

Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet
Zavod za anatomiju¹
Klinički centar Vojvodine, Novi Sad
Klinika za psihijatriju²

Originalni naučni rad
Original study
UDK 611.8.08 i UDK 612.82.085:576.3
DOI: 10.2298/MPNS1312476B

EKSPRESIJA SOMATOSTATINA PRI ISHEMIJI MOZGA PACOVA

EXPRESSION OF SOMATOSTATINE IN ISCHEMIA OF RAT BRAIN

Siniša S. BABOVIĆ¹, Biljana SRDIĆ GALIĆ¹, Branislava SOLDATOVIĆ STAJIĆ²,
Mina CVJETKOVIĆ BOŠNJAK², Bojana KRSTONOŠIĆ¹ i Ljilja MIJATOV UKROPINA¹

Sažetak

Uvod. U ovoj studiji korišćena je imunohistohemijska metoda kako bi bio praćen citoplazmatski protein somatostatin u toku ishemije mozga pacova. Cilj istraživanja bio je da se definišu sve oblasti ekspresije somatostatina i da se distribucija proteina pokaže na mapi. **Materijal i metode.** Bili su proučeni svi rezovi telencefanona, diencefalona i srednjeg mozga pri rezistentnoj i tranzitornoj ishemiji, što nam je omogućilo da posmatramo reakciju neurona na ishemijske atake. **Rezultati i diskusija.** Rezultati ove studije pokazuju da postoji razlika između reakcija u rezistentnoj i tranzitornoj grupi mozga pacova, posebno u parijetofrontalnoj kori, području prednjeg dela amigdaloidnog tela, klastrumu, *nc. reuniens*, *nc. suprachiasmaticus*. Mapiranje pokazuje reakciju u strukturama motorne, senzitivne i senzorijske kore, pretežno u lamini II/III i V/VI, hipokampusu – *gyrus dentatus*, polja 1, 2 i 3. *Corum Amris-a*, endopiriformnom jedru, paraventricularnom i periventricularnom jedru hipotalamusa, amigdaloidnom telu, klastrumu i kaudoputamentu. U filogenetski starijim delovima mozga – rinencefalonu, takođe se reakcija pokazala pozitivnom, što nas navodi na zaključak da su i novije i starije strukture mozga regovale imunohistohemijski. Histološki podaci su pokazali da su mali neuroni najčešće pronalazeni, a potom velike piramidalne ćelije multipolarnog i bipolarnog tipa, a potom i ćelije drugačijih, različitih oblika. **Zaključak.** Naši rezultati su potvrdili nalaze retkih istraživanja koja se bave ovom problematikom, a dodatno smo precizirali mapu ćelija ekspresije somatostatina u mozgu pacova nakon ishemijskog ataka.

KLjučne reči: Somatostatin; Ishemija mozga; Pacovi; Neurotransmiteri; Imunohistohemija; Mapiranje

Uvod

Somatostatin (SS) je sačinjen od lanca 14 aminokiselina; izolovan je najpre iz hipotalamusa ovce, a potom je nađen ne samo u centralnom i perifernom nervnom sistemu, već i u probavnom traktu i

Usled tehničkih nemogućnosti preciznog prikazivanja mapa, zainteresovani mogu da se jave autoru radi dobijanja potpunijih podataka

Summary

Introduction. This study used the immunohistochemical method to follow the expression of cytoplasmatic protein somatostatin in the course of ischemia of rat brain. The aim of the study was to define all the areas of expression of somatostatin and to show the protein distribution on the map. **Material and Methods.** All the sections of telencephalon, diencephalon and mid-brain were studied in resistant, and transitory ischemia, which enabled us to observe the reaction of neurons to an ischemic attack or to repeated attacks. **Results and Discussion.** The results of this study show that there is a difference in the reaction between the resistant and transitory ischemia groups of rats, especially in the parietofrontal cortex, area amygdaloidea anterior, clastrum, *nc. reuniens* and *nc. suprachiasmaticus*. The mapping shows the reaction in the structures of motor, sensitive and sensory cortex, mostly in the laminae II/III and V/VI, hippocampus – *gyrus dentatus* and CA1, CA2, CA3, endopiriform nucleus, paraventricular and periventricular nucleus of hypothalamus, corpus amygdaloideum, clastrum and caudoputamen. The more primitive sections of the brain - rhinencephalon, also showed a reaction, which led us to conclude that both newer and older brain structures reacted immunohistochemically. Histological data showed that small neurons are most commonly found while the second most common are big pyramidal cells of multipolar and bipolar type, with the different body shape. **Conclusion.** Our findings have confirmed the results of rare studies that dealt with these issues, and offered a precise and detailed map of cells expressing somatostatin in the rat brain following ischemic attack.

Key words: Somatostatin; Brain Ischemia; Rats; Neurotransmitter Agents; Immunohistochemistry; Brain Mapping

pridodatim mu žlezdama (npr. gušterača). Ime je dobio po tome što inhibira sekreciju somatotropina.

Ovaj peptid možemo naći širom nervnog sistema, i u interneuronima, i u projekcionim vlaknima. U perifernom nervnom sistemu nalazi se u spinalnim ganglijama, a u centralnom široko je rasprostranjen na mnogo mesta, i to: kičmenoj moždini, moždanom stablu, međumozgu, velikom mozgu.

U kičmenoj moždini se nalazi u ćelijama neposredno oko centralnog kanala i zadnjem rogu kičmene moždine.

