

© В.В. Порсева, 2009  
УДК 612.015.1:611.82.018:599.323.4

*В.В. Порсева*

## АКТИВНОСТЬ NADPH-ДИАФОРАЗЫ В МОТОНЕЙРОНАХ РАЗЛИЧНЫХ СЕГМЕНТОВ СПИННОГО МОЗГА БЕЛОЙ КРЫСЫ В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ ДЕАФФЕРЕНТАЦИИ

Кафедра анатомии человека (зав. — проф. В.В. Шилкин) Ярославской государственной медицинской академии

Возрастные изменения активности NADPH-диафоразы изучены гистохимическим методом в мотонейронах вентральных рогов спинного мозга различных сегментарных уровней у крыс в возрасте 3–90 сут после рождения в норме и при моделировании химической деафферентации путем внутрибрюшинного введения капсаицина. Выявлены волнообразные возрастные изменения активности фермента в мотонейронах на уровне T<sub>II</sub>, L<sub>IV</sub> и S<sub>II</sub> сегментов спинного мозга, с ее ростом к 60-суточному возрасту и последующим значимым снижением к 90-м суткам. Возрастная динамика становления активности NADPH-диафоразы в мотонейронах спинного мозга интактных крыс характеризует конструктивные процессы в нейронах, в условиях деафферентации свидетельствует о повреждении мотонейронов и проявляется резким повышением активности фермента в 90-суточном возрасте.

**Ключевые слова:** *спинной мозг, мотонейроны, NADPH-диафоораза, оксид азота, химическая деафферентация.*

В настоящее время первостепенное значение придается изучению особенностей нейромедиаторов в различном возрасте постнатального онтогенеза, что может способствовать выявлению характера обменных процессов в нейроне и возможностей адекватной его реакции на меняющиеся условия существования.

Как известно, среди нейромедиаторов особое место занимает оксид азота (NO), действие которого не ограничивается только синаптическими контактами, но влияет на ионные каналы плазмолеммы нейрона, регулирует проницаемость и сократимость сосудов [6, 7, 11, 12].

В гистохимических исследованиях уровень секреции NO, как правило, определяется по активности NADPH-диафоразы (NADPH-д), кофермента NO-синтазы (NOS). По данным ряда авторов, гистохимический метод определения NADPH-д является маркером конститутивных нейрональной и эндотелиальной NOS, которые вырабатывают сравнительно низкие концентрации NO [2, 4, 10, 14]. Однако существуют предположения, что NADPH-д не всегда является гистохимическим маркером нейрональной NOS, а связана с индуцибельной изоформой NOS, которая синтезирует высокие концентрации NO и образуется при повреждении [3, 13]. Несмотря на обширную литературу по обнаружению NADPH-д в различных структурах нервной системы, комплексные исследования активности NADPH-д в нейронах сегментарных центров спинного мозга (СМ) в постнатальном онтогенезе отсутствуют.

Цель данного исследования — выявление сегментарных различий активности NADPH-д в

мотонейронах ядер вентральных рогов СМ крысы, определение возрастных особенностей активности NADPH-д в нормальных условиях и в условиях деафферентации.

