



О. В. Ганчева, Ю. М. Колесник, М. В. Данукало

Лінійні відмінності патерну експресії нейрональної NO-синтази у структурі блакитної плями стовбура мозку щурів

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: стовбур мозку, блакитна пляма, щури ліній Wistar і SHR, nNOS.

Мета роботи – встановити лінійні відмінності експресії нейрональної NO-синтази (nNOS), особливості її розподілу в судинному та клітинному компартментах блакитної плями стовбура мозку у щурів-самців ліній Wistar і SHR.

Матеріали та методи. Дослідження здійснили на 10 щурах (самцях) лінії Wistar і 10 щурах (самцях) лінії SHR масою 250–270 г. Об'єктом дослідження був довгастий мозок. Для вивчення патерну експресії nNOS у клітинному і судинному компартментах блакитної плями стовбура мозку використовували імунофлуоресцентний метод її ідентифікації в серійних гістологічних зрізах.

Встановили, що експресія nNOS у структурі блакитної плями стовбура мозку істотно відрізняється в щурів різних ліній; характеризується компартменталізацією на два відділи – тканинний (нейрони та гліальні клітини) й судинний (ендотеліоцити та еритроцити). У щурів лінії SHR встановили збільшення концентрації ферменту в тканинному компартменті більш ніж у 2 рази ($p < 0,05$), перевищення площі імунореактивності в судинному компартменті в 1,8 рази ($p < 0,05$), а концентрації – на 7% ($p < 0,05$), порівнюючи з відповідними показниками у щурів лінії Wistar.

Линейные отличия паттерна экспрессии нейрональной NO-синтазы в структуре голубого пятна ствола мозга крыс

О. В. Ганчева, Ю. М. Колесник, М. В. Данукало

Цель работы – установить линейные различия экспрессии нейрональной NO-синтазы (nNOS), особенностей её распределения в сосудистом и клеточном компартментах голубого пятна ствола мозга у крыс-самцов линий Wistar и SHR.

Материалы и методы. Исследование провели на 10 крысах (самцах) линии Wistar та 10 крысах (самках) линии SHR массой 250–270 г. Объектом исследования был продолговатый мозг. Для изучения паттерна экспрессии nNOS в клеточном и сосудистом компартментах голубого пятна ствола мозга использовали иммунофлуоресцентный метод её идентификации в серийных гистологических срезах.

Установлено, что экспрессия nNOS в структуре голубого пятна ствола мозга существенно отличается у крыс разных линий; характеризуется компартментализацией на два отдела – тканевый (нейроны и глиальные клетки) и сосудистый (эндотелиоциты и эритроциты). У крыс линии SHR установлено увеличение концентрации фермента в тканевом компартменте более чем в 2 раза ($p < 0,05$), превышение площади иммунореактивности в сосудистом компартменте в 1,8 рази ($p < 0,05$), а концентрации – на 7% ($p < 0,05$) по сравнению с соответствующими показателями у крыс линии Wistar.

Ключевые слова: ствол мозга, голубое пятно, крысы линий Wistar и SHR, nNOS.

Запорожский медицинский журнал. – 2016. – №2 (95). – С. 89–92

Linear differences of neuronal NO-synthase expression pattern in locus coeruleus in rats

O. V. Gancheva, Yu. M. Kolesnyk, M. V. Danukalo

The **aim** of the research was to establish linear differences of nNOS expression pattern, peculiarities of its distribution in vascular and cellular compartment of locus coeruleus in the brainstem of Wistar and SHR rats.

Methods and results. The research was carried out on 10 Wistar male rats and 10 male SHR rats with body mass 250-270 g. Decapitation was done under anesthesia (sodium ethaminalum 40 mg/kg intraperitoneally).

Identification of locus coeruleus neurons was done with the help of stereotactic atlas of rat's brain. nNOS expression in the serial brainstem histological sections was studied with immunocytofluorescent method. Histological sections were incubated with primary rabbit IgG to rats' nNOS (Sigma Chemical, USA). Then secondary mice IgG to rabbit IgG conjugated with FITC (Sigma Chemical, USA). 1:64 dilution were applied. Package of statistical programs VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, Germany) in EXCEL 7.0 (Microsoft Corp., USA) was used for analysis. Data with $p < 0,05$ were taken as reliable.