Skraćenice

SS	– somatostatin
NPY	– neuropeptid Y
BST	– <i>bed nucleus striae terminalis</i>
SS IR	– imunoreaktivnost na somatostatin
Pir	– piriformna kora
CA	– Cornu Ammonis
R	– rezistentna grupa ishemije
T	– tranzitorna grupa ishemije
b tačka	– tačka spajanja koronalnog i sagitalnog šava – bregma
i dijometar	– međuušni ili interauralni dijometar
Cg	– cingulatna kora
M1, M2	– primarna motorna kora area 1 i 2
M2	– sekundarna motorna kora
S1	– primarna somatosenzorna kora
GI	– granularna inzularna kora
DI	– disgranularna inzularna kora
VEn	– ventralno endopiriformno jedro
DEn	– dorzalno endopiriformno jedro
LOT	– jedro lateralnog olfaktornog traktusa
ACo	– prednje kortikalno amigdaloidno jedro
RSG	– retrosplinalna granularna kora
AuD	– sekundarna auditivna kora - dorzalna area
AuV	– sekundarna auditivna kora - ventralna area
PRh	– peririnalna kora
Ect	– ektorinalna kora
LEnt	– lateralna entorinalna kora
BLP	– zadnji deo bazolateralnog amigdaloidnog jedra
IPAC	– intersticijsko jedro prednje komisure (medijalni i lateralni deo)
BMP, BLA	– bazomedijalno i bazolateralno amigdaloidno jedro
D6	– <i>gyrus dentatus</i>
Re	– <i>nc. reuniens</i>
PaAP	– paraventricularno jedro hipotalamusa
Cru	– kaudoputamen
RSA	– retrosplinalna agranularna kora
c Fos IR	– imunoreaktivnost na c Fos protein
InG	– središnji sloj sive mase gornjeg kolikulusa
PLCo	– zadnjobočno kortikalno amigdaloidno jedro
PP	– peripedunkularno jedro
SuG	– površinski sloj sive mase gornjeg kolikulusa
TeA	– temporalna asocijativna kora

U produženoj moždini se nalazi u *nc. tractus solitarius*, *nc. ambiguus* i *nc. spinalis nervi trigemini*.

U srednjem mozgu ga ima u periakveduktalnoj sivoj masi i retikularnoj formaciji.

U međumozgu se nalazi i u hipotalamusu i u epitalamusu. U hipotalamusu, po istraživanjima Swaaba, SS je nađen u *nc. suprachiasmaticus*, sa neuropeptidom Y (NPY), galaninom, proenkefalinom i vazointestinalnim peptidom [1]. *Bed nucleus striae terminalis* (BST) ga ima u dva svoja dela, najviše u tzv. *darkly staining posteromedial component*, koji je veći nekoliko puta kod muškarca, i u centralnom, koga karakteriše masivna imunoreaktivnost neurona na somatostatin. Budući da se radi o seksualno dimorfnim jedrima, njihova zapremina zavisi od pola jedinke. *Nc. periventricularis* je takođe karakterična SS pozitivna struktura, čiji se produžeci projektuju u medijalnu emenciju. Značajna seksualno dimorfna jedra *nc.*

ventromedialis i *nc. dorsomedialis* su bogata mrežom vlakana u telima nervnih ćelija odakle i potiče imunopozitivna reakcija na somatostatin (SS-IR). *Nc. tuberalis lateralis* je značajno jedro koje učestvuje u regulaciji unošenja hrane i metabolizma i sadrži značajan kontigent SS-imunoreaktivnih ćelija. U ovom jedru je jasno pokazano da SS pada kod bolesnika od Hantingtonove bolesti, kao i kod obolelih od Alchajmerove bolesti [2]. Kod Alchajmerove bolesti je ranije nađeno smanjenje vrednosti SS-IR. Zadnja ili mamilarna regija, koja ima značajnu ulogu u regulaciji telesne temperature, kao i mnoge druge koje su od vitalnog značaja, pokazala je visok stepen obojenosti neurona na SS, kao i habenularna jedra epitalamusa.

Ćelije velikog mozga pokazuju imunoreaktivnost na SS u bazalnim jedrima, supkortikalnim limbičkim i olfaktivnim strukturama (*nc. centralis amygdale*, *nc. septalis lateralis*, *nc. striae terminalis*, *nc. olfactorius anterior*, *tuberculum olfactorium*), kao i svim delovima neokorteksa (u laminama II–VI, posebno V i VI), a od limbičkih struktura kore, somatostatin se može naći u girusu *cinguli*, hipokampu i u piriformnoj kori (Pir) [3–5].

Grupa vlakana SS-IR sa nepoznatom lokacijom tela mogu se naći u vidnom i slušnom sistemu, kako odlaze da inervišu mišiće pokretače očne jabučice, ili prožimaju auditivni sistem moždanog stabla. Nađena su i u nekim jedrima kičmene moždine.

Uloga ovog neuromodulatora u centralnom nervnom sistemu je u neku ruku opšta. Neki autori ga povezuju sa ulogom u kogniciji i memoriji, ali se smatra centralnim neurotransmiterom/neuromodulatorom [4,6].

Chun sa saradnicima izveštava da se SS (kao i NPY) stvaraju oko 50. dana embrionalnog razvoja kod mačke (graviditet mačke traje 63 dana, tj. 9 nedelja), i to u početnim stadijumima stvaranja ćelija, pre nastanka marginalne ili neke dublje zone tj. sloja ćelija [7–9]. Somatostatin će dalje, tokom razvoja, biti zastupljeniji u ćelijama koje idu prema površini, tj. prema marginalnoj zoni. Jasno je da daljim razvojem ćelijskog kontigenta mozga i ovaj neurotransmiter, γ -amino buterna kiselina, holecistokinin), ima važnu ulogu u razvoju kore mozga.

