

© Коллектив авторов, 2018
УДК 611.813.3.019:616.8-008.615-055.1

Е. В. Горелик^{1, 2}, М. Р. Экова¹, А. В. Смирнов^{1, 3}, Н. В. Григорьева¹, А. И. Краюшкин²,
Д. Ю. Гуров¹, Т. А. Белик¹

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПРЕССИИ ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ В ГИППОКАМПЕ ЧЕЛОВЕКА И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

¹ Кафедра патологической анатомии (зав. — проф. А. В. Смирнов), ² кафедра анатомии человека (зав. — проф. А. И. Краюшкин), ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России; ³ лаборатория морфологии, иммуногистохимии и канцерогенеза (зав. — проф. А. В. Смирнов), ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр»

Цель — изучение особенностей экспрессии индуцибельной NO-синтазы (iNOS) в полях CA1 и CA3 гиппокампа у лиц мужского пола зрелого возраста и половозрелых крыс при комбинированном стрессе.

Материал и методы. Исследовали гиппокамп 10 мужчин второго периода зрелого возраста с патологией сердечно-сосудистой системы и болевым стрессом в результате острого инфаркта миокарда и 10 лиц, причина смерти которых не была связана с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Экспериментальный материал включал головной мозг 20 белых крыс-самцов зрелого возраста, разделенных на контрольную группу и экспериментальную, подвергшуюся комбинированному стрессорному воздействию. Определяли степень экспрессии и относительную площадь iNOS-иммунореактивного материала (ИРМ).

Результаты. В полях CA1 и CA3 гиппокампа человека в условиях стеноза более чем на 50% средней мозговой артерии (СМА) увеличивалась относительная площадь и повышалась степень экспрессии iNOS-ИРМ. У стрессированных животных было обнаружено увеличение по сравнению с контролем относительной площади iNOS-ИРМ в поле CA3, а степени экспрессии iNOS-ИРМ — в полях CA1 и CA3.

Выводы. Выраженные изменения в виде повреждения нейронов пирамидного слоя гиппокампа и увеличения уровня экспрессии iNOS выявлены в поле CA3 как у человека при стенозе СМА, так и у экспериментальных животных в условиях комбинированного стресса.

Ключевые слова: гиппокамп, человек, крыса, стресс, iNOS

Гиппокамп является важным звеном лимбической системы, участвующим в регуляции полового и эмоционального поведения, а также в процессах обучения и сохранения памяти. Интерес представляет изучение изменения нейронов при различных патологических состояниях, а также при стрессовых ситуациях, приводящих к патологическим изменениям в сердечно-сосудистой системе [2]. Иммуногистохимические биомаркеры, позволяющие визуализировать изменения в нервной ткани, дают возможность изучать нервную ткань на клеточном и субклеточном уровнях. Одним из них является индуцибельная NO-синтаза (iNOS), позволяющая обнаружить изменения в головном мозгу при гипоксии. Сверхактивация iNOS и чрезмерное образование NO при ишемии и гипоксии головного мозга свидетельствуют о запуске каскада реакций перекисного окисления, что приводит к повреждению

нервной ткани и последующим нейродегенеративным изменениям. iNOS является ключевым фактором в регуляции мозгового кровотока и реакций воспаления [4].

Целью исследования явилось изучение особенностей экспрессии индуцибельной NO-синтазы в полях CA1 и CA3 гиппокампа у лиц мужского пола второго периода зрелого возраста в условиях стеноза средней мозговой артерии более чем на 50% и у крыс в возрасте 12 мес при комбинированном стрессе.

Материал и методы. Исследование проводилось на аутопсийном и экспериментальном материалах. В работе использовали гиппокампы мозга мужчин, относящихся ко второму периоду зрелого возраста (10 наблюдений), у которых был выявлен стеноз средней мозговой артерии (СМА) более чем на 50%, имеющих в анамнезе ишемическую болезнь сердца. Причиной их смерти был острый инфаркт миокарда, который рассматривался как болевой

Сведения об авторах:

Горелик Елена Владимировна (e-mail: gorelikvolgmu14@yandex.ru), Экова Мария Рафаэлевна, Григорьева Наталья Владимировна, Гуров Дмитрий Юрьевич, Белик Татьяна Анатольевна, кафедра патологической анатомии; Краюшкин Александр Иванович, кафедра анатомии человека, ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России; Смирнов Алексей Владимирович, лаборатория морфологии, иммуногистохимии и канцерогенеза, ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр», 400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

