

ISSN 1609-1175

Тихоокеанский Медицинский Журнал

PACIFIC MEDICAL JOURNAL

2016, № 2

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1997 году
Выходит один раз в три месяца



Издательство
МЕДИЦИНА ДВ

Главный редактор В.Б. Шуматов

Редакционная коллегия:

Н.Н. Беседнова, Б.И. Гельцер, А.И. Дубиков, Е.В. Елисеева, А.В. Ларюшкина (отв. секретарь), Ю.В. Каминский, Е.В. Крукович, Ю.В. Кулаков, П.А. Лукьянов, В.Н. Лучанинова, В.И. Невожай, В.А. Невзорова, К.В. Стегний, Л.В. Транковская (зам. главного редактора), В.Б. Туркутюков, Ю.С. Хотимченко, В.М. Черток (зам. главного редактора), В.В. Шапкин

Редакционный совет:

А.С. Белевский (Москва), А.Ф. Беляев, А.В. Гордеев, Ю.И. Гринштейн (Красноярск), С.Е. Гуляева, Н.А. Догадина, В.А. Иванис, Ю.И. Ишпахтин, В.П. Колосов (Благовещенск), Ю.Ю. Первов, В.А. Петров, В.Ю. Мареев (Москва), В.Я. Мельников, А.А. Полежаев, Б.Я. Рыжавский (Хабаровск), Л.М. Сомова, Г.И. Суханова, И.Е. Чазова (Москва), Jin Liang Hong (КНР), Moon oh Riin (Республика Корея), Yamamoto Masaharu (Япония), Zhao Baoshang (КНР)

Научный редактор О.Г. Полушин

Ответственные редакторы номера В.М. Черток, С.С. Едранов, Ю.С. Хотимченко

Тихоокеанский медицинский журнал, 2016, № 2 (64)

Апрель–июнь 2016 г.

Решением президиума ВАК Минобрнауки России включен в перечень ведущих рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук.

Входит в систему Российского индекса научного цитирования (РИНЦ)
на базе научной электронной библиотеки eLIBRARY.RU

Учредители:

Тихоокеанский государственный
медицинский университет,
Департамент здравоохранения
администрации Приморского края,
НИИ эпидемиологии
и микробиологии СО РАМН,
Краевой клинический центр
охраны материнства и детства

Редакция

**«Тихоокеанского медицинского
журнала»:**

690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 4,
Тихоокеанский государственный
медицинский университет
Тел./факс: +7 (423) 245-56-49

*Журнал зарегистрирован Министерством
РФ по делам печати, телерадиовещания
и средств массовых коммуникаций
ПИ № 77-13548 от 20.09.2002 г.*

Зав. редакцией Т.А. Кожевникова
Редактор И.М. Забавникова
Технический редактор Е.С. Аношина
Корректор И.М. Луговая

Подписано в печать 28.04.2016 г.
Печать офсетная. Формат 60×90/8
Усл. печ. л. 14,6. Заказ № 246.
Тираж 1000 экз.

Издательский дом «Принт-Восток».
Отпечатано в типографии № 1 г. Харбин
(Китай)

Цена свободная

Выпуски «Тихоокеанского медицинского журнала» доступны на сайтах <http://tmj-vgmu.ru>, <http://elibrary.ru> и <http://vgmu.ru>
Правила оформления статей и сведения об авторах публикаций находятся на сайтах <http://tmj-vgmu.ru>, <http://vgmu.ru>

Передовые статьи

*Швалев В.Н.*Вклад научной школы П.А. Мотавкина в развитие
нейроморфологии в России.....7

Обзоры

*Реутов В.П., Черток В.М.*Новые представления о роли вегетативной нервной
системы и систем генерации оксида азота в сосудах мозга..... 10*Порсева В.В., Шилкин В.В.*Строение серого вещества спинного мозга:
неопределенности и перспективы исследования..... 20*Цветков Д., Сийарто И.А., Ванг Н., Тано Й.И., Голлах М.*Сосудистая дисфункция и периадвентициальная
жировая ткань31*Ващенко М.А., Коцюба Е.П.*Топография NO-синтазы в центральной
нервной системе двусторчатых моллюсков в норме
и при действии стресс-факторов 34*Калиниченко С.Г.*Модульная парадигма и проблема структурно-
функциональной организации мозжечка 42*Пиголкин Ю.И., Золотенкова Г.В.*Внедрение современных достижений нейрогистологии
в судебно-медицинскую практику..... 49*Пуцина Е.В., Жарикова Е.И., Варакин А.А.*Нейрогенез у взрослых позвоночных животных:
вопросы адаптации, эволюции и функциональной
специализации 55*Захарчук Н.В., Невзорова В.А., Шуматов В.Б.,**Шестакова Н.В., Гончар Е.Ю.*Субстанция Р в механизмах развития церебральной
дисфункции при хроническом табакокурении 62*Едранов С.С.*Клеточно-молекулярные аспекты
посттравматической регенерации
слизистой оболочки околоносовых пазух..... 67*Черток В.М., Черток А.Г.*Регуляторный потенциал
капилляров мозга..... 72

Оригинальные исследования

*Брюховецкий И.С., Дюйзен И.В., Шевченко В.Е.,
Хотимченко Ю.С.*Стволовые клетки глиобластомы
индуцируют миграцию нормальных
стволовых клеток81*Козлов В.И., Литвин Ф.Б., Рыжак С.М.*Лазерная фотостимуляция кровотока
в пияльных микрососудах 90*Рыжавский Б.Я., Ткач О.В.*Морфологические особенности головного мозга
крыс при акселерации в неонатальном
и молочном периодах онтогенеза..... 94*Семченко В.В., Степанов С.С., Еренев С.И.*Структурно-функциональное восстановление
нервной ткани головного мозга
в постишемическом периоде
с позиций представления о провизорности
в репаративном гистогенезе 98*Цехмистренко Т.А., Козлов В.И.*Гистофизиологический подход
к изучению структурной организации коры
мозга человека в онтогенезе 103*Каминский Ю.В., Матвеева Н.Ю., Матвеев Ю.А.*

Склеродермическая энцефаломиелопатия 108

Editorials

*Shvaley V.N.*The contribution of the P.A. Motavkin scientific school
to the development of neuromorphology in Russia 7

Reviews

*Reutov V.P., Chertok V.M.*The new understanding of the autonomic
nervous system role and the nitric oxide generating
system in the brain vessels..... 10*Porseva V.V., Shilkin V.V.*Structure of the gray matter of the spinal cord –
questions and research aspects 20*Tsvetkov D., Szijártó I.A., Wang N., Tano J.-Y., Gollasch M.*

Vascular dysfunction and periaortic adipose tissue 31

*Vaschenko M.A., Kotsyuba E.P.*Topography of NO-synthase in the central nervous system
of bivalve molluscs under normal and stress conditions 34*Kalinichenko S.G.*The modular paradigm and the problem of the structural
and functional organization of the tentorium 42*Pigolkin Yu.I., Zolotenkova G.V.*The implementation of modern achievements
of neurohistology in forensic practice 49*Puschina E.V., Zharikova E.I., Varaksin A.A.*Neurogenesis in the adult vertebrate animals: the issues
of adaptation, evolution and functional specialization 55*Zakharchuk N.V., Nevzorova V.A., Shumatov V.B.,**Shestakova N.V., Gonchar E.Yu.*
Substance P in the mechanisms of the development
of cerebral dysfunction in chronic tobacco smoking 62*Edranov S.S.*Cellular and molecular aspects of posttraumatic
regeneration of the mucosa of the paranasal sinuses..... 67*Chertok V.M., Chertok A.G.*

Regulatory capacity of the brain capillaries 72

Original Researches

*Bryukhovetskiy I.S., Duyizen I.V., Shevchenko V.E.,**Khotimchenko Yu.S.*
Cancer stem cells of glioblastoma induce
the migration of normal stem cells 81*Kozlov V.I., Litvin F.B., Ryzhak S.M.*Laser photostimulation of the blood flow
in pial microcirculatory vessels 90*Ryzhanskii B.Ya., Tkach O.V.*The morphological features
of the rats brain at an acceleration in the neonatal dairy
and periods of ontogenesis..... 94*Semchenko V.V., Stepanov S.S., Ereva S.I.*Structural and functional recovery
of the nervous tissue of the brain
in the post-ischemic period from the standpoint of view
of provisory in reparative histogenesis 98*Tsekhmistrenko T.A., Kozlov V.I.*Histophysiologic approach in the study
of the structural organization of the human
cerebral cortex in ontogenesis 103*Kaminsky Yu.V., Matveeva N.Yu.,**Matveev Yu.A.*
Sclerodermic encephalomyelopathy 108

Светлой памяти Павла Александровича Мотавкина посвящается



Этот выпуск журнала посвящен памяти заслуженного деятеля науки, доктора медицинских наук, профессора Павла Александровича Мотавкина. Большинство статей в журнале принадлежит его ученикам, последователям и видным ученым, область научных интересов которых связана с изучением строения головного и спинного мозга, вегетативной нервной системы, церебральных сосудов, то есть теми направлениями, которые долгие годы разрабатывались в нейрогистологической школе профессора П.А. Мотавкина.

В статьях представлены преимущественно приоритетные материалы, полученные в результате многолетних исследований научными коллективами, большинство из которых возглавляют ученики Павла Александровича, ставшие во главе новых направлений исследований мозга. Публикация этих работ, выполненных на самом современном научном уровне, может составить честь для любого самого взыскательного издания.

Прошел ровно год, как П.А. Мотавкина нет с нами. Ушел из жизни замечательный человек, педагог, ученый, воспитавший более чем за 60 лет учебно-педагогической и научной работы десятки поколений студентов, оставив после себя известную у нас в стране и за рубежом нейрогистологическую школу, включающую не одну сотню его учеников, коллег и последователей. Жизнь этого замечательного человека вместила целую череду событий: Великая Отечественная война, учеба в Ярославском медицинском институте (который он окончил с красным дипломом), аспирантура, приезд во Владивосток. На войне П.А. Мотавкин командовал санвзводом, а затем санротой. Был дважды ранен, награжден многими боевыми орденами и медалями. Дошел до Германии, там же встретил Победу.

П.А. Мотавкин – один из основателей высшего медицинского образования в Приморье. Вначале был медицинский факультет Дальневосточного государственного университета, затем вместе с факультетом он перешел во вновь организованный мединститут. В самое трудное время был проректором по учебной и научной работе, стоял у истоков образования вуза, был одним из его первых преподавателей.

Несмотря на огромную занятость П.А. Мотавкин в те непростые годы, как и в дальнейшем, много времени и сил отдавал научным исследованиям. Он часто говорил своим ученикам, что для того, чтобы добиться сколько-нибудь существенных успехов в науке, нужно относиться к ней, как к самому важному делу своей жизни. В науке нельзя ничего достичь, если все усилия и помыслы не направлены исключительно на любимое дело. Это не только слова. Красноречивее слов, говорят дела ученого. Важная веха в его научной жизни – открытие механизмов управления мозговой гемодинамикой. Благодаря трудам П.А. Мотавкина и его учеников, создано учение о системе регуляции мозговой гемодинамикой, включающей интимальный (эндотелийзависимый), миогенный, местный эндокринный и нервный механизмы. Еще одно открытие школы П.А. Мотавкина, которое активно разрабатывается учеными во многих странах мира, – интраспинальный орган.

Поражали эрудиция и широта научных интересов Павла Александровича. Оставаясь апологетом фундаментальной науки, он не сторонился клинических исследований. Под его руководством выполняли научную работу и получили ученую степень доктора наук представители таких разных направлений клинической медицины, как офтальмология, оториноларингология,

пульмонология, анестезиология и реаниматология, педиатрия, стоматология, инфекционные болезни, патоморфология. Он организовал и долгие годы возглавлял лабораторию гаметогенеза Института биологии моря Дальневосточного отделения АН СССР. Много сил и энергии было отдано изучению таких, казалось бы, далеких от медицины проблем, как процессы размножения у беспозвоночных. Но и здесь – мировое признание исследований. Полученные им материалы опубликованы в многотомном зарубежном издании *Marin Biotechnologie*, а книга по нервной регуляции размножения у двусторчатых моллюсков переведена на французский и японский языки.

П.А. Мотавкин разрабатывал крупные научные проблемы, умел ставить конкретные задачи и находить пути их экспериментального решения. Он всегда уважительно относился к научным изысканиям своих учеников и коллег, независимо от их возраста и научных заслуг. Неудивительно, что все, работавшие вместе с этим поразительным человеком, высоко оценивают его профессионализм и человеческие качества. Научные работы сотрудников кафедры гистологии Владивостокского медицинского университета, бессменным руководителем которой более пятидесяти лет был профессор П.А. Мотавкин, получили широкую международную известность. В них заложен фундамент для многих дальнейших перспективных исследований. В архиве Павла Александровича хранится около 700 корреспонденций из 127 научных лабораторий мира, с которыми он поддерживал контакты. Известные ученые из университетов США, Японии, Канады,

Германии, Швеции, Франции, Испании, Англии, Аргентины считали за честь получить оттиск работы П.А. Мотавкина с его подписью.

Цифры, характеризующие работу профессора П.А. Мотавкина, впечатляют. Получено 8 авторских свидетельств и 4 патента на изобретения, 10 монографий увидели свет в известных издательствах Москвы и Санкт-Петербурга, 14 книг – монографий и учебных пособий, опубликовано в издательстве «Медицина ДВ». Многие его книги отмечены дипломами и именными премиями. За Павлом Александровичем числится свыше 300 журнальных статей и, что особенно важно – 105 из них представлены в престижных международных поисковых системах Pubmed и Medline, 22 статьи опубликованы на английском, немецком и французском языках.

Уходят поколения. На смену им появляются другие. Это неизбежно. Но остается память. Память о том, кто помог вам стать лучше, видеть дальше, чувствовать тоньше – о вашем главном в жизни Учителе. Помните, у Шекспира: «Ничто не вечно под луной. Но жизнь бессмертна эстафетой поколений. Коль этим даром, друг мой, дорожишь, оставь свой след, отбросив яд сомнений». Он оставил. Оставил увлекательными лекциями, многочисленными статьями и мудрыми книгами. Оставил своим ученикам, коллегам, студентам, врачам.

Давайте все мы – ученики, студенты и сотрудники университета еще раз вспомним Павла Александровича Мотавкина с его неиссякаемой энергией, мощным интеллектом, оптимизмом и трудолюбием.

Светлая вам память, Павел Александрович!

Главный редактор «Тихоокеанского медицинского журнала»

В.Б. Шуматов

ВКЛАД НАУЧНОЙ ШКОЛЫ П.А. МОТАВКИНА В РАЗВИТИЕ НЕЙРОМОРФОЛОГИИ В РОССИИ

В.Н. Швалев

Институт клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова (121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а)

Память о выдающемся ученом России и яркой личности – профессоре П.А. Мотавкине, во многом связана с созданием во Владивостоке известной нейроморфологической школы. Но и вне научной жизни он останется для нас доброжелательным, скромным, исключительно трудолюбивым и разносторонне образованным человеком.

Наша большая, многолетняя дружба и научное сотрудничество с этим замечательным человеком и ученым стала значительным событием в моей жизни. В монографиях П.А. Мотавкина встречаются многочисленные ссылки на результаты исследований моей лаборатории в Кардиоцентре. Бывая в Москве, он часто посещал нас с женой Н.И. Швалевой – в то время главного невролога Академии Наук СССР – и тогда наступала пора интереснейших совместных дискуссий с этим эрудированным и обаятельным человеком на этот раз о настоящем и будущем клинической неврологии. Мы также приезжали с женой и коллегами во Владивосток, как правило, на защиты диссертаций его учеников, и тогда Павел Александрович уже гостеприимным хозяином знакомил нас с историей и достопримечательностями Приморского края, который он хорошо знал и любил всей душой.

Научная школа П.А. Мотавкина быстро получила широкую известность и признание у нас в стране и за рубежом [31, 32]. До этого почти полтора столетия практически недостижимым лидером в изучении морфологии нервной системы оставалась Казанская нейрористологическая школа, которая под руководством А.Н. Миславского приобрела мировую известность. Горжусь, что являюсь одним из учеников А.Н. Миславского и представителем Казанской школы нейрористологов. А.Н. Миславский способствовал созданию в нашей стране ряда крупных научных центров по изучению нервной системы.

За относительно короткий исторический период под руководством П.А. Мотавкина – талантливого педагога и выдающегося ученого – его многочисленными учениками были сделаны научные открытия, на основе которых сформировались новые представления о механизмах сосудистой регуляции головного и спинного мозга человека и животных [11, 13, 19, 29, 30, 41]. Большой вклад в решение этой проблемы внесли талантливые ученики П.А. Мотавкина: д-р мед. наук, проф. В.М. Черток, член-корр. АН РФ, д-р. мед. наук, проф. Ю.И. Пиголкин, д-р мед. наук, проф. Г.С. Власов, д-р мед. наук, проф. В.С. Каредина, д-р мед. наук, проф. Л.Д. Маркина (Палашенко), канд. мед. наук Л.П. Осипова, канд. мед. наук В.Е. Охотин и многие другие. Обобщенные сведения о возрастных и видовых осо-



На защите диссертации.

Слева направо: заведующий кафедрой нормальной анатомии ВГМИ проф. Г.Ф. Мальков, заведующий лабораторией гистохимии и ультраструктуры Института клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова проф. В.Н. Швалев, заведующий кафедрой гистологии и эмбриологии I Московского медицинского института проф. Ю.И. Афанасьев, заведующий кафедрой гистологии и эмбриологии ВГМИ проф. Мотавкин. Владивосток, 1982 г.

бенностях холин- и адренергической иннервации сосудов головного мозга, их ультраструктуре у большой группы позвоночных животных включены в две монографии, одна из которых, написанная в соавторстве с В.М. Чертоком [14] (научный редактор В.Н. Швалев), впоследствии удостоена именной премии АН СССР им. Б.И. Лаврентьева «за выдающийся вклад в развитие отечественной морфологии», другая – с Л.Д. Маркиной и Г.Г. Божко [18]. Для меня опубликованные в этих работах материалы представляли особый интерес, поскольку во многом соответствовали выдвинутой нами теории об этапах формирования вегетативной нервной системы в связи с возникновением ее основных медиаторов в пренатальном онтогенезе [33–35].

Впечатляющие открытия, сделанные П.А. Мотавкиным и его учениками, составили весомую базу для понимания важности нервной системы в регуляции мозгового кровообращения. Накопленный за годы исследований обширный фактический материал позволил не только раскрыть основные закономерности функционирования этой регуляторной системы в обычных условиях жизнедеятельности, но и решить ряд проблем, имеющих отношение к коррекции ее расстройств при сосудистых заболеваниях [12, 15]. Особое внимание в указанных выше исследованиях уделялось организации рецепторного аппарата, вазомоторных сплетений различной медиаторной принадлежности и нейромышечных отношений в стенке мозговых артерий [13, 16, 19, 22]. Было установлено, что воздействие вазомоторных нервов на мышечные клетки опосредуется многочисленными и разнообразными эфферентными окончаниями, расположенными



П.А. Мотавкин с Н.И. Швалевой (1984) и В.Н. Шваевым (1998). Москва.

либо в непосредственной близости от поверхности миоцитов, либо отграниченных от них более или менее выраженной прослойкой соединительной ткани наружной оболочки сосуда.

Важно отметить, что во многих публикациях П.А. Мотавкина и его учеников показана взаимосвязь изменений регуляции мозговой гемодинамики с эндотелиальными нарушениями [15, 24, 28]. В 1977 г. из лаборатории П.А. Мотавкина вышла работа, в которой были представлены морфологические доказательства способности эндотелия в совокупности с другими тканевыми элементами внутренней оболочки выполнять регуляторную функцию. Это открытие могло бы стать еще одним выдающимся достижением Владивостокской научной школы. Однако известная оторванность отечественной науки от мировых научных центров не позволила сделать эти в высшей степени интересные материалы достоянием мировой общественности.

П.А. Мотавкиным были значительно расширены представления о структуре головного и спинного мозга. В 1994 г. совместно с Ю.И. Пиголкиным и Ю.В. Каминским им была издана монография, в которой рассмотрены вопросы гистохимической организации спинного мозга человека в норме и при некоторых заболеваниях [12], а в 2005 г. в книге, написанной в соавторстве с С.Г. Калиниченко, приведены новые материалы по типологии, медиаторной специфичности и морфофункциональных связях нейронов коры мозжечка человека и животных [10]. В крупном издании П.А. Мотавкина и И.В. Дюйзен была подробно освещена нейрoхимическая организация ствола мозга [8]. В.Е. Охотин под руководством П.А. Мотавкина провел серию блестящих исследований по изучению топомии холинергических нейронов в ядрах ствола мозга человека [1, 2, 11]. Существенное значение для понимания центральных механизмов управления гемодинамикой имеют исследования В.М. Чертока, опубликовавшего совместно с А.Е. Коцюбой монографию по этой проблеме [23], а также цикл работ по изучению с помощью предложенного ими метода [20, 25] пространственных отношений между нейронами, продуцирующими классические медиаторы и газотрансмиттеры [36, 37]. В вазомоторных центрах мозга

этими же авторами впервые были описаны два пула нейронов, отличающихся не только морфогистохимическими признаками, но и особенностями реакции на изменение кровяного давления [26, 27, 38].

Гистофизиология капилляров мозга была представлена в ряде работ П.А. Мотавкина и его учеников [12, 16, 17, 28]. Некоторые итоги этих исследований подведены в монографии, написанной им совместно с А.В. Ломакиным и В.М. Чертоком [17]. Авторы книги были удостоены премии ДВНЦ АН СССР «За существенный вклад в развитие дальневосточной науки». Замечу, что особенно ценный материал для этих исследований – мозг человека, который в связи с использованными методиками необходимо было брать не позднее трех часов после смерти (что в то время разрешалось немногим учреждениям), предоставлен Институтом клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова Российского кардиологического научно-производственного комплекса МЗ РФ. С этого началось плодотворное научное сотрудничество между Кардиоцентром и кафедрой гистологии Владивостокского медицинского института, которое продолжалось многие десятилетия.

Среди крупных достижений научной школы, созданной П.А. Мотавкиным, следует выделить открытие неизвестной ранее биологам и медикам эндокринной железы. При анализе капиллярного русла и эпандимы спинного мозга П.А. Мотавкиным вместе с его учеником А.П. Бахтиновым была обнаружена новая эндокринная железа [3, 4]. У человека эта железа, получившая название «интраспинальный орган», располагается в пояснично-крестцовом отделе спинного мозга и имеет глиальное происхождение. Как было установлено, ее развитие начинается во время полового созревания и характеризуется активным влиянием на сердечно-сосудистую систему. Важно подчеркнуть, что инволюция интраспинального органа обычно начинается с 35-летнего возраста, что совпадает по времени с начальными проявлениями инволюции симпатического отдела вегетативной нервной системы [33, 34].

Наряду с изданиями книг по гистофизиологии головного и спинного мозга, кровеносных сосудов П.А. Мотавкиным совместно с А.А. Вараксиным была

написана монография по организации нервной системы и регуляции размножения у двусторчатых моллюсков [5], которая позднее была переведена на французский язык [40], а с Ю.С. Хотимченко – книга по биологии размножения и регуляции гаметогенеза и нереста у иглокожих [21]. П.А. Мотавкин публиковал работы и «чисто медицинского» содержания. Так, в монографии «Клиническая и экспериментальная патофизиология легких», написанной вместе с профессором Б.И. Гельцером [6], изложены материалы по значению оксида азота при легочных заболеваниях и детально рассмотрены возрастные аспекты активности нитрооксидсинтазы в организме человека и животных. Несомненное значение для клинической практики имеет работа П.А. Мотавкина и И.В. Дюйзен по изучению нитроксидаергических механизмов формирования боли [7]. Исследование С.С. Едранова, проведенное под руководством П.А. Мотавкина, позволило выявить существенное значение оксида азота для регенерации верхнечелюстного синуса при его травме, что представляет интерес для стоматологов и оториноларингологов [39].

Наступил XXI век, и в приближении к девятому десятилетию жизни П.А. Мотавкин вслед за опубликованными им учебными пособиями «Введение в нейробиологию», «Гистология человека в ответах на вопросы», «Курс лекций по гистологии» [1, 2, 9], издал и свои воспоминания в стихах и прозе о детстве, юности, годах войны, послевоенной жизни: «Командир санвзвода», «Автобиография», «Истории и легенды деревни Дорское», «Экзаменов прекрасная пора». «Любовь и стремление к поэзии, – вспоминал П.А. Мотавкин, – появились у меня еще в ранние школьные годы» [31]. Прошли тяжелое военное время, учеба в Ярославском медицинском институте, аспирантура под руководством известного нейргистолога профессора И.И. Гутнера, и наступил пятидесятилетний период заведывания кафедрой гистологии Владивостокского медицинского института (университета). Как отмечал Павел Александрович в своих воспоминаниях, наряду с преподаванием гистологии и научной работой его всегда увлекала проза и поэтическое творчество.

В своих книгах П.А. Мотавкин постоянно возвращался к тяжелым военным годам:

*Я помню окопы сырые,
Землянку, из бревен накат.
Нас, юных, комбаты седые
Учили не бегать назад.
Я помню, приказ отдавали:
Ребята, вперед и ура!
И мы из окопа вставали,
Шеренгами шли на врага...
Я помню, как после атаки
Под красной фанерной звездой
Мы вас хоронили, солдаты,
Был каждый в сраженьи герой.*

Длительная и успешная деятельность П.А. Мотавкина связана с его глубоким убеждением о необходимости постоянного труда. На стене его кабинета висело изречение Канта: «Работа – лучший способ наслаждаться жизнью. Чем больше ты сделал, тем больше ты жил». Эти слова как нельзя лучше характеризуют Павла Александровича Мотавкина как ученого и человека.

Светлая тебе память, мой друг и коллега!

References

1. Motavkin P.A. Introduction to neurobiology. Vladivostok: Meditsina DV, 2003. 250 p.
2. Motavkin P.A. Lectures on histology. Vladivostok: Meditsina DV, 2007. 360 p.
3. Motavkin P.A., Bakhtinov A.P. Nervous apparatus of medulla ependyma // Morphology. 1972. No. 5. P. 24–31.
4. Motavkin P.A., Bakhtinov A.P. Intraspinal human organ // Morphology. 1990. No. 10. P. 5–19.
5. Motavkin P.A., Varaksin A.A. Histophysiology of a nervous system and the regulation of reproduction in bivalves. M.: Nauka. 1983. 208 p.
6. Motavkin P.A., Geltser B.I. Clinical and experimental lung pathophysiology. M.: Nauka. 1998. 168 p.
7. Motavkin P.A., Dyuyzen I.V. Nitric oxide ergic mechanisms of pain // Pacific Medical Journal. 2003. No. 2. P. 11–16.
8. Motavkin P.A., Dyuyzen I.V. Brainstem. StP.: SpetsLit, 2011. 563 p.
9. Motavkin P.A., Matveeva N.Yu. Histology of a human: inquiry returns. Vladivostok: Meditsina DV, 2005. 240 p.
10. Motavkin P.A., Kalinichenko S.G. Cerebellar cortex. M.: Nauka, 2005. 319 p.
11. Motavkin P.A., Okhotin V.E. Cholinergic nuclei of a human pons cerebelli // Morphology. 1980. Vol. 79, No. 11. P. 23–28.
12. Motavkin P.A., Pigolkin Yu.I., Kaminskiy Yu.V. Histophysiology of a blood circulation in a medulla. M.: Nauka, 1994. 232 p.
13. Motavkin P.A., Chertok V.M. The ultrastructure of arteries nerves of a base of the brain // Morphology. 1979. Vol. 76, No. 1. P. 13–16.
14. Motavkin P.A., Chertok V.M. Histophysiology of vascular mechanisms of cerebral blood circulation. M.: Meditsina, 1980. 200 p.
15. Motavkin P.A., Chertok V.M. Control of cerebral blood circulation disorders. M.: Znanie, 1986. No. 9. 64 p.
16. Motavkin P.A., Chertok V.M. The innervation of the brain // Pacific Medical Journal. 2008. No. 3. P. 11–24.
17. Motavkin P.A., Lomakin A.V., Chertok V.M. Capillaries of the brain. Vladivostok: DVNTS Academy of Science of the USSR Press, 1983. 140 p.
18. Motavkin P.A., Markina L.D., Bozhko G.G. Comparative morphology of vascular mechanisms of cerebral blood circulation in vertebrates. M.: Nauka, 1981. 206 p.
19. Motavkin P.A., Chertok V.M., Pigolkin Yu.I. Morphological studies of regulatory mechanisms of cerebral blood circulation // Morphology. 1982. Vol. 82, No. 6. P. 42–49.
20. Startseva M.S., Kotsyuba A.E., Chertok V.M. Spatial organization of gas-transmitting neurons in the brain // Pacific Medical Journal. 2015. No. 2. P. 38–42.
21. Khotimchenko Yu.S., Motavkin P.A. Biology of reproduction and regulation of gametogenesis and spawning in echinoderms. M.: Nauka, 1993. 168 p.
22. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Nitric oxide in the mechanisms of the afferent innervation of the cerebral arteries // Cytology. 2010. Vol. 52, No. 1. P. 24–29.
23. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Structure of cardiovascular bulbar center. Vladivostok: Meditsina DV, 2013. 164 p.
24. Chertok V.M., Pigolkin Yu.I. Structural transformations of the endarterium pia mater of brain in arteriosclerosis // Journal of

- Neurology and Psychiatry. 1987. Vol.103, No. 2. P. 215–218.
25. Chertok V.M., Kotsyuba A.E., Startseva M.S. The method of computer image registration for the topochemical mapping of brain neurons // Pacific Medical Journal. 2014. No. 3. P. 95–98.
 26. Chertok V.M., Kotsyuba A.E., Startseva M.S. Topochemistry of inter- and intranuclear interneurons of vasomotor medulla in hypertensive rats // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2015. Vol. 160, No. 9. P. 374–379.
 27. Chertok V.M., Kotsyuba A.E., Startseva M.S. Interneurons in the human brainstem // Annals of the Russian academy of medical sciences. 2015. Vol. 70, No. 5. P. 582–588.
 28. Chertok V.M., Pigolkin Yu.I., Miroshnichenko N.V. Histochemical features of the brain capillary bed of a human in aging and arteriosclerosis // Journal of Neurology and Psychiatry. 1984. Vol. 76, No. 7. P. 991–993.
 29. Chertok V.M., Pigolkin Yu.I., Miroshnichenko N.V. A comparative study of cholinergic and adrenergic innervation of the human and some animals brain vessels // Morphology. 1989. Vol. 96, No. 4. P. 28–33.
 30. Chertok V.M., Pigolkin Yu.I., Motavkin P.A. Cholinergic and adrenergic innervation of intracranial arteries in human ontogenesis // Morphology. 1983. Vol. 84, No. 2. P. 22–29.
 31. Chertok V.M., Reutov V.P., Okhotin V.E. Pavel A. Motavkin – a man, a teacher, a scientist // Pacific Medical Journal. 2012. No. 3. P. 7–8.
 32. Chertok V.M., Ryzhavskiy B.Ya., Tseluyko S.S. To the memory of Pavel A. Motavkin // Morphology. 2015. Vol. 148. No. 4. P. 107.
 33. Shvaley V.N. Age-related changes in the regulatory mechanisms of the cardiovascular system and the importance of nitric oxide synthase in health and disease // Cardiology. 2007. No. 5. P. 67–72.
 34. Shvaley V.N. Age-related changes in the nervous system and the heart contained nitric oxide in health and disease // Pacific Medical Journal. 2012. No. 2. P. 94–99.
 35. Shvaley V.N., Reutov V.P., Rogoz A.A. [et al.]. The development of modern ideas about the nature of neurogenic cardiac diseases // Pacific Medical Journal. 2014. No.1. P. 10–14.
 36. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Norepinephrine and nitroxi-dergic neurons of vasomotor nuclei in hypertensive rats // Bull. Experim. Biol. Med. 2015. Vol. 158, No. 5. P. 695–700.
 37. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Comparative study of catecholaminergic and nitroxidergic neurons in the vasomotor nuclei of the caudal part of the brainstem in rats // Neurosci. Behav. Physiol. 2016. Vol. 46, No. 2. P. 229–234.
 38. Chertok V.M., Kotsyuba A.E., Kotsyuba E.P. et al. Two pools of interneurons in the bulbar region of the cardiovascular center of rats // Dokl. Biological Sciences. 2015. Vol. 463, No. 1. P. 178–182.
 39. Edranov S.S. Apoptosis and reparative processes in the mucosa of the maxillary sinus post injury. Vladivostok: Medicina DV. 2014. 148 p.
 40. Motavkin P.A., Varaksin A.A. La reproduction chez les mollusques bivalves. Rôle du système nerveux et régulation. Brest Fc.: IFREMER, 1988. 250 p.
 41. Pigolkin Yu.I., Chertok V.M., Motavkin P.A. Age characteristics of the efferent innervation of the pia mater arteries in the human brain // Neurosci. Behav. Physiol. 1985. Vol. 15, No. 4. P. 343–350.

УДК 611.839.011.018:612.824

НОВЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ ВЕГЕТАТИВНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ И СИСТЕМ ГЕНЕРАЦИИ ОКСИДА АЗОТА В СОСУДАХ МОЗГА

В.П. Реутов¹, В.М. Черток²

¹ Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (117485, г. Москва, ул. Бутлерова, 5а),

² Тихоокеанский государственный медицинский университет (690650, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Ключевые слова: автономная нервная система, регуляция сосудистого тонуса, интраспинальный орган, диоксид азота.

THE NEW UNDERSTANDING OF THE AUTONOMIC NERVOUS SYSTEM ROLE AND THE NITRIC OXIDE GENERATING SYSTEM IN THE BRAIN VESSELS

V.P. Reutov¹, V.M. Chertok²

¹ Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS (5a Butlerova St. Moscow 117485 Russian Federation), ² Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690950 Russian Federation)

Summary. The article provides a brief history of the study of the autonomic nervous system and the results of many years research of P.A. Motavkin and his students, which allowed defining the brain and intramedullary divisions of the autonomic nervous system, referred to it paravascular nerve ganglia and nerve cells, which form functional connections with blood vessels and spinal cord ependymal shell. It is proved that in the brain department of the autonomic nervous system innervates intra-organs blood vessels, paravascular connective tissue, glial and ependymal membrane shell. Intramedullary department within a nervous apparatus of main cerebral vessels is a single unit that can be considered as the departments with a common organization. The concept is analyzed, developed by the authors of the article, according to which the mediators of sym-

pathetic nervous system, norepinephrine and epinephrine, which have antioxidant and antiradical properties, protect blood vessels from damage caused by violations of the cycle of nitric oxide and superoxide anion radicals and the formation of highly toxic and reactive nitrogen dioxide.

