

- after transient focal cerebral ischemia in rats // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2004. Vol. 24, No. 11. P. 1205–1213.
15. Yamamoto S., Golanov E.V., Berger S.B. et al. Inhibition of nitric oxide synthesis increases focal ischemic infarction in rat // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1992. Vol. 12, No. 5. P. 717–726.

Поступила в редакцию 05.02.2009.

ANGIOGENIC AND CYTOPROTECTING EFFECTS OF BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR IN FOCUS OF EXPERIMENTAL CEREBRAL ISCHEMIA

S.G. Kalinichenko¹, S.P. Schava², N.Yu. Matveeva³

¹ Vladivostok State University of Economics and Service (41 Gogolya St. Vladivostok 690990 Russia), ² Primorsky Regional Clinical Hospital No.1 (57 Aleutskaya St. Vladivostok 690950 Russia), ³ Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russia)

Summary — Male-rat experiments using right general carotid ligation included simulation of cerebral ischemia and intra-arterial introduction of basic Fibroblast Growth Factor (control — physiological solution) and showed that bFGF has enhanced NADPH-diaphorase activity and endothelial proliferation in vessels and pericytes of parietal cerebral cortex. These processes corresponded to thickening of microvessels and reached their maximum after 12 days from ischemia. The paper discusses interaction between bFGF-dependent and nitroxidergic mechanisms of post-ischemic cerebrovascular re-organization. The authors believe stimulation of angiogenesis and maintenance of neuron viability against the bFGF introduction were indicative of decreasing toxic effects of nitric oxide in the focus of ischemia.

Key words: brain, post-ischemic angiogenesis, vessel growth factors, nitric oxide.

Pacific Medical Journal, 2009, No. 2, p. 66–69.

УДК 611.8:612.824:577.152:546.172.6

А.Е. Коцюба, В.М. Черток

Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

НИТРОКСИДСОДЕРЖАЩИЕ ЭЛЕМЕНТЫ ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ИННЕРВАЦИИ АРТЕРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Ключевые слова: сосуды головного мозга, афферентная иннервация, нитроксидергические рецепторы, нитроксидергические нейроны.

С помощью гистохимической реакции на NADPH-диафору в эксперименте на белых крысах изучены структурные элементы афферентной иннервации артерий мягкой мозговой оболочки, а также нейроны нижнего яремного узла и ядра одиночного пути. В сосудах установлено наличие трех типов рецепторов и афферентных волокон — с высокой, умеренной и низкой активностью нитроксидсинтазы, а в нижнем яремном узле и ядре одиночного пути выделены нейроны (17,4 и 24,5% соответственно) с положительной реакцией на NADPH-диафору.

В нервной регуляции церебральной гемодинамики важное место отводится афферентной иннервации артерий головного мозга [2, 8]. Долгое время считалось, что рецепцию и проведение возбуждения к нервным центрам обеспечивает ацетилхолин, а холинергический механизм является едва ли не единственным участником этих процессов [3]. Затем список веществ, включенных в механизмы восприятия и проведения нервного импульса, значительно расширился. В него попали некоторые кинины, аминокислоты, другие биологически активные вещества (брадикинин, адениновые нуклеотиды, аспарат, глутамат), а не так давно — оксид азота [4, 13, 14].

Известно, что в большинстве случаев оксид азота выступает в качестве нейротрансмиттера, опосредуя активность нитроксидергических нейронов. Центральные отростки этих нейронов участвуют в образовании эфферентных сплетений, иннервирующих сосудистую и внесосудистую гладкую мускулатуру сердца, пищеварительной системы, дыхательных путей [4,

5]. В отношении афферентной функции оксида азота сведения ограничиваются сообщениями о наличии этого вещества в инкапсулированных рецепторах сердца [5], нейронах некоторых чувствительных нервных узлов и ядер головного мозга [1, 7].

Целью работы явился анализ распределения нитроксидсинтазы (NOS) в рецепторах и чувствительных нервных волокнах артерий головного мозга, а также в нейронах нижнего яремного узла и одиночного ядра.

Материал и методы. Работа выполнена на 26 белых беспородных крысах массой 180–200 г, содержащихся в условиях лабораторного вивария на стандартном рационе. Животные выводились из опыта путем декапитации под эфирным наркозом с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.). Для выявления нитроинадениндинуклеотидфосфат-диафоразы (NADPH-диафоразы) образцы тканей обрабатывали по методу V. Норе и S. Vinsent [10].