стресс. В группу сравнения включены гиппокампы мужчин (10 наблюдений), причина смерти которых не была связана с патологией сердечно-сосудистой системы. Аутопсийный материал получали из ГБУЗ Волгоградского областного патологоанатомического бюро и Волгоградского областного бюро судебно-медицинской экспертизы. При работе с секционным материалом были учтены требования Федерального закона от 12.01.1996 г. № 8-ФЗ (ред. от 03.07.2016 г., с изм. и доп., вступ. в силу с 01.01.2017 г.). Экспериментальный материал включал головной мозг нелинейных белых крыс-самцов в возрасте 12 мес (20 особей). Животные были разделены на две равные группы — контрольные крысы и крысы, подвергшиеся комбинированному стрессорному воздействию (пульсирующий свет, громкий звук, вибрация) [1]. Эвтаназию проводили с использованием «Гильотины для крыс» AE0702 (Open Science, Россия). При содержании животных, моделировании комбинированного стресса, а также выведении их из эксперимента руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», Хельсинкской декларацией (1975 г., 2000 г.). Дизайн исследования был согласован и одобрен Региональным независимым этическим комитетом (протокол № 96-2009 от 03.04.2009 г., протокол № 207-2014 от 25.12.2014 г.).

Материал фиксировали в нейтральном забуференном 10 % формалине. Для иммуногистохимического исследования изготовленные парафиновые срезы толщиной 4 мкм подвергали депарафинизации. Экспрессию iNOS определяли иммуногистохимическим методом по классической схеме с использованием полимерной системы (Thermo Scientific, Fremont, CA, США). В качестве первичных антител использовали поликлональные кроличьи антитела того же производителя (разведение 1:100). В качестве хромогена был использован диаминобензидин. Оценку изменений уровня экспрессии iNOS определяли путём подсчёта относительной площади иммунореактивного материала (ИРМ) в полях CA1 и CA3 гиппокампа с использованием модуля Image Analysis программы ZEN 1.1.2.0, а также интенсивности окрашивания в баллах от 0 до 3. Исследование микропрепаратов проводили с помощью микроскопа «Axio Lab. A1», фотодокументирование осуществляли камерой «AxioCam 105 color» (все вышеперечисленные приборы — Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Статистическую обработку данных про-

водили с использованием пакетов программ Statistica 6.0. Обобщенные данные представляли в виде медианы (Me) с указанием интерквартильного интервала (Q1–Q3), где Q1 — 25-й процентиль, Q3 — 75-й процентиль. Различия между группами оценивали по непараметрическому критерию Манна—Уитни (Mann—Whitney, U-test) и считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования. В гиппокампе мужчин зрелого возраста при изучении полей CA1 и CA3 в цитоплазме нейронов пирамидного слоя и дендритах радиального слоя наблюдалась умеренно выраженная гранулярная экспрессия iNOS-ИРМ (2 балла), встречались единичные нейроны с выраженной цитоплазматической экспрессией iNOS-ИРМ, окружающий нейропил характеризовался слабовыраженной экспрессией (1 балл) (рис. 1).

Напротив, в гиппокампе лиц со стенозом СМА в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя поля CA1 в отличие от группы сравнения отмечалась выраженная степень экспрессии iNOS-ИРМ (3 балла). Окружающий нейропил характеризовался умеренной степенью экспрессии ИРМ (2 балла) как в поле CA1, так и в поле CA3 (см. рис. 1). При морфометрическом исследовании отмечалось увеличение относительной площади iNOS-ИРМ: в поле CA1 — на 12,5 % ($p < 0,05$), в поле CA3 — на 18,6 % ($p < 0,05$). Оно составило 20,5 (19,0–22,7) % и 28,1 (26,1–31,7) % соответственно по сравнению с контрольной группой. При иммуногистохимическом исследовании гиппокампа крыс отмечалась слабая экспрессия (1 балл) iNOS-ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя полей CA1 и CA3, встречались единичные нейроны с умеренно выраженной цитоплазматической экспрессией ИРМ (2 балла). В нейропиле радиального слоя поля CA1 была обнару-

