

© Коллектив авторов, 2019
УДК 611.81.013, 611.813.3
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14007>
ISSN – 2073-8137

ВОЗРАСТНАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ НИТРЭРГИЧЕСКИХ СУБПОПУЛЯЦИЙ НЕЙРОНОВ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ЛУКОВИЦЫ КРЫСЫ

В. Е. Варенцов, Т. А. Румянцева, К. К. Пшениснов, Т. С. Мясищева, Д. А. Пожилов

Ярославский государственный медицинский университет, Россия

AGE PLASTICITY OF THE NEURONS NITRERGIC SUBPOPULATIONS IN THE OLFACTORY BULBS OF RAT

Varentsov V. E., Rumyantseva T. A., Pshenisnov K. K., Myasishcheva T. S., Pozhilov D. A.

Yaroslavl State Medical University, Russia

В обонятельной луковице белой крысы при иммуногистохимическом исследовании n-NOS-позитивность выявляется в телах отдельных нейронов, части их отростков. Выявлено три субпопуляции n-NOS-позитивных нейронов с разным уровнем активности фермента и разной динамикой возрастных преобразований. Эта гетерогенность нейронов ОЛ по активности фермента обусловлена их функциональной разнородностью, что необходимо учитывать при трактовке результатов экспериментальных работ.

Ключевые слова: обонятельная луковица, нейрогенез, n-NO-синтаза, онтогенез

In immunohistochemical studies, n-NOS-positivity is detected in the bodies and processes of neurons. In the rat's olfactory bulb, there are three subpopulations of n-NOS-positive neurons with different enzyme activity levels and different dynamics of age transformations. The heterogeneous enzyme activity is due to the different functions of neurons. That must be taken into account when interpreting the results of the experimental studies.

Keywords: olfactory bulb, neurogenesis, n-NO-synthase, ontogenesis

Для цитирования: Варенцов В. Е., Румянцева Т. А., Пшениснов К. К., Мясищева Т. С., Пожилов Д. А. ВОЗРАСТНАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ НИТРЭРГИЧЕСКИХ СУБПОПУЛЯЦИЙ НЕЙРОНОВ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ЛУКОВИЦЫ КРЫСЫ. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2019;14(1.2):168-171. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14007>

For citation: Varentsov V. E., Rumyantseva T. A., Pshenisnov K. K., Myasishcheva T. S., Pozhilov D. A. AGE PLASTICITY OF THE NEURONS NITRERGIC SUBPOPULATIONS IN THE OLFACTORY BULBS OF RATS. *Medical News of North Caucasus*. 2019;14(1.2):168-171. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14007> (In Russ.)

КАН – короткоаксонные нейроны
ОЛ – обонятельная луковица

NO – оксид азота
n-NOS – нейрональная NO-синтаза

Функции NO в нервной системе разнообразны, из них наиболее примечательной является связь NO с динамическими процессами, такими как миграция и дифференцировка нейробластов, новообразование и ремоделирование синапсов на протяжении онтогенеза [1, 2, 3], нейронная пластичность и сенсорная обработка стимулов [4]. Есть данные, что NO может действовать в нервной системе как антипролиферативный фактор у млекопитающих [5], в то же время активируя нейрогенез у других животных [6, 7]. Зоны, богатые нитрэргическими нейронами, анатомически тесно связаны с зонами интенсивного нейрогенеза [3, 8]. Вероятно, что нитрэргические механизмы участвуют в регуляции процессов нейрогенеза не только на ранних этапах онтогенеза, но и в мозге взрослых животных [6, 7].

В настоящее время данные о влиянии нитрокси-дэргических соединений на течение и активность нейрогенеза неоднозначны, так как отсутствуют де-

тальные данные о распределении NO-позитивных структур в различных слоях обонятельных луковиц крыс, не учитываются возрастные особенности, что затрудняет оценку направленности компенсаторно-приспособительных реакций при экспериментальных воздействиях.

