

С. А. Мозеров, О. В. Красовитова,
А. Н. Мялин, А. А. Чекушкин, С. В. Киселева

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ NO-СИНТАЗЫ В ОПУХОЛЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА АСТРОЦИТАРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Аннотация. Распространенным межклеточным посредником является газ оксид азота, образующийся многими клетками и оказывающий многостороннее действие на жизнедеятельность клеток и органов. В работе показан анализ экспрессии NO-синтазы (три изоформы) в опухолях головного мозга астроцитарного ряда.

Ключевые слова: оксид азота, нейроны, астроциты, кровеносные сосуды, эндотелий, три формы NO-синтаз: нейрональная – nNOS, эндотелиальная – eNOS и макрофагальная индуцибельная – iNOS.

Abstract. Nitric oxide is a common intercellular intermediate which is formed by many of cells and takes multilateral effect on the life activity of cells and organs. The analysis of NO-synthase expression (three isoforms) in cerebral tumours of astrocytic origin is shown in the paper.

Keywords: azote oxydi, neuron, astrocittes, blood vessels, endothelium, the analysis of NO-synthase expression (three isoforms)

Оксид азота (NO) – газ, хорошо известный химикам и физикам, в последнее время привлек пристальное внимание биологов и медиков. Интенсивное изучение биологического влияния NO началось с 1980-х гг., когда Р. Фуршготт и Дж. Завадски показали, что расширение кровеносных сосудов под влиянием ацетилхолина происходит только при наличии эндотелия – эпителиоподобных клеток, выстилающих внутреннюю поверхность всех сосудов. Вещество, выделяющееся эндотелиальными клетками в ответ не только на ацетилхолин, но и на многие другие внешние воздействия, приводящее к расширению сосудов, получило название «сосудорасширяющий эндотелиальный фактор».

Широкое изучение NO началось после 1987 г., когда две независимые группы ученых под руководством Palmer и Ignarro показали, что мощный эндогенный вазодилататор эндотелий-зависимый релаксирующий фактор является оксидом азота. Эндогенный NO образуется из L-аргинина при помощи кальций-зависимого энзима NO-синтазы III. Мишенью NO являются гладкомышечные клетки резистивных сосудов (артерий и артериол). Диффундируя через альвеолярную мембрану, NO попадает в эти клетки, где повышает уровень циклического гуанозин-монофосфата, что приводит к запуску цепи реакций, результатом которых является снижение тонуса гладких мышц сосуда. Затем NO поступает в системный кровоток, где и происходит его инактивация вследствие связывания с оксигемоглобином и образования конечных продуктов – метгемоглобина и нитратов.

Оксид азота (NO) синтезируется семейством энзимов, обозначаемых как NO-синтазы (NOS), из аминокислоты L-аргинина. Все NO-синтазы традиционно подразделяются на две формы – конститутивные, постоянно экспрессируемые клетками и активизирующиеся, как правило, высоким уровнем

Ca^{++} /кальмодулина, и индуцибельные, экспрессируемые в клетках под влиянием цитокинов и некоторых других лигандов и не претерпевающих посттрансляционную модификацию (в частности, не зависят обычно от уровня Ca^{++} /кальмодулина).

Конститутивные формы фермента постоянно продуцируют умеренные количества NO, а их активность может повышаться преимущественно под влиянием различных агентов, приводящих к увеличению уровня ионов кальция в клетке. Конститутивные формы NO-синтазы имеют, как полагается, преимущественно «физиологическое» значение и участвуют во множестве внутри- и внеклеточных реакций.

Индукцибельные формы NO-синтазы считаются «патофизиологическими» в отличие от конститутивной, поскольку высокие дозы NO могут являться токсическими для клеток. Эта форма фермента проявляет свою активность через некоторое время после внешнего воздействия на клетки, не опосредуемого повышением внутриклеточного уровня ионов кальция, и продуцирует огромные количества NO.

