

УДК 611.818-018.8:546.172.6-31:577.95:599.323.4

*А.Е. Коцюба, В.В. Кокошина, В.М. Черток*

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

## **ВОЗРАСТНЫЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ НИТРОКСИДЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ В ЯДРЕ СОЛИТАРНОГО ТРАКТА У КРЫС**

*Ключевые слова: ядро солитарного тракта; нитроксидаергические нейроны, возрастные изменения.*

В эксперименте на 100 крысах-самцах линии Wistar—Kyoto в возрасте от 4 дней до 24 месяцев (11 возрастных групп) исследовано ядро солитарного тракта продолговатого мозга. Установлены интенсивные количественные и качественные преобразования нитроксидаергических нейронов на протяжении всего постнатального онтогенеза. Активность фермента, невысокая в первые дни жизни, достигала максимальных значений к 1–3 месяцам, после чего постепенно снижалась. До 3-месячного возраста происходило увеличение размеров и количества нитроксидаергических нейронов, при уменьшении значений их относительной плотности. Описанные изменения, по мнению авторов, могут влиять на эффективность центральной регуляции сосудистого тонуса и быть одним из механизмов возникновения старческой артериальной гипертензии.

Известно, что бульбарный вазомоторный центр приобретает функциональную значимость только после созревания и включения в процесс управления его главных регуляторов: ядра солитарного тракта (ЯСТ) и некоторых ядер ретикулярной формации. При этом максимальные реакции возникают при активации ЯСТ – основного афферентного звена в центральной регуляции сосудистого тонуса [11, 15]. Последние годы в механизмах управления гемодинамикой активно исследуется роль оксида азота [4, 6, 10]. Однако возрастные аспекты этой проблемы практически не изучены, хотя нитроксидаергические нейроны появляются в ядрах вазомоторного центра уже в эмбриональном периоде [10]. По мере развития мозга относительное количество и размеры клеток, по одним данным увеличиваются [9], по другим – практически не изменяются или уменьшаются [13]. Неоднозначные материалы приводятся и об изменениях нитроксидаергических систем в старости. Kawamata et al. [8] отметили значительное уменьшение размеров NADPH-позитивных нейронов в пожилом возрасте, но не нашли изменений в плотности расположения этих клеток. Другие авторы у старых крыс не обнаружили изменений размеров и плотности нитроксидаергических нейронов [9].

В настоящей работе изучены возрастные особенности количественного распределения нитроксидаергических нейронов в ЯСТ.

**Материал и методы.** Исследовали ЯСТ у самцов белых крыс линии Wistar—Kyoto следующих возрастных групп: 4 дня (8 особей), 7 дней (8 особей), 14 дней (9 особей), 30 дней (10 особей), 45 дней (8 особей), 2 месяца (8 особей), 3 месяца (10 особей), 6 месяцев (12

особей), 12 месяцев (10 особей), 18 месяцев (9 особей) и 24 месяца (8 особей). Животные выводились из опыта после внутримышечной инъекции раствора нембутала (5 мг на 100 г массы). Из продолговатого мозга крыс делали срезы с двух уровней, которые окрашивали 0,5% раствором метиленового синего по Нисслю. Нитроксидаергические нейроны визуализировали методом V. Норе и S. Vinsent [7]. Методика подготовки материала для гистохимического и морфометрического исследований подробно описана нами ранее [6]. Количественная обработка образцов проводилась с использованием автоматизированной системы анализа изображений Allegro MC: определяли относительное (из расчета на 1 мм<sup>2</sup>) и абсолютное количество нейронов в проекции ядра, относительную плотность клеток, долю нитроксидаергических нейронов от общего количества выявленных клеток, а также площадь профильного поля и средний показатель активности в нейронах нитроксидаергической (NOS).

Для удобства сравнения изменения величины количественных показателей у крыс разных возрастных групп выражали в процентах от значений соответствующих показателей, вычисленных у дефинитивных (6-месячных) животных.