Kod odraslih, nalazi se u skoro svim strukturama mozga, pa stoga nema specifičnu ulogu, a njegovo povećanje ili smanjenje, vezuje se za mnoge poremećaje funkcije centralnog nervnog sistema kao pratilac, a možda i kao uzrok bolesti. Povišene vrednosti ovog proteina češće se nalaze kod zapaljenskih i tumorskih procesa na mozgu i njegovim ovojnicama. Snižene vrednosti su nađene kod obolelih od Parkinsonove, Alchajmerove bolesti [8–10], shizofrenije [11,12], a kod Hantingtonove bolesti su vrednosti nekonzistentne [13]. Ipak se smatra da je opšta pojava promena nalaza SS u ćelijama izazvana disregulacijom, a ne specifičnim promenama kod posmatranih bolesti.

Rauca je sa saradnicima načinio i eksperiment ishemije pri čemu je davao različite koncentracije SS u mozak nakon 5 minuta od ataka i zaključio da, u određenim koncentracijama, može imati zaštitno dejstvo na neurone zahvaćene ishemijom [14].

Ukupno posmatrano, pokazalo se da ubrizgavan u komore mozga izaziva depresiju motorne aktivnosti, a jontoforetsko aplikovanje dovodi do inhibicije aktivnosti.

Somatostatin i ishemija

Eksperiment u kom su okludirana četiri krvna suda prvog sata, drugog i četvrtog dana istraživanja, pokazano je da se samo prolazno smanjuje SS informaciona ribonukleinska kiselina (iRNK) tokom 2–4 dana od ishemijskog ataka, a posmatrani protein je najviše ispitivan tokom ishemijskih ataka u, mrežnjači i žlezdama pridodatim probavnim organima [15–19].

U radu Freunda o SS-IR pojavila se interesantna, koliko god očekivana, pojava naglog smanjenja broja SS pozitivnih neurona u hilusu dentatnog girusa i u regiji jedan ćelijske grupe Amonovog roga (*cornu ammonis* – CA1), tj. u piramidalnim ćelijama [20]. Arabadzisz je ispitivao i preživljavanje neurona SS-IR kod pacova koji su preživeli ishemiju nakon 12–14 meseci [21]. Johansen izveštava da se SS-IR u hipokampu pri ishemiji ne menja [22].

Raspored SS-IR u kori mozga

Mizukawa i saradnici dali su detaljan raspored i oblik SS pozitivnih neurona kore pacova. Mada su različitih i veoma nepravilnih oblika i veličina, podeljeni su na tri grupe ili tipa. Tip A – veliki do srednje veličine, multipolarni neuroni, sa 3–5 dugih produžetaka. Tip B – neuroni srednje do male veličine, fuziformnog oblika, sa 2 produžetka. Tip V – mali neuroni, ovalni ili fuziformni, svetlo prebojeni. Nalaze se u svim slojevima kore izuzev I, a posebno su naglašeni u sloju V somatosenzorne i motorne kore [23].

Najbolju predstavku o regionalnoj ekspresiji SS i NPY u kori mozga majmuna i pacova dali su Hendry i saradnici 1984. godine. Oni su elektronskim mikroskopom posmatrali laminarnu organizaciju ova dva veoma zastupljena peptida u mozgu i našli ga naročito u motornoj i senzitivnoj kori, iako su oba bila zastupljena u svim areama kore ili aksonima tih neurona. Kod majmuna je bio jasno laminarno raspoređen i jedan i drugi peptid, posebno u laminama II/III i V/VI, ali u mozgu pacova ispitivani peptidi nisu imali jasnu laminarnu organizaciju. Oba peptida su imala sličnu anatomsku rasprostranjenost [24].

Sorensen daje precizniju sliku SS pozitivnih neurona u kori i beloj masi neposredno ispod kore mozga čoveka. U radu saznajemo da su imunoreaktivne ćelije u svim slojevima, a da su vlakna posebno mnogobrojna u sloju I, te da su tangencijal-

no usmerena prema površini mozga, dok su mreže grana velikog broja vlakana isprepletene u dubljim slojevima kore, i da nose izražene varikozitete. U supkortikalnim regijama, SS pozitivni neuroni su čak veći, a njihova vlakna idu i prema kori i u dublje slojeve mozga. Jasno je da ovakav raspored ćelija, kao i brojnost, ukazuju da je SS važan modulator integrativnih i, verovatno, specifičnih funkcija, ne samo vezama u kori, već i sinaptičkom povezanošću sa velikom mrežom vlakana u beloj masi [25].

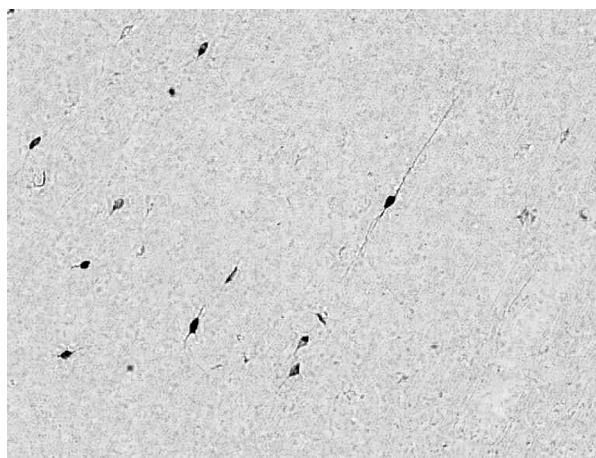
Materijal i metode

Materijal na kom je ispitivan SS brojao je ukupno deset mozgova pacova. Formirane su dve eksperimentalne grupe pacova koji su podvrgnuti ishemiji po Pulsinellijevoj metodi iz 1979. godine i dve kontrolne grupe [26]:

