

Литература

1. Васильева Т.Г., Шишацкая С.Н., Ни А.Н. Некоторые аспекты поражения органов дыхания и желудочно-кишечного тракта при муковисцидозе у детей // Вопросы современной педиатрии. 2013. Т. 12, № 1. С. 162–165.
2. Вахмянина Н.В. Целиакия и метаболические нарушения // Клинико-лабораторный консилиум. 2011. № 1. С. 15–19.
3. Капранов Н.И. Современная диагностика, терапия и социальная адаптация больных муковисцидозом в Российской Федерации // Педиатрия. 2014. Т. 93, № 4. С. 6–10.
4. Муковисцидоз / под ред. Н.И. Капранова и Н.Ю. Каширской. М.: Медпрактика-М, 2014. 671 с.
5. Подольная М.А., Кобринский Б.А. Показатели и методика расчета эпидемиологических характеристик риска // Рос. вестник перинат. и педиатр. 2000. № 6. С. 52–54.
6. Полуни В.С., Нестеренко Е.И., Попов В.А. [и др.] Медико-социальные факторы риска возникновения пороков развития спинного мозга // Рос. мед. журн. 2006. № 1. С. 1.
7. Татьяна О.Ф., Потапов А.С., Намазова Л.С. [и др.] Фекальный кальпротектин – маркер кишечного воспаления при заболеваниях кишечника у детей // Педиатрическая фармакология. 2008. Т. 5, № 3. С. 13–19.
8. Чубарова А.И., Мухина Ю.Г., Кургашева Е.К. [и др.] Определение концентрации водорода в выдыхаемом воздухе у детей с лактазной недостаточностью // Вопр. дет. диетологии. 2009. Т. 7, № 4. С. 10–15.
9. Шуматова Т.А., Приходченко Н.Г. Оценка эффективности диетотерапии у детей первого года жизни // Рос. вестн. перинат. и педиатр. 2014. № 5. С. 82–86.
10. Шуматова Т.А., Приходченко Н.Г., Ефремова И.В. [и др.] Клинико-лабораторный анализ энтеральной нутритивной поддержки детей с тяжелыми формами нарушения кишечного всасывания // Тихоокеанский медицинский журнал. 2013. № 1. С. 38–41.
11. Gonsalves N. Food allergies and eosinophilic gastrointestinal illness // Gastroenterol. Clin. N. Am. 2007. No. 36. P. 75–91.
12. Yurdagül Z., Eckhart G.H., Martin R. The differential diagnosis of food intolerance // Dtsch. Arztebl. Int. 2009. Vol. 106, No. 21. P. 359–370.
13. Olds L.C., Sibley E. Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity *in vitro*: functional role as a cis regulatory element // Hum. Molec. Genet. 2003. No. 12. P. 2333–2340.
14. Sicherer S.H. Clinical aspects of gastrointestinal allergy in childhood // Pediatrics. 2003. No. 111. P. 1609–1616.
15. Swallow D.M. Genetics of lactase intolerance // Ann. Rev. Genet. 2003. No. 37. P. 197–219.

Поступила в редакцию 08.02.2015.

Некоторые аспекты организации медицинской помощи детям с пищевой непереносимостью

Т.Г. Васильева^{1,2}, Т.А. Шуматова¹, А. Ни¹, Л.А. Григорян¹, С.В. Воронин²

¹ Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2), ² Краевой клинический центр специализированных видов медицинской помощи (690091, г. Владивосток, ул. Уборевича, 30/37)

Резюме. Изучены неблагоприятные факторы онтогенеза, проведен расчет коэффициентов относительного и атрибутивного рисков формирования пищевой непереносимости (ПН) у 50 детей в возрасте от 10 до 15 лет. Получены предварительные данные о частоте полиморфизмов гена МСМ6 у 10 детей с лактазной недостаточностью. Проведено исследование иммунореактивного трипсина в крови 24305 новорожденных. К высокому уровню атрибутивного риска были отнесены 11,4% изученных показателей. Частота генотипов гена МСМ6: СС, ТТ (по 30%) и СТ (40%). Высокое содержание иммунореактивного трипсина выявлено у 1,37% новорожденных, положительный ре-тест – у 0,18%.

