

*А.В. Ховряков¹, Е.П. Подрезова², П.П. Кругляков², Н.П. Шиханов¹, М.Н. Балыкова¹,
Н.В. Семибратова², А.А. Сосунов³, Г. Маккханн II³ и М.Г. Айрапетянц⁴*

УЧАСТИЕ NO-СИНТАЗНОЙ СИСТЕМЫ В СТРЕСС-ОПОСРЕДОВАННЫХ РЕАКЦИЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА

¹ Кафедра нервных болезней и психиатрии (зав. — проф. В.Г. Подсеваткин) Мордовского государственного университета им Н.П. Огарева, г. Саранск; ² кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. П.П. Кругляков) Российского университета дружбы народов, Москва; ³ отдел нейрохирургии (зав. — проф. Р. Соломон) Колумбийского университета, г. Нью-Йорк, США; ⁴ лаборатория экспериментальной патологии и терапии (зав. — проф. М.Г. Айрапетянц) Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

Неврозоподобное состояние, развивающееся в результате хронического стресса животных и сопровождающееся проходящей церебральной гипоксией, может приводить к существенным нарушениям многих структур головного мозга. Реализация влияния гуморального звена стрессовой реакции на головной мозг определяется как вне-, так и внутриклеточными сигнальными путями, среди которых большое значение имеет оксид азота (NO). В работе иммуногистохимически изучена экспрессия конститутивной нейрональной (nNOS) и индуцибельной (iNOS) изоформ NO-синтазы в нейронах головного мозга белых крыс при хроническом стрессе с развитием неврозоподобного состояния. Показано, что хронический стресс вызывает усиление экспрессии nNOS и iNOS во многих отделах головного мозга, с преобладанием в новой коре и гиппокампе. Введение неспецифического ингибитора NOS, метилового эфира N^ω-нитро-L-аргинина (L-NAME) (10 мг/кг) приводило к нарастанию депрессии животных, сопровождающейся снижением двигательной и поисковой активности, оцениваемых по традиционным тестам. Использованный ингибитор NOS вызывал незначительное усиление экспрессии только iNOS. Таким образом, показано, что NO принимает участие в реализации эффектов стресса с развитием неврозоподобного состояния.

Ключевые слова: головной мозг, нейроны, оксид азота, NO-синтаза, хронический стресс.

Стресс является одной из наиболее распространенных реакций организма на неблагоприятные или новые условия существования. Практически все системы и органы вовлекаются в ответную реакцию на стресс, при этом нервная и эндокринная системы имеют определяющее значение как в течении, так и в результирующем эффекте стрессового воздействия. Стресс, особенно хронический, может приводить к значительным нарушениям в ЦНС, что отчетливо проявляется как изменениями поведенческих реакций, так и структурными нарушениями многих областей головного мозга [17, 21]. Хронический стресс, результатом которого является церебральная гипоксия, является одной из наиболее распространенных причин развития неврозов [1, 3, 4].

Среди многих факторов, участвующих в реализации стрессовых воздействий на головной мозг, большое значение имеет оксид азота (NO). В ЦНС NO выполняет роль активного меж- и внутриклеточного посредника, определяя многие стороны пластичности нервной системы и участвуя в регуляции регионарного кровотока, в зависимости от функциональной нагрузки нервных центров [11]. В больших дозах он может оказывать цитотокси-

ческое действие, в том числе в реакциях образования свободных радикалов [6, 7, 12].

NO синтезируется семейством ферментов NO-синтаз (NOS), представленным тремя изоформами: конститутивными нейрональной (nNOS) и эндотелиальной (eNOS) и индуцибельной (iNOS). В норме в головном мозгу nNOS экспрессируется только в единичных нейронах, а iNOS не определяется [13, 14]. Экспрессия iNOS наблюдается в ткани головного мозга при многих патологических процессах разного генеза (рассеянном склерозе, травмах мозга, опухолях, многих нейродегенеративных заболеваниях и т.д.) [8, 9, 18, 20]. В то же время, роль NO в развитии изменений головного мозга при длительном стрессе, исходом которого является развитие невроза (неврозоподобного состояния), изучена недостаточно. Имеются только немногочисленные работы с использованием модели иммобилизационного стресса [15, 19, 20]. Цель настоящего исследования — изучение морфофункциональных изменений нейральных элементов головного мозга и поведенческих реакций экспериментальных животных при хроническом стрессе, а также выяснение роли NOS-системы при развитии неврозоподобного состояния.

