

© В.В. Порсева, В.В. Шилкин, 2010
УДК 612.015.1:611.82:599.323.4

В.В. Порсева и В.В. Шилкин

NADPH-ДИАФОРАЗО-ПОЗИТИВНЫЕ СТРУКТУРЫ СПИННОГО МОЗГА И СПИННОМОЗГОВЫХ УЗЛОВ

Кафедра анатомии человека (зав. — проф. В.В. Шилкин) Ярославской государственной медицинской академии,
e-mail: vvporseva@mail.ru

С помощью гистохимической реакции, инкубационные среды которой имели различную pH, исследовали локализацию NADPH-диафразы (NADPH-Д) в спинном мозгу (СМ) и спинномозговых узлах (СМУ) у взрослой крысы. Полученные данные свидетельствуют о том, что применение инкубационной среды с pH 7,4 позволяет выявлять нейроны с различной активностью NADPH-Д, проводить определение не только плотности распределения фермента, но и производить подсчет количества NADPH-Д-позитивных нейронов. Установлено, что в СМ и СМУ NADPH-Д-активностью обладают не все нейроны: высокая активность обнаружена в мелких и средних нейронах СМУ, низкая — в мотонейронах. Другие клеточные структуры СМ также обладают активностью NADPH-Д и являются интернейронами.

Ключевые слова: *спинной мозг, спинномозговой узел, NADPH-диафараза, крыса.*

Внимание к изучению NADPH-диафразы (NADPH-Д) в структурах нервной системы, вероятно, объясняется ее значением в обеспечении многообразных функций нейрона в различных условиях. NADPH-Д способствует реализации нейронами репаративных процессов, обеспечивает рецепцию изменений сосудистого тонуса, процессы синаптической пластичности [5, 6, 11, 12, 16]. С этих позиций понятен интерес к сравнительному исследованию активности фермента. Так, NADPH-Д-позитивные клетки изучали в различных структурах нервной системы у костистых рыб [15], в головном и продолговатом мозгу крыс [2–5, 18], спинном мозгу (СМ) кошки [19], в интрамуральных узлах сердца человека [16]. Однако нельзя считать, что распределение NADPH-Д в нервной системе изучено детально. Более того, результаты работ противоречивы: одни исследователи указывали на наличие фермента в отростках нейронов [1, 3, 4], другие — обнаружили активность NADPH-Д в любом объекте исследований [8, 15], третьи — отмечали видовые и органые ее особенности [9, 13]. Возможно, различия можно объяснить особенностями проведения гистохимической реакции либо неодинаковыми подходами к трактовке ее результатов.

Цель настоящего исследования — сравнительный анализ выраженности активности и топографии NADPH-Д-позитивных нейронов спинномозговых узлов (СМУ) и функционально различных ядер серого вещества СМ различных сегментарных уровней у взрослой белой крысы.

Материал и методы. Исследование проведено на 10 половозрелых белых крысах-самках линии Вистар

в возрасте 90 сут, находящихся в стандартных условиях клеточного содержания, которых выводили из опыта в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г). Эвтаназию животных осуществляли под эфирным наркозом путем транскардиальной перфузии 4% раствором параформальдегида на 0,1М фосфатном буфере (pH 7,4). Для определения необходимого сегмента СМ проводили вскрытие позвоночного канала с визуализацией корешков спинномозгового нерва и установлением сегментарного соответствия, после чего иссекали сегменты СМ и СМУ: четвертый шейный (C_{IV}), второй грудной (T_{II}), четвертый поясничный (L_{IV}), второй крестцовый (S_{II}). Сегменты СМ и СМУ дополнительно фиксировали в 4% растворе параформальдегида на 0,1М фосфатном буфере (pH 7,4) при 4 °C в течение 2 ч, после чего промывали в 15% растворе сахарозы (pH 7,4) в течение 24 ч. Выделенные объекты замораживали в криостате. Предметные стекла со срезами толщиной 20 мкм подсушивали при комнатной температуре и инкубировали в течение 60 мин при 37 °C в среде следующего состава: 50 мМ Трис-буфер, 0,2% Тритон X-100, 0,8 мг/мл β-NADPH (Sigma, США), 0,4 мг/мл нитро-синий тетразолий (Sigma, США) (pH 8,0); затем обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в бальзам (метод, предложенный Э. Пирсом [14], но чаще цитируемый как метод, описанный V.T. Норе и соавт. [17]). В качестве контроля предметные стекла с каждым 2-м срезом инкубировали в среде упомянутого выше состава, но приготовленной на фосфатном буфере (pH 7,4) [7]. Анализ препаратов проводили с помощью микроскопа МБИ-15У4.2 (ЛОМО, Россия) с установленной цифровой фотокамерой Olympus Camedia C4000 Zoom с фотоадаптером Olympus C3040-ADUS (Япония).