Материал и методы. Исследование выполнено с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» на 72 белых крысах линии Вистар. Животные были разделены на 2 группы: 1-ю составили контрольные крысы (n=36), 2-ю — подопытные крысы (n=36). Возраст животных соответствовал периодизации И.П. Западнюка и соавт. [1]: период молочного кормления (новорожденные — 3 и 5 сут после рождения, подсосный возраст — 7, 10, 14 и 21 сут после рождения); неполовозрелый период (инфантильный возраст — 30 сут после рождения, ювенильный возраст — 60 и 90 сут после рождения). В каждом указанном возрасте контрольной и подопытной группы крыс были исследованы по 4 самки. В подопытной группе на 2-е сутки жизни крыс моделировали деафферентацию путем однократного внутрибрюшинного введения 10% раствора капсаицина (N-vanillylonamide, 100 мг/кг, Sigma, США) в смеси, состоящей из 1 части 96% этилового спирта, 1 части Твин-80 (Sigma, США), 8 частей 0,9% раствора NaCl. Эвтаназию животных осуществляли под нембуталовым наркозом (40 мг/кг) путем транскардиальной перфузии 4% раствором параформальдегида на 0,1М фосфатном буфере (рН 7,4). Для определения необходимого сегмента СМ проводили вскрытие позвоночного канала, после чего иссекали сегменты: второй грудной (T<sub>II</sub>), четвертый поясничный (L<sub>IV</sub>), второй крестцовый (S<sub>II</sub>), которые дополнительно фиксировали в 4% растворе параформальдегида на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) при 4° С в течение 2 ч. После этого фиксированные кусочки СМ промывали в 15% растворе сахарозы в течение 24 ч и замораживали в криостате. Предметные стекла со срезами толщиной 20 мкм подсушивали при комнатной температуре и инкубировали в течение 40 мин при 37° С в среде следующего состава: 50 мМ Трис-буфер, 0,2% Тритон X-100, 0,8 мг/мл β-NADPH

Таблица 1

**Активность NADPH-диафоразы в мотонейронах переднего рога спинного мозга у крыс разного возраста**  
( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ , ед. опт. пл.)

Возраст (сутки)	Контроль			Опыт		
	T <sub>II</sub>	L <sub>IV</sub>	S <sub>II</sub>	T <sub>II</sub>	L <sub>IV</sub>	S <sub>II</sub>
3-и	25,2±0,7	24,3±0,5	27,3±0,4	19,50±0,23°	33,3±0,6°	22,4±0,4°
5-е	21,5±0,4*	21,90±0,28*	28,6±1,6	32,9±1,4*°	35,1±0,7	25,9±1,1*
7-е	32,2±0,8*	29,3±0,6*	25,5±0,4	24,1±0,4*°	30,6±0,5*	28,6±0,9*
10-е	23,4±0,8*	20,9±0,3*	26,8±1,4	29,5±1,1°	26,7±0,8*°	27,5±0,6
14-е	31,3±0,8*	31,2±1,3*	30,2±0,8*	29,5±0,8	25,1±0,7°	23,4±0,5*°
21-е	26,7±0,6*	33,9±1,1	30,1±0,6	27,5±0,9	39,8±2,0*°	26,5±0,5*°
30-е	26,9±0,5	38,9±1,0*	28,2±2,7	27,9±0,9	39,5±1,4	26,1±0,8
60-е	57,6±2,4*	55,9±2,3*	45,2±1,7*	28,3±0,6°	38,5±1,9°	27,9±2,2°
90-е	32,3±0,8*	48,2±2,5*	39,3±1,0*	50,4±0,8*°	60±3*°	49±3*°

\* Здесь и в табл. 2: изменения значимы по сравнению с показателями в предыдущем возрасте при P<0,05.

° Изменения значимы по сравнению с контрольными значениями при P<0,05.

(Sigma, США), 0,4 мг/мл нитро-синий тетразолий (Sigma, США), (рН 8,0); затем обезвоживали и заключали в бальзам по стандартной методике. Мотонейроны вентральных рогов сегментов T<sub>II</sub>, L<sub>IV</sub> и S<sub>II</sub> правой половины СМ исследовали в течение 3 мес постнатальной жизни.

