

Координаты для связи с авторами: *Андреева Ирина Владимировна* – д-р мед. наук, профессор кафедры хирургии, акушерства и гинекологии ФДПО РязГМУ, тел.: 8-(4912)-70-14-09, +7-900-902-93-04; e-mail: prof.andreeva.irina.2012@yandex.ru; *Виноградов Александр Анатольевич* – д-р мед. наук, профессор кафедры сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной, оперативной хирургии и топографической анатомии РязГМУ, тел.: 8-(4912)-70-14-09, +7-900-902-93-40, e-mail: alexanvin@yandex.ru; *Жесткова Татьяна Михайловна* – врач-терапевт, врач УЗД, Медицинский центр «МК-МЕД» (г. Санкт-Петербург), соискатель кафедры хирургии, акушерства и гинекологии ФДПО РязГМУ, тел. +7-921-860-36-32, e-mail: Tatjana_zhestkova@mail.ru; *Калина Наталия Владимировна* – канд. мед. наук, врач-невролог, врач УЗД, зам. главврача по экспертизе временной нетрудоспособности ГУ «Луганская государственная многопрофильная больница № 3» (г. Луганск), соискатель кафедры хирургии, акушерства и гинекологии ФДПО РязГМУ, тел. (+38)-095-348-544, e-mail: dockalina@mail.ru; *Симаков Роман Юрьевич* – врач-хирург, врач УЗД ГБУ Рязанской области «Клепиковская районная больница», соискатель кафедры хирургии, акушерства и гинекологии ФДПО РязГМУ, тел. +7-920-950-2525, e-mail: simakovryazan@gmail.com; *Симакова Евгения Сергеевна* – врач-акушер-гинеколог, врач УЗД ГБУ Рязанской области «ГКБ № 10», соискатель кафедры хирургии, акушерства и гинекологии ФДПО РязГМУ, тел. +7-920-953-15-05, e-mail: evsimakova@yandex.ru; *Григорьев Алексей Сергеевич* – врач-уролог ГБУЗ Московской области «Коломенская ЦРБ», соискатель кафедры хирургии, акушерства и гинекологии ФДПО РязГМУ, тел. +7-916-523-92-01, e-mail: Aleksey130379@yandex.ru; *Святивода Роман Владимирович* – старший ординатор урологического отделения ФГБУ «ГВКГ им. Н.Н. Бурденко» Минобороны России, соискатель кафедры хирургии, акушерства и гинекологии ФДПО РязГМУ, e-mail: drsvyativoda@gmail.com.



<http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2019-2-58-62>

УДК 611.813-013-018:825:615.355]:599.323.4-092.9

Б.Я. Рыжавский, Д.И. Жильников

ГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ РЕАКЦИИ НА NO-СИНТАЗУ В НЕЙРОНАХ НЕОКОРТЕКСА И ГИППОКАМПА ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

*Дальневосточный государственный медицинский университет, 680000, ул. Муравьева-Амурского, 35,
тел. 8-(4212)-76-13-96, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru, г. Хабаровск*

Резюме

Изучалась активность NO-синтазы посредством гистохимической реакции на НАДФН-дегидрогеназу (НАДФН-д) в неокортексе и разных отделах гиппокампа (поле I, III, зубчатая извилина). В префронтальной коре, неокортексе переднетеменной и собственно теменной долей реакция на NO-синтазу регистрировалась в небольшом числе нейронов, расположенных изолированно или группами по 2-3 клетки, преимущественно в слоях III-V. Продукт реакции выявлялся в телах и отростках клеток. Форма их перикарионов была пирамидальной, овальной, веретеновидной, угловатой, размеры – 20-40 мкм. Направление отростков соответствовало ходу корковых колонок или (реже) было близким параллельному поверхности коры. Интенсивность реакции в этих клетках равнялась $0,318 \pm 0,024$ усл. ед. В гиппокампе положительная реакция на НАДФН-д наблюдалась в большинстве нейронов. Ее интенсивность значительно различалась в его разных отделах: наиболее высокой она была в поле I – $0,239 \pm 0,027$ усл. ед.; в поле III, и зубчатой извилине она составляла $0,130 \pm 0,019$ и $0,113 \pm 0,024$ усл. ед. соответственно. Обсуждаются возможные различия влияния NO-синтазы неокортекса и гиппокампа, обусловленные различиями плотности расположения НАДФН-д-позитивных нейронов и ее активностью в разных зонах коры.

