

Н. Д. Вартазарян, Э. А. Амроян

ГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОСТАГЛАНДИНСИНТЕТАЗЫ И АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА И МОЗГОВЫХ СОСУДАХ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ ВВЕДЕНИИ ИНДОМЕТАЦИНА

Простагландины (ПГ)—внутриклеточные гормоны, играющие значительную роль в универсальной регуляции метаболизма клеток, которая опосредуется через ферментную систему—аденилатциклазу (АЦ). Биосинтез ПГ осуществляется в микросомах клеток под влиянием мембраносвязанного комплекса ферментов—простагландинсинтетазы (ПГС) [7].

Целью работы явилось гистохимическое определение ПГС и АЦ в тканях головного мозга и мягкой мозговой оболочке белых крыс, установление особенностей локализации этих ферментных систем и их взаимосвязи на уровне тканевых структур и клеток в норме и в условиях подавления биосинтеза ПГ индометацином (ИМ).

Материал и методы

Опыты поставлены на белых крысах массой 150—200 г. Раствор ИМ (30 мг/кг) вводился внутривенно, через 40 мин животные декапитировались. Кристатные срезы толщиной 15—20 мк готовились из полушарий головного мозга для определения ПГС и АЦ с использованием метода Janszen, Nugteren [9] и Howell, Witfield [8]. О наличии ПГС свидетельствовала коричневая окраска клеточных структур после инкубации срезов при 35°C в течение 10—12 ч в среде, содержащей арахидоновую кислоту в присутствии 3,3-диаминобензидина. Для подавления неспецифической окраски (геминкатализируемая аутоокислация жирных кислот) использовался раствор KCN 10⁻³ М, который не ингибирует биосинтеза ПГ.

О специфичности реакции судили после оценки результатов контрольных опытов с инкубацией срезов в среде без субстрата арахидоновой кислоты и при ингибировании биосинтеза ПГ индометацином. В качестве контроля использовались срезы из тканей почек крыс, мозговая часть которых отличается высоким содержанием ПГ [5].

При определении АЦ в срезах из тканей головного мозга кристатные нефиксированные срезы инкубировались в среде, содержащей: 80 мМ трис-малеатного буфера (рН 7,4), 2 мг теофиллина, 2 мг АТФ, 190 мг сахарозы и 2 мг ацетата свинца. После инкубации в течение 1,5 ч при комнатной температуре срезы промывались дистиллированной водой и проводились через разведенный желтый аммония сульфид.

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что у интактных крыс в сосудах мягкой мозговой оболочки, клетках коры головного мозга и в белом веществе обнаруживается высокая активность АЦ и ПГС. Отмечалась интенсивная положительная реакция на оба фермента, преимущественно со стороны эндотелиальных и адвентициальных клеток. Особенно выделялись клетки сосудистой оболочки полушарий головного мозга, отличающиеся мелкозернистым характером АЦ в цитоплазме и ядерных структурах. Эндотелиальные клетки артерий, артериол и единичных капилляров в связи с высоким содержанием ПГС диффузно окрашивались в темно-коричневый цвет, имея гомогенную цитоплазму (рис. 1, а).

В адвентициальных клетках ПГС и АЦ определялись в виде мелких зерен, диффузно заполняющих цитоплазму и ядро. В клетках капилляров и венул ПГС не обнаруживалась, хотя в большинстве венул и венах эндотелиальные клетки содержали АЦ (рис. 3, д). Такую картину активности ПГС и АЦ со стороны микроциркуляторного