Уровень активности NADPH-д определяли в цитоплазме нейронов с помощью компьютерного видеоанализатора Bioscan (Беларусь) при увеличении объектива микроскопа 40 с представлением микроскопического изображения на мониторе компьютера. Для оценки активности NADPH-д с помощью курсора дигитайзера на экране монитора компьютера обводили контуры нейроплазмы с последующим автоматическим определением ее средней оптической плотности в единицах оптической плотности (ед. опт. пл.). Для получения цифровых данных использовали программу Biotest (Беларусь), по которой определяли параметры объектов изображения в интерактивном режиме. Выраженность ферментативной активности оценивали по следующим программным показателям: 1000/graym — оптический показатель, который изменяется прямо пропорционально интенсивности окраски объекта, т. е. изменениям выраженности активности фермента; transmsd — оптический параметр, зависящий от равномерности распределения продукта реакции в объекте: чем ниже значения параметра, тем равномернее распреде-

ляется продукт реакции. Полученные первичные цифровые данные обрабатывали методами вариационной статистики с использованием программы Excel-97. Сравнение количественных показателей проводили с использованием t-критерия Стьюдента, различия считали значимыми при P<0,05.

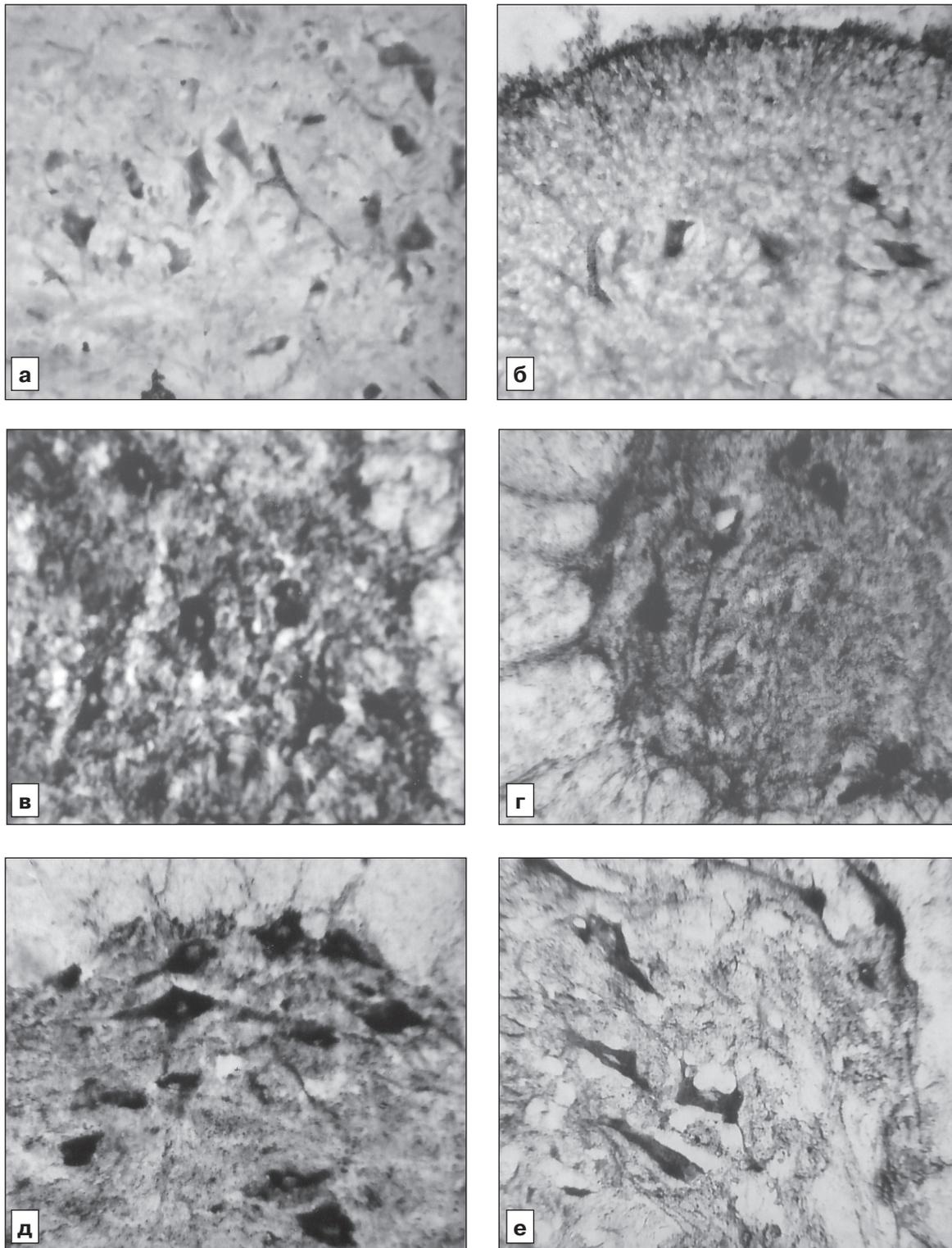
**Результаты исследования.** NADPH-д-позитивные мотонейроны обнаружены на всех исследованных срезах СМ как у контрольных, так и у подопытных животных (рисунок). Продукт реакции, определяемый в цитоплазме нейронов, имел цвет от бледно-голубого до темно-фиолетового, ядра нейронов оставались неокрашенными.