Объектами исследования явились нейроны СМУ, собственного ядра дорсального рога, промежуточно-медиального ядра, промежуточно-латерального ядра бокового рога, парасимпатического крестцового ядра, мотонейроны вентрального рога СМ уровней C_{IV}, T_{II}, L_{IV} и S_{II}. Активность NADPH-Д в цитоплазме нейронов оценивали по оптической плотности

окраски и выражали в условных единицах с использованием некоммерческой программы Image J (НИН, США). Определяли долю NADPH-Д-позитивных клеток: в СМУ количество клеток оценивали на 5 срезах максимальной площади, проходящих через узел и дорсальный корешок спинномозгового нерва, в ядрах СМ — на его поперечных срезах, затем определяли их отношение к общему числу нейронов на срезе, которое принимали за 100%. Анализу подвергали только клетки, у которых срез прошел через ядро, а в цитоплазме выявлялась отчетливо выраженная активность фермента, что проявлялось интенсивно синим окрашиванием. Для определения топографии ядер СМ устанавливали их соответствие пластинам Рекседа [10].

Результаты исследования. При использовании метода, предложенного Э. Пирс и описанного V.T. Норе и соавт., NADPH-Д-позитивные клетки обнаружены не во всех изучаемых объектах.

NADPH-Д-положительные клетки не выявлены в собственном ядре дорсального рога (пластина V) и промежуточно-медиальном ядре СМ

(пластина VII). NADPH-Д-активность определена в мотонейронах вентрального рога СМ (пластины VIII–IX), где интенсивность реакции была максимальной, не зависела от уровня среза СМ и находилась в пределах $60,9 \pm 1,7$ — $62,6 \pm 1,2$ усл. ед. При этом все мультиполярные нейроны имели большие размеры и темно-синий цвет перикариона (рис. 1, а).

В области автономных ядер (пластина VII) и в центральной зоне СМ (пластина X) выявлялись NADPH-Д-позитивные клетки с такой же максимальной активностью фермента. При этом все окрасившиеся клетки были средних и малых размеров с длинными отростками.

В СМУ определялись NADPH-Д-позитивные нейроны, выраженность активности фермента в которых не зависела от сегмента и находилась в пределах $51,2 \pm 0,7$ — $53,2 \pm 0,6$ усл. ед. Долю NADPH-Д-позитивных клеток определить было сложно, так как все клетки СМУ независимо от их размеров были NADPH-Д-позитивными с

