

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

УДК 611.81.013+611.813.11

doi:10.18499/2225-7357-2022-11-2-52-61

1.5.22 – клеточная биология



## Возрастные особенности nNOS иммунореактивных нейронов в неокортексе крыс

Т. А. Румянцева<sup>✉</sup>, Л. С. Агаджанова, В. Е. Варенцов, Д. А. Пожилов,  
Т. С. Дашян, А. В. Киселев

Ярославский государственный медицинский университет, Ярославль, Россия

**Аннотация.** Цель исследования – оценить особенности морфологии nNOS-позитивных (nNOS-IR) нейронов в коре дорзолатеральной зоны лобной доли больших полушарий головного мозга у белых крыс на протяжении 180 суток постнатального развития.

**Материал и методы.** Исследование выполнено на 40 аутбредных белых крысах линии Wistar разного возраста, от 1 до 180 суток. Объектом исследования служили участки правого полушария головного мозга на дорзолатеральной поверхности вблизи лобного полюса (неокортекс). На парафиновых серийных срезах лобной доли проводили иммуногистохимическую реакцию с антителами к nNOS и системой детекции с пероксидазой хрена. Морфометрию нейронов осуществляли по микрофотографиям с помощью программы ImageJ-Fiji (NIH) 1.51h, измеряя площадь сечения тела нейрона, площадь ядра, ядерно-цитоплазматическое отношение, интенсивность реакции. Проведена оценка достоверности различий (парный t-критерий Стьюдента).

**Результаты.** Установлено, что у крыс зрелого возраста в коре лобной доли nNOS-IR проявляют одиночные крупные мультиполярные клетки с высокой активностью фермента, расположенные в надгранулярных слоях, клетки веретенообразной формы с длинными позитивными отростками на границе с белым веществом (тип 1), и две разновидности низкопозитивных нейронов – скопления в VI слое и одиночные в других слоях (тип 2). Полиморфизм nNOS-IR нейронов проявляется уже при рождении, но различить все субпопуляции возможно только с 21-х суток. Каждая субпопуляция отличается собственной возрастной динамикой изученных параметров и характером распределения позитивности. Кроме того, у крыс 3–7 суток транзиторной иммунореактивностью обладают многочисленные мелкие нейроны на границе коры и белого вещества.

**Заключение.** Таким образом, разделение nNOS-IR нейронов на два морфологических типа, предложенных в работах предшественников, не соответствует тому количеству субпопуляций, которое удалось описать в дорзолатеральной области префронтальной коры у крыс. Такое разнообразие nNOS-IR нейронов вполне соответствует многочисленным функциям, описанным для оксида азота. Для объективной характеристики различных классов nNOS-IR интернейронов коры необходимо использовать дополнительные данные, полученные из транскриптомных, гистологических, электрофизиологических, функциональных экспериментов с учетом видовых, топографических и возрастных особенностей. Только расширенный подход позволит селективно воздействовать на разные типы клеток и обоснованно трактовать результаты экспериментальных исследований.

**Ключевые слова:** интернейроны, онтогенез, оксид азота, крыса, префронтальная кора

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования:** Румянцева Т.А., Агаджанова Л.С., Варенцов В.Е., Пожилов Д.А., Дашян Т.С., Киселев А.В. Возрастные особенности nNOS иммунореактивных нейронов в неокортексе крыс // Журнал анатомии и гистопатологии. 2022. Т. 11, №2. С. 52–61. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2022-11-2-52-61>

## ORIGINAL ARTICLES

Original article

### Age specific features of nNOS immunoreactive neurons in rat neocortex

Т. А. Румянцева<sup>✉</sup>, Л. С. Агаджанова, В. Е. Варенцов, Д. А. Пожилов, Т. С. Дашян, А. В. Киселев  
Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia

**Abstract.** The aim of the study was to evaluate the morphological features of nNOS-positive (nNOS-IR) neurons in the dorsolateral cortex of the frontal lobe of the cerebral hemispheres in albino rats during 180 days of postnatal development.

**Material and methods.** The study was performed on 40 outbred white Wistar rats of different ages, from 1 to 180 days. The object of the study was an area of the right cerebral hemisphere on the dorsolateral surface near the frontal pole (neocortex). On paraffin serial sections of the frontal lobe, an immunohistochemical reaction was performed with antibodies to nNOS and a detection system with horseradish peroxidase. Neuronal morphometry was performed by microphotographs using the ImageJ-Fiji (NIH) 1.51h program, measuring the sectional area of the neuron body, the area of the nucleus, the nuclear-cytoplasmic ratio, and the intensity of the reaction.

The significance of differences was assessed by paired Student's t-test.

**Results.** It was found that in mature rats in the frontal lobe cortex nNOS-IR was detected in large multipolar cells with high activity of the enzyme located in the supragranular layers, spindle-shaped cells with long positive processes at the border with the white matter (type 1), and two varieties of low-positive neurons – accumulations in the VI layer and single ones in other layers (type 2). Polymorphism of nNOS-IR neurons manifests from the birth, but it was possible to distinguish all subpopulations only from the 21st day. Each subpopulation is distinguished by its own age dynamics of the studied parameters and the nature of the distribution of positivity. In addition, in 3–7 day old rat pups, numerous small neurons at the border of the cortex and white matter have transient immunoreactivity.

**Conclusion.** Thus, the division of nNOS-IR neurons into two morphological types proposed in the works of predecessors does not correspond to the number of subpopulations that could be described in the dorsolateral region of the prefrontal cortex in rats. This diversity of nNOS-IR neurons is consistent with the numerous functions described for nitric oxide. For an objective characterization of various classes of nNOS-IR cortical interneurons, it is necessary to use additional data obtained from transcriptomic, histological, electrophysiological, and functional experiments, taking into account species, topographic, and age features. Only an extended approach will make it possible to selectively influence different types of cells and reasonably interpret the results of experimental studies.