Conclusion. The results of the research demonstrated heterogeneity of nNOS distribution in rat's brain stem locus coeruleus. Expression pattern of nNOS in locus coeruleus is characterized by compartmentalisation into two sections: cellular (neurons and glial cells) and vascular (endothelial cells and erythrocytes). Wistar and SHR rats have linear differences in nNOS expression. It is characterized by increased concentration of the enzyme in cellular compartment in two times more ($p < 0,05$) in SHR rats. At the same time in vascular compartment in SHR rats the increase immunoreactive area in 1.8 times more ($p < 0,05$), and by 7% ($p < 0,05$) concentration in comparison with appropriate indices in Wistar rats.

Key words: Brain Stem, Locus Coeruleus, Wistar And SHR Rats, nNOS.

Zaporozhye medical journal 2016; №2 (95): 89–92

Блакитна пляма (БП) – це сукупність нейронів, котрі розташовані на рівні мосту мозку поблизу стінки 4 шлуночка. Ця структура представлена переважно норадренергічними нейронами.

На сьогодні доволі чітко визначені деякі функції БП. Так, доведено, що система її нейронів відіграє важливу роль у регуляції циклу сон – неспання, артеріального тиску, процесах навчання, пам'яті, регуляції больової чутливості [1–4].

Водночас залишаються відкритими питання функціональної спроможності структури при різних патологічних станах, порушеннях мікроциркуляції та нейротрансмітерної складової. Відомо, що адекватне кровопостачання, іннервація та міжнейрональні взаємини нейронів забезпечуються шляхом адекватного кровопостачання та функцій нейроглії. Сполучною ланкою параметрів, що описані вище, є система монооксиду азоту та її універсальний месенджер



NO. Утворення NO (як у кількісному, так і топографічно-му плані) залежить від типу ферменту, що його синтезує. Встановлені три ізоформи ферменту NOS: нейрональна (nNOS), макрофагальна (iNOS) та ендотеліальна (eNOS). Тому вважаємо, що функціональна активність нейронів вегетативних центрів стовбура мозку і, зокрема блакитної плями, повинна мати пряму залежність від активності ізоформ NOS, їх співвідношення та особливостей розподілу у структурі БП (клітинному або судинному компартментах).

Мета роботи

Встановити лінійні відмінності експресії nNOS, особливості її розподілу в судинному та клітинному компартментах блакитної плями стовбура мозку у щурів лінії Wistar і SHR.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження здійснили на 10 щурах (самцях) лінії Wistar і 10 щурах (самцях) лінії SHR масою 250–270 г. Експериментальну частину дослідження виконували в суворій відповідності до національних «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), котрі узгоджені з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) і «Положенням про використання тварин в біомедичних дослідженнях» (1989).

Об'єктом дослідження в експериментальних тварин був довгастий мозок; декапітацію тваринам виконували під наркозом (етамінал натрію 40 мг/кг внутрішньочеревинно). Топографічну ідентифікацію нейронів блакитної плями стовбура мозку здійснювали за допомогою стереотаксичного атласу мозку щурів [5].

Для дослідження патерну експресії nNOS у клітинному та судинному компартментах блакитної плями стовбура мозку застосовували імунофлуоресцентний метод її ідентифікації в серійних гістологічних зрізах. Для виявлення nNOS гістологічні зрізи інкубували з первинними кролячими IgG антитілами до nNOS щура (Sigma Chemical, США) у розведенні 1:100. Потім наносили вторинні мишачі IgG до повної молекули IgG кроля, що кон'юговані з FITC (Sigma Chemical, США) у розведенні 1:64.

Імунофлуоресцентні дослідження зрізів стовбура мозку виконували в ультрафіолетовому спектрі збудження за допомогою світлофільтра 38HE з високою емісією на мікроскопі AxioImager-M2. Зображення нейронів блакитної плями, котрі були отримані з відеокамери AxioCam-5HRm, записували у вигляді комп'ютерного файлу з наступним опрацюванням системою цифрового аналізу AxioVision 4.8.2.

