

Экспериментальные исследования
ГРИГОРЬЕВ И. П.¹, ГИЛЕРОВИЧ Е. Г.¹,
ПЕТРОВА Е. С.¹, ВЛАСОВ Т. Д.²,
КОРЖЕВСКИЙ Д. Э.¹

Катехоламинергические структуры переднего мозга крыс после транзиторной ишемии

¹ *Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы НИИ экспериментальной медицины, Санкт-Петербург*

² *Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова*
e-mail: iemmorphol@yandex.ru

Реферат

Исследована катехоламинергическая система переднего мозга крыс через двое суток после фокальной ишемии, вызванной 30-минутной окклюзией средней мозговой артерии. Катехоламинергические структуры выявляли с помощью иммуноцитохимического окрашивания тирозингидроксилазы (ТГ) — фермента синтеза катехоламинов. Описано распределение ТГ в структурах переднего мозга в контроле — преимущественно в волокнах и терминалах, а также в отдельных нейронах неокортекса и полосатого тела. Через 2-е суток после ишемии интенсивность окрашивания ТГ резко снижалась в полушарии, ипсилатеральной окклюзии мозговой артерии. Возможной причиной этого является повышенная реактивность на ишемию катехоламинергических нейронов среднего мозга и ствола мозга, проецирующихся на структуры переднего мозга.

Ключевые слова: ишемия, средняя мозговая артерия, головной мозг, катехоламины, тирозингидроксилаза, иммуногистохимия.

Grigorev I. P.¹, Petrova E. S.¹, Gilerovich E. G.¹,
Vlasov T. D.², Korzhevskii D. E.¹

Catecholaminergic structures of the rat forebrain following transitory ischemia

¹ *Institute of Experimental Medicine of the Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg*

² *Pavlov St. Petersburg State Medical University*
e-mail: iemmorphol@yandex.ru

Abstract

Forebrain catecholaminergic system was studied in rats two days following focal ischemia induced by 30-min occlusion of middle brain artery. Catecholaminergic structures were revealed using immunocytochemical staining for tyrosine hydroxylase (TH), the enzyme of catecholamines synthesis. Distribution of TH is described in the forebrain areas in control — predominantly in fibers and terminals as well as some neurons of neocortex and striatum. Intensity of TH immunostaining reduced sharply in the brain artery occlusion hemisphere 2 days after ischemia. Probably, this is a result of increased reactivity to ischemia of catecholaminergic neurons of midbrain and brainstem projecting to the forebrain areas.

Keywords: ischemia, middle cerebral artery, brain, catecholamines, tyrosine hydroxylase, immunohistochemistry.

Введение

Ишемический инсульт относится к одной из основных причин инвалидизации и смерти в мире. Это определяет особую актуальность фундаментальных исследований клеточных и молекулярных основ данной патологии. Показано, что недавно разработанная экспериментальная модель фокальной ишемии [3] вызывает селективную гибель нейронов стриатума, однако состояние афферентной иннервации в этой области изучено не было. Известно, что катехоламинергические структуры в переднем мозге млекопитающих представлены главным образом норадренергическими аксонами нейронов голубого пятна ствола мозга и дофаминергическими аксонами нейронов черной субстанции и вентральной тегмен-

тальной области, находящимися в среднем мозге. Катехоламинергические нейроны и их отростки, пространственно организованные определенным образом в нервной системе, образуют катехоламинергические системы, которые играют важную роль в регуляции различных физиологических процессов [1] и поведенческих актов [6]. Морфологические исследования катехоламинергических структур разных видов животных проводят с использованием иммуногистохимического выявления ключевого фермента синтеза катехоламинов тирозингидроксилазы (ТГ). Что касается исследований катехоламинергической системы взрослых животных после ишемии, их число незначительно, имеются лишь отдельные

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

данные о повышенной чувствительности катехоламинергических структур к ишемии мозга [7]. В связи с этим цель настоящего исследования — изучить состояние катехоламинергических структур неокортекса и стриатума крыс после транзиторной ишемии мозга, используя иммуногистохимические методы выявления тирозингидроксилазы и маркера нервных клеток — белка NeuN.