Ключевые слова: факторы риска пищевой непереносимости, генетические маркеры, лактазная недостаточность, муковисцидоз.

УДК 611.818/611.82:612.127

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГАЗОТРАНСМИТТЕРНЫХ НЕЙРОНОВ В МОЗГЕ

М.С. Старцева, А.Е. Коцюба, В.М. Черток

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

Ключевые слова: оксид азота, монооксид углерода, сероводород, ядра каудальной части ствола мозга.

THE SPATIAL ORGANIZATION OF GAS-TRANSMITRAL NEURONS IN THE BRAIN

M.S. Startseva, A.E. Kotsuba, V.M. Chertok

Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690950 Russian Federation)

Background. The research objective is an analysis of spatial relations of gas-transmitral neurons in the caudal portion of the brain stem of rats.

Methods. The study was performed on 12 adult male rats Wistar weighing 200–240g. Immunopositive neurons groups were studied with immunohistochemical methods for nitric oxide synthase, heme oxygenase-2, and cystathionine β-synthase in the projection of the nucleus of the solitary tract, small-cell and gi-ant cell reticular nucleus.

Results. Dimensions, share and concentration of NO-, CO- and H₂S- of immunopositive neurons as well as their distribution in each of the investigated nuclei are exceptionally unique. Most of these cells were located in close proximity to each other, forming more or less distinct clusters of neurons of different mediator specificity.

Conclusions. In the organization of vasomotor nuclei there are structural conditions for cooperation NO-, CO- and H₂S- of immunopositive neurons and their integration into functional nerve centers of the brain that enhances the management of complex processes in the body.

Keywords: nitric oxide, carbon monoxide, hydrogen sulfide, caudal nucleus of the brain stem.

Pacific Medical Journal, 2015, No. 2, p. 39–43.

Оксид азота, оксид углерода и сероводород составляют семейство биологически активных газов, так называемый «газообразный триумвират», осуществляющий в мозге, прежде всего, сигнальную функцию [12, 15]. В ряде работ подробно описаны биологические эффекты и механизмы действия каждой из указанных молекул как на уровне структурных образований мозга, где происходит их синтез, так и органов-мишеней, чаще всего сосудов [3, 4, 9, 13, 14]. Не так давно появились сообщения,

Черток Виктор Михайлович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной анатомии ТГМУ; e-mail: chertokv@mail.ru

что функции нейронов контролируются не каждым газом в отдельности, а при их активном взаимодействии [10, 12]. Однако на фоне многочисленных доказательств тесных структурных отношений газотрансмиттерных нейронов с клетками, участвующими в обмене классических нейромедиаторов в мозге [2, 6, 7], материалов о взаимоотношениях NO-, CO- и H₂S-иммунопозитивных нейронов между собой мы не встретили.

Целью настоящей работы стал анализ пространственных отношений газотрансмиттерных нейронов в каудальной части ствола мозга крыс.

Материал и методы. Исследование выполнено на 12 половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 200–240 г, содержащихся на стандартном рационе в условиях лабораторного вивария Института биологии моря ДВО РАН. Животных выводили из эксперимента передозировкой 3 % раствора тиопентала натрия, затем продолговатый мозг фиксировали 4 часа при 4 °C в 4 % растворе параформальдегида, приготовленном на 0,1М натрийфосфатном буфере (pH 7,4), пропитывали холодным 30 % раствором сахарозы на 0,1М фосфатном буфере и готовили серийные криостатные срезы толщиной 30 мкм. Экспериментальные манипуляции проводили в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.).

