

nervous system by two novel monoclonal antibodies // J. Chem. Neuroanat. 2011. Vol. 41. P. 97–110.

23. Witt M., Bormann K., Gudziol V., et al. Biopsies of olfactory epithelium in patients with Parkinson's disease // Mov. Disord. 2009. Vol. 24, № 6. P. 906–914.

Поступила в редакцию 15.06.2016
Получена после доработки 12.01.2017

LOCALIZATION OF ALPHA-SYNUCLEIN IN RAT BRAIN AND ITS INTERRELATION WITH THE DOPAMINERGIC STRUCTURES

D.N. Voronkov, R.M. Khudoyerkov, O.V. Sal'nikova, V.B. Sobolev

Localization of alpha-synuclein (α -Syn — the protein found in Lewy bodies in Parkinson's disease) and tyrosine hydroxylase

(a marker of dopamin- and noradrenergic neurons) were studied by immunohistochemical methods in brain structures of intact Wistar rats ($n = 5$) and compared with the data obtained after destruction of substantia nigra ($n = 3$). Localization of α -Syn in synaptic structures of basal ganglia corresponded to cortico-striatal and strio-nigral projections, which was confirmed experimentally. In the cell bodies of dopamin- and noradrenergic neurons, α -Syn was found in the substantia nigra, locus coeruleus and in the dorsal nucleus of nervus vagus, prone to neurodegeneration in Parkinson's disease. High α -Syn content was also found in sensory olfactory neurons and glomeruli of the olfactory bulbs.

Key words: brain, basal ganglia, dopaminergic systems, alpha-synuclein, tyrosine hydroxylase

Laboratory of Functional Morpho-chemistry, Department of Brain Research, Research Center of Neurology, Moscow

© Коллектив авторов, 2017
УДК 611.813.3:612.67:599.323.4

А.В.Смирнов^{1,3}, Н.В.Григорьева¹, М.Р.Экова¹, М.В.Шмидт^{1,3}, И.Н.Тюренок², Д.В.Куркин², Е.В.Волотова²

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВЕНТРАЛЬНОГО ОТДЕЛА ГИППОКАМПА КРЫС ПРИ СТАРЕНИИ С УЧЕТОМ ЭКСПРЕССИИ ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ И ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗ

¹ Кафедра патологической анатомии (зав. — проф. А.В.Смирнов), ² кафедра фармакологии и биофармации факультета усовершенствования врачей (зав. — чл.-кор. РАН И.Н.Тюренок), Волгоградский государственный медицинский университет, ³ лаборатория морфологии, иммуногистохимии и канцерогенеза (зав. — проф. А.В.Смирнов), Волгоградский медицинский научный центр

Изучены структурные изменения в полях CA1 и CA3 вентрального отдела гиппокампа у 12- и 24-месячных крыс ($n = 20$). Парафиновые срезы головного мозга окрашивали по методу Ниссля, определяли удельное количество сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы, изменение уровня экспрессии индуцибельной и эндотелиальной NO-синтаз (iNOS, eNOS). У старых (24-месячных) крыс выявлены наиболее выраженные признаки повреждения нейронов в пирамидном слое поля CA3 гиппокампа. Обнаружено увеличение доли сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы, уменьшение относительной плотности расположения нейронов, перичеселлюлярный отёк, вакуолизация цитоплазмы. Выявлено также увеличение экспрессии iNOS в нейронах пирамидного слоя поля CA3 и снижение экспрессии eNOS в полях CA1 и CA3 как в нейронах, так и в эндотелиоцитах сосудов микроциркуляторного русла по сравнению с таковыми у 12-месячных животных.