Ключевые слова: мозг, NO-синтаза, неокортекс, гиппокамп.

B.Ya. Rizhavskii, D.I. Zhilnikov

HISTOCHEMICAL ANALYSIS OF PECULIARITIES OF REACTIONS TO NO-SYNTHASE IN NEURONS OF NEOCORTEX AND HIPPOCAMPUS IN THE BRAIN OF RATS

Far Eastern State Medical University, Khabarovsk

Summary

The authors studied the activity of NO-synthase by histochemical reactions to NADFN-dehydrogenize in neocortex and different compartments of hippocampus (field I, dentate gyrus). In pre-frontal cortex, neocortex pre-parietal and parietal proper lobe, the reaction to NO-synthase was registered in a small number of neurons located separately or in groups of two-three cells primarily in layers III-V. Reaction product was found in cellular bodies and processes. The form of their

pericariones was pyramidal, oval, spindle, angular, 20-40 mkm in size. Cortex columns or (less frequently), were closer to parallel surface of the cortex. Processes direction was consistent with the direction of cortex columns or (less frequently), was closer to parallel surface of the cortex. Reaction intensity in those cells was equal to $0,318 \pm 0,024$ relative units. In hippocampus. A positive reaction to NADFN-d was observed on the majority of neurons. Its intensity was significantly different in different compartments: the highest was in the field I – $0,239 \pm 0,027$ relative units; in field III, and dentate gyrus it comprised $0,130 \pm 0,019$ и $0,113 \pm 0,024$ relative units respectively. The authors discuss differences of NO-synthase of neocortex and hippocampus effects explained by the differences in density of NADFN-d positive neurons location and its activity in different zones of the brain.

Key words: brain, NO-synthase, neocortex, hippocampus.

NO-синтаза – фермент, катализирующих реакцию, приводящую к образованию оксида азота – соединения, обладающего многочисленными эффектами: сосудорасширяющим действием, способностью влиять на интенсивность гибели клеток, выступать в качестве объемного нейротрансмиттера, оказывать прямое или опосредованное модуляторное влияние на нейроны разных отделов головного мозга (ГМ) [1, 3, 6, 7, 10, 13]. Концентрация NO в органах, в том числе ГМ, зависит от активности NO-синтаз и числа клеток, проявляющих ее [3, 6]. Нейроны, содержащие NO-синтазу, находятся в разных отделах ЦНС и ганглиях периферической нервной системы. В коре полушарий NO-синтазу содержат в среднем 2 % процента нейронов. Максимальное количество нейронов ГМ, содержащих этот фермент, расположено в коре мозжечка – клетках-зернах и корзинчатых клетках [3, 6].

Многочисленные исследования показали, что об активности NO-синтазы, распределении клеток, продуцирующих оксид азота, можно судить по интенсивности гистохимической реакции на НАДФН-дегидрогеназу (НАДФН-д) после обработки исследуемого материала формалином [7, 8, 10, 11, 16]. При этом были получены данные, свидетельствующие, в частности, о том, что в префронтальной коре 7-дневных крыс наблюдались биполярные НАДФН-д-содержащие нейроны с коротким дендритом. В течение второй постнатальной недели такие нейроны были в основном биполярными и редко – мультиполярными. У трехнедельных крыс НАДФН-д-позитивные нейроны были мультиполярными, имели длинные дендриты. Таким образом, нитрергические нейроны дифференцируются в неокортексе в течение короткого периода времени в неонатальном и молочном периодах онтогенеза [11]. В мозолистом теле нейроны, проявляющие активность НАДФН-д, располагаются преимущественно в латеральной зоне, в медиальных областях их очень мало или они отсутствуют. Форма их перикарионов – биполярная, веретенообразная, округлая; мультиполярная и пирамидальная [7]. В стриатуме и субталамическом ядре оксид азота является основным нейротрансмит-