Иммуногистохимическое исследование выполняли с применением антисыворотки против нейрональной формы синтазы окиси азота, которая в физиологических условиях является морфологическим маркером оксида азота в нервных клетках, цистатионин β-синтазы – маркера сероводорода, гемоксигеназы-2 – маркера монооксида углерода. Для этого срезы последовательно инкубировали:

- 1) с 1 % нормальной сывороткой лошади в течение 1 часа при комнатной температуре,
- 2) с кроличьими поликлональными антителами против нейрональной нитрооксидсинтазы (Cayman, США) в разведении 1:100 или против цистатионин β-синтазы (Abscam, Великобритания) в разведении 1:1000, а также против гемоксигеназы-2 (Abscam) в разведении 1:1000 при температуре 4 °C в течение 18 часов,
- 3) с биотинилированными антителами козы 1:100 (Vector Labs, США) 2 часа при комнатной температуре,

4) с авидин-пероксидазным комплексом (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Labs, США) 1 час при комнатной температуре в темноте.

Для выявления продуктов реакции срезы инкубировали с субстратом для обнаружения пероксидазы (VIP Substrate Kit, Vector Labs, США) под контролем микроскопа. Затем срезы промывали, обезживали по стандартной методике и заключали в бальзам. Для оценки специфичности реакции проводили обработку срезов без первичных или вторичных антител.

В проекции ядра одиночного (солитарного) пути (ЯСТ), ретикулярных мелкоклеточного и гигантоклеточного ядер (РМЯ и РГЯ), используя метод компьютерного совмещения изображений [7], определяли точное местоположение NO-, CO- и H₂S-иммунопозитивных нейронов. Ядра ориентировали по характерным признакам в сагиттальной и фронтальной плоскостях, а их местоположение и границы уточняли на препаратах, окрашенных метиленовым синим. Препараты просматривали под микроскопом Axiovert 200M. Подсчет числа и определение размеров нейронов производили на монтажах срезов, сформированных программой AxioVision 4.8. Учитывали только те клетки, которые имели отчетливо видимое ядро. В центральной части ядер продолговатого мозга вычисляли среднюю площадь профильного поля нейронов, их общее количество при окраске препаратов метиленовым синим, долю от них, приходящуюся отдельно на NO-, H₂S- и CO-иммунопозитивные нейроны, и концентрацию (относительную плотность) клеток из расчета на 1 мм².

Количественную обработку материала проводили с использованием пакета компьютерных программ АСАИ Allegro-МС. Полученные данные представляли в виде среднего значения и стандартной ошибки средней, полученных при обработке соответствующих образцов каждого животного. Для оценки значимости различий применяли t-критерий Стьюдента.

Результаты исследования. Во всех изученных ядрах продолговатого мозга определялись NO-, CO- и H₂S-иммунопозитивные нейроны (рис. 1, а–в). Преобладали клетки полигональной, треугольной и веретенновидной формы, имевшие разный уровень интенсивности реакции. Площадь большинства NO-иммунопозитивных нейронов колебалась от 280 до 420 мкм². Экспрессия

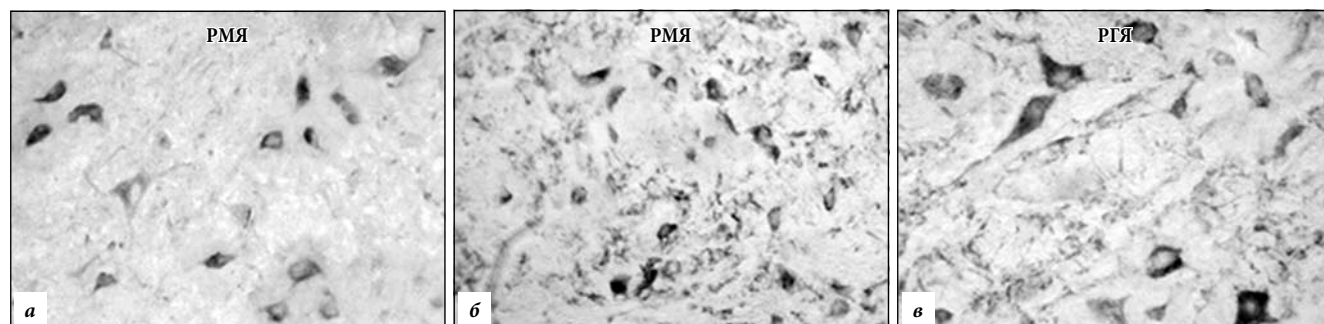


Рис. 1. Нейроны ядер ствола мозга крысы с экспрессией:

а – нитрооксидсинтазы, б – гемоксигеназы-2, в – цистатионин β-синтазы. Иммуногистохимия, ×100.

