

О.В. Довгань, В.О. Майський, О.І. Пілявський, А.В. Мазниченко

НАДФН-діафоразореактивні нейрони та їх взаємозв'язок із мікросудинами в базальних лімбічних структурах переднього мозку і гіпоталамусі

С помощью НАДФН-диафоразной гистохимии изучали распределение и плотность реактивных нейронов в базальных лимбических структурах переднего мозга у интактных крыс. Реактивные нейроны были зарегистрированы в медиальном ядре перегородки (MS), ядрах диагональной полоски Брока (VDB, HDB), крупноклеточном преоптическом ядре (MCPO), безымянной субстанции (SI) и базальном ядре Мейнерта (B). Эти структуры входят в состав холинэргической системы (CH1–CH4) переднего мозга грызунов. Порядок плотности распределения меченых нейронов в различных регионах базального переднего мозга был следующий: HDB > VDB > MCPO > SI > B. Наибольшая плотность распределения реактивных нейронов была обнаружена в островках Калеха (ICj), (больше 1000 меченых нейронов на срез 200x200 мкм²). В супраоптическом (SO) и паравентрикулярном (Pa) ядрах гипоталамуса регистрировали более 130 и более 100 меченых клеток соответственно. Наименьшая плотность реактивных нейронов была зарегистрирована в SI–B-комплексе (менее 10 реактивных единиц). Обнаружено, что реактивные нейроны, их дендриты и аксоноподобные отростки в ICj, MCPO, ядрах SO, Pa и латеральном гипоталамическом ядре (HL) часто окружают артериолы, которые проходят через эти ядра. Значительное скопление гранулярных NO-генерирующих нейронов вблизи сосудов даёт возможность предположить, что действие сигнала NO может быть направлено главным образом на регуляцию тонуса сосудов, пронизывающих ICj и восходящих в вентральный паллидум, прилежащее ядро и боковую перегородку – важные лимбические структуры переднего мозга. Предполагается, что НАДФН-д-реактивные (NO-генерирующие) клетки, локализованные в ICj, преоптическом ядре и гипоталамусе, вовлекаются в регуляцию регионального кровотока, чтобы адаптировать уровень кровоснабжения к интенсивности нейронной активности в структурах основания переднего мозга.

ВСТУП

NO відіграє важливу роль у багатьох функціях мозку, включаючи регуляцію збудливості нейронів, синаптичної пластичності та нейросудинної взаємодії в корі великих півкуль людини і тварин [5, 38]. Впливаючи на процеси секреції нейромедіаторів і модуляторів (глутамату, γ -аміномасляної кислоти (ГАМК), серотоніну та дофаміну) у моторній корі, лімбічних структурах і гіпоталамусі NO є одним із центральних механізмів регуляції інтенсивності поси-

лення та гальмування нейронної активності [10, 11, 17]. Застосовуючи метод виявлення експресії *c-fos*, як маркера нейронної активації, нами було встановлено, що НАДФН-діафоразореактивні нейрони, які у великій кількості локалізовані в острівцях Калеха, гіпоталамусі та ядрах мигдалеподібного комплексу, активуються у тварин в умовах розвитку м'язового болю [1, 3, 21]. Дуже помітну експресію *c-fos* в НАДФН-діафоразореактивних нейронах було також виявлено в структурах головного мозку при стресі та розвитку мотиваційно-афективних

© О.В. Довгань, В.О. Майський, О.І. Пілявський, А.В. Мазниченко

і автономних реакцій у тварин [15]. Фізіологічні та імуногістохімічні дані свідчать про те, що центральні холінергічні шляхи беруть участь у регуляції регіонального кровообігу головного мозку [9, 23, 25, 26, 34, 39]. Слід зазначити, що велика частина джерел цих шляхів представлена NO-синтазовмісними (НАДФН-діафоразопозитивними) нейронами [20, 31]. Щільність розподілу NO-генеруючих нейронів у різних центрах головного мозку дуже відрізняється [19, 41]. Припускається, що взаємодія NO нейронального походження (а не лише ендотеліального) із судинами мозку може здійснюватися через відповідні анатомічні зв'язки. Однак детальне їх вивчення до цього часу ще не проводилося.

Мета нашого дослідження – вивчити розподіл і провести кількісний аналіз НАДФН-діафоразореактивних (NO-синтазовмісних) нейронів і виявити морфологічні ознаки тісних контактів між такими нейронами та мозковими мікросудинами в острівцях Калеха, базальних лімбічних структурах переднього мозку та гіпоталамусі у щурів.

МЕТОДИКА

У гістохімічних експериментах були використані щури-самці лінії Вістар масою 250–300 г (n=8). Усі експериментальні маніпуляції з тваринами та їх утримання виконували згідно з Європейською директивою Ради Громад від 24 листопада 1986 р. (86/609 ЕЕС).

Перфузія. Щурів під глибоким наркозом за допомогою введення пентобарбіталу натрію, внутрішньоочеревинно (90 мг/кг, «Sigma», США) перфузували інтракардіально через висхідну аорту спочатку сольовим фосфатним буфером (СФБ), який містив 0,2 % нітриту натрію та 25000 од/л гепарину. Потім перфузію продовжували 4%-м параформальдегідом, розчиненим у 0,1 моль/л ФБ (рН 7,3). П'ятиміліметрові блоки голов-

ного мозку додатково фіксували (12 год), а потім з метою кріопротекції витримували 48 год при 4° С у 30%-му розчині сахарози, який готувався на ФБ. На заморожувальному мікромомі виготовляли зрізи мозку (40 мкм завтовшки) кожної тварини приблизно на рівнях від +3 мм до –3 мм від брегми за атласом [32]. Зрізи збирали у лунки з СФБ (понад 100) і потім використовували для гістохімічного фарбування.

НАДФН-діафоразна гістохімія. Для виявлення позитивних НАДФН-д(+)-нейронів зрізи мозку витримували 1 год при 37° С у 0,1 моль/л ФБ (рН 7,3), який містив 0,3 % детергенту Triton X-100, 0,2 мг/мл нітроблакитного тетразолію та 0,5 мг/мл редукованого β-НАДФН («Sigma», США). [41]. Для підсилення інтенсивності фарбування нейронів і відростків (дендритів та аксонів) зрізи додатково витримували у цьому розчині ще 12 год при кімнатній температурі, а в розчин додавали 1,2 мг/мл динатрієвої солі молочної кислоти («Sigma», США). НАДФН-д(+)-нейрони ідентифікували в оптичному мікроскопі (X40; X250; X650) у зрізах мозку за блакитним забарвленням їх цитоплазми та відростків.