Наиболее изученными являются три формы NO-синтазы: нейрональная – nNOS, показанная и выделенная впервые из нейронов центральной нервной системы; эндотелиальная – eNOS, определяющаяся в эндотелии всех изученных кровеносных сосудов, и макрофагальная индуцибельная – iNOS, впервые идентифицированная в макрофагах (Knowles, Moncada, 1994; Garthwaite, 1995).

Участие NO, как основного реакционного агента, признается в релаксации кровеносных сосудов и гиперплазии мышечных клеток их стенки, межнейронной связи, где NO может выступать в роли нейромедиатора, цитотоксическом и туморостатическом действии макрофагов и клеток иммунной защиты, а также во многих других процессах (Brian J. E., 1994).

Большое значение придается NO в нервной системе, где газ участвует, как полагают, практически во всех известных физиологических и патологических процессах, в том числе таких основополагающих, но еще малоизученных, как память, мышление, сон (Bredt, Snyder, 1992; Vincent, 1994; Garthwaite, 1995). Большое значение NO имеет в регуляции мозгового кровообращения. Известные более ста лет данные об усилении кровотока в активно работающих областях мозга получили после открытия сосудорасширяющего действия NO более полную интерпретацию. Имеется несколько источников NO для регуляции просвета мозговых сосудов. Это эндотелий сосудов, нейроны, содержащие NO-синтазу и оплетающие своими отростками стенки сосудов и астроциты, образующие периваскулярные оболочки.

Следует отметить еще одно интересное наблюдение, связанное уже с нейронами, содержащими NO-синтазу, и не получившее пока полного объяснения. Еще в 60-х гг. Е. Томас и Э. Пирс использовали новый гистохимический метод выявления активности фермента НАДФН-диафоразы (фермент, способный восстанавливать окисленную форму НАДФ) для анализа нервной системы и показали, что в разных отделах головного мозга имеются единичные нейроны с интенсивной положительной реакцией. Эти нейроны, которые получили название «одиночные активные клетки», остаются неповрежденными при разнообразной патологии нервной системы, в то время как большинство других клеток погибает. Относительно недавно выяснилось, что НАДФН-диафоразная активность свойственна NO-синтазе (НАДФН-диафо-

разная активность широко используется в настоящее время для гистохимической идентификации клеток, содержащих NO-синтазу, хотя НАДФН-диафораза и NO-синтаза – разные ферменты и их распределение в клетках мозга не всегда совпадает), и, таким образом, была установлена устойчивость нейронов, содержащих NO-синтазу, к разнообразным патологическим воздействиям. Механизмы такого необычного и имеющего большое биологическое значение свойства клеток окончательно не выяснены (Bredt D. S., Glatt C. et. al., 1991).

В собственном исследовании представлены результаты иммуногистохимического исследования иммунореактивности ткани астроцитарных опухолей головного мозга на три изоформы NO-синтазы. Всего изучено 49 случаев. Использовали парафиновые срезы и авидин-биотиновый метод. В качестве первичных антител применяли антитела к трем изоформам NO-синтазы.

Максимальная интенсивность реакции была выявлена при обработке препаратов первичными антителами на iNOS. В этих препаратах обнаруживалось больше иммунопозитивных клеток, и степень их окраски была выше, чем при обработке на nNOS и eNOS.

Иммунопозитивные клетки на все три изоформы фермента при внимательном анализе препаратов можно было обнаружить практически во всех изученных случаях, однако в высокоанapластических астроцитомах и глиобластомах их число и степень окраски были значительно выше (рис. 1).

