

Гистохимия NADPH-диафоразы при синдроме Гийена–Барре

А.В. Сахарова, С.М. Ложникова, М.А. Пирадов, В.Н. Пирогов

НЦН РАМН, Москва

Для ряда демиелинизирующих заболеваний доказана вовлеченность в патогенез эндогенного оксида азота (NO). Сведений об участии его в клеточных иммунных реакциях при синдроме Гийена–Барре (СГБ) нет. Мы изучили гистохимию NADPH-диафоразы при синдроме Гийена–Барре на 6 биоптатах периферического нерва в сроки от 11 до 52 дней. Для выявления фермента был применен тетразолиевый метод в нашей модификации, позволяющей на соседних срезах изучать клеточную и субклеточную его локализацию. Мы показали, что каждой изученной стадии патологического процесса в нерве соответствует свой паттерн гистохимической реакции. Динамика нарастания и снижения интенсивности реакции для шванновских клеток (ШК) и иммунокомпетентных клеток (ИКК) оказалась различной. На ранних сроках развития болезни, когда преобладает демиелинизация, в ШК разрушающихся миелиновых волокон наблюдается снижение интенсивности реакции и, соответственно, уровня NO-синтазы (NOS). При ремиелинизации с интенсивной пролиферацией ШК и увеличением объема их цитоплазмы в них нарастает интенсивность NADPH-диафоразной реакции, что свидетельствует об увеличении в них продукции оксида азота. В активированных ШК изменяется субклеточная локализация NADPH-диафоразы. Максимум реакции смещается в ядро, что является признаком включения экспрессионального регулирования, характерного для индуцибельной NOS (iNOS), способной обеспечивать продукцию более высоких уровней NO, необходимых для нужд роста и привлечения макрофагов. В ИКК уровень реакции варьирует в больших пределах, отражая циклический характер, присущий макрофагальной iNOS. Интенсивная реакция обнаруживается в цитоплазме и ядерной мембране моноцитов, мигрирующих через сосудистую стенку, где повышение продукции NO может способствовать увеличению вазодилатации, облегчать выход макрофагов и обеспечивать сброс продуктов распада в кровоток. При электронной микроскопии на территории разрушающейся миелиновой оболочки в отростках цитоплазмы макрофагов выявляются отдельные локусы с исключительно интенсивной реакцией – возможно, места гиперпродукции NO. Перечисленные факты являются свидетельством того, что в патогенез СГБ вовлечен эндогенный оксид азота.

Ключевые слова: СГБ, биоптаты n. suralis, NADPH-диафоораза, гистохимия, электронная гистохимия.

Введение

К настоящему времени доказано участие оксида азота в патогенезе различных демиелинизирующих заболеваний [20]. Ранее, основываясь на гистохимическом изучении маркера NO-синтазы – NADPH-диафоразы – в периферическом нерве (ПН) при дифтерийной полинейропатии (ДП) на разных сроках болезни, мы показали, что с деструктивными изменениями совпадает снижение ферментативной активности в шванновских клетках, а с нарастанием репаративных процессов происходит увеличение интенсивности реакции в цитоплазме и ядрах ШК [3, 4]. Эти результаты послужили обоснованием участия оксида азота в патогенезе ДП. Однако прямых клинико-гистохимических данных, обосновывающих участие NO-синтазы в патогенезе синдрома Гийена–Барре, нет, имеются лишь данные, полученные на модели этой болезни, экспериментальном аллергическом неврите (ЭАН) [19, 24]. Задачей данного исследования было проследить динамику NADPH-диафоразы в связи с развитием патологического процесса при тяжелых формах СГБ. Результаты изучения биопсий периферического нерва, взятых в разные сроки болезни, послужили гистохимическим обоснованием участия эндогенного NO в процессах воспалительной демиелинизации и восстановления при СГБ.

Материалы и методы

Материалом исследования явились биоптаты n. suralis, взятые в различные сроки от момента появления первых признаков нейропатии у шести больных с тяжелыми формами СГБ. У всех наблюдался тяжелый вариант клинического течения СГБ с глубоким парезом дыхательной мускулатуры, расстройством глотания и развитием тетраплегии или глубокого тетрапареза с утратой возможности себя обслуживать и передвигаться. В пяти случаях проводилась искусственная вентиляция легких (ИВЛ) через трахеостому, и слабость дыхательной мускулатуры сопровождалась падением жизненной емкости легких в среднем до 0,5 л (14% от должных величин), а продолжительность ИВЛ составила в среднем 59 суток. Лишь в одном наблюдении со снижением жизненной емкости легких до 1,65 л (69% от должных величин) ИВЛ не потребовалась. Лечение больных проводилось с помощью программного плазмафереза. У всех пациентов отмечался практически полный регресс неврологических нарушений. Характеристика клинических наблюдений представлена в таблице 1.

Контролем к биопсийному материалу послужил аутопсийный материал, полученный от лиц, погибших от сосудистых причин и не имевших при жизни заболеваний периферических нервов.

таблица 1

№ п./п.	№ биопсии (код)	Пол	Возраст	Продолжительность болезни	Количество плазмаферезов
1	512/02 НА	жен.	56	11 дней	0
2	1789/99 КА	муж.	35	14 дней	3
3	1394/01 СИ	муж.	59	21 день	2
4	1017/98 ФИ	муж.	33	31 день	5
5	1781/99 МА	жен.	53	47 дней	7
6	106/00 КЕ	жен.	55	52 дня	5

В данном гистохимическом исследовании мы использовали части биоптатов, которые были предметом проведенного ранее клинико-электронно-микроскопического изучения. В нем во всех случаях основной патологии была установлена антителозависимая макрофаг-ассоциированная демиелинизация [2]. Биоптаты были исследованы методами электронной микроскопии, а также световой и электронной гистохимии NADPH-диафоразы, с использованием тетразолиевого метода в нашей модификации. Эта модификация, подробно описанная в статьях [3, 4], позволила визуализировать один и тот же объект на соседних срезах на уровне световой и электронной гистохимии. На рис. 1 (А, Б) приведены примеры сравнения одного и того же объекта на последовательных срезах в гистохимическом и электронно-гистохимическом выражении. Сопоставление результатов, полученных при использовании электронной микроскопии, с данными световой и электронной гистохимии позволило связать ультраструктурную патологию с клеточными и субклеточными гистохимическими параметрами, отражающими локализацию фермента и его уровень.