Статистика. Кількість НАДФН-д(+)-нейронів та їх щільність (кількість одиниць на площі зрізу мозку 200x200 мкм²) підраховували в острівцях Калеха (ICj), великих острівцях Калеха (ICjM), лімбічних структурах переднього мозку (базальному ядрі Мейнерта (B), локалізованому у блідій кулі (GP) і внутрішній капсулі (ic), ядрі горизонтальної гілки діагональної смужки (HDB), великоклітинному преоптичному ядрі (MCPO), ядрі медіальної перегородки (MS), безіменній субстанції (SI), ядрі вертикальної гілки діагональної смужки (VDB), а також в центральному ядрі мигдалеподібного комплексу, медіальній його частині (CeM), опорному ядрі термінального тяжа (BST), вентральному блідому ядрі (VP) та ядрах гіпоталамуса (латеральному ядрі – LH, паравентрикулярному – Pa,

пришлуночковому – Ре, супраоптичному – SO і вентромедіальному, вентролатеральній його частині – VMHVL). Щільність позитивних нейронів підраховували білатерально на різних рівнях від брегми за атласом [32]. Щоб отримати середню кількість \pm стандартна похибка середнього НАДФН-д(+) нейронів на одиницю площі в окремих структурах, використовували 2–3 зафарбовані зрізи на окремих досліджуваних рівнях переднього мозку кожної тварини. Порівнювали середні щільності пофарбованих клітин в острівцях Калеха, лімбічних структурах і в ядрах гіпоталамуса на різних рівнях методом однопараметричного статистичного дисперсійного аналізу (ANOVA). Різниця вважалася достовірною при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ

НАДФН-діафоразна реактивність у лімбічних структурах. НАДФН-д(+) нейрони в структурах переднього мозку складають невелику частку в гетерогенних ядрах, які включають велику кількість нейронів другого фенотипу. Більшість фарбованих нейронів реєструвалася в базальних лімбічних структурах переднього мозку, які включають відомі чотири групи холінергічних нейронів – джерел висхідних проєкцій до гіпокампа (CH1, CH2), нюхової цибулини (CH3) та кори півкуль (CH4) у щура. До таких структур відносяться ядра медіальної перегородки, вертикальної та горизонтальної гілок. Безіменна субстанція і базальне ядро Мейнерта (CH4) є основними центрами холінергічних проєкцій на кору мозку [26]. Зазначені ядра зверху межують із стріатними ядрами, острівцями Калеха і мигдалеподібним комплексом (рис. 1,а). В ядрі медіальної перегородки виявлено значну кількість НАДФН-д(+)-нейронів, які були слабо фарбовані та найменші за діаметром серед усіх реактивних нейронів у лімбічних структурах. Однак у цьому ядрі

реєструвалися також поодинокі мультиполярні нейрони великого діаметра (20–25 мкм) з інтенсивним фарбуванням як соми, так і дендритів. Такі нейрони знайдені також у ядрах вертикальної та горизонтальної гілок, у великоклітинному преоптичному ядрі (на рівні -0,26 мм від брегми) та безіменній субстанції (див. рис. 1,б-е). Найбільші мультиполярні (діаметром понад 25 мкм) та інтенсивно зафарбовані нейрони зареєстровано у вентральних частинах білої кулі, внутрішньої капсули та базальному ядрі Мейнерта (В) (див. рис. 1,є).

НАДФН-діафоразна реактивність в острівцях Калеха та сусідніх структурах. Великий острівець (ICjM; див. рис. 1,а) та інші острівці Калеха (див. рис. 2,б-г) легко ідентифікувались у зрізах мозку в діагональній смужці та нюховому горбку завдяки щільним скупченням зафарбованих у блакитний колір дуже маленьких у діаметрі (менше ніж 7 мкм) гранулярних нейронів. Ці NO-генеруючі нейрони вже описані раніше у зрізах мозку на фронтальних рівнях від +2,7 до -0,4 мм від брегми [3, 27]. Слід зазначити, що 2–3 острівці Калеха із загальної кількості 6–7 в окремих зрізах мозку часто розташовувалися поблизу вентральної поверхні мозку або контактували з м'якою його оболонкою (рис. 2,б,в). Острівці оточують великі та інтенсивно зафарбовані мультиполярні нейрони діаметром 20–25 мкм. Деякі з таких нейронів або їх відростки спостерігаються у межах самих острівців (див. рис. 2,б-г).

Щільність розподілу НАДФН-д(+)-нейронів в острівцях Калеха була дуже високою (див. рис. 1,а, 2,а). Найбільшою вона була на фронтальному рівні +2,2 мм від брегми, а найменшою – на рівні -0,4 мм. Щільність реактивних нейронів у межах великого острівця Калеха була (410 ± 95) клітин на площі 200×200 мкм² (унілатерально) в окремому зрізі на рівнях від +1,2 до +0,7 мм від брегми (див. рис. 2,а). У сусідніх базальних структурах переднього