Під час аналізу зрізів з імуним фарбуванням на nNOS в інтерактивному режимі виділялися зони, що відповідають БП зі статистично значущою флуоресценцією. Визначали відносну площу імунореактивного матеріалу (IPM) (%) у стандартному полі зору (тобто на площі майже 40 000 мкм²) і концентрацію nNOS (інтенсивність флуоресценції в умовних одиницях, УО_{1ф}). Дослідженню піддавали не менш ніж 200 полів зору з кожної серії.

Усі експериментальні дані опрацювали за допомогою пакета прикладних і статистичних програм VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, ФРН) і EXCEL-7.0 (Microsoft Corp., США). Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії й помилки середньої (m). Для виявлення вірогідності відмінностей результатів досліджень у групах щурів визначали коефіцієнт Стьюдента (t), після чого визначали ймовірність відмінності вибірок (p) і довірчий інтервал середньої за таблицями розподілу Стьюдента. Вірогідними вважали значення, для яких $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Під час дослідження патерну експресії нейрональної ізоформи NOS у структурі блакитної плями стовбура мозку встановили, що в щурів обох ліній фермент розподілявся неоднорідно та виявлявся в нейронах, судинних і гліальних клітинах. Це дало можливість розподілити локалізацію досліджуваного ферменту на два компартменти: судинний і тканинний.

Тканинний компартмент характеризувався неоднорідністю клітинного складу. Експресію ферменту спостерігали як у нейронах блакитної плями, так і у клітинах глії. Більшою частиною локалізацію nNOS у нейронах БП спостерігали переважно субмембранно у вигляді невеличких «глибок», перінуклеарна область нейрона була вільною від ферменту. У невеликій кількості нейронів експресія nNOS додатково відзначалася у вигляді дифузної сітки в цитозолі клітини. У гліальних клітинах експресія nNOS характеризувалась наявністю вираженої флуоресценції в усій цитоплазмі клітини за відсутності її в області ядра, яке в більшості нейронів розташовувалося ексцентрично.

У судинному компартменті БП експресія ферменту, порівнюючи із тканинним, виражена слабше. Спостерігалися поодинокі капіляри з інтенсивною флуоресценцією, при візуальному аналізі котрої практично не було можливості ідентифікувати джерело експресії: чи це ендотеліоцит або еритроцит.

При інтерпретації результатів, що отримані під час цифрового аналізу зображення блакитної плями на системі AxioVision 4.8.2, встановили: відносна площа імунореактивного матеріалу до nNOS у щурів лінії Wistar вірогідно не відрізнялась від показників щурів лінії SHR, однак концентрація ферменту вірогідно більш ніж у 2 рази ($p < 0,05$) перевищувала відповідний показник щурів лінії Wistar (табл. 1).

Таблиця 1

Показники експресії nNOS у тканинному компартменті блакитної плями стовбура мозку в щурів ліній Wistar і SHR, (M±m)

Лінії тварин	Відносна площа імунореактивного матеріалу до nNOS, %	Концентрація nNOS, УО _{1ф}
Wistar, n=10	8,99±1,6	0,46±0,05
SHR, n=10	7,53±0,75	1,037±0,185*

Примітка: * – відмінності показників щурів лінії SHR вірогідні при $p < 0,05$ щодо показників щурів лінії Wistar.



У судинному компартменті нами відзначені суттєві лінійні відмінності в показниках експресії nNOS. Так, відносна площа імунореактивного матеріалу до nNOS у щурів лінії SHR була більшою в 1,8 раза ($p < 0,05$), водночас як концентрація ферменту була вірогідно меншою на 7% ($p < 0,05$) (табл. 2).

Таблиця 2

Показники експресії nNOS у судинному компартменті блакитної плями стовбура мозку в щурів ліній Wistar та SHR, (M±m)

Лінії тварин	Відносна площа імунореактивного матеріалу до nNOS, %	Концентрація nNOS, УОд _{цф}
Wistar, n=10	137,25±19,46	0,74±0,012
SHR, n=10	247,53±17,07*	0,69±0,011*

Примітка: * – відмінності показників щурів лінії SHR вірогідні при $p < 0,05$ щодо показників щурів лінії Wistar.