Целью исследования является установление возрастных показателей активности n-NOS в позитивных субпопуляциях нейронов обонятельной луковицы у интактных крыс.

Материал и методы. Исследование проведено на 25 белых крысах-самцах линии Wistar разного возраста (по 4–5 в группе). Возраст крыс выбирался в соответствии с рекомендациями И. П. Западнюка и соавт. (1974): плоды (22 суток), новорожденные (1–3 сутки), подсосного периода (7 и 14 суток), инфантильного (30 суток), ювенильного (60 суток), зрелого (180 суток).

Объект исследования – правые обонятельные луковицы. После предварительной транскардиальной

перфузии 10 % забуференным формалином материал фиксировали в течение 24 часов при температуре 4 °С. Использовали парасагиттальные парафиновые серийные срезы мозга.

n-NOS выявляли с помощью поликлональных кроличьих антител (ab76067, UK, разведение 1:1000) и вторичных антител, меченных пероксидазой (Goat anti Rabbit IgG ab97051, UK, разведение 1:1000), DAB Substrate Kit (ab64238). На каждом стандартном срезе определяли количество позитивных нейронов. Стандартным считали парасагиттальный срез максимальной площади, проходящий через центральную зону ОЛ. Подсчитывали численную плотность (шт/мм²) распределения и среднюю площадь сечения n-NOS-позитивных клеток (мкм², по данным 100 клеток). Морфометрический анализ проводили с помощью программы ImageJ, Microsoft Excel 2010 и Statistica 8.0, вычисляли M±m, достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента, уровень значимости p<0,05.

Результаты и обсуждение. Использование парасагиттальных срезов, проходящих через длинный луковичи, позволило изучить распределение позитивных клеток во всех шести цитоархитектонических слоях, располагающихся в следующем порядке: слой обонятельного нерва, гломерулярный слой (клубочков), наружный плексиформный слой, слой митральных клеток, внутренний плексиформный слой, гранулярный слой (клеток зерен). В центре луковичи располагается окончание рострального миграционного потока – субэпендимальный слой, который плавно переходит в гранулярный слой (центральную зону ОЛ).

n-NOS-позитивность выявляется в телах отдельных нейронов и их отростков. По морфологии и топографии позитивные клетки относились к трем субпопуляциям: перигломерулярных, короткоаксонных (пучковых) и гранулярных нейронов. Активность n-NOS определяется в перигломерулярных нейронах слоя гломерул, но исключительно на границе наружного плексиформного слоя, остальные структуры клубочков, включая центральную зону, оставались негативными. Позитивные короткоаксонные нейроны (КАН) встречаются в гранулярном и субэпендимальном слоях, характеризуются высокой активностью n-NOS и в телах нейронов, и в отростках. В гранулярном слое фермент определялся в цитоплазме небольшой части нейронов, активность его была невелика.

У плодов слои ОЛ дифференцированы слабо. n-NOS-позитивные клетки выявляются только в гранулярном слое, их относительная плотность составляет 140,0±32,45 шт/мкм². Эти клетки имеют низкое ядерно-цитоплазматическое отношение, низкую степень активности фермента и минимальную среднюю площадь сечения 28,9±2,31 мкм², отростки не выявляются.

У одно-трёхсуточных крысят в гранулярном слое численная плотность позитивных клеток увеличивается в 1,4 раза по сравнению с предыдущим возрастом и достигает 194,5±54,21 шт/мкм². По активности фермента в цитоплазме субпопуляция становится гетерогенной, встречаются клетки с низкой и средней активностью n-NOS, появляются короткие позитивные отростки. Средняя площадь сечения гранулярных нейронов увеличивается до 34,1±2,89 мкм² (p>0,05, по сравнению с предыдущим сроком).

У 7-суточных животных позитивные клетки по морфологии чётко разделяются на субпопуляции.