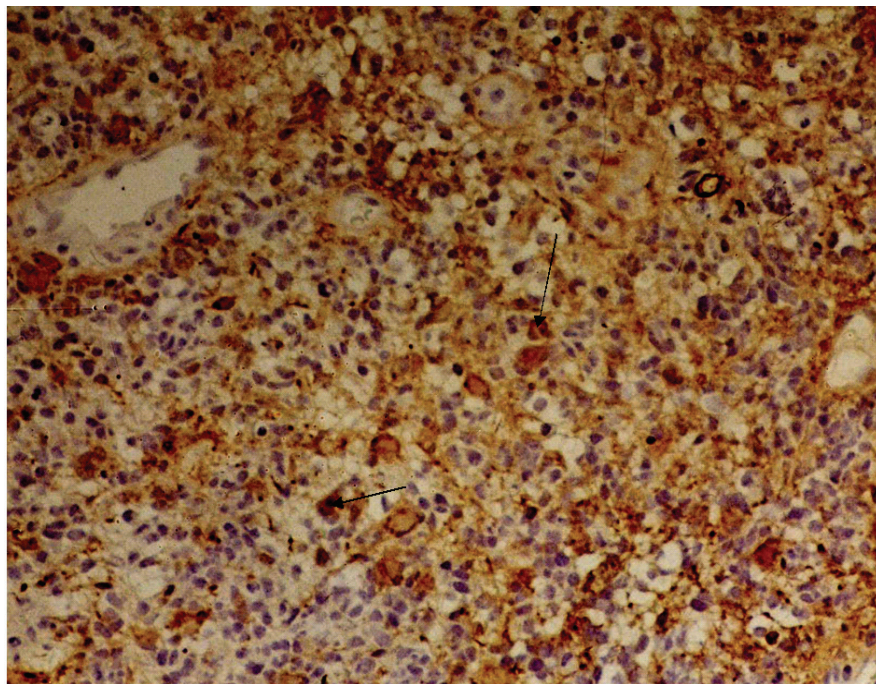


Рис. 1 Положительная реакция в клетках глиобластомы. Реакция на iNOS, $\times 150$

В доброкачественных астроцитомах положительно реагирующие клетки встречались в единичных случаях (рис. 2), что подтверждается и другими нейроморфологами (Сосунов А. А., Чаиркин И. Н. и др., 1997).

Следует отметить, что в опухолевой ткани многие анапластические астроциты были иммунореактивны на эндотелиальную форму NO-синтазы. Ре-

акция эндотелия на эту форму NO-синтазы различалась в разных сосудах и зависела от характера их пролиферации. В сосудах с тонкой эндотелиальной выстилкой без пролиферации интимальных клеток реакция на eNOS была обычно положительной (рис. 3), и, наоборот, в сосудистых клубках с массивной пролиферацией клеток реакция была отрицательной.

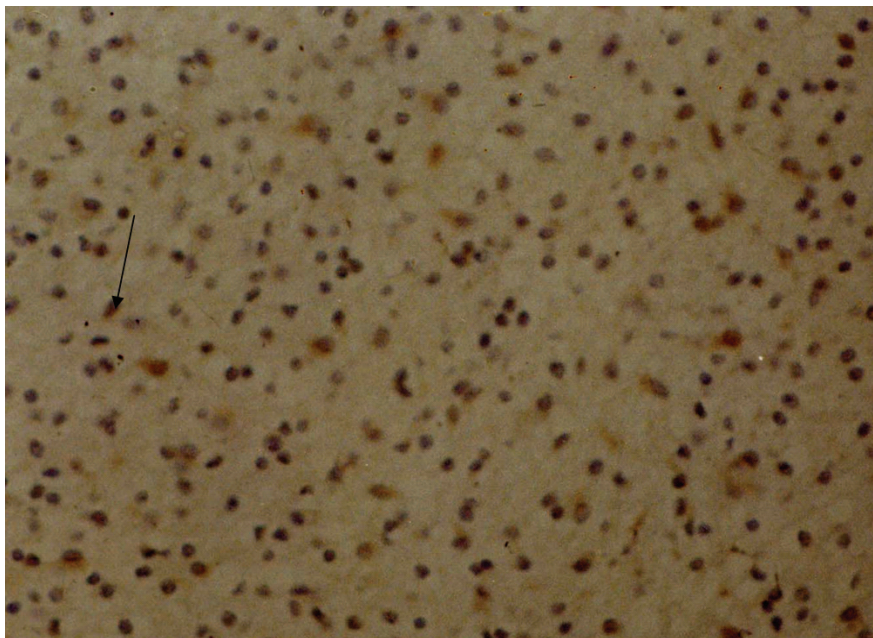


Рис. 2 Фибриллярная астроцитома. Единичные NOS-положительные клетки, $\times 180$