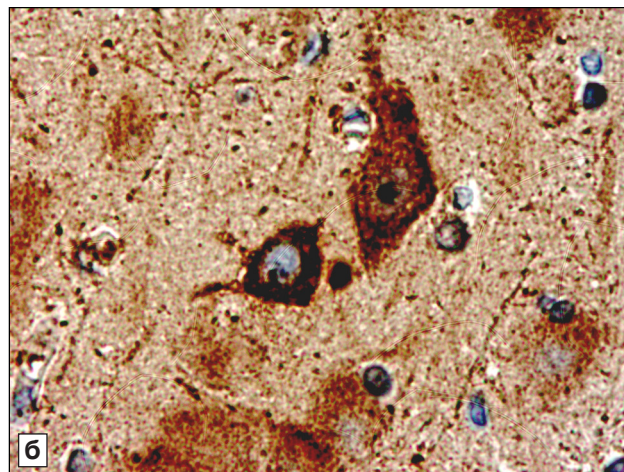
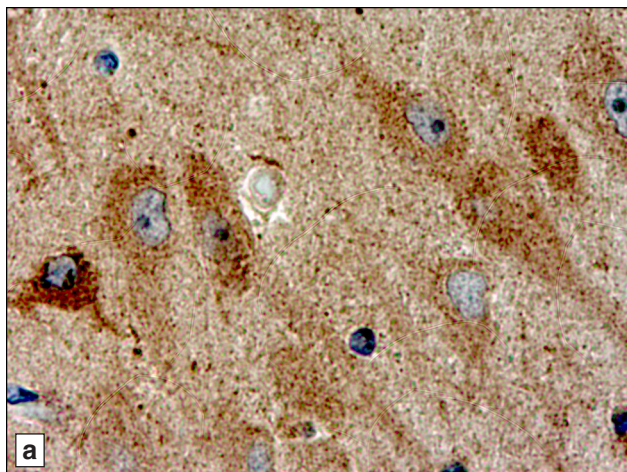


Рис. 1. Гистологическое строение поля CA3 гиппокампа лиц мужского пола второго периода зрелого возраста.

а — группа сравнения; б — группа со стенозом средней мозговой артерии более чем на 50 %. Иммуногистохимическое исследование, антитела к индуцибельной NO-синтазе, докраска тионином по Нисслю. Ув. 400

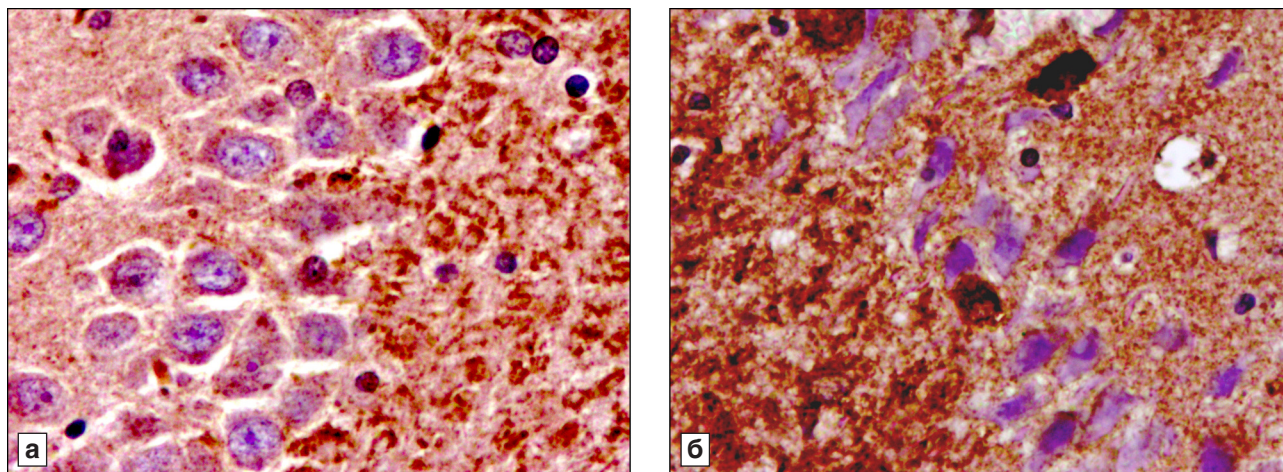


Рис. 2. Гистологическое строение поля СА3 гиппокампа крыс 12 мес.

а — контрольная группа; б — экспериментальная группа, находившаяся в течение 7 сут под влиянием комбинированного стресса. Иммуногистохимическое исследование, антитела к индуцибельной NO-синтазе, докраска тионином по Ниссли. Ув. 400

жена слабовыраженная гранулярная экспрессия iNOS-ИРМ (1 балл), в поле СА3 — умеренно выраженная экспрессия (2 балла). В гиппокампе стрессированных крыс в отличие от контрольной группы животных отмечалось увеличение цитоплазматической степени экспрессии iNOS-ИРМ в перикарионах нейронов пирамидного слоя (2 балла) полей СА1 и СА3. Обнаруживались единичные нейроны с выраженной степенью экспрессии iNOS-ИРМ. В нейропиле радиального слоя поля СА3 наблюдалась умеренно выраженная степень экспрессии ИРМ (2 балла) (рис. 2).

Относительная площадь ИРМ в поле СА1 у контрольной группы животных составила 3,9 (2,2–11,3)%, у стрессированных крыс — 6,6 (5,5–9,6)% ($p > 0,05$). Относительная площадь ИРМ в поле СА3 гиппокампа у стрессированных крыс увеличилась на 30,2% ($p < 0,05$), что составило 53,5 (46,4–57,1)%.