Материал и методы исследования

Объектом исследования были крысы Вистар ($n=18$). Содержание животных и все экспериментальные манипуляции осуществлялись с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Ишемию вызывали путем эндовазальной окклюзии средней мозговой артерии [3]. Продолжительность нарушения кровообращения в бассейне левой средней мозговой артерии составляла 30 мин, время реперфузии — 48 ч. В качестве контроля использовали мозг интактных животных.

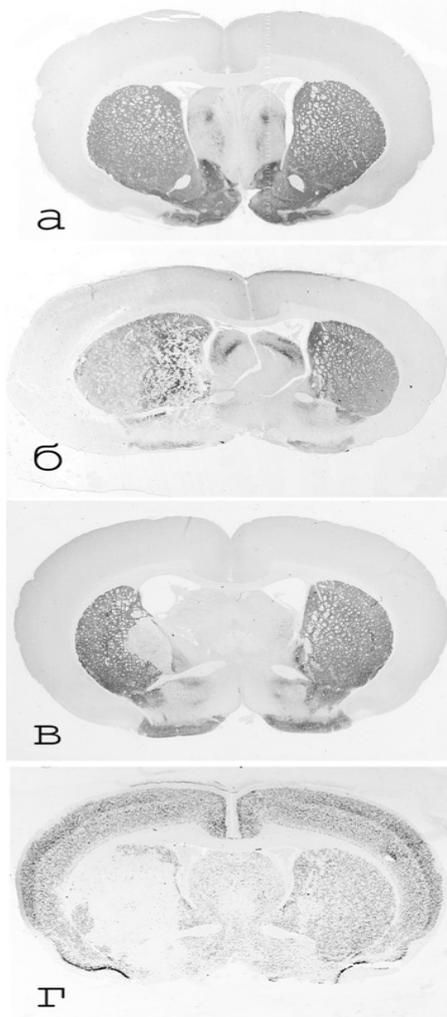


Рис. 1. Общий вид конечного мозга крысы в норме (*а*) и через 2-е суток после унилатеральной окклюзии левой средней мозговой артерии (*б, в, г*): *а* — интактный мозг; *б* — выраженные дегенеративные изменения в полосатом теле и неокортексе ипсилатерального полушария; *в* — фокальное повреждение полосатого тела; *г* — утрата нейронов. Иммуногистохимическое выявление тирозингидроксилазы (*а, б, в*) и маркера нервных клеток — белка NeuN (*г*). Увеличение $\times 8$

Мозг фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде, заливали в парафин и изготавливали срезы толщиной 5 мкм. Катехоламинергические структуры выявляли с помощью иммуногистохимической реакции на тирозингидроксилазу с применением поликлональных кроличьих антител (Abcam, Великобритания) [2]. Для выявления белка NeuN применяли моноклональные антитела клона А60 фирмы Chemicon (США) [4]. Гистологические препараты, подкрашенные гематоксилином или толуидиновым синим по Нисслию, анализировали с помощью микроскопов Leitz DM RB и Leica DM 500 (Leica, Германия) при увеличениях от $\times 100$ до $\times 1000$.

Результаты исследования и их обсуждение

Изучение препаратов на малом увеличении показало, что экспериментальная 30-минутная левосторонняя ишемия вызывала два типа поражения мозга — обширный инфаркт участка левого полушария, с отеком полушария и деструкцией нервной ткани, либо избирательное повреждение нейронов, которое затрагивало главным образом полосатое тело. Иммуноцитохимическое выявление NeuN отчетливо демонстрирует выпадение нейронов в значительной части полушария (включая и неокортекс), либо в относительно небольшом очаге в полосатом теле (рис. 1).