Отже, під час дослідження встановили, що експресія нейрональної NOS у структурі блакитної плями стовбура мозку суттєво відрізняється в щурів різних ліній. На прикладі щурів Wistar і SHR довели, що експресія ферменту відзначається в різних структурах БП, а саме: клітинах (нейронах і глії) й судинах. Відзначимо, що в судинному компартменті встановлені лінійні відмінності експресії як за площею, так і за концентрацією ферменту, водночас як у тканинному компартменті відмінності стосувалися тільки концентрації nNOS.

На нашу думку, такі відмінності зумовлені функціональними особливостями ферменту та монооксиду азоту, котрий утворюється завдяки активації nNOS. Так, відомо, що оксид азоту ініціює експресію синтезу багатьох важливих білків та ферментів як на рівні транскрипції, так і на рівні трансляції: це – стрес-білки, феритин, білки антиоксидантного

захисту, білки рецепторів трансферину, ядерний білок p53, що є відповідальним за блокаду злоякісних новоутворень, білок типу цитохрому P450, фактора транскрипції NF-κB, білки іонних каналів тощо [6,7]. Оксид азоту може також впливати на активність багатьох ферментів – гуанілатциклази, рибонуклеотидредуктази, компонентів дихальної ланки мітохондрій та гліколізу [8,9]. Порушення синтезу цих білків або активності зазначених вище ферментів може стати підґрунтям формування багатьох патологій: цукрового діабету, артеріальної гіпертензії, ожиріння, серцевої недостатності.

Усе це дає підставу вважати, що особливості артеріального тиску в щурів лінії SHR, а саме його стійке підвищення, може бути зумовлене дискоординацією експресії nNOS у компартментах БП – ключового регулятора симпатичної активності й артеріального тиску [10].

Висновки

1. Експресія нейрональної nNOS у структурі блакитної плями стовбура мозку суттєво відрізняється в щурів різних ліній. Патерн експресії ферменту nNOS у структурі блакитної плями характеризується компартменталізацією на два відділи: тканинний (нейрони й гліальні клітини) та судинний (ендотеліоцити й еритроцити).

2. Для щурів SHR є характерним збільшення концентрації ферменту в тканинному компартменті більш ніж у 2 рази ($p < 0,05$), водночас як у судинному компартменті площа імунореактивності перевищує відповідний показник щурів Wistar у 1,8 раза ($p < 0,05$), а концентрація – на 7% ($p < 0,05$).

Перспективи подальших досліджень. Для одержання цілісної картини стану системи монооксиду азоту блакитної плями стовбура мозку необхідно виконати дослідження патерну експресії інших ізоформ NOS: ендотеліальної та макрофагальної.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Список літератури

- Белова Т.И. Гомеостатические функции locus ceruleus (голубого пятна) / Т.И. Белова, Е.Л. Голубева, К.В. Судаков. – М.: Наука, 1980. – 117 с.
- Частная физиология нервной системы. – Ленинград: Наука, 1983. – 734 с.
- Samuels E.R. Functional neuroanatomy of noradrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function. Part 1: principles of functional organization / E.R. Samuels, E. Szabadi // *Current Neuropharmacology*. – 2008. – №6. – P. 235–253.
- Norepinephrine: a neuromodulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance / J. O'Donnell, D. Zeppenfeld, E. McConnell et al. // *Neurochem Res*. – 2012. – №37(11). – P. 2496–2512.
- Paxinos G. The rat brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, Ch. Watson. – Academic Press, 1998. – 474 с.
- Michel Th. Cellular signaling and NO production / Th. Michel, P.M. Vanhoutte // *Pflugers Arch*. – 2010. – №459. – P. 807–816.
- Forstermann U. Nitric oxide synthases: regulation and function / U. Forstermann, W.C. Sessa // *European Heart Journal*. – 2012. – №33. – P. 829–837.
- Fleissnerand F. Critical Role of the Nitric Oxide/Reactive Oxygen Species Balance in Endothelial Progenitor Dysfunction / F. Fleissnerand, Th. Thum // *Antioxidants & redox signaling*. – 2011. – №4. – P. 933–948.
- Villanueva C. Subcellular and cellular locations of nitric-oxide synthase isoforms as determinants of health and disease / C. Villanueva, C. Giulivi // *Free. Radic. Biol. Med*. – 2010. – №49. – P. 1–23.
- Mitochondrial oxidant stress in locus coeruleus is regulated by activity and nitric oxide synthase / J. Sanchez-Padilla, J.N. Guzman, E. Ilijic et al. // *Nat. Neurosci*. – 2014. – №17. – P. 832–840.