Keywords: autonomic nervous system, regulation of vascular tone, intraspinal organ, nitrogen dioxide.

Pacific Medical Journal, 2016, No. 26 p. 10–20.

Вегетативная нервная система (ВНС) рассматривается в настоящее время как комплекс структур, входящих в состав периферического и центрального отделов нервной системы, обеспечивающий регуляцию функций органов и тканей, направленную на поддержание в организме относительного постоянства внутренней среды – гомеостаза. Гомеостаз и адаптация организма к изменяющимся условиям внутренней и внешней среды осуществляется благодаря взаимодействию ВНС с эндокринной и соматической нервной системой. ВНС осуществляет регуляцию сосудистого тонуса, обеспечивает иннервацию желез внутренней секреции,

трофическую иннервацию скелетной мускулатуры и рецепторов, стабильное существование всей нервной системы. Кроме того, ВНС участвует в реализации адаптационно-трофических влияний, а также различных форм физической и психической деятельности.

Сферой основных научных интересов П.А. Мотавкина было исследование сосудистых механизмов регуляции мозгового кровообращения – интимального, миогенного и нейро-эндокринного. Благодаря трудам П.А. Мотавкина и его учеников было создано учение о системе управления мозговой гемодинамикой, включая механизмы, связанные с оксидом азота и продуктами его превращений. Эти работы имеют большое значение для понимания того, как нормальная, физиологическая гемодинамика становится патологической. Есть основания полагать, что со временем труды П.А. Мотавкина и его учеников приобретут еще большее значение, поскольку в них заложен фундамент для исследования многих процессов, которые активируются при нарушениях мозгового кровообращения, ишемических и геморрагических инсультах.

Краткая история изучения ВНС

Первые сведения о структуре и функциях вегетативной нервной системы связывают с именем Клавдия Галена (приблизительно 130–200 гг. н.э.). Исследуя центральную и периферическую нервную систему, он обнаружил рассеянные в разных частях тела нервные узлы, описал блуждающий нерв и дал название «симпатический» пограничному нервному стволу, «содружественно» располагающемуся вдоль позвоночного столба. Эти сведения дошли до физиологов и врачей Нового времени благодаря Андреасу Везалию, который в своей книге «Строение человеческого тела», изданной в 1543 г., представил изображение вегетативных структур, описанных Галеном. Везалий также дал описание симпатических узлов, ганглиев солнечного сплетения, считая, что они отвечают за связь внутренних органов с мозгом. Но термин «вегетативная нервная система» ввел в 1800 г. французский анатом и физиолог М.Ф. Биша. Он считал, что рассеянные в разных частях тела симпатические узлы действуют самостоятельно (автономно), и от каждого из них идут ветви, которые соединяют узлы между собой и обеспечивают влияние на внутренние органы. В 1852 г. французский физиолог Клод Бернар доказал, что раздражение шейного отдела симпатического нервного ствола ведет к расширению сосудов, описав, таким образом, сосудодвигательную функцию симпатических нервов [56].

Однако основы современных представлений о функциях ВНС были заложены английскими физиологами У. Гаскеллом и Дж. Ленгли спустя столетие. У. Гаскелл назвал эту часть нервной системы висцеральной, считая, что она иннервирует только внутренние органы, сосуды и железы внутренней секреции, а Дж. Ленгли – автономной [66, 67].

Американский физиолог Уолтер Кеннон в своих исследованиях уделял особое внимание физиологической роли симпатической нервной системы в реакциях организма [54]. Им совместно с А. Розенблютом был сформулирован закон (закон Кеннона–Розенблюта), согласно которому денервированные структуры повышают чувствительность к действию химических стимулов [6]. Причиной повышения чувствительности, по мнению авторов этого закона, может быть то, что нервы, несущие импульсы к тем или иным тканям, в нормальных условиях оказывают на них постоянное тормозящее действие. При устранении этого «тормоза» порог раздражения снижается, а возбудимость и чувствительность тканей повышаются.

Важным этапом в развитии учения о вегетативной нервной системе стала разработка теории нервизма. Один из ее создателей И.П. Павлов, ставший в 1904 г. нобелевским лауреатом по физиологии и медицине, определял нервизм как «физиологическое направление, стремящееся распространить влияние нервной системы на возможно большее количество деятельности организма» [31]. Согласно развиваемым им представлениям, низшие отделы нервной системы регулируют в основном внутреннюю среду и вегетативные функции, в то время как адаптация к изменениям свойств окружающей среды осуществляется при помощи центральной нервной системы, в которой особая роль принадлежит головному мозгу.

Идеи И.П. Павлова получили дальнейшее развитие в работах Л.А. Орбели, показавшего, что раздражение симпатических нервов снимает утомление скелетной мышцы и восстанавливает ее работоспособность [30]. В работах Л.А. Орбели впервые была установлена адаптационно-трофическая роль нервной системы, сущность которой состоит в том, что она может менять функциональную активность органов в соответствии с условиями существования организма. Денервация, по мнению ученого, как бы возвращает ткань или орган к более раннему этапу развития, когда они реагировали на химические агенты непосредственно. Закон денервации Кеннона–Розенблюта и те представления, которые развил Л.А. Орбели о механизмах повышения чувствительности денервированных тканей, были логически связаны между собой и хорошо дополняли друг друга.

А.Д. Сперанский вошел в историю биологии и медицины как один из создателей общей теории патологических процессов [44]. Обобщив многочисленные данные экспериментальных и клинических исследований, он сформулировал концепцию, согласно которой в основе патологических процессов лежит нарушение трофической функции нервной системы. Эти представления и сама концепция Сперанского в настоящее время известны как «учение о нервной трофике и нервных дистрофиях» [10]. Разработку идей А.Д. Сперанского в России продолжили Я.И. Ажипа [1] и В.А. Говырин [5].

Однако идеи об особой, главенствующей роли нервной системы в организмах млекопитающих

высказывались еще до становления экспериментальной физиологии нервной системы, как научной базы концепции нервизма. В эпоху Нового времени эту концепцию развивал известный немецкий врач Ф. Гофман, который писал о влиянии «нервной системы на все перемены в здоровом и больном организме». Врач из Эдинбурга У. Куллен сформулировал и обосновал «нервный принцип», в соответствии с которым нервы действуют через головной мозг на все ткани и органы млекопитающих и других высших организмов, являясь регулятором всех нормальных и патологических процессов [10].

Роль ВНС в поддержании гомеостаза

Выяснение роли вегетативной нервной системы в поддержании гомеостаза – еще один важный этап в изучении этой проблемы. Понятия «здоровье» и «болезнь» приобрели новый смысл после работ К. Бернара, который впервые выделил в организме процессы, обеспечивающие постоянство внутренней среды. В 1878 г. К. Бернар выдвинул концепцию о постоянстве состава и свойств внутренней среды. Ключевой идеей этой концепции стала мысль о том, что внутреннюю среду составляет не только кровь, но и все плазматические и blastomатические жидкости, которые из нее происходят [10, 55, 66, 67]. Свои представления о механизмах поддержания постоянства внутренней среды сформулировала российский физиолог Л.С. Штерн. Она доказала существование в живых организмах гистогематических барьеров – физиологических преград, разделяющих кровь и ткани. Гистогематические барьеры, по ее мнению, состоят из эндотелия капилляров, базальной мембраны, соединительной ткани, клеточных липопротеиновых мембран. Предложенная теория гистогематических барьеров – это принципиально новый вклад российского физиолога в учение о внутренней среде и значении в поддержании ее постоянства ВНС [10].

Идея о гомеостазе оказалась чрезвычайно плодотворной. В XX веке ее стали рассматривать с позиций кибернетики – науки о целенаправленном и оптимальном управлении сложными процессами. Было установлено, что биологические системы, такие как клетка, мозг, организм, популяция, экосистема функционируют по одну и тому же закону – принципу саморегулирования или автоматического поддержания постоянства регулируемого параметра. Эти идеи развивали Н. Винер [4] и Л. Берталанфи [57]. Последний сформулировал и обосновал обобщенную системную концепцию, задачами которой являются разработка математического аппарата для описания разных типов систем, установление изоморфизма законов в различных областях знания и поиск средств интеграции науки. На основе теоретических работ Л. Берталанфи в биологии возникло новое направление, получившее название «системный подход», а его идеи нашли широкое применение в биологии и медицине.

В настоящее время считают, что физиологический гомеостаз поддерживается вегетативной и сомати-

ческой нервной системой, комплексом гуморально-гормональных и ионных механизмов, составляющих физико-химическую систему организма, а также поведением, в котором велика роль, как наследственных форм, так и приобретенного индивидуального опыта [1]. Теорией, которая смогла объединить все многообразные подходы к пониманию механизмов и проявлений гомеостаза стало учение о функциональных системах, созданное П.К. Анохиным [2]. Применение этой теории к эволюции функций позволило ученому сформулировать понятие системогенеза, как общей закономерности эволюционного процесса.

Начало XX века знаменует нейрохимический этап в изучении ВНС. В 1901 г. Т. Эллиотт высказал предположение о химической передаче нервного импульса в вегетативных узлах, а в 1921 г. в процессе экспериментальных исследований это положение подтвердил австрийский физиолог О. Леви, положив начало учению о медиаторах (нейротрансмиттерах) [3]. Развитие учения о медиаторах нервного возбуждения связано с именами О. Леви, У. Кеннона и российских ученых А.В. Кибякова, Х.С. Коштоянца и Л.С. Штерн [10]. В России одним из сторонников теории О. Леви о химическом звене в передаче нервных сигналов был Е.Б. Бабский. Им впервые установлен факт выделения ацетилхолина и симпатина (норадреналина) в нервных стволах при их раздражении.

В 20–30-х годах XX века в физиологии ВНС широкое распространение получила нейрохимическая классификация Ж. Ленгли и Г. Дейла, согласно которой вегетативные нервные волокна подразделяются на парасимпатические и симпатические [67]. Стало известно, что медиатор симпатической нервной системы – норадреналин – стоек, может циркулировать в крови длительное время, усиливая дистантное генерализованное действие симпатической системы. Ж. Ленгли принадлежит довольно точное описание общего плана строения автономной (вегетативной) нервной системы. Ученый показал наличие в центральной нервной системе центров парасимпатической нервной системы в составе среднего и продолговатого мозга, а также в крестцовых сегментах спинного мозга. Им же были установлены места выхода вегетативных нервных волокон из центральной нервной системы, выделены симпатический и парасимпатический отделы ВНС, описаны синаптические аппараты в вегетативных узлах, где происходит переключение эфферентных нервных импульсов.

Вклад школы П.А. Мотавкина в изучение ВНС

Без преувеличения можно сказать, что ультраструктурные и гистохимические методы открыли новую эпоху в изучении ВНС. Во многом благодаря этим методам, в 60-х годах прошлого века развернулись масштабные исследования электронномикроскопического строения и нейрохимии вегетативной иннервации мозга и его сосудистого обеспечения. Широким потоком шли публикации от ученых известных нейрогистологических школ Германии, США, Швеции, Англии, Испании. У нас

в стране такие исследования проводились преимущественно в крупнейших научных центрах Москвы и Ленинграда, но они были представлены весьма скромно, особенно на фоне растущего числа зарубежных публикаций. Поэтому для многих оказалось неожиданным появление в 70-х годах на страницах отечественных и зарубежных журналов гистохимических работ по холин- и адренергической иннервации сосудов мозга, поступивших из Владивостока [16–18, 28]. Впрочем, уже в начале 80-х годов нейрогистологическая школа П.А. Мотавкина встала в один ряд с такими известными и признанными центрами изучения нейрхимической организации вегетативных сплетений сосудов мозга, как Nielsen, Edvinsson, Owman, Olsen (Лунд, Швеция). В одной из своих статей Edvinsson написал: *«По качеству получаемых изображений адренергических нервных сплетений артерий мозга у большой группы животных и, особенно, у человека, ученых из департамента гистологии Владивостока пока не превзошел никто, да и вряд ли кому-то удалось к ним хотя бы приблизиться»*.

Понятно, что проведение новейших исследований энзимохимии и ультраструктуры нервного аппарата сосудов мозга потребовало адекватного методического обеспечения. Однако для того, чтобы не оставалось сомнений в достоверности полученных материалов, приходилось постоянно совершенствовать методы исследования нейротрансмиттеров и ферментов метаболизма, условия идентификации биогенных аминов, особенно в сосудах мозга человека [11, 16–20, 28, 46].

В результате многолетних изысканий, предпринятых в то время сотрудниками и соискателями кафедры гистологии Владивостокского медицинского института (В.Ф. Баранов, А.П. Бахтинов, Г.С. Власов, В.М. Черток, А.Г. Сидорова, В.Е. Охотин, Ю.И. Пиголкин, В.С. Каредина, Л.П. Осипова, Л.Д. Палащенко, А.В. Ломакин, И.В. Дюйзен, Т.А. Шуматова, Б.Т. Тихвинская, Т.В. Довбыш, О.Н. Воцинина, Г.М. Мухина, С.А. Володин, Г.В. Рева, А.И. Селиванов, М.Г. Иваненко, Г.Г. Божко), получены обширные и убедительные материалы, позволившие выделить мозговой и интрамедуллярный отделы автономной нервной системы, отнести к ней паравазальные нервы и нервные клетки ганглиев, образующие функциональные связи с кровеносными сосудами и эпендимной оболочкой. Было показано, что внутримозговой отдел автономной нервной системы иннервирует интраорганные кровеносные сосуды, паравазальную соединительную ткань, глиальные мембраны и эпендимную оболочку [11, 14, 24–26, 51]. Все они обеспечивают жизнедеятельность нейронов и образуют вспомогательный аппарат мозга, имеющий иннервацию, сходную с соматической. Интрамедуллярный отдел не изолирован от нервного аппарата магистральных мозговых сосудов, составляя с ним непрерывное целое. Это дает основания рассматривать их в единстве как отделы, имеющие общие основы организации.

Известно также влияние гормонов желез внутренней секреции на жизнедеятельность мозга. Особо

зависимы от них эмоции, память, когнитивная сфера, которую гормоны могут активизировать и с меньшим успехом угнетать. Однако кроме эндокринных влияний извне фактически каждый нейрон вырабатывает один или несколько собственных регуляторных нейропептидов с местным или более объемным влиянием на паттерны клеток. Было установлено, что внутри мозга имеются железистые образования с ограниченным временем функционирования, возникающие из эпендимоцитов, на смену им приходит интраспинальный орган [15, 65]. Наличие общих принципов афферентной иннервации и сходных центральных механизмов регуляции паренхимы и кровеносных сосудов мозга свидетельствует о том, что нервная регуляция согласует секреторную и гемодинамическую функции этого органа [12–15]. В эпендимной зоне он формируется последним, но не является единственным. Интраспинальному органу предшествуют такие производные эпендимы, как субкомиссуральный и паравентрикулярный органы и возникающий на основе их эпифиз. Автономная работа этого органа регулируется спинальным нервным механизмом, а соотношение ее с деятельностью других эпендимоглиальных желез – бульбарным механизмом. Последовательность образования, короткий период жизни, замена одного органа другим по краиниоспинальному градиенту у человека позволили сформулировать учение о наличии в мозге каскадной эпендиможелезистой системы [65].

Успешная разработка проблемы нервной регуляции мозговой гемодинамики во многом зависит от решения вопроса о морфологическом субстрате и физиологических механизмах, осуществляющих рецепцию и реализующих вазомоторику. Известно, что сосуды мозга в ответ на стимулы способны активно изменять свой объем. Агенты, вызывающие вазомоторику, воспринимаются довольно разнообразно устроенным рецепторным аппаратом. Афферентный аппарат сосудов обладает возможностями собирать и передавать весь объем сведений о состоянии мозговой гемодинамики в первичные (спинальные) и вторичные (бульбарные) сосудодвигательные центры [7, 12, 13, 21, 26]. Бульбарная иннервация обеспечивает приток крови в магистральные и пиальные артерии. Спинальные механизмы контролируют органную гемоциркуляцию.

Долгое время считалось, что рецепцию и проведение возбуждения обеспечивает ацетилхолин, а холинергический механизм является едва ли не единственным участником этих процессов. В последние годы появились доказательства участия в сосудистой афферентации оксида азота [7, 48, 62]. Последний широко представлен в афферентных структурах головного мозга, а особенности функциональных свойств этой молекулы доказывают возможность ее активного участия в локальных механизмах чувствительной иннервации церебральных сосудов. В стенке артерий (особенно в местах разветвления сосудов) и прилежащих к ним участках мягкой оболочки мозга с большим

постоянством определяются рецепторы, обладающие различной степенью активности NADPH-диафоразы (рис. 1). На более крупных артериях чаще наблюдаются просто устроенные древовидные арборизации, которые с уменьшением калибра сосудов замещаются вначале кустиковидными рецепторами, а затем клубочковыми нервными окончаниями. Клубочковые рецепторы имеют разную величину, форму, концентрацию терминальных волокон и активность фермента.

Гисто- и иммуногистохимическими методами в стенке артерий мягкой оболочки головного мозга человека обнаружены дендриты, терминальные волокна которых содержат L-аспартат. Установлена связь этих рецепторов с нейронами I–III пластин спинного мозга, где обрабатывается ноцицептивная информация [23]. Но особенно чувствительны сосуды мозга к метаболитам, на которые они реагируют увеличением емкости. Физиологические исследования доказали наличие в их стенках хеморецепторов, к которым можно отнести окончания на капиллярах и венах, несущих кровь, насыщенную продуктами обмена.

Ультраструктура рецепторного аппарата в нервах артерий головного мозга довольно разнообразна (рис. 2), но непременным атрибутом таких образований является наличие многочисленных плотно упакованных митохондрий и небольшого количества довольно крупных (до 200 нм) светлых везикул. Такие профили нервов чаще встречаются в составе перивазальных нервов магистральных и пиальных артерий, и значительно реже – по ходу внутримозговых артерий и артериол [19, 20, 27]. Экспериментальными исследованиями установлено, что клубочковые рецепторы, будучи типичными барорецепторами, реагируют на изменения кровяного давления, сигнализируют о тонусе и сократительной деятельности сосудов, о количестве протекающей по ним крови, создавая необходимые предпосылки для обеспечения нормальной работы нейронов головного мозга.

В целом нейрогенный механизм регуляции подвижности кровеносных сосудов мозга образуется при взаимодействии афферентного и эфферентного звеньев. Эфферентное звено, которое не менее разнообразно качественно, а количественно превосходит афферентное, включает холин-, адрен-, пурин- и пептидергические аксоны. Наиболее многочисленные холин- и адренергические волокна, которые образуют густые сплетения на магистральных и крупных пиальных артериях (рис. 3, а–в).

Функциональным эквивалентом нейромышечного синапса принято считать мультиаксональные комплексы, варикозные участки аксонов которых направлены к миоцитам (рис. 3, г). Комплексы состоят из 4–6 и более аксонов одного или разных функциональных назначений и могут находиться от мышц на удалении 750–1000 нм, т.е. имеет место дистантная или объемная нейротрансмиссия [19, 20]. Периадвентициальные пучки находятся на поверхности сосудов и включают миелиновые и безмиелиновые аксоны (рис. 3, д, е).

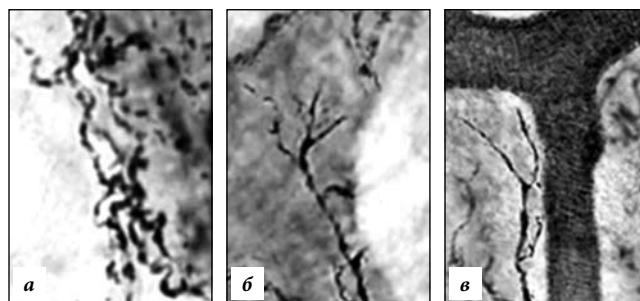


Рис. 1. Рецепторы пиальных артерий (а) и вены (б) и внутримозговой артерии (в).

Метод на NADPH-диафорузу, $\times 200$.

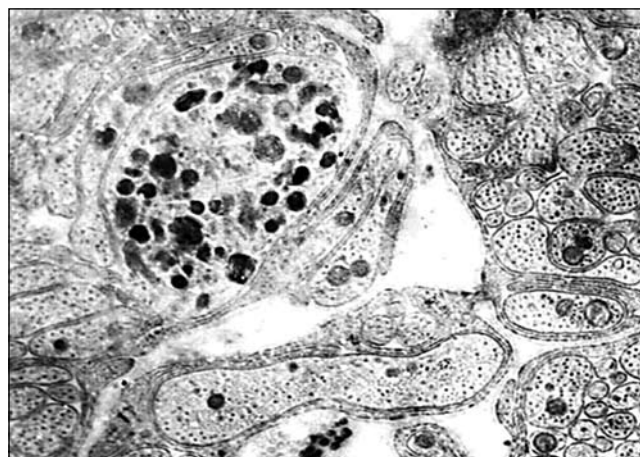


Рис. 2. Ультраструктура рецепторного расширения дендрита в нервном пучке артерии основания мозга кошки.

Электроннограмма, $\times 20\,000$.

Выявлены общие закономерности организации вазомоторных нервных сплетений. Установлено, в частности, что:

- ♦ количественные и качественные преобразования нервных сплетений церебральных сосудов у позвоночных происходят одновременно с развитием мозга и совершенствованием его гемодинамики [20, 29, 51, 68];
- ♦ значительное влияние на организацию холин- и адренергической иннервации оказывают эколого-физиологические адаптации в группах филогенетически родственных животных. У водоплавающих и ныряющих птиц (например, кряквы и баклана) под водой интенсивность гемоциркуляции в большинстве органов снижается, в то время как в мозге и сердце увеличивается, поэтому сосуды этих органов содержат хорошо развитый нервный аппарат [22, 23, 52];
- ♦ перестройка вазомоторных нервных сплетений происходит на протяжении всего онтогенеза. В зависимости от содержания холин- и адренергических проводников на артериях человека можно выделить три периода. Первые аксоны появляются у 8–9-недельных плодов, и их количество увеличивается до 25–30 лет. С 31 года до 55 лет концентрация нервных волокон, число варикозных расширений и уровень активности нейромедиаторов относительно стабильны. Третий этап в развитии сосудистых нервных

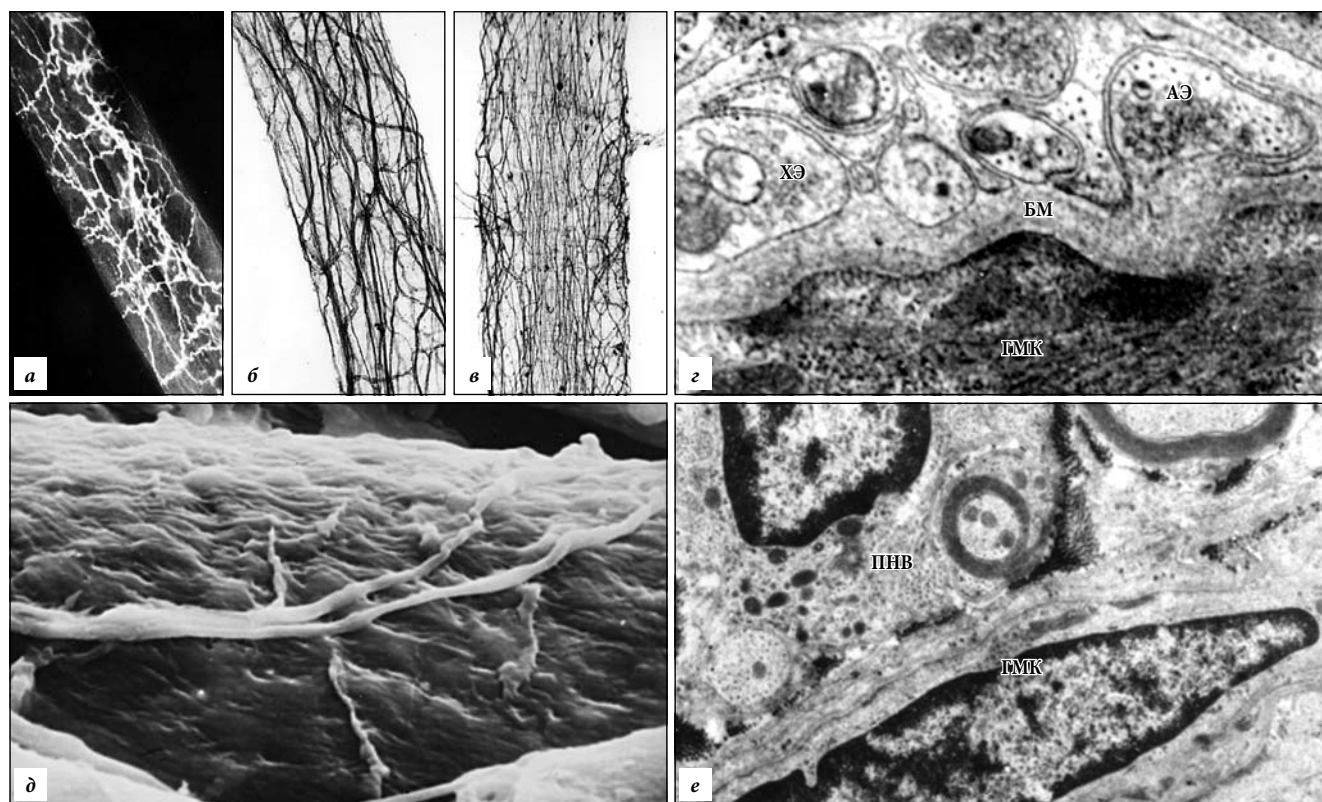


Рис. 3. Нейрохимическая и ультраструктурная организация вазомоторных сплетений мозговых артерий:

а – адренергические нервные волокна, *б*, *в* – холинергические нервные волокна, *г* – мультиаксональный комплекс, *д*, *е* – периваскулярные нервы мозговых артерий (АЭ – адренергические аксоны, БМ – базальная мембрана, ГМК – гладкомышечная клетка артерии, ПНВ – периадвентициальное нервное волокно с безмиелиновыми и миелиновыми проводниками, ХЭ – холинергические аксоны). Гистохимические реакции на ацетилхолинэстеразу (*а*) и холинацетилтрансферазу (*б*, *в*), трансмиссионная (*г*, *е*) и сканирующая (*д*) электронная микроскопия; *а*–*в* – $\times 100$, *г* – $\times 30\,000$, *д* – $\times 1000$, *е* – $\times 15\,000$.

сплетений наступает после 55 лет и характеризуется снижением этих показателей, что имеет индивидуальные особенности [20, 29, 68];

- ♦ концентрация холин- и адренергических нервных волокон находится в зависимости от способа подачи крови к головному мозгу: преобладание в мозговой гемодинамике сосудов каротидной или вертебральной систем [16, 20, 49, 52];
- ♦ содержание эфферентных проводников соответствует типу сосуда и его роли в гемодинамике – наиболее высокая концентрация и наибольшее абсолютное число аксонов присуще магистральным артериям. По мере уменьшения диаметра сосудов стремительнее падают абсолютное количество и концентрация аксонов [8, 19, 52];
- ♦ онто- и филогенетические, а также эколого-физиологические факторы адаптируют гемодинамику к уровню развития мозга и определяют перестройку нервно-регуляторного и исполнительного эффекторного аппарата: имеется прямая зависимость между степенью развития мышечной оболочки сосуда и концентрацией эфферентных аксонов [8, 20, 22, 49].

Одним из аргументов против участия нервов в контроле мозговой гемодинамики считают их малое количество на пияльных и внутримозговых артериях. Между тем это компенсируется высокой концентрацией варикозных расширений, что соответствует большей чувствительности пияльных артерий к нервным стимулам. При электронной микроскопии в варикозных

утолщениях идентифицировано несколько видов синептических пузырьков [13, 19, 24–26]:

- 1) электронно-прозрачные округлые пузырьки диаметром 40–50 нм, маркирующиеся при реакции на ацетилхолинэстеразу и холинацетилтрансферазу, являются принадлежностью холинергических аксонов, которые при светооптических исследованиях дают положительную реакцию на оба фермента;
- 2) пузырьки с электронно-плотной гранулой (40–60 нм), реагирующие на ингибиторы моноаминоксидазы и предшественники норадреналина, определяются в адренергических аксонах, которые выявляют прямым люминесцентно-микроскопическим методом;
- 3) ограниченное число электронно-плотных пузырьков диаметром 120–160 нм с рыхлым аморфным материалом, реагирующих на дипиридамола, который блокирует синтез аденозинтрифосфата – пуринергические аксоны, присутствующие в небольшом количестве у млекопитающих, пресмыкающихся и птиц [22, 25].

Представления о нервной регуляции сосудов мозга значительно расширились после открытия нейропептидов. Наибольшее внимание исследователей привлекло вещество Р, вазоинтестинальный пептид (VIP) и нейропептид Y. Иммуногистохимическими, радиометрическими и биохимическими методами эти пептиды идентифицированы в составе вегетативных нервных сплетений у многих животных и человека. VIP обычно выявляется в составе холинергических, а нейропептид Y – адренергических аксонов [12, 13,

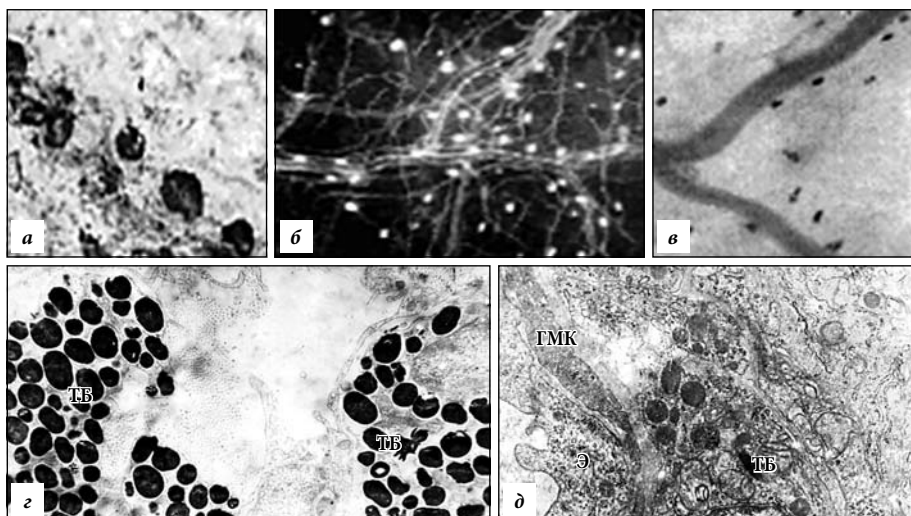


Рис. 4. Тучные клетки в оболочках мозга:

а, б – твердая мозговая оболочка, в – мягкая мозговая оболочка, г, д – тканевой базофил, взаимодействующий с гладкомышечной клеткой пиальной артериолы (ГМК – гладкомышечная клетка, ТБ – тканевой базофил, Э – эндотелий). Гистохимические реакции на NADPH-диафорузу (а), на биогенные амины с гликолевой кислотой (б), на цитохромоксидазу (в), г, д – электронная микроскопия; а – $\times 400$, б, в – $\times 100$, г – $\times 12\,000$, д – $\times 30\,000$.

21, 23]. Полагают, что вещество Р является модулятором боли. Введение животным копсаина приводит к аналгезии ввиду того, что вытяжка из горького перца вызывает мобилизацию вещества Р в афферентных нейронах. Это вещество также обладает способностью релаксировать гладкие миоциты. Пептидергические аксоны с VIP иннервируют преимущественно артерии каротидной системы. VIP вызывает независимую от ацетилхолина релаксацию интракраниальных артерий и артериол. Нейропептид Y по свойствам является типичным вазоконстриктором. В эксперименте он вызывает особенно сильное уменьшение просвета внутримозговых артериол.

Благодаря работам школы П.А. Мотавкина в научный обиход было внесено такое новое понятие, как нейропаракринный аппарат мозговых сосудов [12, 20, 21, 45]. К клеткам, структурно и функционально связанным с кровеносными сосудами головного и спинного мозга, относят хромоаффиноциты, меланоциты и мастоциты. В связи с наличием в цитоплазме материала, оформленного в виде гранул, их называют гранулоцитами, а за участие в обмене биогенных моноаминов – моноаминоцитами. Все они выделяют вазоактивные вещества и могут рассматриваться как сосудистые эндокриноциты с паракринным механизмом действия. Эндокриноциты у представителей позвоночных встречаются в различных соотношениях и, вероятно, в регуляции просвета сосудов имеют разные удельный вес и значение. Располагая широким набором биологически активных веществ, они функционируют в качестве местной и относительно автономной регуляторной системы [9, 20, 22, 45]. У всех млекопитающих гранулоциты располагаются по ходу кровеносных сосудов, в их стенке, часто в непосредственной близости от гладких миоцитов или между пучками коллагеновых волокон мягкой или твердой мозговых оболочек. В твердой оболочке

мозга крыс тучные клетки постоянно встречаются по ходу кровеносных сосудов, а их количество зависит от места расположения, возраста животного и времени суток [47, 50, 61, 63]. Функциональная активность таких клеток возрастает при электромагнитном и шумо-вибрационном воздействиях [58–60].

Гистохимическими методами в гранулоцитах показано наличие NADPH-диафорузы, Ca^{2+} - и Mg^{2+} -зависимой аденозинтрифосфатазы, цитохромоксидазы, норадреналина, серотонина, гистамина (рис. 4, а–в), концентрация которых тесно связана с функциональным состоянием клеток [9, 28, 44, 58–60]. Биохимическими и цитофотометрическими исследованиями установлено, что суммарное содержание индолалкиламинов и катехоламинов у рыб, птиц и ряда лабораторных животных не отличается, а у человека значительно снижено [22, 23]. Вазопрессин идентифицирован в меланоцитах человека и хромоаффиноцитах лягушки, хомяка, крысы, морской свинки, коровы, VIP и вазопрессин обнаружены в тканевых базофилах крысы [12, 13].

Влияние эндокриноцитов на функции гладких миоцитов осуществляется несколькими путями. Во-первых, биологически активные вещества передаются через соединительнотканые элементы твердой и мягкой мозговых оболочек (рис. 4, г). Ее фибробласты способны аккумулировать биогенные моноамины и сохранять их в активном состоянии до 5 суток. Другой компонент наружной оболочки – коллагеновые волокна – образует своеобразные фибропроводы для инкретов, что создает условия для их локальной аппликации и местной реакции сосуда. Во-вторых, катехоламины и индолалкиламины, выведенные тучными клетками, лежащими в наружной оболочке артерий, в результате прямого воздействия на гладкие миоциты вызывают изменения просвета сосудов (рис. 4, д). В-третьих,

биогенные моноамины тучных клеток могут захватываться адренергическими аксонами и использоваться для нейрогенной регуляции сосудистых реакций.

