

А. В. Смирнов^{1,6}, **А. А. Замлелов**¹, **И. Н. Тюренок**²,
В. И. Стаценко³, **Л. И. Александрова**⁴, **Р. П. Самусев**⁴, **В. С. Замараев**⁵

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» МЗ РФ,

¹ кафедра патологической анатомии,

² кафедра фармакологии и фармации Института НМФО,

³ кафедра клинической фармакологии и интенсивной терапии,

⁴ кафедра анатомии человека,

⁵ кафедра микробиологии;

⁶ ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр»

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ iNOS В ГИППОКАМПЕ И ЗУБЧАТОЙ ИЗВИЛИНЕ КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

УДК 616-091.8

Проведен качественный анализ экспрессии биомаркера iNOS в гиппокампе и зубчатой извилине крыс при моделировании хронической алкогольной интоксикации. В гиппокампе и зубчатой извилине алкоголизованных крыс определялась интенсивная экспрессия iNOS, что свидетельствует о роли NO в процессах нейротоксичности посредством активации нитроксидергической системы в головном мозге крыс.

Ключевые слова: алкоголь, крыса, гиппокамп, зубчатая извилина, iNOS, повреждение, алкогольная интоксикация.

A. V. Smirnov, A. A. Zamllelov, I. N. Tyurenkov,
V. I. Statsenko, L. I. Alexandrova, R. P. Samusev, V. S. Zamaraev

MORPHOLOGICAL FEATURES OF iNOS EXPRESSION IN THE HIPPOCAMPUS AND DENTATE GYRUS OF RATS IN MODELING OF CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION

A qualitative analysis of the expression of the iNOS biomarker in the hippocampus and dentate gyrus of rats was performed when modeling chronic alcohol intoxication. Intense iNOS expression was detected in the hippocampus and dentate gyrus of alcoholized rats, which indicates the role of NO in neurotoxicity processes through activation of the nitroxidergic system in the rat brain.

Key words: alcohol, rat, hippocampus, dentate gyrus, iNOS, injury, alcohol intoxication.

В настоящее время остается актуальной проблема распространения хронической алкогольной зависимости среди молодого взрослого населения в Российской Федерации и других странах, что также способствует росту психиатрической коморбидной патологии, в том числе других аддиктивных состояний, соматических заболеваний [2]. Известно, среди органов-мишеней алкоголь индуцированного повреждения особое место занимает головной мозг, что связано с постоянно растущим числом инсультов, внезапной смертью [3]. Патогенез алкогольного поражения головного мозга является сложным и до конца не изученным, связан как с воздействием этанола и продуктов его метаболизма на мозговое кровообращение, так и с поражением нейронов различных отделов ЦНС, реализацией механизмов отека и набухания головного мозга [6]. В механизмах

повреждения головного мозга этанолом и его метаболитами важную роль играет система оксида азота. Имеются данные об алкоголь-индуцированной гиперпродукции NO и ее цитотоксических форм, что приводит к формированию нитрозирующего стресса [1, 7].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Охарактеризовать морфологические особенности экспрессии iNOS в гиппокампе и зубчатой извилине крыс при экспериментальном моделировании хронической алкогольной интоксикации.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование производилось на белых лабораторных крысах самцах 6-месячного возраста исходной массой 220–240 г. Содержание животных соответствовало правилам лабора-

торной практики (GLP) и приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики», были учтены требования комиссии Российского национального комитета по биоэтике при Российской академии наук. Хронический алкоголизм моделировался на крысах путем замены питьевой воды 5%-м этиловым спиртом, подслащенным сахарозой (5 г сахара на 100 мл 5%-го раствора этанола) в течение 20 недель. Группа контроля получала воду. Животные подвергались эвтаназии путем декапитации под наркозом с целью забора головного мозга, фиксировали образцы головного мозга в 10%-м забуференном формалине.