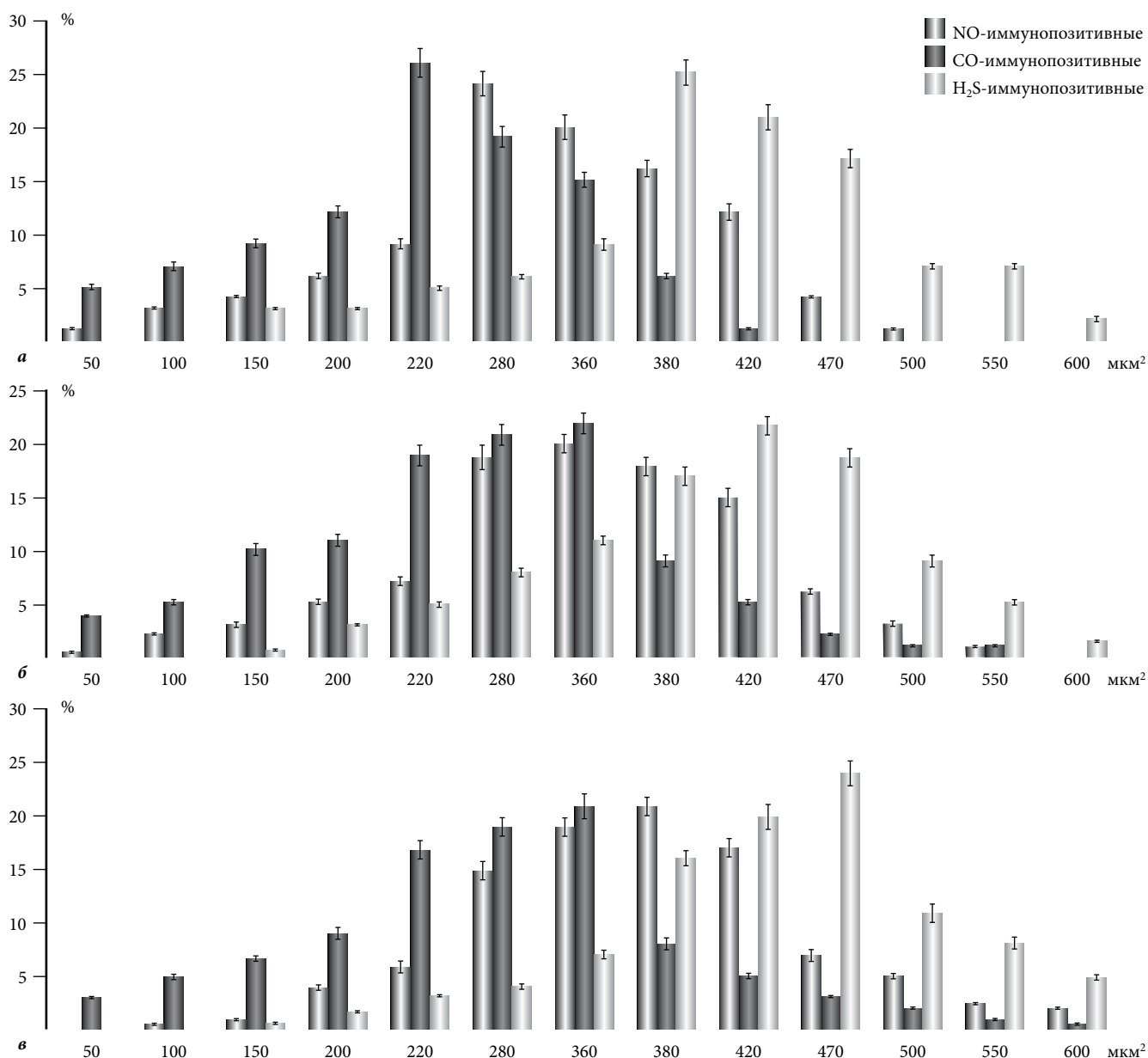


Рис. 2. Распределение NO-, CO- и H₂S-иммунопозитивных нейронов различных размеров в ЯСТ (а), РМЯ (б), РГЯ (в).