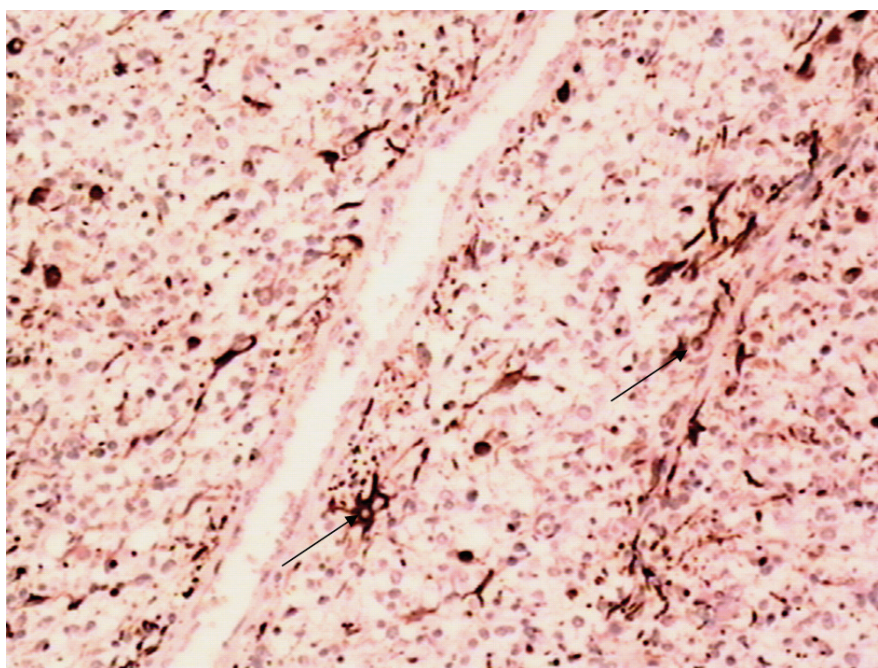


Рис. 3 Иммуноположительные клетки (стрелки) в гигантоклеточной глиобластоме на эндотелиальную форму NO-синтазы, $\times 180$

Аналогичная закономерность в отношении реагирования эндотелия была отмечена и при реакции на iNOS (рис 4). Использование антител на nNOS не давало положительной реакции эндотелиальных клеток.

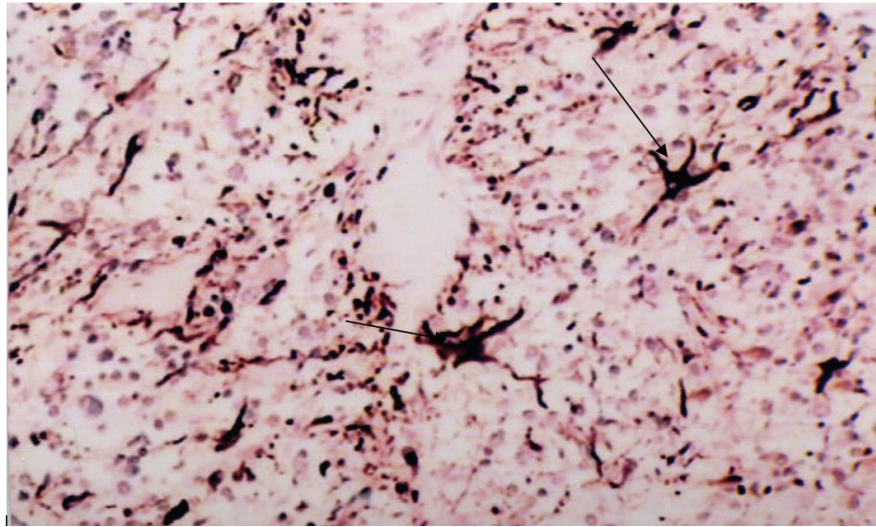


Рис. 4 Положительная реакция в клетках глиобластомы (стрелки). Реакция на iNOS, $\times 150$

Использование трех изоформ NO-синтазы позволило обнаружить частое наличие iNOS-иммунореактивных клеток около фокусов некроза и в периваскулярных розетках анапластических форм опухолей (рис. 5, 6). Интересно также, что митотически делящиеся клетки, особенно в глиобластомах, нередко были иммунопозитивными.