**Key words:** interneurons, ontogenesis, nitric oxide, rat, prefrontal cortex

**Conflict of interests:** the authors declare no conflict of interests.

**For citation:** Rumyantseva T.A., Agadzhanova L.S., Varentsov V.E., Pozhilov D.A., Dashyan T.S., Kiselev A.V. Age specific features of nNOS immunoreactive neurons in rat neocortex. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2022. V. 11, №2. P. 52–61. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2022-11-2-52-61>

## Введение

Оксид азота (NO) является важной клеточной сигнальной молекулой, широко представленной в структурах нервной системы, и может функционировать как нейротрансмиттер. Оксид азота продуцируется тремя изоформами NO-синтазы (NOS; EC 1.14.13.39) [2, 8]. Все они используют L-аргинин и молекулярный кислород в качестве субстратов. Нейрональная NOS (nNOS) экспрессируется в нейронах головного и спинного мозга, вегетативных ганглиев и некоторых других типах клеток. Она влияет на синаптическую пластичность, центральную регуляцию артериального давления, расслабление гладких мышц и расширение сосудов через периферические нитергические нервы. Кроме того, эти интернейроны могут способствовать патологическим состояниям, связанным с дисфункцией производства / высвобождения NO [6].

nNOS-иммунореактивные (IR) нейроны очень разнообразны, как по форме, так и по колокализации с другими маркерами, очень выражены видовые и возрастные различия. В предыдущих исследованиях нами установлено, что в обонятельной луковице белой крысы существуют три субпопуляции nNOS-IR нейронов с разным уровнем активности фермента и разной динамикой возрастных преобразований [1]. Большинство авторов выделяет в коре два типа нейронов, экспрессирующих nNOS [9, 14].

Нейроны nNOS-IR 1-го типа имеют крупное тело, которое плотно заполняется продуктом реакции, позитивные отростки, и достаточно редки. Они описаны в неокортексе мышей, крыс, морских свинок, кроликов, кошек и обезьян, в основном вблизи границы между корой и белым веществом, с меньшим количеством в коре, в основном в поверхностных слоях (II–IV) [10, 12]. По мнению Williams et al. [15–17], у крыс эти нейроны в основном

обнаруживаются в более глубоких слоях и экспрессируют nNOS на более высоких уровнях. Хотя нейроны nNOS 1-го типа получают множество различных нейромодулирующих сигналов [15, 16], почти все они экспрессируют рецептор вещества P, причем как геномные, так и гистологические исследования показали, что это единственная субпопуляция клеток коры головного мозга мышей, которая экспрессирует этот рецептор [3, 4, 5, 13, 14]. Нейроны nNOS-IR 1-го типа имеют протяженные отростки, которые позволяют им влиять на сосудистую сеть. В зрительной коре самая плотная концентрация интенсивных nNOS-IR нейронов была обнаружена у мышей и кроликов в слое VI, в то время как слабые nNOS-IR нейроны были обнаружены в слое II/III у обоих животных. Подавляющее большинство nNOS-IR нейронов – круглые или овальные клетки с многочисленными разнонаправленными позитивными дендритами. При изучении кальций-связывающих белков в nNOS-IR нейронах 1-го типа были выявлены различия в колокализации, не коррелирующие с видом животного [10]. Q. Penneoud с соавт. [12] считал нейроны 1-го типа гаммергическими с коэкспрессией соматостатина.

Нейроны nNOS-IR 2-го типа у крыс представляют собой гетерогенную многочисленную группу интернейронов, которые обнаруживаются в II/III и VI слоях коры, с отростками, охватывающими несколько слоев [12]. Нейроны 2-го типа экспрессируют nNOS на более низких уровнях, чем нейроны 1-го типа. Эти нейроны в основном коэкспрессируют PV, SOM и VIP [11, 12]. Есть мнение, что клетки 2-го типа мелкие, низкого и среднего уровня экспрессии, в 20 раз более многочисленны, чем клетки 1-го типа, расположены только в надгранулярных слоях и встречаются почти исключительно в мозге приматов и человека.

Наиболее подробные данные о постнатальном развитии представлены в работе по

зрительной коре. Авторы установили, что nNOS-IR нейроны появляются уже при рождении в промежуточной (белое вещество) и прилежащей (слои V и VI) областях. Эти нейроны достигают своей типичной морфологии на второй неделе и появляются во всех слоях.

Различия в интенсивности иммунореактивности nNOS в зрительной коре (позже упомянутые как нейроны 1-го типа и 2-го типа) становятся очевидными уже на 7-е сутки [7]. Есть данные, что у морских свинок нейроны 1-го типа генерируются во время раннего кортикогенеза, тогда как клетки 2-го типа образуются в течение широкого пренатального временного окна, сохраняющегося до рождения. В то же время авторы предполагают, что нитринергические нейроны 2-го типа могут проходить период развития / дифференцировки более 1 месяца, прежде чем станут реактивными с NADPH-d (nNOS).

Накопленные данные отрывочны и противоречивы, не описывают региональных и возрастных особенностей субпопуляций позитивных нейронов неокортекса, что затрудняет трактовку результатов экспериментальных работ, использующих модели нейродегенеративных заболеваний, в том числе и ишемических поражений. В большинстве работ не указывается в каких зонах коры исследовались позитивные нейроны, несмотря на специфику цитоархитектоники. Данные о возрастных особенностях nNOS-IR нейронов в коре лобной доли крыс отрывочны.

Цель настоящего исследования – оценить особенности морфологии nNOS-позитивных нейронов в коре дорзолатеральной зоны лобной доли больших полушарий головного мозга у белых крыс на протяжении 180 суток постнатального развития.

### Материал и методы исследования

Исследования выполнены на кафедре анатомии человека Ярославского государственного медицинского университета в соответствии с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных», Хельсинкской декларации 1975 г. и ее пересмотренного варианта 2000 г. и этических норм, и рекомендаций по гуманному обращению с животными, используемыми в экспериментальных и других научных целях (Приказ Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н). Эксперимент одобрен Этическим комитетом ФБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России (протокол № 8 от 24.03.2016 г.).

Исследование проводили на 40 аутбредных белых крысах линии Wistar разного возраста, приобретенных в питомнике ООО «Кролинфо» (г. Орехо-Зуево), и их потомстве. В исследование включали только самцов. Возрастные группы формировались из пяти разных пометов каждая. Материал забирали на 1-е, 3-и (новорожденные, n=10)

7-е, 14-е, 21-е (подсосный, n=15), 30-е (инфантильный, n=5), 60-е (ювенильный, n=5) и 180-е (молодой, n=5) сутки жизни (периодизация по И.П. Западнюку и соавт., 1974).

Объектом исследования служили участки правого полушария головного мозга на дорзолатеральной поверхности вблизи лобного полюса.