тером, связанным с моторным контролем, а численная плотность и размеры нитрергических нейронов не изменяются в процессе старения [13]. В гипоталамусе новорожденных и взрослых самок-мышей нейроны, экспрессирующие NO-синтазу, локализованы преимущественно в зонах, участвующими в контроле энергетического баланса и размножения, причем большая часть этих нейронов экспрессируют рецептор эстрогена [9]. В гиппокампе крыс синтазу оксида азота коэкспрессируют большинство соматостатин-позитивных интернейронов [17].

Экспериментальные воздействия оказывают влияние на НАДФН-д-позитивные нейроны. Так, повторное введение кортикостерона вызывает дефицит рилин-позитивных клеток субгранулярной зоны зубчатой извилины, обладающих и NO-синтазной активностью, тормозит созревание нейронов у новорожденных и приводит к снижению численной плотности клеток, экспрессирующих рилин и NO-синтазу в субгранулярной зоне зубчатой извилины [12].

Имеющиеся данные свидетельствует о том, что активность NO-синтазв ГМ может влиять как на специфические функции его нейронов, так и на обще метаболические процессы в органе, причем выраженность этих влияний зависит от отдела ГМ, что в значительной мере определяет интерес к ее изучению. При этом, по нашему мнению, заслуживает внимания исследование связи между характером онтогенетического развития ГМ, старения его различных отделов [4, 5], с одной стороны, и свойствами популяции нейронов, продуцирующих оксид азота, с другой. Важной предпосылкой для выявления и анализа таких связей могут служить исследования, включающие количественную оценку активности NO-синтаз в клетках разных отделов ГМ и, кроме этого, учитывающие численную плотность таких клеток.

Вышеизложенное определило *цель настоящей работы* – описать особенности реакции на НАДФН-д в нейронах неокортекса и разных отделов гиппокампа крыс, оценить их количественно.

Материалы и методы

Работа проведена на ГМ 5 взрослых крыс Вистар в возрасте 3-5 месяцев. Содержание животных и эвтаназия проводились согласно «Правилам проведения работ с экспериментальными животными» (Приложение к приказу МЗ СССР №755 от 12.08.1977г.). ГМ животных тотчас после эвтаназии извлекался, правое полушарие фиксировали в 4 % растворе холодного 4 % раствора формальдегида в фосфатном буфере (рН 7,4) в течение 6-8 часов в холодильнике, после чего помещали в 15 % раствор сахарозы на 16-20 часов. На

криостатных срезах толщиной 20 мкм при 37 °С проводили реакцию на НАДФН-д по [2]. Время инкубации равнялось 30 минутам. Препараты заключались в глицерин-желатину и бальзам. Проводили контроли: 1) с инкубационным раствором, не содержащим НАДФН; 2) со срезами, полученными из полушария, не фиксированного предварительно формалином.

Изучались препараты, полученные из срезов префронтальной, переднетеменной, собственно теменной областей ГМ. Препараты из срезов, прошедших че-

рез собственно теменную долю, фотографировали в стандартных условиях, вводили микрофотографии в программу ВидеоТест – Морфология 5,0, проводили фотометрическое определение оптической плотности продуктов реакции в цитоплазме нейронов неокортекса (в связи с малым числом НАДФН-д-положительных клеток в неокортексе – в 10 клетках в каждом случае), а также поля I, поля III и зубчатой извилины гиппокампа