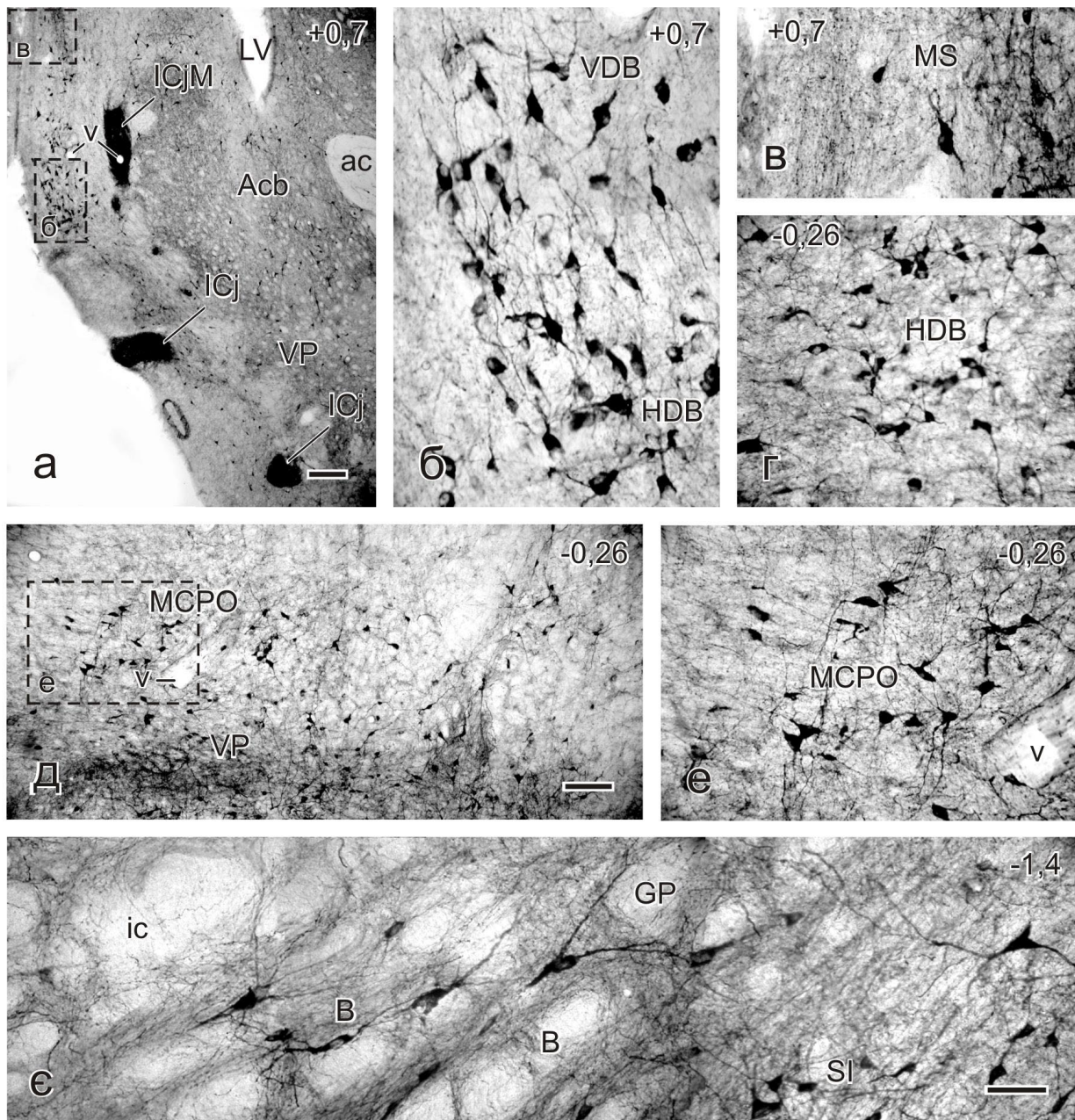


Рис. 1. НАДФН-діафоразореактивні нейрони у базальних структурах переднього мозку (праворуч) на різних фронтальних рівнях від +0,7 до -1,4 мм від брегми (а–є) у щура. Ділянки локалізації фарбованих нейронів, які позначені пунктирними лініями на а і д, представлені при великому збільшенні на б, в і е. Відмічається велике скупчення гранулярних позитивних нейронів, які відтворюють суцільно пофарбовані зони у вентральних регіонах переднього мозку; демонструється мікросудина (v) на а. Структури: ac – передня комісура; Acb – прилегле ядро; B – базальне ядро (Мейнерта); GP – біла куля; HDB – ядро горизонтальної гілки діагональної смужки; ICj – острівець Калеха; ic – внутрішня капсула; ICjM – великий острівець Калеха; LV – боковий шлуночок; MCPO – великоклітинне преоптичне ядро; MS – медіальна перегородка; SI – безіменна субстанція; v – мікросудина; VDB – ядро вертикальної гілки діагональної смужки; VP – вентральний палідум. Скорочення назв структур наведено за атласом [32]. Масштабна лінія на а – 200 мкм, д – 100 мкм, б-г, е, є – 50 мкм

мозку виявлено дуже малу щільність реактивних нейронів. У прилеглому ядрі, латеральній перегородці та вентральному палідумі (див. рис. 1,а) цей показник становив менше ніж 5 одиниць на вибрану стандартну площу зрізу.

Кількісний аналіз щільності розподілу

реактивних нейронів у лімбічних структурах і гіпоталамусі. Велика щільність розподілу НАДФН-д(+)-нейронів була виявлена у лімбічних структурах на каудальних рівнях переднього мозку (від -1,3 до -2,12 мм від брегми). Так, середні значення щільності розподілу NO-генеруючих нейронів у

