DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2021-25(3)-03

УДК: 611.018+577.1:615.099:663.5:599.323.45

ГІСТОХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ NO-СИНТАЗНОЇ СИСТЕМИ ЛАТЕРАЛЬНОГО СЕПТУМУ НА ФОНІ ГОСТРОЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ ТА ПРИ БЛОКАДІ NNOS У ЩУРІВ

Чайковська О. В., Довгань О. В., Рокунець І. Л., Нечипорук В. М., Власенко О. В.

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

Відповідальний за листування:
e-mail: chaikovska.olga@vnmu.edu.ua

Статтю отримано 15 червня 2021 р.; прийнято до друку 19 липня 2021 р.

Анотація. Алкоголь є однією з речовин, що найбільш рутинно споживаються і які здатні викликати залежність або хвороби порушення вживання алкоголю. Вживання алкоголю, яке переходить у залежність, призводить до зниження якості життя пацієнтів і суттєвого навантаження на економіку країни. Нейронні механізми формування залежності інтенсивно вивчаються. Однією з важливих систем, які задіяні у цьому процесі, є система винагороди, частиною якої є латеральний септум. Також вживання алкоголю змінює функціонування нейротрансмітерних систем, включаючи систему оксиду азоту. Останні дані щодо блокади NO-синтазної системи для кокаїнової залежності і пізніх стадій алкогольної залежності, демонструють, що клас сполук, відомих, як блокатори NO-синтази можуть розглядатися як кандидати для терапії алкогольної залежності. Метою нашої роботи було вивчення гістохімічної характеристики NO-синтазної системи латерального септума, її реакції на гостру алкогольну інтоксикацію та блокаду селективним інгібітором нейрональної NO-синтази - 7-нітроіндазолом (7-NI). Для дослідження використали три групи експериментальних тварин (контрольна група (n=4), група моделювання гострої алкогольної інтоксикації (n=4) та група з блокадою NO-синтазної системи на фоні гострої алкогольної інтоксикації (n=4)). Статистична обробка включала виявлення різниці між досліджуваними групами за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу Краскела-Уолліса (Matlab, Mathworks). Ми ідентифікували NOS-позитивні структури латерального септума - великі нейрони, середні/малі нейрони та нервові волокна. Під час гострої алкогольної інтоксикації відбувалася активація субпопуляції NOS-позитивних середніх і малих нейронів та нервових волокон. Також ми показали можливість блокади етанол-індукованої активації селективним інгібітором nNOS 7-NI.

Ключові слова: NO-синтаза, оксид азоту, латеральний септум, етанол, 7-NI.

Вступ

Порушення вживання алкоголю (AUDs) - це хронічне, рецидивуюче захворювання, пов'язане з адаптивними змінами у ЦНС. У розвитку цього захворювання задіяна ціла низка зон мозку, які зазнають нейропластичних і токсичних змін [17]. Драйвером цих процесів - є перебудова сигналізації частини зон лімбічної системи і кори головного мозку. Особливий інтерес представляють зони, що входять до системи винагороди і навчання, а також беруть участь у визначенні та присвоєнні значущості стимулам - алкоголю й асоціюванням з ним контекстом [15]. Латеральний септум (LS) - є частиною лімбічної системи і системи винагороди. Хоча септальна зона не є класичним "хабом", як наприклад, дофамінова система, але має багаточисельні аферентні й еферентні зв'язки з різними зонами мозку, починаючи від кори і закінчуючи стовбуровими центрами [10]. LS має зв'язки з усіма ключовими структурами, задіяними в формуванні залежності. За останні роки з'явилася низка робіт, які доводять участь септальної ділянки у розвитку залежності, особливо в контексті встановлення асоціативних зв'язків між алкоголем і тригерними стимулами [6, 8, 12, 15, 28, 33].