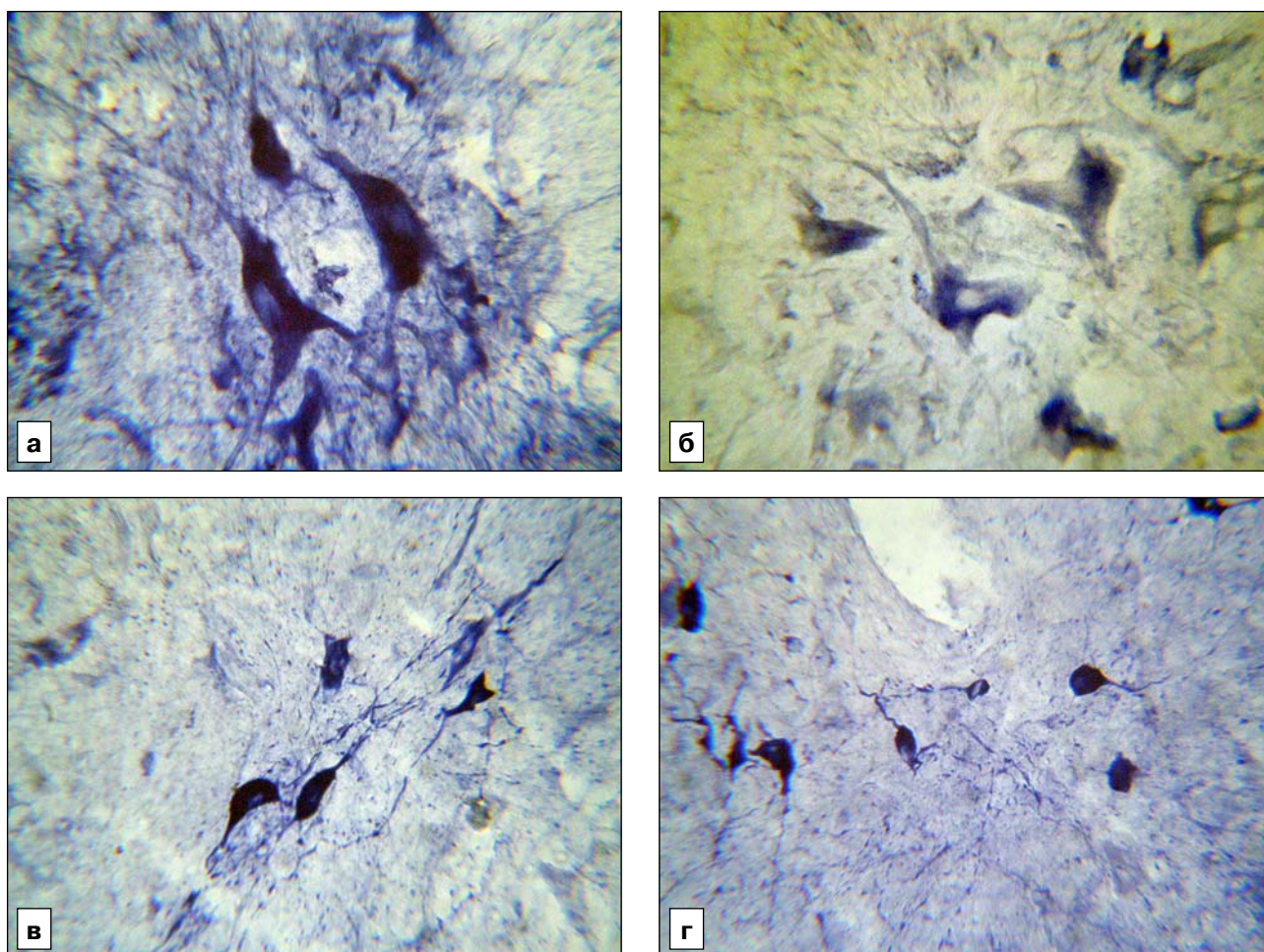


Рис. 1. NADPH-диафорозо-позитивные нейроны спинного мозга (СМ) крысы.

а, б — мотонейроны уровня C_{IV} ; в — нейроны из области автономного ядра; г — нейроны центральной зоны уровня S_{II} СМ.

Реакция на NADPH-диафорозу: а — при использовании трис-буфера; б–г — при использовании фосфатного буфера. Об. 40, ок. 7.

синей окраской цитоплазмы, значительно превышающей фоновую окраску среза (рис. 2, б, г).

При использовании инкубационной среды с фосфатным буфером установлено, что NADPH-Д-позитивные клетки выявлялись также не во всех объектах исследования.

В собственном ядре дорсального рога и промежуточно-медиальном ядре СМ не было обнаружено NADPH-Д-позитивных клеток на всех уровнях СМ. В мотонейронах вентрального рога активность NADPH-Д находилась в пределах $50,5 \pm 0,6$ — $51,1 \pm 1,1$ усл.ед. на всех сегментарных уровнях СМ. При этом интенсивность окраски конечного продукта гистохимической реакции в цитоплазме большинства нейронов мало отличалась от фоновой окраски среза (см. рис. 1, б).