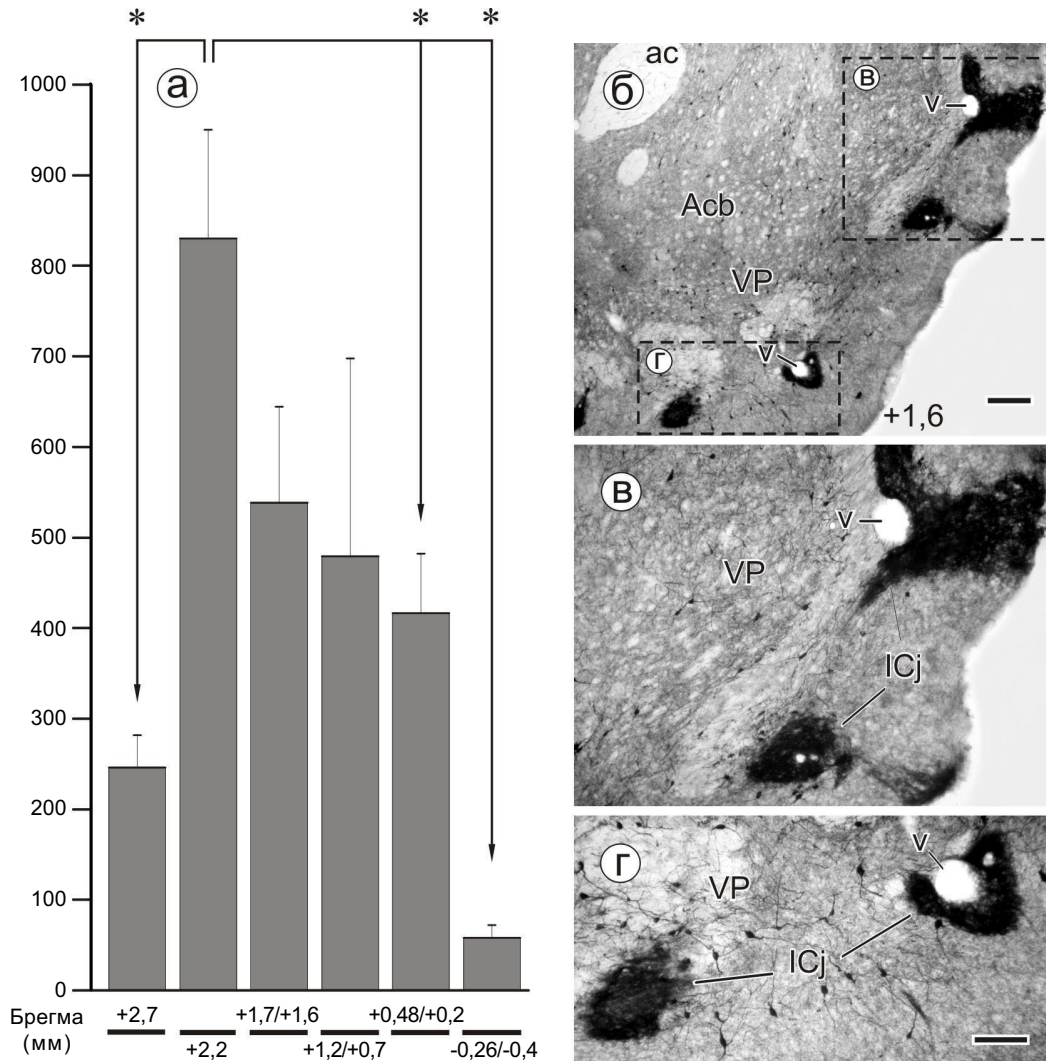


Рис. 2. Розподіл середньої щільності НАДФН-діафоразореактивних нейронів в острівцях Калеха (а) на різних фронтальних рівнях мозку (від +2,7 до -0,4 мм від брегми) та приклади нейросудинних асоціацій. За вісю ординат наведено середню щільність нейронів ± похибка в зрізі (40 мкм) на одному боці мозку (див. Статистику). Відмічається близьке розташування острівців Калеха (ICj) біля м'якої оболонки мозку, а вентральний палідум (VP) відділяє острівці від прилеглого ядра (Acb) та передньої комісури (ac). Зони великого скупчення НАДФН-діафоразопозитивних нейронів, які позначені пунктирними лініями на б, показано при великому збільшенні на в і г. Велике скупчення гранулярних мічених нейронів відтворює суцільно зафарбовану зону навколо судин (v), що демонструється на б. *P<0,05 – достовірність різниці у середній щільності розподілу реактивних нейронів в острівцях між різними фронтальними рівнями мозку. Масштабна лінія на б – 200 мкм, в, г – 100 мкм

супраоптичному та паравентрикулярному ядрах гіпоталамуса перевищували 120 одиниць, а в межах пришлуночкового ядра – близько 80 одиниць, але у межах вентро-медіального гіпоталамічного ядра вона знижувалася до 60 одиниць (рис. 3, 4). Щільність мічених нейронів у медіальній перегородці, гілках діагональної смужки була також достатньо високою (понад 15 одиниць) лише на ростральних і середніх рівнях (від +0,48 до -1,3 мм від брегми). Однак відмічалися дуже низькі середні значення цього показника на всіх рівнях у межах безіменної субстанції (SI), базального ядра Мейнерта (B(ic), B(GP)), латеральної гіпоталамічної ділянки (LH), а також у межах центрального медіального під'ядра

мигдалеподібного комплексу та опорного ядра термінального тяжа (BST) (близько 5 одиниць; див. рис. 3, 5). Відмічені нейрони анатомічно та функціонально пов'язані між собою і можуть представляти частку висіяних із безіменної субстанції мультиполярних нейронів – джерел прямих проєкцій у моторну кору [26, 30].

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Це є перше гістохімічне дослідження, де зроблено спробу кількісно оцінити щільність НАДФН-д(+)-нейронів у лімбічних структурах переднього мозку, а також гіпоталамічних ядрах; та показати можливий зв'язок цих нейронів з мікросудинами мозку.

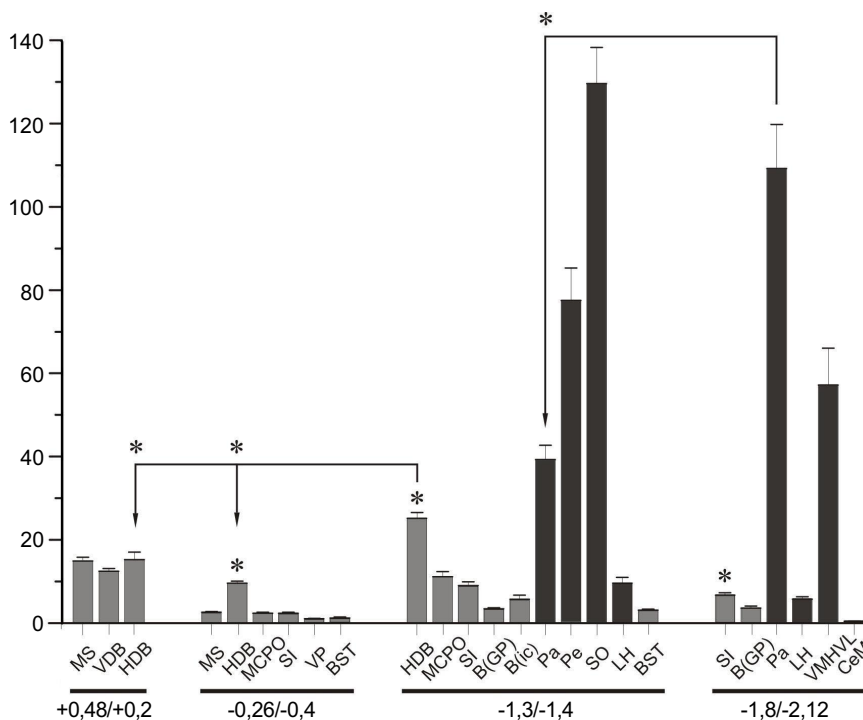


Рис. 3 Розподіл середньої щільності НАДФН-діафоразореактивних нейронів в окремих лімбічних структурах переднього мозку та гіпоталамусі на різних фронтальних рівнях (від +0,48 до -2,12 мм). Структури: BST – опорне ядро термінального тяжа; CeM – центральне медіальне під'ядро мигдалеподібного комплексу; LH – латеральна гіпоталамічна ділянка; Pa – паравентрикулярне ядро гіпоталамуса; Pe – пришлуночкове ядро гіпоталамуса; SO – супраоптичне ядро гіпоталамуса; VMHVL – вентро-медіальне ядро гіпоталамуса (вентролатеральна частина). Зірочки над стрілочками вказують достовірність різниці у середній щільності розподілу реактивних нейронів в однакових структурах на різних фронтальних рівнях мозку ($P < 0,05$). Зірочки над колонками вказують достовірність різниці у середній щільності розподілу реактивних нейронів між різними базальними лімбічними структурами на одному фронтальному рівні ($P < 0,05$). Інші позначення див. рис. 1