Оксид азоту (NO) - газоподібна сполука, яка регулює ряд важливих фізіологічних функцій і патологічних станів у багатьох регуляторних системах організму - серцево-судинній та імунній, включаючи центральну нервову си-

стему, де NO відіграє роль нейромедіатора та нейромодулятора [4]. NO синтезується з амінокислоти L-аргініну сімейством ферментів NO-синтаз (NOS), в яких виділено три ізоформи - нейрональна (nNOS), ендотеліальна (eNOS) і індукційна (iNOS). NOS каталізує реакцію перетворення L-аргініну в L-цитрулін з вивільненням газоподібної сполуки NO. Оксид азоту бере участь у багатьох клітинних каскадних перетвореннях, має як аутокринну, так і паракринну дію. Було описано значно ширший діапазон процесів, в яких NO бере участь [4, 11]. У глобальному фізіологічному контексті до NO-залежних процесів відносяться генерація циркадних і дихальних ритмів, пейсмейкерна активність ШКТ, виділення гормонів центральними залозами, модулювання стресової вісі, участь у нейропластичності - регулювання механізмів довготривалих потенціації і депресії, процесах навчання та формування пам'яті, реактивності імунної системи, etc. Згідно ряду досліджень з розподілу nNOS в ЦНС гризунів і приматів, nNOS локалізується як в багатьох відділах кори, так і підкіркових структурах, включаючи і систему винагороди [27, 34]. Також було зафіксовано роль NO у розвитку алкогольної та наркотичних залежностей з можливим впливом на її перебіг через маніпуляції з NO-синтазною системою, зокрема блокуванням [1, 22, 25, 26, 31].

Метою даного дослідження було встановити гістох-

імічну характеристику NO-синтазних нейронів LS та їх можливу реакцію на блокаду нейрональної NOS селективним інгібітором 7-нітроїдазолом (7-NI).

Матеріали та методи

Експериментальні тварини. Робота виконана на щурах лінії Wistar експериментально-біологічної клініки інституту фізіології ім. О. О. Богомольця масою 170-250 г, віком 3-3,5 місяці. До експерименту тварин утримували у віварії кафедри для адаптації зі сталими показниками температури, вологості та з вільним доступом до води і їжі. Тварини розміщувалися по 2 у клітці. У дослідженні були використані 12 тварин, які були розділені на 3 експериментальні групи: 1 група - контрольна група тварин, які отримували ін'єкції фізіологічного розчину інтраперитонеально (іп) (n=4), 2 група - моделювання гострої алкогольної інтоксикації (n=4), які отримували ін'єкції (іп) етанолу у дозі 2 г/кг у 15% розчині, 3 група - моделювання гострої алкогольної інтоксикації на фоні блокади NO-синтазної системи (n=4), які отримували ін'єкції (іп) 7-NI (Alfa Aesar, USA) у дозі 20 мг/кг, розчиненому на диметилсульфоксиді 0,1 мл/кг за 30 хв. до введення етанолу у дозі 2 г/кг у 15% розчині.

Гістологічні приготування і гістохімія зразків. Докладно опис методики наведений у протоколі [13] і роботах [19, 34]. Методика заснована на гістохімічній ідентифікації НАДФН-діафори, яка колокалізується з nNOS - такі забарвлені структури є NO-позитивними. Досліджуваних тварин анестезували розчином тіопенталу натрію - 75 мг/кг (іп), після чого проводилось відкриття грудної клітки та катетеризація висхідної аорти. Через катетер проводили процедуру перфузії рядом розчинів (1 перфузія - фосфатний буфер + 0.2% розчин нітриту натрію + 5000 МО гепарин сульфату/кг ($t=37^{\circ}\text{C}$); 2 перфузія - 4% розчин параформальдегіду на 1М фосфатному буфері ($\text{pH}=7,4$; $t=4^{\circ}\text{C}$) для прижиттєвої фіксації тканин мозку. Після перфузії мозок додатково фіксували у 4% розчині параформальдегіду на 1М фосфатному буфері (24 години). Після фіксації мозок розрізали на сегменти та проводили кріопротекцію. На заморожувальному мікромомі з фіксованих сегментів були отримані фронтальні зрізи мозку товщиною 40 мкм.

Для гістохімічного маркування nNOS-позитивних нейронів отримані зрізи інкубували протягом 3 годин у термостаті при $t=37^{\circ}\text{C}$ у розчині 1М фосфатного буферу з редукованим бета-НАДФН (0,5 мг/мл, Sigma-Aldrich, Germany), нітроблакитним тетразолієм (0,2 мг/мл), малою кислотою (1,2 мг/мл, Sigma-Aldrich, Germany). NOS-позитивні нейрони ідентифікували за фіолетовим забарвленням цитоплазми за допомогою оптичного бінокулярного мікроскопа.