Иммуноцитохимическая реакция на ТГ выявляет на срезах переднего мозга контрольных животных интенсивно окрашенные волокна и терминали в полосатом теле (особенно в скорлупе), прилежащем ядре и латеральной и медиальной области обонятельных бугорков, что соответствует локализации терминальной части хорошо известных нигростриарного и мезолимбического дофаминергических трактов [5, 9]. В умеренном количестве ТГ-иммунореактивные волокна встречаются в ядрах ложа конечной полоски переднего мозга, особенно медиальном его ядре, а также в латеральной части перегородки, где отчетливо видны две полосы ТГ-иммунореактивности, проходящие через несколько септальных ядер: одна расположена непосредственно под эпендимой, вторая — глубже, параллельно первой. В небольшом количестве тонкие ТГ-позитивные волокна встречаются в коре большого мозга, в первую очередь, поясной и лобной. Волокна могут прослеживаться на большом расстоянии, отдельные из них разветвляются, образуя сплетение в толще нейропиля. Как правило, волокна имеют четкообразные утолщения с повышенной ТГ-иммунореактивностью, которые, по-видимому, являются варикозными расширениями. Плотность ТГ-иммунореактивных нервных волокон наиболее высокая в верхних слоях коры, немного меньше — в нижних и меньше всего — в средних слоях. На границе с белым веществом встречаются более толстые волокна, идущие параллельно миелинизированным проводникам белого вещества.

Помимо волокон, в неокортексе выявляются единичные (один-два на срез) ТГ-иммунопозитивные нейроны. Чаще всего они наблюдаются в средних слоях двигательной области коры (вторичная моторная кора [9]), прилежащей к поясной коре. Они

неправильной формы и имеют один-два отростка. Изредка ТГ-иммуноположительные нервные клетки округлой формы с одним отростком встречаются и в полосатом теле. Через двое суток после ишемии на ипсилатеральной стороне по отношению к окклюзии средней мозговой артерии наблюдается резкое снижение интенсивности реакции на ТГ (рис. 1). В наибольшей степени это выражено в полосатом теле, обонятельном бугорке, области прилежащего ядра и в ядрах ложа конечной полоски переднего мозга. В перегородке в большей степени снижение интенсивности ТГ-положительных волокон наблюдалось в латеральном септальном ядре. Снижение плотности ТГ-иммунопозитивных волокон отмечается в неокортексе — в наибольшей степени в поясной коре, причем как в подвергнутом ишемии, так и в контралатеральном полушариях. ТГ-положительные нейроны встречались в неокортексе и после индукции ишемии.

Тирозингидроксилаза — фермент синтеза дофамина, но поскольку дофамин является непосредственным предшественником норадреналина (оба вещества относятся к группе катехоламинов), то данный фермент является маркером как дофамин-синтезирующих, так и норадреналин-синтезирующих нейронов и их отростков. Соответственно, выявление ТГ-иммунореактивных структур позволяет нам визуализировать суммарно дофаминергические и норадренергические (катехоламинергические) волокна и терминали. Источники этих волокон находятся в среднем мозге (черное вещество и вентральная область покрышки содержат скопления дофаминергических нейронов) и стволе мозга (голубое пятно — основной центр норадренергических нейронов, иннервирующих структуры переднего мозга).

Проведенное исследование показало неоднородность распределения ТГ-иммуноположительных волокон и терминалей в переднем мозге. Если повышенной интенсивностью иммуноокрашивания на ТГ выделялись полосатое тело (особенно скорлупа), область прилежащего ядра и обонятельных бугорков, то передняя спайка и мозолистое тело были практически ТГ-иммунонегативными. Наиболее интенсивно окрашенные области соответствуют местам проекций нигростриарных и мезолимбических дофаминергических нейронов, а также норадренергических нервных клеток голубого пятна [8].