Результаты

Сравнение гистохимических картин распределения и интенсивности NADPH-диафоразной реакции в биоптатах ПН показало, что каждому из изученных сроков присущ свой паттерн гистохимической реакции (рис. 2 А–Д).

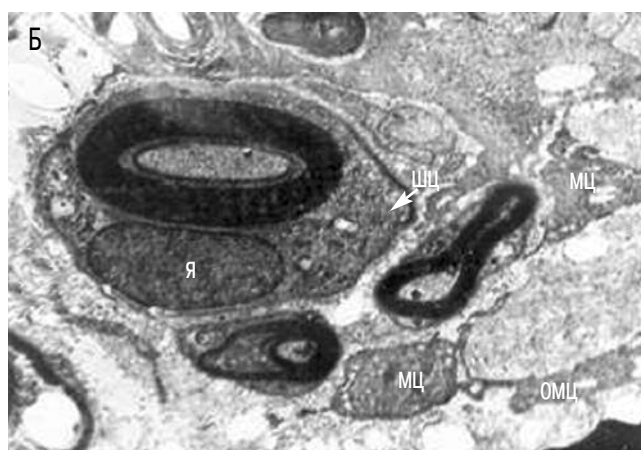
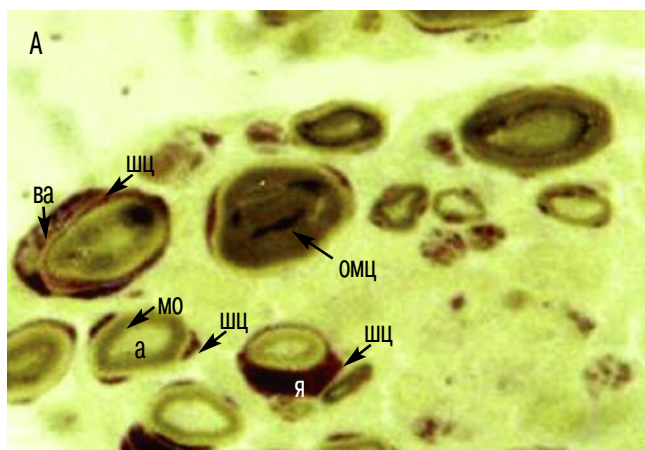


рис. 1: Серийные поперечные срезы участков эндоневрия в гистохимическом (А) и в электронно-гистохимическом (Б) выражении. СГБ, 31 день болезни. NADPH-диафоораза, тетразолиевый метод. Стрелками помечены идентичные участки шванновских клеток

А – увеличение – X 100

Б – увеличение – X 17 000

Здесь и на последующих рисунках: а – аксон; ва – вакуоль; га – голый аксон; кв – коллагеновые волокна; мнв – миелиновое нервное волокно; мц – моноцит; омц – отросток моноцита; ор – островок регенерации; мо – миелиновая оболочка; ц – цитоплазма; шк – шванновская клетка; шц – цитоплазма ШК; яд – ядрышко; я – ядро

В наблюдениях с продолжительностью болезни в 11 и 14 дней при электронной микроскопии выявлены сходные морфологические изменения. В эндоневрии обнаружены в разной степени выраженные мультифокальные повреждения миелиновых нервных волокон (МНВ). Повреждение ШК выражается в уменьшении их объема и вакуолизации цитоплазмы, а также в изменении формы их ядер. Иммунные клетки представлены немногочисленными моноцитами, располагающимися вблизи МНВ с сохранным миелином.

Локализация и интенсивность реакции на NADPH-диафору отражает отмеченную неоднородность повреждений. В большинстве ШК выявляется пониженная (рис. 2 Б) по сравнению с контролем (рис. 2 А) гистохимическая реакция. Продукт реакции в виде мелких гранул локализуется в цитоплазме, прилежащей к наружной стороне миелиновой оболочки (рис. 3 А). В цитоплазме ШК часто имеются вакуоли, не содержащие продукта реакции.

Особенной чертой в гистохимической картине на этих сроках болезни было резкое уменьшение, иногда до полного отсутствия, реакции в ядрах многих ШК (рис. 2 Б, 3 А). В немногочисленных моноцитах, находящихся на территории эндоневрия, реакция на NADPH-диафору была отрицательной или едва заметной.

В наблюдениях с продолжительностью симптоматики в 21 и 31 день на фоне картины продолжающегося процесса демиелинизации, выражающейся в уменьшении плотности МНВ разных диаметров, разрушении миелиновой оболочки (МО) и аксонов в части МНВ, ярко выражена инвазия моноцитов и макрофагов в эндоневрий. Появляются и достигают максимальной выраженности к 31 дню морфологические признаки активации и пролиферации ШК с увеличением количества денервированных ШК и ШК, ассоциированных с голыми аксонами.