Холинергические аксонные терминалы со светлыми синаптическими пузырьками у большинства видов располагаются от внешней клеточной мембраны тучной клетки на расстоянии от 20 до 200 нм. Во внешней мембране сосудистых эндокриноцитов обнаружена ацетилхолинэстераза. Торможение функции фермента эзеринном или прозеринном сопровождается реакцией тканевых базофилов и меланоцитов, сходной с таковой при введении ацетилхолина, за счет накопления его эндогенного пула. Можно считать, что сосудистые эндокриноциты по своему положению занимают место эффекторной клетки, подобное периферическому вегетативному нейрону по следующим причинам:

- ♦ морфологически и функционально связаны с преганглионарными холинергическими аксонами, как и все эндокринные клетки;
- ♦ содержат вазоактивные вещества – катехоламины, индолалкиламины, адренолютины, хиноиды и полипептиды;
- ♦ при введении экзогенного ацетилхолина и других агонистов М-рецепторов реагируют дегрануляцией и секрецией биологически активных веществ;
- ♦ антихолинэстеразные вещества ингибируют ацетилхолинэстеразу клетки и вызывают реакцию, сходную с таковой на введение ацетилхолина;
- ♦ реакция клеток полностью подавляется атропином – специфическим блокаторм М-рецепторов.

На сосудистые эндокриноциты помимо холинергических конвергируют адренергические аксоны, терминалы которых образуют синаптические контакты с весьма узкой щелью (7–20 нм). В опытах с раусеდიлом показано, что мобилизация биоге́нных моноаминов раньше начинается и раньше заканчивается в моноаминергических аксонах, чем в тканевых базофилах, тогда как восстановление этих веществ происходит в обратном порядке [20, 28, 45]. В онтогенезе существует тот же порядок, т.е. появление биоге́нных моноаминов в хромаффиноцитах и тканевых базофилах опережает их появление в аксонах. На основе этих наблюдений высказана гипотеза о коррелированном обмене катехоламинов между моноаминоцитами и адренергическими волокнами. Однако другое, очевидно более важное значение адренергических связей заключено в том, что их медиатор через адренорецепторы тормозит дегрануляцию и секрецию сосудистыми эндокриноцитами вазоактивных веществ.

Влияние эндокриноцитов на функции гладких миоцитов осуществляется несколькими путями. Во-первых, биологически активные вещества передаются через соединительнотканые элементы наружной оболочки (рис. 4, д). Ее фибробласты, как сказано выше, способны аккумулировать биоге́нные моноамины и сохранять их в активном состоянии до 5 суток. Другой компонент наружной оболочки – коллагеновые волокна – образует своеобразные фибропроводы для инкретов, что создает условия для их локальной

аппликации и местной реакции сосуда. Во-вторых, при дегрануляции тучных клеток катехоламины и индолалкиламины, находящиеся в элементарных гранулах, так же как и пептиды, проникая в кровоток, воздействуют через эндотелийзависимый механизм на группу сосудов микрорайона. В-третьих, экзоцитированные биоге́нные моноамины могут захватываться адренергическими аксонами и использоваться для нейрогенной регуляции сосудистых реакций.

Новая концепция: симпатический отдел ВНС защищает клетки сосудов от диоксида азота, образующегося при нарушении циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала

Вегетативная иннервация сосудов мозга и системы генерации $\bullet\text{NO}$ имеют большое значение для их защиты от образования атеросклеротических бляшек и от ишемического и геморрагического инсультов [36, 37, 42, 54]. На материале ранних вскрытий (после внезапной смерти и погибших при несчастных случаях) с помощью нейрогистохимических методов было показано, что еще до развития явных атеросклеротических изменений сосудистая стенка в местах разветвления сосудов претерпевает изменения, которые выражаются в снижении средней суммарной плотности адренергических нервных сплетений [43, 53, 54]. Кроме того, в участках сосудистой стенки, предрасположенной к атеросклерозу, отмечались явления деафферентации. В частности, было обнаружено значительное снижение количества барорецепторов – инкапсулированных чувствительных нервных окончаний, которые, как известно, в норме сигнализируют о внутрисосудистом давлении. Вместе с тем исследования показали, что процесс десимпатизации стенки сосуда и нарушение его нервной трофики предшествуют развитию атеросклеротических изменений [53, 54]. Каковы же могут быть причины десимпатизации стенки сосуда и нарушения его нервной трофики?

В нормальных физиологических условиях циклическая организация оксида азота и супероксидного анион-радикала предотвращает образование высокорекреационного соединения диоксида азота ($\bullet\text{NO}_2$) [32–35, 42]. Такая циклическая организация активных форм азота и кислорода защищает клетки и ткани животных от повреждений [41–43, 69]. В местах бифуркации сосудов, где выявляется максимальная активность нитроксидсинтазы (рис. 1, в) имеет место повышенное сдвиговое напряжение на эндотелии, а следовательно, и образование повышенных концентраций $\bullet\text{NO}$. При любых патологических состояниях, связанных с воспалениями, гипоксией/ишемией, травмами головного мозга увеличивается выработка не только оксида азота, но и $\bullet\text{NO}_2$, о чем свидетельствует присутствие нитротирозина, являющегося продуктом свободнорадикального (при участии $\bullet\text{NO}_2$) нитрования тирозина [37, 40–42]. Появление $\bullet\text{NO}_2$ и нитротирозина может происходить в условиях нарушения циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала, когда избыточное количество $\bullet\text{NO}$ не способно полностью превратиться в ионы NO_3^- , а сами молекулы $\bullet\text{NO}_2$ могут

вступать в непосредственное взаимодействие с кислородом и супероксидом, приводя к образованию $\bullet\text{NO}_2$ [35–38, 42]. Последний вследствие чрезвычайно высокой активности способен окислять практически все органические соединения, в том числе ненасыщенные жирные кислоты [35, 36], повреждать мембраны клеток и субклеточных структур [39, 41, 64].

Таким образом, предложена новая концепция, согласно которой симпатическая ВНС с ее медиаторами норадреналином и адреналином, обладающими антиоксидантными и антирадикальными свойствами, защищает клетки сосудов крови от повреждений, вызванных нарушениями циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала и образованием высокотоксичного и реакционноспособного $\bullet\text{NO}_2$ [42, 43]. Эта концепция хорошо согласуется с идеями П.А. Мотавкина и объясняет природу молекулярных механизмов, при помощи которых ВНС защищает клетки сосудов от патологических процессов, вызванных активацией свободно-радикальных реакций и появлением высокотоксичного и реакционноспособного $\bullet\text{NO}_2$.

Заключение

В целом можно сказать, что вклад школы П.А. Мотавкина в создание новых представлений о вегетативной нервной системе особенно значителен в отношении иннервации мозга. Многообразие полученных им и его учениками данных по нейрохимии и функции интрамуральных аксонов укрепили представления о значении нейрогенного механизма в регуляции сосудов мозга при помощи прямых и опосредованных через сосудистые эндокриноциты влияний на локомоторные функции гладких миоцитов. Намечались перспективы изучения взаимосвязей между нейрогенной и зависимой от эндотелия регуляцией тонуса сосудов. На протяжении сосудистого русла мозга выявлен градиент нервной и интимальной регуляции: по мере сокращения диаметра артерий уменьшается значение нервных и усиливается роль эндотелиальных механизмов. Имеются данные о зависимости морфофункциональной целостности эндотелиального пласта от состояния нервного аппарата артерий.

Суть новых представлений о иннервации мозга, которые развивал П.А. Мотавкин, состоит в том, что интрамедуллярный отдел автономной нервной системы, кроме кровеносных сосудов, распространяет свои регуляторные влияния и на некоторые другие образования центральной нервной системы. Исследование эпендимной зоны мозга и ее сосудистых сплетений доказало участие вегетативных нервных механизмов в регуляции образования ликвора и секреторной деятельности органов, имеющих эпендимозависимый генез. Полученные при изучении эпендимы спинного мозга материалы позволили открыть новую эндокринную железу – интраспинальный орган.

Систематизация полученных за последние годы данных становится все более насущной задачей, решение

которой может быть приближено с помощью выдвижения новых гипотез, основанных, в том числе, на фундаментальных исследованиях вегетативной иннервации мозга Владивостокской нейростологической школы выдающегося ученого П.А. Мотавкина. Поэтому можно сказать, что создано учение о системе управления мозговой гемодинамикой, включающее механизмы, связанные с оксидом азота и продуктами его превращений.

Какое значение фундаментальные работы П.А. Мотавкина могут иметь для решения вопросов патофизиологии кровообращения? Эти работы важны для дальнейшего понимания того, как нормальная, физиологическая гемодинамика становится патологической. В настоящей статье предложена новая концепция, согласно которой симпатическая ВНС с ее медиаторами норадреналином и адреналином, обладающими антиоксидантными и антирадикальными свойствами, защищает клетки сосудов крови от повреждений, вызванных нарушениями циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала и образованием высокотоксичного и реакционноспособного диоксида азота. Эта концепция хорошо согласуется с фундаментальными работами П.А. Мотавкина и его школы по изучению ВНС и систем генерации оксида азота в мозге, которые он сам, его ученики, сотрудники и коллеги исследовали с помощью гистохимических методов по выявлению локализации нитроксидсинтазы.

References

1. Azhipa Ya.I. The trophic function of the nervous system. M.: Nauka, 1990. 672 p.
2. Anokhin P.K. The theory of functional systems. M.: Nauka, 1980. 460 p.
3. Babskiy E.B. Otto Loewi (On the 100th anniversary of his birth) // USSR Journal of Physiology. 1973. Vol. 9. P. 6–8.
4. Viner N. Cybernetics, or control and communication in the animal and the machine. M.: Nauka, 1983. 338 p.
5. Govyrin V.A. Trophic function of the sympathetic nerves and skeletal muscles. L.: Nauka, 1967. 132 p.
6. Kennon U., Rosenblut A. Sensitisation denervated structures. Denervation law. M.: IIL, 1951. 263 p.
7. Kotsyuba A.E., Chertok V.M. Nitric oxide-containing elements of sensory innervation of cerebral arteries // Pacific Medical Journal. 2009. No. 2. P. 69–72.
8. Kotsyuba A.E., Babich E.V., Chertok V.M. Vasomotor innervation of the arteries of the pia mater of brain of a human with hypertension // Journal of Neurology and Psychiatry. 2009. No. 9. P. 56–62.
9. Kotsyuba A.E., Chertok V.M., Kotsyuba E.P. [et al.]. Features cytochemistry of mast cells in some organs of rats // Cytology. 2008. Vol. 50, No. 12. P. 1023–1029.
10. Lisitsin Yu.P. Medicine theory in the 20 cent. M.: Meditsina. 1999. 176 p.
11. Motavkin P.A. Acetylcholine dependent neurons and patterns of communication in the human brain: preprint. Vladivostok: DVNTS Academy of Science of the USSR Press, 1982. 28 p.
12. Motavkin P.A. What and how the brain innervated? // Morphology. 2007. No. 1. P. 82–84.
13. Motavkin P.A. The long road to the truth // Pacific Medical Journal. 2012. No. 2. P. 9–16.
14. Motavkin P.A., Bakhtinov A.P. Nervous apparatus of medulla ependyma // Archive of Anatomy, Histology, and Embryology. 1972. No. 5. P. 24–31.

15. Motavkin P.A., Bakhtinov A.P. Intraspinal human organ // *Morphology*. 1990. No. 10. P. 5–19.
16. Motavkin P.A., Vlasov G.S. Histophysiological features of effector innervation of arteries of the base of brain in ontogenesis in rats // *Morphology*. 1976. No. 7. P. 41–46.
17. Motavkin P.A., Dovbysh T.V. Cholinergic nervous apparatus of blood vessels of pia mater // *Morphology*. 1970. No. 7. P. 113–116.
18. Motavkin P.A., Okhotin V.E. Histochemistry of choline in the spinal cord and spinal sites of a cat // *Morphology*. 1978. Vol. 75, No. 9. P. 52–56.
19. Motavkin P.A., Chertok V.M. The ultrastructure of arteries nerves of a base of the brain // *Morphology*. 1979. Vol. 76, No. 1. P. 13–19.
20. Motavkin P.A., Chertok V.M. Histophysiology of vascular mechanisms of cerebral blood circulation. M.: Meditsina, 1980. 200 p.
21. Motavkin P.A., Chertok V.M. The innervation of the brain // *Pacific Medical Journal*. 2008. No. 3. P. 11–23.
22. Motavkin P.A., Markina L.D., Bozhko G.G. Comparative morphology of vascular mechanisms of cerebral blood circulation in vertebrates. M.: Nauka, 1981. 206 p.
23. Motavkin P.A., Pigolkin Yu.I., Kaminskiy Yu.V. Histophysiology of a blood circulation in a medulla. M.: Nauka, 1994. 233 p.
24. Motavkin P.A., Chertok V.M., Bozhko G.G. Changing of large granular vesicles in sympathetic nerve endings under the influence of certain pharmacological agents // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1977. No. 6. P. 700–702.
25. Motavkin P.A., Chertok V.M., Bozhko G.G. A new type of axons in the nerves of the arteries of the brain base of vertebrates // *Report of the Academy of Science of the USSR*. 1977. Vol. 236, No. 3. P. 736–737.
26. Motavkin P.A., Chertok V.M., Pigolkin Yu.I. Morphological studies of regulatory mechanisms of cerebral blood circulation // *Морфология*. 1982. Vol. 82, No. 6. P. 42–48.
27. Motavkin P.A., Pigolkin Yu.I., Lomakin A.V., Chertok V.M. Receptor glomeruli and their ultrastructure in the arteries of the human pia mater // *Morphology*. 1989. Vol. 97, No. 9. P. 14–19.
28. Motavkin P.A., Karedina V.S., Chertok V.M. Effect of agonists and sympatholytics on adrenergic nerve fibers and mast cells of the dura mater // *Morphology*. 1977. Vol. 73, No. 5. P. 26–32.
29. Motavkin P.A., Chertok V.M., Lomakin A.V. [et al.]. Age-related changes of the nervous apparatus of the brain and spinal cord vessels // *Forensic examination*. 2012. Vol. 3. P. 10–12.
30. Orbeli L.A. Adaptive trophic function of the nervous system. Selected works. L.: Nauka. 1962. Vol. 2. 608 p.
31. Pavlov I.P. Complete works. L.: Academy of Science of the USSR Press, 1951. Vol. 1. 457 p.
32. Reutov V.P. Nitric oxide cycle in mammals organisms // *Biological Chemistry Reviews*. 1995. Vol. 35. P. 189–228.
33. Reutov V.P. Biochemical predestination of NO-synthase and nitrite reductase component of nitric oxide cycle // *Biochemistry*. 1999. Vol. 64, No. 5. P. 634–651.
34. Reutov V.P. Nitric oxide cycle in mammals organisms and the cyclicity principle // *Biochemistry*. 2002. Vol. 67, No. 3. P. 353–376.
35. Reutov V.P. Medical and biological aspects of nitric oxide cycle and superoxide anion radical // *Bulletin RAMS*. 2000. No. 4. P. 35–41.
36. Reutov V.P., Azhipa Ya.I., Kayushin L.P. Investigation of paramagnetic centers formed by reacting nitrogen dioxide with oleic acid and tyrosine // *Report of the Academy of Science of the USSR*. 1978. Vol. 241. No. 6. P. 1375–1377.
37. Reutov V.P., Kayushin L.P., Sorokina E.G. The physiological role of nitric oxide cycle in humans and animals // *Human Physiology*. 1994. Vol. 20, No. 3. P. 165–174.
38. Reutov V.P., Sorokina E.G. NO-synthase and nitric oxide, nitrate reductase components cycle // *Biochemistry*. 1998. Vol. 63, No. 7. P. 1029–1040.
39. Reutov V.P., Sorokina E.G., Kositsyn N.S. [et al.]. The problem of nitrogen oxide in biology and medicine, and the principle of cyclicity. M.: URSS. 2003. 94 p.
40. Reutov V.P., Sorokina E.G., Okhotin V.E. [et al.]. Cyclic conversion of nitric oxide in the body of mammals. M.: Nauka. 1997. 156 p.
41. Reutov V.P., Sorokina E.G., Pinelis V.G. [et al.]. Do nitrite ions participate in the regulation of inner- and intracellular signaling systems? // *Medical Chemistry*. 1994. Vol. 40, No. 6. P. 27–30.
42. Reutov V.P., Sorokina E.G., Shvaley V.N. [et al.]. The possible role of the nitrogen dioxide produced in places vascular bifurcation, in the processes of their damage in hemorrhagic stroke and the formation of atherosclerotic plaques // *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 2012. T. 43, No. 4. P. 73–93.
43. Reutov V.P., Sorokina E.G., Shvaley V.N., Okhotin V.E. The concept of the development of atherosclerosis: the pathological mechanisms of vascular insufficiency // *Journal of Neurology and Psychiatry*. 2014. Vol. 114, No. 8. P. 55–56.
44. Speranskiy A.D. Elements of building a theory of medicine. M.: Medgiz, 1935. 344 p.
45. Chertok V.M. Mast cells of outer coat of arteries of the brain base // *Morphology*. 1980. No. 11. P. 72–79.
46. Chertok V.M. Histochemical characteristics of the transport ATPase in the human brain capillaries // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1984. Vol. 97, No. 3. P. 375–377.
47. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Local differences of tissue basophils of dura mater of the brain in rats // *Morphology*. 1993. Vol. 104, No. 1. P. 40–49.
48. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Nitric oxide in the mechanisms of the afferent innervation of the cerebral arteries // *Cytology*. 2010. Vol. 52, No. 1. P. 24–29.
49. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Age-related features of regulation of vasomotor arteries of pia mater of the brain in rats // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2010. Vol. 149, No. 3. P. 340–344.
50. Chertok V.M., Laryushkina A.V., Kotsyuba A.E. Age-related features of biological rhythms of tissue basophils of dura mater of the brain in rats // *Morphology*. 1994. Vol. 106. No. 1–3. P. 63–70.
51. Chertok V.M., Pigolkin Yu.I., Motavkin P.A. Cholinergic and adrenergic innervation of intracranial arteries in human ontogenesis // *Morphology*. 1983. Vol. 84, No. 2. P. 22–29.
52. Chertok V.M., Pigolkin Yu.I., Motavkin P.A. A comparative study of cholinergic and adrenergic innervation of the human brain vessels and some animals // *Morphology*. 1989. Vol. 96, No. 4. P. 28–33.
53. Shvaley V.N., Reutov V.P., Rogoza A.N. [et al.]. An analysis of age-related changes of the nervous trophism cardiovascular system in normal and pathological conditions // *Morfologicheskoye Vedomosti*. 2012. No. 3. C. 6–11.
54. Shvaley V.N., Reutov V.P., Rogoza A.N. [et al.]. The development of modern ideas about the nature of neurogenic cardiac diseases // *Pacific Medical Journal*. 2014. No. 1. P. 11–15.
55. Yaroshevskiy M.G., Chesnokova S.A. Walter Cannon (1871–1945) M.: Nauka, 1976. 374 p.
56. Ackerknecht E.H. The history of the discovery of the vegetative (autonomic) nervous system // *Med. Hist*. 1974. Vol. 18, No. 1. P. 1–8.
57. Bertalanffy L. General system theory – A critical review // *General Systems*. 1962. Vol. 7. P. 1–20.
58. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. In vivo microscopy of rat basophils irradiated with He-Ne laser // *Bull. Experim. Biology and Medicine*. 1994. Vol. 116. P. 1171–1173.
59. Chertok V.M., Kotsyuba A.E., Laryushkina A.V. The histophysiology of tissue basophils in the dura mater of the rat during laser irradiation // *Bull. Experim. Biology and Medicine*. 1989. Vol. 108, No. 10. P. 493–495.
60. Chertok V.M., Laryushkina A.V., Kotsyuba A.E. Biological rhythms of tissue basophils in the dura mater of the rat during

- exposure to noise/vibration // Bull. Experim. Biology and Medicine. 1991. Vol. 111, No. 4. P. 410–411.
61. Chertok V.M., Laryushkina A.V., Kozhevnikova T.A. Local characteristics of the temporal organization of tissue basophils in the dura mater in adult rats // Neuroscience and Behavioral Physiology. 2001. Vol. 31, No. 3. P. 339–343.
 62. Kotsyuba A.E., Chertok V.M., Kotsyuba E.P. Nitroxidergic nerve fibers of intracerebral vessels // Neuroscience and Behavioral Physiology. 2010. Vol. 40, No. 4. C. 451–455.
 63. Laryushkina A.V., Chertok V.M. Biological rhythms of tissue basophils in various sites of rat dura mater // Bull. Experim. Biol. Med. 2000. Vol. 129, No. 1. C. 83–85.
 64. Lundberg J.O., Gladwin M.T., Ahluwalia A. [et al.]. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics // Nat. Chem. Biol. 2009. Vol. 5, No. 12. P. 865–869.
 65. Motavkin P.A., Bactinov A.P. Das intraspinal Organ des Menschen // Medizin in Fernen Osten der UdSSR. Stuttgart: Hippokrates verlag, 1975. P. 51–59.
 66. Navarro X. Physiology of autonomic nervous system // Rev. Neurol. 2002. Vol. 35, No. 6. P. 553–562.
 67. O'Connor W.J. British physiologists 1885–1914. A biographical dictionary. Manchester: Manchester University Press, 1991. 575 p.
 68. Pigolkin Yu.I., Chertok V.M., Motavkin P.A. Age characteristics of the efferent innervation of the pia mater arteries in the human brain // Neuroscience and Behavioral Physiology. 1985. Vol. 15, No. 4. P. 343–350.
 69. Reutov V.P., Krushinsky A.L., Kuzenkov V.S., Koshelev V.B. Protective effect of hypoxic preconditioning on stress resistance of Krushinsky-Molodkina rats genetically prone to audiogenic epilepsy // Hypoxia Med. J. 2004. Vol. 12, No. 3–4. P. 51–54.

Поступила в редакцию 20.09.2015.

Новые представления о роли вегетативной нервной системы и систем генерации оксида азота в сосудах мозга

В.П. Реутов¹, В.М. Черток²

¹ Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (117485, г. Москва, ул. Бутлерова, 5а), ² Тихоокеанский государственный медицинский университет (690650, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Резюме. Приводится краткая история изучения вегетативной нервной системы и результаты многолетних исследований П.А. Мотавкина и его учеников, позволившие выделить мозговой и интрамедуллярный отделы вегетативной нервной системы (ВНС), отнести к ней паравазальные нервы и нервные клетки ганглиев, образующих функциональные связи с кровеносными сосудами и эпендимной оболочкой спинного мозга. Доказано, что внутримозговой отдел ВНС иннервирует интраорганные кровеносные сосуды, паравазальную соединительную ткань, глиальные мембраны и эпендимную оболочку. Интрамедуллярный отдел составляет с нервным аппаратом магистральных мозговых сосудов единое целое, что позволяет рассматривать их как отделы, имеющие общую организацию. Анализируется концепция, развиваемая авторами статьи, согласно которой медиаторы симпатического отдела ВНС норадреналин и адреналин, обладающие антиоксидантными и антирадикальными свойствами, защищают сосуды от повреждений, вызванных нарушениями циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала и образованием высокотоксичного и реакционно-способного диоксида азота.

Ключевые слова: автономная нервная система, регуляция сосудистого тонуса, интраспинальный орган, диоксид азота.

УДК 611.822.018:616.8-091.81

СТРОЕНИЕ СЕРОГО ВЕЩЕСТВА СПИННОГО МОЗГА: НЕОПРЕДЕЛЕННОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В.В. Порсева, В.В. Шилкин

Ярославский государственный медицинский университет (150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5)

Ключевые слова: серое вещество спинного мозга, ядро, пластинка, нейрон.

STRUCTURE OF THE GRAY MATTER OF THE SPINAL CORD – QUESTIONS AND RESEARCH ASPECTS

Porseva V.V., Shilkin V.V.

Yaroslavl State Medical University (5 Revolyutsionnaya St. Yaroslavl 150000 Russian Federation)

Summary. The article with the historical positions presented from the segmental to the neural structure of the gray matter of the spinal cord in humans and animals. Provides contradictory information about the topography of the nuclei of the autonomic nervous system, sensory and motor nuclei of the gray matter of the spinal cord, commissural, projection and intrinsic (not commissural, not projection) interneurons. Expands upon the topography of the laminae Rexed, criteria for identification of their cellular composition, orientation processes of the nerve cells, neurochemical characterization of the neuropile. Special attention is paid to the description of the diversity of neurons by shape, size, orientation processes, which are combined in the nucleus and laminae; similarity of the neurons that have the same function. At the same time, shown that neurons of the same shape and topography can perform various functions. Morphological studies are needed to identify groups of neurons that form functional clusters, modules, macro – and microneurons network.

Keywords: gray matter of the spinal cord, nucleus, lamina, neuron.

Pacific Medical Journal, 2016, No. 2, p. 20–30.

Учение о структурно-функциональной организации спинного мозга (СМ) постоянно дополняется новыми данными, помогающими понять закономерности его нейронного строения и функции как органа центральной нервной системы. Вместе с тем, осмысление новых данных создает, если не видимость аннигиляции традиционных, то неопределенность таких понятий как сегмент СМ, ядро серого вещества СМ, вставочный нейрон и других, весьма распространенных в научной и учебной литературе.

Сегменты, столбы и ядра спинного мозга

Основой сегментарного строения СМ являются данные о метамерном делении его серого вещества, имеющего связь с определенными участками кожи (дерматомы), внутренними органами (спланхнотомы) и мышцами (миотомы). Каждый метамер связан нервными

волокон, предшественниками нервов, с определенным участком нервной трубки (невромер).

Для удобства вся сложная структура СМ разбивается на отдельные части (отделы), сегменты, ядра, состоящие из нервных клеток, воспринимающих чувствительные импульсы, управляющих движениями, оказывающих адаптационно-трофические влияния на органы и ткани. С этой точки зрения оправданным является выделение следующих сегментарных уровней локализации центров управления: органами шеи (и органов, связанных с ней по развитию) – C_1 – C_4 , верхней (у животных – передней) конечностью – C_5 – T_2 , органами грудной и брюшной полостей – T_3 – L_1 , симпатической иннервацией тела – C_8 – L_{2-4} , нижней (у животных – задней) конечностью и промежностью – L_2 – S_5 , Co_1 , парасимпатической иннервацией органов таза и промежности – S_2 – S_4 .

Считается, что доказательством сегментарного строения СМ, помимо данных филогенеза и онтогенеза, служат:

- 1) наличие периодичности в выходе передних (вентральных) и задних (дорсальных) корешков спинномозговых нервов;
- 2) симметричность парных корешков спинномозговых нервов;
- 3) наличие межсегментарных промежутков, расположенных между корешками.

Однако анатомическое изучение наружного строения СМ как раз и не выявляет указанных особенностей:

- 1) количество корешковых нитей непостоянно в rostrocaudальном направлении [1, 6];
- 2) корешковые нити не имеют билатеральной симметричности [7];
- 3) протяженность входа/выхода корешковых нитей в СМ часто ассиметрична [2] и, определяя протяженность сегмента, различна в rostrocaudальном направлении;
- 4) часто нити соседних корешков перекрывают зоны входа/выхода в СМ, что исключает возможность его сопоставимого подразделения на сегменты снаружи [42];
- 5) внутри СМ распространение волокон корешковых нитей более широко, нежели зона их нахождения в латеральных бороздах его наружной поверхности [25].

Таким образом, создается впечатление об однородности внешнего (наружного) строения спинного мозга, что и является основой критики термина «сегмент».

Насколько же однородно внутреннее строение серого вещества СМ? Если рассматривать фронтальные сечения, разделяющие СМ человека на столбы, то гетерогенность их по ширине и по толщине очевидна. Это связано с размерами в его шейном отделе, на уровне шейного утолщения, в грудном отделе, на уровне пояснично-крестцового утолщения, в крестцово-копчиковом отделе. Подобная гетерогенность проявляется и при исследовании нейронов, образующих ядра серого вещества. Аналогичная картина отмечается и в СМ животных.

Вертикальная ориентация человека и горизонтальная животных заставляет в дальнейшем использовать универсальную биологическую терминологию – вентральный, дорсальный, ростральный, каудальный, поперечный, когда речь идет об ориентации структур СМ, направленности тел нейронов, их отростков.

Следует обратить внимание, что обычно для деления нейронов употребляют термины, закрепленные в *Terminologia Histologica* (2008, 2009): мотонейрон (двигательный нейрон), афферентный нейрон (сенсорный, чувствительный нейрон, первичный чувствительный нейрон, первичный афферент), интернейрон (вставочный нейрон), комиссуральный нейрон, проекционный нейрон, висцеральный двигательный нейрон, преганглионарный нейрон, автономный нейрон, а также употребляемые в биологической литературе термины: интринзичный или инсилатеральный интернейрон (некомиссуральный и непроекционный, отростки которого не покидают область нахождения тела нейрона).

По мнению П.Г. Пивченко [7], в СМ отсутствуют сегментарно расположенные центры (ядра): все комплексы морфологически и функционально однотипных клеток выявляются на всем протяжении или на протяжении его отрезка, соответственно протяженности иннервируемого субстрата. Действительно, в центре дорсального рога располагается собственное ядро, которое присутствует на всех уровнях СМ. Другие ядра имеют ограниченное распространение.

В основании дорсального рога, дорсолатерально от центрального канала, имеется грудное, или дорсальное, ядро (Штиллинга–Кларка) овальной формы. Однако до настоящего времени отсутствует единое мнение о его топографии. Так, у человека некоторые авторы дорсальное ядро располагают латерально от центрального канала на уровне сегментов с T_1 по L_2 [38], другие находят его позади центрального канала соответственно сегментам T_2 – T_{12} [50]. У крысы дорсальное ядро локализуется у основания дорсального рога на уровне сегментов T_2 – L_2 [35, 36]. У крупных млекопитающих дорсальное ядро располагается дорсолатерально от центрального канала на уровне сегментов C_8 – L_3 [20]. В ряду позвоночных клетки этого ядра имеют самую разнообразную форму: овальную, грушевидную, звездчатую, вытянутую и, как правило, средние (20–30 мкм в диаметре) или крупные (30–40 мкм в диаметре) размеры [33]. Разнообразие клеточного состава дорсального ядра у млекопитающих объясняется полифункциональностью его нейронов, которые обеспечивают конвергенцию корковых сенсорных путей.

В промежуточной области серого вещества СМ, вблизи от центральных структур располагается промежуточно-медиальное ядро. В ранних работах Н.К. Anderson [12] по удалению симпатических паравертебральных узлов показано, что симпатические волокна в СМ «берут начало от клеток парацентральной

группы, которая расположена на обеих сторонах центрального канала, непосредственно вентрально от «столбов Кларка». После односторонней грудной или брюшной симпатэктомии установлено, что клетки промежуточно-медиального ядра являются вставочными между афферентными и висцеральными эфферентными нейронами [41]. Очевидно, нейроны промежуточно-медиального ядра СМ выполняют роль как афферентного центра вегетативной рефлекторной дуги, так и проекционных интернейронов, формирующих спиноталамические пути [6, 27].

Висцеросенсорная функция нейронов промежуточно-медиального ядра подкрепляется его распространенностью от сегмента С₈ до сегмента L₄, на уровне которых у крысы выходят белые соединительные ветви спинномозговых нервов, содержащие преганглионарные симпатические волокна [4]. В большей части работ промежуточно-медиальное ядро, в отличие от промежуточно-латерального, располагают вдоль всей длины серого вещества СМ у крысы, собаки и человека, что подтверждает проекционную функцию его нейронов [26, 27, 35, 36]. Последние исследования удостоверяют висцеро- и соматосенсорную функцию промежуточно-медиального ядра, иммунореактивные клетки которого, содержащие холинацетилтрансферазу, распространяются в пластинку Х и в область основания дорсального рога, образуют связи с симпатическими преганглионарными нейронами, участвуя тем самым в формировании симпатического модуля промежуточной области серого вещества СМ [7, 16].

В промежуточной зоне тораколумбального отдела СМ располагается промежуточно-латеральное ядро, которое включает морфологически различные группы клеток, объединяемые в ядра [4, 14, 17, 18]:

- 1) главное промежуточно-латеральное ядро соответствует боковому рогу;
- 2) центральное автономное ядро, локализованное позади центрального канала в дорсальной серой спайке;
- 3) вставочные нейроны (вставочное ядро), сформированное цепочкой клеток, идущей от центрального к главному промежуточно-латеральному ядру.

Аналогичные ядра присутствуют и в крестцовых сегментах СМ, где располагаются парасимпатические преганглионарные нейроны – на уровне S₂–S₄ у кошки и на уровне S₁–S₄ у крысы [7, 37].

Промежуточно-латеральное ядро у человека и других млекопитающих имеет различную протяженность, располагаясь в следующих сегментах СМ: T₁–L₃ – у крысы [22, 35, 36], C₆–L₆ – у кролика [7]; C₈–L₃ – у кошки [6], C₈–L₄ – у собаки [26]; T₁–L₁ – у человека [50]. Ряд авторов уровень каудального распространения нейронов данного ядра в спинном мозге крысы ограничивает сегментом L₄ [7, 8, 14].

В конце XX века нейрофизиологи заявили о присутствии в сером веществе СМ не только симпатических преганглионарных нейронов, но и симпатических

интернейронов, которые не образуют ядер. Ряд авторов морфологически определяет эти интернейроны в промежуточной зоне дорсальнее преганглионарных нейронов и в медиальных частях пластинок I–IV дорсального рога [17, 55]. Другие исследователи располагают их в базальной части дорсального рога, признавая за V пластинкой висцеросенсорную функцию [17]. Интересно, что на границе V и VII пластинок расположены разделительные клетки, которые, возможно, и являются симпатическими интернейронами [14, 53]. Это не исключает их иную локализацию: по данным последних исследований медиальные части I–V пластинок содержат мультиполярные интернейроны, относящиеся к премоторным, т.е. связанными как с симпатическими преганглионарами, так и с мотонейронами [30, 34, 53, 55].

Проекция к преганглионарным нейронам автономной нервной системы обнаружены и от группы мультиполярных нейронов, локализованной в белом веществе вентролатерально от латерального края дорсального рога, обозначаемой как латеральные спинальные ядра, которые присутствуют на всех уровнях СМ [22, 35, 36, 50]. Вентральное спинальных ядер в боковых канатиках расположена канатиковая часть промежуточно-латерального ядра [4, 14, 17].

Нервные клетки вентральных рогов на основании интеграции их строения и функции еще в конце XIX столетия объединили в две группы: вентромедиальную и вентролатеральную как у человека, так и у животных, о чем свидетельствуют руководства П. Тилло (1883) и Л. Франка (1890)*. Медиальная группа иннервирует мышцы, развивающиеся из дорсальной части миотомов, а латеральная – мышцы, происходящие из вентральной части миотомов. При этом, чем каудальнее находятся иннервируемые мышцы, тем латеральнее лежат иннервирующие их клетки.