Материал и методы. Работа выполнена на 24 крысах-самцах линии Wistar массой 180–240 г с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Животные были разделены на 4 группы: 1-я группа — невротизированные животные (хронический стресс), которым вводили изотонический раствор хлорида натрия ($n=6$); 2-я группа — невротизированные животные, которым вводили неспецифический ингибитор NOS (блокирующий все его изоформы) — метиловый эфир N^{ω} -нитро-L-аргинина (L-NAME, Sigma, США) ($n=6$); 3-я — условно контрольные животные, которым вводили изотонический раствор хлорида натрия ($n=6$) и 4-я — интактные контрольные животные ($n=6$).

Невротизацию проводили по методике, апробированной в Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН [2, 5]. Животных ежедневно на 4–5 ч в течение 15 сут помещали в специальную установку с индивидуальными ячейками и подвергали действию прерывистого «белого» шума громкостью 65–70 дБ (соотношение шум—пауза 2:1) в сочетании с болевым раздражением лап электрическим током (силой 1–1,5 МА), служащим неизбежным подкреплением условного сигнала — вспышек света. Вспышки следовали с частотой 0,5 Гц пачками по 12. Последние 6 вспышек в пачке подкрепляли болевым воздействием током с коэффициентом вероятности 0,5.

Для оценки поведения были использованы 2 теста — открытое поле и крестообразный приподнятый лабиринт. Длительность каждого из тестов составляла 300 с. Эти методики позволяли оценить двигательную (исследовательскую) активность крыс (по числу пересеченных квадратов в открытом поле и центральной площадки в крестообразном лабиринте), а также ориентировочную активность (по числу стоек в открытом поле и лабиринте). Выраженность эмоционального напряжения в обоих тестах оценивали по количеству болюсов.

С помощью фотоплетизмографического метода измеряли величину систолического артериального давления (АД) у корня хвоста крысы. На фоне проводимой невротизации шести животным с 7-х по 14-е сутки вводили L-NAME (10 мг/кг, внутривенно), а крысам 1-й группы и условно

контрольной группы (3-я группа) в такой же дозе вводили изотонический раствор хлорида натрия.

Экспрессию NOS определяли иммуногистохимически по классической схеме с использованием авидин-биотинового метода. В качестве первичных антител использовали коммерческие антитела к nNOS (Santa Cruz, США, 1:600) и iNOS (Santa Cruz, США, 1:300). Как хромотоген был использован диаминобензидин. Все инкубационные растворы готовили с 0,2% Triton X-100 и 2% сыворотки. В качестве контроля применяли инкубацию без первичных антител. При иммуногистохимическом исследовании основное внимание было обращено на кору большого мозга (проведен анализ только теменной и височных областей), гиппокамп, полосатое тело, таламус, поскольку именно в этих отделах ранее было показано максимальное увеличение активности конститутивных кальций-зависимых iNOS [15, 20].

Результаты исследования. При проведении тестов после завершения невротизации животных наблюдали неустойчивость рефлексов, их периодическое частичное или полное выпадение, снижение исследовательской и общей двигательной активности крыс в открытом поле и крестообразном приподнятом лабиринте, что принято рассматривать как проявление одного из признаков невротического состояния. Одновременно отмечались вегетативные расстройства в виде нерегулярности ритма дыхания, частоты сердечных сокращений, повышения АД, а также более частых дефекаций и мочеиспусканий. Так, если в начале невротизации средние величины АД значимо не различались у крыс разных групп, то после 15 сут совместного действия шума и электроболевого неизбежного раздражения у всех крыс, подвергавшихся этой процедуре (1-я и 2-я группа), АД увеличилось по сравнению с таковым до невротизации. Средняя величина АД в 1-й группе составила 182 мм рт. ст., во 2-й груп-