**Результаты исследования.** В перинатальном периоде ЯСТ было достаточно сформировано. В нем уже четко выделялись отдельные группы нейронов (рис. 1, а, б, г, д). В то же время большинство других неспецифических ядер продолговатого мозга находилось лишь в стадии закладки. Границы между ними не выражены, клетки лежали равномерно и очень плотно. Впрочем, и в ЯСТ в 1-ю неделю количество нейронов, окрашенных метиленовым синим, было очень велико и заметно снижалось лишь к 30-му дню жизни (рис. 1, в, е). Количество нейронов в этом ядре у 4-дневных животных на 60%, а у 7-дневных – на 48% превышало значения, вычисленные у зрелых крыс (рис. 2, а).

Единичные нитроксидаергические нейроны определялись в ЯСТ с первых дней жизни (рис. 1, ж). Затем их количество быстро увеличивалось (рис. 1, з, и), достигая наибольших значений между 30 днями и 3 месяцами (рис. 2, а). После 12 месяцев наблюдалось снижение величины этого показателя. При этом уже у 4–7-дневных животных определялось достаточно много нитроксидаергических нейронов – 62–71%, а в 14 дней – 94% от числа, установленного для 6-месячных крыс. На 30-й день показатель на 16% превышал дефинитивные значения, после чего постепенно снижался, достигая минимального уровня (65%) у 24-месячных