Установлено, що NO є короткоживучий (близько 500 мс) газ, який утворюється із амінокислоти L-аргініну в нейронах мозку за участю ферменту нейронної NO-синтази (NOS) та кофакторів НАДФН-д і Ca^{+2} [18]. У нашій роботі патерни розподілу НАДФН-д(+)-нейронів у базальних лімбічних структурах переднього мозку збігаються з уже описаними раніше даними з локалізації таких нейронів у мозку [1, 15, 41]. Ці результати свідчать, що лімбічні структури переднього мозку (медіальна перегородка (MS), ядра вертикальної та горизонтальної гілки діагональної смужки (VDB, HDB), великоклітинне преоптичне ядро (MCPO)) та особливо острівці Калеха (ICj, ICjM) і ядра гіпоталамуса (Pa, Pe, SO, LH) включають велику кількість реактивних нейронів (див. рис. 2, 3). Однак щільність NO-генеруючих нейронів у базальних лімбічних структурах мозку невелика. Генеруючий

цими нейронами вільно-радикальний газовий (об'ємний) нейропередатчик NO, з одного боку, може стимулювати виділення класичних медіаторів (глутамату та ГАМК), а з іншого – виділення модуляторних медіаторів (дофаміну, ацетилхоліну та серотоніну).

Гіпоталамус. Раніше вже підкреслювалася важлива роль сигналу NO в ядрах гіпоталамуса при регуляції нейроендокринних та автономних функцій організму або при стресі, тривозі та розвитку м'язового болю [1, 10, 14, 17, 22]. Відомо, що багато медіаторів і специфічних до них рецепторів залучаються до модуляції передачі ноцицептивних сигналів у дорсальному розі спинного мозку, причому основними медіаторами виступають серотонін, вазопресин та окситоцин. Ключову роль у цих механізмах модуляції болю відіграють низхідні прямі шляхи від паравентрикулярного ядра

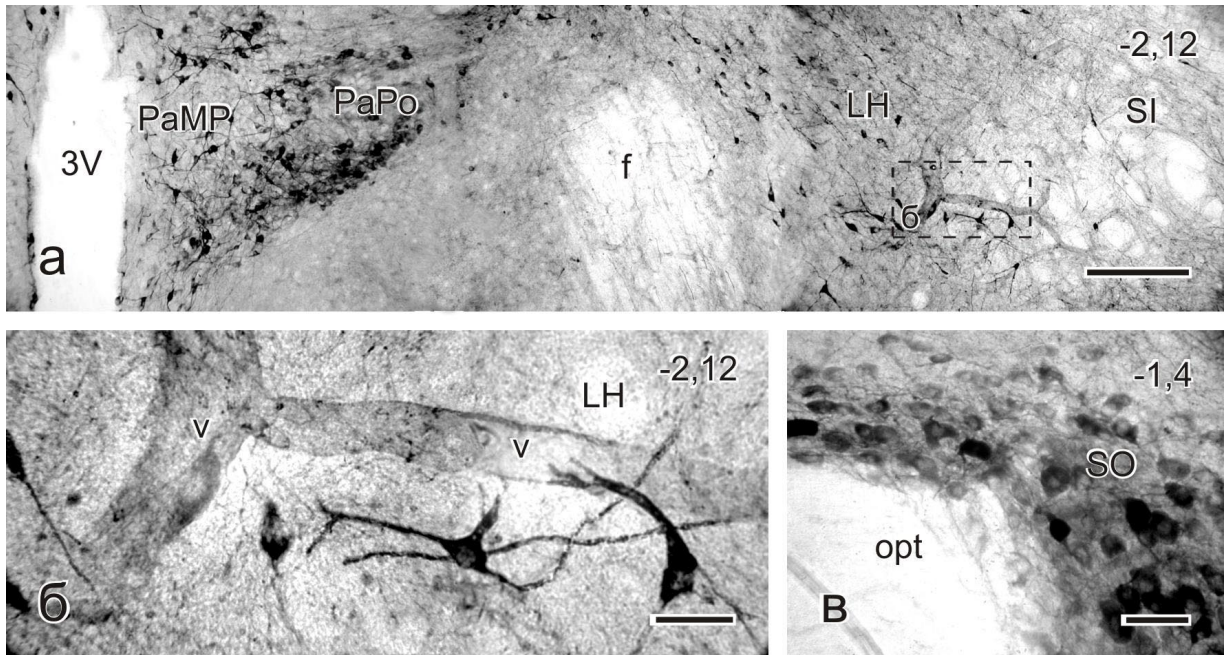


Рис. 4. НАДФН-діафоразна реактивність та структурне об'єднання NO-генеруючих нейронів з мікросудинами в гіпоталамусі. Відмічаються прямі контакти реактивних нейронів з мікросудинами (v) в латеральній гіпоталамічній ділянці (LH), позначеній пунктирними лініями на а та представлені при великому збільшенні на б. Спостерігається велика щільність реактивних нейронів у медіальному (PaMP) і задньому (PaPo) під'ядрах паравентрикулярного ядра гіпоталамуса. Структури: f – склепіння; opt – оптичний тракт; SI – безіменна субстанція; SO – супраоптичне ядро. Масштабна лінія на а – 200 мкм, б – 25 мкм, в – 50 мкм

гіпоталамуса до спинного мозку [1, 16, 28]. Активація нейронів різноманітними аферентами висхідних і низхідних шляхів в цих структурах мозку добре скоординована в часі, що забезпечує реалізацію поточних моторних реакцій та умовних рефлексів [10, 15, 35]. Велика кількість NO-генеруючих нейронів у паравентрикулярному ядрі та латеральному гіпоталамусі (Pa, LH), медіальному мигдалеподібному комплексі і центральній сірій речовині вказує на те, що NO може відігравати важливу роль у мотиваційно-афективних, захисних та інших поведінкових реакціях, які супроводжуються автономними та гормонально-залежними реакціями. Слід зазначити, що прямі контакти тіл реактивних нейронів, їх дендритів і аксоноподібних дуже тонких варикозних паростків з мікросудинами

діаметром 25–70 мкм реєструвалися тільки в паравентрикулярному та латеральному ядрах гіпоталамуса (Pa, LH; див. рис. 4,а,б). Такі прямі нейросудинні контакти можуть забезпечувати ефективну регуляцію регіонального кровообігу в окремих ділянках медіального та латерального гіпоталамуса при активації NO-генеруючих нейронів.