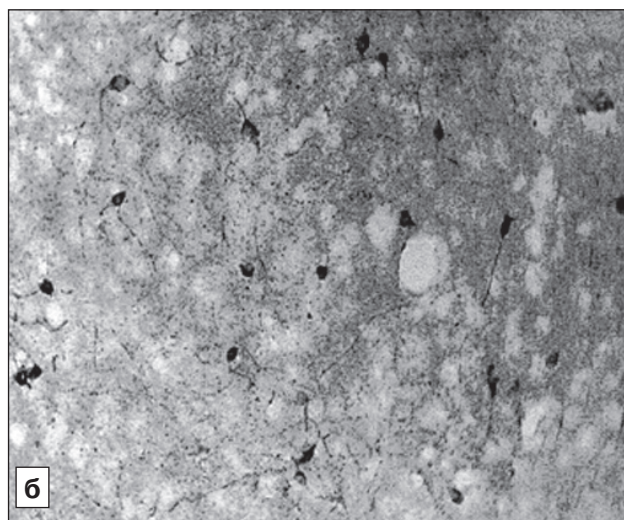
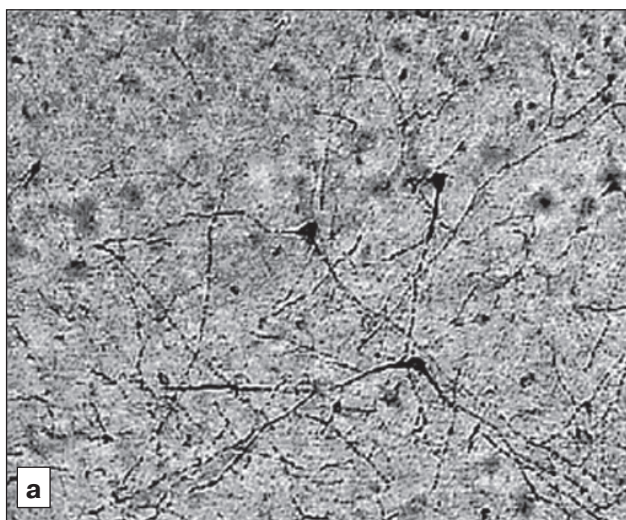


Рис. 1. Нейроны, содержащие нейрональную NO-синтазу, в коре большого мозга контрольной (а) и невротизированной белой крысы (1-я группа) (б).

Авидин-биотиновый метод. Ув.: а — 320; б — 260.