Эти данные нашли подтверждение в более поздних исследованиях, показавших, что мотонейроны мышц разгибателей, а также иннервирующие туловище и передние конечности, располагаются кпереди от мотонейронов, иннервирующих сгибатели. Латеральные мотонейроны, дорсолатеральная группа которых располагается в поясничном утолщении СМ, иннервируют мышцы задних конечностей. Но, с 80-х годов XX века и по настоящее время в литературе можно найти данные о двух–пяти двигательных ядрах на всем протяжении спинного мозга.

Наибольшее число двигательных ядер найдено в передних (вентральных) столбах на уровне шейного и пояснично-крестцового утолщений [22, 35, 36, 10]. В грудном отделе СМ более двух ядер не находят даже у высших приматов, объясняя их малое число

* Тилло П. О спинном мозге и его оболочках // Руководство к топографической анатомии в применении к хирургии. Санкт-Петербург: Издание К.Л. Риккера, 1883. Ч. 2. Отд. 2. Гл. 3. С. 371–386. Франк Л. Руководство к анатомии домашних животных, главным образом лошади. Изд-во Дерпт, 1890. Ч. 2. Отд. 7. С. 541–552.

особенностями иннервации гипаксиальной мускулатуры туловища, тогда как в области шейного и пояснично-крестцового утолщений локализуются центры иннервации мышц верхних конечностей (C_5 – T_{1-2}), осуществляющих тонкие движения (трудовую деятельность), и нижних конечностей (L_2 – S_4), ответственных за локомоцию и позу стояния [50]. Считается, что медиальные ядра развиты на протяжении сегментов C_1 – L_4 и иннервируют мышцы туловища, а мышцы конечностей снабжаются иннервацией из групп латеральных ядер [10, 22, 35, 36, 50].

Совершенно очевидно, что несмотря на условность термина «сегмент», без его употребления невозможно говорить ни о конкретном строении серого вещества СМ, ни об особенностях его на различных уровнях, ни о сегментарных закономерностях иннервации органов и областей тела, ни об уровне и характере патологических процессов. На представлениях о сегментарном строении серого вещества базируются и современные данные о пластинчатой структуре СМ и о морфофункциональной характеристике его клеточного состава.

Пластинки серого вещества СМ и их нейроны

Гетерогенность столбов СМ прослеживается не только в росто-каудальном, но и в вентро-дорсальном направлении, о чем свидетельствует топография и клеточный состав пластинок серого вещества, называемых обычно пластинками Рекседа (см. рис. 1, а, б). В. Rexed [46] описал топографию серого вещества на поперечных сечениях СМ кошки, используя цитологический подход, исключив из анализа дендроархитектонику. Предложенная им схема включает десять пластинок (I–X), из которых первые девять располагаются от вершины дорсального рога серого вещества до вершины вентрального рога, а десятая пластинка занимает область вокруг центрального канала и относится к центральным структурам СМ.

Современные представления о пластинчатом строении серого вещества СМ у млекопитающих основаны на изучении различных животных: мыши [9, 51], крысы [8, 35, 36, 52], кошки [49], свиньи [16], обезьяны [45] и человека [50]. Считается, что пластинчатое строение серого вещества СМ характерно не только для млекопитающих, но и для некоторых представителей класса птиц [59]. При этом за основу берутся классические представления о cito- и дендроархитектонике пластинок СМ у кошки, которые практически аналогичны пластинкам крысы.

Трудность определения границ между различными пластинками в сером веществе СМ была отмечена еще Рекседом [46], который рассматривал их не как «строгие границы», а как нечеткие «переходные зоны». В течение последующих лет критерии разграничения пластинок усложнились выявленными уровнями (отделы и сегменты), возрастной, половой и видовой специфичностью [7, 35, 36, 39].

С.Н. Оленев [6] на основании морфологических особенностей серого вещества разных уровней СМ у млекопитающих выделял пластинки I–III, которые соответствуют задним (дорсальным) рогам, пластинки VIII–IX, соответствующие передним (вентральным) рогам. Остальные пластинки (IV–VII) отнесены автором к промежуточной зоне. R.P. Dum и P.L. Strick [19] на уровнях C_2 – C_5 и C_6 – T_2 в промежуточной зоне серого вещества СМ обезьяны выделили пластинки V–VIII. У грызунов агуты в шейном утолщении (C_4 – T_1), грудном отделе (T_7 – T_{10}) и в поясничном утолщении (L_4 – S_1) в дорсальном роге описаны пластинки I–IV, а в вентральном роге – пластинки VII–IX [21]. Эти данные предусматривают изменение взглядов на структуру основных частей серого вещества СМ на продольных и поперечных сечениях и не являются доказательством необходимости пересмотра представлений Рекседа и его последователей.

Топографически пластинки Рекседа соответствуют, в основном, анатомическим частям серого вещества: в дорсальном роге нейроны располагаются по верхушке головки в виде тонкого ободка – пластинка I, головке соответствует пластинка II, шейке – пластинки III и IV, основанию рога – пластинка V. Наличие пластинки VI спорно.

T.J. Steiner и L.M. Turner [52], исследуя размеры нейронов и плотность их распределения в сером веществе на всех уровнях СМ, пришли к выводу, что у взрослых крыс пластинка VI отсутствует, и дорсальный рог включает только пластинки I–V. С. Molander et al. [35, 36], G. Grant, H.R. Koerber [22] считают, что пластинка VI выявляется только в области утолщений СМ крысы, а именно с сегмента C_4 по T_1 и с сегмента L_3 по S_1 . Границы данной пластинки топографически трудно определяемы в связи с отсутствием четких отличий нейронов пластинок V и VI. В связи с этим пластинки V и VI в СМ человека и в СМ птиц объединяют в одну, а межламнарную границу проводят не поперечно, а дорсовентрально [50, 59]. У других представителей позвоночных пластинок V и VI рассматривают отдельно только в области шейного и пояснично-крестцового утолщений, в которых пластинка VI относится к дорсальному рогу и граничит с промежуточной зоной.

Пластинка VII соответствует промежуточной зоне, занимая, как и пластинка VIII, часть вентрального рога только в области утолщений СМ. Пластинки VII, VIII и X четких границ не имеют. Топографически пластинка X относится к центральным структурам СМ и располагается в области центрального канала. Пластинка IX как таковая отсутствует – она представлена двигательными ядрами, количество и локализация которых в вентральном роге зависят от уровня спинного мозга.

Некоторые пластинки, помимо топографических границ, можно разграничить по размерам нейронов и направленности максимальных диаметров тел нервных клеток, ориентации и нейрохимической

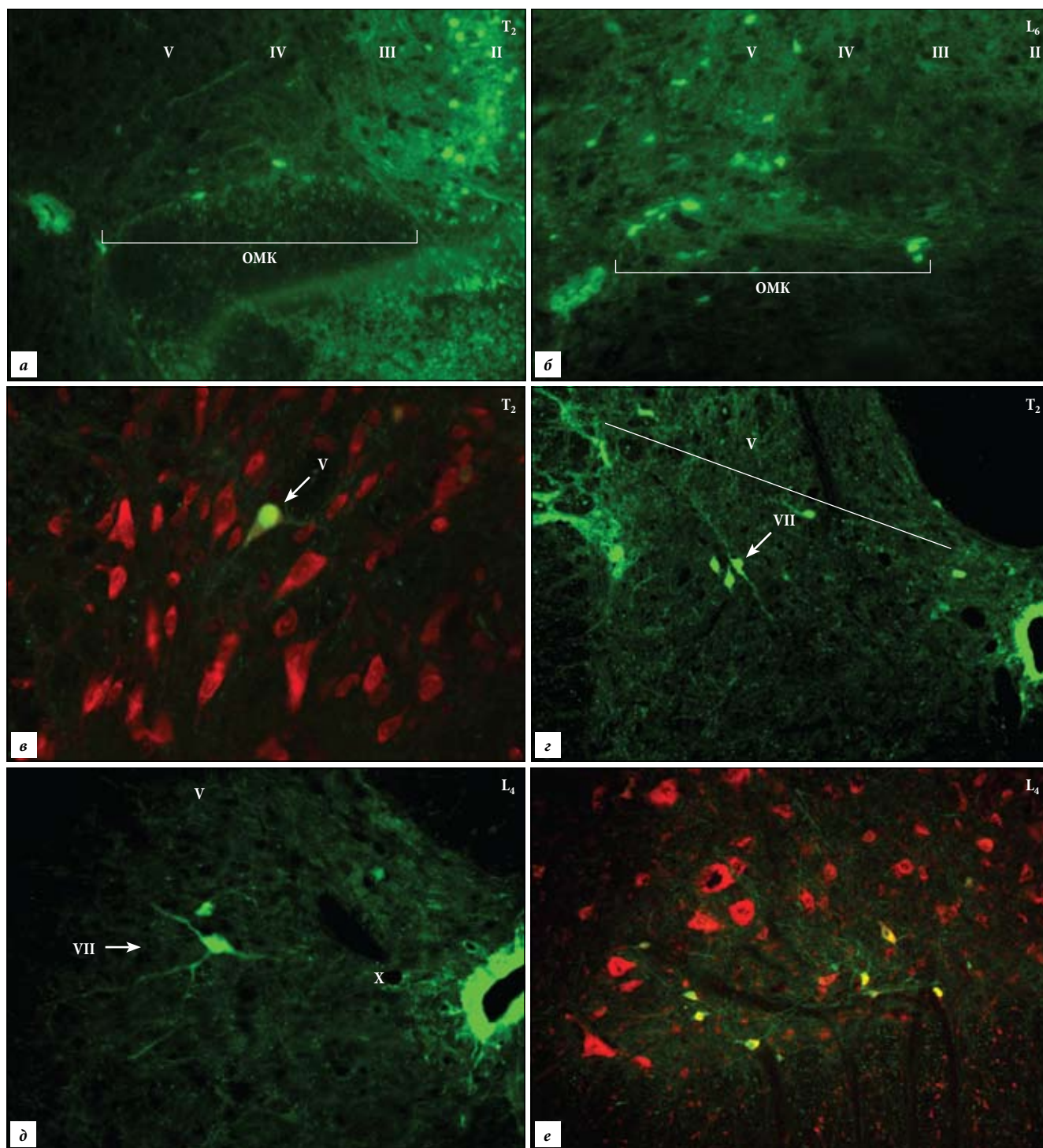


Рис. 1. Интернейроны различных сегментов спинного мозга с иммунореактивностью к кальбиндину:

a–в – мыши линии C57/BL6; г–е – белые крысы. Римскими цифрами обозначены пластинки Рекседа, стрелками указаны интернейроны; ОМК – область медиального края (дорсального рога); а, б, д, е – $\times 200$; в – $\times 400$, г – $\times 100$.

характеристике их отростков. Нейропил пластинки I содержит дендриты, ветвящиеся как в поперечном, так и в ростокаудальном направлении [3, 29, 35, 36, 50]. У большинства нейронов пластинки II дендритные арборизации располагаются ростокаудально [23, 60].

Нейроны пластинки III по ветвлению дендритов делятся на два типа: ростокаудальной ориентации,

невыходящие за пределы пластинки, и дорсовентральной ориентации, пересекающие несколько пластин [40]. Отличительной особенностью пластинки IV является ветвление отростков нейронов во всех плоскостях с преимущественным распространением в поперечном направлении [56].

Нейропил медиальной части пластинки V отличается от нейропила пластинки IV преимущественным

ветвлением дендритов в дорсовентральном направлении [49]. Дендритные проекции нейронов пластинки V обнаруживают нейрональные связи с нейронами пластинок II, III, IV и VII, а аксональные их проекции свидетельствуют о принадлежности этих клеток к комиссуральным и ипсилатеральным премоторным интернейронам [30, 34, 53].

Пластинка V – самая широкая, ее можно легко идентифицировать по сетчатому виду серого вещества в латеральной части [35, 36]. Наличие пластинки VI на уровне утолщений СМ определяется по более темному виду ее нейронов при окраске толуидиновым синим [35, 36, 46, 56].

Наряду с пластинками Рекседа дорсальный рог содержит особую зону, которая занимает его медиальную треть. Именно здесь, в пластинках III, IV и V у крысы, обезьяны и человека обнаружена преимущественно дорсовентральная ориентация отростков интернейронов [15, 45, 50] (рис. 1, в).

Пластинка VII идентифицируется по поперечной ориентации тел нейронов и их отростков, формирующих многочисленные ветвления [3, 38] (рис. 1, г, д). Клетки именно этой пластинки образуют цепочку разделительных нейронов на границе пластинок V и VII, симпатические ядра тораколумбального отдела, парасимпатические ядра крестцового отдела СМ и промежуточно-медиальное ядро [4, 14, 17, 18, 53]. Пластинка VIII принадлежит вентральному рогу и примыкает к пластинкам VII и X и к медиальным двигательным ядрам пластинки IX. Ее нейроны имеют дорсовентральную поляризацию дендритных ветвлений, следующих контрлатерально [3, 50].

Пластинка IX, представленная мотонейронами, располагается в вентральном роге и легко идентифицируется по четко очерченным группам, в основном, крупных клеток, расположенных вблизи латеральной и вентромедиальной поверхности рога. Мотонейроны отличаются от других нейронов размерами, мультиполярной формой клеточных тел, обилием в них крупных гранул нисслевского вещества [3, 7, 10, 35, 36].

Границы пластинки X определяются с трудом из-за рядом расположенных пластинок: вентролатерально – VIII, латерально – VII, дорсолатерально – V. У человека в пластинке X присутствуют только биполярные нейроны с дорсовентральной ориентацией дендритов в центральной и дорсальной частях, и с rostrocaudальной ориентацией – в вентральной части пластинки [50].

Как видно, учение о пластинчатом строении серого вещества СМ имеет свои неопределенности, противоречия и условности, число которых увеличивается при изучении формы и размера тел нервных клеток.

Что касается размеров нейронов, то в литературе чаще встречается их качественная характеристика: мелкие–крупные, крупнее–мельче. Иногда приводятся размеры конкретных клеток. Так, в пластинке I у крысы выделяют мелкие (диаметрами 5–10 и 9–13 мкм),

средние (10–15 мкм) и крупные (30–50 мкм) нейроны [3, 13, 23, 35, 57]. Последние, вероятно, идентичны гигантским клеткам Вальдейера [38], являясь проекционными интернейронами I пластинки [57]. В пластинке II у крысы большинство нейронов имеют диаметр 10,5 мкм и практически не отличаются от мелких и средних нейронов пластинки I [3, 13, 35, 36]. Размеры нейронов пластинки III с диаметром от 8 до 10,5 мкм также мало отличаются по размеру от нейронов пластинок I и II у крысы [15], но в области утолщений СМ у мыши и обезьяны они крупнее [40]. Явное отличие нервных клеток дорсального рога появляется в пластинке IV, где их размеры достигают 12–26, 10–30 и 35–45 мкм, что сопоставимо с нейронами пластинки V [3, 15, 35, 36, 56]. В пластинке VII у крысы присутствует однородная популяция нейронов, диаметры которых составляют 20–40 мкм [4, 14, 16]. В пластинке VIII нейроны разнороднее и крупнее, чем в пластинке VII [22]. В пластинке X подобные клетки располагаются компактнее, они меньше по диаметру, чем в рядом расположенных пластинках [3, 22].

Самыми крупными обычно считаются мотонейроны, но их детальное исследование показывает, что они имеют различные параметры. С учетом размеров и их функциональных характеристик мотонейроны в СМ разделяют на крупные (α) и мелкие (β и γ). Крупные α -мотонейроны достигают у крысы 40–55 мкм, у свиньи – 40–80 мкм, у человека – 60–80 мкм [3, 13, 16, 35, 50]. Шейные мотонейроны крупнее поясничных, мотонейроны латеральных ядер крупнее мотонейронов медиальных ядер [8, 10, 35, 36, 50].

Функциональную принадлежность нейронов рассматривают в совокупности размерных и топографических характеристик, соотнося с формой клеточных тел и аксональными проекциями. Так, в пластинке I крупные клетки с толстым длинным аксоном, локализованные в латеральной области, являясь проекционными, связаны с супраспинальными структурами – ядрами парабрахияльной области, ретикулярной формации и солитарного тракта, центральным серым веществом среднего мозга, гипоталамусом, таламусом, которые контролируют сердечно-сосудистую и дыхательную системы [23, 43, 47]. Здесь же располагаются веретеновидные и призматические клетки, сплюсненные (плоские) клетки – в средней трети пластинки, а мультиполярные клетки – в медиальной части пластинки [29]. При этом интернейроны медиальной области относятся к премоторным интернейронам и формируют контрлатеральные связи, т.е. частично являются комиссуральными. Ипсилатеральные соединения образуют интернейроны, распространенные по всей толщине пластинки I [23]. Многие авторы, однако, отмечают равномерность распределения разных клеточных типов в пределах этой пластинки [35, 36, 50].

Часть исследователей устанавливали связь выделенных типов нейронов пластинки I с поступающей

афферентацией. Так, A.J. Todd [57] считает, что веретенообразные клетки обеспечивают ноцицептивные реакции, реагируя и на высокую температуру. Большинство мультиполярных клеток является ноцицептивными, но реагирует на высокие и низкие температуры, пирамидальные клетки отвечают только на холодовые раздражения. При этом веретенообразные клетки имеют не миелинизированные, а пирамидальные и мультиполярные клетки – миелинизированные аксоны [29, 35, 36, 50]. Но при иммуногистохимическом исследовании белков нейрофиламентов массой 200 кДа оказалось, что нейроны пластинки I и их отростки являются иммунонегативными [44]. При морфологическом разнообразии нейронов в I пластинке часть авторов не обнаруживала корреляций между структурой и функцией клеток, указывая на широкое присутствие идентичных морфологических типов нейронов и в других пластинках дорсального рога СМ [22, 28].

В пластинке II у крысы и кошки в настоящее время выделяют до 5 типов клеток: островковые, центральные, радиальные, вертикальные и звездчатые нейроны [23, 31, 57, 60]. Вертикальные клетки располагаются преимущественно в латеральной, а радиальные клетки – в медиальной части пластинки, островковые и центральные клетки – по всей ее ширине, звездчатые нейроны – на границе пластинок II и III [23, 47, 57]. У человека во II пластинке подробно описаны четыре типа нейронов, различающихся геометрией аксональных ветвлений [50]. В центральной части пластинки локализуются островковые клетки (30 %) с ветвлением отростков в ростокаудальном направлении. Нитевидные клетки (20 %) имеют асимметричные дендриты и дорсально направленный в пластинку I аксон. Вьющиеся клетки (10 %) локализуются в наружной части пластинки и характеризуются сложным строением дендритного дерева и также с дорсальным направлением аксона. Звездчатые клетки (40 %) занимают всю медиальную часть пластинки и характеризуются самым простым дендрическим рисунком и вентральным направлением аксона (в пластинки III–IV). Около 25–30 % нейронов пластинки II отличаются от всех вышеописанных типов [31, 57, 60].

Есть основания объединить пластинки I и II в поверхностную область дорсального рога (ПОДР): однотипные их нейроны участвуют в образовании локальных цепей, связанных с первичными афферентами, тонкие миелинизированные Ад- и немиелинизированные С-волокна, которые проводят импульсы термо- и ноцицептивной чувствительности [31, 42]. На нейронах ПОДР заканчивается и часть механорецептивных волокон [57]. По мнению R. Ruscheweyh et al. [48], в I пластинке сосредоточены термо-, ноцицептивные и мультимодальные волокна первичных афферентов, в поверхностной части II пластинки – ноцицептивные, в глубокой части – волокна от низкопороговых рецепторов. К полимодальным ноцицептивным элементам

относят мультиполярные клетки, на которых преобладают входы от С-волокон первичных афферентов, связанных с тепловыми и холодowymi рецепторами [25]. На части из них заканчиваются Аβ-волокна первичных афферентов, связанные с тактильными рецепторами. Пирамидальный тип нейронов является узкоспецифичным и реагирует только на слабые холодовые раздражения [11].

Островковые клетки и большинство центральных клеток иннервируются в основном С-волоками, в то время как вертикальные и радиальные нейроны могут получать моносинаптические входы как от С-, так и от Ад-волокон первичных афферентов [23, 60]. При этом С-волокна, экспрессирующие ноцицептивные рецепторы, считаются пресинаптическими для вертикальных и радиальных клеток [58]. Другие же говорят о том, что С-волокна являются пресинаптическими для всех типов клеток ПОДР [31].

Внутри этой области, как правило, в качестве медиатора выступает гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), и только гигантские клетки пластинки I получают входы не от первичных афферентов, а от интернейронов с глутаматом [43]. На волокнах первичных афферентов в СМ образуются аксо-аксональные синапсы ГАМК-ергического пресинаптического торможения [60]. Моноамины, норадреналин и серотонин подавляют входы первичных афферентов также через пресинаптические механизмы [32]. Электрофизиологические исследования выявляют синаптические связи различных клеточных типов ПОДР: островковые клетки образуют ГАМК-ергические синапсы на центральных клетках, центральные клетки – глутаматергические синапсы на вертикальных клетках [31, 32]. При этом каждый морфологический тип нейронов формирует синапсы с более чем одним видом тормозных интернейронов [60]. В дорсальном роге холинергические аксональные бутоны, содержащие ГАМК, участвуют в пресинаптическом торможении как ноцицептивной, так и неноцицептивной импульсации, поступающей с первичных афферентов, что показано у крыс, где эти бутоны контактируют пресинаптически с центральными элементами синаптических гломерул первичных афферентов [47].

Как видно, ПОДР – очень сложная комплексная область серого вещества дорсального рога СМ, где не представляется возможным на основании только лишь морфологических особенностей отличить один тип нейрона от другого.

Пластинки III и IV объединяют глубокую область дорсального рога (ГОДР) СМ, на которую проецируется информация от механорецепторов (давление, растяжение, прикосновение, вибрация), образованных крупными миелиновыми А-волоками первичных афферентов [32, 54]. У мыши, крысы, кошки и обезьяны интернейроны III и IV пластинок гетерогенны по форме клеточных тел. Среди них описаны веретеновидные, округлые, треугольные,

пирамидальные [3, 35, 36, 49]. По ветвлению дендритов интернейроны делят на антенноподобные, радиальные и поперечные [38].

Обычно в этих пластинках выделяют три участка концентрации интернейронов: латеральный, срединный, медиальный, что объясняется проявлением первичной соматотопии, т.е. гистотопографическим обособлением групп клеток, принимающих импульсы различной модальности [7]. Данный феномен связан с известным соматотопическим принципом проекции периферических афферентов на нейроны дорсального рога СМ: медиальная проекция дистальных и латеральная проекция проксимальных афферентов [50]. Срединная часть пластинок содержит как мелкие, так и крупные нейроны собственного ядра дорсального рога различной формы, которые относят к проекционным, формирующим спиноталамические пути [15]. Существенно, что при иммуногистохимическом исследовании кальбиндина 28 кДа, последний выявляется в популяциях мелких нейронов как ПОДР, так и ГОДР СМ мыши, и не выявляется в крупных проекционных клетках пластинок I и II [9], что дает надежду на разделение интринзитных и проекционных интернейронов.

Часть авторов объединяет интернейроны пластинок IV с нейронами пластинок V и VI в *wide dynamic range neurons*, где нервные клетки имеют самые большие размеры среди нейронов дорсального рога и обеспечивают связь с супраспинальными структурами, т.е. относятся к проекционным [35, 36, 45, 50]. Выше приводились другие точки зрения, что свидетельствует о плюрализме мнений не только по поводу клеточного состава и топографии собственного ядра, но и о его функциональном значении.

В пластинке V СМ крысы и кошки присутствуют звездчатые, круглые веретеновидные и треугольные нейроны [13, 49], причем в медиальной части определяются веретеновидные и треугольные клетки, а в латеральной – мультиполярные [38]. Нейроны этой пластинки несут до 11 первичных дендритов, сложный рисунок которых прослеживается в пластинке VII и в области собственного ядра дорсального рога СМ, и ветви которых доходят до пластинок I и II ПОДР, а аксональные их проекции свидетельствуют о принадлежности этих клеток к комиссуральным и ипсилатеральным премоторным интернейронам [30, 34, 53].

Медиальные части пластинок V и VI имеют сходный с пластинкой IV клеточный состав, а дендриты нейронов латеральных частей достигают белого вещества латеральных канатиков [50]. У человека в пластинках V–VI форма нейронов отличается в медиальной (веретеновидная) и латеральной (треугольная) частях, в срединной же части клетки имеют веретеновидную и треугольную форму.

Пластинка VII в шейном и пояснично-крестцовом утолщениях СМ углубляется в вентральный рог, занимая его дорсальную, центральную и вентральную части,

вплоть до верхушки вентрального рога [22, 35, 36, 50, 52]. У человека нейроны VII пластинки имеют самую разнообразную форму с преимущественной локализацией в латеральных частях пластинки веретеновидных клеток, в центральной части – мультиполярных, в вентральных частях треугольных [38]. Отличием нейронов данной пластинки СМ человека [50] от нейронов VI и VIII пластинок служит их меньшая плотность и более обильная дендритная арборизация.

У крысы форма симпатических преганглионарных нейронов, расположенных в пластинке VII, неодинакова и связана с их поперечной ориентацией. Так, нейроны главного ядра мультиполярные, их дендриты ветвятся в медио-латеральном поперечном направлении. Нейроны вставочного ядра имеют, как правило, веретеновидную или треугольную форму с ветвлением дендритов в росто-каудальном направлении. Нейроны центрального ядра веретеновидные, но их дендриты ориентированы дорсо-вентрально [14]. Описанные клеточные типы следует дифференцировать от разделительных клеток VII пластинки, которые вытянуты в медио-латеральном поперечном направлении и являются веретеновидными биполярными нейронами, возможно образующими связи с клетками латеральных спинальных ядер [8, 14].

Часть клеточных элементов промежуточной области относится к комиссуральным интернейронам, которые участвуют в формировании премоторных путей от ипсилатеральной группы интернейронов, связанных с проприорецепторами [24]. Они представлены звездчатыми клетками, сходными с мотонейронами, но отличаются от них большей округлостью тела и периферическим расположением ядра [35, 36]. Возможно они и являются холинергическими премоторными нейронами [30, 34, 53].

У крысы нейроны VIII пластинки имеют поперечную ориентацию, их аксоны переходят на противоположную сторону [3], т.е. относятся к комиссуральным. По мнению G. Grant, H.R. Koerber [22], комиссуральные нейроны пластинки VIII связаны с ретикулярной формацией СМ.

У крысы на всех уровнях СМ мотонейроны формируют медиальные и латеральные клеточные группы, которые располагаются в поверхностной части вентрального рога СМ. Но в области утолщений СМ, в сегментах C₄–T₁ и T₁₂–L₆ в дорсолатеральной части вентрального рога у крысы располагаются дополнительные группы мотонейронов, связанные с гипаксиальной мускулатурой. У человека дополнительно выделяют центральную группу мотонейронов вентрального рога на всех уровнях СМ, а вентромедиальную группу выделяют только на уровнях с C₁ по L₄ [50]. У животных, включая обезьяну, собаку, кошку, крысу, медиальная группа мотонейронов прослеживается на всем протяжении СМ [7].

В пластинках VII, VIII и IX вблизи от мотонейронов расположены премоторные нейроны, имеющие

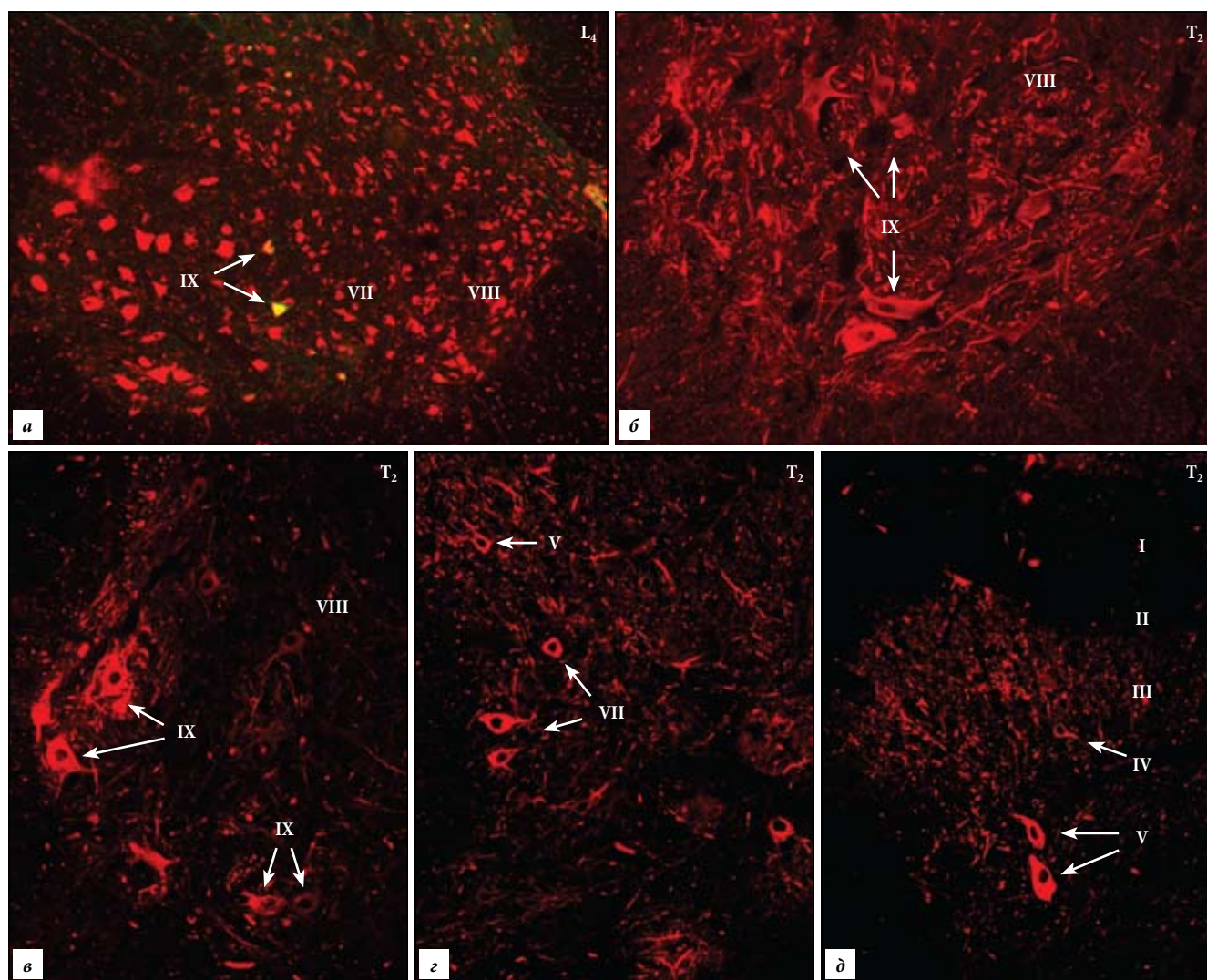


Рис. 2. Иммунореактивные мотонейроны и интернейроны спинного мозга:

а, в–д – белые крысы, б – мыши линии C57/BL6. Римскими цифрами обозначены пластинки Рекседа, стрелками указаны нейроны: а – с кальбиндином, б–д – с белком нейрофиламентов. а – $\times 30$, б–д – $\times 200$.

округлую, веретеновидную и треугольную формы с 2–3 дендритами, именуемые клетками Реншоу – короткоаксонные ингибиторные нейроны [13], у крыс описываемые как мелкие звездчатые нейроны [3, 8].

В X пластинке крысы выделяют различные по форме интернейроны – овальные и веретеновидные, пирамидальные, звездчатые и веретеновидные и мультиполярные [13, 21, 22]. Все они оказывают модулирующее влияние на двигательные нейроны и относятся к премоторным [13].

У человека и животных в сером веществе СМ около центрального канала с большим постоянством присутствуют типичные для спинномозговых узлов псевдоуниполярные нейроны, гетеротопия которых сохраняется в течение всей жизни организма, а также интрамедуллярный тораколюмбальный нерв и нейроны автономной нервной системы, известные по литературе как нервы и нейроны Мотавкина, относящиеся к периферическому отделу нервной системы [5].

Как видно, морфологи накопили огромный материал о спинном мозге – от его сегментарного и ламинарного строения до топографии ядер и строения нейронов. К сожалению, полученные к настоящему времени данные о гистохимической и иммуногистохимической характеристике нервных клеток СМ только закладывают основы идентификации проекционных, комиссуральных и интринзитных нейронов и выделения премоторных интернейронов, без чего невозможна расшифровка структуры межнейрональных связей.

Считается, что возможным маркером наиболее изученной субпопуляции премоторных нейронов – клеток Реншоу – может служить кальбиндин. Но, как показывают современные исследования, экспрессия кальбиндина (28 кДа) свойственна субпопуляции нейронов, располагающихся в различных пластинках СМ и выполняющих различные функции. В контексте настоящего сообщения существенно, что кальбиндин не выявлен ни у мыши, ни у крысы в проекционных нейронах пластинок I (клетки

Вальдейера) и III–IV (собственное ядро дорсального рога). Однако кальбиндин постоянно присутствует в интернейронах области медиального края дорсального рога [9], объединяющего соответствующие части пластинок III, IV, V СМ, где локализованы премоторные интернейроны (рис. 1, а–б). Помимо этого, экспрессию кальбиндина демонстрируют и премоторные интернейроны V и X пластинок (рис. 1, в) и разделительные клетки VII пластинки (рис. 1, г–д), относящиеся к соматическим и вегетативным премоторным нейронам, а также клетки Реншоу (рис. 1, е) [8]. Следовательно, кальбиндин, как маркер, может использоваться для выявления премоторных интернейронов. При этом нельзя забывать, что субпопуляция кальбиндин-позитивных клеток значительно шире – в нее входят, помимо перечисленных, интринзитные интернейроны всех пластинок СМ, включая и некоторые мотонейроны (рис. 2, а). Интересно, что «родство» мотонейронов и премоторных интернейронов прослеживается и по наличию белка нейрофиламентов (200 кДа), который, кроме мотонейронов (рис. 2, б–в) выявляется в телах крупных интернейронов пластинок III, IV, V и VII (рис. 2, г–д) и не выявляется в нейропиле ПОДР СМ (рис. 2, г) [44].

Полученные на интактных животных данные оказались эффективными для выяснения влияния 30-суточного космического полета на интернейроны СМ мышей линии C57/BL6. Оказалось, что условия космического полета существенно воздействуют прежде всего на интернейроны области медиального края дорсального рога СМ, пластинки V, VII, X и клетки Реншоу, т.е. на те интернейроны, которые относят к премоторным. Таким образом, появляется возможность идентифицировать премоторные интернейроны, входящие в моторный микромодуль.

Есть надежда, что привлечение современных высокоинформативных методов гистохимии и иммуногистохимии окажется перспективным для поиска общности структурно-функциональной организации нервной системы через объединение нейронов в группы, именуемые как кластеры, колонки, модули, нейронные ансамбли, локальные цепи, макро- и микронейронные сети.