Преобладающим признаком в гистохимической картине на этих сроках является общее увеличение NADPH-диафоразной реакции в эндоневрии. Оно обусловлено увеличением интенсивности реакции в цитоплазме и ядрах ШК, уча-

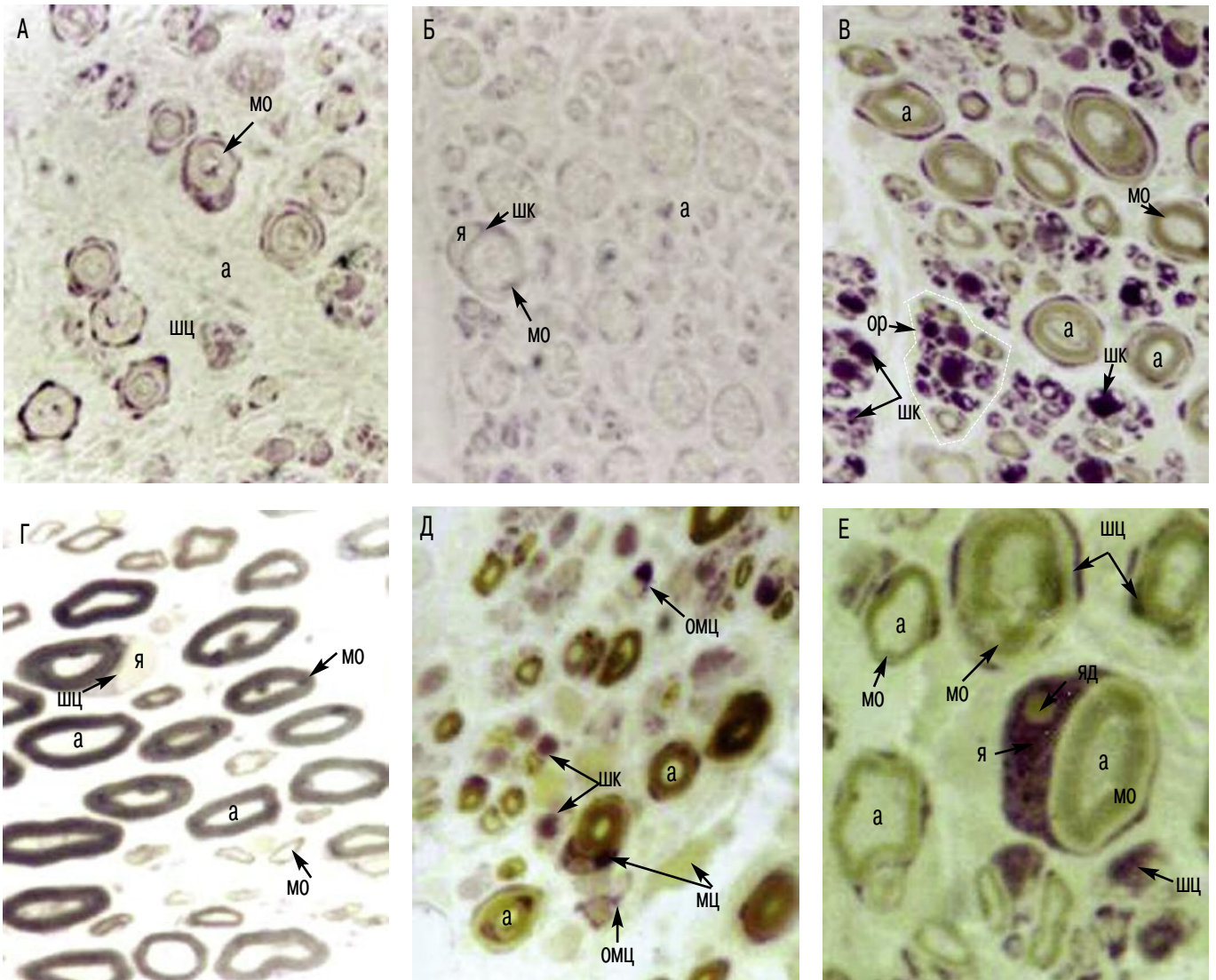


рис. 2: Различия в паттернах гистохимической реакции на разных сроках болезни: А – контроль; Б – 14 дней; В – 31 день, пунктирной линией обведен островок регенерации; Г – 47 дней; Д – 52 дня; Е – 31 день (детали клеточного распределения фермента, увеличенный масштаб). Участки поперечных срезов интернода. Световая гистохимия, полутонкие срезы, тетразолиевый метод. Увеличение – X 100

ствующих в ремиелинизации, а также увеличением количества моноцитов и макрофагов с положительной реакцией. Интенсивная реакция обнаруживается в цитоплазме и ядрах ШК, ассоциированных с голыми аксонами, в островках регенерации (рис. 2 В), в цитоплазме сегментоядерных лейкоцитов в просвете сосудов, а также в моноцитах – макрофагах в эндоневрии. Другим важным признаком является смещение максимальной интенсивности реакции в ядра ШК. Распределение фермента хорошо визуализируется на поперечных срезах крупных МНВ даже при световой микроскопии (рис. 2 Е). Электронно-гистохимические препараты демонстрируют густые гранулярные отложения продукта реакции в цитоплазме и ядрах ШК (рис. 3 Б). Часто в отростках моноцитов, находящихся на территории разрушающейся МО обнаруживаются участки цитоплазмы с исключительно интенсивной реакцией. Они так малы, что их с трудом удается увидеть при разрешении светового микроскопа. При электронной микроскопии они бывают хорошо видны (рис. 3 В, стрелки).

Следует заметить, что моноциты с отрицательной реакцией тоже не видны в световых гистохимических препаратах, и участки эндоневрия, в которых они располагаются, выглядят пустыми (см. рис. 1 А). Однако при электронной микроскопии в докрашенных серийных срезах идентичного участка нерва видно, что эти места не пусты, а заняты моноцитами с отрицательной реакцией (см. рис. 1 Б).

В наблюдении со сроком болезни в 47 дней продолжающийся процесс демиелинизации и уборки продуктов распада миелина сочетается с интенсивной ремиелинизацией. Характерной особенностью в этом наблюдении является наличие в эндоневрии большого количества нервных волокон малого калибра с тонкой миелиновой оболочкой.

В гистохимической картине наблюдается заметное уменьшение общей интенсивности реакции (см. рис. 2 Г). Это связано с уменьшением пропорции пролиферирующих и денервированных ШК, в которых на предыдущих сроках реакция была высокой.