Результаты и обсуждение

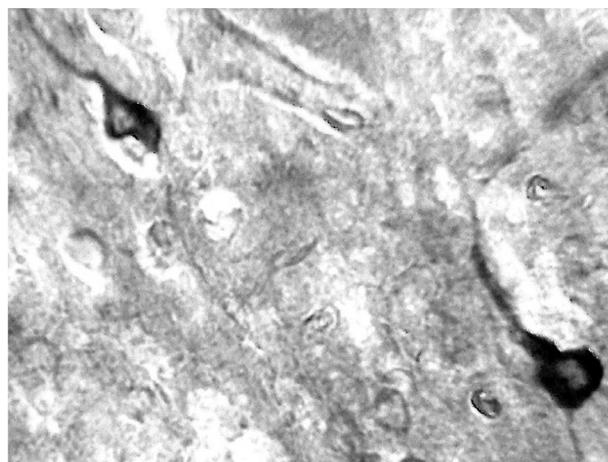
Изучение неокортекса в префронтальной, переднетеменной и собственно теменной доле показало, что подавляющее большинство нейронов в них имеет очень слабую окраску продуктами реакции – на уровне фона или незначительно превышает этот уровень. В то же время, во всех исследованных отделах неокортекса имеется небольшое число нейронов, дающих реакцию очень высокой интенсивности на НАДФН-д. Эти нейроны располагаются изолированно или группами по 2-3 клетки. Их перикарионы также отростки окрашиваются в интенсивно синий цвет. Направление отростков этих клеток обычно соответствует ходу корковых колонок, реже оно близко параллельно поверхности коры (рис. 1а, б, в). Наиболее часто такие нейроны локализуются в слоях III-V коры, хотя встречаются и в слоях II и VI. Иногда наблюдаются нейроны, отростки которых контактируют с кровеносными сосудами или – с перикарионами и отростками других НАДФН-д-положительных нейронов. Форма тела этих клеток-веретеновидная, пирамидная, овальная, угловатая, размеры их перикарионов – 25-40 мкм. Фотометрическое изучение показало, что в собственно теменной доле интенсивность реакции в их цитоплазме составляет $0,318 \pm 0,024$ усл. ед. (рис. 1а, б, в).

В отличие от неокортекса, в гиппокампе положительную реакцию на НАДФН-д дают большинство нейронов. При этом ее интенсивность ниже ($P < 0,05$), чем в НАДФН-д-положительных нейронах неокортекса и значительно различается в исследованных отделах гиппокампа (рис. 2-4). Наибольшая активность НАДФН-д была характерна для гиппокампальных нейронов поля I, где она составила $0,239 \pm 0,027$ усл. ед. В поле III и зубчатой извилине она существенно ниже: $0,130 \pm 0,019$ усл. ед. и $0,113 \pm 0,024$ усл. ед. соответственно. При этом различия интенсивности НАДФН-д в нейронах поля I с таковой в поле III и зубчатой извилине статистически значимы ($P < 0,05$). Следует также отметить, что в поле I гиппокампа продукты реакции обнаруживаются во всех нейронах, а интенсивность реакции в них довольно близкая (рис. 2). В противоположность этому, нейроны в поле III, а также в зубчатой извилине заметно различаются по активности фермента (рис. 3, 4).

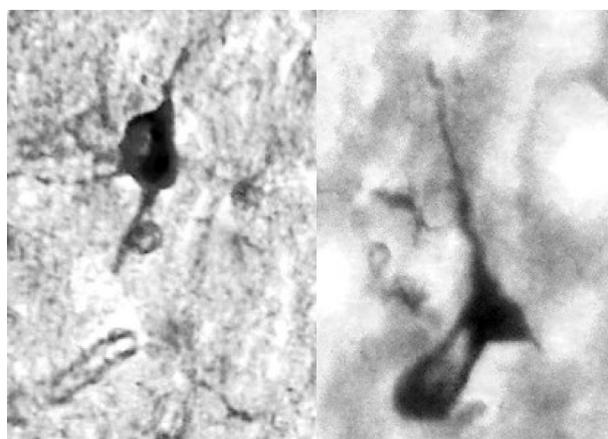
Полученные в работе результаты согласуются с данными литературы о выраженных различиях активности NO-синтазы в разных отделах ГМ. Во-первых, это касается нейронов неокортекса, где лишь небольшая их доля дает положительную реакцию на этот фермент. При этом активность НАДФН-д в этих нейронах неокортекса превосходит ее в исследованных нейронах гиппокампа в 1,3 – 2,8 раз. Заслуживает внимания и тот факт, что высокая активность фермента наблю-

(по 25 клеток каждой локализации в каждом случае). Размеры перикарионов нейронов неокортекса измеряли окуляр-микрометром МОВ-15. Статистическую обработку данных фотометрии проводили в программе Statistica-6 (опция «дескриптивная статистика», с определением средней арифметической и ошибки средней). Различия сравниваемых величин считались достоверными при $P < 0,05$.