Кількісний аналіз nNOS-позитивних нейронів та фотografування забарвлених зрізів проводили за допомогою оптичного бінокулярного мікроскопа, оснащеного камерою. Межі аналізованих структур визначалися відповідно до атласу мозку Paxinos&Watson [23]. Аналізували

зрізи, що відповідали координатам AP: $[-0,48 +0,48]$ mm від брегми. Кількість нейронів оцінювали як кількість клітин на зріз в області, що відповідала LS. Густина нервових волокон (низька, середня, висока) і фонове забарвлення (слабоінтенсивне, середньоінтенсивне і високоінтенсивне) оцінювали візуально. Статистична обробка включала розрахунок медіан і стандартних відхилень ($\text{median}\pm\text{std}$) для NOS-позитивних нейронів кожної із груп та порівняння між групами, яке було проведено за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу Краскела-Уолліса (значення $p<0,05$ приймалося як статистично достовірне різниця). Статистичний аналіз здійснювали в середовищі Matlab, Mathworks.

Дослідження проведено в науково-дослідній лабораторії експериментальної нейрофізіології, кафедри нормальної фізіології, проведені з дотриманням основних положень Закону України No 3447 - IV від 21.02.06 р. "Про захист тварин від жорстокого поводження" (2006), "Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин", затверджених наказом МОЗ України No 755 від 12.08.1997 р. та "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1986), Директиви Ради Європи 2010/63 EU щодо експериментів на тваринах. Усі маніпуляції робилися під місцевою та загальною анестезією і були прикладені всі зусилля для зменшення страждань тварин.

Результати

У зоні LS при гістохімічному фарбуванні ідентифікували наступні NOS-позитивні структури - два типи нейронів і скупчення нервових волокон (рис. 1 А-С) в області дорзального (LSD), проміжного (LSI) та вентрального (LVD) ядер LS.

Морфологічно виділялися добре профарбовані нейрони з крупними тілами ~ 20 мкм і одиничними слабо розгалуженими відростками (рис. 1А), середні/мілкі нейрони з тілами ~ 10 -12 мкм і розгалуженими відростками (рис. 1В) та зони NOS-позитивних нервових волокон (рис. 1С).

Для контрольної групи густина NOS-позитивних нейронів в LS класифікувалася як низька і складала в середньому $3,05\pm 0,34$ клітин на тестову ділянку для крупних нейронів та $3,15\pm 0,31$ клітин на тестову ділянку для середніх нейронів (рис. 2). Зони нервових волокон у серіях зрізів контрольної групи профарбовувалися слабоінтенсивно.

Введення етанолу значущо не змінило активацію крупних клітин у порівнянні з контролем, яка для групи моделювання гострої інтоксикації становила $3,34\pm 0,32$ клітин на зріз. Натомість реєстрували значну активацію NOS у цитоплазмі мілких і середніх нейронів. Характерною особливістю цих зрізів була вища інтенсивність забарвлення й загального фону препаратів порівняно з контролем. На зрізах мозку групи моделювання гострої алкогольної інтоксикації чітко відмічали нейрони малого та середнього діаметру з неінтенсивним забарвленням цитоплаз-

Рис. 1. NOS-позитивні структурні елементи LS: А - крупні нейрони, В - середні/малі нейрони, С - зони нервових волокон.

Рис. 2. Мікрофотографія NOS-позитивних структур контрольної групи тварин (репрезентативний зріз); LSD - дорзальний латеральний септум, LSI - інтермедіальний латеральний септум, LSV - вентральний латеральний септум, MS - медіальний септум, cc - мозолисте тіло.

Рис. 3. Мікрофотографія NOS-позитивних структур: група моделювання гострої алкогольної інтоксикації (репрезентативний зріз); LSD - дорзальний латеральний септум, LSI - інтермедіальний латеральний септум, LSV - вентральний латеральний септум, MS - медіальний септум, cc - мозолисте тіло.

ми та відростків, причому щільність їх у цій групі щурів була досить високою (рис. 3). Так середня кількість вказаних нейронів на тестову ділянку збільшилася в 2,24 рази в порівнянні з контролем ($p=0,0122$) і становила

$7,06 \pm 0,67$ клітин на тестову ділянку. Окрім того на фоні введення етанолу також спостерігалася активація сплетень NOS-позитивних нервових волокон.