С целью детекции афферентной иннервации сосудов использовали фрагменты отпрепарированной и расплавленной на стекле мягкой оболочки теменной доли мозга, а для изучения чувствительных нейронов — нижний яремный узел и кусочки ткани, взятые из продолговатого мозга в проекции одиночного ядра. Из последних изготавливали криостатные срезы толщиной 30 мкм. Образцы инкубировали 1 час при 37°C в среде, содержащей 0,5 мМ β-НАДФН, 0,5 мМ нитросинего тетразолия и 0,3% тритона Ч-100 в 0,15 М трис-НСL-буфере (рН 8,0). После инкубации срезы промывали в дистиллированной воде, обезжизняли в спиртах и заключали в канадский бальзам.

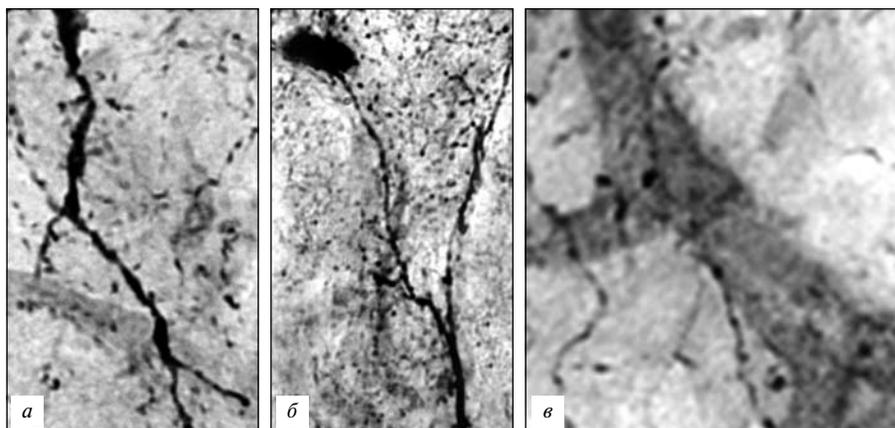


Рис. 1. Рецепторный аппарат артерий головного мозга.

а – кустиковидный рецептор; *б*, *в* – клубочковые нервные окончания. Метод Hope и Vinsent; *а*, *б* – $\times 400$, *в* – $\times 100$.

Контрольные препараты помещали в среду с добавлением ингибитора NOS – N^{ω} -нитро-L-аргинина (10 мМ). Активность фермента идентифицировалась по наличию продукта реакции, который в зависимости от плотности выпавшего осадка окрашивал структуры в различные оттенки синего цвета – от светло-голубого до фиолетового. Специфичность гистохимической реакции проверялась инкубацией нескольких срезов в растворах, не содержащих нитросинего тетразолия или NADPH, а также в растворе, содержащем NADP вместо NADPH. Поскольку химическая основа реакции заключается в образовании преципитата формазана при восстановлении солей тетразолия в присутствии NADPH-диафоразы, то гистохимическая реакция не должна наблюдаться в случае отсутствия в инкубационной среде любого из основных ее компонентов.

Исследование нейронов в нервном узле и ядре одиночного пути проводили в соответствии с алгоритмом, описанным нами ранее [9]. Долю NO-нейронов от общего количества клеток в ядре устанавливали в сериях из 6–10 срезов. При этом один срез окрашивали по Нисслю, а параллельный – по V. Hope и S. Vinsent. При статистической обработке результатов для оценки значимости цифровых данных использовали *t*-критерий Стьюдента.

В работе применялись реактивы: тритон X-100 (Serva, Германия), трис-буфер, p-NADPH, нитро-СТ и парафенилендиамин (Sigma, США), кедровый бальзам, метиленовый синий («Биовитрум», Россия).

Результаты исследования. В стенке сосудов постоянно определялись рецепторы, отличавшиеся строением и активностью NOS. На артериях диаметром больше 60 мкм наблюдались просто устроенные древовидные арборизации, которые с уменьшением калибра сосудов до 50–30 мкм замещались компактными и диффузными кустиковидными рецепторами, сменявшимися, в свою очередь, клубочковыми нервными окончаниями (рис. 1, а–в). Древовидные и кустиковидные рецепторы в стенке артерий и оболочке мозга обычно обладали низкой или,

же, умеренной активностью NOS. Клубочковые рецепторы с большим постоянством выявлялись как в оболочке, так и в стенке пиальных артерий диаметром около 30 мкм. Клубочки имели величину от 10 до 20 мкм и располагались по ходу сосудистого русла очень неравномерно: у мест деления и у начала вновь образованных ветвей отмечалась их высокая концентрация (до 20 на 1 мм²), на других участках встречались лишь единичные нервные терминалы. Такие рецепторы формировались из ветвей одного, двух или трех нервных волокон различного диаметра. Среди последних можно выделить тонкие афференты с поперечником меньше 4 мкм, отличавшиеся невысокой активностью фермента, средние (4–7 мкм) с умеренной активностью и толстые (7–9 мкм) с высокой активностью энзима.