дается как в перикарионах, так и в отростках клеток неокортекса, что позволяет полагать, что небольшое число нейронов неокортекса, имеющих признаки интенсивной выработки оксида азота, могут транспортировать его на значительные расстояния. Это важно, поскольку оксид азота – это молекула с небольшой продолжительностью жизни, способная диффундировать в ткани ГМ лишь на небольшие расстояния [3, 6]. Кроме того, можно предполагать, что особенности распределения и высокая активность NO-синтазы лишь в небольшом количестве нейронов неокортекса создают условия для осуществления преимущественно «точечных» регулирующих воздействий на клетки-мишени (в том числе, другие нейроны, клетки кровеносных сосудов), расположенные близко от перикариона и отростков НАДФН-д-положительных нейронов, не вызывая при этом существенных изменений концентрации оксида азота в значительных объемах ткани неокортекса.



А



Б

Б'

Рис. 1. Неокортекс. Реакция на НАДФН-д. Нейроны, имеющие высокую активность. Увеличение 15×100

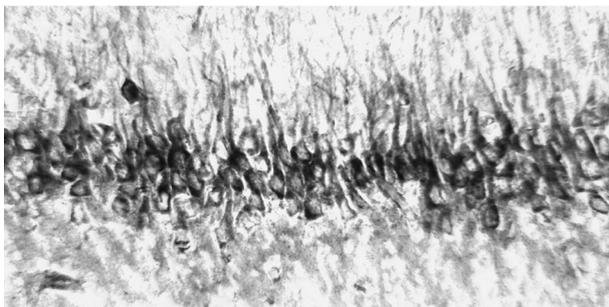


Рис. 2. Поле I гиппокампа. Реакция на НАДФН-д.
Увеличение 15×40

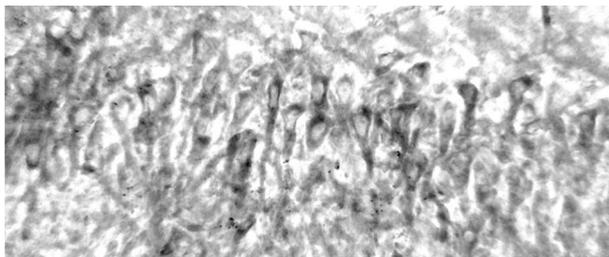


Рис. 3. Поле III гиппокампа. Реакция на НАДФН-д.
Увеличение 15×40

В гиппокампе характер реакции на НАДФН-д значительно отличается от наблюдаемого в неокортексе. В этом отделе коры, характеризующемся плотным расположением нейронов, значительная их часть (в отличие от неокортекса) проявляет активность НАДФН-д. Вследствие этого, несмотря на меньшую интенсивность реакции в нейронах гиппокампа, по сравнению с характерной для НАДФН-д-активных нейронов неокортекса, можно предполагать, что как ее повышение, так и понижение, суммируясь, может

оказывать и «диффузный», «объемный», эффект на близлежащие структуры. В то же время, это не исключает и воздействий оксида азота, выделяющегося как из тел нейронов, так и их отростков, на определенные структуры-мишени. Выраженные отличия интенсивности реакции в поле I, III, зубчатой извилине могут быть обусловлены локальными различиями строения гиппокампальных нейронов, их связей, медиаторных особенностей и функций [3, 12, 13, 15, 17].