Ключевые слова: гиппокамп, нейроны, старение, iNOS, eNOS

В процессе физиологического старения человека когнитивные функции постепенно снижаются, при этом вероятность возникновения нейродегенеративных расстройств увеличивается,

начиная с 6-го десятилетия жизни [18]. Старение приводит к функциональным изменениям в головном мозгу, в частности в гиппокампе, который играет ключевую роль в механизмах памяти и

Сведения об авторах:

Григорьева Наталья Владимировна (e-mail: ngrigorievavsmu@gmail.com), *Экова Мария Рафаэлевна* (e-mail: maria.ekova@mail.ru),

Тюренок Иван Николаевич (e-mail: fibfuv@mail.ru), *Куркин Денис Владимирович* (e-mail: strannik986@mail.ru),

Волотова Елена Владимировна (e-mail: evv.md.@yandex.ru), кафедра патологической анатомии, кафедра фармакологии и биофармации факультета усовершенствования врачей, Волгоградский государственный медицинский университет, 400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

Смирнов Алексей Владимирович (e-mail: alexey-smirnov@rambler.ru), *Шмидт Максим Вячеславович* (e-mail: schmidtmed@mail.ru), лаборатория морфологии, иммуногистохимии и канцерогенеза, Волгоградский медицинский научный центр, 400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

обучения. Возрастные изменения в гиппокампе связаны в первую очередь со сморщиванием нейронов, а не с их гибелью. Исследования старения животных демонстрируют снижение плотности расположения во всех зонах нейронов гиппокампа и числа дендритных шипиков в поле CA1 [8, 11, 12]. С возрастом увеличивается удельный объем нейропиля [11]. Цитоархектонически гиппокамп представляет собой сложную структуру, и в разных его отделах выраженность возрастных изменений, вероятно, варьирует и имеется их передне-задний градиент. Для пресенильной формы болезни Альцгеймера и для пациентов с возрастными изменениями головного мозга, не связанными с ней, менее характерны атрофические изменения вентрального отдела гиппокампа. Однако при сенильной форме болезни Альцгеймера отмечено значительное уменьшение объема последнего, что свидетельствует о его большей восприимчивости к дегенеративным изменениям [11]. Оксид азота (NO) играет важную роль как в процессе физиологического старения, так и в возникновении нейродегенеративных заболеваний на его этапах [3, 9]. NO является внутри- и межклеточным мессенджером и синтезируется тремя изоформами NO-синтаз: конститутивными нейрональной (nNOS) и эндотелиальной (eNOS), а также индуцибельной (iNOS) [5]. Повышенная экспрессия NO-синтаз наблюдается в головном мозгу при многих патологических процессах [20]. Согласно одной из гипотез старения, избыточный синтез NO при активации iNOS в головном мозгу приводит не только к развитию повреждений в клетках, но и посредством глутаматзависимого NO-сигнального пути может приводить к дегенеративным изменениям в нейронах во многих отделах головного мозга, включая гиппокамп [5]. Повторяющиеся инфекции ЦНС и других органов могут привести к активации iNOS в головном мозгу и увеличить концентрацию NO, который может способствовать реализации механизмов эксайтотоксичности и дегенерации нервных клеток [10]. Считается, что индукция iNOS не происходит во время физиологического старения [4, 6, 15, 16], однако признается существенная роль системы NOS/NO в этом процессе Liu и соавт. [15–17]. Хотя классические взгляды указывают на роль nNOS в нейрональных моделях пластичности, данные, полученные с использованием нокаутных мышей, демонстрируют ключевую роль eNOS в указанных процессах. Описано отсутствие влияния nNOS нокаута на процессы обучения и памяти при моделировании различной патологии [4, 21]. Учитывая экспрессию eNOS

не только в эндотелии кровеносных сосудов, но и в астроглиоцитах и нейронах гиппокампа [16, 21], необходимо отметить, что когнитивные нарушения у eNOS-дефицитных мышей сопровождаются селективной потерей эндотелиального NO [21].

Цель данного исследования — изучение структурных изменений в полях CA1 и CA3 вентрального отдела гиппокампа у 12- и 24-месячных крыс с учётом экспрессии индуцибельной и эндотелиальной нитрооксидсинтаз.

Материал и методы. Исследование проведено на 20 нелинейных белых крысах-самцах в возрасте 12 и 24 мес (ФГПУ Питомник лабораторных животных «Рапполово») с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Были сформированы 2 группы по 10 животных в каждой: 1-я группа — крысы в возрасте 12 мес, 2-я группа — 24 мес. Животных содержали в стандартных условиях вивария с естественным 12-часовым свето-темновым циклом (ГОСТ Р 50258–92). Эвтаназию проводили с помощью гильотинного метода с использованием «Гильотины для крыс» (AE0702, производитель «Open Science»). Головной мозг извлекали из полости черепа полностью и разрезали на 4 участка во фронтальной плоскости: 1-я линия разреза — на уровне прехиазматической области, 2-я — на уровне задней поверхности сосцевидных тел, 3-й линией отсекали мозжечок со стволом мозга. Головной мозг фиксировали в нейтральном забуференном 10% формалине. Для получения препаратов гиппокампа 2-й участок заливали в парафин по стандартной методике и изготавливали серийные срезы толщиной 5,0 мкм [2]. Фронтальные срезы головного мозга окрашивали гематоксилином — эозином, тионином по методу Ниссля и изучали на уровне от –4,56 мм до –6,12 мм относительно брегмы [19].

