

В.М. Черток, А.Е. Коцюба

ГБОУ ВПО «Владивостокский государственный медицинский университет»
Минздравсоцразвития России

Иммуноцитохимическая характеристика H₂S-позитивных нейронов в ядрах бульбарного отдела сердечно-сосудистого центра при развитии вазоренальной гипертензии

50

Иммуноцитохимическим методом у крыс линии Вистар в 6 ядрах продолговатого мозга, относящихся к сердечно-сосудистому центру, были обнаружены нервные клетки (H₂S-нейроны), имеющие положительную реакцию на цистатионин-β-синтазу (CBS) — фермент, участвующий в синтезе сероводорода в мозге. Установлено, что у крыс с реноваскулярной гипертензией лишь через 6 нед от начала развития гипертензии в нейронах ретикулярных ядер наблюдается значимое снижение содержания CBS, хотя число H₂S-позитивных клеток в этот период существенно не меняется. Только на 12-й нед реноваскулярной гипертензии отмечается выраженное сокращение доли H₂S-позитивных нейронов в большинстве ретикулярных ядер медиальной зоны, хотя дальнейшего снижения интенсивности ферментативной реакции в нейронах не отмечено. Между 14 и 16-й нед развития гипертензии дальнейшего сокращения доли H₂S-нейронов и содержания в них фермента не наблюдается. В одиночном ядре и ретикулярном латеральном ядре, воспринимающих афферентные импульсы, при развитии реноваскулярной гипертензии определяются минимальные изменения величины показателей.

Ключевые слова: H₂S-позитивные нейроны, сердечно-сосудистый центр, цистатионин-β-синтаза, вазоренальная гипертензия.

Введение

Данные о вовлечении сероводорода (H₂S) в центральные механизмы регуляции кровотока практически отсутствуют. Этому факту имеются пока лишь косвенные доказательства, свидетельствующие о воз-

можном снижении содержания при гипертензии промежуточных продуктов обмена сероводорода в мозге [1]. Недавно появилось сообщение о том, что вовлечение H₂S в центральную регуляцию кровяного давления может осуществляться посредством воздействия этой сигнальной молекулы на АТФ-зависимые K⁺-каналы

V.M. Chertok, A.E. Kotsyuba

Vladivostok State Medical University

Immunocytochemical characterization H₂S-positive neurons in the nuclei of bulbar cardiovascular center in the development of renovascular hypertension

Immunocytochemical method in Wistar rats in 6 nuclei of the medulla oblongata, related to the cardiovascular center, identified nerve cells (H₂S-neurons) with a positive reaction to cystathionine β-synthase (CBS) — an enzyme involved in the synthesis of hydrogen sulfide in the brain. Found that in rats with renovascular hypertension only after 6 weeks of hypertension in the neurons of the reticular nuclei observed a significant reduction of CBS, while the number of H₂S-positive cells in this period does not change significantly. Only at week 12 renovascular hypertension notes marked reduction in the proportion of positive H₂S-neurons in the reticular nuclei of most of the medial zone, although further reduction in the intensity of the enzymatic reaction in the neurons were observed. Between 14-16 weeks of hypertension to further reduce the proportion of neurons and H₂S-content of the enzyme is not observed. In a single nucleus and reticular lateral nucleus, which receive afferent impulses in the development of renovascular hypertension specify the minimum change of the indicators.

Key words: H₂S-positive neurons, cardiovascular center, cystathionine, β-synthase, vasorenal hypertension.

нейронов гипоталамуса крыс [2]. Вместе с тем никто не обнаружил присутствие нервных клеток, экспрессирующих CBS, ни в гипоталамусе, ни в других центрах мозга, управляющих вазомоторикой.

Целью настоящей работы стало изучение изменений H_2S -позитивных нейронов в некоторых ядрах бульбарного отдела сердечно-сосудистого центра в процессе развития реноваскулярной гипертензии.