Среди клубочковых рецепторов по величине, форме и концентрации терминальных волокон можно выделить несколько типов. I тип представлен шаровидными и близкими к ним по форме клубочками размерами около 20 мкм с высокой концентрацией тонких терминалей, образующих густую сеть с интенсивным отложением продукта реакции (рис. 1, б). II тип формировали компактные клубочки размером 10–15 мкм с умеренным числом терминальных волокон, обладавших умеренной активностью NOS (рис. 1, в). III тип нервных окончаний выглядел как рыхлый клубочек, вытянутый в длину, размером 15–20 мкм, с низкой концентрацией тонких волокон и активностью фермента; на терминалях здесь имелись относительно крупные веретеновидные утолщения. В большинстве рецепторов по ходу волокон также определялись мелкие веретеновидные утолщения, в которых плотность отложения продукта реакции возрастала.

Протонейроны нижнего яремного узла, содержавшие NOS, были представлены одиночными, редко расположенными клетками округлой или овальной формы, большинство из которых имели низкую и умеренную диафоразную активность и окрашивались в голубой цвет. Реже наблюдались группы из 3–4

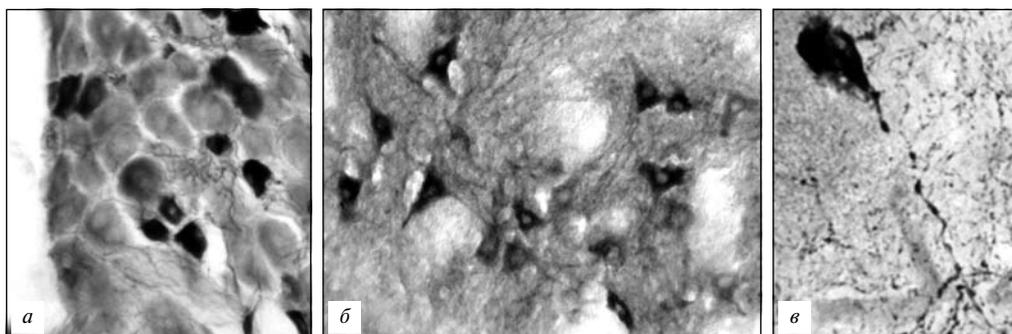


Рис. 2. Распределение NOS в нервных структурах.

a – протонейроны нижнего яремного узла; *б, в* – нейроны одиночного ядра продолговатого мозга. Метод Норе и Vinsent; *a, б* – $\times 100$, *в* – $\times 400$.

нитроксидазических нейронов фиолетового цвета с более массивным отложением продукта реакции (рис. 2, а). Нервные клетки с высокой и умеренной активностью энзима чаще встречались на периферии узла, где они располагались в непосредственной близости от капсулы. Доля нитроксидазических нейронов в узле колебалась от 12,3 до 23,4% (в среднем $17,4 \pm 2,4\%$).

В одиночном ядре нейроны имели полигональную, овальную или веретеновидную форму и размеры от 9 до 30 мкм. В этом ядре было выше и содержание нитроксидазических нейронов, и активность в них фермента (рис. 2, б). В отличие от яремного узла здесь определялись немногочисленные клетки, обладавшие высокой активностью фермента. Доля нитроксидазических нейронов в ядре составляла от 19,3 до 39,4% (в среднем $24,4 \pm 5,5\%$). В области ядра маркировались также отростки нейронов, капилляры, иногда глиальные клетки. Окраска распространялась на дендриты клеток, где продукт гистохимической реакции откладывался в виде обособленных гранул, обладавших высокой активностью энзима, придавая отросткам неравномерно-прерывистый вид (рис. 2, в).