Определяли удельное количество сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы. Для иммуногистохимического исследования парафиновые срезы подвергали депарафинизации. Высокотемпературную демаскировку антигенных детерминант проводили с помощью нагревания срезов в 10 мМ растворе цитратного буфера (pH 6,0) (Thermo Scientific, Fremont, CA, США) при 98 °C в течение 20 мин с последующим охлаждением при комнатной температуре в течение 20 мин. В качестве промывочного буфера использовали 20% TBS IHC Wash Buffer with Tween 20 (Cell Marque, США). Для блокирования эндогенной пероксидазы применяли 3% раствор H₂O₂ (Cell Marque, США). С целью определения экспрессии нитрооксидсинтаз в качестве первичных антител использовали поликлональные кроличьи антитела к iNOS (разведение 1:100; Thermo Scientific, NeoMarkers, Fremont, CA, США) и eNOS (разведение 1:50; Thermo Scientific, NeoMarkers, Fremont, CA, США). В качестве визуализирующей системы использовали полимерную систему UltraVision Quanto Detection System HRP Polymer (Thermo Scientific, Fremont, CA, США). В качестве хромогена применяли 1% раствор 3,3-диаминобензидина (Thermo Scientific, Fremont, CA, США), затем препараты докрашивали гематоксилином Карацци (БиоВитрум, Россия) и заключали в монтирующую среду (Bio-Mount, Bio-Optica, Италия). В качестве позитивного контроля при определении экспрессии iNOS и eNOS в соответствии с протоколом фирмы производителя (Thermo

Scientific, NeoMarkers, Fremont, CA, США) выступала ткань лёгких. Негативным контролем служили срезы с экспериментальным материалом, на которые наносили разбавитель антител (Cell Marque, США), но не наносили первичные антитела. Оценку изменений уровня экспрессии нитрооксидсинтаз определяли путём подсчёта удельного количества иммунопозитивных нейронов, определения относительной площади иммунопозитивного материала в полях CA1 и CA3 с использованием программы «Видеотест-Морфо-4» (Россия), а также интенсивности окрашивания в баллах от 0 до 3 (0 — иммунонегативная реакция; 1 — слабо выраженное окрашивание; 2 — умеренно выраженное окрашивание; 3 — максимально выраженное окрашивание). Исследование микропрепаратов проводили с помощью микроскопа «Micros» (Австрия), фотодокументирование осуществляли используя камеру «Olympus» (Япония). Статистическую обработку данных проводили пользуясь пакетом программ Statistica 6.0 (StatSoft, США). Обобщенные данные представляли в виде медианы (Me) с указанием интерквартильного интервала (Q1; Q3), где Q1 — 25%, Q3 — 75%. Различия между группами оценивали с использованием непараметрического t-критерия Манна—Уитни и считали статистически значимыми при $P < 0,05$.