References

1. Bersenev V.A. Cervical spinal components (structure, pathophysiology, syndromology). M.: Meditsina, 1980. 208 p.
2. Burdey G.D. Spinal cord. Saratov University Press, 1984. 236 p.
3. Gilerovich E.G., Moshonkina T.R., Fedorova E.A. [et al.]. Morphofunctional characteristic lumbar enlargement of the spinal cord in rats // *Morphology*. 2007. Vol. 3, No. 5. P. 33–37.
4. Zhukova G.P., Bragina T.A. The morphology of the central structures of autonomic nervous system // *Physiology of the autonomic nervous system*. L.: Nauka, 1981. P. 66–104.
5. Motavkin P.A., Chertok V.M. The innervation of the brain // *Pacific Medical Journal*. 2008. No. 3. P. 11–23.
6. Olenov S.N. Brain construction. L.: Meditsina, 1987. 208 p.
7. Pivchenko P.G. Structural organization of cineria of a human and mammals: thesis abstract, MD. Kharkov, 1993. 38 p.
8. Porseva V.V. Calbindin immunoreactive interneurons intermediate region and the ventral horn of the spinal cord gray matter white rat // *Morphology*. 2014. Vol. 146, No. 6. P. 21–26.
9. Porseva V.V., Shilkin V.V., Strelkov A.A. [et al.]. Subpopulations of calbindin-immunoreactive interneurons of the dorsal horn of the spinal cord of mice // *Cytology*. 2014. Vol. 56, No. 8. P. 612–618.
10. Yatsenko A.D., Lyutikova T.M. Analysis of morpho-cytochemical indicators of motor neurons of the lateral nucleus of the spinal cord of mice and rats // *Morphological News*. 2012. No. 4. P. 64–68.
11. Almarestani L., Waters S.M., Krause J.E. [et al.]. Morphological characterization of spinal cord dorsal horn lamina I neurons projecting to the parabrachial nucleus in the rat // *J. Comp. Neurol.* 2007. Vol. 504. P. 287–297.
12. Anderson H.K. The nature of the lesions which hinder the development of nerve-cells and their processes // *J. Physiol.* 1902. Vol. 28. P. 499–513.
13. Barber R.P., Vaughn J.E., Roberts E. The cytoarchitecture of GABAergic neurons in rat spinal cord // *Brain Res.* 1982. Vol. 238. P. 305–328.
14. Barber R. P., Phelps P. E., Houser C. R. [et al.]. The morphology and distribution of neurons containing choline acetyltransferase in the adult rat spinal cord: an immunocytochemical study // *J. Comp. Neurol.* 1984. Vol. 229. P. 329–346.
15. Bhardwaj R., Nagar M., Prakash R. Histomorphometry of nucleus proprius in rat lumbar dorsal spinal horn // *Anat. Soc.* 2001. Vol. 50. P. 140–144.
16. Calka J., M. Zalecki, K. Wasowicz [et al.]. A comparison of the distribution and morphology of ChAT-, VACHT-immunoreactive and AChE-positive neurons in the thoracolumbar and sacral spinal cord of the pig // *Veterinari Medicina*. 2008. Vol. 53. P. 434–444.
17. Clarke H.A., Dekaban G.A., Weaver L.C. Identification of lamina V and VII interneurons presynaptic to adrenal sympathetic preganglionic neurons in rats using a recombinant herpes simplex virus type 1 // *J. Neurosci.* 1998. Vol. 85, No. 3. P. 863–872.
18. Deuchars S.A., Milligan C.J., Stornetta R.L. [et al.]. GABAergic neurons in the central region of the spinal cord: a novel substrate for sympathetic inhibition // *Neurosci.* 2005. Vol. 25, No. 5. P. 1063–1070.
19. Dum R.P., Strick P.L. Spinal cord terminations of the medial wall motor areas in macaque monkeys // *J. Neurosci.* 1996. Vol. 16. P. 6513–6525.
20. Eustachiewicz R., Flieger S., Boratyński Z. [et al.]. Structure and topography of nucleus dorsalis in the spinal cord of horses // *Pol. Arch. Weter.* 1980. Vol. 21, No. 4. P. 499–506.
21. Freire M.A.M., Tourinho S.C., Guimarães J.S. [et al.]. Histochemical characterization, distribution and morphometric analysis of NADPH diaphorase neurons in the spinal cord of the agouti // *Front. Neuroanat.* 2008. Vol. 2. P. 2–9.
22. Grant G., Koerber H.R. Spinal cord cytoarchitecture // *The Rat Nervous System / Paxinos G. (eds)*. 2004. Vol. 3. P. 121–128.
23. Grudt T.J., Perl E.R. Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn // *Journal of Physiology*. 2002. Vol. 540. P. 189–207.
24. Jankowska E., Bannatyne B. A., Stecina K. [et al.]. Commissural interneurons with input from group I and II muscle afferents in feline lumbar segments: neurotransmitters, projections and target cells // *J. Physiol.* 2009. Vol. 587, No. 2. P. 401–418.
25. Kato G., Furue H., Katafuchi T. [et al.]. Electrophysiological mapping of the nociceptive inputs to the substantia gelatinosa in rat horizontal spinal cord slices // *J. Physiol.* 2004. Vol. 560. P. 303–315.
26. Kojima M., Takeuchi Y., Goto M. [et al.]. Immunohistochemical study on the distribution of serotonin fibers in the spinal cord of the dog // *Cell and Tissue Research*. 1982. Vol. 226. P. 477–491.
27. Lanerolle de N.C., Lamotte C.C. The human spinal cord: substance P and methionine-enkephalin immunoreactivity // *J. Neurosci.* 1982. Vol. 2. P. 1369–1386.

28. Light A. R., Willcockson H. H. Spinal laminae I–II neurons in rat recorded in vivo in whole cell, tight seal configuration: Properties and opioid responses // *J. Neurophysiol.* 1999. Vol. 82. P. 3316–3326.
29. Lima D., Coimbra A. The neuronal population of the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord. A study based on reconstructions of serially sectioned cells // *Anat. Embryol.* 1983. Vol. 167. P. 273–288.
30. Liu T.T., Bannatyne B.A., Maxwell D.J. Organization and neurochemical properties of intersegmental interneurons in the lumbar enlargement of the adult rat // *Neuroscience.* 2010. Vol. 171. P. 461–484.
31. Lu Y., Perl E.R. Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II) // *J. Neuroscience.* 2005. Vol. 25. P. 3900–3907.
32. Lu Y., Perl E.R. Selective action of noradrenaline and serotonin on neurones of the spinal superficial dorsal horn in the rat // *J. Physiol.* 2007. Vol. 582. P. 127–136.
33. Mann M.D. Clarke's column and the dorsal spinocerebellar tract: a review // *Brain Behavior and Evolution.* 1973. Vol. 7, No. 1. P. 34–83.
34. Miles G.B., Hartley R., Todd A.J. [et al.]. Spinal cholinergic interneurons regulate the excitability of motoneurons during locomotion // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007. Vol. 104. P. 2448–2453.
35. Molander C., Xu Q., Grant G. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord // *J. Comp. Neurology.* 1984. Vol. 230. P. 133–141.
36. Molander C., Xu Q., Rivero-Melian C., Grant G. Cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat: II. The cervical and upper thoracic cord // *J. Comp. Neurology.* 1989. Vol. 289. P. 375–385.
37. Nadelhaft W.C., Degroa C.M. Location and morphology of parasympathetic preganglionic neurons in the sacral spinal cord of the cat revealed by retrograde axonal transport of horseradish peroxidase // *Journal of Comparative Neurology.* 1980. Vol. 193. P. 265–281.
38. Nogradi A., Vrbova G. Anatomy and physiology of the spinal cord // *Transplantation of Neural Tissue into the Spinal Cord.* 2006. Vol. 2. P. 1–23.
39. Papka R.E., Hafemeister J., Puder B.A. [et al.]. Estrogen receptor- α and neural circuits to the spinal cord during pregnancy // *J. Neurosci. Res.* 2002. Vol. 70, No. 6. P. 808–816.
40. Pawlowski S.A., Gaillard S., Ghorayeb I. [et al.]. A novel population of cholinergic neurons in the macaque spinal dorsal horn of potential clinical relevance for pain therapy // *J. Neurosci.* 2013. Vol. 33, No. 9. P. 3727–3737.
41. Petras J. M., Cummings J. F. Autonomic neurons in the spinal cord of the rhesus monkey: a correlation of the findings of cytoarchitectonics and sympathectomy with fiber degeneration following dorsal rhizotomy // *Journal of Comparative Neurology.* 1972. Vol. 146, No. 2. P. 189–218.
42. Pinto V., Derkach V., Safronov B. Monosynaptic convergence of C- and A δ -afferent fibres from different segmental dorsal roots on to single substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord // *J. Physiol.* 2008. Vol. 586, No. 17. P. 4165–4177.
43. Polgár E., Al-Khater K. M., Shehab S. [et al.]. Large projection neurons in lamina I of the rat spinal cord that lack the neurokinin 1 receptor are densely innervated by VGLUT2 containing axons and possess GluR4 containing AMPA receptors // *J. Neurosci.* 2008. Vol. 28. P. 13150–13160.
44. Porseva V.V. Topography and morphometric characteristics of NF200+ neurons in the gray matter of the spinal cord after capsaicin deafferentation // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2014. Vol. 44, No. 8. P. 919–923.
45. Ralston H.J. The fine architecture of laminae IV, V and VI of the macaque spinal cord // *Comp. Neurol.* 1982. Vol. 21. P. 125–134.
46. Rexed B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat // *J. Comp. Neurology.* 1952. Vol. 95. P. 415–495.
47. Ribeiro-da-Silva A. Substantia gelatinosa of the spinal cord // *The Rat Nervous System* / Paxinos G. (Eds). 3rd edition. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. P. 129–148.
48. Ruscheweyh R., Wilder-Smith O., Drdla R. [et al.]. Long-term potentiation in spinal nociceptive pathways as a novel target for pain therapy // *Molecular Pain March.* 2011. Vol. 7, No. 1. P. 1–37.
49. Scheibel M.E., Scheibel A.B. Organization of spinal motoneuron dendrites in bundles // *Exp. Neurol.* 1968. Vol. 28. P. 106–117.
50. Schoenen J., Faull R.L.M. Spinal cord: cyto- and chemoarchitecture // *The Human Nervous System.* 2004. Vol. 2. P. 190–232.
51. Sidman R.L., Angevine J.B., Taber Pierce E. and Jr. Atlas of the Mouse Brain and Spinal Cord. Cambridge: Harvard University Press, 1971. 264 p.
52. Steiner T.J., Turner L.M. Cytoarchitecture of the rat spinal cord // *J. Physiol.* 1972. Vol. 222. P. 123–125.
53. Stepien A.E., Tripodi M., Arber S. Monosynaptic rabies virus reveals premotor network organization and synaptic specificity of cholinergic partition cells // *Neuron.* 2010. Vol. 68. P. 456–472.
54. Takazawa T., MacDermott A.B. Synaptic pathways and inhibitory gates in the spinal cord dorsal horn // *Acad. Sci.* 2010. Vol. 18. P. 153–158.
55. Tang X., Neckel N.D., Schramm L.P. Locations and morphologies of sympathetically correlated neurons in the T10 spinal segment of the rat // *Brain Res.* 2003. Vol. 976. P. 185–193.
56. Todd A.J. Anatomy of primary afferents and projection neurones in the rat spinal dorsal horn with particular emphasis on substance P and the neurokinin 1 receptor // *Exper. Physiol.* 2002. Vol. 2. P. 245–249.
57. Todd A.J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn // *Nature Reviews.* 2010. Vol. 11. P. 823–836.
58. Uta D. TRPA1 expressing primary afferents synapse with a morphologically identified subclass of substantia gelatinosa neurons in the adult rat spinal cord // *Eur. J. Neurosci.* 2010. Vol. 31. P. 1960–1973.
59. Wild J.M., Krützfeldt N.O., Altschuler D.L. Trigeminal and spinal dorsal horn (dis)continuity and avian evolution // *Brain Behav. Evol.* 2010. Vol. 76, No. 1. P. 11–19.
60. Yasaka, T. Kato G., Furue H. [et al.]. Cell-type-specific excitatory and inhibitory circuits involving primary afferents in the substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn in vitro // *J. Physiol.* 2007. Vol. 581. P. 603–618.

Поступила в редакцию 26.10.2015.

Строение серого вещества спинного мозга: неопределенности и перспективы исследования

В.В. Порсева, В.В. Шилкин
Ярославский государственный медицинский университет
(150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5)

Резюме. В статье с исторических позиций представлены данные от сегментарного до нейронного строения серого вещества спинного мозга у человека и животных. Приводятся разноречивые сведения о топографии ядер автономной нервной системы, чувствительных и двигательных ядер серого вещества спинного мозга, комиссуральных, проекционных и интринзитных (некомиссуральных, непроекционных) интернейронов. Подробно освещаются вопросы топографии пластинок Рекседа, критерии идентификации их по клеточному составу, ориентации отростков нервных клеток, нейрохимической характеристике нейропилия. Особое внимание уделено описанию разнообразия нейронов по форме, размерам, ориентации отростков, которые объединяются в ядра и пластинки, а также сходству нейронов, имеющих одинаковую функцию. В тоже время показано, что нейроны одинаковой формы и топографии могут выполнять различные функции. Формулируется необходимость морфологических исследований по идентификации групп нейронов, образующих функциональные кластеры, модули, макро- и микронейронные сети.

Ключевые слова: серое вещество спинного мозга, ядро, пластинка, нейрон.

УДК 611.018.26:546.221.1:616.12. DOI 10.17238/1609-1175.2016.2.31

VASCULAR DYSFUNCTION AND PERIADVENTITIAL ADIPOSE TISSUE

D. Tsvetkov, I.A. Szijártó, N. Wang, J.-Y. Tano, M. Gollasch

Charité – University Medicine, Experimental and Clinical Research Center, a joint cooperation of the Charité and Max Delbrück Center for Molecular Medicine in the Helmholtz Association (Lindenberger 80, Weg 13125 Berlin, Germany)

Keywords: body mass index, adipocytes, vasoactive factors, hydrogen sulfide.

VASCULAR DYSFUNCTION AND PERIADVENTITIAL ADIPOSE TISSUE

Tsvetkov D., Szijártó I.A., Wang N., Tano J.-Y., Gollasch M.
Charite University Medicine Berlin (80 Lindenberger Weg 13125 Berlin, Germany)

Summary. Over the last years, concerted efforts have helped to uncover and understand the basic mechanisms of periadventitial regulation of arterial tone by perivascular adipose tissue. Basically, perivascular adipose tissue serves as source for “Adipocyte-derived relaxing factor” (ADRF), an essential player in the control of vascular tone of visceral and other arteries. Importantly, its disturbed local, paracrine activity is able to cause vascular dysfunction. Hydrogen sulfide (H_2S) is a putative candidate for ADRF, which has received increased attention. The importance of this and other candidates for periadventitial vasoregulation has been recently explored in rodent models of obesity, hypertension and metabolic syndrome. Pharmacological tools have been successfully used to clarify the role of potassium channels involved in these conditions. Vasoactive factors of adipocytes or their receptors could represent targets for the development of novel cardiovascular drugs.

Keywords: body mass index, adipocytes, vasoactive factors, hydrogen sulfide.

Pacific Medical Journal, 2016, No. 2, p. 31–33.

Obesity in the last few decades has rapidly developed into a major health problem affecting a large portion of the world population. Cardiovascular disease remains the leading cause of death worldwide fueled by arterial hypertension and diabetes mellitus. These two risk factors are driven by the occurrence of obesity, which increases in all countries of the world. In North America, the population of people with overweight (body mass index, $BMI > 25 \text{ kg/m}^2$) or obesity ($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$) exceeds the population with normal weight and underweight, with the latter now constituting a minority in the population. There is no reason to believe that Europeans, Asians, South Americans, Africans and other populations are spared from this trend (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>). In Germany, about 70 % of men and 50 % of women are overweight or obese [22]. The consequences are staggering, especially as life expectancy in the United States of America is expected to shorten due to obesity [25].

Obesity hypertension

Obesity hypertension is the most common form of secondary hypertension. The Framingham study has already demonstrated a strong correlation between obesity and hypertension [29]. The incidence of hypertension in extremely obese individuals ($BMI > 35 \text{ kg/m}^2$) is increased by a factor of three compared to non-obese individuals. Results of the

Framingham study show that an increased BMI is an independent risk factor for death from heart failure [14]. In fact, obesity is solely responsible for 11 percent of cases in men and 14 percent of cases in women of death from heart failure. These and more recent epidemiological data demonstrate the close relationship between obesity and cardiovascular morbidity and mortality [1]. Overweight as a cardiovascular risk factor is therefore a focal point of the current research. The exact relationship between visceral obesity and increased cardiovascular morbidity, in particular the underlying mechanisms, however, are largely unknown.

Adipose tissue is an endocrine organ that secretes a variety of biologically active molecules into the circulation. These molecules include adiponectin, vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor- α , interleukin-6, leptin, resistin, insulin-like growth factor and sex hormones [3, 5]. However, in addition to its function as a source of classical endocrine hormones, adipose tissue can also act as an important paracrine regulator of cells and organs. In fact, almost all arteries of our body are enveloped by perivascular adipose tissue. An increasing number of research groups have begun to study possible paracrine functions of adipose tissue in cardiovascular health and disease.

Adipocyte-derived relaxing factor

In 2002, our research group made the fundamental observation that visceral perivascular adipose tissue can directly regulate vascular tone of aortic rings and mesenteric arteries of Sprague-Dawley rats without involvement of the sympathetic nervous system. This new principle of paracrine regulation of vascular tone is based on the release of an “adipocyte-derived relaxing factor” (ADRF), which relaxes the smooth muscle cells by opening K^+ channels [19]. Several other research groups have subsequently confirmed this conceptual finding in various arteries of different species, including in humans [8, 13, 21]. A hallmark of this regulatory pathway resides in the mediation of the vasodilatory effects of ADRF by opening of voltage-gated (K_v) potassium channels in the vascular smooth muscle cells (ADRF- K_v signaling pathway), which can be blocked by 4-aminopyridine [27].

The chemical identity of ADRF is not yet known and is different from other – previously known – adipokines with vasoactive effects, such as tumor necrosis factor- α and leptin [10]. Additionally, we have demonstrated that adiponectin exhibits ADRF features, but does not act as a paracrine regulator of vascular tone by opening of K_v channels [4].

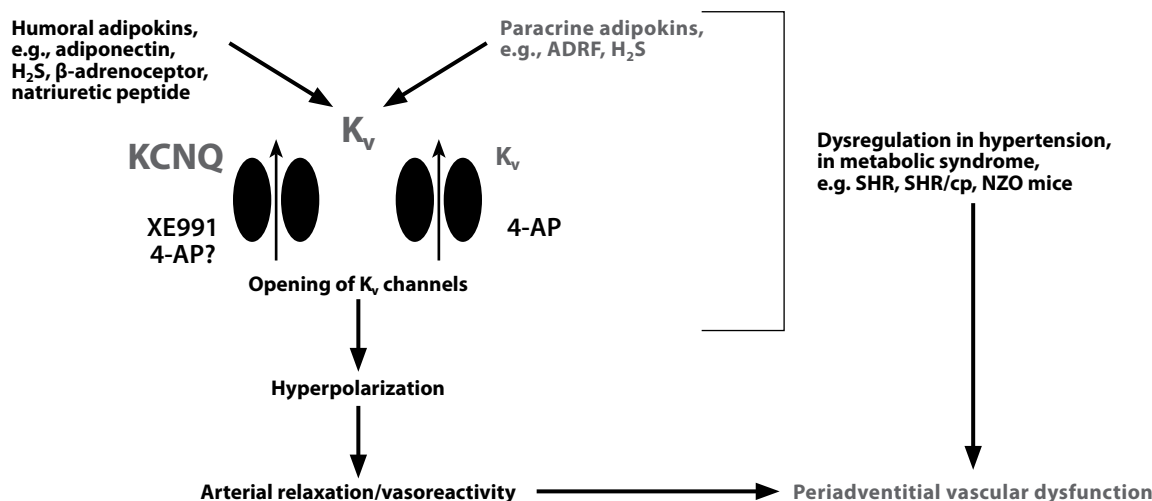


Figure 1. Vasoregulation by humoral and paracrine adipokines.

Adipose tissue is able to release humoral adipokines into the circulation to produce arterial relaxation by opening voltage-dependent (K_v) K^+ channels in the plasma membrane of smooth muscle cells. ADRF is released by perivascular adipocytes in response to vasoconstrictors (such as serotonin) and primarily produces endothelium-independent arterial relaxation by opening smooth muscle cell K_v channels. At least in part, KCNQ (K_{v7}) channels could represent the subtype of K_v channels involved. Native KCNQ channels are blocked by XE991 and possibly by 4-aminopyridine (4-AP). It is possible that additional subtypes of K_v channels play a role in the effects of ADRF, which are sensitive to 4-AP. H₂S could represent ADRF, at least in rats. This signaling pathway is mal-functional in a number of polygenetic rodent models of hypertension, such as spontaneously hypertensive rats (SHR), corpulent SHR/cp rats and New Zealand obese (NZO) mice.

A number of research groups became involved in search for the chemical identity of ADRF. Bob Lee's group focused mainly on Ang (1–7) signaling. This group has proposed that Ang (1–7) is released from perivascular adipocytes and leads to relaxation via activation of MAS receptors [17]. The group led by Tony Heagerty is largely focused on adiponectin [20, 28]. Interestingly the effects of both factors are presumed to involve opening of Ca^{2+} -activated maxi potassium channels and are largely dependent on the endothelium, thus it is rather unlikely that these “perivascular relaxing factors” represent ADRF(s) [4]. It is surprising that the anti-contractile effect of perivascular adipose tissue lost in obesity can be rescued using melatonin; though, rescue by adiponectin has not been studied by this group [2]. The group of Tony Lee proposed methyl palmitate as perivascular adipose tissue-derived relaxing factor in the rat aorta [18]. Similarly to ADRF, 4-aminopyridine inhibits the relaxant effects of this factor; therefore methyl palmitate exhibits indeed ADRF-like properties [18] and could represent a potential ADRF.

We investigated whether ADRF is a gaseous mediator. We were able to rule out that carbon monoxide is ADRF. However, coinciding with a Chinese research group, we obtained data suggesting that the “third gas” H₂S may represent ADRF. Consistent with this view, we found that inhibitors of the H₂S-producing enzyme cystathionine gamma-lyase inhibit the effects of ADRF in the rat aorta. Moreover, exogenous H₂S can mimic ADRF effects [24]. Nevertheless, our recent work indicates that additional factors can act as ADRF, at least in the mouse [15, 16].

Potassium channels

On the search for the chemical nature of ADRF, we succeeded in identifying putative K_v potassium channel(s) involved in ADRF signaling: among the 12 families of K_v channels

(K_{v1} – K_{v12}), K_{v7} channels, also called KCNQ channels, seem to act as target structures of ADRF (and possibly H₂S [24]). KCNQ channels (KCNQ 1, 3, 4, 5) have only recently been identified in vascular smooth muscle cells and were initially thought to be functionally insignificant because they are inactive at resting conditions and are not involved in the myogenic arterial response [23]. Our recent observations indicate, however, that ADRF seems to represent the physiological activator of KCNQ channels in vascular smooth muscle cells [11, 12, 26]. Notably, we observed an attenuated paracrine (ADRF) effect of visceral perivascular adipose tissue on mesenteric arterial tone in spontaneously hypertensive rats and New Zealand obese mice [4, 6, 7]. We also showed that the disturbed ADRF- K_v -signaling can be “normalized” in peripheral resistance arteries by synthetic KCNQ channel openers in spontaneously hypertensive rats and New Zealand obese mice [30]. Interestingly, “normalization” of the ADRF effect was accompanied by a reduction of systemic blood pressure, suggesting that ADRF- K_v could be necessary for the regulation of blood pressure. However, the KCNQ subtype(s) involved is still unclear and needs to be defined in future studies (Fig. 1).

KCNQ and novel drugs

Our attempts using $Kcnq1^{-/-}$ mice have suggested that KCNQ1 are unlikely involved in ADRF effects. We therefore speculate that KCNQ3, KCNQ4 and/or KCNQ5 channels may play an important role (Tsvetkov et al., 2015, submitted). A better understanding of the role of these periadventitial stress signals could thus be a new starting point to explain the increased cardiovascular risk and the increased prevalence of hypertension in visceral obesity and metabolic syndrome and to develop novel therapeutic approaches. We have hypothesized that these approaches need to consider that perivascular adipose tissue is not

homogenous, but non-uniform. This obvious regional heterogeneity and diversity of perivascular adipose tissue has the consequence that it may exhibit different paracrine effects on the vascular structure and function, with immediate consequences for particular disease states, such as endothelial dysfunction, atherosclerosis or insulin resistance [9]. Future research activities are needed to identify the participating signaling molecules and to clarify the exact pathophysiological relationships to develop novel drug targets and therapeutic approaches.

Acknowledgments. *Our research is supported by the Deutsche Akademische Austauschdienst (DAAD), Alexander von Humboldt Foundation and Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG).*

References

- Adams K.F., Schatzkin A., Harris T.B. [et al.]. Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old // *N. Engl. J. Med.* 2006. Vol. 355. P. 763–778.
- Agabiti-Rosei C., De Ciuceis C., Rossini C. [et al.]. Anticontractile activity of perivascular fat in obese mice and the effect of long-term treatment with melatonin // *J. Hypert.* 2014. Vol. 32. P. 1264–1274.
- Engeli S. Is there a pathophysiological role for perivascular adipocytes? // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005. Vol. 289. P. H1794–1795.
- Fesus G., Dubrovskaya G., Gorzelniak K. [et al.]. Adiponectin is a novel humoral vasodilator // *Cardiovasc. Res.* 2007. Vol. 75. P. 719–727.
- Galic S., Oakhill J.S., Steinberg G.R. Adipose tissue as an endocrine organ // *Mol. Cell Endocrinol.* 2010. Vol. 316. P. 129–139.
- Galvez B., de Castro J., Herold D. [et al.]. Perivascular adipose tissue and mesenteric vascular function in spontaneously hypertensive rats // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2006. Vol. 26. P. 1297–1302.
- Galvez-Prieto B., Dubrovskaya G., Cano M.V. [et al.]. A reduction in the amount and anti-contractile effect of periadventitial mesenteric adipose tissue precedes hypertension development in spontaneously hypertensive rats // *Hypertension research.* 2008. Vol. 31. P. 1415–1423.
- Gao Y.J., Zeng Z.H., Teoh K. [et al.]. Perivascular adipose tissue modulates vascular function in the human internal thoracic artery // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2005. Vol. 130. P. 1130–1136.
- Gil-Ortega M., Somoza B., Huang Y. [et al.]. Regional differences in perivascular adipose tissue impacting vascular homeostasis // *TEM.* 2015. Vol. 26, No. 7. P. 367–375.
- Gollasch M., Dubrovskaya G. Paracrine role for periadventitial adipose tissue in the regulation of arterial tone // *Trends in Pharmacological Sciences.* 2004. Vol. 25. P. 647–653.
- Gollasch M. KCNQ channels and novel insights into coronary perfusion // *Hypertension.* 2013. Vol. 62. P. 1011–1012.
- Gollasch M. Vasodilator signals from perivascular adipose tissue // *Br. J. Pharmacol.* 2012. Vol. 165. P. 633–642.
- Greenstein A.S., Khavandi K., Withers S.B. [et al.]. Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients // *Circulation.* 2009. Vol. 119. P. 1661–1670.
- Kenchiah S., Evans J.C., Levy D. [et al.]. Obesity and the risk of heart failure // *N. Engl. J. Med.* 2002. Vol. 347. P. 305–313.
- Kohn C., Dubrovskaya G., Huang Y. Gollasch M. Hydrogen sulfide: potent regulator of vascular tone and stimulator of angiogenesis // *Int. J. Biomed. Science.* 2012. Vol. 8. P. 81–86.
- Kohn C., Schleifenbaum J., Szijarto I.A. [et al.]. Differential effects of cystathionine-gamma-lyase-dependent vasodilatory H₂S in periadventitial vasoregulation of rat and mouse aortas // *PLoS one.* 2012. Vol. 7. P. e41951.
- Lee R.M., Lu C., Su L.Y., Gao Y.J. Endothelium-dependent relaxation factor released by perivascular adipose tissue // *J. Hypertens.* 2009. Vol. 27. P. 782–790.
- Lee Y.C., Chang H.H., Chiang C.L. [et al.]. Role of perivascular adipose tissue-derived methyl palmitate in vascular tone regulation and pathogenesis of hypertension // *Circulation.* 2011. Vol. 124. P. 1160–1171.
- Lohn M., Dubrovskaya G., Lauterbach B. [et al.]. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor // *FASEB.* 2002. Vol. 16. P. 1057–1063.
- Lynch F.M., Withers S.B., Yao Z. [et al.]. Perivascular adipose tissue-derived adiponectin activates BK(Ca) channels to induce anticontractile responses // *Am. J. Physiol. Heart Circulatory Physiol.* 2013. Vol. 304. P. H786–795.
- Malinowski M., Deja M.A., Janusiewicz P. [et al.]. Mechanisms of vasodilatory effect of perivascular tissue of human internal thoracic artery // *Journal of Physiology and Pharmacology.* 2013. Vol. 64. P. 309–316.
- Mensink G.B., Lampert T., Bergmann E. Overweight and obesity in Germany 1984–2003 // *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2005. Vol. 48. P. 1348–1356.
- Schleifenbaum J., Kassmann M., Szijarto I.A. [et al.]. Stretch-activation of angiotensin II type 1a receptors contributes to the myogenic response of mouse mesenteric and renal arteries // *Circulation Research.* 2014. Vol. 115. P. 263–272.
- Schleifenbaum J., Kohn C., Voblova N. [et al.]. Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide // *J. Hypertension.* 2010. Vol. 28. P. 1875–1882.
- Stewart S.T., Cutler D.M., Rosen A.B. Forecasting the effects of obesity and smoking on U.S. life expectancy // *N. Engl. J. Med.* 2009. Vol. 361. P. 2252–2260.
- Tano J.Y., Schleifenbaum J., Gollasch M. Perivascular adipose tissue, potassium channels, and vascular dysfunction // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2014. Vol. 34. P. 1827–1830.
- Verlohren S., Dubrovskaya G., Tsang S.Y. [et al.]. Visceral periadventitial adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries // *Hypertension.* 2004. Vol. 44. P. 271–276.
- Weston A.H., Egner I., Dong Y. [et al.]. Stimulated release of a hyperpolarizing factor (ADHF) from mesenteric artery perivascular adipose tissue: involvement of myocyte BKCa channels and adiponectin // *Br. J. Pharmacol.* 2013. Vol. 169. P. 1500–1509.
- Wilson P.W., D'Agostino R.B., Sullivan L. [et al.]. Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience // *Arch. Intern. Med.* 2002. Vol. 162. P. 1867–1872.
- Zavaritskaya O., Zhuravleva N., Schleifenbaum J. [et al.]. Role of KCNQ channels in skeletal muscle arteries and periadventitial vascular dysfunction // *Hypertension.* 2013. Vol. 61. P. 151–159.

Поступила в редакцию 01.11.2015.

Сосудистая дисфункция и периадвентициальная жировая ткань
Д. Цветков, И.А. Сийарто, Н. Ванг, Й.И. Тано, М. Голлах
Университетский медицинский комплекс Шарите
(Германия, Берлин, 13125, проезд Линденберга, 80)

Резюме. К настоящему времени расшифрованы основные механизмы регуляции сосудистого тонуса. Считается, в частности, что жировая ткань, окружающая сосуды, служит источником ADRF (adipocyte-derived relaxing factor). Важно отметить, что именно локальные паракринные расстройства могут стать причиной сосудистой дисфункции. Наиболее вероятным кандидатом на роль ADRF называют сероводород (H₂S). На экспериментальных моделях ожирения, артериальной гипертензии и метаболического синдрома доказано наличие и других соединений, участвующих в периадвентициальной регуляции сосудистого тонуса посредством влияния на калиевые каналы клеточных мембран. Вазоактивные структуры жировых клеток или их рецепторы могут оказаться перспективными мишенями для разработки новых сердечно-сосудистых препаратов.
Ключевые слова: индекс массы тела, жировые клетки, вазоактивные факторы, сероводород.

УДК 591.48:591.88:574.23

ТОПОГРАФИЯ NO-СИНТАЗЫ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ В НОРМЕ И ПРИ ДЕЙСТВИИ СТРЕСС-ФАКТОРОВ

М.А. Ващенко, Е.П. Коцюба

Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17)

Ключевые слова: оксид азота, нейроны, цитосомы, антропогенное загрязнение.

TOPOGRAPHY OF NO-SYNTASE IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF BIVALVE MOLLUSCS UNDER NORMAL AND STRESS CONDITIONS

M.A. Vaschenko, E.P. Kotsyuba

A. V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences (17 Palchevsky St. Vladivostok 690041 Russian Federation)

Summary. This brief review article summarizes the results of the studies of the nitric oxide component of the central nervous system (CNS) of bivalve mollusks obtained by using aldehyde-resistant NADPH-dependent diaphorase (NADPH-d) as a marker for NO-syntase. The data are given on the influence of several environmental stress factors (hyperthermia, hypoxia and anthropogenic pollution) on the topography and quantitative characteristics of NADPH-d-positive neurons and activity of NADPH-d (determined as an optical density of formazan precipitate in the cells) in the CNS of bivalve mollusks, as well as on the neuron ultrastructure, synaptic plasticity and subcellular localization of NADPH-d.

Keywords: nitric oxide, neurons, cytosomes, anthropogenic pollution.

Pacific Medical Journal, 2016, No. 2, p. 34–41.

Проблема устойчивости организма и его адаптации к экстремальным факторам среды – одна из центральных в биологии и медицине. Для ее решения необходимы детальные исследования молекулярных и клеточных механизмов центральной нервной системы (ЦНС), в том числе ее медиаторных систем, а также выяснение их роли в адаптации к факторам среды у разных классов животных. Морские беспозвоночные, обитающие в мелководной прибрежной зоне Мирового океана, подвержены действию постоянно меняющихся факторов окружающей среды (температура, соленость, концентрация кислорода в воде), а также антропогенного загрязнения. Двустворчатые моллюски семейства Mytilidae хорошо адаптированы к изменчивости этих факторов, поэтому могут выступать в качестве модельного объекта для изучения клеточных и молекулярных механизмов устойчивости ЦНС к стрессу, вызванному воздействием абиотических факторов среды [15, 22, 42, 48].

В Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук работы по изучению нервной системы у морских беспозвоночных были начаты в 1970-х годах по инициативе профессора П.А. Мотавкина [20]. Под его руководством проводились исследования структурной организации, а также роли нервной системы в регуляции размножения у промысловых видов моллюсков и иглокожих [4, 6, 9, 10, 16]. С открытием нового класса

межклеточных посредников – газотрансмиттеров – исследование нервной системы беспозвоночных получило новый импульс. Изучались топохимия и количественное распределение нитроксида азота (NO-ергических) структур в различных отделах нервной системы у нескольких видов двустворчатых моллюсков и ракообразных [1, 2, 6, 19, 46]. П.А. Мотавкин и его ученики исследовали взаимоотношения нитроксида азота с классическими трансмитами нервной системы у позвоночных и беспозвоночных животных [5, 7, 8, 14, 18, 27, 28, 36]. Одновременно выяснялась роль NO-ергических механизмов в реакциях двустворчатых моллюсков на стрессовые факторы среды [4–6, 37, 51]. Большая часть данных была получена при изучении мидии Грея *Crenomytilus grayanus*, которую часто используют в различных экологических исследованиях. Это широко распространенный долгоживущий вид семейства Mytilidae, обитающий в зал. Петра Великого (Японское море).

Топография и активность NO-синтазы в ЦНС двустворчатых моллюсков

В настоящее время установлено, что в нервной системе беспозвоночных и позвоночных животных оксид азота синтезируется преимущественно с участием конститутивных форм NO-синтазы [17–19, 21, 26, 29, 32, 35]. Все формы этого фермента используют восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADPH) в качестве кофактора. NADPH-диафороза (NADPH-d, EC 1.6.99.1) локализована в нервных клетках с NO-синтазой, поэтому гистохимическая реакция на NADPH-d широко применяется в исследованиях как маркер данной синтазы [1, 30, 32, 40, 43]. У *C. grayanus* NADPH-d-позитивные нейроны выявлены во всех ганглиях. Наибольшее их количество (около 1,5 % от общего числа) обнаружено в педальных ганглиях. В цереброплевральных и висцеральных ганглиях таких нейронов в 7–13 раз меньше [1, 4, 51]. В педальных ганглиях NADPH-d-позитивные нейроны формируют кластеры, наибольший из которых локализован в дорсомедиальной части ганглия (рис. 1, а), где наиболее интенсивно окрашиваются грушевидные клетки размером 20–25 мкм. Интенсивность окраски NADPH-d-позитивных нейронов в педальных ганглиях достоверно выше, чем в цереброплевральных и висцеральных [51]. Мелкие (3–8 мкм) и средние (10–15 мкм) нейроны имеют овальную, грушевидную или веретенообразную форму, меньшую интенсивность окраски и располагаются между

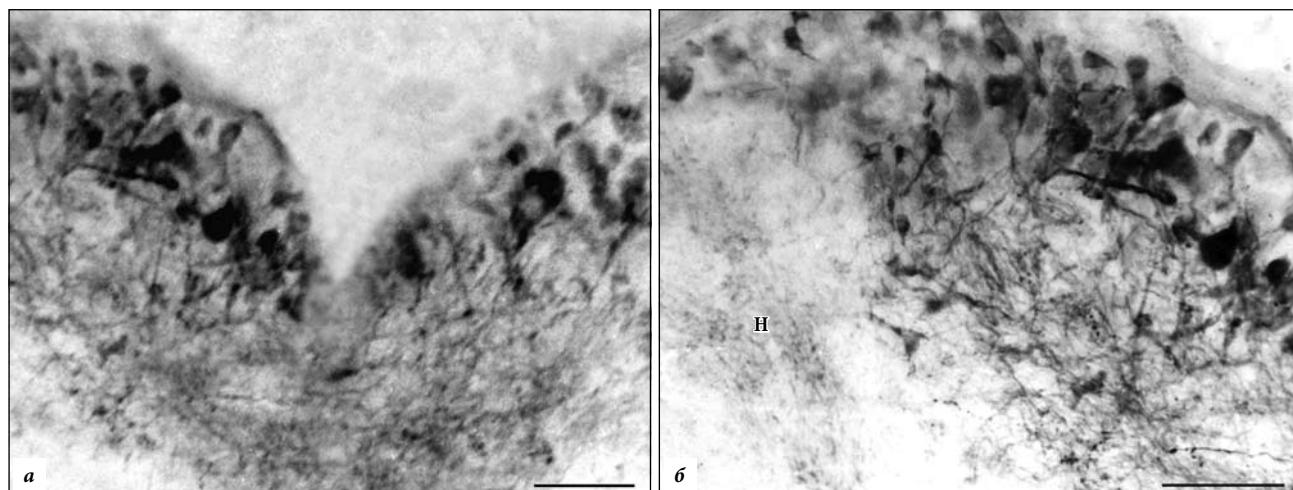


Рис. 1. Локализация NADPH-d в педальном ганглии мидий Грея *Crenomytilus grayanus*, обитающих в относительно чистом районе зал. Петра Великого (Японское море):

а – дорсомедиальная часть ганглия, б – часть правого ганглия. Волокна в центральной части нейропиля (Н) не окрашены. Масштаб – 100 мкм.

крупными клетками. В межганглионарной комиссуре и в паракортикоидной зоне нейропиля обнаружены слабо окрашенные сплетения NADPH-d-положительных нейрональных отростков, тогда как в центральной зоне нейропиля они отсутствуют (рис. 1, б).

Сравнительный гистохимический анализ ЦНС двустворчатых моллюсков из разных семейств показал, что мидия Грея обладает хорошо развитой нитроксидергической системой [1, 4]. В ганглиях мегангулюса *Megangulus venulosus* (старое название *Peronidia venulosa*, сем. Tellinidae), выявлены единичные NADPH-d-положительные нервные волокна, а у приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* (сем. Pectinidae), реакция на NADPH-d отрицательная [2, 4]. У другого представителя сем. Pectinidae, японского гребешка *Chlamys farreri nipponensis*, NADPH-d-положительные нейроны (от 15 до 35 клеток на срез), и их отростки обнаружены в висцеральном ганглии, а в цереброплевральном и педальном ганглиях выявлены только тонкие слабо окрашенные волокна в нейропиле [5]. При этом в висцеральном ганглии японского гребешка топография NO-ергических нейронов, выявленных гистохимическими и иммуноцитохимическими методами, совпадает.

Нитроксидергическая компонента хорошо выражена в ЦНС и другого вида долгоживущих мидий, обитающего в зал. Петра Великого – модиолуса *Modiolus kurilensis* [4]. Следует отметить, что в периферической нервной системе кишечника и гонад *C. grayanus* и *M. kurilensis* также обнаружены NADPH-d-положительные нейроны и волокна [11, 12, 21, 46, 50]. Эти данные предполагают участие оксида азота в регуляции функций пищеварения и размножения у двустворчатых моллюсков.

Субклеточное распределение NADPH-d в нейронах двустворчатых моллюсков

Электронно-гистохимический метод визуализации NADPH-d отражает NADPH-зависимую активность

NO-синтазы и обеспечивает практически полную инактивацию всех других диафораз [43]. Субклеточная локализация NADPH-d в нейронах *C. grayanus* соответствует таковой у млекопитающих [17, 40, 49, 52], рыб [13] и нескольких других видов двустворчатых моллюсков [4, 6]. Нейрональная NO-синтаза, будучи водорастворимым и преимущественно цитозольным ферментом, тем не менее способна ассоциироваться с внутриклеточными мембранами [47, 52].

Ультраструктурный анализ педальных ганглиев показал, что нейроны всех размерных групп имеют хорошо развитый эндоплазматический ретикулум, состоящий из многочисленных цистерн и вакуолей, комплекс Гольджи и большое количество свободных рибосом, полисом и митохондрий (рис. 2, а). NADPH-d-положительный осадок локализуется преимущественно в перикарионах в следующих внутриклеточных структурах: на перинуклеарной мембране, на мембранах эндоплазматического ретикулума, на внешней мембране митохондрий, в цитосомах и цитозоле. В большинстве клеток осадок расположен преимущественно в цитосомах (рис. 2, б). Последние представляют собой гетерогенную популяцию органелл, сильно варьирующую по форме, размеру, электронной плотности и количеству.

На основе морфологических признаков и особенностей распределения формазана выделены три основных типа цитосом [37]. Цитосомы типа I (0,5–2 мкм в диаметре) обычно имеют округлую или овальную форму и гетерогенную плотность (рис. 2, в). Для них характерны светлая периферическая зона и электроноплотный матрикс, в котором обнаруживаются редкие гранулы формазана. Цитосомы типа II не выявляются при обычном электронномикроскопическом исследовании, но четко видны после реакции на NADPH-d. Это окруженные элементарной мембраной органеллы диаметром 0,2–2 мкм, овальной или неправильной формы, с низкой электронной плотностью и высоким содержанием гранул формазана (рис. 2, г).

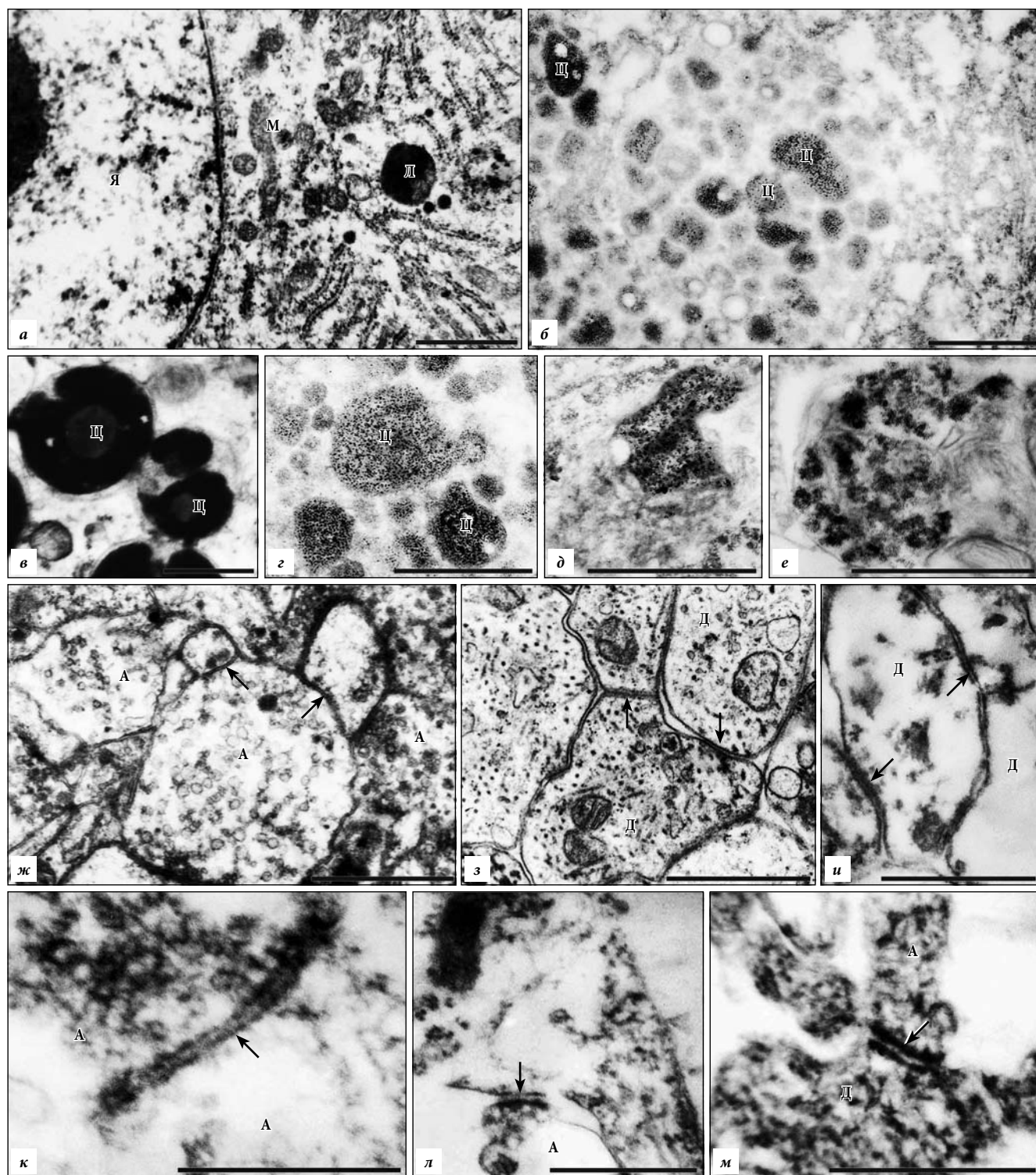


Рис. 2. Ультраструктура (а, в, ж, з) и цитохимическая реакция на NADPH-d (б, г, д, е, и, к, л, м) в педальном ганглии мидий Грея *Crenomytilus grayanus*, обитающих в относительно чистом районе зал. Петра Великого (Японское море):

а – часть нейрона среднего размера с ядром, митохондриями, эндоплазматическим ретикуломом и липидными включениями; б – локализация гранул формазана в цитосомах; в – цитосомы типа I; г – цитосомы типа II; д, е – цитосомы типа III; ж – профили аксонов, заполненные пузырьками различной электронной плотности (стрелкой указан аксо-шиповый синаптический контакт); з – профили дендритов (стрелками указаны дендро-дендритные щелевые контакты); и – локализация гранул формазана в дендритах и дендро-дендритных щелевых контактах (указаны стрелками); к – локализация гранул формазана в аксонах и аксо-аксональном синапсе (указан стрелкой); л – локализация гранул формазана в аксо-соматическом щелевом контакте (указан стрелкой); м – локализация гранул формазана в аксо-аксональном десмосомоподобном контакте (указан стрелкой). А – аксоны, Д – дендриты, Л – липидные включения, М – митохондрии, Ц – цитосомы, Я – ядро. Масштаб – 1 мкм.

Цитосомы типа III похожи на вторичные лизосомы, возникающие в результате аутофагоцитоза как цитосом первых двух типов, так и других клеточных

органелл (рис. 2, д, е). Все три типа цитосом могут содержать осадок формазана, но в основном активность NADPH-d сосредоточена в цитосомах типа II.

Цитосомы описаны почти полвека назад как характерные цитоплазматические гранулы нейронов наземных, пресноводных и морских двустворчатых моллюсков и гастропод [9]. Тем не менее морфологические характеристики и функции этих органелл остаются предметом дискуссии до настоящего времени. Цитосомы сильно варьируют по форме, размеру и содержанию, что указывает на присутствие нескольких типов и/или стадий развития этих органелл [9, 53]. Осмиофильные цитосомы типа I (в соответствии с нашей классификацией [37]) очень похожи на цитосомы типа I, описанные ранее в нейронах *C. grayanus* [9]. Цитосомы типа II четко визуализируются после окраски на NADPH-d, их число и интенсивность окраски сильно увеличиваются в результате действия стресс-факторов (гипоксии, гипертермии) на организм моллюсков [4, 6]. Цитосомы типа III (аутофагосомы) также могут содержать осадок формазана и напоминают цитосомы типов II и III, описанные ранее [9].

В нейропилях нервных ганглиев *C. grayanus*, как и других двустворчатых моллюсков, найдена сложно переплетенная сеть из нервных отростков диаметром 1–3 мкм и выявлены различные типы межнейрональных контактов (рис. 2, ж, з). Аксо-аксональные соединения преобладают среди химических синапсов, в их пресинаптических зонах присутствуют скопления различных пузырьков (рис. 2, ж). Обнаружены также контакты между аксонами и дендритами, их отростками и шипиками. По нашим данным, доля NADPH-d-положительных нервных терминалей составляет в среднем 4,8 % от общего числа межнейрональных контактов в педальном ганглии мидии Грея. В терминалях аксонов и дендритах осадок формазана ассоциирован с митохондриями и микрофиламентами, включая филаментозный материал пре- и постсинаптических мембран (рис. 2, и–м). Активность NADPH-d выявляется в основном в щелевых и десмосомоподобных контактах (рис. 2, и, л, м), среди которых наиболее часто встречаются щелевые соединения, сформированные смежными плазматическими мембранами отростков разных диаметров (рис. 2, и, л). Десмосомоподобные контакты, состоящие из двух симметричных электроноплотных утолщений плазматических мембран (рис. 2, м), встречаются реже. Осадок формазана локализован главным образом в пре- и постсинаптических мембранах синапсopодобных контактов, и лишь небольшое число его гранул найдено в аксо- и дендроплазме.

Влияние стресс-факторов среды на активность NADPH-d и ультраструктуру нейронов

Имеются данные о том, что оксид азота участвует в адаптивных реакциях ЦНС на действие различных стресс-факторов у позвоночных и беспозвоночных животных. Как показали наши наблюдения, гипертермия вызывала увеличение доли NADPH-d-положительных

нейронов в педальном ганглии в 1,5 раза и повышение числа NADPH-d-положительных нервных волокон в его дорсомедиальной области [4]. Комбинированное воздействие гипертермии и гипоксии приводило к увеличению доли NADPH-d-положительных нейронов в этом ганглии в 2,5 раза. Ультраструктурное исследование нервных ганглиев мидий *C. grayanus*, подвергнутых гипертермии, выявило незначительные изменения некоторых нейронов – краевую конденсацию хроматина в ядрах. Интересен тот факт, что в висцеральных ганглиях мегангулюса *M. venulosus* после воздействия повышенной температуры появились единичные NADPH-d-положительные нейроны, тогда как в норме они отсутствовали. У гребешка *M. yessoensis* гипертермия не индуцировала активность NADPH-d в ЦНС. У двух последних видов наблюдали модификацию митохондрий – вместо фибриллярных органелл появлялись набухшие округлые митохондрии, особенно в околоядерной зоне. Для *C. grayanus* и *M. venulosus* характерно увеличение плотности мелкозернистого NADPH-d-положительного осадка в аксонах нейропиля [4].

Воздействие гипертермии в сочетании с гипоксией вызвало более значительные изменения в структуре нервных клеток. В NADPH-d-положительных нейронах наблюдали увеличение числа и размеров NADPH-d-положительных цитосом, в некоторых из них выявлены расширение и вакуолизация цистерн эндоплазматического ретикула, единичные разрушенные митохондрии и миелоноподобные тела. В NADPH-d-негативных нейронах, особенно у *M. yessoensis* и *M. venulosus*, наблюдали округление и расширение цистерн эндоплазматического ретикула, набухание и гипертрофию митохондрий, просветление и отек цитоплазмы, хотя ядра не были изменены. В аксонах и дендритах появлялись светлые вакуоли разной величины, лизосомы и многочисленные миелоноподобные структуры. Терминали NADPH-d-негативных аксонов приобретали вид цистерн неправильной формы с просветленной аксоплазмой. В то же время NADPH-d-положительные аксоны сохраняли свою структурную целостность [4].

При изучении влияния антропогенного загрязнения на структуру нейронов и активность NADPH-d в ЦНС у мидий *C. grayanus* было установлено, что: 1) сразу после отлова в водах контрольной (о-в Русский) и четырех загрязненных станций в Амурском и Уссурийском заливах (зал. Петра Великого Японского моря) их ганглии достоверно различались по числу NADPH-d-положительных нейронов и активности фермента; 2) наибольшие значения этих показателей выявлены в педальных ганглиях моллюсков, которые находились в водах сильно загрязненной станции (район Второй Речки в Амурском заливе); 3) после 3-суточного содержания в аэрируемой воде у моллюсков, независимо от места отлова, эти показатели достоверно не отличались от установленных сразу после отлова. Однако достоверные различия сохранялись между соответствующими показателями

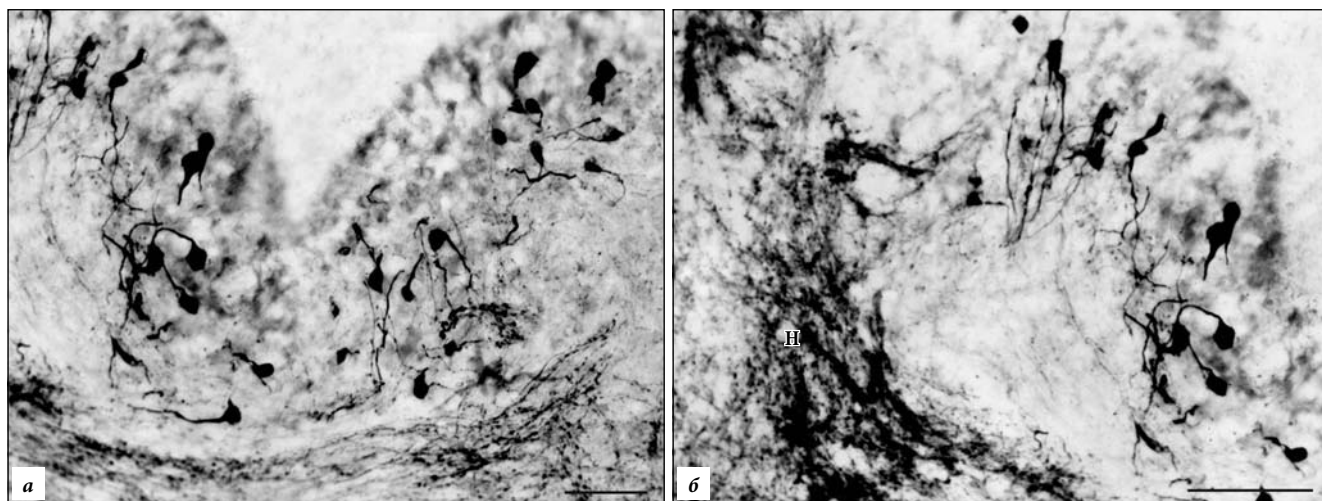


Рис. 3. Локализация NADPH-d в педальном ганглии мидий Грея *Crenomytilus grayanus*, обитающих в сильно загрязненном районе зал. Петра Великого (Японское море):

а – дорсомедиальная часть ганглия, б – часть правого ганглия. Волокна в центральной части нейропиля интенсивно окрашены. Н – нейропиле. Масштаб – 100 мкм.

у контрольной группы моллюсков и у мидий, которые находились в водах сильно загрязненной станции. Кроме того, установлено, что транспортировка мидий в течение 3 часов приводила к достоверному увеличению доли и интенсивности окраски NADPH-d-положительных нейронов во всех ганглиях [51].

Следует отметить, что у мидий с сильно загрязненной станции интенсивно маркировались не только тела нейронов и их отростки (рис. 3, а), но и волокна нейропиля (рис. 3, б), что не наблюдалось у контрольных животных (рис. 2, б). Резкое повышение числа NADPH-d-положительных нейронов и активности фермента у моллюсков через 3 часа после отлова было, скорее всего, вызвано гипоксией, обусловленной транспортировкой в ограниченном объеме воды. Сходные изменения NO-ергической активности выявлены в ЦНС двустворчатых моллюсков при гипоксии в условиях лабораторного эксперимента [4, 6].

Электронно-гистохимическое исследование педальных ганглиев мидий *C. grayanus*, отобранных на двух станциях – о-в Русский (контрольная) и Вторая Речка (сильно загрязненная) – в начале августа (температура воды, соответственно, 18 и 19 °C), и в конце августа (температура воды 21 и 23 °C), определило различия в ультраструктуре NADPH-d-положительных и NADPH-d-негативных нейронов [37]. Эти изменения могут быть отнесены либо к нейропластическим, либо к нейродегенеративным (деструктивным). Наиболее характерные нейропластические видоизменения происходили в NADPH-d-положительных нейронах и характеризовались чередованием содержания цитосом (главным образом типа II) и митохондрий. Число цитосом типа II в таких нейронах возрастало в 5–10 раз в контрольной группе, исследованной в начале и конце августа, а также у мидий, отловленных в эти же сроки у загрязненной станции [37]. Одновременно наблюдалось резкое (более чем в 10 раз) снижение

числа митохондрий. Важно отметить, что в NADPH-d-положительных нейронах у мидий контрольной группы в оба срока отлова дегенеративных преобразований не выявлено. У мидий с загрязненной станции, отловленных в начале августа, в таких нейронах отмечены дегенеративные изменения – фрагментация и набухание цистерн эндоплазматического ретикулаума и вакуолизация цитоплазмы [37]. В перикарионах NADPH-d-негативных нейронов число митохондрий и аутофагосом было в три раза выше, чем в NADPH-d-положительных нейронах. В нервных отростках и терминалях последних дегенеративные изменения отсутствовали. В то же время для NADPH-d-негативных терминалей характерно снижение электронной плотности матрикса, уменьшение числа синаптических пузырьков, нейрофиламентов, микротрубочек и появление вакуолей. Доля нервных терминалей с деструктивными изменениями составляла около 8%.

В перикарионах NADPH-d-положительных нейронов мидий, отловленных в конце августа в водах загрязненной станции, практически отсутствовали митохондрии. Цитосомы типа II, хотя и выявлялись, но в значительно меньшем количестве, чем в начале августа, и отличались низкой активностью фермента [37]. Кроме того, в цитоплазме нейронов наблюдали электропрозрачные полости и вакуоли разных размеров, а также многочисленные аутофагосомы, содержащие концентрические миелоноподобные структуры. В NADPH-d-негативных нейронах число аутофагосом увеличивалось в три раза. В нейропиле выявлялись пластические изменения щелевых и десмосомоподобных контактов в виде повышения электронной плотности примембранного материала и увеличения протяженности контактов. Структура NADPH-d-негативных аксонов и дендритов была сильно нарушена, а их доля у разных особей варьировала от 3 до 34%.

Нейропластические изменения в ЦНС двустворчатых моллюсков при действии стресс-факторов

Результаты исследований влияния экологического стресса на состояние нитроксидергической компоненты и ультраструктуру ЦНС двустворчатых моллюсков и митилид свидетельствуют о высокой пластичности нервной ткани этих животных, ее способности адаптироваться к неблагоприятным факторам среды [4–6, 37, 51]. Механизмы, лежащие в основе устойчивости нервных клеток двустворчатых моллюсков к этим факторам, до сих пор мало изучены. Полученные в наших работах данные позволяют с большой долей вероятности предположить участие оксида азота в формировании адаптационной защиты нервных клеток двустворчатых моллюсков в условиях высокой изменчивости среды.

Наиболее интересны, на наш взгляд, результаты анализа ультраструктуры нейронов и субклеточного распределения NADPH-d в межклеточных контактах, позволяющие судить о некоторых клеточных и молекулярных механизмах нейропластичности [4, 37]. Факты свидетельствуют, что реорганизация синапсоархитектоники при хроническом загрязнении идет в двух направлениях: уменьшение числа химических синапсов в результате повреждения NADPH-d-негативных отростков и сохранение, а также структурная перестройка NADPH-d-позитивных синапсоподобных контактов. Пластическая реорганизация синапсов обеспечивает адаптацию нейронов к изменениям информационного потока, проходящего через его афференты, оптимизирует работу нейронных сетей и, как следствие, предоставляет возможность приспосабливаться к новым условиям функционирования нервных центров. Кроме того, резкое увеличение числа NADPH-d-позитивных цитосом типа II и активности в них фермента, видимо, является неспецифической реакцией нейронов двустворчатых моллюсков на действие стресс-факторов окружающей среды. В конце 70-х годов прошлого века было показано, что цитосомы представляют собой гранулы, содержащие желтый пигмент, которые появляются в нейронах моллюсков при аноксии [53]. Ультраструктурными и цитохимическими исследованиями, а также абсорбционным спектральным анализом было установлено, что цитосомы содержат каротиноиды, миоглобин и гемопротеиновые дыхательные ферменты. Было высказано предположение, что эти органеллы – внутриклеточные источники кислорода в условиях гипоксии [33]. Другая предполагаемая функция цитосом – это обратимая аккумуляция Ca^{2+} [45]. Биохимические и биофизические исследования подчеркнули конформационные изменения каротиноидов цитосом под влиянием серотонина, ацетилхолина и оксида азота – нейромедиаторов, представленных в нервной системе моллюсков так же широко, как и у млекопитающих [3, 23]. Воздействие экзогенного оксида азота вызывало снижение вязкости мембран цитосом и двухстадийное уменьшение количества

внутриклеточных связанных ионов кальция. На основании этих фактов высказано предположение, что цитосомы участвуют в комплексе процессов, индуцированных нейротрансмиттерами и сопряженных с перераспределением ионов кальция в цитоплазме нейрона в процессе его функционирования [3, 23].

Согласно нашим данным, в ЦНС двустворчатых моллюсков NADPH-d-позитивные цитосомы типа II служат важным поставщиком оксида азота. При этом NADPH-d-позитивные цитосомы и митохондрии являются метаболически связанными органеллами: в нейронах мидий Грея, обитавшей в условиях сильного загрязнения и гипоксии, наблюдалось резкое увеличение числа цитосом и столь же выраженное снижение количества митохондрий, вплоть до их полного исчезновения [37]. В последние годы накапливается все больше фактов, позволяющих считать, что реакция клетки на повреждение различной природы приводит к митохондриальной дисфункции, которая способствует развитию многих патологических процессов, включая нейродегенеративные заболевания [31, 34, 41]. Митохондриальная дисфункция сопровождается увеличением уровня активных форм кислорода и развитием окислительного стресса в клетке. Многочисленные сигнальные молекулы, появление которых в клетке связано с дисфункцией митохондрий и окислительным стрессом (активные формы кислорода, белки семейства Bcl-2, цитохром C и др.), определяют судьбу нейрона при гипоксии и нейродегенерации – выживание или смерть путем апоптоза или некроза [31, 44].

Еще одной функцией эндогенного оксида азота в нейронах моллюсков может быть его участие в регуляции митохондриального дыхания. В опытах с изолированными митохондриями, нервными терминалями и нейронами мозга наномолярные концентрации этого соединения быстро и обратимо ингибировали цитохромоксидазу, конкурируя с кислородом [24, 25]. Вполне вероятно, что оксид азота, продуцируемый цитосомами в NO-ергических нейронах ЦНС митилид, устойчивых к гипоксии, участвует в ингибировании митохондриальной дыхательной цепи и переключении нейронов с аэробного дыхания на гликолиз в условиях понижения внутриклеточной концентрации кислорода [37]. Эта гипотеза находит подтверждение в экспериментальных работах по изучению молекулярных механизмов устойчивости клеток других органов митилид (жабр, мантии) к действию гипоксии и загрязняющих веществ [38, 39]. Вероятно, гипоксия запускает продукцию оксида азота, который ингибирует цитохром C-оксидазу и переключает поток электронов на альтернативный окислительный процесс, что сводит к минимуму продукцию активных форм кислорода в клетке [39]. Кроме того, оксид азота способен реагировать с восстановленным глутатионом [39]. В этом случае продукт реакции активирует гуанилатциклазу, в результате чего увеличивается синтез циклического гуанозинмонофосфата, активирующего

его протеинкиназу. Последняя, в свою очередь, активизирует так называемую стресс-киназу – p38-зависимую митоген-активируемую протеинкиназу, в функции которой входит активация/деактивация метаболических и окислительно-восстановительных процессов в клетке. В соответствии с этой гипотезой, сигналы, запускаемые в клетках аноксией, генерируют быструю метаболическую реакцию, которая завершает или усиливает регуляцию энергетических и окислительно-восстановительных процессов у устойчивых к аноксии видов двустворчатых моллюсков [39]. Стресс-киназа, видимо, играет ключевую роль в модуляции реакций клеток двустворчатых моллюсков на окислительный стресс, которые могут быть направлены как на увеличение устойчивости клеток (запуск синтеза белков теплового шока), так и на проапоптотические процессы, в частности, на активацию каспаз.

Заключение

В пользу предположения о нейропротективной роли нейропластических изменений в ЦНС двустворчатых моллюсков при воздействии негативных факторов среды свидетельствует несколько фактов: 1) увеличение числа и размеров NADPH-d-позитивных цитосом в нейронах и связанное с этим увеличение продукции эндогенного оксида азота; 2) структурная реорганизация синапсов и синапсоподобных контактов; 3) резкое снижение числа митохондрий вплоть до их полного исчезновения. Отсутствие апоптотически или некротически погибших нейронов в ЦНС мидий Грея, обитающих в загрязненной среде или экспериментально подвергнутых действию стресс-факторов, позволяет считать, что резкое снижение числа митохондрий в нейронах играет важную нейропротективную роль. С одной стороны, это может предохранять нейроны от избытка активных форм кислорода и от апоптоза, поскольку исключает так называемый внутренний (митохондриальный) путь его активации. С другой стороны, исчезновение митохондрий может быть связано с переключением аэробного энергетического метаболизма нейронов на анаэробный.

Важную роль в адаптации нервной системы к изменяющимся условиям внешней среды играет оксид азота ввиду того, что выявленные нами деструктивные изменения в нервной системе мидий Грея при хроническом воздействии загрязнения среды связаны в основном с NADPH-d-негативными нейронами, их отростками и терминалями, тогда как структура NADPH-d-позитивных нейронов практически не меняется. Действие дополнительных неблагоприятных факторов (повышенной температуры и/или гипоксии), очевидно, приводит к срыву адаптационных механизмов и вызывает выраженные нейродегенеративные изменения в ЦНС двустворчатых моллюсков.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований ДВО РАН «Дальний Восток» (проекты 15-1-6-007 и 15-1-6-010).