В гранулярном и субэпендимальном слоях появляются высокопозитивные КАН, 5–6 штук на стандартном срезе. Средняя площадь клеток этого вида составляет 175,1±12,06 мкм². В гломерулярном слое дорзальной части ОЛ выявляется субпопуляция перигломерулярных нейронов, они имеют среднюю степень активности n-NOS, площадь сечения 48,1±2,88 мкм². Численная плотность гранулярных n-NOS-позитивных нейронов достигает 316,6±43,01 шт/мм², а средняя площадь сечения нейронов возрастает до 44,0±2,91 мкм² (p<0,05 для предыдущих сроков).

На 14 сутки резко увеличивается численная плотность перигломерулярных клеток, гломерулу окружают 4–7 нейронов средней площадью сечения 53,3±3,81 мкм². Они имеют позитивные на всем протяжении отростки с тропизмом к центру гломерулы. В гранулярном слое и в области перехода его во внутренний плексиформный слой выявляются крупные одиночные биполярные нейроны (КАН) с высокой активностью n-NOS. КАН достоверно увеличиваются в размерах до 264,4±28,59 мкм² (p<0,05), их количество на стандартном срезе достигает 8–11 штук. В гранулярном слое плотность позитивных нейронов достигает максимума – 541,2±58,74 шт/мкм², что превышает в 1,7 раза показатель предыдущей возрастной группы (p<0,05).

К 30 суткам постнатального развития в ОЛ также встречаются все субпопуляции n-NOS-позитивных нейронов. В субэпендимальном слое ОЛ определяются крупные, средней площадью 288,7±27,61 мкм², мультиполярные пучковые нейроны (КАН) с высокой активностью к n-NOS, количество которых возрастает до 13–17 штук на стандартном срезе ОЛ (рис. А). Пероксидазная метка насыщенно заполняет цитоплазму этих клеток и отчётливо маркирует отростки нейронов на значительном протяжении. Отростки часто ветвятся, в некоторых местах оплетает сосуд, формируют выраженный нейропил. В то же время численная плотность позитивных клеток гранулярного слоя значительно снижается – до 260,4±42,96 шт/мкм² – в 2,5 раза по сравнению с предыдущим возрастом (p<0,05). Средняя площадь сечения гранулярных клеток по сравнению с показателями 14-суточного возраста достоверно не изменяется (59,5±3,84 мкм²). Перигломерулярные нейроны имеют выраженные отростки и формируют ассоциацию с клубочком по 7–10 штук.

К двум месяцам показатели позитивных КАН и перигломерулярных нейронов ОЛ по сравнению с показателями одномесячных не изменяются. Численная плотность распределения гранулярных позитивных нейронов также стабильна, но средняя площадь их сечения значимо возрастает – до 75,4±5,83 мкм² (p<0,05), достигая максимума за период наблюдения.

У полугодовальных крыс значимых изменений не происходит. Гранулярный слой приобретает чёткую ламинарную структуру, его позитивные клетки лежат группами, характеризуются гетерогенностью по уровню активности фермента. КАН высокопозитивные, площадью сечения 276,5±32,19 мкм², по 10–14 штук на срез, локализуются в области окончания рострального потока (рис. Б). Интенсивность ИГХ-реакции перигломерулярных клеток снижается, позитивные клетки в основном визуализируются вокруг клубочков дорзальной поверхности ОЛ (рис. В).