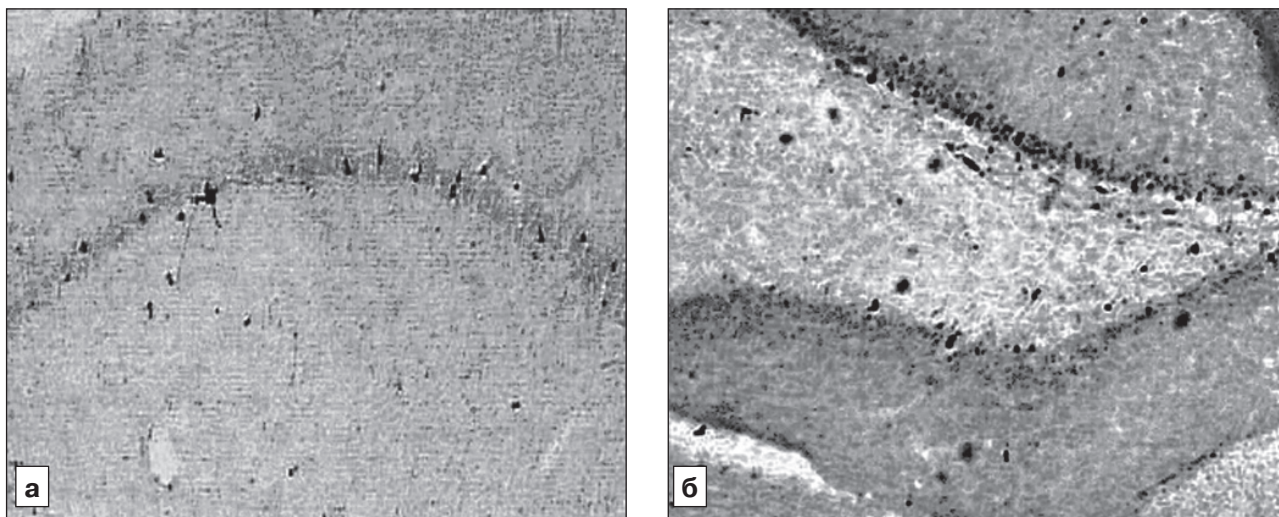


Рис. 2. Интернейроны и пирамидные нейроны поля CA2 гиппокампа (а) и клетки-зерна зубчатой извилины (б), содержащие нейрональную NO-синтазу у невротизированной белой крысы (1-я группа).

Авидин-биотиновый метод. Ув. 180.

пе — 180 мм рт. ст., а в группах контроля (3-й и 4-й) была 97 мм рт. ст.

Введение неспецифического ингибитора NO-синтазы (L-NAME) привело к более значительным изменениям определяемых поведенческих реакций и более длительной депрессии животных.

У животных контрольных групп (3-я и 4-я группа) различий обнаружено не было.

Единичные pNOS-иммунопозитивные нейроны у них встречались во всех изученных отделах головного мозга. По форме тела, локализации в слоях новой коры и характеру арборизации отростков эти нейроны можно считать вставочными.

У невротизированных животных в новой коре обнаруживалось несколько больше pNOS-иму-

ноположительных нейронов, в среднем до 5–7 в поле зрения (2–3 в контрольной группе). В отличие от контроля, у иммунопозитивных клеток стрессированных животных плохо прокрашивались длинные отростки (рис. 1).

В гиппокампе положительную реакцию давали интернейроны, расположенные преимущественно в полях CA1–CA3, и лишь незначительное количество иммунопозитивных нейронов наблюдалось в хилусе. При неврозе положительная реакция отмечалась и в единичных пирамидных нейронах гиппокампа (рис. 2, а), и в клетках-зернах зубчатой извилины (см. рис. 2, б).

Большее количество pNOS-иммуноположительных нейронов наблюдалось в подкорковых образованиях (полосатое тело, ядра таламуса)