Экспериментальная часть

Работа выполнена на материале 45 крыс линии Вистар массой 240–280 г, содержащихся в условиях лабораторного вивария на стандартном рационе. Из 5 животных сформировали контрольную группу, в которой средние значения систолического давления составили $114,7 \pm 5,4$ мм рт.ст. У 40 крыс по опубликованному ранее методу [3] воспроизводилась реноваскулярная гипертензия (РВГ), после чего образцы изучали на 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 и 16-й нед развития гипертензии (по 5 животных в каждой группе). У крыс с РВГ через 2 нед после операции кровяное давление повышалось до $148,1 \pm 5,6$ мм рт.ст., через 4 — до $167,5 \pm 8,8$ мм рт.ст., через 6 — до $178,4 \pm 6,3$ мм рт.ст. На 8-й нед развития гипертензии оно стабилизировалось на уровне $186,6 \pm 5,1$ мм рт.ст., после чего до 16-й нед эксперимента менялось незначительно. Давление измеряли при помощи системы неинвазивного мониторинга у крыс ML U/4c501 методом хвостовой манжеты (MedLab). Экспериментальные манипуляции производили в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Животных выводили из эксперимента внутривенным введением раствора нембутала. Из полости черепа извлекали головной мозг, отделяли от него продолговатый мозг, который фиксировали в течение 1 ч в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,4) при 4° С. Из образцов мозга готовили криостатные срезы толщиной 30 мкм, которые обрабатывали для иммуноцитохимического выявления цистатионин-β-синтазы (CBS) — фермента, участвующего в синтезе H_2S в центральной нервной системе [4, 5]. Для этого срезы последовательно инкубировали с 1% нормальной сывороткой лошади в течение 1 ч при комнатной температуре мышинными моноклональными антителами против цистатионин-β-синтазы (в разведении 1:1000) (Abscam, Великобритания) при температуре 4° С в течение 18 ч, биотинилированными антителами лошади против IgG мыши в разведении 1:100 (VectorLabs, США) 2 ч, а также с авидин-пероксидазным комплексом (Vectastain Elite ABC Kit, VectorLabs, США) 1 ч при комнатной температуре. Между инкубациями проводили отмывки препаратов фосфатным буфером. Для выявления продуктов реакции под контролем микроскопа срезы инкубировали в субстрате для обнаружения пероксидазы (VIP Substrate Kit, VectorLabs, США). Затем срезы промывали, обезвоживали по стандартной методике и заключали в полистерол. Для оценки специфичности реакции проводили окрашивание срезов без первичных или вторичных антител.

В серии из последовательных срезов один обрабатывали 0,5% раствором метиленового синего для определения общего числа нейронов, другой использовали для иммуноцитохимического выявления в них активности CBS. Изучали ядра, имеющие отношение к буль-

барному отделу сердечно-сосудистого центра: ядро солитарного тракта (ЯСТ), дорсальное ядро блуждающего нерва (ДЯБН), ретикулярные гигантоклеточное (РГЯ), окологигантоклеточное (РОГЯ), мелкоклеточное (РМЯ) и латеральное (РЛЯ) ядра. В проекции среза каждого ядра вычисляли величину среднего значения оптической плотности продукта реакции (активность фермента), а также долю, приходящуюся на H_2S -позитивные нейроны (H_2S -нейроны). Для количественного анализа использовали данные, полученных при обработке не менее 12 срезов мозга каждого животного. Для оценки значимости цифровых данных применяли *t*-критерий Стьюдента. Значения доверительного интервала $p < 0,05$ считали статистически достоверными.