References

- Belova, T., Golubeva, E., & Sudakov, K. (1980). *Gomeostaticheskie funkcii locus ceruleus (golubogo pyatna) [Homeostatic function of locus coeruleus (blue spots)]*. Moscow: Nauka. [in Russian].
- (1983). *Chastnaya fiziologiya nervnoj sistemy [Private physiology of the nervous system]*. Leningrad: Nauka. [in Russian].
- Samuels, E. R., & Szabadi, E. (2008) Functional neuroanatomy of noradrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function. Part 1: principles of functional organization. *Current Neuropharmacology*, 6, 235–253. doi: 10.2174/157015908785777229.
- O'Donnell, J., Zeppenfeld, D., McConnell, E., Pena, S., & Ned-



- ergaard, M. (2012) Norepinephrine: a neuromodulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance. *Neurochem Res.*, 37(11), 2496–2512. doi: 10.1007/s11064-012-0818-x.
5. Paxinos, G., & Watson, Ch. (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*.
 6. Michel, Th., & Vanhoutte, P. M. (2010) Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch.*, 459, 807–816. doi: 10.1007/s00424-009-0765-9.
 7. Forstermann, U., & Sessa, W. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, 33(7), pp.829-837. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.
 8. Fleissner, F., & Thum, T. (2011). Critical Role of the Nitric Oxide/Reactive Oxygen Species Balance in Endothelial Progenitor Dysfunction. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(4), 933–948. doi: 10.1089/ars.2010.3502.
 9. Villanueva, C., & Giulivi, C. (2010). Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(3), 307–316. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.004.
 10. Sanchez–Padilla, J., Guzman, J. N., E. Ilijic, Kondapalli, J., J Galtieri, D., Yang, B. et al. (2014) Mitochondrial oxidant stress in locus coeruleus is regulated by activity and nitric oxide synthase. *Nat. Neurosci*, 17, 832–840. doi:10.1038/nn.3717.

Відомості про авторів:

Ганчева О. В., д-р мед. наук, професор каф. патологічної фізіології, Запорізький державний медичний університет,
E-mail: gancheva_olga@mail.ru.

Колесник Ю. М., д-р мед. наук, професор, зав. каф. патологічної фізіології, ректор Запорізького державного медичного університету.
Данукало М. В., асистент каф. патологічної фізіології, Запорізький державний медичний університет.

Сведения об авторах:

Ганчева О. В., д-р мед. наук, профессор каф. патологической физиологии, Запорожский государственный медицинский университет,
E-mail: gancheva_olga@mail.ru.

Колесник Ю. М., д-р мед. наук, профессор, зав. каф. патологической физиологии, ректор Запорожского государственного медицинского университета.

Данукало М. В., ассистент каф. патологической физиологии, Запорожский государственный медицинский университет.

Information about authors:

Gancheva O. V., MD, PhD, DSci., Professor, Department of Pathological Physiology, Zaporizhzhia State Medical University,
E-mail: gancheva_olga@mail.ru.

Kolesnyk Yu. M., MD, PhD, DSci., Professor, Head of the Department of Pathological Physiology, Rector, Zaporizhzhia State Medical University.

Danukalo M. V., Assistant, Department of Pathological Physiology, Zaporizhzhia State Medical University.

Поступила в редакцию 24.02.2016 г.