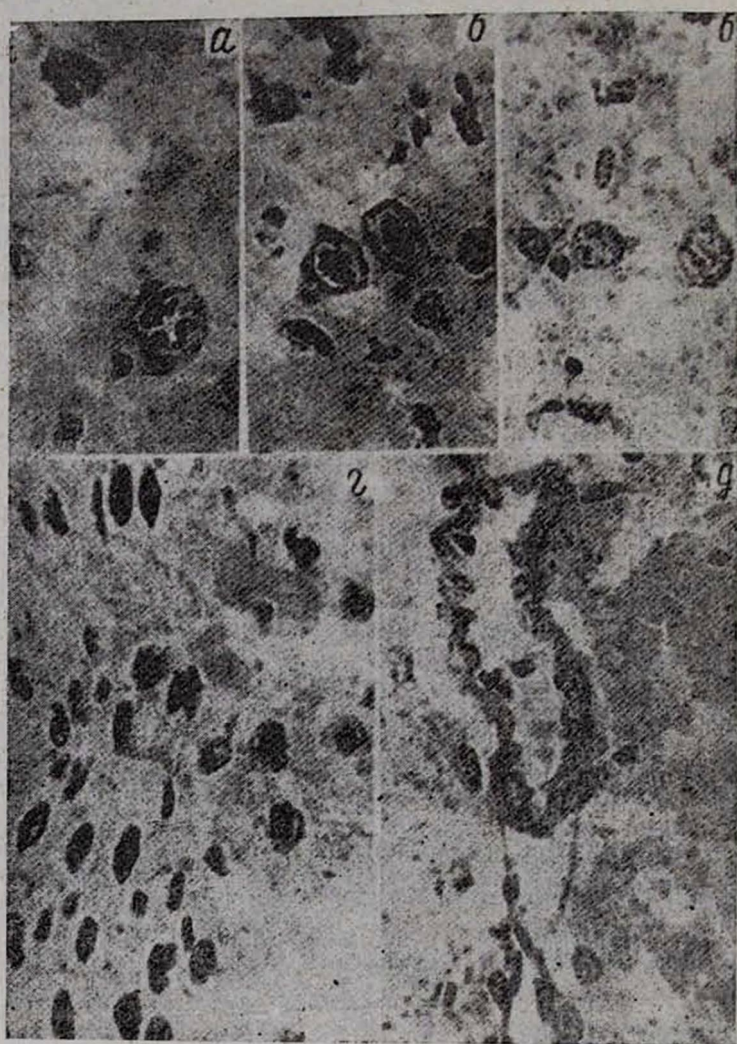


Рис. 1. ПГС в ткани головного мозга intactных крыс: а—высокая активность фермента в эндотелиальных и адвентициальных клетках артериолы и глии молекулярного слоя коры головного мозга; б—локализация фермента в ядре и под клеточной оболочкой нервных клеток молекулярного слоя; в—слабая активность ПГС в пирамидальном слое коры; г—высокая активность фермента в клетках затылочной доли коры, где выявляются множественные нейроны и глиальные элементы с диффузным гомогенным окрашиванием; д—сосуд мозговой оболочки с высокой активностью фермента. Метод Jänszen, Nugteren, Ув. 400.

русла удалось выявить также в молекулярном слое коры. Однако в отличие от АЦ эндотелиальные и гладкомышечные клетки артериол

проявили высокую ПГС активность. В контрольных срезах они не окрашивались, что свидетельствует о специфичности реакции. Эти данные согласуются с результатами других исследователей, указывающих, что эндоперекиси ПГ могут быть синтезированы в клетках артерий и глии в ЦНС [10]. Нами была установлена высокая активность ПГС в большинстве нейроцитов и глиальных клетках. АЦ обнаруживалась с одинаковой интенсивностью в цитоплазме и ядрах клеток глии в виде мелких зерен, окрашенных в черный или коричневый цвет. В большинстве нервных клеток активность АЦ была высокой, локализуясь преимущественно в цитоплазматической мембране, которая принимала интенсивную черную окраску (рис. 3, е).