Взятие материала осуществляли после транскардиальной перфузии 10% забуференным формалином под внутривенным наркозом зоветилом (50 мг/кг). Материал фиксировали в течение суток при температуре 4°C, промывали в проточной воде в течение 2 часов и обезжизивали в растворе изопрепа (Izoprep, Biovitrum) возрастающих концентраций, заливали в парафин. На серийных срезах мозга крыс толщиной 7 мкм (pfm Slide 2003 compact) проводили иммуногистохимическую реакцию. Использовали первичные моноклональные антитела anti-nNOS (UK, ab76067, разведение 1:200) и вторичные поликлональные антитела (Goat anti Rabbit IgG, UK, ab97051, разведение 1:1000). Демаскировку антигенных детерминант проводили в стеклянном сосуде Коплина, заполненном цитратным буфером 10 ммоль/л, pH 6,0 (10 mM цитрата натрия, 0,05% Tween 20) на водяной бане в течение 20 мин в мультиварке (p=0,3 бар, t=100°C). Остывшие препараты промывали в фосфатно-солевом буфере (TBS). Для инактивации эндогенной пероксидазы использовали 1% раствор H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, в качестве блокирующего раствора применяли PBS с 1% BSA, 0,05% Triton X-100. Инкубацию с первичными и вторичными антителами, разведенными в буфере, проводили по 3 часа во влажной камере при комнатной температуре. Для детекции использовали DAB Substrate Kit (ab64238) на основе хромогена 3,3'-диаминобензидина. Срезы докрашивали гематоксилином Майера, дегидратировали и заключали в канадский бальзам. Для контроля и исключения артефактов часть препаратов обрабатывали только вторичными антителами, без нанесения первичных антител.

Микроскопию проводили при помощи светового микроскопа Optica DM-20 (Italy 2016) со встроенной камерой. Морфометрию нейронов осуществляли по микрофотографиям с помощью программы ImageJ-Fiji (NIH) 1.51h, измеряя площадь сечения тела нейрона, площадь ядра, ядерно-цитоплазматическое отношение, интенсивность реакции (Max Gray Value) у 50 клеток каждого типа в каждом случае (по 5 животных в группе). Всего в каждой возрастной группе оценено по 250 клеток 1-го и 2-го типов. При исследовании разных возрастных групп крыс соблюдали стандартные условия вивария: температура 20°C, свет/темнота 10/14, питание и вода ad libitum. Статистическую обработку данных проводили методами вариационной статистики с использованием пакетов Microsoft Excel 2010



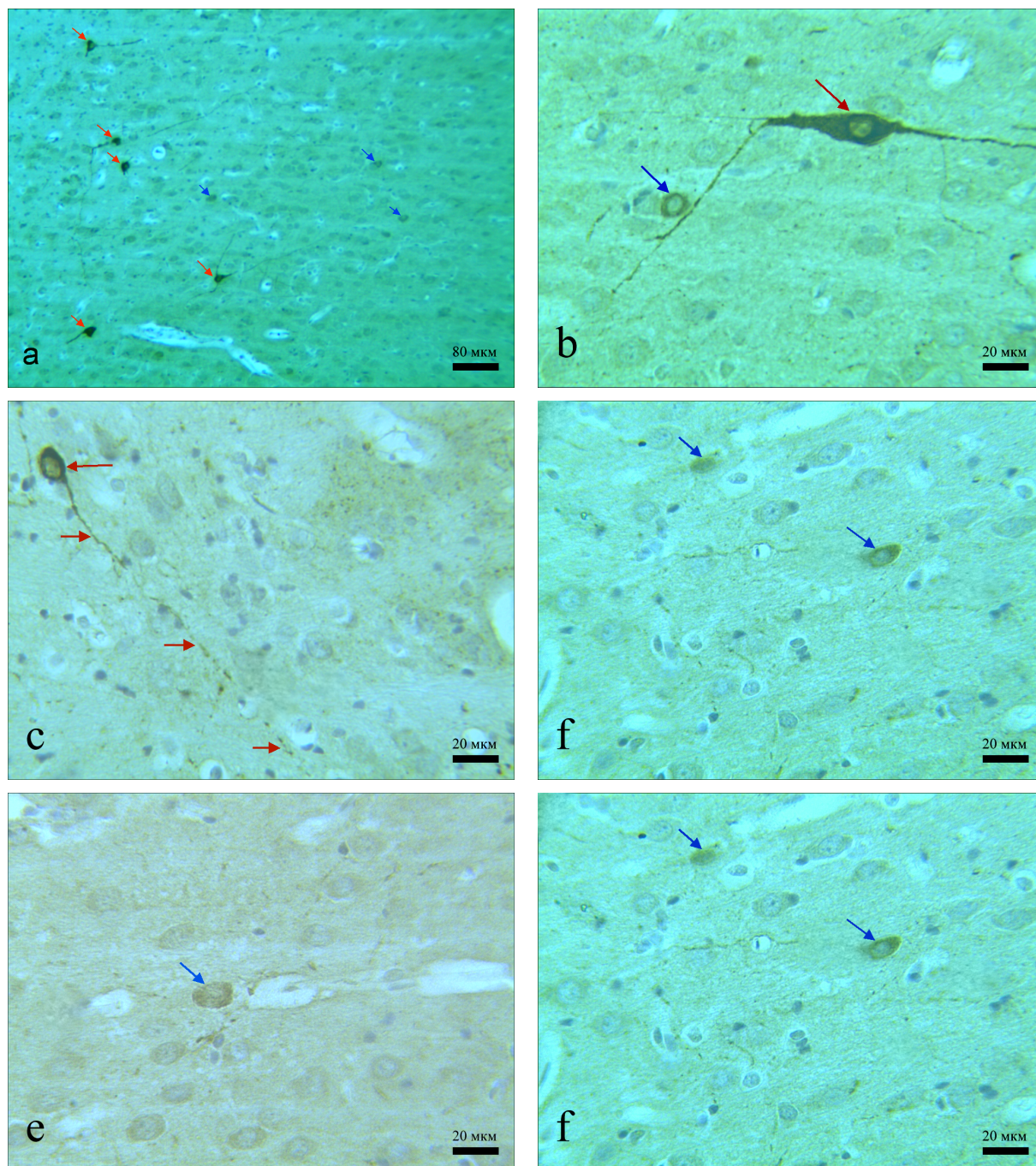


Рис. 1. pNOS-IR нейроны в коре лобной доли головного мозга белых крыс в возрасте 180 суток: а – позитивные нейроны разных типов, б – высокопозитивный (1-го типа) и низкопозитивный (2-го типа) нейроны, с – высокопозитивный нейрон с позитивными отростками, д – скопление pNOS-IR мелких нейронов с низким уровнем позитивности вблизи сосудов, е, ф – нейроны 2-го типа. III–IV слои коры – а, б, е; граница VI слоя коры и белого вещества – с, д, ф. Иммуногистохимия, докраска гематоксилином Майера. Об. 10 (а), об. 40 (б, с, д, е, ф), красные стрелки – нейроны 1-го типа, синие – нейроны 2-го типа, зеленые – нейроны особого типа.