– Prva grupa bila je izložena totalnoj ishemiji ligaturom četiri krvna suda (koagulacija vertebralne arterije, uz obostranu ligaturu karotidnih arterija parafiniziranim koncem 10 minuta, a potom perfuzija 60 minuta). Označena je kao rezistentna (**R**) grupa pacova i činile su je tri jedinke (R 41, R 42, R 43);

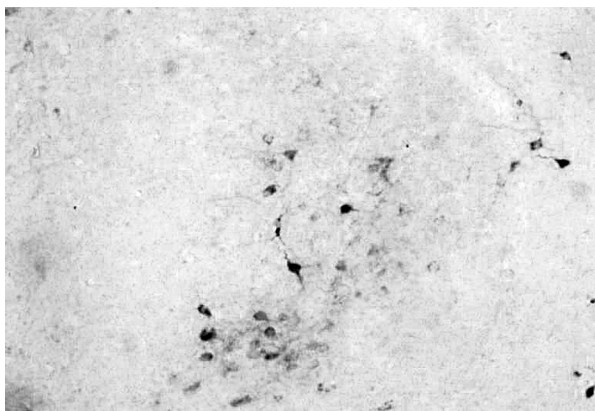
– U drugoj grupi eksperimentalne životinje su izložene ishemijskom tolerantnom ataku (koagulacija vertebralne arterije, uz obostranu ligaturu karotidnih arterija parafiniziranim koncem 4 minuta, a potom ponovljena za 72 sata u trajanju od 10 minuta). Označena je kao tolerantna (**T**) grupa pacova i obuhvatala je pet životinja (T 12, T14, T 16, T 17, T 19).

– U prvoj kontrolnoj grupi, u kojoj nije bilo intervencije, bila je 1 životinja;



Slika 1. Parijetofrontalna kora mozga pacova, desno. SS-IR mozak pacova R43. Jasno uočljiva laminarna organizacija sloja V/VI desne hemisfere, s primerom bipolarnih sferoidnih neurona. Fotografija uvećana 40 puta.

Fig. 1. Parietofrontal cortex SS-IR rat R43. Laminar layer organization of V/VI right hemisphere is clearly visible with the example of bipolar spheroid neurons. Photography is magnified 40 times.



Slika 2. *Nc. amygdaloideus centralis*. Prikaz SS-IR ćelija mozga pacova T30. Neuron ovalnog i nepravilnog oblika. Fotografija uvećana 40 puta.

Fig. 2. *Nc. amygdaloideus centralis* Image of SS-IR neurons, rat T30. Neurons are oval and irregular. Photography is magnified 40 times.

– U drugoj kontrolnoj grupi za tolerantnu ishemiju (koagulacija vertebralne arterije uz ligaturu 4 minuta obe karotidne arterije bez desetominutne religature) bila je jedna životinja.

Pacovi su anestezirani prvog dana ketaminom (100 mg/kg), kada je načinjena elektroauterizacija *a. vertebralis*. Sledećeg dana u anesteziji halotanom (1,5–2%), preparisane su obe zajedničke karotidne arterije i podvezane parafiniziranim koncem, kako bismo zaštitili zid krvnog suda od oštećenja koncem pri zatezanju. U grupi **R**, okluzija karotidnih arterija trajala je 10 minuta, nakon čega su životinje žrtvovane, a u ishemijskoj grupi 10 minuta, nakon čega je presecanjem konca postignuta recirkulacija krvi. U tolerantnoj, grupi **T**, nakon 72 sata od prve okluzije, *a. carotis communis* je okludirana 4 minuta, a nakon 60 minuta po okluziji životinje su žrtvovane u stanju anestezije ketaminom (100 mg/kg), dok je mozak intrakranijalno reperfundovan 4% paraformaldehidom.

Tokom hirurških intervencija, telesna temperatura životinja bila je održavana grejnom lampom na 37°C. Tokom prvih 15–20 minuta od reperfuzije, životinje su bile pasivne, nisu se pokretale, a jedna sat nakon okluzije bile su žrtvovane.

Nakon fiksacije tokom noći u 20% saharozi, sledilo je rezanje *free floating* tehnikom, na rezove debljine 50 µm.

U radu smo koristili imunohistohemijsku tehniku avidin-biotin peroksidaze, kao semikvantitativnu metodu za detekciju traženih proteina. Preseci su ispirani 0,1M fosfatnim puferom, inkubirani u 0,5% triton-H-100 i 10% normalnom kozjem rastvoru 60 minuta. Nakon toga sledila je inkubacija 48 h sa specifičnim antitelima za *SS rabbit polyclonal IgG Sant Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA*, u razređenju 1 : 4 000. Sledeći korak je inkubacija sekundarnim zečjim antitelima 60 minuta, a potom u istom vremenskom trajanju

dodaje se avidin-biotin peroksidaza. Ispiranje se vrši 0,1M fosfatnim puferom (rN 7,26). Antigen-antitelo kompleks je vizualiziran 3,3' diamino-benzidinom i 0,03% H₂O₂.

Antitela na SS i NPY su istog proizvođača, u razređenju 1 : 4 000.