Изменения общей гистоферментохимической картины говорят о неодинаковой активности ПГС и АЦ в нейронах и глиальных элементах коры головного мозга, свидетельствуя об их метаболической и функциональной гетерогенности. Если ПГС в клетках концентрировалась преимущественно в ядерной оболочке и под цитоплазматической мембраной, то АЦ обнаруживалась в ядрах и цитоплазме, концентрируясь часто в цитоплазматической мембране (рис. 3, д, е). Более интенсивное окрашивание ядер по сравнению с цитоплазмой связано с регуляторным действием цАМФ, контролирующего фосфорилирование ядерных белков, что, по мнению ряда авторов, является непосредственным механизмом регуляции генной экспрессии и клеточного деления [1]. Локализуясь в ядерной оболочке, ПГС не обнаруживалась в перинуклеарном пространстве. На периферии цитоплазмы под клеточной оболочкой ПГС удалось выявить в виде широкой, гомогенной, темно-коричневой зоны. Заметная активность ферментов устанавливалась в пирамидальной зоне коры, где реакция клеток, интенсивность окраски ядерных структур и цитоплазмы отличались мозаичностью. ПГС в нервных клетках выявлялась неодинаково, с наличием темно-коричневых, гомогенно окрашенных и более светлых клеток—в связи с низкой активностью фермента. Большинство клеток с крупным и светлым ядром содержали мелкие, темно-коричневые зерна, диффузно распространенные по всему ядру. Параллельно встречались нейроциты, где фермент обнаруживался в виде 4—6 полиморфных, темно-коричневых зерен, беспорядочно расположенных в ядерном веществе. В цитоплазме ПГС определялась в виде пылевидных включений, концентрируясь у ядерной оболочки и клеточной мембраны.

Наряду с ПГС нервные клетки III слоя коры отличались заметной активностью АЦ, которая выявлялась в виде диффузно расположенного зернистого материала в ядрах и цитоплазме. Однако активность фермента в нейроцитах была значительно ниже, чем в клетках глии. Последние отличались высоким содержанием АЦ по всей ткани. Хотя функциональное значение такой локализации АЦ в клетках глии не выяснено, однако с определенностью можно сказать, что большинство глиальных элементов тесно контактировали с нейроцитами, имеющими слабую активность АЦ.

У животных, получавших ИМ, в клетках адвентиции мелких артерий мягкой мозговой оболочки выявлялась низкая активность ПГС. Отмечалось при этом качественное отличие в характере окраски. Если у контрольных крыс больше выявлялись мелкие темно-коричневые зерна в ядре и цитоплазме, то у животных, получавших ИМ, фермент обнаруживался в виде более крупных, полиморфно-коричне-