Действие ишемии через 2-е суток приводило к значительному снижению интенсивности ТГ-иммуноокрашивания в структурах переднего мозга. Использованная нами модель ишемии головного мозга связана с нарушением кровотока в средней мозговой артерии, а основные центры катехоламинергической иннервации головного мозга (черное вещество, вентральная тегментальная область и голубое пятно) расположены за пределами бассейна средней мозговой артерии, и потому кровоснабжение тел катехоламинергических нейронов не должно страдать. Однако, как показывают результаты проведенной работы, в переднем мозге аксоны дофаминергических и норадренергических нервных клеток теряют тирозингидроксилазу. Это указывает на резкое снижение функциональной активности катехоламинергических нервных клеток, что может быть связано с гибелью катехоламинергических нейронов, несмотря на их отдаленное расположение от локуса ишемии, или с их значительной функциональной перестройкой. В исследовании с использованием закупорки сонной артерии на 90 мин у крысы было обнаружено, что интенсивность ТГ-иммуноокрашивания нейронов черного вещества значительно снижалась через 2 и 6 недель, что сопровождалось уменьшением числа нейронов, меченных нейрональным маркером NeuN, и уменьшением площади черного вещества, однако через 20 недель выявлено полное восстановление ТГ-иммунореактивности [10]. Эти данные свидетельствуют о высокой выживаемости нигральных дофаминергических нейронов. Возможно, в использованной нами модели фокальной транзиторной ишемии катехоламинергические нейроны также реагируют резким адаптационным изменением (снижением) функциональной активности, вследствие чего количество ТГ значительно снижается в проекциях катехоламинергических нейронов в переднем мозге. Однако причины снижения количества ТГ в проекционных областях катехоламинергических нейронов требует дальнейшего изучения, в том числе самих этих нейронов в подкорковых катехоламинергических центрах. Это имеет большое значение в связи с ролью катехоламинергических систем в многочисленных поведенческих актах, нарушение которых наблюдается при ишемическом повреждении мозга в клинике.

Работа поддержана грантами РФФИ 11-04-01693-а и 10-04-00180.

Литература

1. Баришполец, В. В. Структурно-функциональная организация дофаминергической системы головного мозга / В. В. Баришполец, Ю. О. Федотова, Н. С. Сапронов // Эксперимент. клин. фармакол. — 2009. — № 72 (3). — С. 44–49.
2. Григорьев, И. П. Применение различных антител к тирозингидроксилазе для изучения катехоламинергических систем головного мозга млекопитающих / И. П. Григорьев [и др.] // Морфология. — 2010. — № 138 (6). — С. 60–63.
3. Коржевский, Д. Э. Моделирование одностороннего ишемического повреждения нейронов стриатума с помощью непродолжительной окклюзии средней мозговой артерии / Д. Э. Коржевский [и др.] // Бюлл. эксперимент. биол. мед. — 2009. — № 147 (2). — С. 217–219.
4. Коржевский, Д. Э. Иммуноцитохимическое выявление нейронов головного мозга с помощью селективного маркера NeuN / Д. Э. Коржевский [и др.] // Морфология. — 2005. — № 128 (5). — С. 76–78.
5. Отеллин, В. А. Нигрострионигральная система / В. А. Отеллин, Э. Б. Арушанян. — М.: Медицина, 1989.
6. Cools, R. Role of dopamine in the motivational and cognitive control of behavior / R. Cools // *Neuroscientist*. — 2008. — № 14 (4). — P. 381–395.
7. Crespi, F. Middle cerebral artery occlusion alters neurotransmitter activities in ipsilateral and contralateral rat brain regions: an ex vivo voltammetric study / F. Crespi, C. Pietra // *Neurosci. Lett.* — 1997. — № 230 (2). — P. 77–80.
8. Fallon, J. H. Collateralization of monoamine neurons: mesotelencephalic dopamine projections to caudate, septum, and frontal cortex / J. H. Fallon // *J. Neurosci.* — 1981. — № 1 (12). — P. 1361–1368.
9. Paxinos, G. *The rat brain in stereotaxic coordinates* / G. Paxinos, C. Watson. — N.-Y.: Academic Press, 1998.
10. Uchida, H. Long-term changes in the ipsilateral substantia nigra after transient focal cerebral ischaemia in rats / H. Uchida [et al] // *Int. J. Exp. Path.* — 2010. — № 91. — P. 256–266.