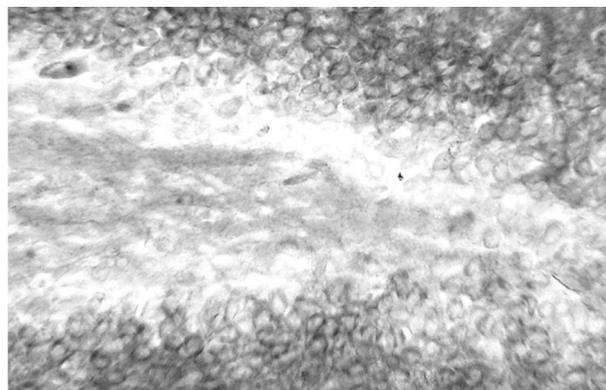


Рис. 4. Зубчатая извилина гиппокампа.
Реакция на НАДФН-д. Увеличение 15×40

Таким образом, в работе показаны отличия, в том числе количественные, реакции на NO-синтазу (по активности НАДФН-д) в неокортексе и ряде отделов гиппокампа молодых взрослых крыс. Эти результаты могут учитываться при изучении механизмов изменений ГМ, в процессе онтогенетического развития органа, а также – при экспериментальных воздействиях, влияющих на состояние ЦНС и при патологии ГМ.

Литература

1. Дудина Ю.В. Симптоматическая височная эпилепсия. – Владивосток 2008. – 300 с.
2. Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. – М.: Мир, 1982. – 272 с.
3. Мотавкин П.А. Введение в нейробиологию. – Владивосток: Медицина-ДВ, 2003. – 251 с.
4. Рыжавский Б.Я. Развитие головного мозга: отдаленные последствия влияния некомфортных условий. – Хабаровск: Издательство Дальневосточного государственного медицинского университета, 2009. – 278с.
5. Рыжавский Б.Я., Ковальский Г.Б. Старение. Адаптация. Обратимость. – Владивосток: Изд-во Дальневосточного университета, 1992. – 159 с.
6. Сосунов А.А. Оксид азота как межклеточный посредник // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – № 12. – С. 27-34.
7. Barbaresi P., Fabri M., Mensà E. Characterization of NO-producing neurons in the rat corpus callosum // Brain Behav. – 2014. – Vol. 4, № 3. – P. 317-336.
8. Bredt D.S., Glatt C.E., Hwang P.M., et al. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase // Neuron. – 1991. – Vol. 7, № 4. – P. 615-624.
9. Chachlaki K., Malone S.A., Qualls-Creekmore E., et al. Phenotyping of nNOS neurons in the postnatal and adult female mouse hypothalamus // J. Comp. Neurol. – 2017. – Vol. 525, № 15. – P. 3177-3189.
10. Hope B.T., Michael G.J., Knigge K.M., et al. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase // Proc. Natl. Acad. Sci USA. – 1991. – Vol. 88, № 7. – P. 2811-2814.
11. Hvizdosova N., Tomasova L., Bolekova A., et al. Nitregic neurons during early postnatal development of the prefrontal cortex in the rat: histochemical study // Acta Histochem. – 2014. – Vol. 116, № 5. – P. 736-739.
12. Romay-Tallon R., Rivera-Baltanas T., Kalynchuk L.E., Caruncho H.J. Differential effects of corticosterone on the colocalization of reelin and neuronal nitric oxide synthase in the adult hippocampus in wild type and heterozygous reeler mice // Brain Res. – 2015. – Vol. 12, № 1594. – P. 274-283.
13. Santos-Lobato B.L., Del-Bel E.A., Pittella J.E., Tumas V. Effects of aging on nitregic neurons in human striatum and subthalamic nucleus // Arq Neuropsiquiatr. – 2015. – Vol. 73, № 9. – P. 779-783.
14. Vila-Verde C., Marinho A.L., Lisboa S.F., Guimarães F.S. Nitric oxide in the prelimbic medial prefrontal cortex is involved in the anxiogenic-like effect induced by acute restraint stress in rats // Neuroscience. – 2016. – Vol. 21, № 320. – P. 30-42.

15. Yamamoto T., Nakayama T., Yamaguchi J., et al. Role of the NMDA receptor GluN2D subunit in the expression of ketamine-induced behavioral sensitization and region-specific activation of neuronal nitric oxide synthase // *Neurosci Lett.* – 2016. – № 610. – P. 48-53.