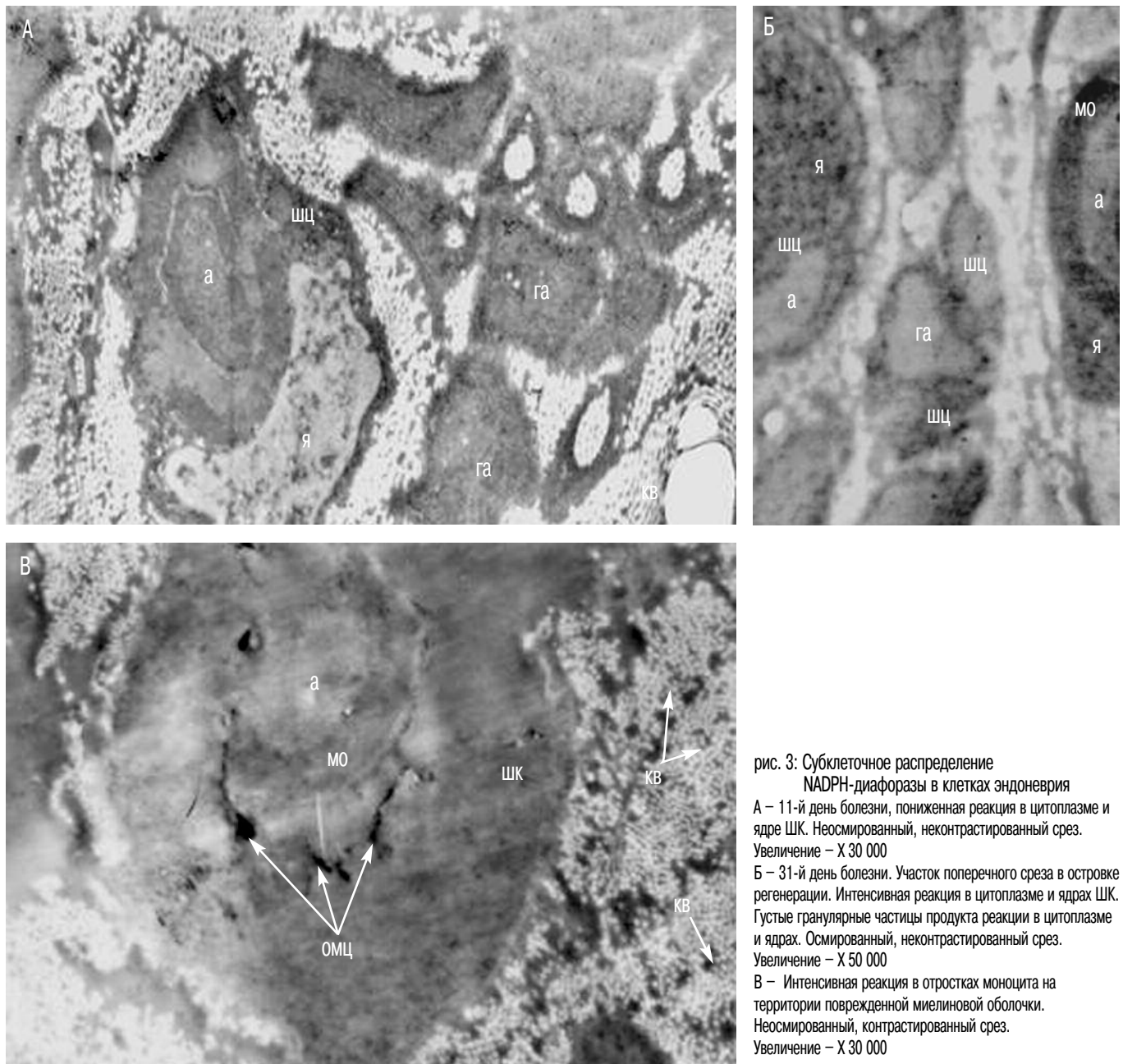


рис. 3: Субклеточное распределение NADPH-диафоразы в клетках эндоневрия
 А – 11-й день болезни, пониженная реакция в цитоплазме и ядре ШК. Неосмированный, неконтрастированный срез. Увеличение – X 30 000
 Б – 31-й день болезни. Участок поперечного среза в островке регенерации. Интенсивная реакция в цитоплазме и ядрах ШК. Густые гранулярные частицы продукта реакции в цитоплазме и ядрах. Осмированный, неконтрастированный срез. Увеличение – X 50 000
 В – Интенсивная реакция в отростках моноцита на территории поврежденной миелиновой оболочки. Неосмированный, контрастированный срез. Увеличение – X 30 000

В шестом наблюдении с продолжительностью болезни в 52 дня наиболее ярко проявляются признаки повышения проницаемости эндоневральных сосудов. Мононуклеарные клетки, преимущественно моноциты и макрофаги, располагаются вблизи сосудов, а также в стенках микрососудов и просто в эндоневрии.

В эндоневрии сохраняется выраженная реакция на NADPH-диафорузу. Ее уровень обеспечивают ШК, ассоциированные с МНВ средних и крупных размеров, и иммунные клетки. В моноцитах, которые инвазируют эндоневрий, интенсивность реакции варьирует в больших пределах. Иногда она едва заметна, а иногда сравнима с максимальной реакцией в ШК. Она бывает разной не только в разных клетках, но и в разных частях одной и той же

клетки. Наиболее интенсивна она в дистальных участках отростков моноцитов, которые контактируют с МО или с голым аксоном (рис. 2 Д). Интенсивная реакция появляется в цитоплазме и ядерных мембранах моноцитов, мигрирующих через стенки сосудов (рис. 4 А, Б). Моноциты отростками цитоплазмы взаимодействуют между собой и с ШК (рис. 4 В).