В ядрах боковых рогов и в центральной зоне СМ продукт гистохимической реакции определялся как в цитоплазме тел клеток, так и в отростках. Выявленные клетки были темносиними с максимальной активностью фермен-

та. Активность NADPH-Д в них на уровне T_{II} составила $66,9 \pm 1,7$ усл. ед., на уровне S_{II} — $65,8 \pm 2,61$ усл. ед. NADPH-Д-позитивные клетки в области автономных ядер были сгруппированы, их темноокрашенные отростки распространялись в сером веществе и проникали в белое вещество СМ (см. рис.1, в). В центральной зоне Д-позитивные нейроны располагались в виде цепочки (см. рис. 1, г). Выявляющиеся униполярные и биполярные нейроны были средней и малой величины. В промежуточной зоне серого вещества СМ (пластина VII) всех сегментарных уровней также были обнаружены NADPH-Д-позитивные рассеянные одиночные униполярные, биполярные и мультиполярные нейроны средней и малой величины с максимальной активностью фермента. Отростки клеток распространялись как в дорсальный, так и в вентральный рога СМ.

Нейроны различных СМУ обладали практически одинаково высокой NADPH-Д-активностью: C_{IV} — $59,9 \pm 0,6$ усл.ед., T_{II} — $59,9 \pm 0,7$ усл.ед.,