и Statistica 10 (Statsoft BX202F254217FA-P). Средние значения изучаемых показателей представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее арифметическое, а  $m$  – ошибка среднего.

Нормальность распределения данных оценивали критерием Колмогорова–Смирнова. Проверку статистических гипотез осуществляли с помощью параметрического  $t$ -критерия Стьюдента для независимых выборок. Сравнивали показатели пары соседних возрастных групп. Значимыми считали раз-

личия между средними показателями при  $p < 0.05$ .

### Результаты и их обсуждение

У крысы в возрасте 180 суток pNOS-IR нейроны выявлялись во всех слоях коры и обладала различной морфологией. В молекулярном слое они встречались очень редко, имели низкую позитивность, овальное тело небольшого размера, негативные отростки.



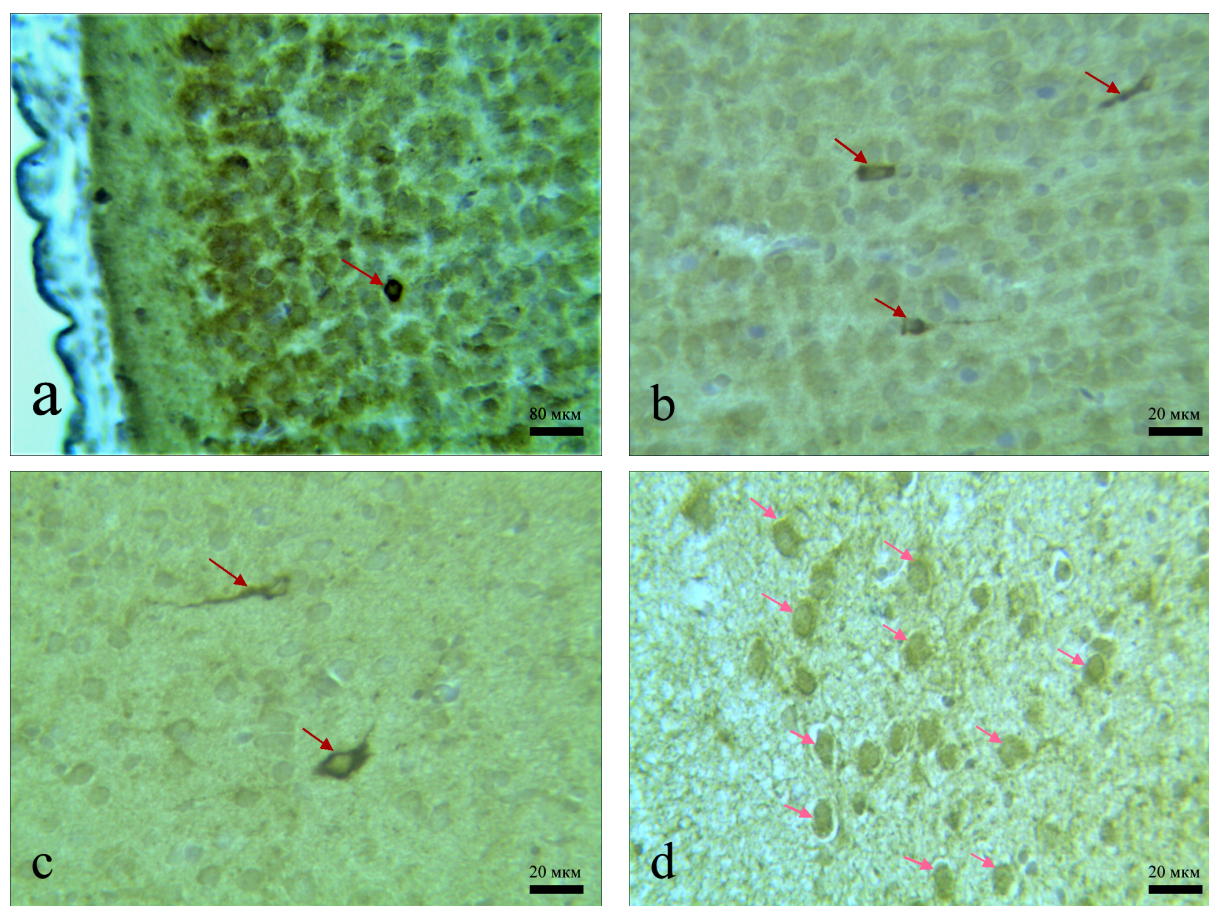


Рис. 2. pNOS-IR нейроны в коре лобной доли головного мозга белых крыс: а – одиночные позитивные нейроны в коре, б – нейроны вытянутой формы с позитивностью начальных отделов отростков в глубоких слоях коры, в – высокопозитивные нейроны 1-го типа в III–IV слоях коры, д – скопление pNOS-IR мелких нейронов с низким уровнем позитивности на границе серого и белого вещества. Особь в возрасте 1 суток (а), 3 суток (б), 7 суток (в, д). Иммуногистохимия, докраска гематоксилином Майера. Об. 10 (а), об. 40 (б, в, д), красные стрелки – нейроны 1-го типа, розовые – нейроны с транзитной экспрессией маркера.

В II–III слоях мультиполярные нейроны располагались поодиночке, не образовывали групп, имели крупные веретенообразные, звездчатые и полигональные тела, отличались высокой pNOS-IR. Выраженные позитивные отростки этих нейронов были направлены перпендикулярно поверхности коры, прослеживались на очень большом протяжении, через несколько слоев, ветвились между негативными нейронами и сосудами (рис. 1а, б). Следует отметить, что длинные позитивные отростки не достигали молекулярного слоя. Такие клетки можно классифицировать как нейроны 1-го типа согласно описаниям ряда авторов [9, 14].

pNOS-IR нейроны, морфологически схожие с нейронами 1-го типа, обнаруженными в надгранулярных слоях, выявлялись в слое полиморфных клеток (слой VI) на границе с белым веществом, но их тела были мельче, вытянуты вдоль границы и протяженные отростки также следовали вдоль нее (рис. 1с). Такие клетки встречались редко и не образовывали скоплений. В соответствии с данными обзора R.H. Williams и T. Riedemann [17], их можно отнести к проекционным нейронам, в

том числе, к связывающим полушария друг с другом.