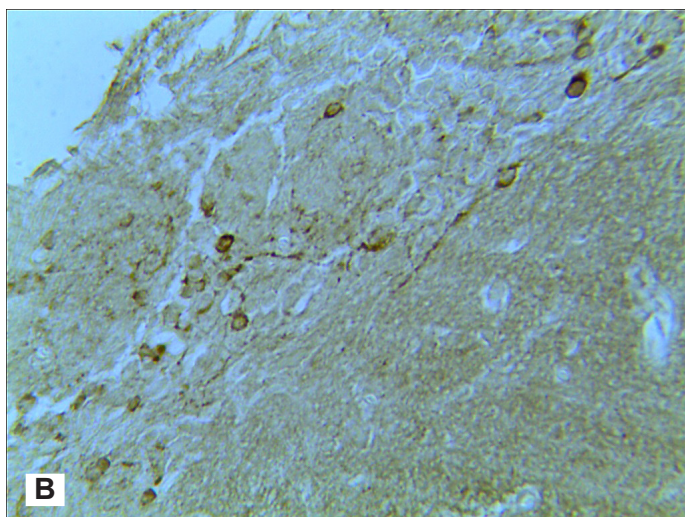
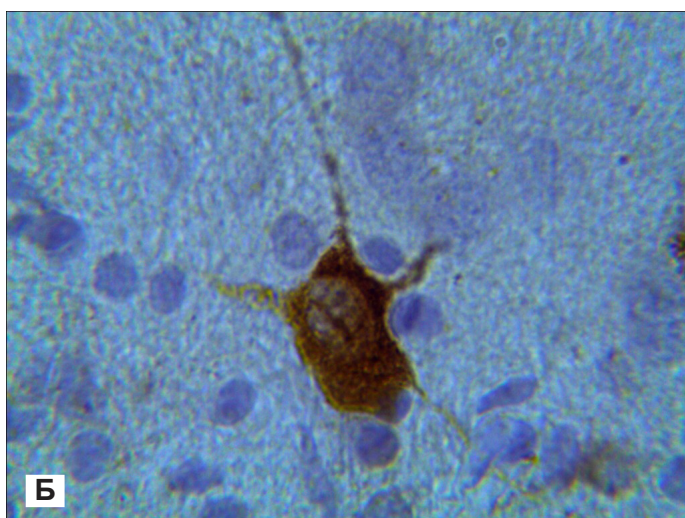
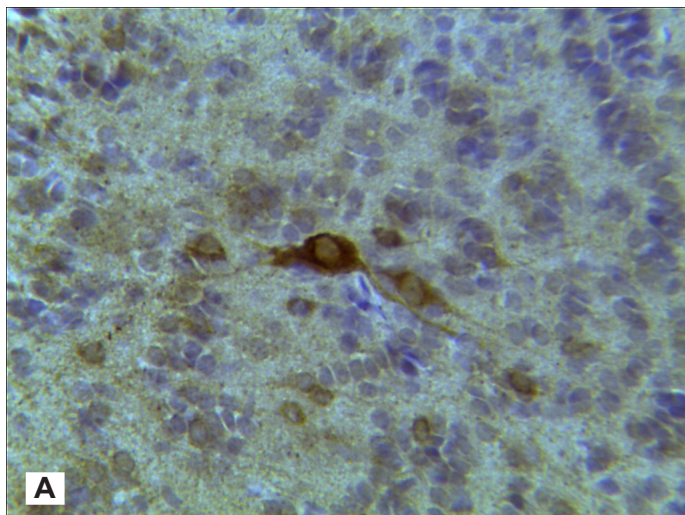


Рис. p-NOS-позитивные нейроны в различных слоях ОЛ крыс: А – гранулярный слой, гранулярные позитивные нейроны и ГКАН (60 сутки); Б – p-NOS-позитивный ГКАН (180 сутки); В – p-NOS-позитивные перигломерулярные нейроны (180 сутки). ИГХ-реакция на p-NOS. Докраска гематоксилином Майера (А, Б). Без докраски (В). Ок.10, об. 40 (А, В), ок. 10, об. 100 (Б)

В результате исследования установлено, что в ОЛ крысы клетки гранулярного слоя экспрессируют NO начиная с плодного периода. После рождения на

протяжении 14 суток численная плотность позитивных клеток возрастает более чем в 3 раза, затем на 30 сутки резко снижается (в 2 раза) и сохраняется с 30 по 180 суток без достоверных колебаний. Увеличение размеров этих клеток продолжается до 60 суток, затем показатель стабилизируется.