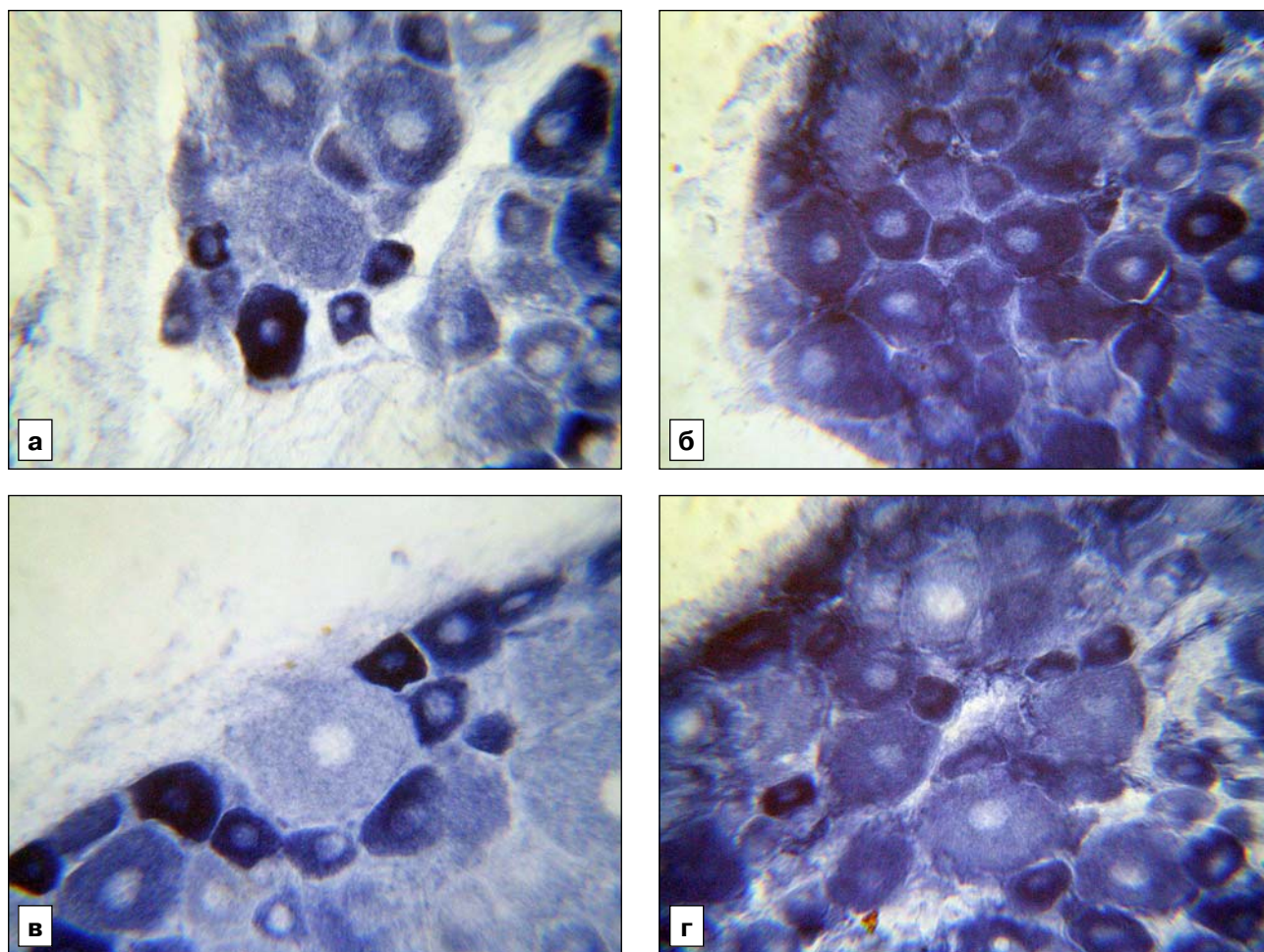


Рис. 2. NADPH-диафоразо-позитивные нейроны шейных (а, б) и крестцовых (в, г) спинномозговых узлов крысы.

Реакция на NADPH-диафору: а, в — при использовании фосфатного буфера; б, г — при использовании трис-буфера. Об. 40, ок. 7.

$L_{IV} — 59,1 \pm 0,7$ усл.ед., $S_{II} — 59,5 \pm 0,6$ усл.ед. В нейронах всех уровней СМУ продукт реакции равномерно распределялся в цитоплазме клеток, имел окраску от бледно-голубого до темно-синего цвета, ядро оставалось не окрашенным. При этом оказалось, что популяция нейронов СМУ неоднородна. Часть нейронов были лишены активности NADPH-Д, другие, обычно крупные, по окраске не отличались от фоновой (см. рис. 2, а, в). Мелкие и средней величины нейроны, как правило, имели высокую активность, при этом содержание последних было выше в грудных и крестцовых (51,2% и 59,7%), среднее — в поясничных (48,9%) и низкое — в шейных (33,1%) СМУ.

Обсуждение полученных данных. Сравнительными исследованиями с применением антител к синтазе окиси азота (NOS) и путем гистохимического определения NADPH-Д установлено, что высокая активность фермента, обнаруживаемая в отдельных нейронах, сопровождается экспрессией NOS [4, 13, 18, 19]. Специфичность реакции цитоплазмы нейронов на нейрональную NOS подтверждается тождественным распределением иммунопозитивных нейронов и клеток, дающих положительную реакцию на NADPH-Д. К сожалению, как иммуногистохимические, так и гистохимические методы определения активности фермента недостаточно стандартизированы, что может отражаться на результатах реакции.

Гистохимическая методика выявления NADPH-Д, судя по данным литературы, предусматривает приготовление инкубационной среды либо на трис-буфере pH 8,0 [1, 2, 5, 8, 9, 15], либо на фосфатном буфере pH 7,4 [4, 6, 16].

Собственный опыт использования различных инкубационных сред при выявлении активности NADPH-Д свидетельствует о том, что результаты гистохимической реакции различаются. При использовании среды с pH 8,0 высокая активность NADPH-Д выявляется в мотонейронах вентральных рогов и в клетках, расположенных как в области ядер боковых рогов, так и в центральной и промежуточной зонах СМ. Низкая активность фермента определяется во всех СМУ, при этом очевидно, что нейроны значительно не различаются по выраженности активности фермента, а конечный продукт гистохимической реакции часто прокрашивает их ядерную зону. Эти обстоятельства мешают детальному анализу распределения ферментативной активности в различных нейронах, ее локализации в нейроплазме, определению морфометрических параметров нейронов, что особенно важно при сравнительных исследованиях. Не менее важен подсчет числа нейронов,

обладающих активностью NADPH-Д. Анализируя данные литературы [4, 6, 11, 16], можно прийти к выводу, что в сравнительных исследованиях следует считать клетками с NADPH-Д-активностью нейроны, сечение которых прошло через ядро, а активность фермента существенно отличается от фоновой, определяемой в окружающих тканях, что обеспечивается использованием инкубационной среды с pH 7,4.