Кроме крупных мультиполярных клеток в этих слоях встречались единичные низкопозитивные клетки округлой формы с негативными отростками (рис. 1b,e,f). В глубоком слое VI и на границе с белым веществом вблизи сосудов обнаруживались скопления мелких низкопозитивных нейронов с позитивными отростками (рис. 1d). Отмечалось, что не только отростки этих нейронов имели тесную связь с сосудами, но и их тела также плотно прилежали к сосудистой стенке.

То есть, у крысы 180-суточного возраста в коре лобной доли pNOS позитивность проявляли одиночные крупные мультиполярные клетки с высокой активностью фермента, расположенные в надгранулярных слоях, клетки веретенообразной формы с длинными позитивными отростками на границе с белым веществом, и две разновидности низкопозитивных нейронов – скопления в VI слое и одиночные – в других слоях.

На основании этого деления были проанализированы субпопуляции позитивных нейронов в раннем онтогенезе крысы (от 1-х



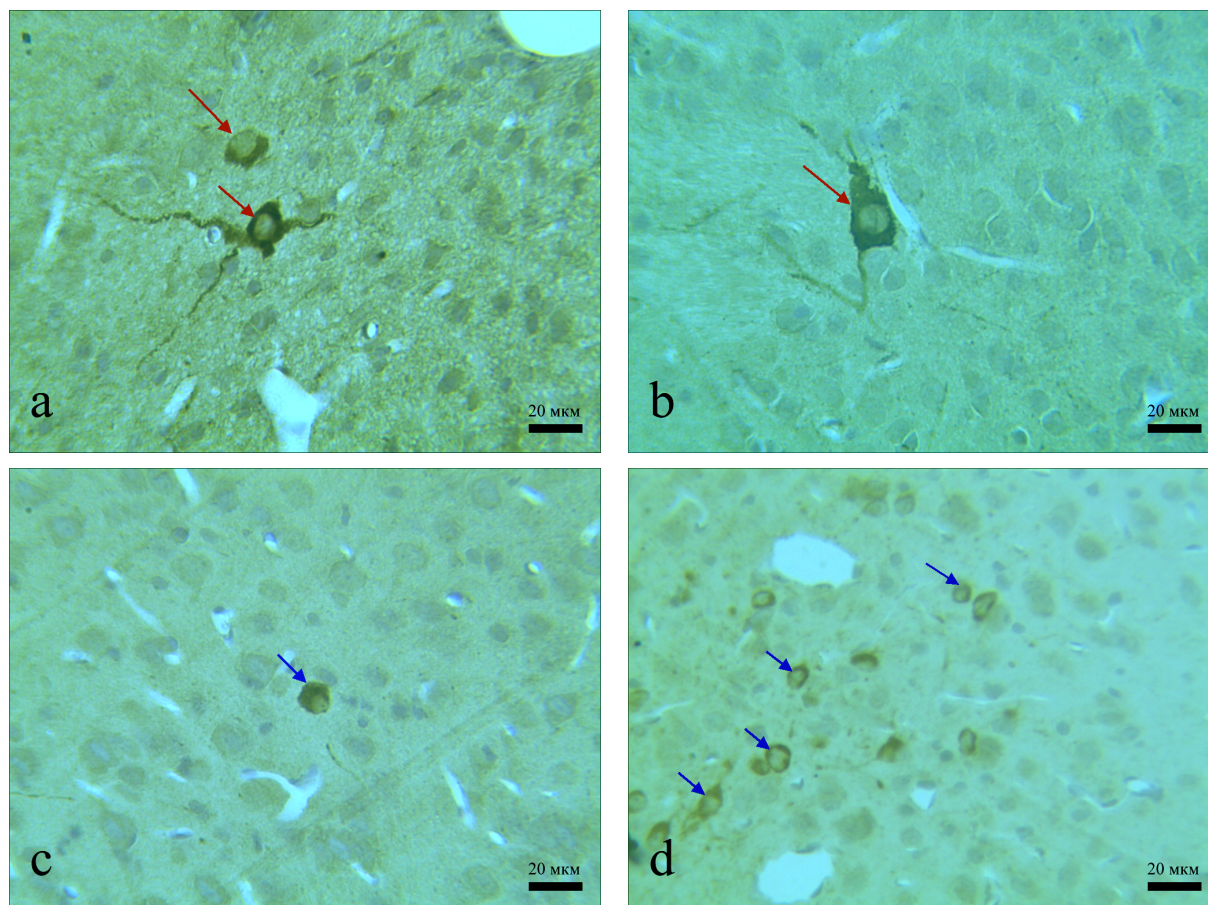


Рис. 3. pNOS-IR нейроны в коре лобной доли головного мозга белых крыс: а – позитивные нейроны 1-го типа на границе коры и белого вещества, б – высокопозитивный нейрон 1-го типа в II–IV слоях коры, тесно связанный с сосудом, с – позитивный нейрон 2-го типа в III–IV слоях коры, д – скопление нейронов 2-го типа с низким уровнем позитивности на границе серого и белого вещества. Крыса в возрасте 14 суток (а, б, с), 21 суток (д). Иммуногистохимия, докраска гематоксилином Майера. Об. 40; красные стрелки – нейроны 1-го типа, синие – нейроны 2-го типа.

до 60-х суток).

Одиночные pNOS-IR нейроны выявлялись в лобной доле крысы уже при рождении (рис. 2а). Клетки локализовались в III–IV слоях и в глубине коры на границе белого вещества, располагались по 1–2 в поле зрения, часть имели высокую иммунопозитивность тел и начальных отделов отростков (рис. 2б), что позволило отнести их к 1-му типу. В глубоких слоях встречались одиночные клетки с низкой иммунопозитивностью, отростки их почти не прослеживались. Определить их типовую принадлежность по морфологии не удавалось.

Уже на 7-е сутки pNOS-IR клетки значительно изменялись: становилось возможным различать описанные ранее типы. Так, в надгранулярных слоях выявлялись одиночные клетки округлой формы без отростков, глубже (III–IV) – клетки с вытянутыми телами и направлением отростков к поверхности коры (рис. 2с), в VI слое на границе с белым веществом – наиболее крупные нейроны с толстыми начальными отделами отростков, вытянутых вдоль границы. Отмечалась также многочисленная субпопуляция низкопозитивных клеток на границе коры и белого вещества (слой VI) (рис. 2д). Плотность этих клеток

многократно превышала плотность распределения pNOS-IR нейронов в этой зоне у молодых крыс. Клетки имели характерную для незрелых нейронов овальную форму, отростки были негативны или отсутствовали.