Обсуждение полученных данных. С введением в практику научных исследований гистохимических методов детекции медиаторов нервного импульса сделан большой шаг вперед в функциональной паспортизации сосудодвигательных волокон. Подтвержден факт нейрохимической гетерогенности вазомоторных нервных проводников, что во многом способствовало развитию представлений об их динамическом взаимодействии в процессе жизнедеятельности организма [2, 3, 8]. Вместе с тем изучение чувствительной иннервации с помощью современных методов морфологического анализа не получило должного отражения в научной литературе. Данные, свидетельствующие об участии биологически активных веществ в рецепции или передаче афферентного импульса от сосудов к нервным центрам, ограничиваются единичными сообщениями [7, 11]. В них авторы отмечают наличие в стенке артерий рецепторов, терминальные волокна которых содержат ферментсинтезирующие системы ацетилхолина, L-аспартата, глутамата и некоторых

других веществ, которые могут выполнять одновременно и трансмиссивные функции.

Не так давно в этой связи стал упоминаться и другой молекулярный регулятор, синтезируемый в нервной ткани, – оксид азота, имеющий широкое представительство как в центральной, так и в периферической нервной системе [4, 6]. Он обнаружен в интрамуральных ганглиях, преганглионарных парасимпатических и постганглионарных симпатических волокнах [1, 5]. Также было установлено, что оксид азота способен синтезироваться в рецепторном аппарате сердца [5]. Эта комплексная окислительная реакция катализируется NOS, которая морфологически определяется по восстановлению нитросинего тетразолия в диформаза. Плотность образуемого осадка служит показателем активности в клетках NOS [14]. С помощью этого метода нами выявлены рецепторы, обладающие различной степенью активности фермента, которые с большим постоянством определяются в стенке сосудов и мягкой оболочке мозга. На более крупных артериях чаще наблюдаются просто устроенные древовидные арборизации, которые с уменьшением калибра сосудов замещаются кустиковидными рецепторами, сменяющимися, в свою очередь, клубочковыми нервными окончаниями. Клубочковым рецепторам присущи разная величина, форма, концентрация терминальных волокон и активность фермента. Тем не менее основная масса этих рецепторов имеют характерные признаки, по которым можно выделить по крайней мере три типа, отличающихся как плотностью терминальных волокон, так и активностью NOS.

В эксперименте установлено, что клубочковые структуры, являясь типичными барорецепторами, реагируют на изменения кровяного давления, сигнализируют о тоне и сократительной деятельности сосудов, о количестве протекающей по ним крови, создавая необходимые предпосылки для обеспечения нормальной работы нейронов головного мозга [12]. И хотя о нитроксидазических механизмах рецепции и проведения возбуждения к вышележащим центрам известно немного, предполагается, что они универсальны как в центральной, так и в периферической нервной системе [11, 13]. Оксид азота выделяется под

влиянием некоторых нейротрансмиттеров (ацетилхолин, гистамин, глутамат и др.), из которых наибольшее значение придается глутамату [7]. Механизм их действия сходен и состоит в следующем: ионы кальция под влиянием нейротрансмиттера входят в клетку, где связываются в единый комплекс с кальмодулином в цитозоле. Комплекс «кальций–кальмодулин» выступает как кофактор и активирует NOS. Под влиянием ингредиентной NOS образуются очень малые количества оксида азота, который осуществляет, главным образом, местную регуляцию. Оксид азота активирует клеточный фермент гуанилатциклазу, что приводит к образованию циклического гуанозина монофосфата, который и опосредует все эффекты оксида азота [5, 6]. В основе многостороннего участия эндогенного NO в функциях нервной системы лежит сложная пространственная организация трех NOS (нейрональной, индуцибельной, эндотелиальной), возможности которых в сотни раз различаются концентрациями вырабатываемого газа [6]. Будучи липофильной молекулой, оксид азота легко диффундирует через клеточные мембраны и проникает в соседние клетки.

По восходящим путям от сосудистых рецепторов сигнал достигает нервных центров, воспринимающих афферентные импульсы от баро- и хеморецепторов артерий. Как показали наши наблюдения, нитроксидергические нейроны в нижнем яремном узле и одиночном ядре встречаются постоянно, хотя и обладают преимущественно невысокой активностью NOS. Их доля относительно небольшая и составляет около 17% в нижнем яремном узле и 24% – в одиночном ядре. В большем количестве NO-нейроны описаны в некоторых сенсорных центрах головного мозга: гиппокампальной формации, латеральном ядре гипоталамуса, обонятельных луковицах [6]. Однако поскольку в этих работах контроль специфичности реакции не проводился, велика вероятность того, что в число нитроксидергических попали нейроны с неспецифическим отложением продукта реакции.

