарного тракта; 2 – дорсальное ядро блуждающего нерва; 3 – латеральное ретикулярное ядро; 4 – гигантоклеточное ретикулярное ядро; 5 – мелкоклеточное ретикулярное ядро; 6 – бледное ядро шва; 7 – темное ядро шва; 8 – крупное ядро шва.

нейротрансмиттера [5]. Однако сообщений о пространственном и количественном распределении нейронов, в которых оксид азота выступает комедиатором SN, немного, поскольку возможности метода двойного иммуногистохимического мечения, обычно применяемого для этих целей, весьма ограничены [7]. Метод наложения изображения, использованный нами, позволил получить такую информацию. Оказалось, что доля клеток, аккумулирующих оба медиатора, колеблется от 29,9% (ядро солитарного тракта) до 64,7% (темное ядро шва). Нейроны, в которых сокоализованы SN и оксид азота, в латеральном ретикулярном ядре распределены относительно равномерно, в гигантоклеточном и мелкоклеточном ретикулярных ядрах они обычно встречаются на периферии вентральной и дорсальной частей, в ядрах шва – в вентролатеральной части, а в ядре солитарного шва – в дорсомедиальной части его каудального отдела. Выявляются также одиночные нейроны, которые находятся между этими ядрами, а также между ядрами и проводящими путями. Таких клеток немного, но они занимают стратегически важные участки в продолговатом мозге и, согласно имеющимся данным, обмениваются многочисленными отростками с ретикулярными ядрами, вегетативным ядром блуждающего нерва, ядром одиночного пути [9]. Эти клетки, экспрессирующие разные нейротрансмиттеры и нейромодуляторы, способны выполнять интегративную функцию в отношении клеток и нервных волокон различной функциональной принадлежности. SN в них может быть сокоализован не только с оксидом азота (в 68% клеток), как было показано нами, но и с гамма-аминомасляной кислотой, глицином, вазоактивным интестинальным пептидом [11].

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют в пользу того, что нейрохимическая гетерогенность нейронов является одним из фундаментальных принципов организации мозга. Вовлечение нейронов, содержащих два или более медиаторов в пространственные взаимоотношения между различными ядрами, создают необходимый субстрат для реализации разнообразных функций мозга.

Литература

1. Гуревич М.И., Шаповал Л.Н. О влиянии введения серотонина в структуры продолговатого мозга на гемодинамику // Физиол. журнал СССР. 1975. Т. 61, № 12. С. 1812–1818.
2. Иззати-заде К.Ф., Баша А.В., Демчук Н.Д. Нарушения обмена серотонина в патогенезе заболеваний нервной системы // Журн. неврологии и психиатрии. 2004. № 9. С. 62–70.
3. Мотавкин П.А., Охотин В.Е. Холинергические нейроны ядерных образований продолговатого мозга человека // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. 1983. Т. 134, № 1. С. 24–28.
4. Прокопьева Е.В., Николаева Л.А. Серотонинергическая система головного мозга и ее влияние на сердечно-сосудистую деятельность // Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии: сб. науч. трудов. Томск, 2004. Т. 1. С. 54–56.
5. Салей А.П., Рецкий М.И. Роль оксида азота в формировании мотивационного поведения и обучения // Вестник ВГУ. Серия «Химия, биология, фармакология». 2003. № 1. С. 75–80.
6. Уртикова Н.А., Сапронова А.Я., Бризоргей М.-Ж. и др. Развитие серотонинергических нейронов задней группы ядер шва у мышей с генетическим исключением моноаминоксидазы А и ауторецепторов 5-HT1B // Онтогенез. 2009. Т. 40, № 4. С. 270–281.
7. Хрулев С.В., Дюйзен И.В. Солокализация серотонина и нитроксидазы в нейронах подкоркового белого вещества мозга человека // Тихоокеанский мед. журн. 2004. № 2. С. 23–26.
8. Черток В.М., Афанасьев А.А., Коцюба А.Е. Применение автоматизированной системы анализа изображений Allegro MC для морфометрических исследований. Морфология. 2003. Т. 124, № 4. С. 88–93.
9. Черток В.М., Коцюба А.Е., Бабич Е.В. Нитроксидазосодержащие нейроны в некоторых ядрах продолговатого мозга человека и крысы // Цитология. 2009. Т. 51, № 7. С. 612–616.
10. Aquilonius S.M. Role of acetylcholine in the central nervous system // Handbook of clinical Neurology / ed. P.J. Vinken, G.W. Bruyn. Amsterdam – New York – Oxford, 1977. Vol. 29. P. 435–458.
11. Cauli B., Tong X.-K., Rancillac A. et al. Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: relays for subcortical vasoactive pathways // J. Neurosci. 2004. Vol. 41, No. 24. P. 8940–8949.
12. Chalmers J.P., Minson J.B., Choy V. Bulboserial Serotonin Pathways and Hypotensive Action of Methylidopa in the Rat // Hypertension. 1984. Vol. 6, No. 5. P. 16–21.
13. Dahlstrom A., Fuxe K. Localization of monoamines in the lower brain stem // Experientia. 1964. Vol. 20, No. 7. P. 398–399.
14. Gaenatdinov R.R., Wetsel W.C., Jones S.R. et al. Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity // Science. 1999. Vol. 283. P. 397–401.
15. Hope B.T., Vincent S.R. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase // J. Neurochem. Cytochem. 1989. Vol. 37. P. 653–661.

Поступила в редакцию 08.04.2010.

SPATIAL POSITIONING OF SEROTONERGIC AND NITROXIDERGIC NEURONS IN SOME NUCLEI OF HUMAN CARDIOVASCULAR BULBAR CENTRE

A.E. Kotsuba, V.M. Chertok

Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russia)

Summary – The human spinal bulb nuclei were examined using 14 autopsies to detect serotonin- and nitroxidergic neurons. As reported, the neurons that had serotonin co-localised with nitroxidsynthase were most frequently observed in the suture nucleus and reticular, gigantocellular and medial nuclei with the 50% content. Between the nuclei and between the nuclei and pathways there were 2 to 6 percents of neurons that were tentatively performing integrative functions aimed to regulate hemodynamics. Neurons having the serotonin co-localised with nitroxidsynthase were most frequently met among this cell population.

Key words: serotonergic and nitroxidergic neurons, cardiovascular bulbar centre.

Pacific Medical Journal, 2010, No. 4, p. 43–46.