Результаты и обсуждение

У контрольных животных в проекции всех исследованных ядер мозга постоянно определяются клетки, обладающие разной степенью активности CBS. Более интенсивная реакция, как правило, проявляется в крупных нейронах (рис. 1 А), поэтому ядра, имеющие большое количество таких клеток (РГЯ, РОГЯ), отличаются и более высокими значениями среднего показателя оптической плотности продукта иммуноцитохимической реакции (рис. 2 А). В ЯСТ и ДЯБН выявляется ограниченное количество клеток с невысокой активностью фермента (рис. 1 Б). Содержание H_2S -нейронов в изученных ядрах значительно варьирует. Доля таких клеток в ЯСТ, ДЯБН, РЛЯ не превышает 3–4%, в РГЯ и РОГЯ достигает 13–14% (рис. 2 Б). Клетки, экспрессирующие CBS, концентрируются обычно в тех же участках ядер, что и NO-ергические нейроны, что объясняется, по-видимому, тесным функциональным взаимодействием, существующим между нейронами, аккумулирующими сероводород и оксид азота [4, 5], хотя концентрация последних в соответствующих ядрах в 3–4 раза выше, чем H_2S -нейронов [6].

В первые 4 нед развития гипертензии значимых изменений количественных показателей ни в одном из исследованных ядер не наблюдалось. Только на 6-й нед РВГ в нейронах ДЯБН, РГЯ и РОГЯ установлено достоверное увеличение среднего показателя оптической плотности продукта реакции CBS, хотя доля H_2S -нейронов в большинстве из них остается на уровне контрольных значений (рис. 3 А, Б). В ДЯБН повышение интенсивности реакции и числа иммунопозитивных нейронов происходит в основном за счет группы клеток, расположенных в каудальной части ядра на уровне средней трети нижней оливы (рис 4). В РГЯ, РОГЯ, РМЯ также отмечено более плотное отложение продукта реакции в большинстве нейронов, хотя не столь выраженное, как в ДЯБН, зато более равномерное в различных участках ядер. В остальных ядрах существенных изменений величины исследованных показателей не установлено.

Начиная с 8-й нед развития РВГ, в исследованных ядрах наблюдали все более выраженное снижение значений среднего показателя оптической плотности продукта реакции при весьма умеренном уменьшении доли H_2S -нейронов (см. рис. 3 А, Б). При этом сокращения количественных показателей в большей степени затрагивают ядра медиальной зоны продолговатого мозга — РГЯ, РОГЯ, РМЯ, которые имеют непосредственные связи со спинным мозгом [7]. В ДЯБН и ядрах латеральной зоны (ЯСТ, РЛЯ) изменения морфометрических пара-