Острівці Калеха. Відомо, що ці утворення в базальній частині переднього мозку включають значну популяцію ГАМКергічних/ NO-синтазовмісних нейронів [3, 12, 41], які проявляють виражену активність (експресію *c-fos*) при появі ноцицептивних подразнень або вираженої харчової та статеві поведінки [1, 6]. Необхідно відмітити, що на відміну від сусідніх з ними структур переднього мозку (перегородки, безіменної субстанції, вентрального палідума), майже

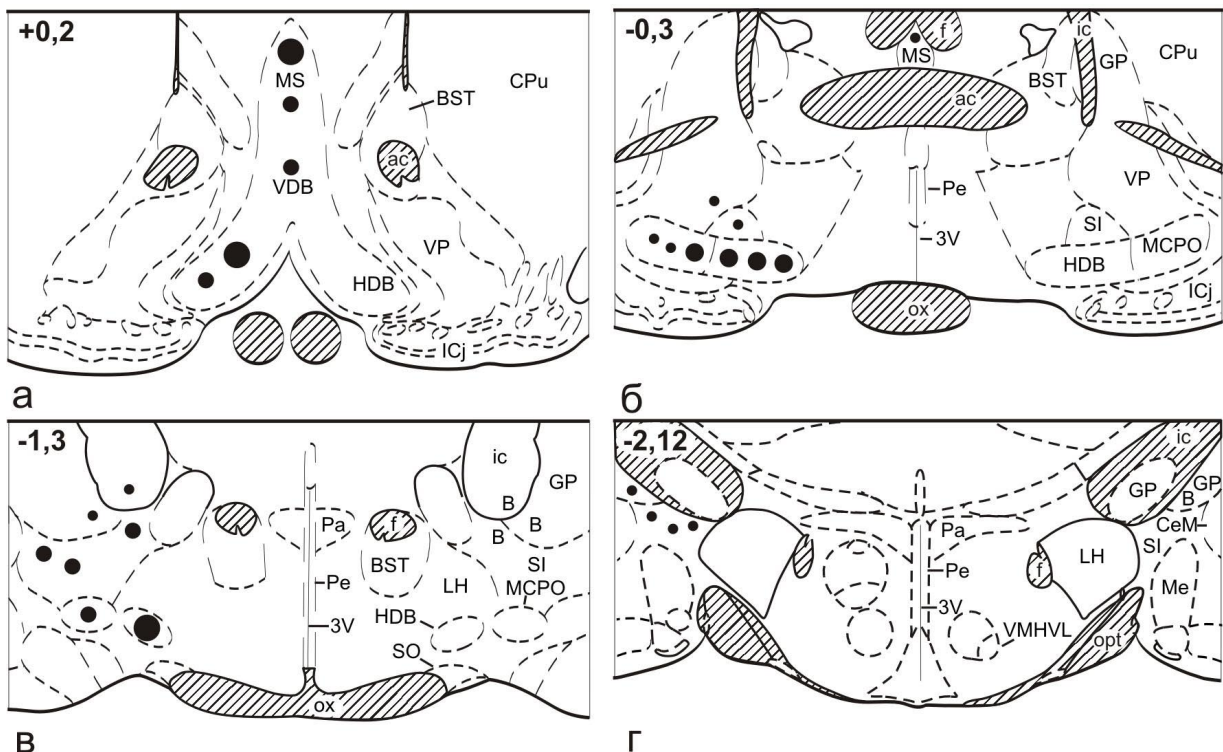


Рис. 5. Схематичне відображення фронтальних зрізів гіпоталамічних і лімбічних структур переднього мозку на рівнях від +0,2 до -2,12 і показники середньої щільності розподілу в них НАДФН-діафоразореактивних нейронів (малі чорні крапки – 3–7, середні – 8–15, великі – понад 15 одиниць на площі 200 x 200 мкм² у зрізі). Структури: CeM – центральне медіальне під'ядро мигдалеподібного комплексу; CPu – хвостате ядро; f – склепіння; Me – медіальне ядро мигдалика; opt – оптичний тракт; ox – зоровий перехрест; 3V – третій шлуночок. Інші позначення див. рис. 1, 4

всі нейрони острівців Калеха є НАДФН-д(+)-клітинами, тобто такими, що генерують потужний сигнал NO [27]. Такі фенотипові особливості нейронів вентральних і медіальних (великих) острівців Калеха, а також судинно-розширювальні властивості газових молекул NO можуть свідчити про очевидну участь цих базальних структур переднього мозку в механізмах трансформації нейронного сигналу в вивільнення NO та наступну судинну відповідь. Таким чином, створюється дуже тонке співвідношення інтенсивності нейронної активності в острівцях Калеха та швидкості кровотоку в базальних лімбічних структурах переднього мозку. Відсутність холінергічних нейронів в острівцях Калеха [36] посилює роль активації NO-вмісних гальмівних нейронів в регуляції тону судин, які проходять через ці структури, прямуючи від м'якої оболонки мозку (див. рис. 2). Значне скупчення гранулярних NO-генеруючих нейронів поблизу судин дає змогу зробити припущення, що сигнал NO, можливо направлений, головним чином, на регуляцію тону судин, мішенями яких є вентральний палідум, прилегле ядро та бокова перегородка – важливі лімбічні структури переднього мозку.

Слід зазначити, що аксони та паростки нейронів острівців Калеха розгалужуються в межах самих цих острівців, а об'ємний газовий сигнал NO має обмежене поширення у тканині мозку і короткий час життя самої молекули [7]. Тому NO – цГМФ-сигналізація в базальних лімбічних структурах переднього мозку і пряма дія NO на артеріоли при короткій фазовій активації різноманітних аферентів острівців Калеха, головним чином аферентів модулюючих мозкових нейронних систем, може продовжуватися дуже обмежений час (сотні мілісекунд). Можливо припустити, що генерація NO в острівцях Калеха та зміна тону регіональних судин забезпечує узгодження інтенсивності реакцій нейронів і кровоза-

безпечення у лімбічних структурах переднього мозку в період надходження в ЦНС важливих сигналів для підготовки та виконання рухів, статевої, харчової поведінки або появи ноцицептивних подразників [1, 2].