Обсуждение

В настоящем исследовании мы показали, что развитие патологических процессов в нерве при СГБ сопровождается изменениями локализации и интенсивности реакции на NADPH-диафорузу, что служит свидетельством участия NOS в патогенезе этого воспалительного демиелинизи-

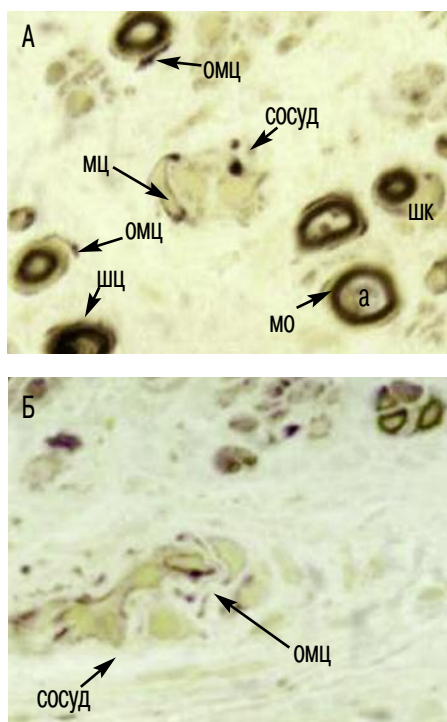
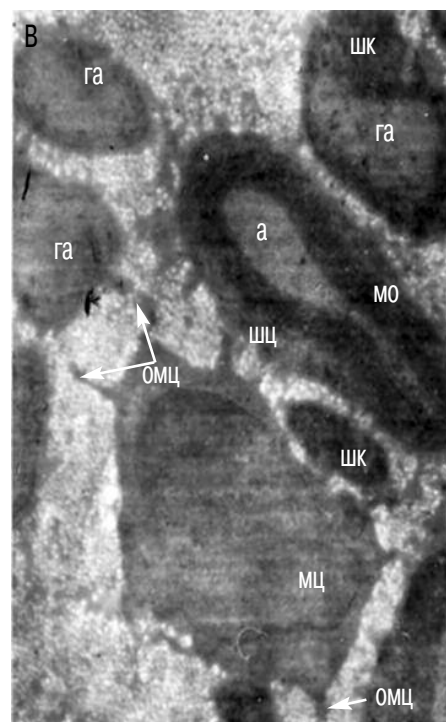


рис. 4: Гистохимические признаки, отражающие участие макрофагальной NOS в патогенезе. Биоптат позднего срока (52 дня)

А, Б – Интенсивная реакция в моноцитах и их отростках (стрелки). Световая гистохимия
В – Взаимодействие моноцитов между собой и с ШК. Выраженная реакция в цитоплазме. Электронная гистохимия, осмированный, контрастированный срез. Увеличение – X 30 000



рующего заболевания. В работе представлены результаты изучения 6 биоптатов на сроках болезни от 11 до 52 дней. Характер и уровень разрушения и восстановления в них в большинстве случаев изменяется с изменением продолжительности болезни, и каждой временной точке и состоянию патологического процесса на этом сроке соответствует свой паттерн гистохимической реакции. Наблюдаемое на ранних сроках распространенное равномерное снижение интенсивности гистохимической реакции в ШК, совпадающее с заметным повреждением миелина и минимальным присутствием иммунных клеток, можно объяснить следствием общего, исключительно гуморального воздействия. Возможность сугубо сывороточного воздействия, вызывающего лизис ШК и везикулярное разрушение миелина, была продемонстрирована в ювелирных опытах *in vitro* на культуре нервных и глиальных клеток, не содержащей никаких иммунных клеток [6]. Имеющиеся наряду с этим фокальные, более грубые повреждения ШК, в которых значительно снижена гистохимическая реакция в цитоплазме и ядрах, связаны, по-видимому, с клеточными влияниями, имевшими место в предшествующее биопсии время, когда иммунные клетки транзитивно и временно появлялись в nerve.

В литературе имеются свидетельства возможности подобных реакций, происходящих на более ранних, чем в наших наблюдениях, сроках, и их связывают с присутствием в эндоневрии цитотоксических Т-клеток и С9neo-компонентов комплемента [26]. С увеличением продолжительности болезни, когда в морфологической картине появляются и нарастают признаки восстановления с интенсивной пролиферацией ШК и с увеличением объема их цитоплазмы и ядер, в них становится более интенсивной реакция на NADPH-диафорузу. Нарастание гистохимической реакции в ШК является признаком увеличения в них продукции оксида азота, который служит аттрактантом моноцитов и

макрофагов и может частично восполнять отсутствие или недостаток факторов роста [1, 5], необходимых для обеспечения пролиферативных потребностей ШК. Участие NO-синтазы в регенерации, а также зависимость регенерации нерва от N-оксидной поддержки, были убедительно продемонстрированы в опытах с пересадкой отрезка седалищного нерва генетически измененным мышам, лишенным одной из изоформ NOS. Было показано, что у мышей, лишенных или нейрональной, или индуцибельной NO-синтазы, обнаруживалось нарушение регенерации нерва. Отсутствие эндотелиальной NOS (eNOS) на регенерацию не влияло, а лишь замедляло реваскуляризацию трансплантата [19, 20]. В других опытах с повреждением ПН было показано, что на регенерацию положительно влияет увеличение экспрессии всех трех форм NOS [18]. И наоборот, замедление регенерации после перерезки нерва при экспериментальном диабете связывают с недостаточным уровнем NO, возникающим из-за наблюдаемой отсроченной инвазии макрофагов [21, 27, 28].