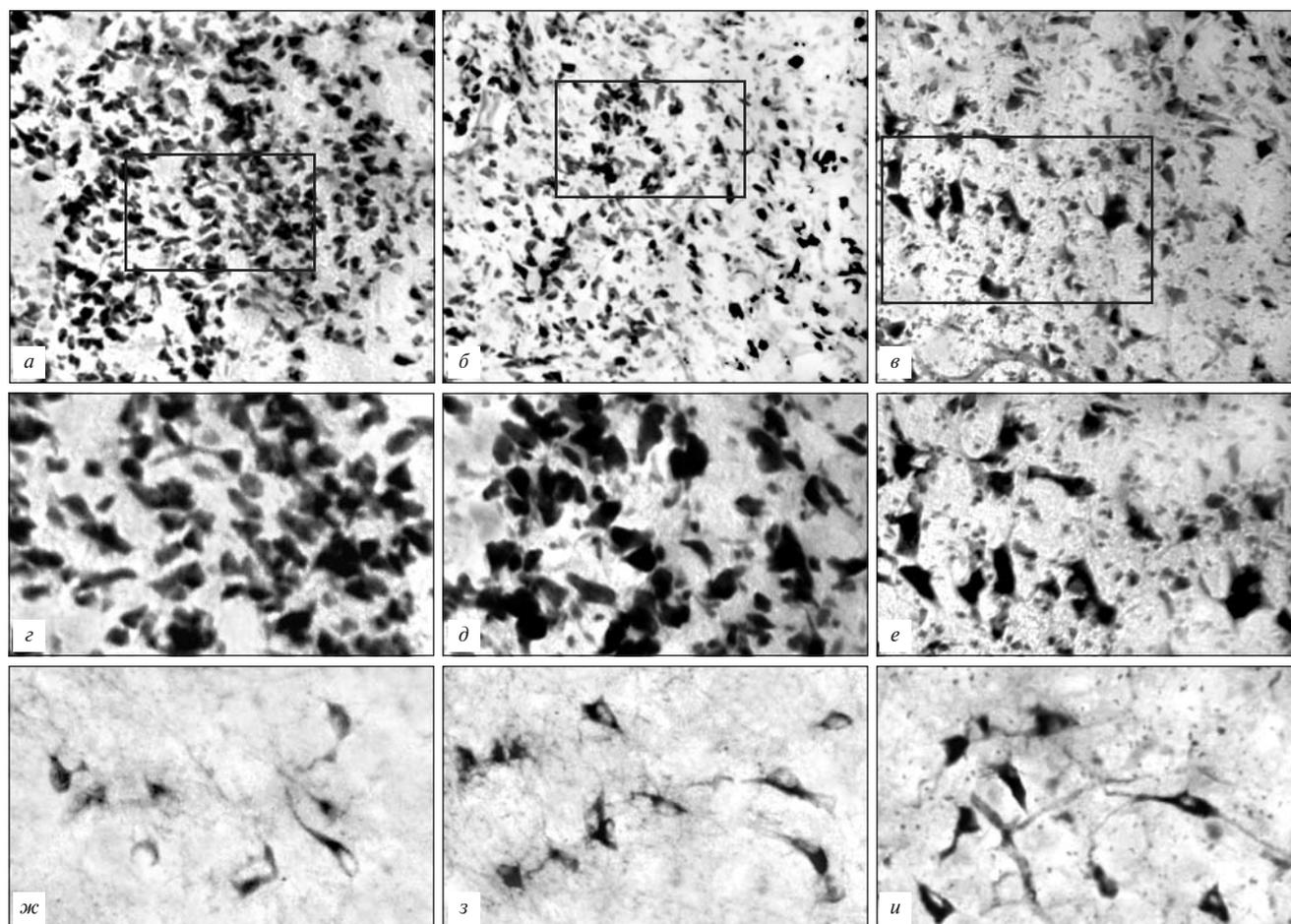


Рис. 1. Нейроны ядра солитарного тракта, при окраске по Ниссию (а–е) и Норе и Vinsent (ж–и).

а, г, ж – 4-дневные животные; б, д, з – 14-дневные животные; в, е, и – 30-дневные животные; фото г, д, е – фрагменты фото а, б, в соответственно. а, б –  $\times 80$ ; в –  $\times 100$ ; г–и –  $\times 200$ .

животных. В иной последовательности изменялась доля нитроксидпозитивных нейронов, вычисленная от общего числа клеток, выявленных при помощи метиленового синего (рис. 2, б). В перинатальный период значения этого показателя были особенно низки и не превышали 8%. Затем абсолютное количество клеток прогрессивно снижалось, что приводило к увеличению доли нитроксидергических нейронов, которая к 30-му дню достигала дефинитивного уровня. После этого количество нейронов, окрашенных метиленовым синим, существенно не менялось. Лишь у 24-месячных животных определялось небольшое (на 4–6%) снижение величины данного показателя.

У 4–7-дневных животных большинство нитроксидергических нейронов было представлено небольшими (5–12 мкм в диаметре) клетками округлой или овальной формы (рис. 1, ж), хотя при окраске метиленовым синим форма и размер нервных клеток в первые дни жизни отличались большим разнообразием (рис. 1, а, г). Между 14–30 днями усложнялась структура и нитроксидергических нейронов. Помимо мелких овальных и веретеновидных клеток выявлялись треугольные или полигональные нейроны средних (13–16 мкм) и крупных (20–24 мкм) размеров (рис. 1, з, и). Если в первые дни после рож-

дения наиболее многочисленную группу составляли мелкие клетки с профильным полем около 80 мкм<sup>2</sup>, то к 30-му дню этот показатель смещался в сторону нейронов площадью 100–120 мкм<sup>2</sup>, а к 3 месяцам – 160–180 мкм<sup>2</sup> (рис. 2, в). Между 3-м и 6-м месяцами постнатального онтогенеза увеличивалась доля клеток с профильным полем 200–220 мкм<sup>2</sup>. У 4-дневных животных мелкие нитроксидпозитивные клетки составляют около 80–85%, у 14- и 30-дневных крыс доля таких нейронов сокращалась примерно на треть, а у 45-дневных – во всех случаях не превышала 45%. Начиная с 3 и до 12 месяцев соотношение нитроксидергических нейронов в ядре практически не менялось. Доля мелких клеток составляла 32%, средних – 60% и крупных – 8%. В старости вновь увеличивалась доля нитроксидергических нейронов небольшого размера. При окраске метиленовым синим в размерных группах клеток получены другие соотношения (рис. 2, г). Как видно, на протяжении постнатального онтогенеза активность фермента выявляется преимущественно в нейронах площадью менее 200 мкм<sup>2</sup>. Существенно реже NOS определялась в более крупных клетках и никогда – в нейронах площадью свыше 600 мкм<sup>2</sup>, которые выявлялись в ЯСТ при окраске метиленовым синим.