По стандартной методике изготавливали парафиновые блоки и срезы толщиной 5 мкм. Иммуногистохимическое исследование проводили непрямой пероксидазно-антипероксидазным методом с использованием поликлональных антител к iNOS (1:100) согласно протоколу производителя, с использованием полимерной системы (Thermo Scientific, Fremont, CA). В качестве хромогена использовали DAB (диаминобензидин). Оценка изменения уровня экспрессии определяли путём оценки интенсивности реакции в соответствии с 4-балльной адаптированной шкалой Allred (0 – отсутствие реакции, 1 – слабая интенсивность, 2 – умеренная интенсивность, 3 – выраженная интенсивность).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При микроскопическом исследовании гиппокампа и зубчатой извилины интактных и алк-

голизированных животных определялась следующая характеристика: экспрессия iNOS отмечается в гиппокампе и зубчатой извилине и характеризуется неравномерным характером. В зоне CA1 гиппокампа обеих групп животных экспрессия биомаркера имеет слабую степень выраженности (рис. 1, 2).

Достаточная визуализация экспрессии имеется в зонах CA2, CA3, CA4 гиппокампа (рис. 3, 4) и в зубчатой извилине (*hilus*). В зонах гиппокампа CA2 и CA3 интактных и алкоголизированных животных экспрессия в большей степени выраженности в *stratum radiatum* и в меньшей степени выраженности в *pyramidal layer*. В *pyramidal layer* иммунопозитивный материал определяется в межклеточном пространстве и цитоплазме нейронов. В зоне гиппокампа CA4 интактных и алкоголизированных животных экспрессия биомаркера в пирамидном слое имеет диффузный характер и также наблюдается в цитоплазме нейронов. Интенсивность экспрессии iNOS в гиппокампе: интактная группа CA1 – балл 0; CA2, CA3, CA4 – балл 1 (см. табл.). Интенсивность экспрессии iNOS в гиппокампе: алкоголизированная группа CA1 – балл 0, CA2, CA3, CA4 – балл 2. В зубчатой извилине экспрессия визуализируется преимущественно в полиморфном слое (*hilus*), незначительно экспрессируется в цитоплазме нейронов слоя гранулярных клеток (GCL) и молекулярного слоя (ML) как у интактных, так у алкоголизированных животных (рис. 5, 6). Интенсивность экспрессии iNOS в баллах: интактная группа – балл 1; алкоголизированная группа – балл 2.

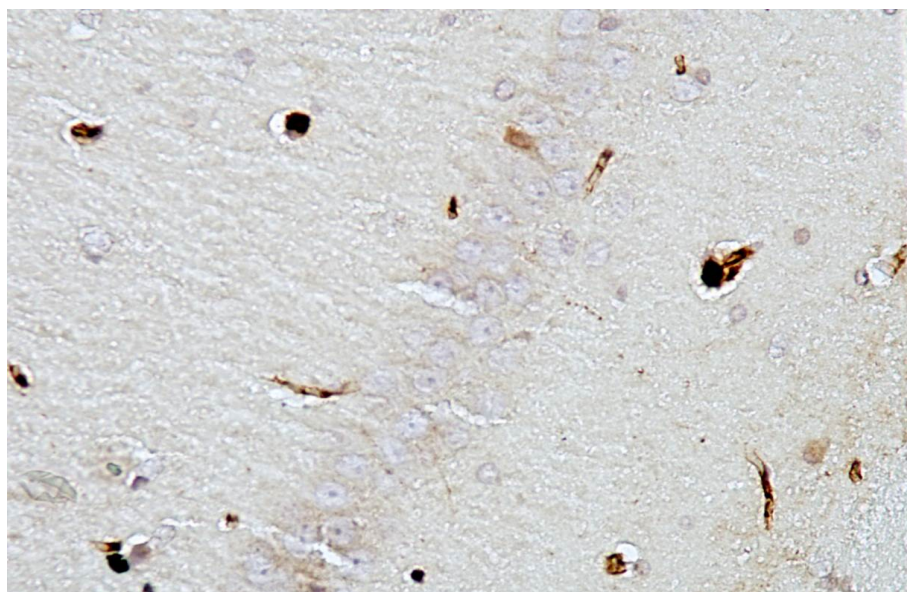


Рис. 1. Зона CA1 гиппокампа интактных крыс в возрасте 11 месяцев. Экспрессия iNOS имеет слабую степень выраженности – 0 баллов. Иммуногистохимическое исследование, антитела против iNOS, докраска гематоксилином. Ув. ×400