Холінергічні проєкції в кору та їх роль у кортикальній пластичності. Кортикальна паренхіма мозку приматів і гризунів, як відомо, отримує широку холінергічну іннервацію [9, 25, 26]. Головними джерелами якої є безіменна субстанція та базальне ядро (SI, B), до складу яких входять NO-генеруючі мультиполярні нейрони (див. рис. 1, е, 5). Характерно, що в самій корі холінергічні нейрони не були знайдені [24]. Холінергічні нейрони цих підкіркових центрів задіяні у багатьох аспектах фізіологічної регуляції та поведінки, включаючи сенсорні та моторні процеси, пам'ять і увагу. Необхідно відзначити, що ядро Мейнерта як інтеграційний центр «лімбічних сигналів» є також модульним розподільником аферентних посилок до різних ділянок кори головного мозку. Топічну організацію цих кіркових проєкцій можна характеризувати швидше як екстенсивну, ніж дифузну [30]. Детально вивчені і молекулярні механізми полегшення глутаматних входів після стимуляції холінергічних рецепторів і короточасної та довготривалої модифікації синаптичних зв'язків у кіркових нейронних мережах [9, 33]. Слід також відмітити, що найбільшу частку складають ГАМК- та глутаматергічні нейрони, які є джерелами кіркових проєкцій. Тільки мала частка (приблизно 5 %) нейронів у передньому мозку синтезує ацетилхолін [8]. В останні роки встановлено, що NOS-вмісні нейрони базальних лімбічних структур, в першу чергу є джерелами прямих проєкцій до мікросудин та NOS-вмісних нейронів неокортекса [38]. В корі ГАМКергічні (не NOS-вмісні) нейрони базального переднього мозку також утворюють прямі проєкції до мікросудин і NOS-вмісних нейронів. Такий холін- та ГАМКергічний анатомічний субстрат і забезпечує

пряму локальну регуляцію кровотоку в мікросудинах і артеріолах кори головного мозку [5, 40]. Порушення в механізмах холінергічної іннервації кортикальних мікросудин, артеріол і NOS-вмісних нейронів є головними чинниками розвитку хвороби Альцгеймера у людини [37].

В останні роки велику увагу привертає вивчення нейропротекторної дії нейростероїдів вітаміну D₃ у мозку [4]. Встановлено, що ядерні рецептори до вітаміну локалізуються в нейронах, які реєструються виключно в медіальному ядрі перегородки, ядрах діагональної смужки, опорному ядрі термінального тяжа і SI – B комплексі [29], тобто збігаються з холінергічними базальними структурами (CH1–CH4) переднього мозку [26]. Нещодавно встановлено важливу роль сигналу NO в гальмуванні експресії гена *zinc finger*, який бере участь у формуванні білка ядерних рецепторів до вітаміну D₃ [13]. Такі дані свідчать про те, що холінергічні нейрони окрім NO-генеруючої функції можуть також отримувати сигнали про стан кальцієвого гомеостазу та включати відповідні системи для його модуляції.

Таким чином, проведений гістохімічний аналіз показав, що серед структур переднього мозку острівці Калеха та ядра гіпоталамуса вміщують велику кількість NO-генеруючих нейронів, які розташовуються поблизу мозкових артеріол і, таким чином, можуть бути задіяні в формуванні адаптивних нейросудинних реакцій.

Роботу виконано за підтримки гранту „Молекулярні основи функціонування генному (2007)” НАН України

O.V. Dovgan', V.O. Maisky, O.I. Pilyavskii, A.V. Maznychenko

INVESTIGATION OF NADPH-DIAPHORASE-REACTIVITY AND NEUROVASCULAR COUPLING IN THE BASAL FOREBRAIN LIMBIC STRUCTURES AND HYPOTHALAMUS

NADPH-diaphorase histochemistry was used to study the

distribution and density of labeled neurons in the limbic structures and hypothalamus in intact rat. NADPH-diaphorase positive neurons were registered in the basal forebrain–medial septal nucleus (MS), the nuclei of the diagonal band of Broca (VDB, HDB), substantia innominata (SI) and the nucleus basalis of Meynert (B). These areas largely overlap with the cholinergic CH1–CH4 forebrain system of the rodent brain. The order of density of labeled neurons in different regions of the basal forebrain was as following sequence: HDB > VDB > SI > B. The highest densities of the reactive neurons (>1000 labeled neurons per section 200x200 μm²) was found in the islands of Calleja (ICjs). In the supraoptic (SO) and paraventricular (Pa) nuclei of hypothalamus were recorded > 130 and > 100 labeled units, respectively. The lowest density of labeled neurons was recorded within the SI–B complex: < 10 reactive units. Reactive neurons, their dendrites and axon-like processes within the ICjs, SO, Pa, the lateral nucleus hypothalamus (LH) often surround arterioles which traverse the structures. We suggest that NADPH-diaphorase-reactive (NO-generating) neurons within the ICjs and hypothalamus are involved in regulation of the regional blood flow (RBF) that is important to adapt the blood flow to changes in neuronal activity of the basal forebrain structures.

*M.I. Pirogov National Medical University, Vinnytsia
O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Власенко О.В., Майський В.О., Мазниченко А.В. та ін. Дослідження експресії *c-fos* і НАДФН-діафоразної активності у спинному та головному мозку при розвитку стомлення м'язів ший у щурів // Фізіол. журн. – 2006. – 52, №6. – С. 3–14.
2. Власенко О.В., Мороз В.М., Йолтухівський М.В. та ін. Активність нейронів кори та підкіркових структур мозку при підготовці та виконанні рухів // Там само. – 2006. – 52, №2. – С. 27.
3. Пилявский А.И., Власенко О.В., Мазниченко А.В., Майский В.А. Экспрессия *c-fos* в островках Калеха и соседних ядрах основания головного мозга после усталостной стимуляции дорсальных мышц шеи у крыс // Нейронауки. – 2007. – 2. – С. 9–15.
4. Carswell S. Vitamin D in the nervous system: action and therapeutic potential. – In: Feldman D., Glorieux F.H., Pike J.W., Eds. Vitamin D. – San Diego: Acad. Press, 1997. – P. 1197–1211.
5. Cauli B., Tong X.K., Rancillac A. et al. Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: relays for subcortical vasoactive pathways // J. Neurosci. – 2004. – 24. – P. 8940–8949.
6. Colom L.V. Septal networks: relevance to theta rhythm, epilepsy and Alzheimer's disease // J. Neurochem. – 2006. – 96. – P. 609–623.
7. Garthwaite J. Dynamics of cellular NO-cGMP signal-