Важной особенностью в динамике NADPH-диафоразы были изменения ее субклеточной локализации. По мере нарастания регенерации в ШК наблюдалось не только увеличение интенсивности гистохимической реакции в клетке, но и перемещение максимального уровня реакции в ядро. В нормальных условиях в ШК и в других клетках, содержащих NO-синтазы, согласно нашим данным [4] и данным литературы [12], NADPH-диафоруза и другие иммунологические маркеры NO-синтазы локализируются преимущественно в мембранных структурах цитоплазмы и в ядерной мембране. Появление NO-синтазы в ядре считается проявлением не свойственного конститутивному ферменту экспрессионального регулирования, которое возникает в ответ на специфическую стимуляцию [14]. В литературе имеются описания ядерной локализации eNOS, появляющейся в адипоцитах бурой жировой ткани крыс в

ответ на симпатическую стимуляцию или на воздействие норадреналином [17]. Появление iNOS в ядрах крысиных полиморфноядерных лейкоцитов описано как ответ на активацию кальциевым ионофором [24]. Такие внутриклеточные перемещения белка следуют за миграцией транскрипционного фактора, который исходно локализуется в цитозоле, а в ответ на активацию перемещается в мембраны, где подвергается каскаду белкового фосфорилирования, после чего переходит в ядро и связывается там с ДНК [5, 16]. Имеются свидетельства того, что в этих процессах участвуют специальные белки-регуляторы, в частности, связанный с NOS белок NOSIP [11].

Динамика гистохимических изменений при СГБ, а именно, снижение интенсивности реакции на NADPH-диафоразу в ШК разрушающихся миелиновых волокон и нарастание – в ШК, принимающих участие в ремиелинизации, оказалась сходной с динамикой, наблюдаемой при ДП [3, 4]. Механизмы вовлеченности оксида азота в патогенез этих двух разных по этиологии демиелинизирующих заболеваний для ШК выглядят сходными. Этиологические и патогенетические различия при СГБ по сравнению с ДП обусловлены участием иммунных клеток, в которых локализуется макрофагальная iNOS, способная продуцировать высокие уровни NO и таким образом модулировать течение процессов. Признаки, отражающие участие в патологическом процессе макрофагальной iNOS, появляются в морфологической картине и паттернах гистохимической реакции после трех недель от начала развития симптоматики. Если на ранних сроках болезни мононуклеаров в срезах мало и реакция маркера в них или отрицательная, или слабая, то позднее в срезах увеличивается количество моноцитов с положительной реакцией. Ее уровень в клетках, однако, варьирует в больших пределах, что является отражением циклического характера процессов, присущих макрофагальной iNOS, а также транзиторности ее присутствия. Временные параметры циклов могут сильно различаться в разных тканях и при разных условиях [10, 13]. В циклах начало экспрессии гена в ответ на стимуляцию, нарастание уровня белка и продукции NO, а затем ее затухание и прекращение продукции отделены значительными интервалами времени – от часов до нескольких недель.

Известно, что при аутоиммунных процессах продукция оксида азота в иммунных клетках может достигать значительных концентраций. В наших наблюдениях, однако, нарастание интенсивности реакции маркера NOS в моноцитах/макрофагах не было значительным, и пропорция иммунных клеток с интенсивной реакцией была также невелика. По-видимому, такое подавление потенциальных возможностей макрофагальной iNOS стало результатом специфической терапии, направленной на удаление иммунологически активных субстанций, в частности, циркулирующих цитокинов, ответственных за инициацию экспрессии iNOS. В эндоневрии, однако, на поздних сроках болезни обнаруживалась исключительно высокая интенсивность NADPH-диафоразной реакции в цитоплазме и ядерной мембране моноцитов, мигрирующих через стенку сосуда, а также в отдельных локусах цитоплазмы моноцитов, на территории разрушающейся миелиновой оболочки. Поскольку эти участки принадлежат иммунным клеткам с высокопродуктивной iNOS, то интенсивная гистохимическая реакция в них указывает на высокий уровень продукции NO, такой, при котором сам оксид азота,

непосредственно и очень локально, может производить цитотоксический эффект и очищать пространство для ремиелинизации.

Избыточная продукция оксида азота считается причинным фактором нейродегенеративных нарушений [25]. Изучение механизмов участия NO в патогенезе рассеянного склероза, проведенное иммуно-гистохимическими методами на срезах ткани головного и спинного мозга, а также на клеточных культурах макрофагов, выделенных от больных с рассеянным склерозом, выявило важные закономерности [9]. В срезах ткани, в участках активной демиелинизации, в макрофагах была обнаружена интенсивная реакция на iNOS, а изолированные от больных рассеянным склерозом макрофаги в условиях клеточной культуры экспрессировали обе – конститутивную и индуцибельную NO-синтазы, и продуцировали оксид азота в концентрациях, превышающих 30 mM. На основании этих наблюдений авторы пришли к выводу, что при рассеянном склерозе макрофаги и в ткани продуцируют оксид азота в цитотоксических концентрациях, и это становится причиной гибели олигодендроцитов и разрушения миелина.

Чтобы проверить справедливость такой точки зрения, в другом исследовании, проведенном на зрительных нервах крыс с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом (ЭАЭ), был измерен уровень продукции NO в ткани, и оказалось, что он не превышал 1 nM [15]. По мнению авторов этой работы, огромные расхождения в данных об уровнях продукции NO объясняются различием условий опытов. В дисперсных культурах уровень NO в самом деле достигает высоких значений из-за дефицита его своевременного связывания. В тканях же всегда существуют механизмы торможения чрезмерного повышения активности iNOS, а также механизмы быстрого связывания NO [1], поэтому создания токсических концентраций оксида азота, как правило, не происходит. Наши данные предполагают наряду с этим и другое объяснение: участки клеток, в которых возможна гиперпродукция NO, так малы и настолько рассеяны, что не могут быть обнаружены микроэлектродными методами.