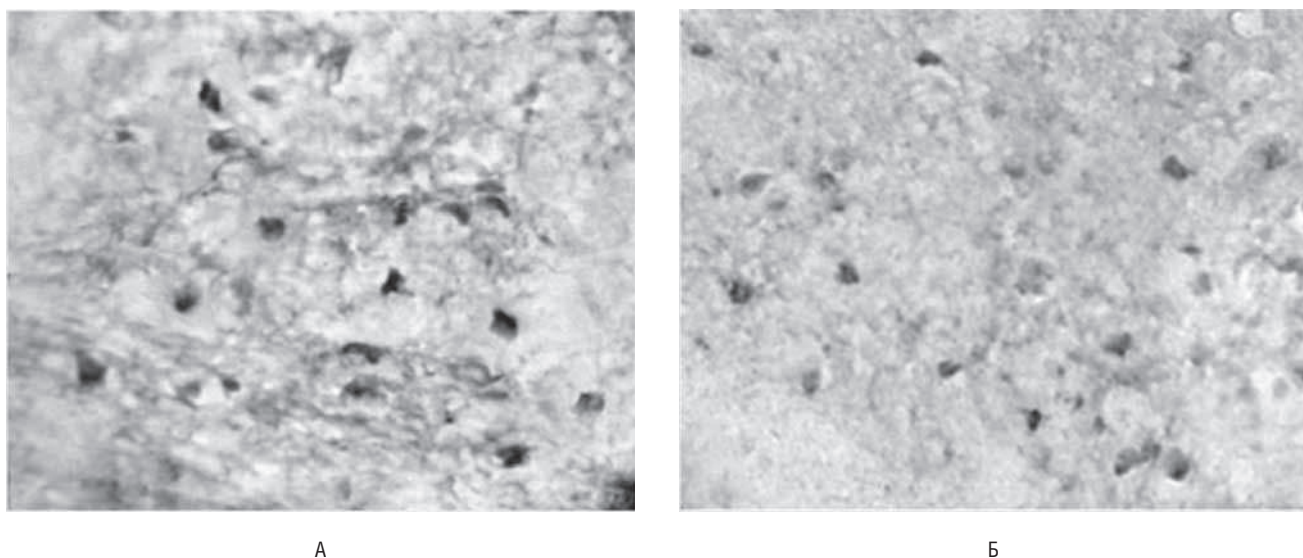


Рис. 1. Разный уровень активности CBS в H_2S -нейронах ретикулярного окологигантоклеточного ядра (А), дорсального ядра блуждающего нерва (Б) у животных контрольной группы. Иммуноцитохимический метод. Об. $10\times$, ок. $10\times$.

52

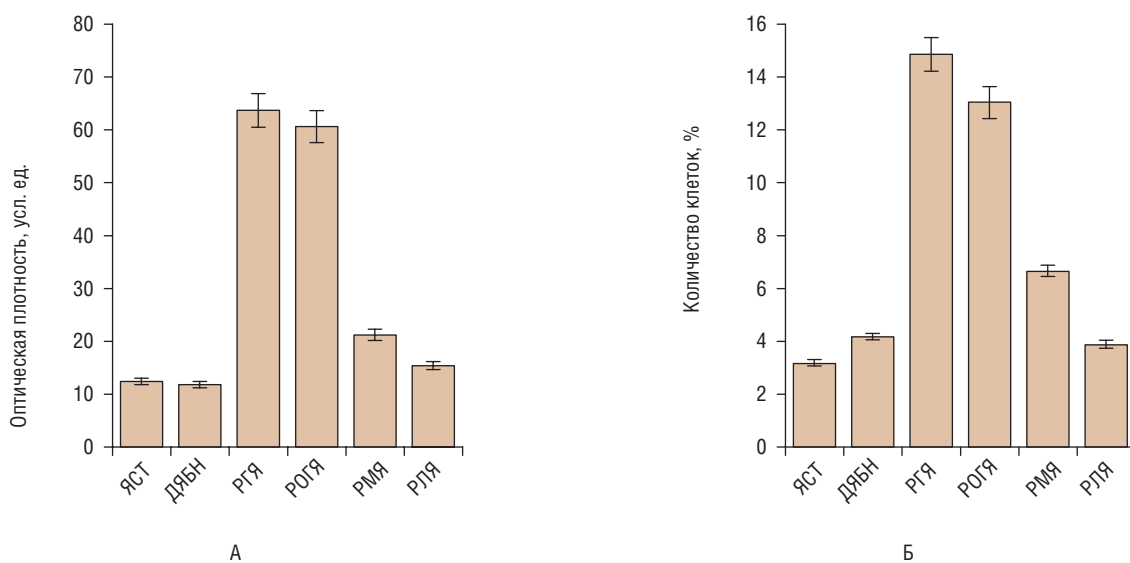
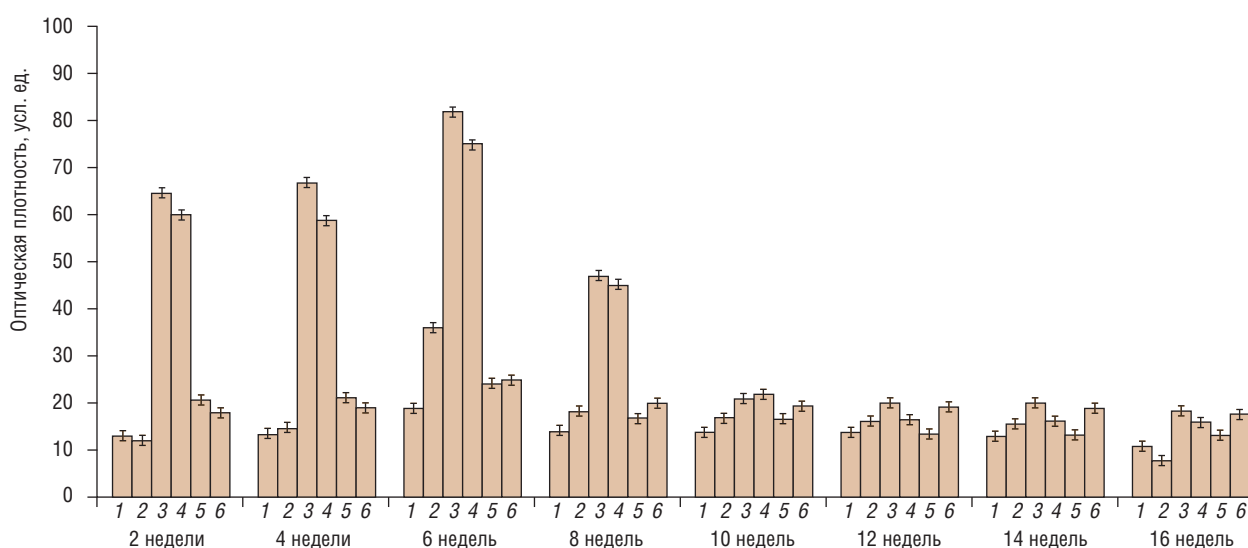