Блокада nNOS селективним інгібітором 7-NI, яка передувала гострій алкогольній інтоксикації, не вплинула на кількість NOS-позитивних нейронів, яка для групи блокади nNOS з гострою алкогольною інтоксикацією була співставна з контрольною групою і склала $3,00 \pm 0,21$ клітин на зріз для крупних нейронів та $3,08 \pm 0,44$ клітин на зріз для середніх/маленьких нейронів. У порівнянні з групою моделювання гострої алкогольної інтоксикації, супутня блокада NO-синтазної системи призвела до зменшення рівня NOS-позитивних середніх нейронів у 2,29 разів ($p=0,0421$) у порівнянні з групою моделювання гострої алкогольної інтоксикації без блокади nNOS. Загалом блокада nNOS знизилася також густина NOS-позитивних нервових волокон і фонову інтенсивність фарбування до рівнів, що спостерігалися для контрольної групи (рис. 4).

Статистично значущої різниці в кількості середніх/маленьких NOS-позитивних нейронів між контрольною групою і групою з блокадою 7NI + етанол не спостерігалася. Також не виявлена різниця між рівнем великих NOS-по-

Рис. 4. Мікрофотографія NOS-позитивних структур: група моделювання 7-NI + гострої алкогольної інтоксикації (репрезентативний зріз); LSD - дорзальний латеральний септум, LSI - інтермедіальний латеральний септум, LSV - вентральний латеральний септум, MS - медіальний септум, cc - мозолисте тіло.

Рис. 5. Зміна кількості NOS-позитивних нейронів латерального септуму при моделюванні гострої алкогольної інтоксикації та при супутній блокаді NO-синтазної системи.

Таблиця 1. Розподіл NOS-позитивних структур LS для трьох груп досліджуваних тварин (медіана±стандартне відхилення).

Експериментальні групи/ Досліджувані структури	Контроль n = 4	Гостра інтоксикація етанолом n = 4	7NI + гостра інтоксикація етанолом n = 4
Великі нейрони, клітин/зріз	3.05±0.34	3.34±0.32	3.00±0.21
Середні та малі нейрони, клітин/зріз	3.15±0.31	7.06±0.67	3.08±0.44
Густина нервових волокон	Низька +	Висока +++	Низька +
Інтенсивність фарбування	Низька +	Висока +++	Низька +

зитивних нейронів між всіма трьома групами (рис. 5).

По осі абсцис: Large Size Neurons - крупні нейрони, Medium/Small Size Neurons - середні і малі нейрони; по осі ординат - кількість клітин на зріз; синій колір стовпчиків відповідає контрольній групі (Control group), червоний - групі моделювання гострої алкогольної інтоксикації (Ethanol group), жовтий - групі моделювання гострої алкогольної інтоксикації при супутній блокаді NO-синтазної системи 7-нітроїдазолом (7-NI + Ethanol group); представлені дані медіани±стандартне відхилення (medians±SD); статистичне порівняння між групами здійснене за допомогою критерію Краскела-Уолліса (*- p-value <0,05).

Описані результати підсумовані в таблиці 1.

Обговорення

Сигнальні та нейромодуляторні шляхи, опосередковані оксидом азоту відіграють суттєву роль у реакціях, які реалізуються за участі лімбічної системи та системи винагороди, а підвищена експресія nNOS [21, 30] у відповідних ділянках мозку під час реалізації цих реакцій дає підстави розглядати її, як таргет для корекції і терапії ряду залежностей (алкогольної, наркотичних), а також деп-

ресій, нейродегенеративних захворювань, хронічного болю та груп хвороб, у патогенезі яких задіяний механізм ексайтотоксичності [16].

У роботі [7] була оцінена кількість нейронів для щурів лінії Sprague-Dawley, для зрізів мозку яких, в LS був зафіксований високий рівень NO-синтазних нейронів, що відповідно градації авторів відповідало 3 і більше клітинам на оцінювану ділянку мозку. Загалом, це співпадає з результатами, які ми спостерігали для щурів лінії Wistar для контрольної групи. Щільність NO-позитивних волокон для щурів лінії Sprague-Dawley була оцінена як висока, а для щурів контрольної групи лінії Wistar у нашому дослідженні, як низька, що може бути пов'язано як з різною методикою ідентифікації NOS-позитивних структур - моноклональними антитілами в дослідженні P.S. Chong et al. (2019) і НАДФН-діафори у нашій роботі, так і видовою різницею досліджуваних тварин [7]. Наприклад, наявність NOS-позитивних нейронів у LS мозку людини і приматів до недавнього часу дискутувалась, аж доки в дослідженні [3] не була доведена їх наявність, а також залежність ідентифікації від методу гістологічного приготування зрізів. Загалом наші результати по оцінці кількості нейронів LS співпадають з такими, що виявлені в лінії щурів Sprague-Dawley.