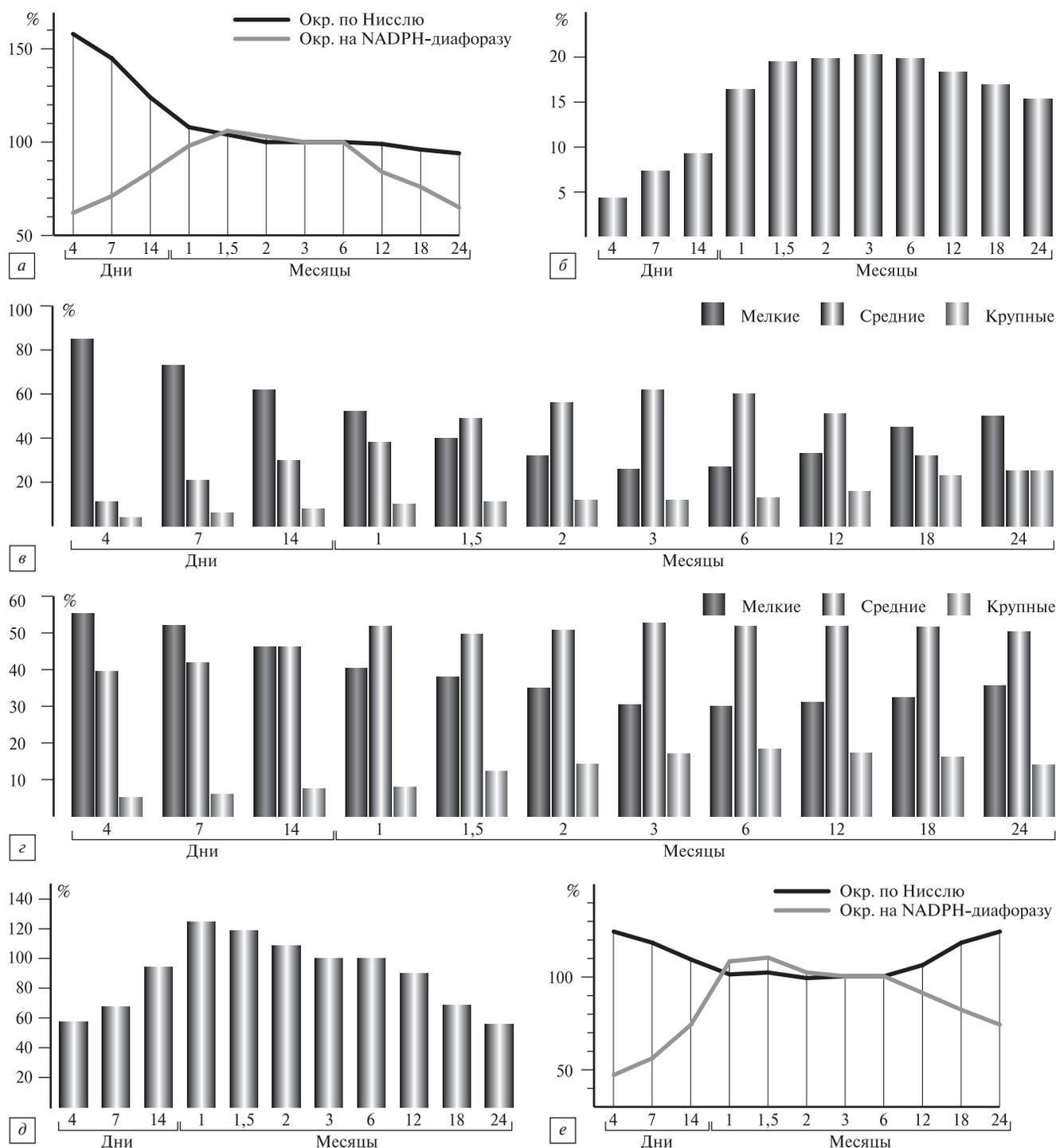


Рис. 2. Изменения нейронов ЯСТ у крыс разных возрастных групп.

*а* — количество нитроксидергических нейронов и клеток, окрашенных метиленовым синим; *б* — доля нитроксидергических нейронов от общего числа клеток, окрашенных метиленовым синим; *в, г* — соотношение доли клеток с положительной реакцией на NADPH-диафорузу (*в*) и окрашенных метиленовым синим (*г*) в зависимости от их размеров; *д* — средний показатель активности NOS; *е* — динамика преобразований относительной плотности нейронов в постнатальном онтогенезе. За 100% принята величина показателей у 6-месячных животных.