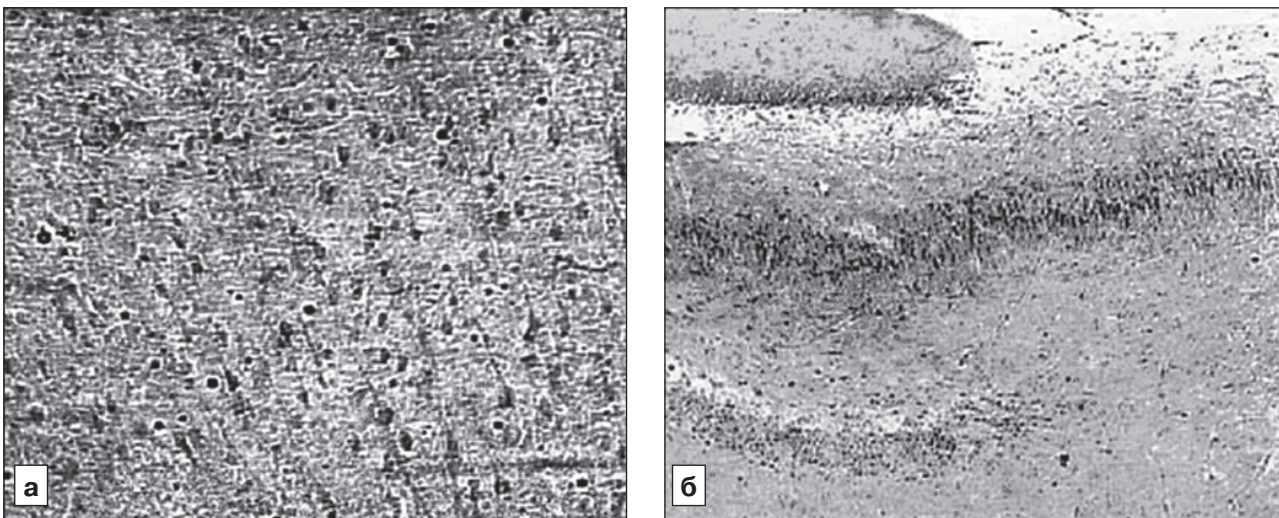


Рис. 3. Нейроны коры большого мозга (а) и клетки-зерна зубчатой извилины и вставочные интернейроны хилуса (б), содержащие индуцибельную NO-синтазу у невротизированной белой крысы (1-я группа).

Авидин-биотиновый метод. Ув.: а — 320; б — 180.

головного мозга невротизированных животных. Дистальные отделы отростков этих нейронов многократно дихотомически ветвились, переплетались и образовывали своеобразную сеть.

В группе животных, которым вводили ингибитор NO-синтазы — L-NAME (2-я группа), изменений локализации и количества nNOS-положительных нейронов в коре большого мозга и в гиппокампе, по сравнению с таковыми в группе невротизированных животных, не наблюдалось.

У животных из групп контроля положительная реакция на iNOS в нейронах коры большого мозга и гиппокампа обнаружена не была. В то же время иммунопозитивная реакция с антителами к iNOS была выявлена в нейронах практически всех отделов головного мозга невротизированных животных. В коре большого мозга невротизированных животных встречались крупные iNOS-положительные нейроны, которые характеризовались наличием иммунопозитивного продукта реакции в перикарионах и крупных апикальных дендритах (рис. 3, а).

В гиппокампе положительную реакцию на iNOS давали немногочисленные пирамидные нейроны, равномерно распределенные по всем его полям. Единичные клетки-зерна зубчатой извилины и вставочные интернейроны хилуса были также иммунопозитивны (см. рис. 3, б). В полосатом теле и гипоталамусе также определялись немногочисленные iNOS-иммунопозитивные нейроны.

В отличие от реакции на nNOS, реакция на iNOS определялась преимущественно в перикарионах нейронов и крупных стволах нервных отростков, концевые веточки не были иммунопозитивны.

Обсуждение полученных данных. Влияние стресса, особенно хронического, на головной мозг и высшие проявления его деятельности — установленный факт [1, 4, 22]. Одним из наиболее лабильных отделов головного мозга является гиппокамп, прежде всего вследствие наличия у нейронов большого количества рецепторов I (минералокортикоиды) и II (глюкокортикоиды) типов стрессовых гормонов надпочечников [10, 22]. Именно влияние стероидных гормонов надпочечников на эти рецепторы, как полагают исследователи, определяет основные наиболее отчетливо выраженные эффекты стрессового воздействия на весь головной мозг и гиппокамп в частности. Данные воздействия проявляются изменением возбудимости нейронов, что отражается на параметрах длительной синаптической потенциации, атрофией дендритов и дендритных шипиков у нейронов, в частности в зоне СА3, и снижением интенсивности образования и диф-

ференцировки клеток-зерен в зубчатой извилине [16]. Активация рецепторов инициирует многочисленные внутриклеточные реакции, в том числе и связанные с немедленными ранними генами. Как свидетельствуют наши данные, по-видимому, активация этих генов запускает экспрессию двух изоформ NO-синтазы.

Раннее усиление экспрессии nNOS и iNOS было показано только при иммобилизационном стрессе [15, 19, 20]. Отличием нашей модели является большая ее приближенность к клинике неврозов и неврозоподобных состояний [2, 4]. Совпадение наших данных по экспрессии NOS с результатами отмеченных исследований с иммобилизационным стрессом свидетельствует об общности механизмов реализации стрессорных изменений разного генеза в головном мозгу, что еще раз отражает неспецифичность реакции стресса.