Активацию NO-залежного молекулярного шляху виявлено на всіх стадіях формування циклу алкогольної залежності, який складається з трьох повторюваних етапів - стадії гострої алкогольної інтоксикації, стадії відміни (негативного афекту) і стадії пошуку (рецидиву) [17, 18]. Було визначено, що вже для стадії гострої алкогольної інтоксикації мало місце підвищення експресії nNOS in vitro для культури кортикальних нейронів у порівнянні з контрольними групами клітин [21]. Також було виявлено збільшення синтезу NO на стадії абстиненції в ділянках мозку, що контролюють тривожність, і в таких, що задіяні в реалізації стрес-реакцій та їх емоційних, вегетативних і моторних компонентах [24]. Встановлено, що 7-NI у дозах 15 мг/кг і 25 мг/кг, який вводився піддослідним тваринам протягом тижня знижував інтенсивність абстинентного синдрому, а також мав нейропротективну дію щодо оксидативного стресу [32]. Натомість, стимуляція nNOS агоністом L-аргініном призводила до рецидиву вживання у щурів [30], що вказує на участь NO-синтазної системи у всіх стадіях циклу залежності для тваринних моделей ПБА.

Щодо реакції NO-синтазної системи LS на гостру інтоксикацію етанолом дані досить обмежені. Згідно результатів нашого дослідження етанол активував специфічну nNOS в LS щурів, але переважно це стосувалося популяції мілких та середнього розміру нейронів. Також під час стадії гострої інтоксикації, очевидно, активувалася трансмісія сигналу через LS з іншими структурами, що проявлялося як збільшення інтенсивності забарвлення нервових волокон на зрізах. Оскільки LS має щільні зв'язки з рядом ділянок мозку, які опосередковують нейронні контури формування залежності [10, 17, 18], то факт одночасної активації NOS-позитивних волокон та субпопу-

ляції клітин самого LS дає підстави вважати, що LS бере участь в обробці стимулів і ефектів пов'язаних з алкоголем як безпосередньо, так і в структурі відповідних нейронних контурів. Згідно останніх даних і описаних зв'язків LS [10], одним із ключових кандидатів є гіпокамп, з яким LS має дуже щільні двонаправлені зв'язки. На користь цієї гіпотези говорить і зафіксована сукупна роль LS і гіпокампа у формуванні поведінки, пов'язаної з отриманням винагороди, контекстною і мотиваційною інформацією та емоційним фоном, що супроводжує стимули, пов'язані з активацією системи винагороди, класичним представником яких є алкоголь [20, 36, 37].

Натомість при інгібуванні nNOS специфічним інгібітором 7-NI ми спостерігали значне зниження фонового забарвлення для всіх досліджуваних структур, а також зниження активності nNOS, індукованої етанолом для субпопуляцій середніх і мілких нейронів до рівнів, що суттєво не відрізнялися від контрольної групи, але були значно нижчі таких, що спостерігалися для моделі гострої алкогольної інтоксикації. Цей факт пояснює поведінкові реакції на ряд інгібіторів NOS, які проявлялися зниженням алкоголь-індукованої локомоторної сенситизації, зменшенням споживання етанолу у тварин, зниженням інтенсивності та тривалості синдрому відміни, зменшення реакції умовної переваги місця (CPP) [1, 25, 26, 31].

Висновки та перспективи подальших розробок

1. У зоні LS морфологічно було виділено дві групи

NOS-позитивних нейронів: крупні з нерозгалуженими відростками і середні з розгалуженими множинними терміналами. Також візуально визначалася зона NO-позитивних нервових волокон, густо переплетених без чіткої орієнтації.