цистатинин β-синтазы наблюдалась обычно в более крупных клетках – их размеры варьировали от 380 до 470 мкм², а экспрессия гемоксигеназы-2 – в мелких: 220–360 мкм² (рис. 2, а–в). В ЯСТ и РМЯ чаще встречались группы мелких клеток соответствующей медиаторной принадлежности, чем в РГЯ, поэтому средние значения площади иммунопозитивных нейронов в нем было значимо выше, чем в двух других ядрах, между которыми показатели значимо не различались (рис. 3, а).

Доля газотрансмиттерных нейронов, экспрессирующих каждый из указанных выше ферментов, в значительной степени зависела от исследуемого ядра (рис. 3, б). NO-иммунопозитивные нейроны одинаково часто встречались в РМЯ и РГЯ, но почти вдвое реже – в ЯСТ. Доля CO-иммунопозитивных нейронов в ЯСТ оказалась в 2,5 раза выше, чем в РМЯ, а в последнем величина этого показателя была почти в 4 раза больше, чем в РГЯ. Доля H₂S-иммунопозитивных нейронов

в РГЯ вдвое превосходила соответствующие значения в РМЯ и в 4,5 раза – в ЯСТ.

Иная зависимость установлена при вычислении относительной плотности клеток, значения которой связаны не только с их количеством, но и размером (рис. 3, в). В РМЯ выявлялись объемные компактные группы небольших по размеру NO- и CO-позитивных нейронов, поэтому их концентрация здесь была выше, чем в двух других ядрах, где были представлены крупные клетки, неформировавшие плотных скоплений. H₂S-иммунопозитивные нейроны, которые, как указывалось, имели самые большие размеры среди других газотрансмиттерных клеток, чаще всего встречаются в РГЯ, но значения их концентрации во многом соответствовали цифрам, установленным в ЯСТ, где они регистрировались реже, но имели меньшие размеры (рис. 2, в). Относительная плотность H₂S-иммунопозитивных нейронов в РМЯ, оказалась наименьшей.