У крыс первых дней жизни большая часть нейронов в ядре обладает низкой активностью фермента (рис. 1, ж). В цитоплазме таких клеток откладывался мелкозернистый преципитат голубовато-синего цвета, и лишь единичные нейроны имели более высокую активность NOS. Однако уже между 7-м и 14-м днями в ЯСТ выявлялись клетки с умеренной и высокой активностью фермента (рис. 1, з). Такие нейроны отличались

большой плотностью выпавшего осадка, в результате чего их цитоплазма окрашивалась в различные оттенки синего цвета. Клетки с высокой активностью NOS особенно часто встречаются между 30-м и 45-м днями онтогенеза (рис. 1, и). В этот период выявлялись также небольшие группы нейронов с очень высокой активностью фермента. У 6–12-месячных животных такие клетки в ядре встречались редко и никогда — на более

поздних этапах онтогенеза. В нейронах, обладавших высокой активностью NOS, окраска распространялась на отростки, где продукт гистохимической реакции откладывался в виде обособленных, интенсивно окрашенных гранул, придавая отросткам неравномерно-прерывистый вид. У 18–24-месячных крыс в ростральном отделе ЯСТ большинство клеток обладало низкой активностью NOS. В каудальном отделе ядра на уровне средней трети нижней оливы, кроме того, можно было встретить небольшие группы нейронов с умеренной активностью фермента. Расчеты показывают, что в первые 3 месяца жизни в нейронах ядра наблюдалось быстрое увеличение значений среднего показателя активности NOS (рис. 2, д). Уже у 4-дневных животных его величина составляла около 60% от дефинитивных значений, а на 14-й день существенно от них не отличалась. Продолжая расти, средний показатель активности фермента у 30–45-дневных крыс более чем на 20% превышал таковой, установленный для взрослых животных, после чего начинал постепенно снижаться, достигая минимальной величины у крыс 18–24 месяцев – 55 и 68% соответственно (рис. 2, д). После 6 месяцев в большинстве нейронов наблюдалось умеренное снижение активности NOS, что приводило к уменьшению ее величины у старых животных в среднем на 19–44%.

Динамика преобразований относительной плотности нейронов в течение постнатального онтогенеза была тесно связана с методом выявления нервных клеток (рис. 2, е). Величина этого показателя напрямую зависела от абсолютного количества и размеров клеток, поэтому большое число нейронов даже при небольших средних размерах клеток, выявляемых в проекции ядер у 4–7-дневных крыс при окраске препаратов метиленовым синим, закономерно приводила к увеличению относительной плотности клеток. Затем в течение 30 дней наблюдался быстрый прирост площади поперечного сечения нейронов и снижение их количества, что влекло за собой существенное уменьшение относительной плотности нейронов. С небольшими колебаниями ее значения удерживались на постоянном уровне до 12 месяцев и незначительно (на 4–6%) сокращались у 18–24-месячных крыс в связи с уменьшением у них числа клеток в ядре. Иная динамика изменений относительной плотности наблюдалась при выявлении в ЯСТ нитроксидпозитивных нейронов. В этом случае в течение 30 дней постнатального онтогенеза шло постепенное увеличение плотности клеток, которое стабилизировалось между 45 днями и 3 месяцами, после чего наблюдалось вначале небольшое, а затем все более выраженное (до 32–45%) сокращение величины показателя.

**Обсуждение полученных данных.** Как известно, у незрелорождающих животных, в том числе и у крысы, активные процессы перестройки продолговатого мозга, в отличие от вышележащих отделов, приходятся на первые недели постнатального онтогенеза [3]. На этом основании считалось, что регуляторные центры, ядра