References

1. Annikova L.V., Pimenova E.A., Dyuyzen I.V. [et al.]. Localization of NO-ergic elements in the central nervous system of *Crenomytilus grayanus* // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2000. Vol. 36, No. 5. P. 452–457.
2. Dyuyzen I.V., Annikova L.V., Motavkin P.A. Localization of NO-synthase in the central nervous system of *Mizuhopecten yessoensis* and *Modiolus kurilensis* // *Marine Biology*. 1999. Vol. 25, No. 3. P. 243–245.
3. Erokhova L.A., Brazhe N.A., Maksimov G.V. [et al.]. The study of conformational changes of carotenoids in neurons by the action of neurotransmitters // *Report of the Academy of Sciences*. 2005. Vol. 402, No. 4. P. 558–560.
4. Kotsyuba E.P. Effect of hypoxia and high temperature on the NO activity of the central nervous system of bivalves // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2008. Vol. 44, No. 2. P. 200–208.
5. Kotsyuba E.P. Effect of heat stress on NO-synthase activity and tyrosine hydroxylase in the central nervous system of bivalves // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2009. Vol. 45, No. 1. P. 122–129.
6. Kotsyuba E.P., Kotsyuba A.E. NO-synthase in the central nervous system of a *Nodularia vladivostokensis* in normal and hypoxic // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2003. Vol. 39, No. 2. P. 179–183.
7. Kotsyuba A.E., Chertok V.M. Nitric oxide-containing elements of sensory innervation of cerebral arteries // *Pacific Medical Journal*. 2009. No. 2. P. 69–72.
8. Kotsyuba A.E., Chertok V.M. Histochemical and immunohistochemical localization of choline acetyltransferase in nuclei of the medulla oblongata in rats // *Cytology*. 2013. Vol. 55, No. 11. P. 821–827.
9. Motavkin P.A., Varaksin A.A. Histophysiology nervous system and regulation of reproduction in bivalves. M.: Nauka, 1983. 208 p.
10. Motavkin P.A., Khotimchenko Yu.S., Deridovich I.I. Regulation of breeding and biotechnology produce germ cells in bivalves. M.: Nauka, 1990. 217 p.
11. Pimenova E.A., Khlopova A.V., Varaksin A.A. Nitroksidergicheskogo cells in the intestine of *Modiolus kurilensis* // *Marine Biology*. 2002. Vol. 28, No. 2. P. 119–124.
12. Pimenova E.A., Varaksin A.A. Localization of NO-ergic elements in oral lobes, lips and esophagus of *Crenomytilus grayanus* // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2003. Vol. 39, No. 5. P. 476–481.
13. Ruzhinskaya N.N., Gdovskiy P.A. NADPH-diaphorase in the olfactory system of carp *Cyprinus carpio* // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2002. Vol. 38, No. 1. P. 91–96.
14. Startseva M.S., Kotsyuba A.E., Chertok V.M. Spatial organization of gas-transmitted neurons in the brain // *Pacific Medical Journal*. 2015. No. 2. P. 38–42.
15. Tischenko P.Ya., Sergeev A.F., Lobanov V.B. [et al.]. Hypoxia of bottom waters of the Amur Bay // *Bulletin FEB RAS*. 2008. No. 6. P. 115–125.
16. Khotimchenko Yu.S., Deridovich I.I., Motavkin P.A. Biology of reproduction and regulation of gametogenesis and spawning in echinoderms. M.: Nauka, 1993. 168 p.
17. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Nitric oxide in the mechanisms of the afferent innervation of the cerebral arteries // *Cytology*. 2010. Vol. 52, No. 1. P. 24–29.
18. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. A comparative study of catecholaminergic and vasomotor ergic neurons in the nuclei of the caudal brain stem of rat // *Morphology*. 2015. Vol. 147, No. 2. P. 26–31.
19. Chertok V.M., Kotsyuba E.P. Comparative characteristics of uNOS-positive structures in the central nervous system of some species of crustaceans // *Cytology*. 2015. Vol. 57, No. 8. P. 584–591.
20. Chertok V.M., Reutov V.P., Okhotin V.E. Pavel A. Motavkin –

- a man, a teacher, a scientist // Pacific Medical Journal. 2012. No. 3. P. 7–8.
21. Annikova L.V., Dyuzhen I.V., Paltseva Y.N. [et al.]. Putative nitric oxide synthase containing nervous elements in male and female gonads of some marine bivalve mollusks revealed by NADPH-diaphorase histochemistry // Invertebr. Reprod. Dev. 2001. Vol. 40. P. 69–77.
 22. Bayne B.L. Ecological consequences of stress // The effects of stress and pollution on marine animals. New York: Praeger, 1985. P. 141–155.
 23. Brazhe (Ulyanova) N.A., Erokhova L.A., Churin A.A. [et al.]. The relation of different-scale membrane processes under nitric oxide influence // J. Biol. Phys. 2005. Vol. 31. P. 533–546.
 24. Brown G.C. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase // Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 2001. Vol. 1504. P. 46–57.
 25. Brown G.C., Borutaite V. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart // Cardiovasc. Res. 2007. Vol. 75. P. 283–290.
 26. Calabrese V., Mancuso C., Calvani M. [et al.]. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity // Nat. Rev. Neurosci. 2007. Vol. 8. P. 766–775.
 27. Chertok V.M., Kotsyuba A.E., Kotsyuba E.P. Serotonergic and nitroxidergic neurons in the nuclei of the medulla oblongata in the rat // Neuroscience and Behavioral Physiology. 2012. Vol. 42, No. 5. P. 526–531.
 28. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Norepinephrinergic and nitroxidergic neurons of vasomotor nuclei in hypertensive rats // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2015. Vol. 158, No. 5. P. 695–699.
 29. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Distribution of NADPH-diaphorase and neuronal NO synthase in the nuclei of the medulla oblongata in rats // Neuroscience and Behavioral Physiology. 2014. Vol. 44, No. 8. P. 909–913.
 30. Dawson T.M., Bredt D.S., Fotuhi M.H. [et al.]. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH-diaphorase are identical in brain and peripheral tissues // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. Vol. 88. P. 7797–7801.
 31. Fiskum G. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of acute neural cell death // Mitochondria in pathogenesis. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001. P. 317–331.
 32. Hope B.T., Michael G.J., Knigge K.M. [et al.]. Neuronal NADPH-diaphorase is a nitric oxide synthase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. Vol. 88. P. 2811–2814.
 33. Karnaukhov V.N. Carotenoids in oxidative metabolism of molluscoid neurons // Exp. Cell. Res. 1971. Vol. 64. P. 301–306.
 34. Keating D.J. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, regulation of exocytosis and their relevance to neurodegenerative diseases // J. Neurochem. 2008. Vol. 104. P. 298–305.
 35. Kim H.W., Batista L.A., Hoppes J.L. [et al.]. A crustacean nitric oxide synthase expressed in nerve ganglia, Y-organ, gill and gonad of the tropical land crab, *Gecarcinus lateralis* // J. Exp. Biol. 2004. Vol. 207. P. 2845–2857.
 36. Kotsyuba A.E., Chertok V.M., Kotsyuba E.P. Comparative characteristics of serotonergic neurons in some nuclei of rat medulla // Cell and Tissue Biology. 2011. Vol. 5, No. 4. P. 503–510.
 37. Kotsyuba E.P., Vaschenko M.A. Neuroplastic and neuropathological changes in the central nervous system of the Gray mussel *Crenomytilus grayanus* (Dunker) under environmental stress // Invertebr. Neurosci. 2010. Vol. 10, No. 1. P. 35–46.
 38. Larade K., Storey K.B. A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrates // Cell and molecular response to stress 3: sensing, signaling and cell adaptation. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 2002. P. 27–46.
 39. Letendre J., Le Boulenger F., Durand F. Oxidative challenge and redox sensing in mollusks: effects of natural and anthropic stressors // Oxidative stress in vertebrates and invertebrates: molecular aspects of cell signaling. Chpt. 26. New York: Wiley-Blackwell, 2012. P. 361–376.
 40. López-Costa J.J., Acupil C., Tagliaferro P. [et al.]. Distribution of NADPH-diaphorase in rat mesencephalon: a light and electron microscopical study // Biocell. 2002. Vol. 26. P. 247–252.
 41. Mancuso C., Scapagnini G., Curro D. [et al.]. Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders // Front. Biosci. 2007. Vol. 12. P. 1107–1123.
 42. Marine mussels: their ecology and physiology. Cambridge: Cambridge University Press, 1976. 506 p.
 43. Matsumoto T., Nakane M., Pollock J.S. [et al.]. A correlation between soluble brain nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase activity is only seen after exposure of the tissue to fixative // Neurosci. Lett. 1993. Vol. 155. P. 61–64.
 44. Niizuma K., Endo H., Chan P.H. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival // J. Neurochem. 2009. Vol. 109, Suppl. 1. P. 133–138.
 45. Petrunka V.V. Localization and role of carotenoids in molluscan neurons // Cell. Mol. Neurobiol. 1982. Vol. 1. P. 11–20.
 46. Pimenova E.A., Varaksin A.A. Putative nitroxidergic cells in the digestive system of some mytilids (Mollusca: Bivalvia: Mytilidae) revealed by NADPH-diaphorase histochemistry // Malacologia. 2006. Vol. 49. P. 61–78.
 47. Rothe F., Langnaese K., Wolf G. New aspects of the location of neuronal nitric oxide synthase in the skeletal muscle: a light and electron microscopic study // Nitric Oxide. 2005. Vol. 13. P. 21–35.
 48. Shulkin, V.M., Presley, B.J., Kavun, V.Ya. Metal concentrations in mussel *Crenomytilus grayanus* and oyster *Crassostrea gigas* in relation to contamination of ambient sediments // Environ. Int. 2003. Vol. 29. P. 493–502.
 49. Tseng C.-Y., Lue J.-H., Chang H.-M. [et al.]. Ultrastructural localization of NADPH-d/nNOS expression in the superior cervical ganglion of the hamster // J. Anat. 2000. Vol. 197. P. 461–475.
 50. Varaksin A.A., Pimenova E.A., Varakina G.S. [et al.]. Localization of NADPH-diaphorase-positive elements in the intestine of the mussel *Crenomytilus grayanus* // Malacologia. 2002. Vol. 44. P. 135–143.
 51. Vaschenko M.A., Kotsyuba E.P. NADPH-diaphorase activity in the central nervous system of the Gray mussel *Crenomytilus grayanus* (Dunker) under stress conditions: a histochemical study // Mar. Environ. Res. 2008. Vol. 66. P. 249–258.
 52. Wolf G., Würdig S., Schünzel G. Nitric oxide synthase in rat brain is predominantly located at neuronal endoplasmic reticulum: an electron microscopic demonstration of NADPH-diaphorase activity // Neurosci. Lett. 1992. Vol. 147. P. 63–66.
 53. Zs.-Nagy I. Cytosomes (yellow pigment granules) of mollusks as cell organelles of anoxic energy production // Int. Rev. Cytol. 1977. Vol. 49. P. 331–377.

Поступила в редакцию 02.11.2015.

Топография NO-синтазы в центральной нервной системе двустворчатых моллюсков в норме и при действии стресс-факторов

М.А. Ващенко, Е.П. Коцюба

Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17)

Резюме. В обзоре представлены результаты исследований нитроксидергической компоненты центральной нервной системы двустворчатых моллюсков, полученные с использованием устойчивой к альдегидам NADPH-диафоразы (NADPH-d) в качестве маркера NO-синтазы. Приведены данные о влиянии экологических стресс-факторов (гипертермии, гипоксии и антропогенного загрязнения) на топографию, количественные характеристики NADPH-d-позитивных нейронов и активность NADPH-d в центральной нервной системе двустворчатых моллюсков, а также на ультраструктуру нейронов, синаптическую пластичность и субклеточную локализацию NADPH-d.

Ключевые слова: оксид азота, нейроны, цитосомы, антропогенное загрязнение.

УДК 611.81.1.018: 616.8-091.81

МОДУЛЬНАЯ ПАРАДИГМА И ПРОБЛЕМА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ МОЗЖЕЧКА

С.Г. Калининченко

Тихоокеанский государственный медицинский университет (6900950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Ключевые слова: модульная самоорганизация, кортиконуклеарный микрокомплекс, модели межнейронных связей.

THE MODULAR PARADIGM AND THE PROBLEM OF THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ORGANIZATION OF THE TENTORIUM

S.G. Kalinichenko

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

Summary. It is discussed topical issues of the organization of neural ensembles implementing the basic functions of the tentorium. On the basis of literature data and own research of the author the position substantiates according to which the actual existence of the cerebellar cortex has functional modules coordinates and their morphological contours determined by the core of the exciting influence of afferent fibers and local interneuron connections. The dynamic characteristics of the modules are considered by the example of the formation of ergic compartments of neurons and parasagittal corticonuclear microcomplexes of the tentorium; it is suggested the generalized scheme of these communications.

Keywords: modular self-organization, corticonuclear microcomplex, models of interneuron connections

Pacific Medical Journal, 2016, No. 2, p. 42–48.

Начиная с первых попыток изучения коры мозжечка, исследователями движет главная цель – выявить скрытый порядок в сложном строении нейронной сети и использовать его для создания реалистичных функциональных моделей этого отдела мозга [11, 13, 22]. Типология нейронов всегда оставалась необходимым методологическим принципом данных изысканий, их первоэлементом, на основе которого сформировались современные представления о физиологии мозжечка [1, 16, 26]. Как установлено, взаимосвязи идентифицированных типов нейронов функционируют посредством модульных ансамблей по линии взаимодействия внешних афферентных связей мозжечка и их мишеней в коре [2, 9]. В фокусе интеграции гетерогенных популяций нейронов находятся различные нейрохимические и анатомо-гистологические механизмы. В настоящей работе рассмотрены основные подходы к решению вышеупомянутой цели и противоречия, возникающие при изучении структурно-функциональной организации мозжечка.

Модульная архитектура мозжечка

Кора мозжечка имеет строго упорядоченную организацию. В каждом ее сегменте формируется повторяющаяся нейронная цепь, в пределах которой происходит переработка мультимодальной возбуждающей информации. Как и в большинстве других отделов

центральной нервной системы, в коре мозжечка можно выделить несколько уровней модульной организации нейронов: анатомический, нейрохимический и функциональный.

Структурно-функциональный модуль включает клетки Пуркинье и интернейроны, взаимосвязанные для синхронного вовлечения в формирование эфферентного импульсного залпа [30]. Данная группа клеток пронизывает все слои коры и строится по вертикальной оси вдоль восходящих аксонов клеток-зрен. Анатомические границы модулей определяются парасагиттальной ориентацией и ареалом ветвления лиановидных волокон. Паттерны их распределения в ростокаудальном направлении позволяют разделить кору на дискретные зоны: переднюю (дольки I–V), центральную, заднюю и узелковую [28]. Модули состоят из клеток Пуркинье и интернейронов, которые неоднозначны по своему нейрохимическому профилю и, следовательно, могут выполнять полимодальные функции во внутренних и внешних связях коры мозжечка.

Нейрохимическое картирование коры мозжечка показывает регулярное сочетание нейронных ансамблей по признаку экспрессии различных макромолекул. Довольно эффективным маркером таких комплексов является белок зебрин (zebrin II), ассоциированный с цитоскелетом клеток Пуркинье [18]. С помощью методов молекулярного клонирования и геномного анализа этот белок распознан как дыхательный фермент альдолаза C [29, 33]. Хотя окончательная функция зебрин в нервных клетках остается неясной, выявление его хемоспецифической локализации позволяет представить кортикоцеребеллюм как совокупность чередующихся узких парасагиттальных полос (кластеров) зебрин-иммунопозитивных и, соответственно, зебрин-иммунонегативных нейронов Пуркинье. Согласно R. Hawkes и C. Gravel [19], количество одноименных компартментов у крыс составляет порядка 10^3 , а каждый из них содержит до 300 нейронов Пуркинье. Эта регулярная архитектура обнаруживается в передней и задней долях червя и полушарий, однако в центральной доле, клочке, околочлолке и узелке мозжечка нейроны Пуркинье демонстрируют тотальную экспрессию зебрин без разделения на отдельные группировки (рис. 1).

Нейрохимическая гетерогенность модулей реализована уже на уровне постмитотических клеток – носителей протокарты, или программы развития

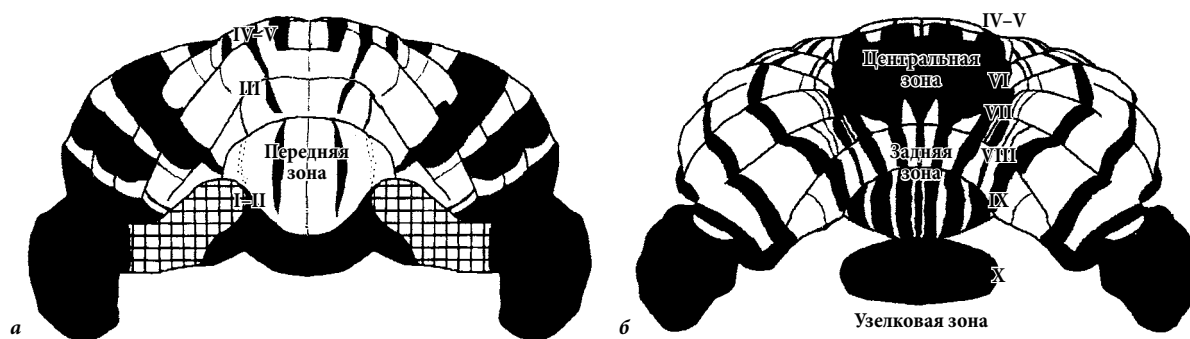


Рис. 1. Схема проекций зебрин-иммунопозитивных «полос» клеток Пуркинье на поверхность коры мозжечка мыши по C.L. Armstrong и R. Hawkes [6]:

а – вид мозжечка спереди; б – вид мозжечка сзади. Каждая «полоска» клеток Пуркинье представляет совокупность модулей со специфическим паттерном афферентных и эфферентных связей. I–X – доли червя по номенклатуре Ларселла.

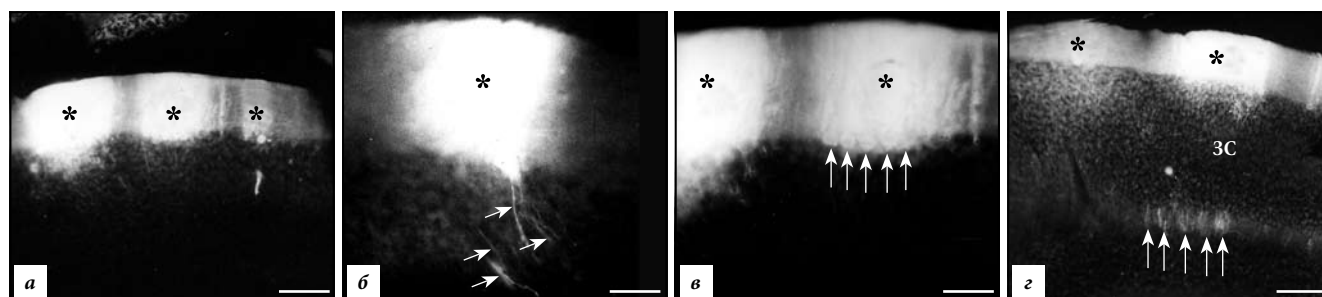


Рис. 2. Зональная организация нейронов Пуркинье в передней доле мозжечка крысы:

а – модули клеток Пуркинье маркируются как регулярные интенсивно флюоресцирующие полосы (звездочки); б – аксональные проекции внутримодульных нейронов Пуркинье (стрелки); в – детали модуля, включающего по ширине от 5 до 10 нейронов Пуркинье (стрелки); г – топографическое соответствие сагиттальных модулей нейронов Пуркинье (звездочки) и пучков лиановидных волокон (стрелки) в субкортикальном белом веществе. ЗС – зернистый слой. Сагиттальные срезы, окрашенные с помощью инъекции DI в нижний оливарный комплекс. Масштаб: а – 150 мкм; б, в – 50 мкм; г – 100 мкм.

кортикальных листков, которая реализуется с помощью домен-специфичных сигнальных молекул, ассоциированных с мембраной корковых нейроцитов [6]. Первоначально протокарта служит «матрицей» для формирования локальных связей между нейронами, однако позднее, с поступлением первичной афферентной информации, она преобразуется в соответствии с модальностью кортикопетальных проекций на отдельные цитоархитектонические зоны. Каждый модуль, согласно механизму селекции, дифференцируется с помощью специфического афферентного волокна, которое находит комплементарную ему молекулярную протокарту в зебрин-иммунопозитивных парасагиттальных доменах растущей кортикальной пластинки [17]. Природа описанных взаимодействий остается неясной, однако есть основания полагать, что их опосредует обширное семейство кондукторных молекул, которые моделируют и направляют позиционный рост лиановидных и моховидных афферентов к соответствующей топографической карте своих мишеней в коре [23].

Модули зебриновых клеток – закономерное явление, возникающее на ранних этапах эволюции мозжечка. Их морфогенетическое постоянство в ряду от рыб до млекопитающих повторяет фенотипические признаки нейронов Пуркинье и соотносится с топографией проекций специфических кортикопетальных

волокон [6]. Однако не исключено, что кора имеет еще более тонкое деление с образованием минимальных топомимических единиц. С помощью иммуноцитохимических методик и гибридизации *in situ* удалось доказать региональную специфичность мозжечка в отношении экспрессии цитохромоксидазы, ацетилхолинэстеразы, 5'-нуклеотидазы, синаптофизина, белков теплового шока, различных транскрипторных факторов и других макромолекул [2, 6]. Распределение этих маркеров также отражает морфологическую стратификацию мозжечка и соответствует его зональным компартаментам.

За детальным изучением модульной нейроархитектуры следуют сравнительные исследования различных афферентных систем, вскрывающие специфические черты функционирования определенных областей мозжечка уже на самых ранних стадиях кортикогенеза. Афферентные входы к модулям кортикоцереbellума носят направленный характер и адресуются ко многим пространственно разделенным участкам коры, а конstellации синергичных и антагонистичных межмодульных отношений обеспечивают динамичность их участия в различных актах сенсомоторного поведения [15].

Как показали наши исследования, введение микрокристаллов DI и DA в нейроны нижнего оливарного комплекса у крыс маркирует лиановидные афферентные

волокна в молекулярном и их коллатерали в зернистом слое коры. В белом веществе червя и полушарий мозжечка эти волокна группируются в сагиттальные пучки шириной 200–300 мкм, направляющиеся в пределах данного участка коры к определенным микромодулям нейронов Пуркинье. В результате, при окрашивании карбоцианинами последние приобретают вид регулярных полосок (рис. 2). Аксоны меченных карбоцианинами нейронов проецируются на участки белого вещества, в которых проходят соответствующие пучки лиановидных волокон. Можно полагать, что обнаруженные модули содержат неоднородные популяции клеток, сходных с теми, которые маркируются с помощью топографического маркера зебрин [18].

Разделение оливодеребереллярных волокон на дискретные, последовательно сменяющие друг друга серии, соответствует зонам А, В, С1, С2, С3, D1 и D2, идентифицированным ранее J. Voogd и его сотрудниками [32]. Каждая микрозона представляет собой топический компартмент, включающий восходящие волокна от определенных подъядер нижнего оливарного комплекса, и нисходящие системы волокон, избирательно иннервирующие нейроны собственных ядер мозжечка и вестибулярных ядер мозгового ствола.

Нейрофизиологические механизмы сборки, формирования и поддержания столь обширных объединений нейронов в единую рабочую систему отвечают авторитетной концепции кортиконуклеарного микрокомплекса, предложенной Masao Ito в 1991 г. Осуществляя мультисенсорную обработку информации, отдельные паттерны синхронно активных клеток Пуркинье объединяются в более крупные интегрированные единицы, соматотопически связанные с соответствующими группами своих мишеней в глубоких ядрах мозжечка и вестибулярных ядрах мозгового ствола. Такие объединения рассматриваются в качестве жесткого структурного элемента организации кортикоцеребеллума, образующегося в пренатальном онтогенезе. М. Ito констатировал, что реверберация импульсов между элементами этих микрокомплексов служит нейрональной основой корковой пространственно-временной структуры памяти и процессов обучения. Подобные модули формируются в виде дискретных складок или листов кортикальной пластинки шириной 0,3–1 мм и длиной до 10 мм. У человека их количество во всей коре составляет от 5 до 15 тысяч [21]. Морфофункциональная специализация каждого листка как элементарной единицы сенсомоторной интеграции определяется характером кортикопетальных проекций и адресатом конечного эффекторного пути. Хотя основные типы функций, выполняемых корой мозжечка, сходны во всех листках, мозаика афферентных входов, организация внутрикорковых локальных цепей нейронов и проекции эфферентов, по-видимому, уникальны для каждого из них [2, 5]. Количество и рисунок кортикальных листов в ряду млекопитающих являются

своеобразным морфологическим индикатором различной функции сенсомоторного контроля у данного вида. Таким образом, распределенная система кортикоцеребеллярных модулей выступает частью общемозговых систем, выходы которых конвергируют на разных уровнях ствола и спинного мозга и обеспечивают управление деятельностью определенных мышечных групп.

Модульные ассоциации NO-ергических интернейронов и их функция

Повторение модульных ансамблей через определенные интервалы (даже если отростки клеток частично перекрываются) неизбежно ведет к возникновению регулярной структуры, которую определяет строение внутренних связей. Повторяющиеся группы нейронов обнаруживаются при окрашивании срезов на NADPH-диафорузу (NADPH-d). У крысы и кролика они выявляются как скопления NADPH-d-позитивных клеток-зерен, которые закономерно чередуются с участками нейропилия, содержащими малоокрашенные нейроны (рис. 3, а). Зоны с высокой активностью энзима, диаметром от 300 до 500 и 800 мкм, находятся иногда на равновеликом расстоянии друг от друга, простираются в сагиттальном направлении перпендикулярно пиальной поверхности коры. Наиболее интенсивное окрашивание перикарионов клеток-зерен отмечается под слоем нейронов Пуркинье, оно усиливается также за счет высокой активности NADPH-d в розетках моховидных волокон. В молекулярном слое NADPH-d-позитивные модули располагаются над одноименными структурами клеток-зерен и, очевидно, представляют собой зоны финальной конвергенции их восходящих аксонов (рис. 3, б).

Периодический рисунок распределения NADPH-d-позитивных клеток-зерен и их ассоциации с определенными пучками мшистых волокон согласуются с концепцией модульной структуры коры, которая формируется из вертикальных колонок синхронно активных нейронов [8]. Эти модульные ассоциации получают одномодалые афференты и оказывают возбуждающее действие на сопредельные группы клеток Пуркинье. По данным R. Hawkes и R.W. Turner [20], зональная специализация диафоразных нейронов у мышей коррелирует с топографией зебриновых компартментов нейронов Пуркинье и почти с абсолютной точностью совпадает с границами рецептивных полей моховидных афферентных волокон. Если восходящие сегменты аксонов клеток-зерен фокусируют возбуждение на зебрин-иммунореактивные нейроны Пуркинье, то параллельные волокна, напротив, передают активность на зебрин-иммунонегативные нейроны, находящиеся «по бокам» от скоплений NO-ергических клеток-зерен. Наряду с образованием нейрхимических и функциональных микрозон феномен структурной упорядоченности клеток обеспечивает концентрацию возбуждения и ограничивает его иррадиацию на

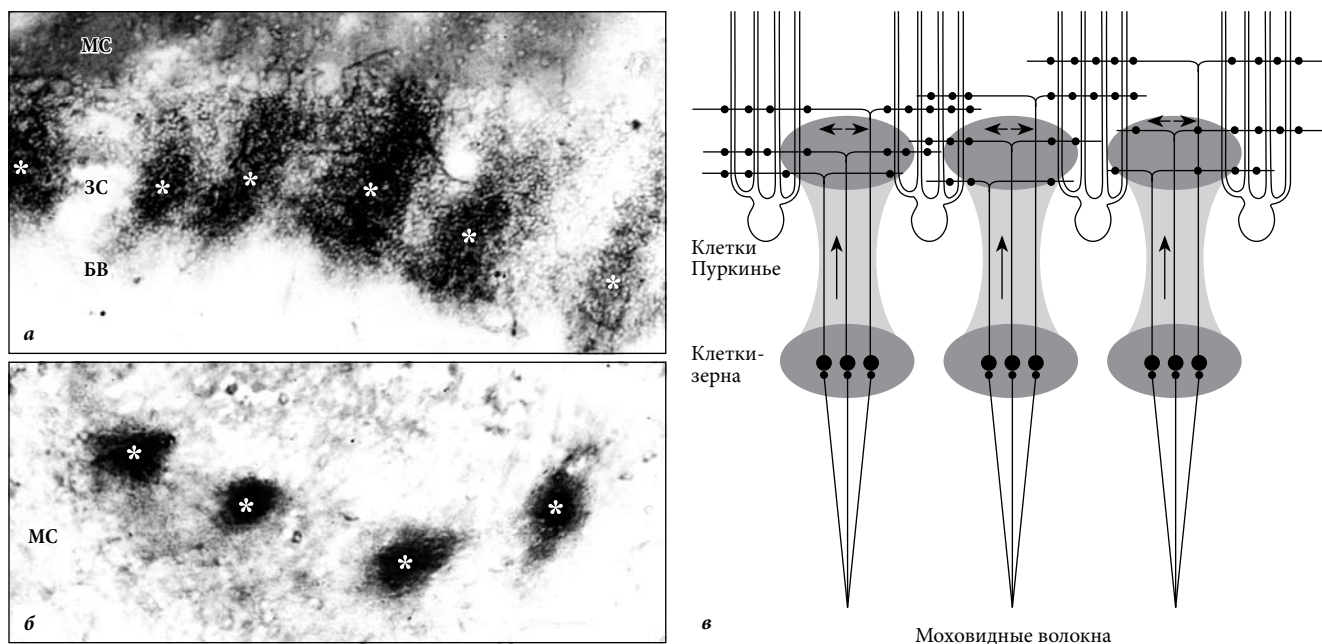


Рис. 3. NADPH-d-позитивные компартменты в коре мозжечка крысы:

а – модули NO-ергических клеток-зерен (звездочки) имеют форму дискретных полос, разделенных участками нейронила с низкой активностью энзима. Каждый модуль содержит скопления NADPH-d-позитивных розеток моховидных волокон; б – модульные структуры нейронов молекулярного слоя. Зоны с высокой активностью NADPH-d (звездочки) совпадают с топографией проекций восходящих аксонов клеток-зерен в молекулярном слое коры; в – схема модульной организации NO-ергических интернейронов в коре мозжечка крысы и кролика. Кластеры клеток-зерен, их восходящие аксоны и мишени формируют вертикальные колонки синхронно активных элементов. Диффузия NO происходит по ходу аксонов клеток-зерен и их обширной дивергенции в молекулярном слое коры. Оксид азота регулирует активность модульных нейронов и является значимым фактором в механизмах пластичности межнейронных связей. Зоны его диффузного действия заштрихованы. Стрелки – направление циркуляции нервного импульса. MC – молекулярный слой, ЗС – зернистый слой, БВ – субкортикальное белое вещество. Масштаб: а – 200 мкм; б – 100 мкм.

обширные участки коры, направляя афферентные импульсы в строго определенные нейронные цепи. Более того, регулярное распределение NO-ергических клеток создает условия для равномерной диффузии оксида азота в трехмерном пространстве нейронила.

Время эффективного действия оксида азота в цитоплазме нейронов Пуркинье составляет около 50 мс, однако в окружающем межклеточном веществе оно еще меньше – порядка 10 мс [2, 4]. За это время молекулы NO успевают заполнить сферическое пространство нейронила радиусом 14 мкм от источника их высвобождения. В этом объеме ткани содержится примерно 4136 шипиков клеток Пуркинье [2]. Следовательно, в течение 10 мс оксид азота способен модифицировать активность более 4000 аксошипиковых синапсов параллельных волокон [21]. Его эффекты в этих взаимосвязях развиваются в соответствии с точной геометрией связей аксонов клеток-зерен, оказывая влияние на дальнейшее распространение волны возбуждения и передачу импульсов от параллельных волокон на дендриты нейронов Пуркинье. Этот неявный, но мощный фактор способствует пространственному разграничению и функциональной изоляции зон возбуждения и торможения клеток Пуркинье, вызванных стимуляцией модульных группировок клеток-зерен. Функциональное сопряжение и синхронизация активности клеток-зерен также связаны с парасинаптическим (объемным) действием оксида азота, которое может целиком контролировать кортикальный сегмент,

и выступает фактором саморегуляции активности нейронной сети.

Таким образом, диффузное действие оксида азота моделирует распространение возбуждающей активности клеток-зерен, которая определяется высокой степенью конвергенции моховидных волокон на их дендриты и обширной дивергенцией параллельных волокон в молекулярном слое коры. С учетом этих факторов распределение активности клеток-зерен в трехмерном пространстве нейронила можно представить в виде песочных часов со стянутой «талией» посередине (рис. 3, в).

Анатомо-функциональные координаты корковых модулей мозжечка

Проблема взаимодействия внутримодульных и внешних факторов нервной активности при ближайшем рассмотрении оказывается чрезвычайно многогранной и емкой. Модуль является полифункциональной единицей, принимающей импульсы из различных отделов мозга, обеспечивая широкие возможности для тонко сбалансированного взаимодействия близкорасположенных клеток Пуркинье с взаимоперпендикулярным размещением основных каналов ввода и вывода информации. Подобная организация коры ведет к формированию квазикристаллической структуры, взаимодействие между отдельными элементами которой определяется константами решетки [2, 30]. Осуществляя внутреннюю обработку информации,

каждый модуль функционирует как относительно автономная система, однако активность локальной сети модифицируется при взаимодействии с афферентными волокнами и другими модульными ансамблями [3]. Следовательно, система в целом обладает свойствами, отличными от тех, которые можно обнаружить у простого набора модулей, что дает основание говорить об эмерджентности форм функциональных взаимосвязей в пределах локального участка коры [2]. Отметим, что каждая корковая область является одной из надсистем в центральной нервной системе, и для интерпретации основных принципов ее организации требуется моделирование различных петель прямых и обратных связей по уровням взаимодействия от локальных цепей до крупномасштабных сетей [31]. Разнообразие типов модульной организации внутри корковых листов и между ними отображает, по-видимому, различные паттерны информационных процессов. Вследствие этого становится понятным внутри- и межвидовое разнообразие мозжечка. Эта гипотеза согласуется также с теориями операционных механизмов коры, которые не рассматривают структурные модули, но показывают, как сложные формы организации могут состоять из простых субъединиц, связывающих нейрональные входы с внутренними цепями обработки информации. Вовлечение корковых систем мозжечка в целостную деятельность большого мозга определяется текущей мотивацией и конкретной двигательной программой, направленной на удовлетворение этой мотивации. Двигательная программа, по сути, носит приспособительный характер и строится на основе принципа мультисенсорной конвергенции [27].

Наряду с входными и выходными системами, функциональное состояние мозжечка определяется специфическим взаимодействием возбуждающих и тормозных нейронов локальных цепей. Схематизирующий анализ этих событий и их адекватное моделирование требуют дополнительного совмещения различных подходов с учетом анатомической полярности межнейронных связей, субординированности, консолидации и пропорциональной соотношенности возбуждающих и тормозящих сигналов в нейронных сетях коры. Поскольку входящие в кору афферентные импульсы первоначально переключаются на структурах зернистого слоя, синаптические комплексы клеток-зерен предлагается рассматривать как элементарную единицу информационного процесса в коре мозжечка [12, 25]. Всплески одиночных разрядов в моховидном волокне активируют участок зернистого слоя диаметром 500–1500 мкм [24]. В ответ на эту стимуляцию клетки-зерна генерируют синхронные спайки и фокусируют их с помощью своих восходящих аксонов на определенные группы нейронов Пуркинье. Функциональные модули имеют форму регулярных вертикальных колонок, где уровень активации клеток Пуркинье постоянно коррелирует с уровнем активности подлежащих кластеров клеток-зерен [10]. Дискриминация активности между

соседними модулями достигается за счет ограничения иррадиации возбуждения вдоль параллельных волокон аксонов клеток-зерен. При этом гломерулы сохраняют кодовые признаки качества передаваемой информации, обеспечивая перенос соматотопической мозаики мшистых афферентов в структуру соответствующей микрозоны слоя клеток Пуркинье [15]. Эта структура широко принимает сенсорную информацию из различных источников и последовательно обрабатывает ее по разным параметрам на разных уровнях сложности [7].