У новорожденных контрольных крысят активность фермента в мотонейронах вентрального рога на уровне T<sub>II</sub> к 5-суточному возрасту по сравнению с таковой у 3-суточных снизилась на 15% (табл. 1). В подсосном возрасте также обнаружена неодинаковая активность фермента — у 7-суточных крыс она на 50% превысила таковую в предыдущем возрасте. К 10-суточному возрасту этот показатель значительно снизился, а к 14-

Таблица 2

**Показатели неравномерности распределения конечного продукта реакции в мотонейронах переднего рога спинного мозга у крыс разного возраста** ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ )

Возраст (сутки)	Контроль			Опыт		
	T <sub>II</sub>	L <sub>IV</sub>	S <sub>II</sub>	T <sub>II</sub>	L <sub>IV</sub>	S <sub>II</sub>
3-и	944±82	1070±76	1192±106	2911±380°	1041±112	1426±118
5-е	928±98	1038±84	1400±304	1885±148*°	964±88	1398±233
7-е	1084±147	1025±129	1505±219	1498±197	850±130	1056±179
10-е	997±208	945±149	1558±147	2238±217*°	938±107	1030±72
14-е	2609±958*	862±107	947±117*	1224±167*°	984±81	958±63
21-е	787±79*	828±75	677±65*	1292±156	1220±131°	937±116
30-е	757±88	920±114	1037±143*	1750±187*°	1072±217	994±61
60-е	1333±146*	761±75	1199±118	1493±114	1058±185°	941±49
90-е	641±49*	513±46*	703±78*	783±66*	602±40*	655±70*



Активность NADPH-диафоразы в мотонейронах вентральных рогов спинного мозга (СМ) intactных крыс (а, в, д) и после введения капсаицина (б, г, е).

а, б — у крыс 3-суточного возраста на уровне  $T_{II}$  СМ; в, г — у крыс 60-суточного возраста на уровне  $L_{IV}$  СМ; д, е — у крыс 90-суточного возраста на уровне  $L_{IV}$  СМ. Реакция с нитро-синим тетразолием. Об. 10.

суточному возрасту резко повысился, соответствуя показателю в начальном подсосном возрасте (см. табл. 1). В 21-суточном возрасте активность NADPH-д вновь понизилась, оставаясь без изменений и в 30-суточном возрасте. В 60-суточном возрасте ферментативная активность значительно повысилась до максимальных значений и превысила таковую в предыдущем возрасте на 114%. К 90-м суткам активность NADPH-д вновь понизилась и достигла показателя, характерного для начального подсосного возраста. Минимальные значения активности фермента в мотонейронах сегмента  $T_{II}$  выявлены в 5- и 10-суточном возрасте, максимальные — в 60-суточном возрасте (см. табл. 1).