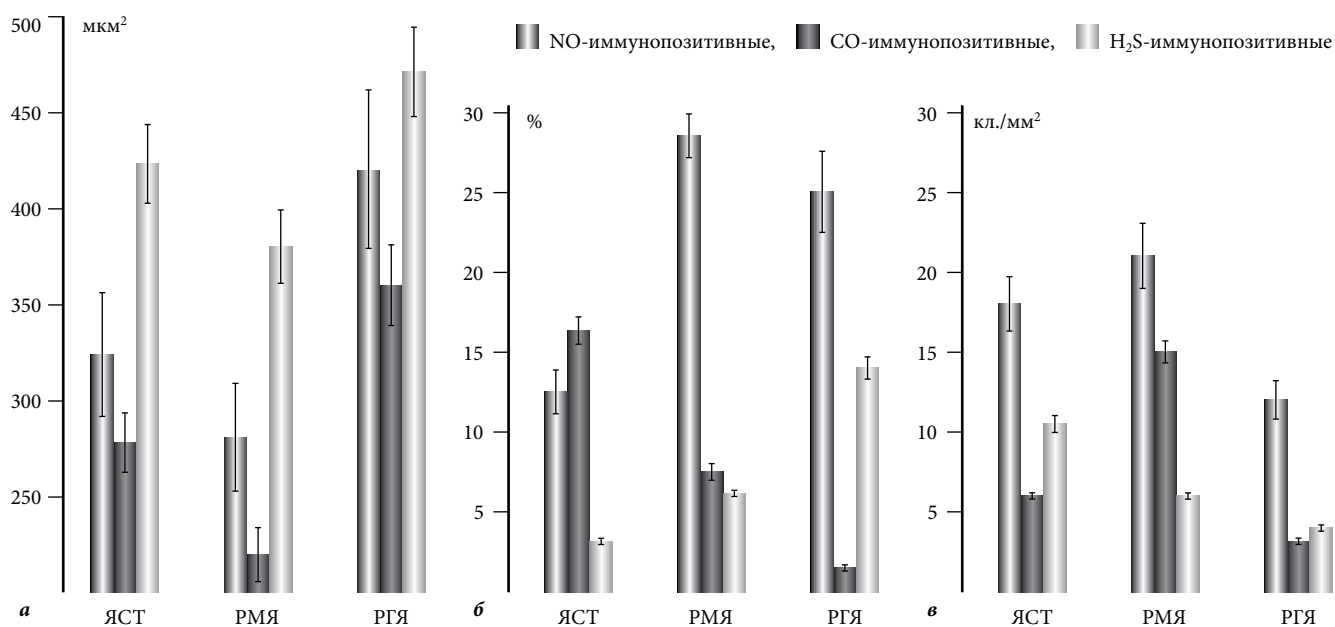


Рис. 3. Средние площадь (а), доля (б) и концентрация (в) NO-, CO- и H₂S-иммунопозитивных нейронов в ядрах ствола мозга.

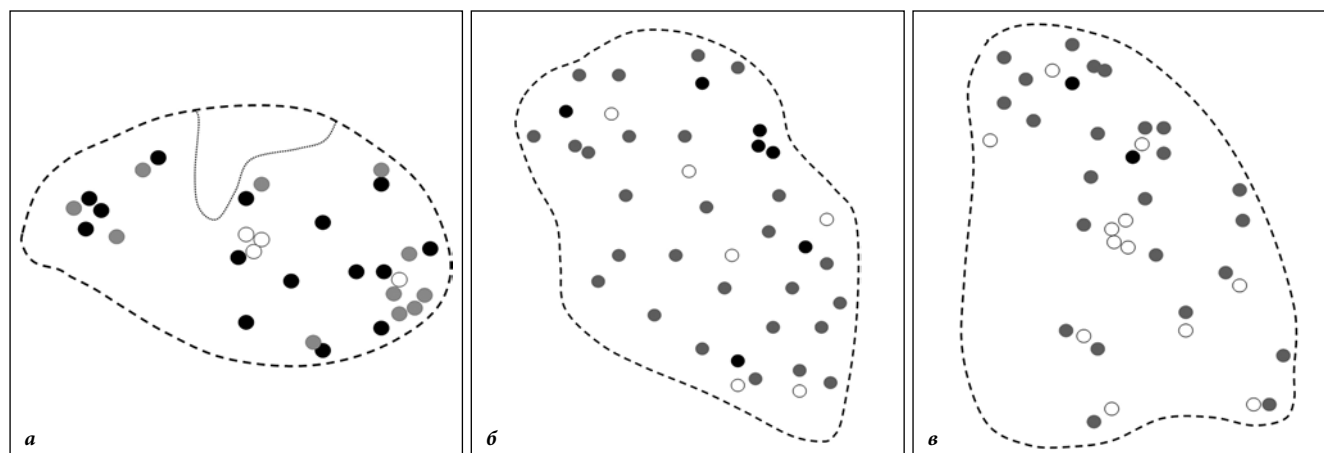


Рис. 4. Пространственная организация газотрансмиттерных нейронов в центральной части ЯСТ (а), РМЯ (б) и РГЯ (в):

● NO-иммунопозитивные, ● CO-иммунопозитивные, ○ H₂S-иммунопозитивные.

В проекции ЯСТ NO-иммунопозитивные нейроны лежали одиночно или формировали небольшие группы, лучше выраженные в вентролатеральной области центральной части ядра, в РМЯ располагались относительно равномерно, а в РГЯ – наиболее объемные скопления этих клеток выявлялись в его дорсомедиальной области (рис. 4). Большинство H₂S- и CO-иммунопозитивных нейронов находились в тех же участках ядра, что и NO-иммунопозитивные нейроны. Однако H₂S-иммунопозитивные клетки в ЯСТ и РГЯ формировали скопления и в центральной области, а в РМЯ относительно плотные группы CO-иммунопозитивных нейронов находились в латеральной области, т.е. там, где клетки с экспрессией нейрональной нитрооксидсинтазы встречались редко.