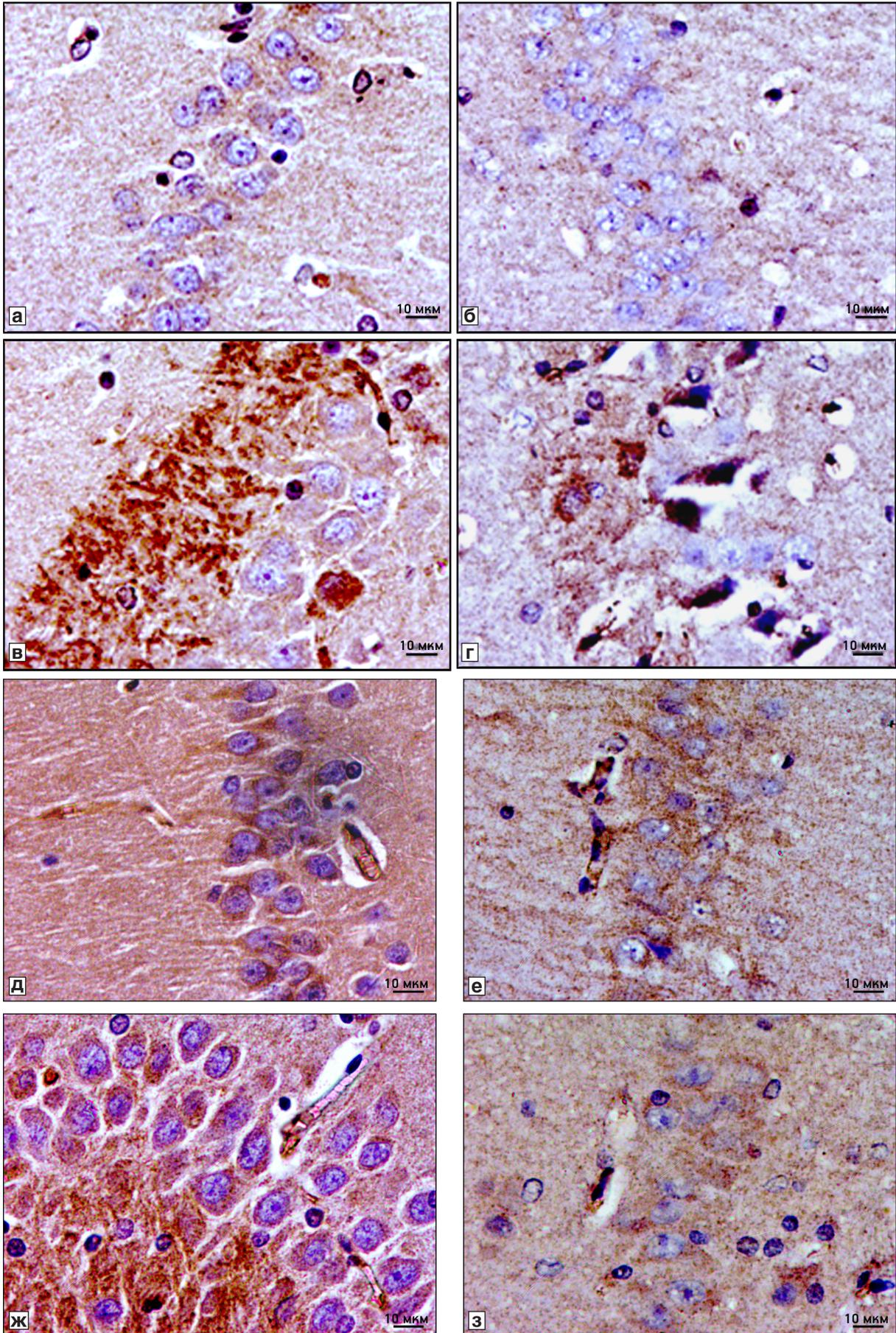
Результаты исследования. При микроскопическом исследовании поля CA1 вентрального отдела гиппокампа у 12- и 24-месячных крыс не было выявлено существенных различий в строении пирамидного слоя. Тела нейронов характеризовались полигональной формой с центрально расположенным округлым ядром, как правило, с хорошо выраженным ядрышком. В цитоплазме отмечалось равномерное распределение пылевидного и мелкоглобулярного хроматофильного вещества. Встречались единичные гиперхромные нейроны, которые мы расценивали как слабоизмененные. Удельное количество сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы составило 7,7 (2,9; 12)% у 12-месячных животных и 7,4 (5,6; 12)% — у 24-месячных ($P > 0,05$). В поле CA3 нейроны пирамидного слоя располагались более рыхло, имели полигональную форму тела с пузырьковидным ядром и одним ядрышком. При этом у старых (24-месячных) крыс многие нейроны характеризовались уменьшением размеров и извитой формой перикарионов, с базофильной цитоплазмой. Удельное количество сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы составило 12,5 (9,8; 15)% у 12-месячных крыс и 25,9 (15,7; 52,7)% — у 24-месячных животных ($P < 0,001$). В пирамидном слое наблюдался перичеселлюлярный отёк, в отдельных нейронах — явления вакуолизации цитоплазмы перикариона. Отмечалось уменьшение относительной плотности расположения нейронов.