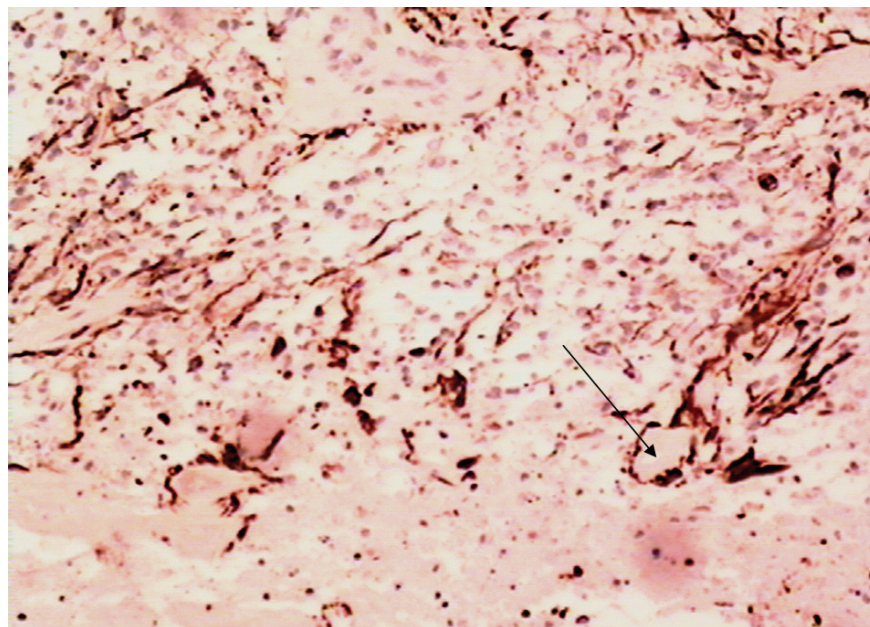


Рис. 5 Большое количество iNOS-иммунореактивных клеток около фокусов некроза в гигантоклеточной глиобластоме, $\times 180$

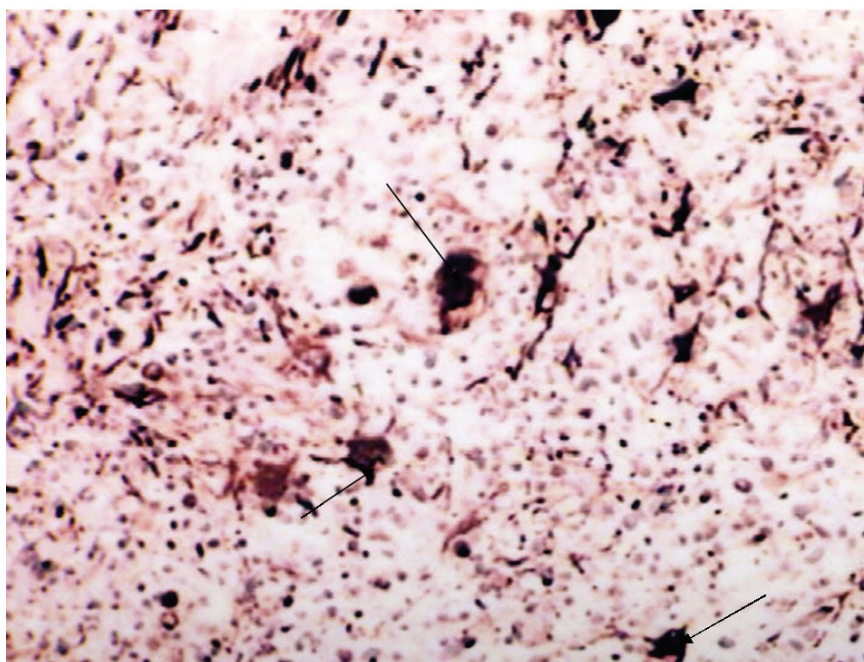


Рис. 6 Положительная реакция в клетках глиобластомы (стрелки). Реакция на iNOS, $\times 150$