Trajni histološki preparati dobijeni su montiranjem pokrovnih stakala na osušene isečke pomoću kanada balzama tj. *Permunt* medijuma (*Fisher*). Medijum se suši oko 48 sati.

Preparati su posmatrani, analizirani na mikroskopu *Leica*.

Fotografije su načinjene *Analysis* programom.

Za mapiranje mozгова koristili smo mape poznatog atlasa *George Paxinos, Charles Watson: The rat brain in stereotaxic coordinates, Academic press, 1997*. Sve mape su poslužile za unošenje naših rezultata konsektivno, a na kojima su obeležene strukture sa pozitivnom reakcijom, dok je dubina mozga već kod autora označena na slici i obeležena brojevanjem vrednostima dvaju parametara: međuušni ili interauralni dijametar (**i**) i tački spajanja koronalnog i sagitalnog šava – bregme (**b**). S obzirom na različit stepen obojenosti u grupama **R** i **T** i među presecima i među strukturama u okviru jednog preseka, koristili smo samo dve vrednosti veličine tačaka (*Adobe Photoshop 1 px i 3 px*) kojima smo obeležavali vrednost pozitivne reakcije u ćeliji, a obeležavanjem u mesto gde se pojavila, prikazali smo lokaciju pozitivne reakcije.

Fotografije pokazuju regije mozga u kojima se uočava SS-IR. Budući da se imunoreaktivnost citoplazme neurona ne poklapa sa izgledom ćelije, već samo pozitivnim molekulima traženog proteina, nismo pravili dublju analizu podele po tzv. ne-piramidalnoj podeli u rezultatima SS-IR. Drugi razlog je i to što se SS-IR tela neurona poklapaju sa veoma izraženo rektivnim neuropilima, što bi semikvantitativnim merenjem dalo lažne rezultate.

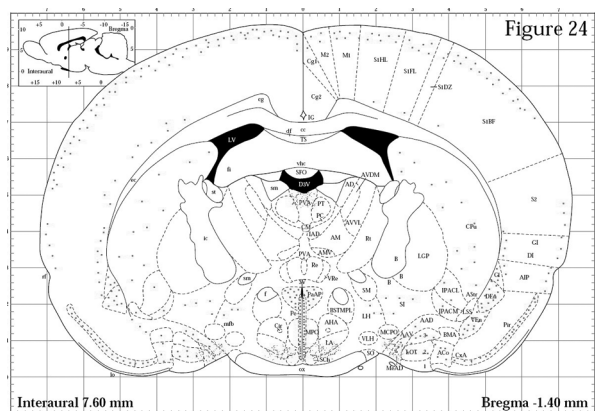
Rezultati

SS pozitivne strukture mozгова R grupe

U svim strukturama mozгова **R**-grupe, gustina SS-IR neurona veličine 3 px, bila je znatno manja u odnosu na **T**-grupe pacova.

U mapi mozga **R41, R42, R43** pacova, u rostralnijim delovima, do novoa **i** 7,6 mm/**b** -1,4 mm, javlja se SS-IR u dorzalnim delovima kore mozga pretežno u lamini II/III, i to u sledećim strukturama kore: cingularnoj kori (Cg) (area 1 – Cg1, area 2 – Cg2), motornoj kori (primarna motorna kora – M1, sekundarna motorna kora – M2), primarna somatosenzorna kora (S1), granularna inzularna kora (GI), disgranularna inzularna kora (DI) (**Mapa 1**).

Ventralne strukture koje su SS-IR su: Pir, klaustrum (Cl), dorzalno endopiriformno jedro (DEn), ventralno endopiriformno jedro (VEn), prednji deo bazomedijalnog amigdaloidnog tela (BMA), jedro lateralnog olfaktivnog traktusa (LOT) i prednje kortikalno amigdaloidno jedro (ACo).



Mapa 1. Prikaz SS-IR area u mozgu pacova R41. Nivo reza i 7,6 mm/b-1,4 mm. Zelenom bojom obeleženi SS-IR.neuroni. Crvenom bojom obeleži SS-IR neuropili. Objašnjenje dato u štivu. (Mape su preuzete iz atlasa: George Paxinos, Charles Watson: The rat brain in stereotaxic coordinates, Academic press, 1997).

Map 1. Image of SS-IR area in the brain of rat R41. The level of slice is i 7,6 mm/ b- 1,4 mm. NPY-IR neurons are marked in green color. The explanation is given in the text (The map has been taken over from atlas: George Paxinos, Charles Watson: The rat brain in stereotaxic coordinates, Academic press, 1997)

Dublji nivoi preseka mozga od i 7,2 mm/b -1,8 mm su takođe slabije SS-IR. U kori su uočeni reaktivni neuroni u laminama II/III i V/VI i to: retrosplenijalna granularna b kora (RSGb), u rostrosplenijalnom agranularnom korteksu (RSA), sekundarna vizuelna kora – medijalni deo (V2MM), sekundarna vizuelna kora – dorzalni deo (V2ML), M2, M1, S1, sekundarna auditivna kora - dorzalna area (AuD), sekundarna auditivna kora - ventralna area (AuV), GI, DI. Ventralni delovi kore su SS-IR u V/VI, a to su ektorinalna kora (Ect), peririnalna kora (PRh), lateralni entorinalni korteks (LEnt). Ventralniji delovi mozga su pokazivali slabu obojenost u: medijalnom i lateralnom delu BST, *nc. accumbens* (jedro – AcbC, i kora - AcbSh), intersticijalno jedro prednje komisure (IPAC). Kaudoputamen (Cpu) je bio slabio SS reaktivan, sa retkim SS-IR neuronima difuzno razbacanim. U hipokampu je *gyrus dentatus* (DG) bio više reaktivan, dok su CA1, Amonov rog – polje 2 (CA2), Amonov rog – polje 3 (CA3) bili znatno manje SS-IR.