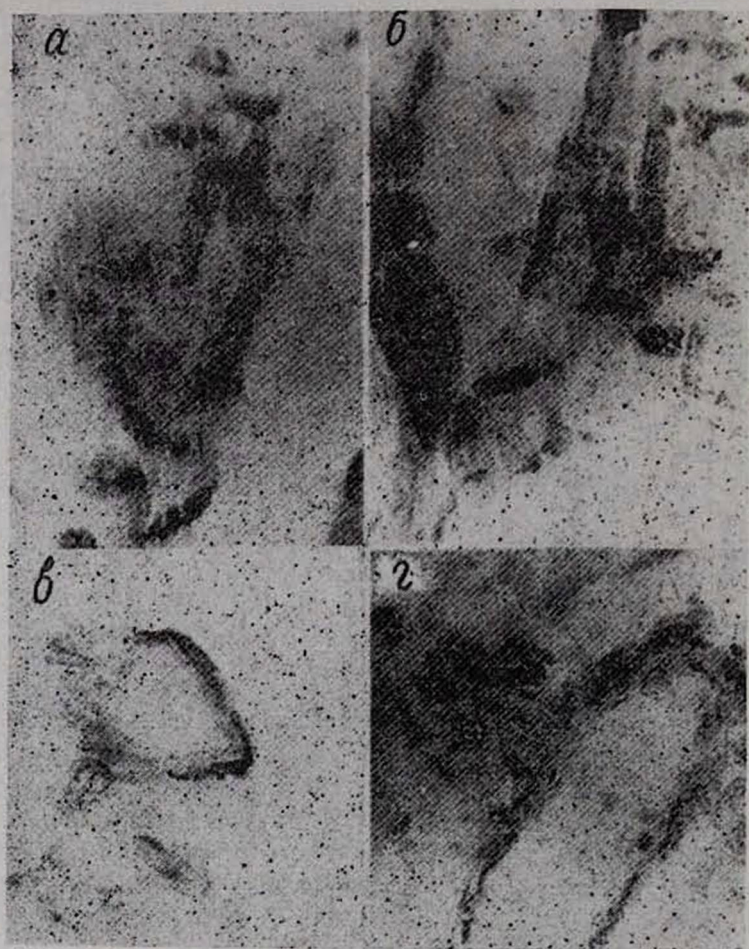


Рис. 2. ПГС в сосудах головного мозга через 40 мин после интраперитонеального введения ИМ; а—при заметной активности ПГС в адвентициальных клетках фермент не выявляется в эндотелии сосуда и нервных клетках. Ув. 400; б—в стенке артерии мозговой оболочки фермент обнаруживается лишь в гладкомышечных элементах; в—стенка артериолы с низкой активностью фермента в клетках внутримозгового сосуда. В нервных клетках фермент не обнаруживается. Метод Janszen, Nugteren. Ув. 900.

вых зерен и глыбок, расположенных диффузно по всей клетке. В эндотелиальных клетках мелких сосудов ПГС не обнаруживалась или выявлялась редко. При этом все клетки сосудов проявляли высокую, идентичную сосудам интактных животных, активность АЦ. В

нервных клетках различных слоев коры (молекулярный, наружный зернистый, пирамидальный, внутренний зернистый) и белого вещества через 40 мин после введения ИМ имело место резкое снижение ак-