Отмечена прямая зависимость между размером анапластических астроцитов и интенсивностью иммуногистохимической реакции – в крупных и гигантских клетках величина окраски была выше, чем в мелких клетках.

В перитуморальной зоне многие реактивные астроциты обладали иммунопозитивной реакцией на три изоформы NO-синтазы. Причем в этой области в астроцитах хорошо выявлялись и клеточные отростки.

Таким образом, в астроцитарных опухолях происходит как активизация конститутивной формы фермента, так и интенсивная экспрессия индуцибельной NO-синтазы. Продукция оксида азота (NO) может иметь значения в прогрессии опухолей головного мозга и вызывать нарушения трофики в перитуморальной зоне.

Список литературы

1. **Сосунов, А. А.** Синтаза окиси азота в нейроэпителиальных опухолях головного мозга / А. А. Сосунов, И. Н. Чаиркин, Л. Р. Одыванова и др. // Архив патологии. – 1997. – Т. 59. – № 6. – С. 61–65.
2. **Bredt, D. S.** Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase / D. S. Bredt, C. Glatt, P. M. Hwang et al. // Neuron. – 1991. – V. 7. – P. 615–620.
3. **Garthwaite, J.** Neural nitric oxide signalling / J. Garthwaite // Trends Neurosci. – 1995. – V. 18. – P. 51–56.
4. **Knowles, R.** Nitric oxide synthases in mammals / R. Knowles, S. Moncada // Biochem. J. – 1994. – V. 298. – P. 249–258.
5. **Vincent, S. R.** Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system / S. R. Vincent // Progr. Neurobiol. – 1994. – V. 42. – P. 129–160.

Мозеров Сергей Алексеевич

доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой патологической
анатомии, Медицинский институт,
Пензенский государственный
университет

E-mail: mozerov@list.ru

Mozerov Sergey Alexeevich

Doctor of medical sciences, professor,
head of morbid anatomy sub-department,
Medical institute, Penza State University

Красовитова Оксана Владимировна

доцент, кафедра патологической
анатомии, Медицинский институт,
Пензенский государственный
университет

E-mail: mozerov@list.ru

Krasovitova Oksana Vladimirovna

Associate professor, morbid anatomy
sub-department, Medical institute,
Penza State University

Мялин Александр Николаевич

кандидат медицинских наук, доцент,
кафедра хирургии, Медицинский
институт, Пензенский государственный
университет

E-mail: pmisurg@gmail.com

Myalin Alexander Nikolaevich

Candidate of medical sciences, associate
professor, surgery sub-department,
Medical institute, Penza State University

Чекушкин Александр Александрович

старший преподаватель, кафедра
патологической анатомии,
Медицинский институт, Пензенский
государственный университет

E-mail: mozerov@list.ru

Chekushkin Alexander Alexandrovich

Senior lecturer, morbid anatomy
sub-department, Medical institute,
Penza State University

Киселева Светлана Владимировна

врач-невропатолог, Рузаевская
центральная районная больница
(республика Мордовия)

Kiselyova Svetlana Vladimirovna

Neuropathologist,
Ruzaevka regional hospital
(Republic Mordovia)

УДК 616-006.484.03

Мозеров, С. А.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии NO-синтазы в опухолях головного мозга астроцитарного происхождения / С. А. Мозеров, О. В. Красовитова, А. Н. Мялин [и др.] // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2009. – № 2 (10). – С. 14–20.