В мотонейронах  $L_{IV}$  у контрольных крыс принципиальных отличий возрастной динамики показателей активности NADPH-д по сравнению с таковой на уровне  $T_{II}$  не отмечено до 21-суточного возраста животных. У новорожденных контрольных крысят активность фермента к 5-суточному возрасту по сравнению с таковой у 3-суточных снизилась на 10%, а к 7-суточному возрасту крыс — повысилась на 34% по сравнению с показателем в предыдущем возрасте (см. табл. 1). В отличие от предыдущей группы нейронов, в 21-суточном возрасте в мотонейронах  $L_{IV}$  активность фермента не снизилась, а резко повысилась, оставаясь на высоком уровне и в 30-суточном возрасте. В 60-суточном возрасте ферментативная активность значительно повысилась до максимальных значений, что превысило этот показатель в предыдущем возрасте на 43%. К 90-м суткам активность фермента понизилась. Минимальные значения активности NADPH-д в мотонейронах этого сегмента наблюдались на 5-е и 10-е сутки постнатальной жизни, максимальные — на 60-е сутки (см. табл. 1).

Возрастные изменения активности NADPH-д в мотонейронах  $S_{II}$  контрольных крыс резко отличались от таковых на  $T_{II}$  и  $L_{IV}$  уровнях СМ. Так, с 3- до 10-суточного возраста активность фермента в мотонейронах сегмента  $S_{II}$  не изменялась (см. табл. 1). На 14-е сутки показатель активности NADPH-д значительно повысился на 13% по сравнению с таковым в предыдущем возрасте и оставался на этом уровне по 30-е сутки включительно. В 60-суточном возрасте ферментативная активность повысилась до максимальных значений и превысила показатель в предыдущем возрасте на 60% ( $P < 0,05$ ), а на 90-е сутки — вновь понизилась. Минимальные значения активности NADPH-д в мотонейронах  $S_{II}$  приходились на 7-, 10-е сутки постнатальной жизни, максимальные — на 60-е сутки (см. табл. 1).

Как видно, волнообразность возрастных изменений активности NADPH-д в мотонейронах выявляется на всех изученных уровнях, но выраженность процесса различна. Помимо возрастных изменений активности NADPH-д в нейронах, в контрольных группах крыс учитывали распределение конечного продукта гистохимической реакции на NADPH-д (табл. 2). Независимо от исследуемого сегмента, в первые 10 сут постнатальной жизни обнаруживались высокие цифры transmsd, что свидетельствовало об отчетливо выраженной неравномерности распределения активности фермента, локализацию которой можно определить как полусную. При этом выявляемый конечный продукт реакции имел гранулярно-глыбчатый характер. В 90-суточном возрасте распределение активности фермента становилось более равномерным, а конечный продукт гистохимической реакции приобретал мелкодисперсный характер. Сегментарные различия в равномерности распределения активности выражались в высоких показателях на 14-е и 60-е сутки в  $T_{II}$  и на 30-е и 60-е сутки жизни крысы в  $S_{II}$ , в другом возрасте показатели оставались низкими на всех уровнях СМ.

В условиях деафферентации, как и в контроле, выявлялись NADPH-д-позитивные мотонейроны на всех сегментарных уровнях СМ. Активность NADPH-д в мотонейронах подопытной группы животных варьировала на изученном отрезке онтогенеза (см. табл. 1). Активность NADPH-д в мотонейронах  $T_{II}$  у подопытных крысят к 5-суточному возрасту по сравнению с таковой у 3-суточных повысилась на 68%. К 7-суточному возрасту показатель снизился на 27% по сравнению с таковым в предыдущем возрасте. В последующих возрастных группах значения активности колебались в пределах 27,5–29,5 ед. опт. пл. В 90-суточном возрасте наблюдался резкий подъем активности NADPH-д, что составило 56% по отношению к показателю в предыдущем возрасте. В условиях деафферентации минимальные значения активности фермента приходились на 3- и 7-суточный возраст, максимальные — на 90-суточный (см. табл. 1).