У крысят 14-суточного возраста картина распределения позитивных нейронов соответствовала картине у молодых. Количество нейронов 1-го типа невелико – тела одиночных высокопозитивных нейронов залежали в двух зонах – в II–IV слоях и на границе с белым веществом. Размеры клеток и плотность распределения конечного продукта реакции были ниже, чем у молодых крыс. Отмечалась очень тесная связь нейронов в VI слое с сосудами (рис. 3а,б). Нейроны 2-го типа были представлены двумя субпопуляциями: одиночными клетками без позитивности в отростках в надгранулярных слоях (рис. 3с) и группами мелких нейронов с позитивными отростками в глубине коры. Низкопозитивные нейроны без маркированных отростков, обнаруженные у 7-суточных особей, на 14-е сутки отсутствовали, что указывает на транзиторную экспрессию pNOS в этой субпопуляции. Возможно, что эти клетки не просто утрачивают позитивность, а гибнут, не включаясь в межнейронные связи.

Таблица 1

**Морфометрические характеристики nNOS-IR нейронов 1-го типа в III–IV слоях дорзолатеральной зоны неокортекса, (M±m)**

Возраст	Площадь клетки, (мкм <sup>2</sup> )	Площадь ядра, (мкм <sup>2</sup> )	ЯЦО	Оптическая плотность (опт. ед.)
1-е сутки	51,4±2,45	17,1±0,97	0,335±0,0137	171,2±2,85
3-е сутки	68,9±3,30*	26,4±1,57*	0,378±0,0120	169,8±1,89
7-е сутки	110,4±3,67*	35,8±1,37*	0,329±0,0090*	163,5±1,97*
14-е сутки	127,5±5,89	57,4±1,93*	0,323±0,0084	157,2±1,46
21-е сутки	137,4±5,40	59,1±1,56	0,288±0,0090*	163,1±3,18
30-е сутки	268,6±12,83*	83,2±5,66*	0,313±0,0189	162,6±2,72
60-е сутки	251,6±9,24	67,1±3,09	0,272±0,0090	168,1±1,62
180-е сутки	270,5±10,54	76,3±3,16	0,284±0,0100	177,4±2,75*

Примечание: \* – различия статистически значимы по сравнению с предыдущей возрастной группой,  $p < 0,05$ .

На 21-е сутки в VI слое коры вблизи сосудов выявлялись группы nNOS-IR нейронов с отростками (рис. 3d). Распределение этих клеток было подобно мелким низкопозитивным нейронам, описанным у 180-суточных крыс.

Учитывая разнообразие nNOS-IR нейронов, оценка размеров была проведена только для клеток 1-го типа, расположенных II–IV в слоях, и нейронов 2-го типа отдельно. Нейроны, которые по морфологии не соответствовали описаниям, представленным в литературе, морфометрически не оценивались. Это, в первую очередь, клетки, выявленные в VI слое у крысят 1-х – 7-х суток жизни.

Средняя площадь сечения nNOS-IR нейронов, предположительно 1-го типа, у 1-суточных крысят составляла 51,4±2,45 мкм<sup>2</sup>. В течение первой недели происходило статистически значимое увеличение показателя, достигавшее на 7-е сутки 110,4±3,67 мкм<sup>2</sup>,  $p < 0,01$ . Следующее значимое, по сравнению с 7-ми сутками, увеличение средней площади сечения нейронов отмечалось на 21-е сутки и соответствовало 137,4±5,40 мкм<sup>2</sup>,  $p < 0,05$ . С 21-х по 30-е сутки происходил резкий прирост размеров нейронов в 1,96 раза, достигая максимального значения 268,6±12,83 мкм<sup>2</sup>,  $p < 0,001$ . На протяжении последующих 5 месяцев наблюдения значимых изменений размеров тел nNOS-IR нейронов не выявлено (табл. 1).

Изменения размеров ядра имели динамику несколько отличную от изменений площади сечения тел нейронов. С 1-х до 3-х суток средняя площадь сечения ядра увеличивалась с 17,1±0,97 до 26,4±1,57 мкм<sup>2</sup>, в 1,54 раза,  $p < 0,001$ , а с 3-х до 14-х – еще в 2,1 раза,  $p < 0,001$ , достигая 57,4±1,93 мкм<sup>2</sup>. Следующий прирост происходил с 21-х до 30-х суток, в 1,41 раза. В последующем, до 180 суток, значимых изменений показателя не отмечалось (табл. 1).

Показатель ядерно-цитоплазматического отношения nNOS-IR нейронов 1-го типа представлен в табл. 1. Данная субпопуляция нейронов у новорожденных обладала относительно более крупным ядром, чем в подсосном возрасте. Максимального значения этот показатель достигал на 3-и сутки жизни

0,378±0,0120, затем постепенно снижался до 0,288±0,0090 на 21-е сутки, и сохранялся без достоверных изменений до 180-х суток.

Оценка активности nNOS, проведенная на основании плотности распределения конечного продукта реакции, выявила, что наибольшая оптическая плотность отмечалась в перинуклеарной зоне нейронов у новорожденных крысят (табл. 1). Затем постепенно снижалась, достигая достоверного изменения на 14-е сутки ( $p < 0,05$ ). В последующем показатель возрастал и на 180-е сутки становился максимальным за весь период наблюдения.

Установленная возрастная динамика морфометрических показателей демонстрировала очень раннюю стабилизацию субпопуляции nNOS-IR нейронов 1-го типа, расположенных во III–IV слоях, по размерам тел и ядер, и фазным изменениям активности фермента.

Таким образом, nNOS-IR проявляли короткоаксонные высокопозитивные нейроны с многочисленными, упорядоченно расположенными позитивными отростками. Эти клетки маркировались на nNOS с рождения, быстро росли, значимо увеличиваясь в размерах до 30-х суток. Их тела при рождении располагались в глубине коры, при постнатальных преобразованиях коры локализовались в III–IV слоях, надгранулярных. Их отростки постепенно удлинялись, приобретали выраженную позитивность, распространялись через несколько слоев, имели преимущественно радиальное направление, что позволяло отнести их к подтипу нейронов, известных, как клетки Маржинотти, то есть, высокоспециализированным интернейронам.