Полученные данные о нарастании плотности позитивных нейронов в гранулярном слое на протяжении первых двух недель жизни согласуются с результатами исследований [2, 5, 9, 10], где показано, что именно в этом возрасте регистрируется максимальная плотность DCX-позитивных клеток – нейрональных предшественников в гранулярном слое, которые, продвигаясь радиально, дифференцируются, формируют синапсы и утрачивают DCX-позитивность. Уже с 30 суток на фоне уменьшения интенсивности миграции незрелых нейронов через гранулярный слой количество p-NOS-позитивных клеток резко снижается, что указывает на ограничение пролиферации и стимуляцию синаптогенеза под влиянием NO.

Короткоаксонные нейроны ОЛ в плодном периоде и у новорожденных крысят не проявляют p-NOS-позитивности, реакция становится положительной с 7 суток. Численная плотность КАН очень низкая – она не превышает 20 клеток на парасагиттальный срединный срез луковицы, причем в течение первого месяца жизни она возрастает в 3 раза, с 5 до 15 штук. Характерной чертой их является очень высокая активность фермента в цитоплазме. Средние показатели площади сечения этих клеток достоверно увеличиваются только с 7 до 30 суток, в дальнейшем до 180 суток достоверных изменений не отмечается.

Динамика возрастных преобразований перигломерулярных позитивных клеток сходна с КАН. Впервые позитивные клетки появляются на 7 сутки. Эти клетки проявляют средний уровень активности. Количество их подсчитать сложно в связи с особенностями распределения – вокруг гломерулярных структур. В 7-суточном возрасте гломерулу при продольном срезе ОЛ окружают 4–7 позитивных клеток, у 30-суточных – 7–10 штук. Увеличение размеров этих клеток идет постепенно от 14 суток до 30 суток в 1,4 раза ($p < 0,05$). Позитивность перигломерулярных клеток подтверждает участие p-NOS в формировании одорантных систем обонятельного мозга.

Заключение. В обонятельной луковице белой крысы существуют три субпопуляции p-NOS-позитивных нейронов с разным уровнем активности фермента и разной динамикой возрастных преобразований. Эта гетерогенность нейронов ОЛ по активности фермента обусловлена их функциональной разнородностью, что необходимо учитывать при трактовке результатов экспериментальных работ.

Информированное согласие: Экспериментальное исследование проведено в соответствии с требованиями ГОСТ Р от 02.12.2009 53434–2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)» с соблюдением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях [Directive 2010/63/EU].