В мотонейронах  $L_{II}$  возрастная динамика изменений показателей активности NADPH-д у подопытных крыс резко отличалась от таковой на уровне  $T_{II}$  (см. табл. 1). На 7-е и 10-е сутки жизни показатели активности фермента снизились на 13%, а на 21-е сутки — значительно повысились и оставались без изменений по 60-суточный возраст включительно. Новый подъем активности NADPH-д произошел на 90-е сутки жизни и составил 64% по сравнению с таковым в преды-

дущем возрасте. Минимальные значения активности NADPH-д в мотонейронах этого сегмента пришлось на 10-е и 14-е сутки постнатальной жизни, а максимальные — на 90-е (см. табл. 1).

Возрастные изменения активности NADPH-д в мотонейронах  $S_{II}$  в условиях деафферентации отличались от таковых на уровне  $T_{II}$  и  $L_{IV}$ . В 5- и 7-суточном возрасте она повысилась на 16% и 10% соответственно по отношению к показателю в предыдущем возрасте. На 14-е сутки жизни активность NADPH-д снизилась на 15%, а с 21-х суток вновь повысилась и достигла максимальных значений в 90-суточном возрасте крысы, на 57% превысив показатель в предыдущем возрасте. Минимальные значения активности NADPH-д пришлось на 3- и 14-суточный возраст крысы, максимальные — на 90-суточный (см. табл. 1).

Показатели transmsd (см. табл. 2) в опыте имели общую закономерность для всех уровней СМ: высокие цифры — от 3- до 60-суточного возраста, низкие — в 90-суточном возрасте, именно в этом возрасте глыбчатых включений в нейроплазме не наблюдалось.

Обсуждение полученных данных. В результате проведенного исследования установлено, что возрастная динамика гистохимических характеристик мотонейронов вентрального рога СМ разных сегментарных уровней у контрольных крыс была волнообразной.

У контрольных крысят 3-суточного возраста выявлены незначительные различия уровня активности NADPH-д в мотонейронах вентральных рогов изученных сегментов спинного мозга. В контрольной группе рост активности фермента наблюдался к 60-суточному возрасту, с последующим значимым снижением к 90-суточному. К этому возрасту животного выявлено и увеличение равномерности распределения конечного продукта гистохимической реакции. Сегментарные особенности активности NADPH-д в мотонейронах контрольных крыс проявились «монотонностью» ее возрастной динамики на уровне  $S_{II}$  до 30-суточного возраста крысы и отчетливо выраженной волнообразностью изменения показателя на уровнях  $T_{II}$  и  $L_{IV}$ .

Установлено, что при низких значениях активности NADPH-д она имела полусную локализацию. При низкой «стартовой» активности NADPH-д к 90-суточному возрасту в мотонейронах  $L_{IV}$  ее значение превышало таковое в мотонейронах  $T_{II}$  и  $S_{II}$ . По всей видимости, на изученных сегментарных уровнях возрастное повышение активности NADPH-д у контрольных крыс происходило в пределах концентраций NO, опосредую-

щих конструктивные процессы, в частности обеспечение возросших метаболических потребностей нейронов. Выявляемые сегментарные особенности активности NADPH-д, возможно, связаны с особенностями рефлекторных дуг, обеспечивающих нейрональную регуляцию весьма специфичных органов-мишеней для нервных центров  $T_{II}$ ,  $L_{IV}$ ,  $S_{II}$ . Об этом могут свидетельствовать изменения активности NADPH-д в мотонейронах при моделировании деафферентации введением капсаицина. Как известно, химическая деафферентация капсаицином приводит к гибели преимущественно афферентных нейронов спинномозговых узлов [5, 9] и повреждению эфферентной части рефлекторной дуги вследствие «дефицита афферентации» [8].

Проведенное исследование показало, что в подопытной группе крыс по сравнению с контролем существенный разброс показателей активности NADPH-д регистрировался уже в 3-суточном возрасте: резкое снижение активности фермента в мотонейронах уровней  $T_{II}$  и  $S_{II}$  и повышение в мотонейронах уровня  $L_{IV}$ . Изменения активности NADPH-д характеризовались ее повышением на всех уровнях СМ в 5-суточном возрасте, степень которого зависела от исходного уровня показателей. Последующие изменения активности NADPH-д по 60-суточный возраст включительно не имели существенных волнообразных колебаний независимо от уровня спинного мозга, но к 90-суточному возрасту по сравнению с контролем отмечался резкий подъем активности NADPH-д, выраженность которого была также связана с исходным уровнем показателей.