Размеры нейронов 2-го типа удалось оценить только с 21-х суток, когда становилось возможным дифференцировать их от клеток первого типа, и исчезала многочисленная субпопуляция позитивных нейронов в глубоких слоях.

При морфометрии выбранной субпопуляции нейронов 2-го типа, локализованных во II–IV слоях, у 21-, 30-, 60- и 180-суточных крыс (табл. 2) установлено, что увеличение средней площади сечения тел и ядер этих



Таблица 2

**Морфометрические характеристики nNOS-IR нейронов 2-го типа в III–IV слоях дорзолатеральной зоны неокортекса, (M±m)**

Возраст	Площадь клетки, (мкм <sup>2</sup> )	Площадь ядра, (мкм <sup>2</sup> )	ЯЦО	Оптическая плотность (опт. ед.)
21-е сутки	48,3±3,21	28,1±1,15	0,63±0,007	170,4 ±6,11
30-е сутки	97,3±8,15*	38,2±3,03*	0,41±0,026*	176,3±5,22
60-е сутки	97,6±4,00	36,5±1,49	0,38±0,014	143,8±2,42*
180-е сутки	97,5±4,09	35,8±1,36	0,37±0,012	143,6±2,47

Примечание: \* – различия статистически значимы по сравнению с предыдущей возрастной группой,  $p < 0,05$ .

Таблица 3

**Морфометрические характеристики nNOS-IR нейронов 2-го типа в VI слое дорзолатеральной зоны неокортекса, (M±m)**

Возраст	Площадь клетки, (мкм <sup>2</sup> )	Площадь ядра, (мкм <sup>2</sup> )	ЯЦО	Оптическая плотность (опт. ед.)
21-е сутки	78,7±4,21	29,2±1,26	0,37±0,012	168,3 ±8,01
30-е сутки	124,9±11,15*	38,1±3,03*	0,39±0,017	170,3±6,52
60-е сутки	163,9±10,98*	50,8±4,24*	0,33±0,011*	150,7±3,62*
180-е сутки	215,9±14,12*	95,3±7,46*	0,43±0,027*	148,3±2,36

Примечание: \* – различия статистически значимы по сравнению с предыдущей возрастной группой,  $p < 0,05$ .

интернейронов происходило только в сроки от 21-х до 30-х суток, в 2,0 и 1,4 раза, соответственно, а затем на протяжении всего наблюдения не изменялось. В эти же сроки отмечалось снижение ЯЦО. Оценка плотности распределения конечного продукта иммунной реакции показала, что у 21- и 30-суточных крысят этот показатель максимален, а на 60-е и 180-е сутки – минимален. На 30-е – 60-е сутки экспрессия стабилизировалась, и возрастные показатели в дальнейшем значимо не изменялись. Вероятно, что именно эта субпопуляция была описана в ряде работ на зрелых животных [11, 12] как низкопозитивные нейроны 2-го, хотя в раннем возрасте у крыс интенсивность реакции в них достаточно высока. Средние значения площади сечения нейронов этой субпопуляции во все изученные сроки были в 2,5–2,8 раза меньше размеров нейронов 1-го типа, но изменения параметров этих нейронов в целом сходны с динамикой первой субпопуляции.

Субпопуляция nNOS-IR нейронов в глубоких слоях – в VI слое на границе с белым веществом – была выделена на основании особенностей распределения конечного продукта реакции: не только в телах, но и в протяженных отростках клеток. Отмечалась тесная связь нейронов с сосудами, причем не только отростками, но и плотным прилеганием тел нейронов к стенке сосуда. Морфометрические характеристики этой субпопуляции представлены в табл. 3. На 21-е сутки площадь сечения составляла 78,7±4,21 мкм<sup>2</sup>, что достоверно, почти в 2 раза, меньше, чем у клеток

1-го типа, и в 1,6 раза больше, чем у нейронов 2-го типа в надгранулярных слоях. На 30-е сутки средние размеры nNOS-IR клеток увеличивались в 1,6 раза, на 60-е сутки – возрастали еще в 1,3 раза, и на 180-е сутки – в 1,3 раза по сравнению с предыдущими сроками, достигая 215,9±14,12 мкм<sup>2</sup>. Эти изменения происходили одновременно с изменениями средней площади сечения ядер. ЯЦО на протяжении всего времени наблюдения достоверно не изменялось. Оптическая плотность распределения конечного продукта реакции до 30-х суток была высокой, а на 60-е сутки снижалась до значений, достоверно не отличающихся от показателя нейронов 2-го типа в III–IV слоях. Нейроны 1-го типа в эти сроки имели более высокие показатели оптической плотности.

Третья разновидность позитивных нейронов была представлена многочисленной субпопуляцией клеток, расположенных на границе коры и белого вещества, отличающихся высокой позитивностью, и выявлялась только в ранние сроки, с 3-х до 7-х суток. В последующих возрастных периодах данные клетки отсутствовали.

**Заключение**

Таким образом, в результате исследования установлено, что разделение nNOS-IR нейронов по двум морфологическим типам, предложенным в работах предшественников, не соответствует тому разнообразию, которое

удалось описать в дорзолатеральной области префронтальной коры у крыс. Выявленные субпопуляции нейронов 2-го типа различаются локализацией, характером распределения маркера nNOS, возрастной динамикой роста. Кроме того, описана субпопуляция с транзитной экспрессией фермента.

Для объективной характеристики различных классов nNOS-IR интернейронов коры необходимо использовать дополнительные данные, полученные из транскриптомных, гистологических, электро-физиологических, функциональных экспериментов с учетом видовых, топографических и возрастных особенностей. Только расширенный подход позволит селективно воздействовать на разные типы клеток и обоснованно интерпретировать результаты экспериментальных исследований.