При иммуногистохимическом исследовании гиппокампа 12-месячных крыс с использованием

антител к iNOS отмечалась пылевидная, слабо выраженная экспрессия (1 балл) иммунопозитивного материала (ИПМ) в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя, а также в нейропиле радиального слоя (1 балл) поля CA1. В дендритах пирамидных нейронов, расположенных в радиальном слое, выраженность экспрессии была слабее, чем в окружающем нейропиле. В краевом слое обнаруживались единичные нейроны со слабовыраженной экспрессией ИПМ в цитоплазме их перикарионов (1 балл). Отмечалась умеренно выраженная цитоплазматическая экспрессия ИПМ (2 балла) в отдельных нейронах пирамидного, радиального и молекулярного слоёв. Кроме того, наблюдалась умеренно выраженная экспрессия (2 балла) в эндотелии капилляров поля CA1 (рисунки, а, в, д, ж).

В пирамидном слое поля CA1 вентрального отдела гиппокампа у 24-месячных крыс большинство нейронов характеризовались слабовыраженной цитоплазматической экспрессией iNOS-позитивного материала (1 балл), отмечалось увеличение количества нейронов с умеренно выраженной цитоплазматической экспрессией ИПМ (2 балла). В дендритах нейронов в радиальном слое наблюдалась слабовыраженная пылевидная экспрессия ИПМ (1 балл). В краевом и молекулярном слоях гиппокампа встречались нейроны с умеренно- и сильновыраженной цитоплазматической экспрессией ИПМ (3 балла) (см. рисунок, б, г, е, з). Значимых различий изменений уровня экспрессии иммунопозитивных нейронов и относительной площади ИПМ в пирамидном слое поля CA1 у 12- и 24-месячных крыс обнаружено не было ($P > 0,05$).

В поле CA3 вентрального отдела гиппокампа 12-месячных крыс экспрессия iNOS-позитивного материала была обнаружена в нейропиле и в единичных нейронах радиального слоя гиппокампа, которая имела умеренный характер (2 балла), в цитоплазме перикарионов остальной части нейронов наблюдалась слабовыраженная экспрессия ИПМ (1 балл). В нейронах пирамидного слоя отмечалась слабая цитоплазматическая экспрессия ИПМ (1 балл), встречались единичные нейроны с умеренно выраженной цитоплазматической экспрессией ИПМ. В молекулярном слое обнаруживались нейроны со слабой цитоплазматической экспрессией ИПМ (1 балл). Перикарионы нейронов краевого слоя имели умеренно выраженную экспрессию ИПМ (2 балла), в нейропиле отмечалась слабовыраженная экспрессия (1 балл). В эндотелии капилляров наблюдалась умеренно



выраженная экспрессия ИПМ (2 балла) (см. рисунок).

У 24-месячных крыс, в отличие от 12-месячных, в нейропиле радиального слоя поля СА3 гиппокампа отмечалась слабо выраженная экспрессия iNOS-позитивного материала (1 балл). В пирамидном слое в большинстве нейронов наблюдался пылевидный ИПМ (1 балл), встречались единичные нейроны с умеренной и отчетливо выраженной экспрессией ИПМ в перикарионах (см. рисунок). Отмечалось увеличение удельного количества иммунопозитивных нейронов в пирамидном слое поля СА3 на 38,6%, по сравнению с таковым в группе 12-месячных животных, достигающее 46,7 (19,2; 66,7)% ($P < 0,001$). Значимых различий изменений относительной площади ИПМ в пирамидном слое поля СА3 у 12- и 24-месячных крыс обнаружено не было. В молекулярном и краевом слоях поля СА3 у 24-месячных крыс наблюдалась умеренная степень экспрессии ИПМ в перикарионах нейронов (2 балла), единичные нейроны краевого слоя характеризовались значительно выраженной экспрессией ИПМ в цитоплазме (3 балла). В эндотелиоцитах капилляров наблюдалась умеренная степень экспрессии ИПМ (2 балла).