Применение последней среды позволяет выявлять нейроны с различной активностью NADPH-Д, выраженность которой можно верифицировать доступными цитофотометрическими методами, предусмотренными компьютерными программами, проводить определение не только плотности распределения фермента, но и производить подсчет количества NADPH-Д-позитивных нейронов.

Результаты исследования свидетельствуют, что активность NADPH-Д характеризует не все клеточные структуры: высокой активностью Д в изученный период онтогенеза обладают нейроны ядер боковых рогов. Что касается нейронов СМУ и мотонейронов вентральных рогов серого вещества СМ, то применение различных инкубационных сред позволяет выявить их особые свойства. Вместе с тем, если речь идет не о выявляемости, то можно считать предпочтительнее применение инкубационной среды с pH 7,4, как более отвечающей кинетике гистохимических реакций, где соли тетразолия служат акцепторами электронов от окисляемого субстрата.

Сопоставление результатов исследования показало, что нейроны головного мозга человека и крысы являются гистохимически неоднородными. Активность NADPH-Д выявлена только в непиримидных нейронах, которые являются «типичными интернейронами» [6, 11]. Ряд авторов считают, что в большом мозгу крысы NO синтезируется как нейронами, так и родственными им глиальными элементами, а распределение фермента согласуется с представлениями о важной роли глии в регуляции миграции и дифференцировки нейробластов [2, 3].

В результате проведенного исследования установлено, что независимо от условий гистохимической реакции, активность NADPH-Д отсутствует в нейронах собственного ядра дорсального рога и автономных ядер СМ. Учитывая топографию NADPH-Д-позитивных клеток в сером веществе СМ (пластины VII, X), можно предположить, что выявляемые элементы являются интерстициальными клетками, которые получают коллатерали от мотонейронов и функционально участвуют в обратном торможении последних [10]. В то же время можно определить выявленные NADPH-Д-

позитивные клетки как интерстициальные клетки, в исследованиях ЦНС именуемые интернейронами.

Что касается нейронов СМУ, то их состав неоднороден: активность NADPH-Д выявляется преимущественно в мелких и средних клетках, содержание которых возрастает в краниокаудальном направлении.

Таким образом, доказано, что в СМУ, в СМ активностью NADPH-Д обладают не все нейроны: высокая активность фермента характеризует часть мелких и средних нейронов СМУ, менее выражена активность в мотонейронах вентральных рогов. Другие клеточные структуры СМ обладают активностью NADPH-Д и являются интернейронами.