Обсуждение полученных данных. В последние годы появляется все больше доказательств, что сигнальная функция нейронов в мозге контролируется не каждым газотрансмиттером в отдельности, а при активном взаимодействии этих веществ [10, 12]. Все они могут

активировать К-каналы высокой проводимости, а их внутриклеточное действие сопряжено с химической модификацией белков-мишеней. Все газообразные посредники участвуют в развитии мозга, облегчают индукцию долговременной потенциации в гиппокампе, оказывают вазорелаксирующее действие [1, 3, 13, 14].

Ранее отмечалось, что подавляющее число медиаторноспецифических нейронов сконцентрировано в центральной части ядер ствола мозга [2, 5, 11]. Однако данные о пространственных отношениях между NO-, CO- и H₂S-иммунопозитивными нейронами в этой части ядер отсутствуют. Как показали наши наблюдения, размеры, доля и концентрация NO-, CO- и H₂S-иммунопозитивных нейронов, а также их распределение в каждом из исследованных ядер отличаются исключительным своеобразием. Большинство выявленных здесь клеток располагается в непосредственной близости друг от друга, образуя более или менее выраженные скопления нейронов различной медиаторной специфичности. Однако, нередко примеры, когда

NO- и СО-иммунопозитивные нейроны формируют объемные кластеры и в тех областях ядра, где нейроны с экспрессией цистатионин β -синтазы отсутствуют или наблюдаются в ограниченном количестве.

В связи с этим отметим, что, несмотря на определенную схожесть функций и общность периферических эффектов газообразных посредников, в нейрональной трансдукции часто наблюдаются «параллельные» эффекты оксида азота и оксида углерода, тогда как сероводород в ряде случаев подавляет активность этих газов [5, 10, 15]. Различны и механизмы действия оксида азота и сероводорода. Эффекты первого опосредуются через растворимую форму гуанилатциклазы и модуляцию K_{Ca} -каналов, эффекты второго – через гиперполяризацию, которая обеспечивается активностью K_{ATP} -каналов [14]. Кроме того, оксид азота и монооксид углерода осуществляют свое действие на пресинаптическом уровне, усиливая секрецию глутамата, в то время как сероводород меняет активность постсинаптических НМДА-рецепторов [8, 10]. Впрочем, при определенных условиях оксид азота тормозит высвобождение монооксида углерода из нейронов [13]. Оксид азота и монооксид углерода также могут подавлять активность цистатионин β -синтазы, вызывая снижение концентрации сероводорода в клетках. В данном случае простетический гем этого фермента выполняет роль мишени для оксида углерода [8, 10]. Гем связывается с N-концевой частью последовательности цистатионин β -синтазы, которая состоит из 70 аминокислотных остатков и выступает в роли окислительно-восстановительного сенсора. Но при этом газы функционально тесно связаны между собой и работают вместе, регулируя клеточные процессы в норме и патологии.

Приведенные нами материалы показывают, что в нейронной организации вазомоторных ядер имеются структурные предпосылки для обеспечения взаимодействия газов. В процессе реализации своей деятельности газотрансмиттерные нейроны могут не только взаимодействовать между собой, но и с нервными клетками, продуцирующими классические нейромедиаторы, которые также находятся в центральной части ядра [2, 6, 7]. Согласно современным представлениям, множественность и разнообразие эффектов классических нейромедиаторов во многом обеспечивают нейромодуляторы, в качестве которых часто выступают оксид азота, монооксид углерода и сероводород. Оказывая действие на нейроны, включающие ацетилхолин, норадреналин или серотонин, они создают условия для объединения отдельных нейронов в функциональные нервные центры, расширяя возможности мозга по управлению сложными процессами в организме.