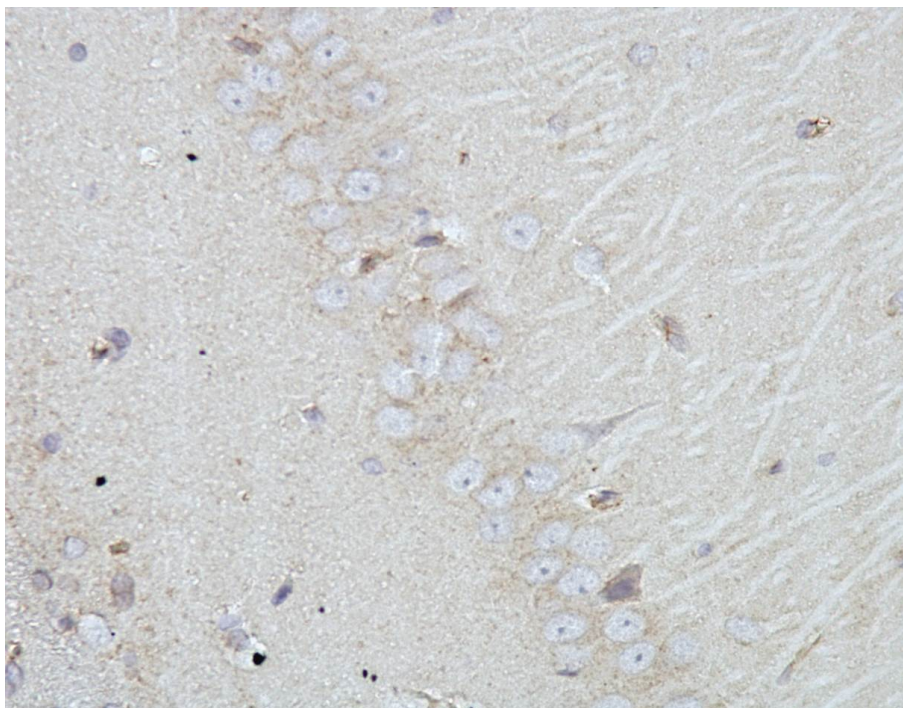


Рис. 2. Зона CA1 гиппокампа алкоголизованных крыс в возрасте 11 месяцев. Экспрессия iNOS имеет слабую степень выраженности – 0 баллов. Иммуногистохимическое исследование, антитела против iNOS, докраска гематоксилином. Ув. ×400