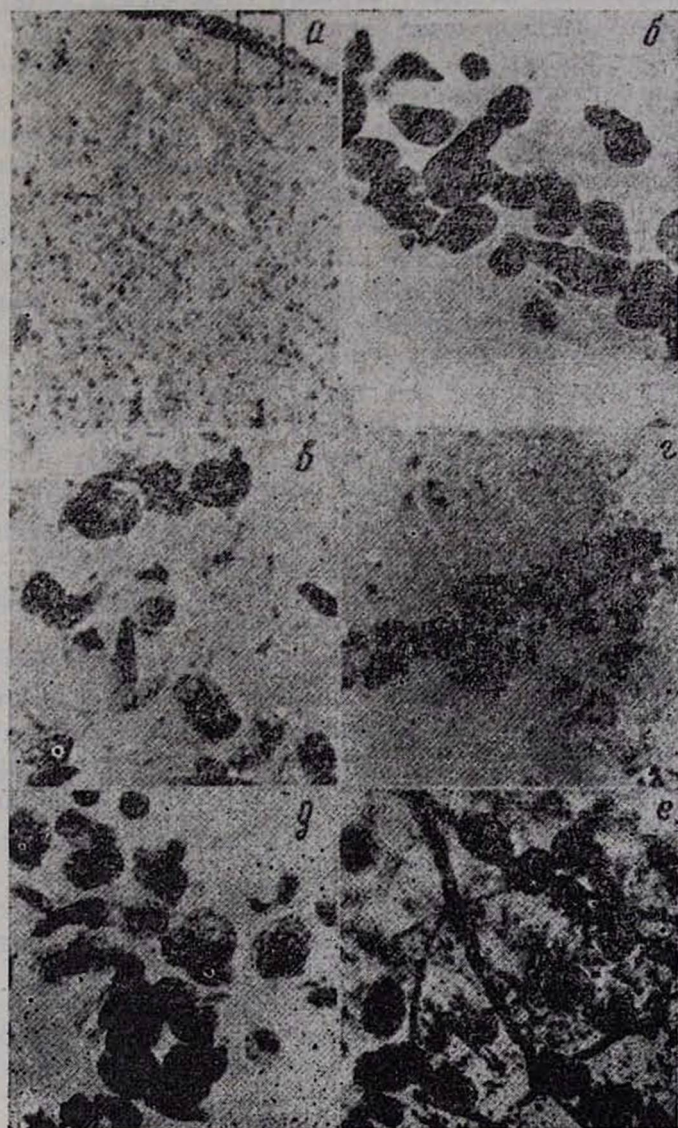


Рис. 3. Аденилатциклазная активность в клетках головного мозга крыс. а—высокая активность фермента в клетках коры и мягкой мозговой оболочки. Ув. 100; б—клетки мягкой мозговой оболочки, содержащие АЦ. Ув. 700; в—умеренное содержание АЦ в нейронах и более интенсивная реакция со стороны глияльных элементов. Ув. 400; г—высокая активность фермента в клетках сосудов коры. Ув. 200; д—умеренная зернистая реакция фермента в нейронах коры и высокая активность в глияльных элементах и сосудах вены. Ув. 700; е—АЦ с высокой активностью в нейронах и миелиновых волокнах подкоркового узла. Ув. 700. Реакция на АЦ по Howell, Whitfield.

тивности ПГС. Обращало на себя внимание уменьшение коричневой окраски большинства адвентициальных клеток и гладкомышечных элементов стенок мелких артерий и артериол обоих полушарий головного мозга. Параллельно встречались клетки адвентиции с выраженной зернистостью их ядер. Фермент выявлялся в виде крупных полиморфных темно-коричневых зерен и глыбок, диффузно заполняющих ядерное вещество и цитоплазму. В клетках пирамидального слоя в связи с резким снижением содержания ПГС в цитоплазме и ядрах зернистость не обнаруживалась. Встречались клетки микроглии, в цитоплазме которых ПГС обнаруживалась в виде перинуклеарных или беспорядочно расположенных зерен, образующих иногда короткие цепочки. Такая морфологическая картина ферментохимических сдвигов в клеточных элементах после действия ИМ свидетельствует не только о торможении биосинтеза ПГ, но и о существенных изменениях в ферментной системе ПГС, которая, однако, является обратимой [6] (рис. 2).

В параллельных срезах при изучении активности АЦ в сосудах головного мозга и мозговых оболочках заметных сдвигов не было обнаружено. Изменения имели некоторый качественный характер лишь со стороны адвентициальных клеток, где АЦ определялась в виде крупных внутриядерных и цитоплазматических полиморфных и неодинаково окрашенных зерен. В клетках сосудистых сплетений борозд полушарий головного мозга и нейронах коры заметных изменений в активности АЦ не наблюдалось (рис. 3, д).

Приведенные данные о постоянно высоком содержании АЦ и низкой активности ПГС в клетках головного мозга при действии ИМ дают основание думать об активации АЦ в инкубационной среде, используемой для реакции. Что касается ПГС, то несмотря на обратимость подавления ее активности индометацином, в срезах наблюдалось длительное ингибирующее действие последнего. Полученные данные свидетельствуют об относительной устойчивости ферментной системы АЦ, осуществляющей синтез цАМФ. Выявленные гистохимические особенности АЦ в нейронах головного мозга и глиальных клетках указывают на сравнительную стабильность и её автономность при действии различных ингибиторов. Биологический смысл такого механизма, вероятно, состоит в сохранении постоянной исходной активности ферментной системы, обеспечивающей внутриклеточные метаболические процессы. Этим и обуславливается способность циклических нуклеотидов более или менее универсально трансформировать многочисленные качественно различные внешние воздействия в количественно ограниченные специфические клеточные ответы [4]. Не исключено, что это относится к адаптивным реакциям в условиях воздействия экстремальных факторов, протекающих при участии системы циклаза—циклические нуклеотиды [2, 3].

Таким образом, особенности локализации и активности ПГС и АЦ свидетельствуют о морфофункциональном единстве двух ферментных систем в процессе модуляции обменных и физиологических сдвигов в сосудах и клеточных элементах коры головного мозга, осуще-

ствляющих регуляцию внутриклеточного обмена в норме и при воздействии различных факторов.