Конфликт интересов. Все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

1. Обухов Д. К., Пушина Е. В., Вараксин А. А. Газообразные медиаторы в ЦНС позвоночных животных. *Успехи современного естествознания*. 2011;(12):49-51. [Obukhov D. K., Pushchina Ye. V., Varaksin A. A. Gazoobraznye mediatory v TsNS pozvonochnykh zhivotnykh. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*. – *Advance of modern science*. 2011;(12):49-51. (In Russ.)].
2. Варенцов В. Е., Румянцева Т. А. Возрастные особенности экспрессии даблкортина в структурах обонятельных луковок крысы. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2017;(6):19-24. [Varentsov V. E., Rumyantseva T. A. Vozrastnye osobennosti ehkspressii dablkortina v strukturakh obonyatel'nykh lukovits krysy. *Zhurnal anatomii i gistopatologii*. – *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2017;(6):19-24. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2017-6-3-19-24>
3. Одыванова Л. Р., Сосунов А. А., Гатчев Я., Цервос Наварро Дж. Окис азота в нервной системе. *Успехи современной биологии*. 1997;117:374-389. [Odyvanova L. R., Sosunov A. A., Gatchev Ya., Cervos Navarro Dzh. Okis azota v nervnoy sisteme. *Uspekhi sovremennoy biologii*. – *Advance of modern biology*. 1997;117:374-389. (In Russ.)].
4. Sun H., Tao J., Zhao Q., Xu G., Zhang Y. Multiple roles of nitric oxide in root development and nitrogen uptake. *Plant Signaling & Behavior*. 2017;12(1):e1274480. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1274480>
5. Matarredona E. R., Murillo-Carretero M., Moreno-López B., Estrada C. Role of nitric oxide in subventricular zone neurogenesis. *Brain Research Reviews*. 2005;49:355-366. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2005.01.001>
6. Benton J. L., Sandeman D. C., Beltz B. S. Nitric oxide in the crustacean brain: regulation of neurogenesis and morphogenesis in the developing olfactory pathway. *Developmental Dynamics*. 2007;236:3047-3060. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21340>
7. Knowles R. G., Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *The Journal of Biochemistry*. 1994;298:249-258.
8. Аниол В. А., Степанчиков М. Ю. Оксид азота и гамма-аминомасляная кислота как регуляторы нейрогенеза в мозге взрослых млекопитающих при моделировании судорожной активности. *Нейрохимия*. 2007;(1):265-274. [Aniol V. A., Stepanichev M. Yu. Oksid azota i gamma-aminomaslyanaya kislota kak regulatory nejrogeneza v mozge vzroslyh mlekopitayushchih pri modelirovanii sudorozhnoy aktivnosti. *Neirohimiya*. – *Neurochemistry*. 2007;(1):265-274. (In Russ.)].
9. Bredt D. S., Hwang P. M., Snyder S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*. 1990;347:768-770.
10. Kiss J. P., Vizi E. S. Nitric oxide: a novel link between synaptic and non-synaptic transmission. *Trends in Neurosciences*. 2001;24:211-215.

Сведения об авторах:

Варенцов Вячеслав Евгеньевич, ассистент кафедры анатомии человека; тел.: 89201437038; e-mail: carabidolog@mail.ru

Румянцева Татьяна Анатольевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой анатомии человека; тел.: 89065277612; e-mail: rum-yar@mail.ru

Пшениснов Кирилл Кириллович, студент; тел.: 89201437038; e-mail: carabidolog@mail.ru

Мясищева Тамара Сергеевна, студент; тел.: 89201437038; e-mail: carabidolog@mail.ru

Пожилев Дмитрий Алексеевич, аспирант; тел.: 89201235632; e-mail: dmitry.oldman@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.735.5.002.61:34.49.003.38.11.21

DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14008>

ISSN – 2073-8137

СТИМУЛЯЦИЯ РЕПАРАТИВНОГО ДЕНТИНОГЕНЕЗА ПОСЛЕ ВИТАЛЬНОЙ АМПУТАЦИИ ПУЛЬПЫ ЗУБА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

М. Ю. Вафиади¹, С. В. Сирак¹, Е. В. Щетинин¹, А. В. Баландина¹,
В. А. Иващенко², А. А. Адамчик², И. И. Бородулина³

¹ Ставропольский государственный медицинский университет, Россия

² Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар, Россия

³ Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

EXPERIMENTAL STIMULATION OF REPARATIVE DENTINOGENESIS AFTER VITAL AMPUTATION OF THE PULP OF THE TOOTH

Vafiadi M. Yu.¹, Sirak S. V.¹, Shchetinin E. V.¹, Balandina A. V.¹,
Ivaschenko V. A.², Adamchik A. A.², Borodulina I. I.³

¹ Stavropol State Medical University, Russia

² Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

³ S. M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

Проведена морфометрическая оценка эффективности репаративного дентиногенеза после витальной ампутации пульпы при пломбировании зуба гидроокисью кальция и силикатом кальция, модифицированного светоотверждаемой смолой. Эксперимент проведен на 48 зубах (нижние центральные резцы) 6 овец в возрасте от 2,5 до 3 лет, массой от 25 до 40 кг, содержащихся в одинаковых условиях вивария. Продолжительность наблюдения