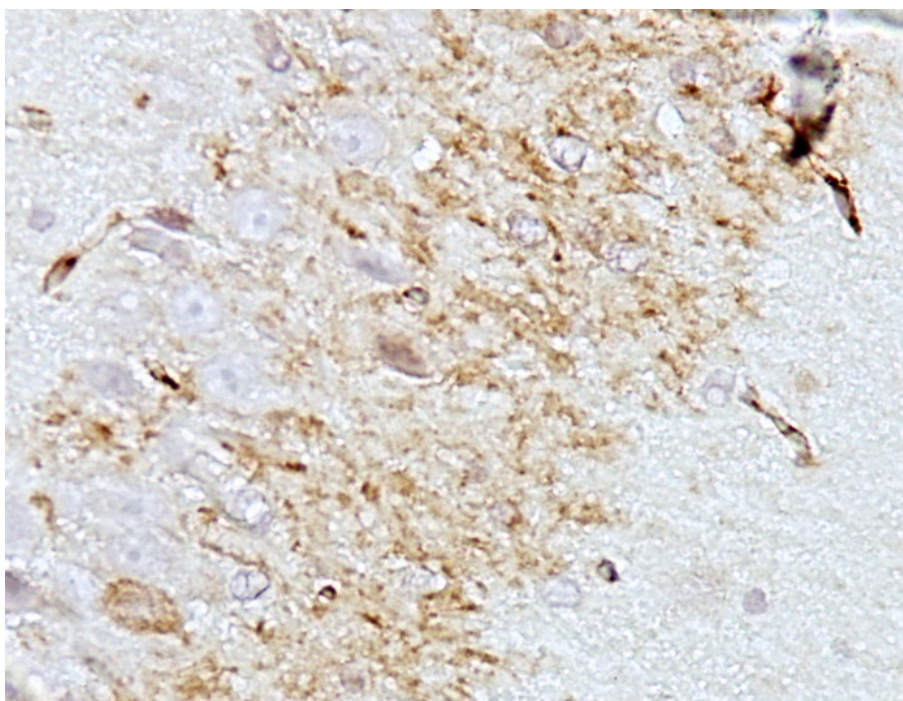


Рис. 3. Зона CA3 гиппокампа intactных крыс в возрасте 11 месяцев. Экспрессия iNOS преимущественно локализуется в *stratum radiatum*, меньше в *pyramidal layer*, степень выраженности – 1 балл. Иммуногистохимическое исследование, антитела против iNOS, докраска гематоксилином. Ув. ×600

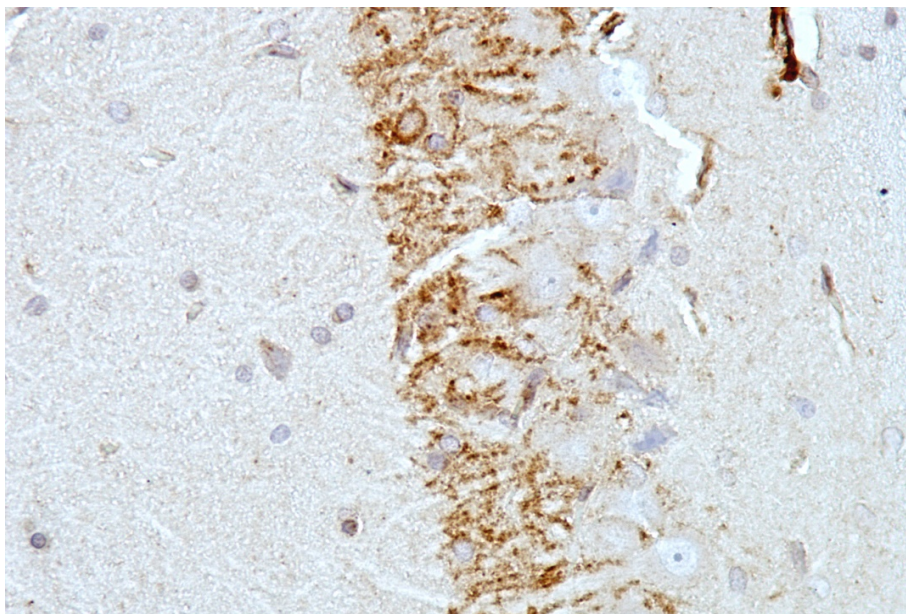


Рис. 4. Зона CA3 гиппокампа алкоголизованных крыс в возрасте 11 месяцев. Экспрессия iNOS преимущественно локализуется в *stratum radiatum* и в меньшей степени в *pyramidal layer*, степень выраженности – 2 балла. Иммуногистохимическое исследование, антитела против iNOS, докраска гематоксилином. Ув. ×400

Интенсивность экспрессии биомаркера iNOS в гиппокампе intactных крыс и при моделировании хронической алкогольной интоксикации