Рис 2. Распределение активности CBS в нейронах (А) и доли H_2S -нейронов (Б) в исследованных ядрах контрольной группы крыс
Примечание. ЯСТ – ядро солитарного тракта, ДЯБН – дорсальное ядро блуждающего нерва, РГЯ – ретикулярное гигантоклеточное ядро, РОГЯ – ретикулярное окологигантоклеточное ядро, РМЯ – ретикулярное мелкоклеточное ядро, РЛЯ – ретикулярное латеральное ядро. Б – за 100% принято количество нейронов соответствующих ядер, окрашенных метиленовым синим.

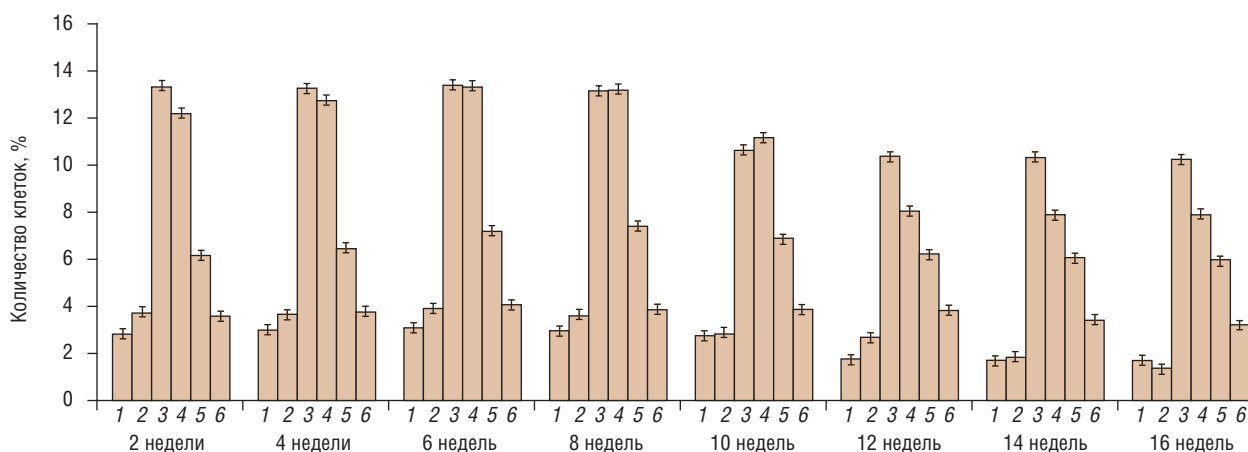
метров остаются практически на уровне контрольных значений. Между 10 и 12-й нед развития гипертензии в ядрах медиальной зоны зафиксировано максимальное снижение активности и доли H_2S -нейронов. В РГЯ это происходит на 10-й нед развития РВГ, в РОГЯ и РМЯ — на 12-й нед, когда наблюдаются минимальные значения и активности CBS в клетках этих ядер, и доли H_2S -нейронов. В ЯСТ и РЛЯ изменения величины количественных показателей в этот период не выходят за рамки статистической погрешности расчетов. В ДЯБН величина показателей хотя и снижается по сравнению с 6-й нед РВГ,