Каково же значение выявленного повышения экспрессии NOS, и что в первую очередь означает усиление выработки NO в целом? По нашим данным, эффект NO будет определяться объемом синтезированного газа в конкретной области головного мозга. Вначале NO выполняет нейропротекторную функцию, усиливая кровоток и снижая адгезивность тромбоцитов. Однако по мере усиления стресса этот эффект «уступает» нейротоксическому действию больших доз NO, что может приводить к гибели нейронов вследствие некроза и/или апоптоза клеток. В условиях проведенного эксперимента ингибирование активности NOS введением L-NAME приводило к нарастанию отрицательных проявлений невротизации и незначительно отражалось на степени экспрессии iNOS. Ранее было показано, что ингибирование iNOS при иммобилизационном стрессе дает нейропротекторный эффект [20]. Различия в результатах могут быть связаны прежде всего с использованием разных ингибиторов. В наших экспериментах показано, что L-NAME, являясь неспецифическим ингибитором, блокирующим все изоформы NOS, в том числе и eNOS, может косвенно приводить к ухудшению кровоснабжения тканей головного мозга и соответственно к повреждению и гибели нейронов. Сопоставление полученных нами физиологических и морфологических данных показало, что NO принимает участие в стрессовых реакциях головного мозга и непосредственно влияет на высшие механизмы мозговой деятельности, проявляющиеся изменением поведенческих реакций животных. Введение ингибитора NOS невротизированному животному приводило к усилению выраженности морфологических проявлений стресса, что прямо коррелировало с поведенческими показателями.

Полученные данные позволяют лишь косвенно судить о значении NO в механизмах развития

стрессорного повреждения, поскольку хорошо известно, что эффект NO часто бывает неоднозначным и определяется не только объемом газа, но и состоянием эффекторных структур, в первую очередь циклического гуанозинмонофосфата и наличием свободных радикалов. Морфологические исследования подтверждают результаты физиологических наблюдений — в гиппокампе и коре большого мозга имеются различия в числе нейронов, экспрессирующих iNOS и nNOS. Одним из возможных объяснений этому может быть компенсаторная реакция, направленная на поддержание необходимого высокого содержания NO. Поскольку NO может выполнять функцию активного межклеточного посредника и модулировать степень возбуждения или торможения нейронов, можно предположить, что именно с таким модулирующим эффектом связано влияние NO на поведение животных в условиях стресса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Айрапетянц М.Г. Вопросы патогенеза экспериментальных неврозов. Вестн. АМН СССР, 1987, № 8, с. 76–82.
2. Айрапетянц М.Г. Некоторые итоги и перспективы изучения неврозов. Журн. высш. нервн. деят., 1992, т. 4, № 5, с. 885–890.
3. Айрапетянц М.Г. Участие церебральной гипоксии в патогенезе неврозов. Новая концепция. Журн. высш. нервн. деят., 1997, т. 47, № 2, с. 412–416.
4. Айрапетянц М.Г. и Вейн А.М. Неврозы в эксперименте и клинике. М., Наука, 1982.
5. Левшина И.П. и Гуляева Н.В. Изменение скорости локального мозгового кровотока и содержание цитохромов в некоторых областях мозга белых крыс при невротизации. Журн. высш. нервн. деят., 1984, т. 44, № 5, с. 967–971.
6. Одыванова Л.Р., Сосунов А.А., Гатчев Я. и Цервос-Наварро Дж. Окись азота (NO) в нервной системе. Успехи соврем. биол., 1997, т. 117, вып. 3, с. 374–389.
7. Реутов В.П. Цикл окиси азота в организме млекопитающих. Успехи биол. химии, 1995, т. 35, с. 189–228.
8. Chabrier P.E., Demerle-Pallardy C. and Auguet M. Nitric oxide synthases: targets for therapeutic strategies in neurological diseases. Cell. Mol. Life Sci., 1999, v. 55, № 8–9, p. 1029–1035.
9. Cobbs Ch.S., Brenman J.E., Aldape K.D. et al. Expression of nitric oxide synthase in human central system tumors. Cancer Res., 1995, v. 55, p. 727–731.
10. De Kloet E.R., Vreugdenhil E., Oitzl M.S. and Joels M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. Endocr. Rev., 1998, v. 19, № 3, p. 269–301.
11. Faraci F.M. and Brian J.E. Nitric oxide and the cerebral circulation. Stroke, 1994, v. 25, p. 692–703.
12. Gally J., Montague P., Reeke G. and Edelman G. The NO hypothesis: Possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, v. 87, p. 3547–3553.
13. Garthwaite J. Neural nitric oxide signalling. Trends Neurosci., 1995, v. 18, p. 51–56.
14. Knowles R.G. and Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. Biochem. J., 1994, v. 298, p. 249–258.
15. Leza J.C., Salas E., Sawicki G. et al. The effects of stress on homeostasis in JCR-LA-cp rats: the role of nitric oxide. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1998, v. 286, № 3, p. 1397–1403.
16. McEwen B.S. Stress and hippocampal plasticity. Annu. Rev. Neurosci., 1999, v. 22, p. 105–122.
17. McEwen B.S. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. Prog. Brain. Res., 2000, v. 122, p. 25–34.
18. Moncada S., Palmer R.M.J. and Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol. Rev., 1991, v. 43, p. 109–141.
19. Oliveira R.M., Aparecida Del Bel E., Mamede-Rosa M.L. et al. Expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in stress-related brain areas after restraint in rats. Neurosci. Lett., 2000, v. 289, № 2, p. 123–126.
20. Olivenza R., Moro M.A., Lizasoain I. et al. Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex. J. Neurochem., 2000, v. 74, № 2, p. 785–791.
21. Pani L., Porcella A. and Gessa G.L. The role of stress in the pathophysiology of the dopaminergic system. Mol. Psychiatry., 2000, v. 5, № 1, p. 14–21.
22. Seckl J.R. Glucocorticoids, ageing and nerve cell damage. J. Neuroendocrinol., 2000, v. 12, № 8, p. 709–710.