которых расположены в продолговатом мозге, созревают достаточно быстро и уже в раннем возрасте осуществляют свои функции в полном объеме [1]. Проведенное исследование свидетельствует, что созревание нитроксидергических нейронов в ЯСТ у крысы продолжается не менее 3 месяцев после рождения. В этот период усложняется структура нейронов, в них увеличивается активность фермента. Возрастает абсолютное количество NO-позитивных клеток и их доля от общего количества выявленных нейронов, стабилизируются показатели относительной плотности клеток. Иначе говоря, созревание медиаторных систем, частью которых являются и нитроксидергические нейроны, проходит не так быстро, как цитоархитектоническая дифференцировка ядра. Об этом свидетельствуют данные, полученные при изучении параллельных срезов: один из них окрашивался метиленовым синим, применение которого позволяет визуализировать все нейроны, находящиеся в проекции среза, другой – обрабатывался для выявления нервных клеток, обладающих активностью NOS. Использование метода параллельного окрашивания срезов позволило составить объективное представление и о динамике изменений количественных параметров нитроксидергических нейронов при старении. Подсчеты показали, что общее число нейронов, маркированных метиленовым синим, а также показатели относительной плотности этих клеток в ЯСТ у старых крыс уменьшаются в среднем на 6–8%, что соответствует и опубликованным ранее данным [12, 14]. В то же время значения соответствующих показателей, но вычисленные в отношении нитроксидпозитивных нейронов, снижаются в соответствующих возрастных группах животных в 3–4 раза больше. Еще более существенным в старших возрастных группах оказались уменьшение активности фермента и доли нитроксидергических нейронов. Вполне вероятно, что снижение функциональной активности нитроксидергической системы, наблюдающееся в старости, является одним из потенциальных механизмов, способствующих нарушению работы центров вазомоторной регуляции и развитию так называемой артериальной гипертензии пожилых людей [2, 5].

В целом приведенные выше данные позволяют заключить, что в ЯСТ на протяжении всего постнатального онтогенеза проходят количественные и качественные преобразования нитроксидпозитивных нейронов, с активностью которых может быть связана эффективность центральной регуляции сосудистого тонуса.

#### Литература

1. Вальдман А. В. *Нейрофармакология центральной регуляции сосудистого тонуса*. Л.: Медицина, 1976. 200 с.
2. Гельцер Б.И., Котельников В.Н. *Суточные ритмы артериального давления при артериальной гипертензии: патофизиологические и хронотерапевтические аспекты*. Владивосток: Дальнаука, 2002. 164 с.
3. Ефимович И.В., Хижняк А.С., Клементьев А.В. и др. *Плотность нейронов вегетативных ядер продолговатого мозга половозрелых и неполовозрелых белых крыс в посттравматическом периоде* // *Морфология*. 2006. Т. 129, № 4. С. 50.

4. Коцюба А.Е., Черток В.М. Нитрооксидсодержащие элементы чувствительной иннервации артерий головного мозга // Тихоокеанский мед. журнал. 2009. № 2. С. 69–72.
5. Кушаковский М.С. Гипертоническая болезнь и вторичные гипертензии. Л.: Медицина, 1983. 288 с.
6. 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. 335–339.
7. Hope B.T., Vincent S.R. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase // *J. Neurochem. Cytochem.* 1989. Vol. 37. P. 653–661.
8. Kawamata T., Nakamura S., Akiguchi I. et al. Effect of aging on NADPH-diaphorase neurons in laterodorsal tegmental nucleus and striatum of mice // *Neurobiol. Aging.* 1990. Vol. 11. P. 185–192.
9. Kio H., Hengemihle J., Ingram D.K. Nitric oxide synthase in rat Brain: age comparisons quantitated with NADPH-diaphorase histochemistry // *Journal of Gerontology: biological sciences.* 1997. Vol. 3 (52A). P. 146–151.
10. Ma S-X., Fang Q., Morgan B. et al. Cardiovascular regulation and expressions of NO synthase-tyrosine hydroxylase in nucleus tractus solitarius of ovine fetus // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2003. Vol. 284, No. 4. P. 1057–1063.
11. Marlinskii V.V., Voitenko L.P. The participation of the medial reticular formation of the medulla oblongata in the supraspinal control of locomotor and postural activities in the guinea pig // *Fiziol. Zh. SSSR Im. I.M. Sechenova.* 1991. Vol. 77, No. 3. P. 33–40.
12. Mesulam, M.M., Mufson, E.J., Rogers J. Age-related shrinkage of cortically projecting cholinergic neurons: a selective effect // *Ann. Neurol.* 1987. Vol. 22. P. 31–36.
13. Sander S.E., Hamann M., Richter A. Age-related changes in striatal nitric oxide synthase-immunoreactive interneurons in the dystonic ditz mutant hamster // *Neuropathology and Applied Neurobiology.* 2007. Vol. 32, No. 1. P. 74–82.
14. Smith M.L., Deadwyler S.A., Booze R.M. 3D reconstruction of the cholinergic basal forebrain system in young and aged rats // *Neurobiol. Aging.* 1993. Vol. 14. P. 389–392.
15. Spyer K.M. The central nervous organization of reflex circulatory control. // In: *Central Regulation of Autonomic Function / A.D. Loewy, K.M. Spyer.* N.Y.: Oxford University Press, 1990. P. 126–144.