При иммуногистохимическом исследовании гиппокампа 12-месячных крыс с использованием антител к eNOS перикарионы большинства нейронов пирамидного слоя поля СА1 характеризовались умеренной степенью экспрессии ИПМ (2 балла), однако встречались нейроны и со слабо выраженной степенью экспрессии. В дендритах нейронов радиального слоя экспрессия ИПМ имела чередующийся характер, от слабо- (1 балл) до умеренновыраженной (2 балла). В молекулярном слое преобладали протоплазматические астроглиоциты. В эндотелии капилляров наблюдалась умеренная степень экспрессии eNOS-позитивного материала (2 балла) (см. рисунок, е, ж).

В цитоплазме нейронов пирамидного слоя поля СА1 24-месячных крыс наблюдалось снижение уровня экспрессии eNOS-позитивного материала (1 балл) по сравнению с таковым у более молодых животных. Отмечалось значимое уменьшение удельного количества иммунопозитивных нейронов в пирамидном слое поля СА1 на 56,1% ($P < 0,001$) и относительной площади ИПМ на 24,8% ($P < 0,001$) у 24-месячных крыс по сравнению с таковыми у 12-месячных животных. Данные показатели в группе 24-месячных крыс

составили 38,9 (25; 62,5)% и 13,3 (6,3; 33,3)%, соответственно. В нейропиле радиального слоя экспрессия была слабо выраженной (1 балл) или отсутствовала. В эндотелии капилляров наблюдалась незначительная eNOS-позитивная реакция (1 балл) (см. рисунок, д, з).

Нейроны пирамидного слоя поля СА3 у 12-месячных животных характеризовались слабой цитоплазматической экспрессией eNOS-позитивного материала (1 балл), а также умеренной экспрессией ИПМ (2 балла) в единичных нейронах пирамидного слоя. В нейропиле радиального слоя отмечалась умеренно выраженная экспрессия ИПМ (2 балла). В молекулярном слое встречались единичные нейроны со слабовыраженной экспрессией ИПМ (1 балл) в перикарионах. В эндотелии капилляров наблюдалась умеренно выраженная экспрессия ИПМ (2 балла).

У 24-месячных крыс в поле СА3 наблюдалось снижение экспрессии eNOS-позитивного материала в цитоплазме нейронов пирамидного слоя, а также в нейропиле радиального слоя — слабо выраженная экспрессия (1 балл) или её отсутствие по сравнению с таковыми у 12-месячных животных (см. рисунок, з). У 24-месячных животных отмечалось значимое снижение удельного количества иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя поля СА3 на 78% ($P < 0,001$) и относительной площади ИПМ на 18,5% ($P < 0,001$) по сравнению с таковыми у 12-месячных животных. Данные показатели в группе 24-месячных крыс составили 22% (6,7; 64,5) и 14,2% (6,0; 17,3) соответственно. Нейроны и глиоциты молекулярного слоя гиппокампа характеризовались иммунонегативной реакцией (0 баллов), в нейропиле была выявлена слабо выраженная экспрессия ИПМ (1 балл). В эндотелии капилляров наблюдалась слабо выраженная экспрессия eNOS-позитивного материала (1 балл) или она отсутствовала (см. рисунок, д-з).

Обсуждение полученных данных. Обнаруженные нами у 24-месячных крыс структурные признаки повреждения нейронов преимущественно пирамидного слоя поля СА3 вентрального отдела гиппокампа свидетельствуют о нарастании выраженности дистрофических и атрофических изменений нейронов при старении в сочетании с уменьшением количества неизменённых нейронов, что соответствует данным