### Список литературы / References

1. Варенцов В.Е., Румянцева Т.А., Пшениснов К.К., Мясичева Т.С., Пожилов Д.А. Возрастная пластичность нитрергических субпопуляций нейронов обонятельной луковицы крысы. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2019;14(12):168–71 [Varentsov VE, Rumyantseva TA, Pshenisnov KK, Myasishcheva TS, Pozhilov DA. Age plasticity of the neurons nitrenergic subpopulations in the olfactory bulbs of rat. Medical news of the North Caucasus. 2019;14(1):168–71] (in Russian). EDN: KVRXLK. doi: 10.14300/mnnc.2019.14007
2. Обухов Д.К., Пушина Е.В., Варакин А.А. Газообразные медиаторы в ЦНС позвоночных животных. Успехи современного естествознания. 2011;(12):49–51 [Obukhov DK, Pushhina EV, Varaksin AA. Gazoobraznye mediatory v CNS pozvonochnykh zhivotnykh. Advances in current natural sciences. 2011;(12):49–51] (in Russian). EDN: OIPLQF
3. Barbaresi P, Mensà E, Lariccia V, Desiato G, Fabri M, Gratter S. Intracallosal neuronal nitric oxide synthase neurons colocalize with neurokinin 1 substance P receptor in the rat. Journal of Comparative Neurology. 2014 Nov 18;523(4):589–607. doi: 10.1002/cne.23695
4. Dittrich L, Heiss JE, Warrier DR, Perez XA, Quik M, Kilduff TS. Cortical nNOS neurons co-express the NK1 receptor and are depolarized by Substance P in multiple mammalian species. Frontiers in Neural Circuits. 2012;6:31A. doi: 10.3389/fncir.2012.00031.
5. Endo T, Yanagawa Y, Komatsu Y. Substance P Activates Ca<sup>2+</sup>-Permeable Nonselective Cation Channels through a Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C Signaling Pathway in nNOS-Expressing GABAergic Neurons in Visual Cortex. Cerebral Cortex. 2014 Oct 14;26:669–82. doi: 10.1093/cercor/bhu233
6. Kanold PO, Luhmann HJ. The Subplate and Early Cortical Circuits. Annual Review of Neuroscience. 2010 Jun;33(1):23–48. doi: 10.1146/annurev-neuro-060909-153244
7. Kourosh-Arabi M, Hosseini N, Mohsenzadegan M, Komaki A, Joghataei MT. Neurophysiologic implications of neuronal nitric oxide synthase. Reviews in the Neurosciences. 2020 Aug 1;31(6):617–36. doi: 10.1515/revneuro-2019-0111
8. Kubota Y, Karube F, Nomura M, Kawaguchi Y. The Diversity of Cortical Inhibitory Synapses. Frontiers in Neural Circuits. 2016 Apr 25;10:27. doi: 10.3389/fncir.2016.00027
9. Lee JE, Jeon CJ. Immunocytochemical localization of nitric oxide synthase-containing neurons in mouse and rabbit visual cortex and co-localization with calcium-binding proteins. Mol Cells. 2005;19(3):408–17.
10. Magno L, Oliveira MG, Mucha M, Rubin AN, Kessaris N. Multiple embryonic origins of nitric oxide synthase-expressing GABAergic neurons of the neocortex. Frontiers in Neural Circuits. 2012;6:65. doi: 10.3389/fncir.2012.00065
11. Perrenoud Q, Geoffroy H, Gauthier B, Rancillac A, Alfonsi F, Kessaris N, et al. Characterization of Type I and Type II nNOS-Expressing Interneurons in the Barrel Cortex of Mouse. Frontiers in Neural Circuits. 2012;6:36. doi: 10.3389/fncir.2012.00036
12. Tasic B, Menon V, Nguyen TN, Kim TK, Jarsky T, Yao Z, et al. Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. Nature Neuroscience [Internet]. 2016 Jan 4;19(2):335–46. doi: 10.1038/nn.4216
13. Vruwink M, Schmidt HHHW, Weinberg RJ, Burette A. Substance P and nitric oxide signaling in cerebral cortex: Anatomical evidence for reciprocal signaling between two classes of interneurons. The Journal of Comparative Neurology. 2001 Dec 24;441(4):288–301. doi: 10.1002/cne.1413
14. Williams RH, Black SW, Thomas AM, Piquet J, Cauli B, Kilduff TS. Excitation of Cortical nNOS/NK1R Neurons by Hypocretin 1 is Independent of Sleep Homeostasis. Cerebral Cortex. 2018 Feb 16;29(3):1090–108. doi: 10.1093/cercor/bhy015
15. Williams RH, Vazquez-DeRose J, Thomas AM, Piquet J, Cauli B, Kilduff TS. Cortical nNOS/NK1 Receptor Neurons are Regulated by Cholinergic Projections From the Basal Forebrain. Cerebral Cortex. 2017 May 2;28(6):1959–79. doi: 10.1093/cercor/bhx102
16. Williams RH, Riedemann T. Development, Diversity, and Death of MGE-Derived Cortical Interneurons. International Journal of Molecular Sciences. 2021 Aug 27;22(17):92–7. doi: 10.3390/ijms22179297
17. Yan XX, Garey LJ. Morphological diversity of nitric oxide synthesising neurons in mammalian cerebral cortex. J Hirnforsch. 1997;38:165–72.

18. Yousef T, Neubacher U, Eysel UT, Volgushev M. Nitric oxide synthase in rat visual cortex: an immunohistochemical study. Brain Research

Protocols. 2004 Apr;13(1):57–67. doi: 10.1016/j.brainresprot.2004.01.004

**Информация об авторах**

✉ Румянцева Татьяна Анатольевна – д-р. мед. наук, профессор, зав. кафедрой анатомии человека Ярославского государственного медицинского университета. Ул. Революционная, 5, Ярославль, 150000; rum-yar@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-8035-4065>  
Агаджанова Лилия Семеновна – канд. мед. наук, доцент; lili2573@mail.ru  
Варенцов Вячеслав Евгеньевич – канд. мед. наук, доцент; carabidolog@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-4724-9466>  
Пожиллов Дмитрий Алексеевич; dmitry.oldman@yandex.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-4086-8272>  
Дашян Тигран; lili2573@mail.ru  
Киселев Андрей Владимирович; rum-yar@mail.ru

**Information about the authors**

✉ Tat'yana A. Rumyantseva – Doct. Med. Sci., Prof., head of human anatomy department of Yaroslavl State Medical University. Ul. Revolyutsionnaya, 5, Yaroslavl, 150000; rum-yar@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-8035-4065>  
Liliya S. Agadzhanova – Cand. Med. Sci., Assoc. Prof.; lili2573@mail.ru  
Vyacheslav E. Varentsov – Cand. Med. Sci., Assoc. Prof.; carabidolog@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-4724-9466>  
Dmitrii A. Pozhilov; dmitry.oldman@yandex.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-4086-8272>  
Tigran Dashyan; lili2573@mail.ru  
Andrei V. Kiselev; rum-yar@mail.ru

---

Статья поступила в редакцию 1.02.2022; одобрена после рецензирования 20.04.2022; принята к публикации 25.04.2022.  
The article was submitted 1.02.2022; approved after reviewing 20.04.2022; accepted for publication 25.04.2022.

---