но остается на уровне или немногим выше контрольных значений. Достоверное снижение активности фермента и количества иммунопозитивных нейронов в этом ядре наблюдается лишь на 14–16-й нед развития гипертензии (см. рис. 4), тогда как в остальных ядрах колебания величины количественных показателей в этот период незначительны (см. рис. 3 А, Б).

Таким образом, в процессе развития гипертензии в большинстве изученных нами ядер наблюдается все более выраженное уменьшение содержания H_2S -нейронов и активности в них CBS. Наиболее отчетливые преобразо-



А



Б

Рис 3. Распределение активности CBS в нейронах (А) и доли H₂S-нейронов (Б) в исследованных ядрах крыс в разные сроки развития реноваскулярной гипертензии

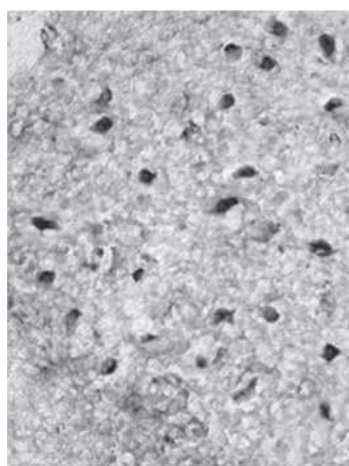
Примечание. 1 – ЯСТ, 2 – ДЯБН, 3 – РГЯ, 4 – РОГЯ, 5 – РМЯ, 6 – РЛЯ.

Б – за 100% принято количество нейронов соответствующих ядер, окрашенных метиленовым синим.

вания величины количественных показателей прослеживаются в нейронах двигательных ядер. Сходные изменения этих показателей были отмечены и при гипертензии и в отношении NO-позитивных нейронов [4, 5]. Однако в отличие от оксида азота, время полужизни которого составляет 5 с, а расстояние диффузии 100 мкм, H₂S обеспечивает развитие не столь мощного, зато длительного возбуждения с более широкой зоной воздействия. Вполне вероятно, что это свойство сероводорода, впервые установленное в гиппокампе крысы [8], может быть использовано и в других центрах мозга, в том числе в центрах, участвующих в регуляции вазомоторики. Поскольку при гипертензии, как у человека, так и у экспериментальных животных, содержание

NO-позитивных нейронов в ядрах вазомоторного центра значительно сокращается [9, 10], способность сероводорода вызывать длительное возбуждение нейронов может оказаться в этом случае необходимым условием для стабилизации кровяного давления. Дальнейшее сокращение активности соответствующих ферментов в NO- и H₂S-нейронах, а затем и числа этих клеток способствует появлению, а далее — и закреплению артериальной гипертензии.

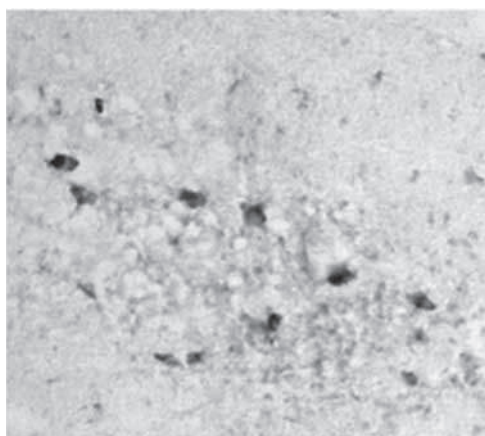
Исследование выполнено при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям. Федеральная целевая программа «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (госконтракт № 14.740.11.0186).