Исключительно интенсивная реакция в моноцитах, мигрирующих через стенку сосуда, на поздних сроках болезни заслуживает особого внимания. Оксид азота является самым мощным вазодилататором, и здесь, выступая в этой роли, он встраивается в цепь участников воспалительных реакций. Диффундируя из мигрирующих моноцитов, он способствует значительному увеличению локального кровотока, что помогает проникновению иммунных клеток из сосуда в эндоневрий и увеличивает степень иммунного клеточного влияния на стадии активной инвазии, а на стадии разрушения способствует выходу макрофагов с продуктами распада из ткани и сбросу их в кровоток.

В пяти из шести исследованных нами биоптатов с увеличением продолжительности болезни прослеживалась тенденция нарастания гистохимической реакции в ШК и ИКК. Только в одном биоптате с продолжительностью болезни в 47 дней наблюдалось некоторое уменьшение интенсивности гистохимической реакции, что совпадало с наличием в эндоневрии большого количества миелиновых волокон малого калибра с тонкой миелиновой оболочкой. В данном случае снижение интенсивности реакции маркера

NOS и малый калибр МНВ мог стать также следствием терапевтических мер, направленных на снижение уровня цитокинов и зависимость от них уровня NO на стадии ремиелинизации, что проявилось недоразвитием миелиновых оболочек.

В ряде исследований, проведенных на модели экспериментального диабета [21], было обнаружено замедление регенерации в ПН, что связывали с отсроченной инвазией макрофагов и возникновением вследствие этого дефицита NO.

Биологическая роль NO изменчива и зависит от изоформы NOS, а также от места продукции и наличия мишеней и индукторов в локальном окружении [1, 5, 22, 23, 25]. В одних случаях увеличение уровня NO может тормозить развитие репаративных процессов и снижение уровня продукции NO является благоприятным фактором, так как предупреждает цитотоксические проявления [7, 8]. В других – недостаток NO становится причиной замедления регенерации [18, 19].

Список литературы

1. Ванин А.Ф. Оксид азота – универсальный регулятор биологических процессов. NO-терапия: теоретические аспекты, клинический опыт и проблемы применения экзогенного оксида азота в медицине. Материалы научно-практической конференции 4 – 5 декабря 2001 года. Москва, 2001: 22 – 27.
2. Пирадов. М.А. Синдром Гийена–Барре. М.: Интермедика, 2003.
3. Сахарова А.В., Ложникова С.М., Пирогов В.Н., Пирадов М.А. Экспрессия NADPH-диафоразы в периферическом нерве и ее изменение на разных стадиях дифтерийной полинейропатии. Архив патологии 1999; 61 (1): 39–46 (4).
4. Сахарова А.В., Ложникова С.М. Ультраструктурная локализация NO-синтазной NADPH-диафоразы в периферическом нерве и ее изменения при дифтерийной полинейропатии. Вестник Российской академии медицинских наук 2000; 4: 44–48.
5. Турнаев К.Т. Роль окиси азота в передаче сигнала между клетками. Молекулярная биология 1998; 32 (4): 581–591.
6. Birchem R., Mithen F.A., L'Empereur K.M. Ultrastructural effects of Guillain-Barre serum in cultures containing only rat Schwann cells and dorsal root ganglion neurons. Brain Res. 1987; 421 (1–2): 173–85.
7. Brenner T., Brocke S., Szafer F., Sobel R.A., Parkinson J.F., Perez D.H., Steinman L. Inhibition of nitric oxide synthase for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Immunol. 1997; 158: 2940–2946.
8. Conti G., Rostami A., Scarpini E., Baron P.L., Galimberti D., Bresolin N., Contri M., Palumbo C., De Pol A. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune-mediated demyelination and Wallerian degeneration of rat peripheral nervous system. Exp. Neurol. 2004; 187: 350–358.
9. De Groot C.J., Ruuls S.R., Theeuwes J.W., Dijkstra C.D., van der Valk P. Immunocytochemical characterization of the expression of inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase in demyelinating multiple sclerosis lesions. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1997; 56: 10–20.
10. Ding M., Merrill J.E. The kinetics and regulation of the induction of type II nitric oxide synthase and nitric oxide in human fetal glial cell cultures. Mol. Psychiatry 1997; 2 (2): 117–129.
11. Dreyer J., Schleicher M., Tappe A., Schilling K., Kuner T., Kusumawidijaja G., Miller-Esterl W., Oess S., Kuner R. Nitric oxide synthase (NOS)-interacting protein interacts with neuronal NOS and regulates its distribution and activity. J. Neurosci. 2004; 24 (46): 10454–10465.

В данной работе мы показали, что при СГБ маркер NO-синтазы – NADPH-диафороза – постоянно присутствует в ШК и появляется на время в иммунокомпетентных клетках. Локализация и уровень фермента изменяются по мере развития процессов демиелинизации и ремиелинизации. Снижение интенсивности реакции в ШК совпадает с деструктивными изменениями в нерве, а нарастание – с репаративными процессами.

В активированных ШК изменяется внутриклеточная локализация маркера NOS со смещением максимальной интенсивности реакции в ядро, что считается проявлением включения индуктивного регулирования в клетках, исходно экспрессирующих конститутивную NOS. В иммунокомпетентных клетках маркер NOS присутствует не всегда, и увеличение реакции широко варьирует от клетки к клетке и от случая к случаю, что отражает циклический и волнообразный характер процессов в клетках, экспрессирующих индуцибельную NOS. Все перечисленные факты являются свидетельством того, что эндогенный оксид азота вовлечен в патогенез СГБ.