16. Zou S., Kumar U. Colocalization of cannabinoid receptor 1 with somatostatin and neuronal nitric oxide synthase in rat brain hippocampus // *Brain Res.* – 2015. – Vol. 5, № 1622. – P. 114-126.

Literature

1. Dudina Yu.V. Symptomatic temporal lobe epilepsy. – Vladivostok, 2008. – 300 p.

2. Loida Z., Gossrau R., Shibley T. Histochemistry of enzymes. Laboratory methods. – M.: «Mir», 1982. – 272 p.

3. Motavkin P.A. Introduction into neurobiology. – Vladivostok: Far Eastern Medicine, 2003. – 251 p.

4. Ryzhavsky B.Ya. Development of the brain: remote consequences of exposure to uncomfortable conditions. – Khabarovsk: FESMU Publishing House, 2009. – 278 p.

5. Ryzhavsky B.Ya., Kovalsky G.B. Aging. Adaptation. Reversibility. – Khabarovsk: FESMU Publishing House, 1992. – 159 c.

6. Sosunov A.A. Nitric oxide as an intercellular mediator // *Soros Educational Journal.* – 2000. – № 12. – P. 27-34.

7. Barbaresi P., Fabri M., Mensà E. Characterization of NO-producing neurons in the rat corpus callosum // *Brain Behav.* – 2014. – Vol. 4, № 3. – P. 317-336.

8. Bredt D.S., Glatt C.E., Hwang P.M., et al. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase // *Neuron.* – 1991. – Vol. 7, № 4. – P. 615-624.

9. Chachlaki K., Malone S.A., Qualls-Creekmore E., et al. Phenotyping of nNOS neurons in the postnatal and adult female mouse hypothalamus // *J. Comp. Neurol.* – 2017. – Vol. 525, № 15. – P. 3177-3189.

10. Hope B.T., Michael G.J., Knigge K.M., et al. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase //

Proc. Natl. Acad. Sci USA. – 1991. – Vol. 88, № 7. – P. 2811-2814.

11. Hvizdosova N., Tomasova L., Bolekova A., et al. Nitroergic neurons during early postnatal development of the prefrontal cortex in the rat: histochemical study // *Acta Histochem.* – 2014. – Vol. 116, № 5. – P. 736-739.

12. Romay-Tallon R., Rivera-Baltanas T., Kalynchuk L.E., Caruncho HJ. Differential effects of corticosterone on the colocalization of reelin and neuronal nitric oxide synthase in the adult hippocampus in wild type and heterozygous reeler mice // *Brain Res.* – 2015. – Vol. 12, № 1594. – P. 274-283.

13. Santos-Lobato B.L., Del-Bel E.A., Pittella J.E., Tumas V. Effects of aging on nitroergic neurons in human striatum and subthalamic nucleus // *Arq Neuropsiquiatr.* – 2015. – Vol. 73, № 9. – P. 779-83.

14. Vila-Verde C., Marinho A.L., Lisboa S.F., Guimarães F.S. Nitric oxide in the prelimbic medial prefrontal cortex is involved in the anxiogenic-like effect induced by acute restraint stress in rats // *Neuroscience.* – 2016. – Vol. 21, № 320. – P. 30-42.

15. Yamamoto T., Nakayama T., Yamaguchi J., et al. Role of the NMDA receptor GluN2D subunit in the expression of ketamine-induced behavioral sensitization and region-specific activation of neuronal nitric oxide synthase // *Neurosci Lett.* – 2016. – № 610. – P. 48-53.

16. Zou S., Kumar U. Colocalization of cannabinoid receptor 1 with somatostatin and neuronal nitric oxide synthase in rat brain hippocampus // *Brain Res.* – 2015. – Vol. 5, № 1622. – P. 114-126.

Координаты для связи с авторами: Рыжавский Борис Яковлевич – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии ДВГМУ, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru; Жильников Дмитрий Игоревич – аспирант кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ДВГМУ.