Od struktura hipotalamusa, jedino je SS-IR bio *nc. reuniens* (Re) i periventrikularno jedro hipotalamusa (PaAP).

SS pozitivne strukture mozgovog T grupe

U svim strukturama mozgovog pacova T12, T14, T16, T17 i T19, vrednost imunopozitivne reakcije na SS je veličine obeležene tačke 3 px koje su najzastupljenije.

U rostralnim strukturama mozga nivoa od i 10,7 mm do 7,7 mm/b 1,7 mm do -1,3 mm, SS-IR neuroni su nađeni u kori, hipotalamusu, bazalnim jedrima i ventralnom delu mozga. Kora je SS-IR

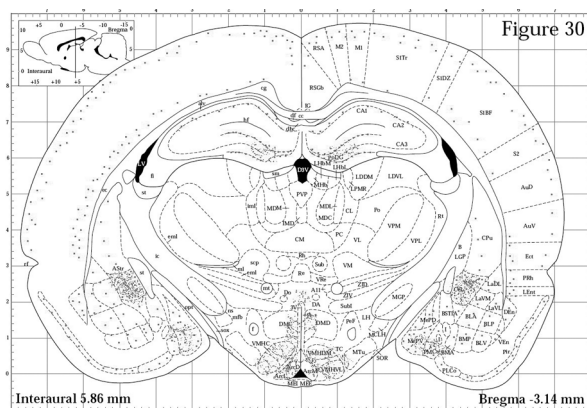
duž čitave cirkumferencije leve i desne hemisfere, u jasno naznačenim laminama II/III i V/VI, sledećih struktura: Cg1, Cg2, M1, M2, S1, S2, GI, DI, zadnjem agranularnom inzularnom korteksu (AIP). U lamini I kore velikog mozga nađene su retke obojene ćelije.

Neuroni u bazalnim jedrima su slabio SS-IR, i nalaze se u Cru, dok je u S1, DEn, VEn imunoreaktivnost veća. U tom, ventralnom delu mozga, SS-IR je nađena u lateralnoj traci strijatuma (LSS), LOT, Pir, *substantia innominata pars basalis* (SIB), *substantia innominata pars ventralis* (SIV), *nc. striae medullaris* (SM), ACo. Slaba SS-IR je i u: svim delovima BST, intersticijalno jedro prednje komisure (medijalni deo – IPACM i lateralni deo - IPACL), ventralni deo lateralnog septalnog jedra (LSV).

SS-IR u hipotalamusu su: PaAP, Pe, SCh, a od jedara talamusa samo Re.

Na dubini preseka mozga od i 7,2 mm/b -1,8 mm najveću SS-IR pokazao je centralno amigdaloidno jedro, u hipotalamusu je posebno obojeno periventrikularno jedro (Pe), ventralni deo paraventrikularnog jedra (PaV), medijalni deo paraventrikularnog jedra (PaMB), dorzalni deo paraventrikularnog jedra (PaDC), lateralni deo paraventrikularnog jedra (PaLM) i lateralna area hipotalamusa (LH). Na prelazu talamusa, koji nije imao SS-IR, zona incerta (ventralni - ZIV i dorzalni deo – ZID) bio je SS-IR. Cru je slabio obojen (**Mapa 2**).

Ventralni delovi mozga su SS-IR u amigdaloidnom kompleksu (medijalno amigdaloidno jedro, vazomedijalno i vazolateralno amigdaloidno je-



Mapa 2. Prikaz SS-IR area u mozgu pacova R42. Nivo reza i 5,86 mm/b-3,14 mm. Zelenom bojom obeleženi SS-IR. neuroni. Crvenom bojom obeleži SS-IR neuropili. Objašnjenje dato u štivu. (Mape su preuzete iz atlasa: George Paxinos, Charles Watson: The rat brain in stereotaxic coordinates, Academic press, 1997)

Map 2. Image of SS-IR area in the brain of rat R42. The level of slice is i 5,86 mm/b – 3,14 mm. SS-IR neurons are marked in green color. The explanation is given in the text (The map has been taken over from atlas: George Paxinos, Charles Watson: The rat brain in stereotaxic coordinates, Academic press, 1997).

dro, zadnje bočno korikalno amigdaloidno jedro) Pir, DEn.

Kora je jasno SS-IR u laminama II/III i V/VI, sledećih struktura: RSG, RSA, M1, M2, S1, S2, AuD, primarna auditivna kora (Au), AuV, GI, DI, Ect, PRh, LEnt. DG, CA1, CA2, CA3 bili su obojeni, ali mnogo manje spram *c-Fos* IR. Na ovoj dubini je samo laminama V/VI postsubikuluma (Post) i subikuluma (S) bila SS-IR.

Na kaudalnijim presecima mozga od 3,2 mm do 2,96 mm/od **b** – 5,8 mm do -6,04 mm, SS-IR neuronima se vide na presecima koji pripadaju regionu srednjeg mozga: zonalni sloj gornjeg kolikulusa (Zo), površinski sloj sive mase gornjeg kolikulusa (SuG), sloj optičkog nerva u gornjem kolikulusu (Op), središnji sloj sive mase gornjeg kolikulusa (InG), lateralna periakveduktalna siva masa (LPAG), zadnje intralaminarno talamičko jedro (PIL), peripedunkularno jedro (PP), *nc. nervi optici* (OT), dorzalno terminalno jedro pomoćnog optičkog traktusa (DT).