12. Elphick M.R. Localization of nitric oxide synthase using NADPH diaphorase histochemistry. Cell Tissue Res. 1995; 279 (2): 405–409.
13. Felts P.A., Woolston M.A., Fernando H.B., Asquith S., Gregson N.A., Mizzi O.J., Smith R.J. Inflammation and primary demyelination induced by the intraspinal injection of lipopolysaccharide. Brain 2005 (Jul); 128 (Pt. 7): 1649–1666. Epub. 2005; May 4.
14. Forstermann U., Boissel J.-P., Kleinert H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). REVIEW. The FASEB Journal 1998; 12: 773–790.
15. Garthwaite G., Batchelor A.M., Goodwin D.A., Hewson A.K., Leeming K., Ahmed Z., Czuzner M.L., Garthwaite J. Pathological implication of iNOS expression in central white matter: an ex vivo study of optic nerves from rats with experimental allergic encephalomyelitis. Eur. J. Neurosci. 2005; 21 (8): 2127–2135.
16. Gilchrist M., McCauley S.D., Befus A.D. Expression, localization, and regulation of human mast cell lines: effects on leucotriene production. Blood 2004; 104 (2): 462–469.
17. Giordano A., Tonello C., Bulbarelli A., Cozzi V., Cinti S., Carrubo M.O., Nosoli E. Evidence for a functional nitric oxide synthase system in brown adipocyte nucleus. FEBS LETT 2002 (Mar. 13); 514 (2–3): 135–140.
18. Gonzales-Hernandez T., Rustioni A. Expression of three forms of nitric oxide synthase in peripheral nerve regeneration. J. Neurosci. Res. 1999; 55(2): 198–207.
19. Keilhoff G., Fansa Y., Wolf G. Neuronal NOS deficiency promotes apoptotic cell death of spinal cord neurons after peripheral nerve transection. Nitric Oxide 2004; 10 (2): 101–111.
20. Keilhoff G., Wolf G., Fansa H. NOS-mediated differences in peripheral nerve graft revascularization and regeneration. Neuroreport 2002; 13 (11): 1463–1468.
21. Kennedy J.M., Zochodne D.W. Impaired peripheral nerve regeneration in diabetes mellitus. J. Peripher. Nerve Syst. 2005; 10 (2): 144–157.
22. Michel T., Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how and why? J. Clin. Invest. 1997; 100 (9): 2146–2157.
23. Nagano S., Takeda M., Ma L., Soliven B. Cytokine-induced cell death in immortalized Schwann cells: roles of nitric oxide and cyclic AMP. J. Neurochem. 2001; 77(6): 1486–1495.
24. Saini R., Patel S., Saluja R., Sahasrabudde A.A., Singh P.M., Habib S., Bajpai V.K., Dikshit M. Nitric oxide synthase localisation in the rat neutrophils: immunocytochemical, molecular, and biochemical studies. Journal of Leukocyte Biology 2006; 79: 519–528.

25. *Smith K.J., Kapoor R., Felts P.A.* Demyelination: The role of reactive oxygen and Nitrogen Species. *Brain Pathology* 1999; 9: 69–92, Symposium: Oxidative Stress in Neurological Disease.

26. *Wanschitz J., Maier H., Lassmann H., Budka and Berger T.* Distinct time pattern of complement activation and cytotoxic T-cell response in Guillain-Barre syndrome. *Brain* 2003; 126 (9): 2034–2042.

27. *Zochodne D.W., Levi D.* Delayed axonal degeneration and regener-

ation in mice lacking immunological (inducible) nitric oxide synthase (iNOS). Mechanisms of nerve degeneration and regeneration. Abstracts. Platform 1999 (July 24); 8.

28. *Zochodne D.W., Verge V.M.K., Cheng C., Hoke A., Jolley C., Thomsen K., Rubin J., Lauritzen M.* Nitric oxide synthase activity and expression in experimental diabetic neuropathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2000; 59: 798–807.

Histochemical changes of NADPH-diaphorase in Guillain–Barre syndrome

A.V. Sakharova, S.M. Lozhnikova, M.A. Piradov, V.N. Pirogov

Research Center of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Key words: GBS, n. suralis biopsats, NADPH-diaphorase histochemistry, electronic histochemistry.

The distribution of NADPH-diaphorase activity in peripheral nerve biopsy was studied to evaluate the role of nitric oxide in demyelination.

NO is an important inflammatory mediator which appears to exert significant effects in number of demyelinating diseases, and sometimes is established a direct causal link between NO and demyelination. Till now there wasn't any description for the involvement of nitric oxide in GBS cellular immune reactions.

We have studied cellular and sub-cellular histochemistry of NADPH-diaphorase in GBS. Peripheral nerve biopsy tissues were examined with regard to disease duration, from 6 patients who were 11 to 52 days after onset of symptoms.

Tetrazolium method in our modification was used to visualize NADPH-diaphorase reaction in the successive tissue sections on the cellular and ultra-structural levels. We have shown that specific pattern of histochemical reaction was characteristic for each distinct time point of disease duration. Up- and down-regulation mode of histochemical reaction was different for Schwann cells (SC) and mononuclear inflammatory cells.

During demyelination reduced NADPH-diaphorase activity was found in SCs associated with degrading myeline sheath. During remyelination that characterized by proliferation of SCs and

enlarge of its cell volume we observed an increase in NADPH-diaphorase reaction that indicated on the rise of the NO production in it. In that activated SCs the intracellular distribution of NADPH-diaphorase is changed. Maximum of reaction intensity was shifted in nucleus. It suggests the appearance of the expressional regulation in SCs, which characteristic for the high-output iNOS, and directed to increase of NO production

The levels of NADPH-diaphorase activity varied in large extend in different recruited macrophages in the same tissue sample. It reflects the cyclic character proper to macrophagal iNOS. Intensive reaction was found in cytoplasm and nuclear envelop of the mononuclear cells, that migrate throw the blood vessel walls where NO may enhancing local nerve blood flow and serve simultaneously as important effector in the clearance of the myelin/axonal debris.

High intensive NADPH-diaphorase activity was detected in distinct cytoplasm regions of the macrophage on the territory of the injured myelin sheath. Hyperproduction of nitric oxide and cytotoxic effect may take place in such districts.

All this findings suggest that endogenous nitric oxide is involved in pathogenesis of GBS.