Поступила в редакцию 03.07.2009.

#### AGE-DEPENDENT TRANSMUTATIONS OF NITROXIDERGIC NEURONS IN RAT'S NUCLEUS TRACTUS SOLITARIUS

A.E. Kotsyuba, V.V. Kokoshina, V.M. Chertok  
Vladivostok State Medical University (2 Ostryakov Av. Vladivostok 690950 Russia)

**Summary** – Experiments with 100 males Wistar–Kyoto aged 4 days to 24 months (11 age groups) allowed studying nucleus tractus solitarius of medulla oblongata. Over the whole period of postnatal ontogenesis some intense quantitative and qualitative transmutations of nitroxide-positive neurons were registered. The enzyme activity being low during the first days of life has reached its maximum values by 1–3 months, following which it was decreasing step by step. Before reaching the 3-month age, there was an increase in sizes and numbers of nitroxidergic neurons with a reduction of their relative density values. It is the authors' opinion that the changes described in this paper may have an influence upon efficiency of central regulation of vascular tone and may become one of the mechanisms for senile arterial hypertension.

**Key words:** nucleus tractus solitarius; nitroxidergic neurons, age-related changes.

Pacific Medical Journal, 2009, No. 4, p. 50–54.

УДК 616.12-008.331/.351:616.132]:[616.12-005.4+616.233-002-036.12

В.А. Невзорова, О.И. Шекунова, О.В. Голотина, Т.А. Бродская

Владивостокский государственный медицинский университет (690600 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

### СОСТОЯНИЕ СИСТОЛИЧЕСКОГО И ПУЛЬСОВОГО ДАВЛЕНИЯ В АОРТЕ ПРИ СОЧЕТАННОЙ КАРДИОРЕСПИРАТОРНОЙ ПАТОЛОГИИ

**Ключевые слова:** центральное систолическое давление, аортальное пульсовое давление, хроническая обструктивная болезнь легких, ишемическая болезнь сердца.

Изучено состояние систолического и пульсового давления в аорте, его взаимосвязь с периферическим артериальным давлением и основными характеристиками жесткости аорты у 60 пациентов, страдавших хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) в сочетании с ишемической болезнью сердца (ИБС). Контроль – 30 здоровых лиц. Применялся метод неинвазивной артериографии. Установлено повышение аортального систолического и пульсового давления и снижение эластичности крупных сосудов в I и II стадии ХОБЛ. Подтверждена корреляция между повышением центрального и периферического артериального давления и основными характеристиками жесткости аорты. В III стадии ХОБЛ выявлено «парадоксальное» снижение центрального и периферического артериального и аортального пульсового давления. Более чувствительными показателями состояния упруго-эластических свойств крупных сосудов и миокарда оказались индекс аугментации, разность и индекс соответствия центрального и периферического систолического давления, соотношение индексов площади сердечного цикла и интервал периода изгнания левого желудочка. Указанные маркеры могут быть исполь-

зованы для оценки степени сердечно-сосудистого риска при сочетанной кардиореспираторной патологии.

Сочетанные соматические болезни являются одной из актуальных проблем современной медицины, особенно в группе лиц старше 50 лет [11]. Коморбидность, с одной стороны, является фактором, значительно ухудшающим прогноз каждой из нозологий, с другой – может затруднять диагностику и выбор оптимальной терапии. Общность факторов риска позволяет отнести сочетание хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и ишемической болезни сердца (ИБС) к типичным примерам, часто встречающимся в клинической практике. Согласно проведенным многоцентровым исследованиям, одной из ведущих причин смертности при ХОБЛ являются сердечно-сосудистые катастрофы [5]. В то же время патогенетические механизмы, ведущие к усилению сердечно-сосудистого риска при ХОБЛ и ее сочетании с ИБС, остаются недостаточно изученными.

Шекунова Ольга Ивановна – аспирант кафедры терапии ФПК и ПП ВГМУ; тел.: 8 (4232) 45-63-67; e-mail: olga-shekunova@mail.ru.