Зоны гиппокампа	Интенсивность экспрессии iNOS у intactных животных в баллах	Интенсивность экспрессии iNOS у алкоголизованных животных в баллах
CA1	0	0
CA2	1	2
CA3	1	2
CA4	1	2

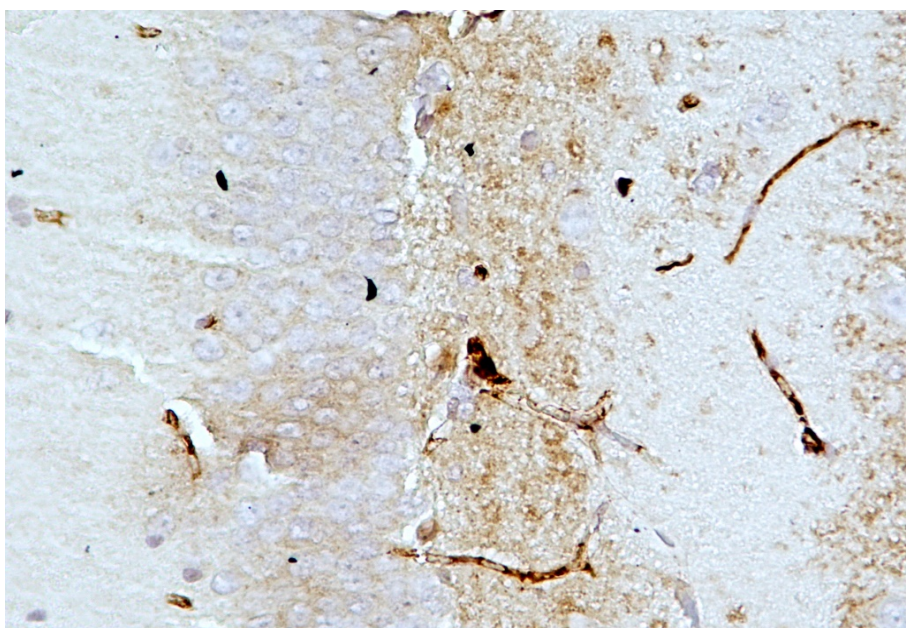


Рис. 5. Зубчатая извилина intactных крыс возрастом 11 месяцев. Экспрессия iNOS преимущественно локализуется в *stratum radiatum* и в меньшей степени в *pyramidal layer*, степень выраженности – 1 балл. Иммуногистохимическое исследование, антитела против iNOS, докраска гематоксилином. Ув. ×400