Таким образом, следствием химической деафферентации является резкое изменение активности одного из ведущих ферментов нейронального гомеостаза — NADPH-д, что проявляется нарушением динамики ее становления в мотонейронах грудных, поясничных, крестцовых сегментов СМ и резким повышением активности фермента в 90-суточном возрасте. Возмещение активности NADPH-д в мотонейронах СМ в условиях деафферентации характеризует дезадаптацию мотонейронов в условиях дефицита афферентации, а резкое повышение активности NADPH-д к 90-суточному возрасту деафферентированной крысы свидетельствует о повреждении мотонейронов, что подтверждается изучением мотонейронов СМ классическим методом их окраски тионином [5].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Западнюк И.П., Западнюк В.И. и Захария Е.А. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. Киев, Вища школа, 1974.

2. 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.
3. Матвеева Н.Ю., Калиниченко 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.
4. Охотин В.Е. и Шуклин А.В. Значение нейрональной, эндотелиальной и индуцибельной изоформ NO-синтаз в гистофизиологии сердечной мышцы. *Морфология*, 2006, т. 129, вып. 1, с. 7–15.
5. Порсева В.В. Возрастные преобразования ядер спинного мозга и спинномозговых ганглиев в норме и в условиях химической деафферентации: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Ярославль, 2006.
6. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е. и Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М., Наука, 1997.
7. Сосунов А.А. Оксид азота как межклеточный посредник. *Соровский образовательный журн.*, 2000, № 12, с. 27–34.
8. Филимонов В.И., Шилкин В.В. и Ковригина Т.Р. Характеристика моторной бляшки при дефиците афферентации. *Росс. морфол. ведомости*, 2000, № 1–2, с. 141–144.
9. Шилкин В.В., Румянцева Т.А., Ковригина Т.Р. и Филимонов В.И. Влияние введения капсаицина на нейроны спинномозговых ганглиев белой крысы. *Рос. морфол. ведомости*, 1999, № 1–2, с. 167–168.
10. 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.
11. Garthwaite J. and Boulton C. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.*, 1995, v. 57, p. 683–706.
12. 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.
13. Martin L.J., Chen K. and Lin Z. Adult motor neuron apoptosis is mediated by nitric oxide and Fas death receptor linked by DNA damage and p53 activation. *J. Neurosci.*, 1997, v. 76, № 3, p. 659–663.
14. 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 10.10.08

#### **NADPH-DIAPHORASE ACTIVITY IN THE MOTOR NEURONS OF DIFFERENT SPINAL CORD SEGMENTS OF ALBINO RAT UNDER NORMAL CONDITIONS AND AFTER DEAFFERENTATION**

*V.V. Porseva*

Age changes of NADPH-diaphorase activity were studied histochemically in the ventral horn motor neurons at different segmental levels of the spinal cord of rats aged 3–90 days both under normal conditions and in the model of deafferentation (by intraperitoneal capsaicin injection). Wave-like age changes of motor neuron enzyme activity were detected at the level of T<sub>II</sub>, L<sub>IV</sub> and S<sub>II</sub> spinal segments with its increase by day 60 followed by a significant decrease to day 90. Age dynamics of NADPH-diaphorase activity development in the spinal cord motor neurons of intact rats characterizes the constructive processes in neurons, while the changes found after the deafferentation are indicative of the motor neuron damage and are manifested by an abrupt increase of the enzyme activity at the age of 90 days.

**Key words:** *spinal cord, motor neurons, NADPH-diaphorase, nitric oxide, chemical deafferentation.*

Department of Human Anatomy, Yaroslavl State Medical Academy.