Результаты электронно-гистохимических исследований с использованием антител, конъюгированных с частицами коллоидного золота различного диаметра, позволили уточнить локализацию NOS в нейронах [15]. Преципитат откладывается в перикарионе на внутриклеточных мембранах саркоплазматической сети, по всей длине дендрита, включая его терминальные отделы, что свидетельствует о возможности синтеза оксида азота в чувствительных окончаниях при получении локального сигнала. Быстрая инактивация этой молекулы (время полужизни составляет около 5 с) и ограниченная зона воздействия (около 100 мкм) [4, 6, 14] создают необходимые предпосылки для эффективного использования оксида азота в афферентном аппарате сосудов.

Литература

1. Андреева Н.А., Шуматова Т.А., Мотавкин П.А. Нитроксидергические нейроны органов дыхания // *Бюл. эксперимент. биол. и мед.* 2000. Т. 129, № 2. С. 222–224.
2. Мотавкин П.А., Черток В.М. Гистофизиология сосудистых механизмов мозгового кровообращения. М.: Медицина, 1980. 200 с.
3. Мотавкин П.А., Черток В.М., Пиголкин Ю.И. Морфологические исследования регуляторных механизмов внутри мозгового кровообращения // *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии.* 1982. Т. 82, № 6. С. 42–49.
4. Охотин В.Е., Куприянов В.В. Нейровазальные отношения в новой коре головного мозга человека // *Морфология.* 1996. Т. 110, № 4. С. 17–22.
5. Охотин В.Е., Шуклин А.В. Значение нейрональной, эндотелиальной и индуцибельной изоформ NO-синтаз в гистофизиологии сердечной мышцы // *Морфология.* 2006. Т. 129, № 1. С. 7–17.
6. Сосунов А.А. Оксид азота как межклеточный посредник // *Соровский образовательный журн.* 2000. Т.6, № 12. С. 27–34.
7. Цырлин В.А. Бульбарный вазомоторный центр – морфофункциональная и нейрохимическая организация // *Артериальная гипертензия.* 2003. Т. 9, № 3. С. 77–81.
8. Черток В.М., Пиголкин Ю.И. Иннервация пиллярных артерий разного диаметра человека при атеросклерозе // *Журнал невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 1990. Т. 90, № 12. С. 43–46.
9. Chertok V.M., Kotsyuba A.E., Babich E.V. Nitroxidergic Neurons in Nuclei of Rat and Human Medulla Oblongata // *Cell and Tissue Biol.* 2009. No. 4. P. 56–64.
10. Hope B.T., Vincent S.R. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase // *J. Neurochem. Cytochem.* 1989. Vol. 37. P. 653–661.
11. Kaushik P.P., Yi-Fan L., Yoshitaka H. Role of nitric oxide in central sympathetic outflow // *Experimental Biology and Medicine.* 2001. Vol. 226. P. 814–824.
12. Motavkin P.A., Lomakin A.V., Pigolkin Y.I., Chertok V.M. Receptor glomeruli and their ultrastructural organization in the arteries and pia mater of the human brain and spinal cord // *Neuroscience and Behavioral Physiology.* 1990. Vol. 20, No. 5. P. 471–475.
13. Toda N., Okamura T. The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels // *Pharmacol. Rev.* 2003. Vol. 55. P. 271–324.
14. Vincent S.R. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system // *Progr. Neurobiology.* 1994. Vol. 42. P. 129–160.
15. Xu K.Y., Huso D.L., Dawson et al. Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. Vol. 96. № 2. P. 657–662.

Поступила в редакцию 22.04.2009.

NITRIC OXIDE-CONTAINING ELEMENTS OF NEUROSENSORY BRAIN ARTERIES

A.E. Kotsyuba, V.M. Chertok

Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russia)

Summary – Histochemical NADPH-diaphorase reaction during white rat experiments allowed to research into structural elements of afferent innervation of the pia mater arteries and neurons of lower jugular node and solitary tract nucleus and discover three types of receptors and afferent fibres characterized by high, moderate and low activity of nitric oxide synthase and neurons (17.4 и 24.5%, respectively) with positive NADPH diaphorase reaction – in the lower jugular node.

Key words: brain vessels, afferent innervation, NO-ergic receptors, NO-ergic neurons.

Pacific Medical Journal, 2009, No. 2, p. 69–72.