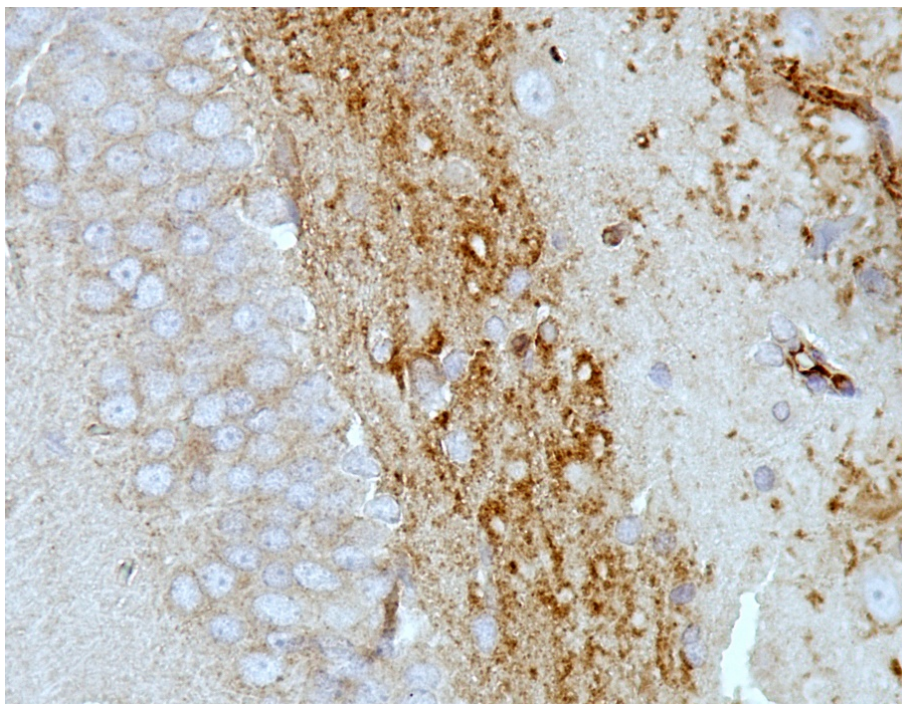


Рис. 6. Зубчатая извилина алкоголизованных крыс возрастом 11 месяцев. Экспрессия iNOS преимущественно локализуется в *stratum radiatum* и в меньшей степени в *pyramidal layer*, степень выраженности – 2 балла. Иммуногистохимическое исследование, антитела против iNOS, докраска гематоксилином. Ув. ×500

Согласно литературным данным экспрессия биомаркера iNOS наблюдается у крыс в нормальном стареющем мозге [4]. Экспрессия биомаркера iNOS определяется в нейронах, нейропиле (преимущественно в клетках микроглии вблизи синаптических элементов) [5]. В нашем исследовании при хронической алкоголизации наиболее выраженная экспрессия биомаркера iNOS наблюдалась в гиппокампе СА3 и зубчатой извилине (*stratum radiatum*), в других зонах гиппокампа отмечена более интенсивная экспрессия биомаркера iNOS по сравнению с интактной группой животных, что свидетельствует об увеличении уровня iNOS как в нейронах, так и в глиальных клетках гиппокампа и зубчатой извилины.

Подобные морфофункциональные изменения могут способствовать увеличению продукции NO и пероксинитритов, а также других свободно радикальных форм, которые принимают участие в реализации NOS-зависимых механизмах нейротоксичности [7].

ЛИТЕРАТУРА

1. Нитрозирующий стресс и апоптоз нейронов СА1-зоны гиппокампа в условиях моделирования хронической алкогольной интоксикации: нейропротективные эффекты тиоцетама / И. Ф. Беленичев [и др] // Вестник новых медицинских технологий. – 2014. – Т. 21, № 3. – С. 86 – 89. – Текст : непосредственный.
2. Alcohol use disorder relapse factors: A systematic review / W. Slidrecht [et al.] // *Psychiatry Res.* – 2019. – Vol. 278. – P. 97 – 115. – Direct text.
3. Association of alcohol in brain injury, headaches, and stroke with brain-tissue and serum levels of ionized magnesium: a review of recent findings and mechanisms of action / B. M. Altura [et al.] // *Alcohol.* – 1999. – Vol. 19 (2). – P. 119 – 130. – Direct text.
4. Brain iNOS: current understanding and clinical implications / J. Licinio [et al.] // *Molecular Medicine Today.* – 1999. – Vol. 5 (5). – P. 225 – 232. – Direct text.
5. Chronic Isolation Stress Affects Subsequent Crowding Stress-Induced Brain Nitric Oxide Synthase (NOS) Isoforms and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis Responses / A. Gądek-Michalska [et al.] // *Neurotoxicity Research.* – 2019. – Vol. 36. – P. 523 – 539. – Direct text.
6. Effect of alcohol on diffuse axonal injury in rat brainstem: diffusion tensor imaging and aquaporin-4 expression study / L. Kong [et al.] // *Biomed Res Int.* – 2013. – P. 798261. – Direct text.
7. **El-Mas, M. M.** Metabolism and Effects: Nitric Oxide and its Interaction / M. M. El-Mas, A. A. Abdel-Rahman // *Alcohol.* – 2013. – Vol. 47 (4). – P. 339 – 346. – Direct text.
8. Increased iNOS and Nitrosative Stress in Dopaminergic Neurons of MDMA-Exposed Rats / S. Schiavone [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20 (5). – P 1242. – Direct text.