Обсуждение полученных данных. Учитывая, что значительное повышение iNOS [4] ведет к образованию не только NO, но и его метаболитов — пероксинитритов, запускающих каскад окислительных реакций, обнаруженное нами увеличение уровня экспрессии iNOS в полях СА1 и СА3 гиппокампа как у лиц мужского пола второго периода зрелого возраста со стенозом СМА более 50%, так и у экспериментальных животных зрелого возраста, может свидетельствовать о схожих механизмах iNOS-опосредованного повреждения нейронов пирамидного слоя гиппокампа у человека и экспериментальных животных при стрессовых состояниях. Таким образом, наиболее выраженные повреждения нейронов и увеличение уровня экспрессии iNOS были выявляе-

ны в пирамидном слое в поле СА3 гиппокампа у лиц мужского пола второго периода зрелого возраста со стенозом СМА более 50% и животных зрелого возраста, перенесших стресс.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: А. В. С., А. И. К., Н. В. Г.

Сбор и обработка материала: Е. В. Г., М. Р. Э.

Статистическая обработка данных: Е. В. Г., М. Р. Э.

Анализ и интерпретация данных: Е. В. Г., М. Р. Э., Д. Ю. Г., Т. А. Б.

Написание текста: Е. В. Г., М. Р. Э., А. В. С.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Смирнов А.В., Григорьева Н.В., Экова М.Р., Шмидт М.В., Медников Д.С., Тюренок И.Н., Куркин Д.В., Волотова Е.В. Морфологические изменения и особенности экспрессии сериновой рацемазы в гиппокампе крыс при комбинированном стрессорном воздействии // *Морфология*. 2016. Т. 150, вып. 6. С. 20–25 [Smirnov A.V., Grigorieva N.V., Ekova M.R., Shmidt M.V., Mednikov D.S., Tyurenkov I.N., Kurkin D.V., Volotova E.V. Morphological changes and serine racemase expression in rat hippocampus under combined stress condition // *Morfologiya*. 2016. Vol. 150, № 6. P. 20–25. In Russ.].
2. Andersen P., Morris R., Amaral D., Bliss T., O'Keefe J. *The hippocampus book*. Oxford University Press, 2007. 832 p. doi: 10.1093/acprof:oso/9780195100273.001.0001.
3. Charriaut-Marlangue C., Bonnin P., Pham H., Loron G., Leger P.-L., Gressens P., Renolleau S., Baud O. Nitric oxide signaling in the brain: a new target for inhaled nitric oxide? // *Annals Neurol*. 2013. Vol. 73, № 4. P. 442–448. doi: 10.1002/ana.23842.
4. Doherty G.N. Nitric oxide in neurodegeneration: potential benefits of non-steroidal anti-inflammatories // *Neurosci. Bull*. 2011. Vol. 27, № 6. P. 366–382. doi: 10.1007/s12264-011-1530-6.

Поступила в редакцию 25.10.2018

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF INDUCIBLE NO-SYNTHASE EXPRESSION IN THE HIPPOCAMPUS OF A MAN AND EXPERIMENTAL ANIMALS

Ye. V. Gorelik^{1, 2}, *M. R. Ekova*¹, *A. V. Smirnov*^{1, 3},
*N. V. Grigoryeva*¹, *A. I. Krayushkin*², *D. Yu. Gurov*¹,
*T. A. Belik*¹

Objective — to study the characteristics of inducible NO synthase (iNOS) expression in hippocampal fields CA1 and CA3 in adult human males and in mature rats under combined stress.

Materials and methods. Hippocampus of 10 males in the second period of adult age who had cardiovascular pathology and pain stress because of acute myocardial infarction and of 10 persons who died of reasons not associated with cardiovascular diseases were studied. Experimental material included brain of 20 adult male albino laboratory rats, which were divided into control and experimental groups, and the latter underwent combined

stress. The degree of expression and the relative size of the area of the iNOS immunoreactive material (IRM) were determined.

Results. In the CA1 and CA3 hippocampal fields of human males with more than 50% medial cerebral artery (MCA) stenosis, the relative size of the area and the degree of expression of iNOS-IRM were increased. In the stressed animals, the increase was detected in the relative size of the area of iNOS-IRM in CA3 field and in the degree of iNOS-IRM expression in CA1 and CA3 fields, as compared to the control group.

Conclusions. The pronounced changes in the form of damage of the pyramidal cell layer neurons of the hippocampus and an increase in the level of iNOS expression were detected in CA3 field both in humans with MCA stenosis and in experimental animals under combined stress.

Key words: *hippocampus, human, rat, stress, iNOS*

¹ Department of Pathological Anatomy, ² Department of Human Anatomy, Volgograd State Medical University; ³ Laboratory of Morphology, Immunohistochemistry and Carcinogenesis, Volgograd Medical Research Center, 1 Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd 400131