Литература

1. Коцюба А.Е., Кокошина В.В., Черток В.М. Возрастные преобразования нитроксидергических нейронов в ядре солитарного тракта у крыс // Тихоокеанский мед. журн. 2009. № 4. С. 50–54.
2. Коцюба А.Е., Черток В.М. Пространственная организация серотонинергических и нитроксидергических нейронов в некоторых ядрах бульбарного отдела сердечно-сосудис-

- того центра человека // Тихоокеанский мед. журнал. 2010. № 4. С. 43–46.
3. Черток В.М., Коцюба А.Е., Беспалова Е.П. Роль оксида азота в реакции артериальных сосудов на лазерное облучение // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2008. Т. 145, № 6. С. 699–703.
4. Черток В.М., Коцюба А.Е. Особенности распределения ферментов синтеза H_2S в стенке церебральных артерий у крыс // Бюлл. эксперим. биол. и мед. 2012. № 7. С. 116–120.
5. Черток В.М., Коцюба А.Е. Новые нейротрансмиттеры и их роль в центральных механизмах регуляции кровообращения // Тихоокеанский мед. журн. 2013. № 4. С. 27–38.
6. Черток В.М., Коцюба А.Е. Норадреналинергические и нитроксидергические нейроны «вазомоторных» ядер у гипертензивных крыс // Бюлл. эксперим. биол. и мед. 2014. Т. 158, № 11. С. 649–654.
7. Черток В.М., Коцюба А.Е., Старцева М.С. Применение метода компьютерного совмещения изображений для топохимического картирования нейронов мозга // Тихоокеанский мед. журнал. 2014. № 3. С. 77–79.
8. Hogg N. Nitric oxide expands scope to cover hydrogen sulfide and carbon monoxide // Nitric Oxide. 2013. Vol. 35. P. 1–3.
9. Hovater M.B., Ying W.-Zh., Agarwal A., Sanders P.W. Nitric oxide and carbon monoxide antagonize TGF- β through ligand-independent internalization of T β R1/ALK5 // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 2014 Vol. 307, No. 6. P. 727–735.
10. Kajimura M., Fukuda R., Bateman R.M. [et al.]. Interactions of multiple gas-transducing systems: hallmarks and uncertainties of CO, NO, and H_2S gas biology // Antioxid Redox Signal., 2010. Vol. 13, No. 2. P. 157–192.
11. Kotsiuba A.E., Chertok V.M. Immunolocalization of cystathionine β -synthase in cerebral pontine nuclei in humans // Bull. Exper. Biol. a. Med. 2013. Vol. 155, No. 2. P. 277–279.
12. Li L., Hsu A., Moore P.K. Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation – a tale of three gases! // Pharmacology, Therapeutics. 2009. Vol. 123. P. 386–400.
13. Wu L., Wang R. Carbon Monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications // Pharmacol. Rev. 2005. Vol. 57, No. 4. P. 585–630.
14. Yang G., Wu L., Jiang B. [et al.] H_2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine γ -lyase // Science. 2008. Vol. 322. P. 587–590.
15. Zhang C.Y., Li X.H., Zhang T. [et al.] Hydrogen sulfide up-regulates heme oxygenase-1 expression in rats with volume overload-induced heart failure // Biomed. Rep. 2013. Vol. 1, No. 3. P. 454–458.

Поступила в редакцию 23.04.2015.

Пространственная организация газотрансмиттерных нейронов в мозге

М.С. Старцева, А.Е. Коцюба, В.М. Черток
Тихоокеанский государственный медицинский университет
(690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Резюме. У крыс популяции Вистар иммуногистохимическим методом с использованием антисыворотки против нейрональной формы синтазы окиси азота, цистатионин β -синтазы и гемоксигеназы-2 изучали группы иммунопозитивных нейронов, в проекции ядра одиночного пути, мелкоклеточного и гигантоклеточного ретикулярных ядер. Установлено, что размеры, доля и концентрация NO-, СО- и H_2S -иммунопозитивных нейронов, а также их распределение в каждом из ядер отличались. Большинство этих клеток располагается в непосредственной близости друг от друга, образуя скопления нейронов различной медиаторной специфичности. Тесное взаимодействие NO-, СО- и H_2S -иммунопозитивных нейронов создают предпосылки для их взаимодействия и объединения в функциональные нервные центры.

Ключевые слова: оксид азота, монооксид углерода, сероводород, ядра каудальной части ствола мозга.