Na ovoj dubini su nađeni retki SS-IR neuroni u kompaktnom delu ventralne supstancije nigre (SNCD) i njenom lateralnom delu (SNL), u mozgu pacova T17.

Na kraju analize mapa SS-IR neurona, zaključujemo da je intenzitet SS-IR značajno veći u T-grupi.

Diskusija

Somatostatin je široko rasprostranjeni peptid i u našem radu je nađen u mnogim strukturama ishemijskog zahvaćenog mozga. Najpre ističemo da je obojenost prisutna u T-grupi pacova, i to u: granularnoj kori, motornoj i senzitivnoj kori i površnim laminama, DG, S1, S2, VEn, DEn i piriformnoj kori. Ova reaktivnost bila je prisutna u I, II, i VI lamini kore. Amigdaloidno telo, posebno kapsularni deo, a u hipotalamusu paraventricularno i periventricularno jedro su bili veoma SS-IR, što se slaže sa nalazima Swaaba [1]. Nalaze s kojima smo mogli da uporedimo naše rezultate sa rezultatima eksperimenata na ishemijskom zahvaćenom mozgu, u nama dostupnoj novijoj literaturi, nismo našli, iako je iz ranije literature poznato da SS ima najviše u V/VI lamini kore, nekim jedrima hipotalamusa i amigdaloidnom telu intaktnog mozga [4].

Budući da je poznato da SS biva povišen u inflamatornim i razarajućim procesima na mozgu (meningitis, kompresije nervnih korenova, tumori), toksičnim encefalopatijama, manijakalnim poremećajima, naš zaključak je da se ovaj peptid održava u stanjima smanjenog dotoka kiseonika i hranljivih materija, što može imati veze sa ishemijskim atakom, a možda i sa stvaranjem protoonkogenih, nalik rezultatima rada Wu Y. [27], koji pominje povezanost u modulaciji stvaranja NPY i c-Fos proteina.

Iako je u nekim radovima pokazano da se smanjuje iRNK SS u neuronima hipokampa 2–4 dana od načinjene ishemije, smatramo da takav nalaz nije u koliziji s našim rezultatima, jer nisu svi delovi mozga jednako osetljivi na ishemiju, i da za značajnije iscrpljivanje ovog proteina mora biti načinjena ishemija dužeg trajanja [28].

Što se tiče histološkog tipa ćelija, naši nalazi potvrđuju nalaze Mizukave i Hendrya o obliku neurona, njihovoj laminarnoj organizaciji u kori mozga, budući da smo ih našli u laminama II/III i V/VI [23,24]. Male ćelije, obojene samo u perikarionu, bipolarne i multipolarne, s određenim smerom vlakana opisuje Yamasita [28], s čijim nalazima se naš nalaz u potpunosti slaže.

Johansen i Sorensen, potvrđuju da je oblik SS-IR ćelija multiforman i u hipokampu [20,29].

U ovom eksperimentu je ispitivano ponašanje i protoonkogenih c-Fos proteina [30], kao i neuropeptida Y [31,32]. Pritom, nalaz pozitivne reakcije kod sva tri proteina je pozitivniji u mozgovima koji su „navikavani“ na ishemiju, što potvrđuje da priroda pokušava da održi u životu jedinku tvoreći neuroprotektivne peptide u, za život važnim, delovima mozga.

Zaključak

Naše ispitivanje je dopunilo dosadašnja saznanja u vezi sa ponašanjem somatostatina pri atacima ishemije u mozgu pacova, kako na nivou femikvantifikacije imunoreaktivnosti i mapiranja struktura koje su reagovale, tako i na nivou histološkog određivanja tipa ćelija u kojima je ovaj peptid nađen.

Literatura

1. Swaab DF. Chapter II Neurobiology and neuropathology of the human hypothalamus. In: Handbook of chemical neuroanatomy. Amsterdam: Elsevier; 1997. p. 39-137.
2. Meade CA, Figueredo-Cardenas G, Fusco F, Nowak TS Jr, Pulsinelli WA, Reiner A. Transient global ischemia in rats yields striatal projection neuron and interneuron loss resembling that in Huntington's disease. *Exp Neurol* 2000;166:307-23.
3. Nieuwenhuys R. Chemoarchitecture of the brain. Berlin: Springer-Verlag; 1985. p. 52-82.
4. Mršulja B, Kostić V. Neurohemija u neurološkim bolestima. Beograd: Medicinska knjiga; 1994. str. 48-82.
5. Paunović V, Babinski T. Biološka psihijatrija I: molekularna osnova mentalnih poremećaja. Beograd: Medicinski fakultet; 1995. str. 335-58.
6. Arif A, Ahmed MM, Kumabe Y, Hoshino H, Chikuma T, Kato T. Chlorthalidone but not haloperidol suppresses the changes in the levels of neuropeptides in MK-801-treated rat brain regions. *Neurochem Int* 2006;49(3):304-14.
7. Chun JJ, Shatz CJ. The earliest-generated neurons of the cat cerebral cortex: characterization by MAP2 and neurotransmitter immunohistochemistry during fetal life. *J Neurosci* 1989;5:1648-67.
8. Horgan J, Miguel-Hidalgo JJ, Thrasher M, Bissette G. Longitudinal brain corticotropin releasing factor and somato-

statin in a transgenic mouse (TG2576) model of Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis* 2007;12(2):115-27.