других исследователей о зависимости от возраста увеличении дегенеративных изменений в полях CA1, CA3 и зубчатой извилине гиппокампа у преждевременно стареющих крыс линии OXYS [1]. Признаки обратимых и необратимых повреждений нейронов в гиппокампе были значительно выражены в пирамидном слое поля CA3 у 24-месячных крыс и могут быть связаны с различными механизмами клеточной гибели. Гибель нейронов гиппокампа при старении приводит к потере памяти и способствует снижению способности к обучению [3]. Важная роль системы NO в процессе старения головного мозга обусловлена нейропротекторным и нейротоксическим действием NO [5, 6, 13]. Выявленное в нашем исследовании увеличение удельного количества iNOS-позитивных нейронов в пирамидном слое поля CA3 у 24-месячных крыс может свидетельствовать о повышенной продукции NO, что способствует накоплению свободных радикалов пероксинитритов, оказывающих нейротоксическое действие как в условиях нормального старения, так и при развитии нейродегенеративных состояний [16]. Снижение уровня экспрессии eNOS в нейронах и нейропиле различных слоёв гиппокампа, а также снижение удельного количества иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя у 24-месячных крыс по сравнению с 12-месячными животными свидетельствует об уменьшении базового уровня продукции eNOS в нервной ткани гиппокампа у стареющих животных, что отражает зависимость от возраста процессы снижения нейрональной пластичности структур гиппокампа [22]. Уменьшение уровня продукции и содержания eNOS в структурах гиппокампа в группе старых — 24-месячных животных может способствовать развитию повышенной чувствительности нейронов к ишемии при старении, так как в исследованиях, проведенных на нокаутных мышях, продемонстрировано участие eNOS в механизмах защиты нейронов головного мозга при ишемии [4, 7]. При изучении экспрессии eNOS в сосудах микроциркуляторного русла в гиппокампе выявлено практически полное исчезновение экспрессии в капиллярах и снижение уровня экспрессии в артериолах у старых крыс, что мы рассматриваем как фактор, способствующий возникновению вазоспастических реакций в сосудах головного мозга при старении, поскольку NO является мощным вазодилататором [5].

Таким образом, в процессе старения у 24-месячных крыс по сравнению с 12-месячными животными обнаруживается увеличение

количества повреждённых нейронов, атрофические изменения нейронов преимущественно в пирамидном слое поля CA3 вентрального отдела гиппокампа, сопровождающееся зависимым от возраста увеличением экспрессии iNOS в нейронах пирамидного слоя поля CA3 и снижением экспрессии eNOS в полях CA1 и CA3 как в нервных, так и в эндотелиальных клетках, что может способствовать нарушению процессов передачи нервного импульса, а также более значительному повреждению нейронов гиппокампа у старых крыс в ответ на внешние стимулы в результате снижения нейрональной пластичности и повышения чувствительности нейронов к ишемии.

Исследование выполнено при поддержке гранта ВолГМУ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Максимова К.Ю., Логвинов С.В., Стефанова Н.А. Морфологическая характеристика гиппокампа крыс линий OXYS и Вистар в процессе старения // Морфология. 2015. Т. 147, № 3. С. 11–16.
2. Тверской А.В., Должиков А.А., Бобынцев И.И. и др. Морфологические изменения нейронов областей CA1 и CA3 гиппокампа крыс при хроническом иммобилизационном стрессе (морфометрическое исследование) // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2014. № 3. С. 37–41.
3. Aliev G., Palacios H.H., Lipsitt A.E. et al. Nitric oxide as an initiator of brain lesions during the development of Alzheimer disease // Neurotox. Res. 2009. Vol. 16, № 3. P. 293–305.
4. Austin S.A., Santhanam A.V., Katusic Z.S. Endothelial nitric oxide modulates expression and processing of amyloid precursor protein // Circ. Res. 2010. Vol. 107, № 12. P. 1498–1502.
5. Calabrese V., Mancuso C., Calvani M. et al. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity // Nat. Rev. Neurosci. 2007. Vol. 8, № 10. P. 766–775.
6. Chambers R.A., Self D.W. Motivational responses to natural and drug rewards in rats with neonatal ventral hippocampal lesions: an animal model of dual diagnosis schizophrenia // Neuropsychopharmacology. 2002. Vol. 27. P. 889–905.
7. Chen J., Zacharek A., Zhang C. et al. Endothelial nitric oxide synthase regulates brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis after stroke in mice // J. Neurosci. 2005. Vol. 25, № 9. P. 2366–2375.
8. Desjardins S., Mayo W., Vallee M. et al. Effect of aging on the basal expression of c-Fos, c-Jun, and Egr-1 proteins in the hippocampus // Neurobiol. Aging 1997. Vol. 18, № 1. P. 37–44.
9. Doherty G.N. Nitric oxide in neurodegeneration: potential benefits of non-steroidal anti-inflammatories // Neurosci. Bull. 2011. Vol. 27, № 6. P. 366–382.
10. Domek-Łopacińska K.U., Strosznajder J.B. Cyclic GMP and nitric oxide synthase in aging and Alzheimer's disease // Mol. Neurobiol. 2010. Vol. 41. P. 129–137.
11. Driscoll I., Howard S.R., Stone J.C. et al. The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat // Neuroscience. 2006. Vol. 139. P. 1173–1185.