Кафедры патологической анатомии и фармакологии
Ереванского медицинского института

Поступила 7/IX 1989 г.

Ն. Դ. Վարդապետյան, Է. Ա. Ամրոյան

ՊՐՈՍՏԱԳԼԱՆԴԻՆՍԻՆԹԵՏԱԶԻ ԵՎ ԱԴԵՆԻԼԱՏՑԻԿԼԱԶԻ ՀԻՍՏՈԹԵՄԻԱԿԱՆ ԲԵՌԹԱԳԻՐԸ
ՍՊԻՏԱԿ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԳԼԵՈԴԵՆԴԻ ԱՆՈԹԵՆԵՐՈՒՄ ԵՎ ՈՒՂԵՂԻ ԹԱՂԱՔՆԵՐՈՒՄ ՆՈՐՄԱՅՈՒՄ
ԵՎ ԻՆԴՈՄԵՏԱՑԻՆԻ ՆԵՐԱՐԿՄԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿ

Սպիտակ առնետների գլխուղեղի և ուղեղի թաղանթների հատվածներում հիստոքիմիական մեթոդներով ուսումնասիրվել է պրոստագլանդինսինթետազի (ՊԳ—Ս) և ադենիլատցիկլազի (ԱՅ) ակտիվությունը:

Դիտվել է երկու ֆերմենտների բարձր ակտիվություն նորմայում: մանր անոթներում, գլխայի բջիջներում, ինչպես նաև կեղևի նեյրոցիտներում:

Ինդոմետացինը ընկճում է ՊԳ—Ս-ի ակտիվությունը, իջեցնելով ռեակցիայի ինտենսիվությունը: Նա չի ազդում ԱՅ-ի ակտիվության վրա:

Ինդոմետացինի ազդեցության ժամանակ ԱՅ-ի մշտական բարձր քանակը ՊԳ—Ս-ի ցածր ակտիվության պայմաններում խոսում է ԱՅ-ֆերմենտային սիստեմի կայունության մասին, որը ապահովում է ՅԱՄՅ-ի սինթեզը:

N. D. Vartazaryan, E. A. Amroyan

Histochemical Characteristics of Prostaglandin Synthetase and Adenylatecyclase in the Cerebral Cortex and Vessels of Rats in Normal Conditions and After Indomethacine Injection

A histochemical study of prostaglandinsynthetase (PG—S) and adenylatecyclase (AC) in slices from cerebral hemispheres and meninges of the rat was carried out. The high activity of both enzymes in the microvessels, glial cells and neurocytes of cerebral cortex were determined in normal conditions. Indomethacine (IM) inhibited the activity of PG—S and depressed the intensity of reaction without influence on the AC. The permanent high level of AC parallel with a low activity of PG—S under IM influence testify to the relation stability of AC system in the synthesis of cAMP realization.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Булгарина Т. В., Васильев В. Ю., Северин Е. С. В кн.: Циклические нуклеотиды. М., 1979, с. 31.
2. Куреев М. М., Конвай В. Д., Корпачев В. Г. Вopr. мед. химии, 1980, 2, с. 158.
3. Наградова Н. К. Функциональная активность ферментов и пути ее регуляции. М., 1981, с. 124.
4. Хватова Е. М., Сидоркина А. Н., Миронова Г. В. В кн.: Нуклеотиды мозга, М., 1987, с. 179.
5. Danon A., Chang L. C., Sweetman B. J. et al. Biochem. et biophys. acta, 1975, 338, 1, 71.
6. Flower R. J., Vane J. R. Biochem. Pharmacol., 23, 10, 1439.
7. Hamberg M., Samuelsson B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, 70, 899.
8. Howell S. L., Whitfield M. J. Histochem. Cytochem., 1972, 20, 873.
9. Janszen F. H., Nugteren D. H. Advanc. Biosci., 1973, 9, 287.
10. Smith W. L., Gutekunst D. I., Lyons R. H. Prostaglandins, 1980, 19, 1, 61.