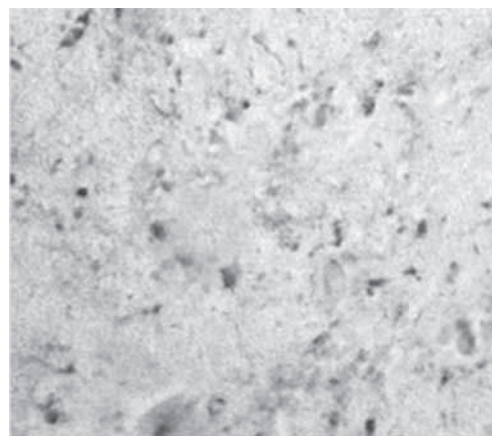
А



Б



В



Г

Рис. 4. Ретикулярное гигантоклеточное ядро (А, Б) и дорсальное ядро блуждающего нерва (В, Г) в разные сроки развития реноваскулярной гипертензии. А, В – 6-я неделя; Б, Г – 16-я неделя. Иммуноцитохимический метод. Об. 10^х, ок. 10^х

REFERENCES

1. Szabo C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature Reviews*. 2007; 6: 917–935.
2. Dawe G.S., Han S.P., Bian J.S. et al. Hydrogen sulphide in the hypothalamus causes an ATP-sensitive K⁺ channel-dependent decrease in blood pressure in freely moving rats. *Neuroscience*. 2008; 152: 169–177.
3. Harin S.N., Krandycheva V.V., Shmakov D.N. Metodika suzheniya pochechnoj arterii dlya modelirovaniya renovaskulyarnoj gipertenzii u krysa. *Byulleten' 'eksperimental'noj biologii i mediciny*. 2004; 137 (5): 489–493.
4. Gadalla M.M., Snayder S.H. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. *J. Neurochem*. 2010; 113: 14–26.
5. Roth S.H., Skrajny B., Reiffenstein, R.J. Alteration of the morphology and neurochemistry of the developing mammalian nervous system by hydrogen sulfide. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 1995; 22: 379–380.
6. Chertok V.M., Kocyuba A.E., Babich E.V. Nitroksidergicheskie nejrony v nekotoryh yadrah prodolgovatogo mozga cheloveka i krysa. *Citologiya*. 2009; 51 (7): 612–616.
7. Guyenet P.G. Role of the ventral medulla oblongata in blood pressure regulation. In: Central Regulation of Autonomic Functions / A.D. Loewy and K.M. Spayer (eds). *Oxford University Press*. N.Y. 1990. 145–167 p.
8. Kerchner G.A., Nicoll R.A. Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nat. Rev. Neurosci*. 2008; 9: 813–825.
9. Babich E.V., Chertok V.M., Kocyuba A.E. Nitroksidergicheskie nejrony v yadrah prodolgovatogo mozga u normo- i gipertenzivnyh krysa. *Byulleten' 'eksperimental'noj biologii i mediciny*. 2009; 147 (8):157–160.
10. Kocyuba A.E., Chertok V.M., Babich E.V. Nitroksidergicheskie nejrony bul'barnogo vazomotornogo centra cheloveka pri arterial'noj gipertenzii. *Zhurnal nevrologii i psixiatrii*. 2010; 2: 61–65.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Чертюк Виктор Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой анатомии человека ГБОУ ВПО «Владивостокский государственный медицинский университет» Минздрава России
Коцюба Александр Евгеньевич, кандидат медицинских наук, доцент кафедры анатомии человека ГБОУ ВПО «Владивостокский государственный медицинский университет» Минздрава России
 Адрес: 690990, Владивосток, пр-т Острякова, д. 2
 Тел.: (4232) 45-34-73
 E-mail: chertokv@mail.ru