- ing // *Front. Biosci.* – 2005. – **10**. – P. 1868–1880.
8. Gritti I., Henny P., Galloni F. et al. Stereological estimates of the basal forebrain cell population in the rat, including neurons containing choline acetyltransferase, glutamic acid decarboxylase or phosphate-activated glutaminase and colocalizing vesicular glutamate transporters // *Neuroscience.* – 2006. – **143**. – P. 1051–1064.
 9. Gu Q. Neuromodulatory transmitter systems in the cortex and their role in cortical plasticity // *Ibid.* – 2002. – **111**. – P. 815–835.
 10. Guimarrès F.S., Beijamini V., Moreira F.A. et al. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2005. – **29**. – P. 1313–1322.
 11. Kadekaro M. Nitric oxide modulation of the hypothalamo-neurohypophyseal system // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2004. – **37**. – P. 441–450.
 12. Kohler C., Chan-Palay V. Distribution of gamma aminobutyric acid containing neurons and terminals in the septal area. An immunohistochemical study using antibodies to glutamic acid decarboxylase in the rat brain // *Anat. Embryol. (Berlin).* – 1983. – **167**. – P. 53–65.
 13. Kroncke K.D., Klotz L.O., Suschek C.V., Sies H. Comparing nitrosative *versus* oxidative stress toward *zinc finger*-dependent transcription. Unique role for NO // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**. – P. 13294–13301.
 14. Krukoff T.L. Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions // *Brain Res. Rev.* – 1999. – **30**. – P. 52–65.
 15. Krukoff T.L., Khalili P. Stress-induced activation of nitric oxide-producing neurons in the rat brain // *J. Comp. Neurol.* – 1997. – **377**. – P. 509–519.
 16. Kuypers H.G., Maisky V.A. Retrograde axonal transport of horseradish peroxidase from spinal cord to brain stem cell groups in the cat // *Neurosci. Lett.* – 1975. – **1**. – P. 9–14.
 17. Li D.P., Chen S.R., Pan H.L. Nitric oxide inhibits spinally projecting paraventricular neurons through potentiation of presynaptic GABA release // *J. Neurophysiol.* – 2002. – **88**. – P. 2664–2674.
 18. Lohse M.J., Forstermann U., Schmidt H.H. Pharmacology of NO: cGMP signal transduction // *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* – 1998. – **58**. – P. 111–112.
 19. Maisky V.A., Datsenko V.V., Moibenko A.A. et al. NO-generating neurons in the medullary cardiovascular centers of rodents and carnivores // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2003. – **136**. – P. 605–612.
 20. Marino J., Cudeiro J. How does the brain wake up? The nitric oxide blow // *Rev. Neurol.* – 2006. – **42**. – P. 535–541.
 21. Maznychenko A.V., Pilyavskii A.I., Kostyukov A.I. et al. Coupling of *c-fos* expression in the spinal cord and amygdala induced by dorsal neck muscles fatigue // *Histochem. Cell Biol.* – 2007. – **128**. – P. 85–90.
 22. Maznychenko A.V., Pilyavskii A.I., Vlasenko O.V., Maisky V.A. Fatigue of the dorsal neck muscles initiates *c-fos* expression in the rat spinal cord and hypothalamus // *Нейрофизиология/Neurophysiology.* – 2006. – **38**. – P. 354–357.
 23. Mesulam M.-M., Geula C. Nucleus basalis (Ch4) and cortical cholinergic innervation in the human brain: observations based on the distribution of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase // *J. Comp. Neurol.* – 1988. – **275**. – P. 216–240.
 24. Mesulam M.-M., Hersh L.B., Mash D.C., Geula C. Differential cholinergic innervation within functional subdivisions of the human cerebral cortex: a choline acetyltransferase study // *Ibid.* – 1992. – **318**. – P. 316–328.
 25. Mesulam M.-M., Mufson E.J., Levey A.I., Wainer B.H. Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey // *Ibid.* – 1983. – **214**. – P. 170–197.
 26. Mesulam M.-M., Mufson E.J., Wainer B.H., Levey A.I. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1–Ch6) // *Neuroscience.* – 1983. – **10**. – P. 1185–1201.
 27. Meyer G., Gonzalez-Hernandez T., Galindo-Mireles D. et al. NADPH-d activity in the islands of Calleja: a regulatory system of blood flow to the ventral striatum/pallidum? // *Neuroreport.* – 1994. – **5**. – P. 1281–1284.
 28. Millan M.J. Descending control of pain // *Prog. Neurobiol.* – 2002. – **66**. – P. 355–474.
 29. Musiol I.M., Stumpf W.E., Bidmon H.J. et al. Vitamin D nuclear binding to neurons of the septal, substriatal and amygdaloid area in the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*) brain // *Neuroscience.* – 1992. – **48**. – P. 841–848.
 30. Oleshko N.N., Maisky V.A. Topographical organization of the sources of discrete cortical projections within the striatum as determined by a retrograde fluorescence tracing technique in the cat // *Ibid.* – 1993. – **57**. – P. 683–695.
 31. Pasqualotto B.A., Vincent S.R. Galanin and NADPH-diaphorase coexistence in cholinergic neurons of the rat basal forebrain // *Brain Res.* – 1991. – **551**. – P. 78–86.
 32. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* – San Diego: Acad. Press, 1997.
 33. Sanes J.N., Donoghue J.P. Plasticity and primary motor cortex // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2000. – **23**. – P. 393–415.
 34. Sato A., Sato Y. Regulation of regional cerebral blood flow by cholinergic fibers originating in the basal forebrain // *Neurosci. Res.* – 1992. – **14**. – P. 242–274.
 35. Sawchenko P.E., Swanson L.W. The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat // *J. Comp. Neurol.* – 1983. – **218**. – P. 121–144.
 36. Sugaya K., McKinney M. Nitric oxide synthase gene expression in cholinergic neurons in the rat brain examined by combined immunocytochemistry and *in situ* hybridization histochemistry // *Brain Res. Mol. Brain Res.* – 1994. – **23**. – P. 111–125.
 37. Tong X.K., Hamel E. Regional cholinergic denervation of cortical microvessels and nitric oxide synthase-containing neurons in Alzheimer's disease // *Neuroscience.*

- 1999. – **92**. – P. 163–175.
38. Tong X.K., Hamel E. Basal forebrain nitric oxide synthase (NOS)-containing neurons project to microvessels and NOS neurons in the rat neocortex: cellular basis for cortical blood flow regulation // *Eur. J. Neurosci.* – 2000. – **12**. – P. 2769–2780.
39. Vaucher E., Hamel E. Cholinergic basal forebrain neurons project to cortical microvessels in the rat: electron microscopic study with anterogradely transported *Phaseolus vulgaris leucoagglutinin* and choline acetyltransferase immunocytochemistry // *J. Neurosci.* – 1995. – **15**. – P. 7427–7441.
40. Vaucher E., Tong X.K., Cholet N. et al. GABA neurons provide a rich input to microvessels but not nitric oxide neurons in the rat cerebral cortex: a means for direct regulation of local cerebral blood flow // *J. Comp. Neurol.* – 2000. – **421**. – 161–171.
41. Vincent S.R., Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain // *Neuroscience.* – 1992. – **46**. – P. 755–784.

*Він. нац. мед. ун-т ім. М.І. Пирогова;
Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 05.06.2007*