Поступила в редакцию 21.08.08

PARTICIPATION OF NO-SYNTHASE SYSTEM IN THE STRESS-MEDIATED REACTIONS OF THE BRAIN

A.V. Khovryakov, Ye.P. Podrezova, P.P. Kruglyakov, N.P. Shykhonov, M.N. Balykova, N.V. Semibratova, A.A. Sosunov, G. McKhann II and M.G. Ayrapetyantz

Neurosis-like status developing as a result of the exposure of animals to chronic stress, which is associated with a transitory cerebral hypoxia, could cause significant structural and functional alterations in many brain structures. Realization of humoral stress effects on the brain is mediated by both extra- and intracellular signal molecules, among which nitric oxide (NO) is considered to be one of the most potent ones. Expression of neuronal constitutive (nNOS) and inducible (iNOS) isoforms of NO-synthase was studied by immunohistochemistry in the neurons of albino rat brain after exposure of animals to chronic stress resulting in the development of neurosis-like status. Chronic stress was shown to result in the increased expression of both nNOS and iNOS in many brain areas with the predominance in neocortex and hippocampus. The administration of nonspecific inhibitor of NOS, N ω -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) (10 mg/kg) resulted in the aggravated depression of the animals, associated with a decrease of locomotor and exploring activities that were evaluated using the traditional tests. The application of NOS activity inhibitor caused an insignificant rise only in iNOS expression. Thus the results obtained suggest that NO is involved in the realization of stress effects with the development of a neurosis-like status.

Key words: brain, neurons, nitric oxide, NO-synthase, chronic stress.

Department of Neurology and Psychiatry, Department of Human Anatomy N.P. Ogarev Mordvinian State University, Saransk; Department of Histology, Cytology and Embryology, Russian Peoples Friendship University, Moscow; Department of Neurosurgery, Columbia University, New York, USA; Laboratory of Experimental Pathology and Therapy, RAS Scientific Research Institute of Higher Nervous Activity and Neuropsychology, Moscow.