2. Гостра алкогольна інтоксикація не змінила кількість крупних NO-позитивних нейронів, але натомість збільшила кількість забарвлених середніх та мілких нейронів. На фоні етанолу відбулася активація NO-позитивних нервових волокон, також збільшилась інтенсивність забарвлення. Блокада ж NO-синтазної системи на фоні гострого введення етанолу селективним інгібітором призвела до нівелювання ефекту етанолу - кількість виявлених забарвлених крупних і середніх нейронів була на рівні співставному з контрольною групою.

3. Результати нашого дослідження дають підстави стверджувати, що етанол активує NO-синтазну систему в середніх і мілких нейронах LS та ймовірно зони мозку функціонально і структурно пов'язані з LS, що проявлялося інтенсивним забарвленням нервових волокон. Селективна ж блокада нейрональної NO-синтази виявила кількісну і структурну картину NO-позитивних нейронів і волокон на рівні, співставним з контролем.

У результаті нашого дослідження показано, що NO-система LS активно реагує на гостру алкогольну інтоксикацію, а реакція на 7-NI створює перспективи для подальших досліджень цієї зони в контексті терапії AUDs й інших залежностей.

Список посилань - References

- [1] Auta, J., Gatta, E., Davis, J. M., Zhang, H., Pandey, S. C., & Guidotti, A. (2020). Essential role for neuronal nitric oxide synthase in acute ethanol-induced motor impairment. *Nitric oxide: biology and chemistry*, 100-101, 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.04.003>
- [2] Bernstein, H. G., Brisch, R., Ogonlade, V., Heinemann, A., Baumann, B., Arendt, T., ... & Lüth, H. J. (2004). Detection of nitric oxide synthase (NOS) immunoreactive neurons in the human septal area: a matter of method? *Journal of chemical neuroanatomy*, 27(4), 247-250. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2004.03.008>
- [3] Bonassoli, V. T., Milani, H., & de Oliveira, R. M. W. (2011). Ethanol withdrawal activates nitric oxide-producing neurons in anxiety-related brain areas. *Alcohol*, 45(7), 641-652.
- [4] Calabrese, V., Mancuso, C., Calvani, M., Rizzarelli, E., Butterfield, D. A., & Stella, A. M. (2007). Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(10), 766-775. <https://doi.org/10.1038/nrn2214>
- [5] Chandler, L. J., Sutton, G., Norwood, D., Sumners, C., & Crews, F. T. (1997). Chronic ethanol increases N-methyl-D-aspartate-stimulated nitric oxide formation but not receptor density in cultured cortical neurons. *Molecular pharmacology*, 51(5), 733-740. <https://doi.org/10.1124/mol.51.5.733>
- [6] Chen, G., Reilly, M. T., Kozell, L. B., Hitzemann, R., & Buck, K. J. (2009). Differential activation of limbic circuitry associated with chronic ethanol withdrawal in DBA/2J and C57BL/6J mice. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 43(6), 411-420. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2009.05.003>
- [7] Chong, P. S., Poon, C. H., Fung, M. L., Guan, L., Steinbusch, H., Chan, Y. S., ... & Lim, L. W. (2019). Distribution of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity in adult male Sprague-Dawley rat brain. *Acta histochemica*, 121(8), 151437. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2019.08.004>
- [8] Criado, J. R., Steffensen, S. C., & Henriksen, S. J. (1996). Microelectrophoretic application of SCH-23390 into the lateral septal nucleus blocks ethanol-induced suppression of LTP, in vivo, in the adult rodent hippocampus. *Brain research*, 716(1-2), 192-196. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00018-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00018-2)
- [9] Cuéllar, B., Fernández, A. P., Lizasoain, I., Moro, M. A., Lorenzo, P., Bentura, M. L., ... & Leza, J. C. (2000). Up-regulation of neuronal NO synthase immunoreactivity in opiate dependence and withdrawal. *Psychopharmacology*, 148(1), 66-73. <https://doi.org/10.1007/s002130050026>
- [10] Deng, K., Yang, L., Xie, J., Tang, H., Wu, G. S., & Luo, H. R. (2019). Whole-brain mapping of projection from mouse lateral septal nucleus. *Biology open*, 8(7), bio043554. <https://doi.org/10.1242/bio.043554>
- [11] Finnerty, N., O'Riordan, S. L., Klammer, D., Lowry, J., & Pålsson, E. (2015). Increased brain nitric oxide levels following ethanol administration. *Nitric oxide : biology and chemistry*, 47, 52-57. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2015.03.002>
- [12] Gárate-Pérez, M. F., Mández, A., Bahamondes, C., Sanhueza, C., Guzmán, F., Reyes-Parada, M., ... & Renard, G. M. (2021). Vasopressin in the lateral septum decreases conditioned place preference to amphetamine and nucleus accumbens dopamine release. *Addiction biology*, 26(1), e12851. <https://doi.org/10.1111/adb.12851>
- [13] Gonzalez-Zulueta, M., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2001). Histochemical analysis of nitric oxide synthase by NADPH