9. van de Nes JA, Konermann S, Nafe R, Swaab. Beta-protein/A4 deposits are not associated with hyperphosphorylated tau in somatostatin neurons in the hypothalamus of Alzheimer's disease patients. *Acta Neuropathol* 2006;111(2):126-38.

10. Tallent M. Somatostatin in the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 2007;163:265-84.

11. Freedman R, Adams CE, Leonard S. The alpha 7-nicotinic acetylcholine receptor and the pathology of hippocampal interneurons in schizophrenia. *J Chem Neuroanat* 2000;20(3-4):299-300.

12. Morris HM, Hashimoto T, Lewis DA. Alterations in somatostatin mRNA expression in the dorsolateral prefrontal cortex of subjects with schizophrenia or schizoaffective disorder. *Cereb Cortex* 2008. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18203698?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum

13. Giampa C, DeMarch Z, D'Angelo V, Morello M, Martorana A, Sancesario G, et al. Striatal modulation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) after excitotoxic lesions: implications with neuronal vulnerability in Huntington's disease. *Eur J Neurosci* 2006;23(1):11-20.

14. Rauca C, Schafer K, Holtt V. Effects of somatostatin, octreotide and cortistatin on ischemic neuronal damage following permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1999;360:633-8.

15. Mastrodimou N, Kiagiadakis F, Thermos K. The role of nitric oxide and cGMP in somatostatin's protection against retinal ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(1):342-9.

16. Chen P, Hu B, Tan Q, Liu L, Li D, Jiang C, Wu H, Li J, Tang C. Role of neurocrine somatostatin on sphincter of Oddi contractility and intestinal ischemia reperfusion-induced acute pancreatitis in macaques. *Neurogastroenterol Motil* 2010;22:935-40.

17. Yu HY, Wang JC, Tang C. Role of mesenteric lymph pathway in the effects of exogenous somatostatin against early intestinal injury after ischemia: reperfusion in rats. *Neuropeptides* 2013;47(4):237-43.

18. Xu LT, Wu YY, Fan H, Tan QH, Hu B, Wang CH, et al. Association between somatostatin levels and life of polymorphonuclear neutrophils in macaques following intestinal ischemia-reperfusion. *Sci Res Essays* 2011;6(10):2187-94.

19. Lauer S, Daudel F, Traber DL, Nofer JR, Ertmer C, Morelli A, et al. Somatostatin infusion increases intestinal ischemia and does not improve vasoconstrictor response to norepinephrine in ovine endotoxemia. *Shock*. 2008;30(5):603-9.

Rad je primljen 20. IX 2013.

Recenziran 17. X 2013.

Prihvaćen za štampu 25. X 2013.

BIBLID.0025-8105(2013):LXVI:11-12:476-482.

20. Freund TF, Buzsaki G, Leon A, Somogy P. Hippocampal cell death following ischemia: effects of brain temperature and anesthesia. *Exp Neurol* 1990;108(3):251-60.

21. Arabadzisz D, Freund F. Changes in excitatory and inhibitory circuits of the rat hippocampus 12-14 months after complete forebrain ischemia. *Neuroscience* 1999;92(1):27-45.

22. Johansen FF, O'Hare MM. Loss of somatostatin immunoreactivity in the rat hippocampus following transient cerebral ischemia. *J Neurosurg Anesthesiol* 1989;1(4):339-45.

23. Mizukawa K, McGeer PL, Vincent SR, McGeer EG. The distribution of somatostatin-immunoreactive neurons and fibers in the rat cerebral cortex: light and electron microscopic studies. *Brain Res* 1987;426(1):28-36.

24. Hendry SHC, Jones EG, Emson PC. Morphology, distribution, and synaptic relations of somatostatin and neuropeptide Y-immunoreactive neurons in rat and monkey neocortex. *J Neurosci* 1984;4(10):2497-517.

25. Sorensen KV. Somatostatin: localization and distribution in the cortex and the subcortical white matter of human brain. *Neuroscience* 1982;7(5):1227-32.

27. Wu Y, Zhang D, Lou D, Fan Y, Aronow B, Xu M, et al. C-Fos regulates neuropeptide Y expression in mouse dentate gyrus. *Neurosci Lett* 2004;363(1):6-10.

26. Pulsinelli Wa, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized. *Stroke* 1979; 10: 267-72.

28. Yamashita A, Hayashi M, Shimizu K, Oshima K. Ontogeny of somatostatin in cerebral cortex of macaque monkey: an immunohistochemical study. *Dev Brain Res* 1989;45:103-11.

29. Johansen FF, Sorensen T, Tonder N, Zimmer J, Diemer NH. Ultrastructure of neurons containing somatostatin in the dentate hilus of the rat hippocampus after cerebral ischemia, and a note on their commissural connection. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1992;18 (2):145-57.

30. Puškaš L, Puškaš N, Babović SS, Velicki L, Ivanov D, Mijatov-Ukropina Lj. Ekspresija c-fos proteina u parijetalnoj kori i olfaktivnom tuberkulumu pri hipoksiji mozga pacova. *Med Pregl* 2007;60(3-4):128-33.

31. Babović SS. Regionalna ekspresija c-Fos proteina, somatostatina i neuropeptida Y pri atakama ishemije u mozgu pacova (doktorska disertacija). Novi Sad: Medicinski fakultet u Novom Sadu; 2008.

32. Babović SS, Srdić-Galić B, Soldatović-Stajić B, Cvjetković-Bošnjak M, Krstonošić B, Siladi-Mladenović Đ. Ekspresija neuropeptida Y pri ishemiji mozga pacova. *Med Pregl* 2013;66(9-10):361-7.