ЛИТЕРАТУРА

- Дюйзен И.В., Деридович И.И., Курбацкий Р.А. и Шорин В.В. NO-ергические нейроны ядер шва мозга крысы в норме и при введении опиатов. *Морфология*, 2003, т. 123, вып. 2, с. 24–29.
- Елисеева Е.В., Романова Н.Е., Баранов В.Ф. и Мотавкин П.А. Нитрооксидсинтаза нейронов заднего ядра и узлового ганглия блуждающего нерва и ее изменения при ингаляциях ацетилхолина в норме и при экспериментальной бронхиальной астме. *Морфология*, 2002, т. 123, вып. 4, с. 32–36.
- Коржевский Д.Э. и Отеллин В.А. Распределение синтазы окиси азота в клетках коры большого мозга крысы. *Морфология*, 1996, т. 110, вып. 6, с. 37–41.
- Коржевский Д.Э., Отеллин В.А., Григорьев И.П. и др. Иммуноцитохимическое выявление нейрональной NO-синтазы в клетках головного мозга крысы. *Морфология*, 2007, т. 132, вып. 4, с. 77–80.
- Коцюба А.Е., Коцюба Е.П. и Черток В.М. Нитроксидергические нервные волокна внутримозговых сосудов. *Морфология*, 2009, т. 135, вып. 2, с. 27–32.
- Лапша В.И., Бочарова В.Н. и Гурин В.Н. Изменение активности NO-синтазы, ферментов энергетического обмена и ультраструктуры в нейронах коры большого мозга при моделировании кратковременной ишемии. *Морфология*, 2003, т. 123, вып. 2, с. 32–36.
- Лили Р. Ферменты. В кн.: *Патогистологическая техника и практическая гистохимия*. М., МИР, 1969, с. 349–354.
- Матвеева Н.Ю., Калинин С.Г., Пушин И.И. и Мотавкин П.А. Роль оксида азота в апоптозе нейронов сетчатки глаза плодов человека. *Морфология*, 2006, т. 129, вып. 1, с. 42–48.
- Мотавкин П.А., Андреева Н.А. и Шуматова Т.А. Нитрооксидергические нейроны органов дыхания. *Морфология*, 2000, т. 117, вып. 1, с. 10–13.
- Оленев С.Н. Спинной мозг. В кн.: *Конструкция мозга*. Л., Медицина, 1987, с. 51–62.
- Охотин В.Е. и Калинин С.Г. Локализация NO-синтазы в клетках Люгаро и механизмы NO-ергического взаимодействия между тормозными интернейронами коры мозжечка кролика. *Морфология*, 1999, т. 115, вып. 3, с. 52–61.
- Охотин В.Е. и Куприянов В.В. Нейровасальные отношения в новой коре головного мозга человека. *Морфология*, 1996, т. 110, вып. 4, с. 17–22.
- Охотин В.Е. и Шуклин А.В. Значение нейрональной, эндотелиальной и индуцибельной изоформ NO-синтазы в гистологии сердечной мышцы. *Морфология*, 2006, т. 129, вып. 1, с. 7–15.
- Пирс Э. Диафоразы и дегидрогеназы. В кн.: *Гистохимия*. М., Изд. иностр. лит-ры, 1962, с. 503–531.
- Чусовитина С.В. и Варакин А.А. Нитроксидергическая иннервация пищеварительного тракта японского анчуса. *Морфология*, 2003, т. 123, вып. 3, с. 50–53.
- Шуклин А.В. и Швалев В.Н. NO-синтаза во внутрисердечных ганглиях человека в норме и при ишемии миокарда. *Морфология*, 2006, т. 129, вып. 3, с. 34–36.
- Hope B.T., Michael G.J., Knigge K.M. and Vincent S.R. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Neurobiology*, 1991, v. 88, p. 2811–2814.
- Ma S.X., Holley A.T., Sandra A. et al. Increased expression of nitric oxide synthase in the gracile nucleus of aged rats. *J. Neurosci.*, 1997, v. 76, № 3, p. 659–663.
- Vizzard M.A., Erdman S.L., Roppolo J.R. et al. Differential localization of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity and NADH-diaphorase activity in the cat spinal cord. *Cell. Tissue Res.*, 1994, v. 278, № 2, p. 299–309.

Поступила в редакцию 20.08.09

NADPH-DIAPHORASE-POSITIVE STRUCTURES OF THE SPINAL CORD AND SPINAL GANGLIA

V.V. Porseva and V.V. Shilkin

Using the histochemical reaction with the various incubation medium pH, the localization of NADPH-diaphorase was studied in the spinal cord and spinal ganglia of the adult rat. The data obtained indicate, that the application of the incubation medium with pH 7.4 allows to demonstrate the neurons with various NADPH-diaphorase activity, to define not only the density of enzyme distribution, but also to calculate the numbers of NADPH-diaphorase-positive neurons. It was established, that both in the spinal cord and spinal ganglia, NADPH-diaphorase activity was found not in all the neurons: high activity was found in small and medium neurons of the spinal ganglia, while low activity was detected in motoneurons. Other cellular structures of the spinal cord also possessed NADPH-diaphorase activity and were found to be the interneurons.

Key words: *spinal cord, spinal ganglion, NADPH-diaphorase, rat.*

Department of Human Anatomy, Yaroslavl State Medical Academy