- diaphorase staining. *Current protocols in toxicology*, 10. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx1006s01>
- [14] Halasy, K., Szőke, B., & Janzso, G. (2017). Fine structure and synaptology of the nitrergic neurons in medial septum of the rat brain. *Acta biologica Hungarica*, 68(1), 1-13. <https://doi.org/10.1556/018.68.2017.1.1>
- [15] Jonsson, S., Morud, J., Stomberg, R., Ericson, M., & Söderpalm, B. (2017). Involvement of lateral septum in alcohol's dopamine-elevating effect in the rat. *Addiction biology*, 22(1), 93-102. <https://doi.org/10.1111/adb.12297>
- [16] Kamii, H., Taoka, N., Minami, M., & Kaneda, K. (2017). Nitric oxide in the medial prefrontal cortex contributes to the acquisition of cocaine place preference and synaptic plasticity in the laterodorsal tegmental nucleus. *Neuroscience letters*, 660, 39-44. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.09.015>
- [17] Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(1), 217-238. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.110>
- [18] Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2016). Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The lancet. Psychiatry*, 3(8), 760-773. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8)
- [19] Maisky, V. A., Mankivska, O. P., Maznychenko, A. V., Vlasenko, O. V., Dovgan, O. V., Schomburg, E. D., & Steffens, H. (2016). NADPH-diaphorase reactivity and Fos-immunoreactivity within the ventral horn of the lumbar spinal cord of cats submitted to acute muscle inflammation induced by injection of carrageenan. *Acta histochemica*, 118(7), 659-664. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2016.09.005>
- [20] McGlinchey, E. M., & Aston-Jones, G. (2018). Dorsal Hippocampus Drives Context-Induced Cocaine Seeking via Inputs to Lateral Septum. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 43(5), 987-1000. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.144>
- [21] Mori, C., & Natsuki, R. (1996). Nihon yakurigaku zasshi. *Folia pharmacologica Japonica*, 107(4), 197-203. <https://doi.org/10.1254/fpj.107.197>
- [22] Nasif, F. J., Hu, X. T., Ramirez, O. A., & Perez, M. F. (2011). Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents alterations in medial prefrontal cortex excitability induced by repeated cocaine administration. *Psychopharmacology*, 218(2), 323-330. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2105-3>
- [23] Paxinos, G., & Watson, C. (2006). *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. Elsevier.
- [24] Picón-Pages, P., García-Buendía, J., & Muñoz, F. J. (2019). Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1865(8), 1949-1967.
- [25] Pokk, P., & Väli, M. (2002). Effects of nitric oxide synthase inhibitors 7-NI, L-NAME, and L-NOARG in staircase test. *Archives of medical research*, 33(3), 265-268. [https://doi.org/10.1016/s0188-4409\(02\)00365-x](https://doi.org/10.1016/s0188-4409(02)00365-x)
- [26] Pokk, P., Sepp, E., Vassiljev, V., & Väli, M. (2001). The effects of the nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole on the behaviour of mice after chronic ethanol administration. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 36(3), 193-198. <https://doi.org/10.1093/alcalc/36.3.193>
- [27] Rodrigo, J., Springall, D. R., Uttenthal, O., Bentura, M. L., Abadia-Molina, F., Riveros-Moreno, V., ... & Moncada, S. (1994). Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 345(1312), 175-221.
- [28] Ryabinin, A. E., Galvan-Rosas, A., Bachtell, R. K., & Risinger, F. O. (2003). High alcohol/sucrose consumption during dark circadian phase in C57BL/6J mice: involvement of hippocampus, lateral septum and urocortin-positive cells of the Edinger-Westphal nucleus. *Psychopharmacology*, 165(3), 296-305. <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1284-y>
- [29] Situmorang, J. H., Lin, H. H., Lo, H., & Lai, C. C. (2018). Role of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) at medulla in tachycardia induced by repeated administration of ethanol in conscious rats. *Journal of biomedical science*, 25(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0409-5>
- [30] Smith, A., Scofield, M. D., Heinsbroek, J. A., Gipson, C. D., Neuhofer, D., Roberts-Wolfe, D. J., ... & Kalivas, P. W. (2017). Accumbens nNOS Interneurons Regulate Cocaine Relapse. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 37(4), 742-756. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2673-16.2016>
- [31] Thériault, R. K., Leri, F., & Kalisch, B. (2018). The role of neuronal nitric oxide synthase in cocaine place preference and mu opioid receptor expression in the nucleus accumbens. *Psychopharmacology*, 235(9), 2675-2685. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-4961-1>
- [32] Trent, N. L., & Menard, J. L. (2010). The ventral hippocampus and the lateral septum work in tandem to regulate rats' open-arm exploration in the elevated plus-maze. *Physiology & behavior*, 101(1), 141-152. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.04.035>
- [33] Vilpoux, C., Warnault, V., Pierrefiche, O., Daoust, M., & Naassila, M. (2009). Ethanol-sensitive brain regions in rat and mouse: a cartographic review, using immediate early gene expression. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 33(6), 945-969. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2009.00916.x>
- [34] Vincent, S. R., & Kimura, H. (1992). Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*, 46(4), 755-784. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90184-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90184-4)
- [35] Vitcheva, V., Simeonova, R., Kondeva-Burdina, M., & Mitcheva, M. (2015). Selective Nitric Oxide Synthase Inhibitor 7-Nitroindazole Protects against Cocaine-Induced Oxidative Stress in Rat Brain. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015, 157876. <https://doi.org/10.1155/2015/157876>
- [36] Wirtshafter, H. S., & Wilson, M. A. (2020). Differences in reward biased spatial representations in the lateral septum and hippocampus. *eLife*, 9, e55252. <https://doi.org/10.7554/eLife.55252>
- [37] Wirtshafter, H. S., & Wilson, M. A. (2021). Lateral septum as a nexus for mood, motivation, and movement. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 126, 544-559. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.03.029>
- [38] Zima, T., Druga, R., & Stipek, S. (1998). The influence of chronic moderate ethanol administration on NADPH-diaphorase (nitric oxide synthase) activity in rat brain. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 33(4), 341-346. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.alcalc.a008402>

HISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF NITRERGIC NEURONAL SYSTEM DURING ACUTE ALCOHOL INTOXICATION AND NNOS BLOCKAGE IN THE RAT LATERAL SEPTUM

Chaikovska O. V., Dovhan O. V., Rokunets I. L., Nechiporuk V. M., Vlasenko O. V.

Annotation. Alcohol is a one of the most frequently consumed substances of abuse, which can cause addiction or alcohol use disorders (AUDs). Alcohol addiction leads to decrease of the life quality of patients and considerable economic burden. Neuronal mechanisms of addiction are intensively studied. One of the most important systems involved in this process is a brain reward system that includes lateral septum (LS). Additionally alcohol consumption changes activity of the neurotransmitter systems including the nitric oxide (NO). Recent studies for blockage of nitric oxide synthase (NOS) for cocaine addiction and late stages of AUDs

demonstrated that a group of the substances known as blockers of NOS can be referred to as candidates for alcohol addiction therapy. The aim of our research was to investigate histochemical characteristics of NO-system in LS, its response to acute alcohol intoxication including or excluding neuronal NOS (nNOS) blockage with selective inhibitor - 7-nitroindazole (7-NI). This study involved three experimental groups of animals (control group (n=4), group with acute alcohol intoxication (n=4), group of nNOS blockage with acute alcohol intoxication (n=4)). For statistical analysis, one-way Kruskal-Wallis test was implemented to reveal differences between groups (Matlab, Mathworks). We have identified NOS-positive structures in LS consisting of big neurons, medium/small neurons and nerve fibers. Acute alcohol intoxication activated subpopulations of NOS-positive medium/small neurons and nerve fibers. Moreover, we determined that ethanol-induced changes can be blocked with selective nNOS inhibitor 7-NI.

Keywords: NO-synthase, nitric oxide, lateral septum, ethanol, 7-NI.