12. Falougy H., Kubikova E., Benuska J. The microscopical structure of the hippocampus in the rat // Bratisl. Lek. Listy. 2008. Vol. 109, № 3. P. 106–109.
13. Garry P.S., Esra M., Rowland M.S. et al. The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment — from bench to bedside // Exp. Neurol. 2015. Vol. 263. P. 235–243.
14. Jęško H., Chalimoniuk M., Strosznajder J.B. Activation of constitutive nitric oxide synthase(s) and absence of inducible isoform in aged rat brain // Neurochem. Int. 2003. Vol. 42. P. 315–322.
15. Liu P., Smith P.F., Appleton I. et al. Age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the rat prefrontal cortex // Neurobiol. Aging. 2004. Vol. 25, № 4. P. 547–552.
16. Liu P., Smith P.F., Appleton I. et al. Regional variations and age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the subregions of the hippocampus // Neuroscience. 2003. Vol. 119. P. 679–687.
17. Liu P., Smith P.F., Appleton I. et al. Hippocampal nitric oxide synthase and arginase and age-associated behavioral deficits // Hippocampus. 2005. Vol. 15, № 5. P. 642–655.
18. Mattson M.P., Magnus T. Ageing and neuronal vulnerability // Nat. Rev. Neurosci. 2006. Vol. 7, № 4. P. 278–294.
19. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. New York: Elsevier Academic Press, 2007.
20. Siciliano R., Barone E., Calabrese V. et al. Experimental research on nitric oxide and the therapy of Alzheimer disease: a challenging bridge // CNS Neurol. Disord. Drug Targets. 2011. Vol. 10, № 7. P. 766–776.
21. Strosznajder J.B., Jęško H., Zambrzycka A. et al. Age-related alteration of activity and gene expression of endothelial nitric oxide synthase in different parts of the brain in rats // Neurosci. Lett. 2004. Vol. 370. P. 175–179.
22. Zhao Y., Vanhoutte P.M., Leung S.W.S. Vascular nitric oxide: beyond eNOS // J. Pharmacol. Sci. 2015. Vol. 129, № 2. P. 83–94.

Поступила в редакцию 16.04.2016
Почтена после доработки 01.12.2016

**MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS
OF VENTRAL HIPPOCAMPUS OF AGING
RATS WITH SPECIAL REFERENCE
TO THE EXPRESSION OF INDUCIBLE
AND ENDOTHELIAL NO-SYNTASE**

*A. V. Smirnov^{1,3}, N. V. Grigoryeva¹, M. R. Ekova¹,
M. V. Shmidt^{1,3}, I. N. Tyurenkov², D. V. Kurkin²,
Ye. V. Volotova²*

Structural changes in CA1 and CA3 areas of ventral hippocampus were studied in 12- and 24-month-old rats (n = 20). Paraffin sections of the brain were stained by Nissl's method, and the proportion of shrunken neurons with hyperchromatic cytoplasm was calculated. Changes of inducible and endothelial NO-synthases (iNOS, eNOS) expression were registered. In old (24 months) rats, most pronounced signs of neuronal damage were observed in the hippocampal CA3 pyramidal layer. The proportion of shrunken neurons with hyperchromatic cytoplasm was increased, while the relative density of neurons was decreased. The neurons demonstrated the pericellular edema and vacuolization of cytoplasm. The increased expression of iNOS was detected in the neurons of CA3 pyramidal layer while eNOS expression in CA1 and CA3 was decreased both in neurons and endothelial cells of microcirculatory bed vessels as compared to that in young (12 months) animals.

Key words: *hippocampus, neurons, aging, iNOS, eNOS*

¹ Department of Pathological Anatomy, ² Department of Pharmacology and Biopharmaceutics, Faculty of Continuing Medical Education, Volgograd State Medical University; ³ Laboratory of Morphology, Immunohistochemistry and Carcinogenesis, Volgograd Medical Research Center