Традиционная точка зрения о продольном направлении нейроциркуляторных процессов в коре мозжечка (on-beam interaction) не может быть признана вполне удовлетворительной. Согласно этой концепции, предложенной J.C. Eccles, M. Ito и J. Szentagothai [14], влияние мшистых кортикопетальных волокон на клетки-мишени осуществляется в прямоугольном пространстве нейропила, ограниченном ходом параллельных волокон (на протяжении около 2 мм вдоль листка коры) и аксонами клеток-канделябров, распространяющими свои терминальные ветвления на 0,6 мм в плоскости, перпендикулярной параллельным волокнам. Четко сфокусированный приток импульсов, поступающих по моховидным волокнам, генерирует серию разрядов, идущих вдоль пучков аксонов клеток-зерен. В результате возникает полоска (beam) возбужденных нейронов Пуркинье шириной 2 мм, которую фланкируют зоны торможения (шириной 0,6 мкм), вызванные стимуляцией корзинчатых нейронов [14]. Оригинальная идея авторов о распространении возбуждения вдоль пучков одновременно активируемых параллельных волокон и возникающего при этом в билатеральной краевой зоне торможения, остается актуальной и в настоящее время, однако последствия активации корзинчатых нейронов и аксонов клеток-зерен для импульсного поведения клеток Пуркинье рассматриваются сейчас в совершенно новом свете. Оказалось, что воздействие параллельных волокон на нейроны Пуркинье носит, как правило, сугубо косвенный характер. Более существенное влияние на них оказывает фактор вертикальной организации восходящих аксонов клеток-зерен и взаимодействие последних с тормозными интернейронами. J.M. Bower [8], впервые изучивший это явление, обнаружил вертикальные модули, включающие небольшие группы клеток-зерен и вышележащие кластеры нейронов Пуркинье, взаимосвязанные посредством возбуждающих контактов. Эти элементы формируются как временные динамические констелляции нейронов, участвующие в приеме и передаче сигналов, поступающих по системе мшистых афферентных волокон [12].

Морфофункциональный дизайн коры мозжечка выглядит как однотипная структура, состоящая из комбинации слоистых и колончатых компартментов клеток. Взаимодействие между модулями реализуется с помощью параллельных волокон в медиолатеральном

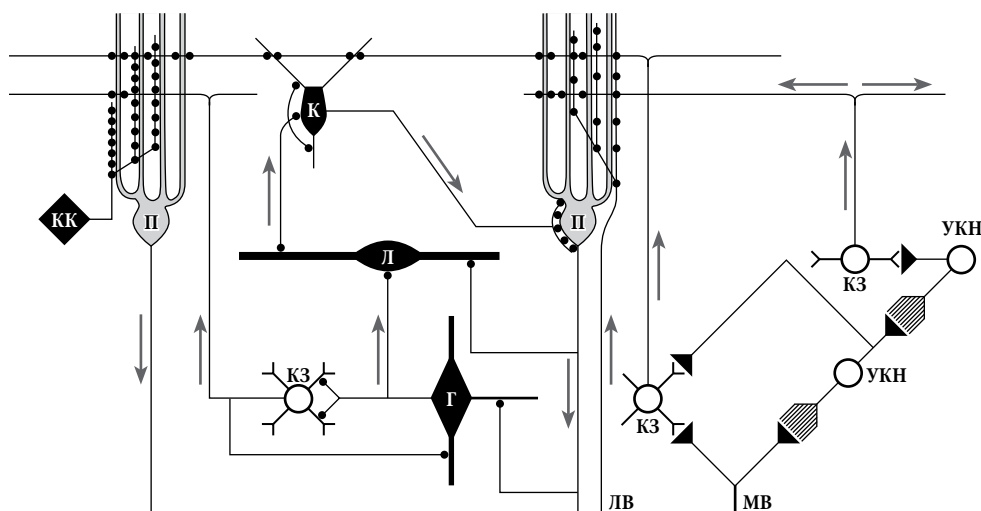


Рис. 4. Схема организации межнейронных связей в модуле коры мозжечка:

Г – клетка Гольджи, К – корзинчатая клетка, КЗ – клетки-зерна, КК – клетка-канделябр, Л – клетка Люгаро, ЛВ – лиановидное афферентное волокно, МВ – моховидное афферентное волокно, П – клетка Пуркинье, УКН – униполярный кисточковый нейрон. Тормозные ГАМК-ергические интернейроны выделены черным цветом, возбуждающие аспартат/глутамат-ергические интернейроны – белым. Эффекторные тормозные нейроны Пуркинье обозначены серым цветом. Стрелки – направление циркуляции нервного импульса.

направлении, а в сагиттальной плоскости – посредством длинноаксонной системы корзинчатых клеток. Регистрация активности параллельных волокон показывает, что она значительно короче и слабее импульсации, поступающей на интернейроны молекулярного слоя и клетки Пуркинье в результате растормаживающего действия корзинчатых нейронов. Синхронное суммирование синаптических потенциалов локального происхождения, преимущественно тормозных интернейронов молекулярного слоя, и, возможно, возбуждающих сигналов клеток-зерен в ходе возвратного торможения интегрирует влияние афферентных волокон и ограничивает распространение возбуждения, обеспечивая функциональную изоляцию парасагиттальных модулей клеток Пуркинье [12].

Благодаря координирующей функции специфических тормозных кортикальных механизмов, жесткие структурно организованные нейронные ансамбли, обладающие распределенными выходами, могут включаться в обширные функциональные объединения. Так, уравнивание торможения в корковых макро- и микромодулях путем торможения корзинчатых нейронов по вертикали, могут осуществлять клетки Люгаро, а синхронизацию торможения, или дезингибицию, по горизонтали обеспечивают клетки Гольджи. Активность внутримодульных нейронов регулируется также возвратным и прямым торможением, которое опосредуют, соответственно, клетки Гольджи и корзинчатые нейроны. Влияние афферентных волокон на нейроны различных кортикальных модулей определяется не только фазным состоянием их непосредственных мишеней (клеток-зерен и клеток Гольджи), но и траекторией парасагиттального ветвления возвратных коллатералей аксонов клеток Пуркинье.

Топографическое распределение соматических проекций участков тела на кору мозжечка только частично

определяется анатомическими закономерностями. Не менее важную роль здесь играют функциональные механизмы, ведущим среди которых служит внутрикоровое торможение. Оно способствует не только специализации корковых модулей, ограничивая приток к ним афферентной импульсации, но и устанавливает между ними сложные координационные отношения. Если внутримодульная активность регулируется возвратным и прямым торможением, то межмодульное взаимодействие осуществляется с помощью латерального торможения, которое опосредуют аксоны корзинчатых клеток. Этот механизм фокусирует возбуждение на нейронах данной кортикальной зоны и снижает его иррадиацию на соседние модули [2, 8].

Итак, модульная структура в своем функциональном смысле может быть представлена специфическим взаимодействием тормозных и возбуждающих типов нейронов, а распределение импульсов во внутри- и межмодульных пространствах определяется геометрией ветвления специфических афферентных волокон. Таким образом, возбуждение, поступающее по соответствующему кортикопетальному входу, ведет к формированию функциональных взаимосвязей (модулей) нервных клеток (рис. 4):

1. По входу моховидных волокон: 1) клетки-зерна → клетки Пуркинье; 2) униполярные кисточковые нейроны → униполярные кисточковые нейроны → клетки-зерна → клетки Пуркинье.

2. По входу лазающих волокон: 1) клетки Пуркинье → клетки Люгаро → корзинчатые клетки → клетки Пуркинье; 2) клетки Гольджи → клетки-зерна → клетки Пуркинье.

3. По входу моноаминергических афферентов: 1) клетки Люгаро → корзинчатые клетки → клетки Пуркинье; 2) клетки Люгаро → клетки Гольджи → клетки-зерна.

Пространственная организация связей формируется согласно принципу межнейронной комплементарности, детерминирована домен-селективностью и медиаторной специфичностью эффекторов одних типов клеток к рецепторным мишеням других и характеризуется постоянством количественных соотношений нейрохимически гетерогенных нейронов. Подобный порядок связей между нейронами стабилизирует баланс медиаторов, обеспечивает равновесие возбуждающих и тормозных механизмов на уровне микромодулей, модулей, долек и долей коры мозжечка. Высокоупорядоченная структура коры и ансамбли избирательно связанных клеток с различной медиаторной характеристикой определяют закономерную нейрохимическую организацию коркового модуля и являются первым шагом в создании нейронных кодов, представляющих собой комбинацию пространственных межнейронных отношений.

References

- Kalinichenko S.G., Okhotin V.E. Unipolar penicillar cells - a new type of excitatory interneurons of the cerebellar cortex and cochlear nuclei of the brain stem // *Morphology*. 2003. Vol. 124, No. 6. P. 7–21.
- Kalinichenko S.G., Motavkin P.A. Cerebellar cortex. M.: Nauka, 2005. 319 p.
- Kalinichenko S.G., Matveeva N.Yu. Self-organization of neural systems and brain modular architectonic // *Pacific Medical Journal*. 2010. No. 4. P. 8–11.
- Kalinichenko S.G., Matveeva N.Yu., Motavkin P.A. Morphofunctional characteristic neurovascular connections of the cerebellar cortex // *Pacific Medical Journal*. 2015. No. 1. P. 26–29.
- Apps R., Hawkes R. Cerebellar cortical organization: a one map hypothesis // *Nat. Rev. Neurosci.* 2009. Vol. 10, No. 9. P. 670–681.
- Armstrong C.L., Hawkes R. Pattern formation in the cerebellar cortex // *Biochem. Cell. Biol.* 2000. Vol. 78. P. 551–562.
- Barmack N.H., Yakhnitsa V. Functions of interneurons in mouse cerebellum // *J. Neurosci.* 2008. Vol. 28, No. 5. P. 1140–1152.
- Bower J.M. The organization of cerebellar cortical circuitry revisited. Implication for function // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2002. Vol. 978. P. 135–155.
- Cerminara N.L. Cerebellar modules: individual or composite entities? // *J. Neurosci.* 2010. Vol. 30. P. 16065–16067.
- Cerminara N. L., Aoki H., Loft M. [et al.]. Structural basis of cerebellar micircuits in the rat // *J. Neurosci.* 2013. Vol. 33. P. 16427–16442.
- Cerminara N.L., Apps R. Behavioural significance of cerebellar modules // *Cerebellum*. 2013. Vol. 10. P. 484–494.
- Cohen D., Yarom Y. Cerebellar on-beam and lateral inhibition: two functionally distinct circuits // *J. Neurophysiol.* 2000. Vol. 83. P. 1932–1940.
- D'Angelo E., Mazzearello P., Prestori F. [et al.]. The cerebellar network: from structure to function and dynamics // *Brain Res. Rev.* 2011. Vol. 66. P. 5–15.
- Eccles J.C., Ito M., Szentagothai J. The cerebellum as a neuronal machine. NY: Springer-Verlag, 1967. 97 p.
- Garwicz M. Micro-organisation of cerebellar modules controlling forelimb movements // *Prog. Brain Res.* 2000. Vol. 124. P. 187–199.
- Glickstein M. Stratab P, Voogd J. Cerebellum: history // *Neuroscience*. 2009. Vol. 162. P. 549–559.
- Hallem J.S., Thompson J.H., Gundappa-Sulur G. [et al.]. Spatial correspondence between tactile projection patterns and the distribution of the antigenic Purkinje cell markers anti-zebrin I and anti-zebrin II in the cerebellar folium cruris IIA of the rat // *Neuroscience*. 1999. Vol. 93. P. 1083–1094.
- Hawkes R. An anatomical model of cerebellar modules // *Prog. Brain. Res.* 1997. Vol. 114. P. 39–52.
- Hawkes R., Gravel C. The modular cerebellum // *Prog. Neurobiol.* 1991. Vol. 36. P. 309–327.
- Hawkes R., Turner R.W. Compartmentation of NADPH-dia-phorase activity in the mouse cerebellar cortex // *J. Comp. Neurol.* 1994. Vol. 346. P. 499–516.
- Ito M. Cerebellar circuitry as a neuronal machine // *Prog. Neurobiol.* 2006. Vol. 78. P. 272–303.
- Jörntell H., Bengtsson F., Schonewille M. [et al.]. Cerebellar molecular layer interneurons – computational properties and roles in learning // *Trends Neurosci.* 2010. Vol. 33, No. 11. P. 524–532.
- Karam S.D., Burrows R.C., Logan C. [et al.]. Eph receptors and ephrins in the developing chick cerebellum: relationship to sagittal patterning and granule cell migration // *J. Neurosci.* 2000. Vol. 20. P. 6488–6500.
- Kolb F.P., Arnold G., Lerch R. [et al.]. Spatial distribution of field potential profiles in the cat cerebellar cortex evoked by peripheral and central inputs // *Neuroscience*. 1997. Vol. 81. P. 1155–1181.
- Llinás R.R., Walton K.D. Cerebellum // *The synaptic organization of the brain*. 4th ed. / G. Shepherd (ed.). NY: Oxford University Press, 1998. P. 255–288.
- Oberdick J., Sillitoe R.V. Cerebellar zones: history, development, and function // *Cerebellum*. 2011. Vol. 10, No. 3. P. 301–306.
- Ros H., Sachdev R.N., Yu Y. [et al.]. Neocortical networks entrain neuronal circuits in cerebellar cortex // *J. Neurosci.* 2009. Vol. 29. P. 10309–10320.
- Sanchez M., Sillitoe R.V., Attwell P.J. [et al.]. Compartmentation of the rabbit cerebellar cortex // *J. Comp. Neurol.* 2002. Vol. 444. P. 159–173.
- Sugihara I., Shinoda Y. Molecular, topographic, and functional organization of the cerebellar cortex: a study with combined aldolase C and olivocerebellar labeling // *J. Neurosci.* 2004. Vol. 24, No. 40. P. 8771–8785.
- Szentagothai J. Self-organization: the basic principle of neural functions // *Theor. Med.* 1993. Vol. 14. P. 101–116.
- Tom J.H. Ruigrok. Ins and Outs of Cerebellar Modules // *Cerebellum*. 2011. Vol. 10. P. 464–474.
- Voogd J. The human cerebellum // *J. Chem. Neuroanat.* 2003. Vol. 26. P. 243–252.
- Walther E.U., Dichgans M., Maricich S.M. [et al.]. Genomic sequences of aldolase C (Zebrin II) direct lacZ expression exclusively in non-neuronal cells of transgenic mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. Vol. 95. P. 2615–2620.

Поступила в редакцию 30.09.2015.

Модульная парадигма и проблема структурно-функциональной организации мозжечка

С.Г. Калиниченко

Тихоокеанский государственный медицинский университет (6900950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Резюме. Обсуждаются актуальные вопросы организации нейронных ансамблей, реализующих основные функции мозжечка. На основе данных литературы и собственных исследований автора обосновывается положение, согласно которому реальное существование модулей коры мозжечка имеет функциональные координаты, а их морфологические контуры определяются активной зоной возбуждающего влияния афферентных волокон и локальных межнейронных связей. Динамические характеристики модулей рассмотрены на примере формирования нитроксидергических компартов нейронов и парасагитальных кортиконуклеарных микрокомплексов мозжечка; предложена обобщенная схема этих коммуникаций.

Ключевые слова: модульная самоорганизация, кортиконуклеарный микрокомплекс, модели межнейронных связей.

УДК 616.832-001: 611.82.018

ВНЕДРЕНИЕ СОВРЕМЕННЫХ ДОСТИЖЕНИЙ НЕЙРОГИСТОЛОГИИ В СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКУЮ ПРАКТИКУ

Ю.И. Пиголкин¹, Г.В. Золотенкова²

¹ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8/2), ² Бюро судебно-медицинской экспертизы Московской области (111401, г. Москва, 1-я Владимирская ул., 33/1)

Ключевые слова: иннервация сосудов, возраст, спинальная травма, давность наступления смерти.

THE IMPLEMENTATION OF MODERN ACHIEVEMENTS OF NEUROHISTOLOGY IN FORENSIC PRACTICE

Yu.I. Pigolkin¹, G.V. Zolotenkova²

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (8/2 Trubetskaya St. Moscow 119991 Russian Federation), Bureau of forensic medical examination of Moscow Region (33/1 Vladimirskaia St. Moscow 111401 Russian Federation)

Summary. The article discusses the significance of basic research on neurohistology, made by a team of scientists under the leadership of P.A. Motavkin, for forensic practice. The laws revealed in the study of vasomotor innervation used to solve such important problems of forensic medical examination, as the establishment of a specific accessory of material evidence of their biological origin, to establish the time of death, and the lifetime of limitations of spinal cord injury, the establishment of the age interval with identification.

Keywords: vascular innervation, age, spinal trauma, time of death.

Pacific Medical Journal, 2016, No. 2, p. 49–54.

Регуляция кровоснабжения головного и спинного мозга на протяжении многих лет является актуальной научной проблемой, в решение которой выдающийся вклад внес Павел Александрович Мотавкин – создатель Дальневосточной нейрогистологической школы [64–66]. Тем не менее эта проблема не теряет актуальности, поскольку сосудистые заболевания до сих пор остаются одной из главных причин инвалидности и смертности в развитых странах [16, 39]. Нервные структуры артерий центральной нервной системы, выполняя интегративную функцию, обеспечивают адекватное кровоснабжение мозга, поэтому разработка вопросов профилактики и лечения сосудистых расстройств здесь требует детального изучения сосудисто-нервного аппарата и его структурных перестроек в процессе индивидуального развития или обусловленных различными повреждающими воздействиями. Однако построение теоретических моделей функционирования биологических систем приобретают особую ценность после того, как они находят применение в практической деятельности. Материалы, полученные П.А. Мотавкиным, его соратниками и учениками при изучении системы регуляции кровообращения головного и спинного мозга в фило- и онтогенезе, при некоторых заболеваниях и различных воздействиях [5, 10–20, 24, 41, 49–64, 67–75] с успехом применяются для решения ключевых задач судебно-медицинской экспертизы [1–3, 8, 16, 22, 27, 28, 32, 40].

Золотенкова Галина Вячеславовна – канд. мед. наук, доцент, врач медико-криминалистического отдела БСМЭ Московской области; e-mail: zolotenkova.galina@bk.ru

Установление видовой принадлежности вещественных доказательств является одной из важнейших задач криминалистики [1, 27, 29, 38, 45]. Дифференциальная диагностика видовой принадлежности артерий мозга может быть основана на отличиях структуры нервных сплетений в сосудах разного калибра у человека и животных [4, 10, 14, 50, 51]. Доказана возможность отличать нервные сплетения кровеносных сосудов у различных классов животных посредством сопоставления значений концентрации эфферентных нервных проводников на мозговых артериях соответствующего калибра [12, 14, 24, 25, 63]. В качестве самостоятельного критерия предложено использовать особенности конфигурации эфферентных нервных сплетений. Дифференциально-диагностическим признаком может служить и содержание различных биогенных моноаминов, а также их соотношение в мягкой мозговой оболочке спинного мозга. Новые возможности в решении данной проблемы открыли исследования структуры гранулосодержащих клеток артерий у различных видов позвоночных, проведенные под руководством П.А. Мотавкина [9, 35, 36, 49, 67, 68]. Гранулосодержащие клеточные элементы, в частности меланоциты, хорошо сохраняются в трупном материале даже в случае резких гнилостных изменений, что значительно расширяет возможности их использования для видовой идентификации [24, 35, 36]. Способ идентификации биологических объектов, основанный на гистологических и гистохимических методах выявления нервных и местных нейроэндокринных элементов артерий и на морфометрическом анализе, достаточно специфичен и с успехом используется в судебно-медицинской практике [2, 27, 30].

Определение давности наступления смерти – одна из важнейших проблем судебной медицины. Известны трудности методологического и методического характера, с которыми приходится сталкиваться исследователям при ее решении [2, 3, 33, 40, 46]. Традиционные способы установления давности смерти подробно освещены в многочисленных руководствах. Основанные преимущественно на анализе выраженности трупных изменений, они из-за невысокой точности не соответствуют современным требованиям экспертной практики. С целью повышения качества экспертиз эти методы постоянно совершенствуются, в том числе на основе изменений нейроэндокринного аппарата сосудистой стенки [2, 30, 43].

Так, в процессе изучения эфферентной иннервации артерий головного и спинного мозга человека были

получены данные о том, что ее количественные показатели находятся в тесной связи с длительностью постмортального периода [21, 37]. С течением времени в адренергических аксонах уменьшается количество адренергических проводников и варикозностей вплоть до их полного исчезновения. Выявлена четкая корреляция интенсивности люминесценции нервных волокон сосудов мягкой оболочки головного мозга человека и времени, прошедшего с момента смерти. При изучении секционного материала установлено, что в течение двух часов после смерти, вне зависимости от температурных условий окружающей среды, на артериях оболочки головного мозга определяется густая сеть флуоресцирующих волокон, количество и интенсивность свечения которых практически не отличается друг от друга. Но уже спустя два часа интенсивность флуоресценции адренергических проводников снижается, хотя достоверного уменьшения концентрации нервных волокон не наблюдается. Значительная редукция нервных волокон в сосудах зарегистрирована через шесть часов после смерти. В этот период отмечается и значительное сокращение интенсивности свечения адренергических проводников. Динамика посмертной люминесценции адренергических волокон как дополнительный метод успешно используется в судебно-медицинской практике для установления давности смерти [27, 30].

Одной из главных медицинских и социальных проблем до сих пор остается тупая механическая травма. Интенсификация жизни людей, необходимость быстрых перемещений, развитие транспорта и техники – все это неизбежно приводит к росту травматизма на транспорте и в быту [3, 39]. Смертность от тупой мозговой травмы из года в год занимает одно из ведущих мест в общей структуре смертности населения планеты. В этой связи вопрос о давности механических повреждений актуален и в судебной медицине [3, 33, 48]. Однако, несмотря на активные научные поиски, точность диагностики давности тупой закрытой травмы явно недостаточна. При этом ранний период после причинения травмы является наиболее трудным и субъективным при экспертной оценке повреждений [2, 3, 33, 40, 42]. Сочетание традиционных гистологических и современных гистохимических и биохимических методов позволило группе ученых под руководством профессора П.А. Мотавкина выявить хронологические закономерности изменений тканевых структур спинного мозга на действие травмирующего фактора [3, 14, 32, 42, 74]. Известно, что в первые минуты после травмы во всех отделах центральной нервной системы выявляются полиморфные мелкоочаговые кровоизлияния. Вместе с тем в спинном мозге, по сравнению с головным, их не так много, и они имеют преимущественно ректический характер. Диапедзные кровоизлияния в спинном мозге в большом количестве появляются лишь спустя 3–6 часов после повреждения, в то время как в головном мозге они образуются уже в течение первого часа. Патоморфологические процессы в нервной ткани всех отделов центральной нервной

системы протекают однонаправленно и в достаточной степени синхронно. Воспалительная реакция в области ушиба постепенно сменяется дистрофическими изменениями нейронов и глии, позднее некротическими изменениями с формированием детрита через 12–24 часа после травмы.

В ходе гистохимических исследований транспортных ферментов в капиллярах при тупой травме спинного мозга были впервые выявлены волнообразные колебания и асинхронность пиков активности щелочной фосфатазы и магний-зависимой аденозинтрифосфатазы в первые три часа после повреждения [11, 25, 28, 31, 74]. В последующем, по мере нарастания дистрофических и некротических процессов в нервной ткани, их активность резко падает. Флюорометрическое изучение мягкой мозговой оболочки в области ушиба спинного мозга показало, что суммарное содержание биогенных моноаминов в разные сроки посттравматического периода значительно варьирует. Первоначальный ответ на травму характеризуется активацией симпатической системы. Через час содержание аминов снижается до контрольных значений и сохраняется на этом уровне в течение 12 часов. В дальнейшем их концентрация резко падает [23, 26, 32, 42]. Особенно заметно уменьшается содержание катехоламинов, тогда как уровень индолакиламинов меняется не столь значительно. Выявленная хронология гистологических, гистохимических и флюорометрических изменений сосудисто-нервного аппарата в месте повреждения дает объективные критерии для диагностики давности и прижизненности закрытой травмы спинного мозга и активно используется в экспертной практике [25, 28, 31, 32].

Актуальность проблемы идентификации личности обусловлена геополитическими катаклизмами, ростом масштабов неорганизованной миграции, сложной криминогенной обстановкой [27, 47, 48]. Определение возраста, как одного из основных общегрупповых признаков, позволяет ограничить круг объектов, подлежащих дальнейшему сравнительному исследованию [1, 29, 38]. Старение отдельных тканей, систем, как и всего организм в целом, развивается в соответствии с закономерностями гетерохронии, которая, применительно к судебно-медицинской практике, означает, что в разные периоды жизни уровень диагностической значимости признаков различен. Гетерохронное созревание функционально различных отделов нервного аппарата зависит от темпов дифференцировки иннервируемого субстрата и способствует адаптивным перестройкам кровообращения, поддерживающим адекватный энергетический баланс тканей.

При изучении артерий головного и спинного мозга человека, коллективом исследователей под руководством П.А. Мотавкина было установлено, что афферентная и эфферентная иннервация в процессе онтогенеза проходит ряд последовательных стадий качественных и количественных преобразований, на основании которых можно достаточно точно судить о возрасте человека [7, 14, 19, 41, 56, 64, 75]. Так, на 6–7-й неделе

внутриутробного развития на корешковых артериях и в мягкой мозговой оболочке верхнего сосудистого бассейна спинного мозга появляются первые чувствительные нервные волокна. Их формирование развивается в нисходящем направлении. Первоначально эти волокна обнаруживаются на сосудах спинного мозга верхнего бассейна, а затем в среднем и нижнем бассейнах. Дифференцировка нервных сплетений в первой половине внутриутробного развития выражается в повышении аргирофильности проводников и увеличении плотности их расположения. В этот период афферентный нервный аппарат построен исключительно из тонких волокон, берущих начало, по-видимому, из нейроцитов межпозвоночных ганглиев. В течение 20–24-й недели в организме плода происходят важнейшие изменения, определяющие новое качественное состояние основных функций. Этот возраст является одним из критических периодов развития, в том числе и для спинного мозга. Усложнение кровообращения в спинном мозге в связи с его десементацией и влечет за собой соответствующие изменения в иннервации кровеносных сосудов. Количество нервных волокон значительно возрастает на 9–10-м месяце пренатального онтогенеза, что, вероятно, связано с быстрым ростом спинного мозга на этом этапе развития и усложнением его гемодинамики. Морфологический субстрат иннервационных связей дифференцируется в значительной степени после рождения. В течение первого года жизни человека происходят значительные количественные и качественные преобразования афферентной иннервации кровеносных сосудов спинного мозга [4, 10, 14, 25]. Уже в первые дни после рождения в нервных сплетениях, наряду с тонкими и средними проводниками, появляются и толстые волокна диаметром свыше 7 мкм. Количество толстых волокон с возрастом увеличивается. С 13 до 44 лет качественные и количественные показатели афферентной иннервации артерий спинного мозга стабилизируются, но их значения остаются относительно выше, чем в предыдущих возрастных группах. В 45–54 года впервые начинают определяться инволютивные изменения афферентного аппарата артерий, которые служат частным проявлением «деафферентационного феномена». Снижение плотности сплетений происходит за счет редукции числа толстых и средних проводников, а после 65 лет наблюдается интенсификация инволютивных изменений. Мякотные волокна сосудов местами выглядят резко утолщенными, извитыми, гиперхромными.

Первые рецепторы, появляющиеся у 10-недельных эмбрионов, напоминают чувствительные нервные окончания низших позвоночных [10, 14, 24, 25]. Во второй половине беременности отмечается интенсивная дифференцировка чувствительных окончаний на спинномозговых артериях. Период становления чувствительной иннервации в пре- и в постнатальном онтогенезе сопровождается повышением доли компактных рецепторных форм. Начальный период выделения мягкой оболочки спинного мозга относится к 7-й неделе развития эмбриона, а неделю спустя в ней

выявляются первые холинергические проводники. На 8-й неделе внутриутробной жизни, когда появляются первые движения эмбриона, происходит расчленение симпатического ствола на дефинитивные узлы, отмечается слабая диффузная флюоресценция моноаминов в нервных волокнах, подходящих к спинному мозгу с передними корешковыми артериями [25, 36].

Развитие нервного аппарата артерий спинного мозга отражает процесс непрерывной дифференцировки симпатического ствола, становление которого сопровождается увеличением количества дефинитивных узлов. К 16-й неделе эмбриогенеза их число с каждой стороны возрастает до шестнадцати. В этот период наряду с дальнейшим увеличением количества нервных проводников на магистральных спинномозговых артериях регистрируется переход единичных волокон на крупные ответвления этих сосудов. В начале второй половины пренатального онтогенеза при некотором снижении темпов дифференцировки клеток вегетативных центров происходит интенсивное разрастание островков клеток, что ведет к росту показателей иннервированности артерий спинного мозга. Становление нервных сплетений происходит благодаря формирующему действию двух механизмов: концентрации и дисперсии [19, 25]. Первый проявляется в увеличении толщины поверхностных нервных пучков, второй – в многократном делении интраадвентициальных стволиков.

После рождения активность ферментов, маркирующих холинергические проводники, несколько снижается, что сопряжено, по-видимому, с усиленным ростом тел нейронов и дифференцировкой ткани нервных узлов. Увеличение количества холинергических нейронов, их способность синтезировать и накапливать ацетилхолин ведет к повышению значений концентрации холинергических нервных сплетений, а также активности в них холинацетилтрансферазы в спинномозговых сосудах у детей 2–4 лет. В период полового созревания (13–16 лет) концентрация адрен- и холинергических нервных волокон, уровень активности медиаторов и ферментов достигают дефинитивного состояния и практически не меняются до 45 лет. С возрастом отмечается ослабление нервных влияний на ткань, происходит редукция нервно-волоконистых структур, которой предшествует постепенное уменьшение в них запасов трансмисмиттеров и ферментов. Первые инволютивные изменения в нервных сплетениях артерий отмечаются в возрасте 45–54 лет, причиной чему могут служить дистрофические процессы в клетках симпатического ствола и в ганглиях блуждающего нерва. При старении последовательно снижается интенсивность люминесценции нервных проводников, активность ферментов и концентрация варикозностей, что характерно для начала постмедиаторного периода онтогенеза вегетативной нервной системы [6, 19, 41, 64, 75]. Число нервных волокон снижается параллельно содержанию катехоламинов и ферментов в нервных структурах сосудов. Во всех случаях изменения наступают раньше и выражены в большей степени в адренергических сплетениях, особенно на

сосудах задней поверхности спинного мозга. Однако видоизменения в нервной системе при старении нельзя сводить только к инволютивным процессам, поскольку часть нервных волокон сохраняет структуру, типичную для зрелого возраста. Следует также дифференцировать возрастные преобразования нервного аппарата артерий от патологических изменений, связанных с сосудистыми заболеваниями, которые особенно часто наблюдаются у людей преклонного возраста [14, 16, 50, 54, 55].

Гранулосодержащие клетки появляются в первые два месяца эмбриогенеза, опережая в своем развитии дифференцировку адренергической иннервации. Иначе говоря, в раннем онтогенезе симпатический контроль мозгового кровообращения осуществляется эндокринными клетками адвентиции, а в более позднем периоде эту функцию принимает на себя адренергическая иннервация сосудов. Первыми гранулосодержащими клетками, выявленными на 7-й неделе внутриутробного развития на спинномозговых артериях, являются хромаффиноциты. Из них на более поздних этапах онтогенеза адренергические терминали аккумулируют катехоламины. У 8-недельного эмбриона на спинномозговых сосудах появляются тканевые базофилы. На 9–10-й неделе обнаруживаются клетки, обладающие тирозиназной активностью, что позволяет отнести их к меланоцитам. Сразу после рождения хромаффиноциты на спинномозговых сосудах встречаются довольно редко, и их число практически не меняется до старческого возраста. Концентрация тканевых базофилов прогрессивно возрастает от 8-й недели пренатального онтогенеза до 2–3 лет жизни. После некоторого спада следующий пик роста приходится на 13–17 лет, что можно объяснить адаптивными процессами, обусловленными половым созреванием. С 17-летнего возраста до старости количество тканевых базофилов практически не меняется. Концентрация меланоцитов после рождения несколько снижается и стабилизируется в период с 8 до 55 лет [5, 14, 25, 35]. Инволютивные процессы в гранулосодержащих клетках наступают позже, чем в нервном аппарате кровеносных сосудов, и это имеет свой биологический смысл. Функция сосудов, постепенно теряющих к старости прямые нервные связи, начинает регулироваться биологически активными веществами гранулосодержащих клеток. В этой связи обращает на себя внимание увеличение числа базофилов в тканях и некоторых органах у лиц пожилого возраста.

Флюориметрические исследования мягкой оболочки и артерий спинного мозга показали, что на протяжении жизни человека общее содержание биогенных моноаминов, соотношение различных типов и их качественные характеристики варьируют. В эмбриональном периоде идентифицируются лишь индолалкиламины, что, вероятно, связано с деятельностью гранулосодержащих клеток, которые в своем развитии опережают созревание адренергического нервного аппарата артерий [17, 24, 35, 36]. Во второй половине пренатального онтогенеза в исследуемых образцах определялись адреналин, но-

радреналин, дофамин, серотонин и триптамин – амины, свойственные зрелому возрасту. Среди катехоламинов особенно велика доля дофамина. У детей качественные и количественные параметры биогенных моноаминов, установленные флюориметрически, не отличаются от аналогичных значений взрослого человека. На протяжении длительного периода жизни (до 45 лет) содержание биогенных моноаминов в сосудах мягкой мозговой оболочки спинного мозга остается практически неизменным. Выборочные исследования, проведенные в старческом возрасте, позволили установить, что после 75 лет происходит снижение общего содержания аминов, среди которого обращает на себя внимание трехкратное сокращение уровня норадреналина [9, 25]. Регрессивные изменения содержания норадреналина можно объяснить выраженной деструкцией адренергического нервного аппарата кровеносных сосудов в старости. Уровень других катехоламинов снижается не так быстро из-за продолжающейся деятельности гранулосодержащих клеток.

Многолетние исследования, проведенные П.А. Мотавкиным и его учениками, показали, что в процессе онтогенеза различные механизмы регуляции дополняют и заменяют друг друга, обеспечивая адекватный кровоток, соответствующий метаболическим запросам вещества мозга [5, 11, 17, 20, 25, 34]. Неодновременное подключение разнородных подсистем в онтогенезе определяет гетерогенность механизмов управления мозговой гемодинамикой, которые зависят от функциональной зрелости иннервируемого субстрата и способствуют адаптивным перестройкам кровообращения, поддерживающим адекватный энергетический баланс тканей. Выявленные закономерности возрастных изменений нервного аппарата артерий и капилляров мозга [6, 11, 25, 32, 34, 70, 74] в комплексе с другими методами, могут способствовать решению еще одной актуальной проблемы судебно-медицинской практики – установлению возраста человека при проведении судебно-медицинских идентификационных экспертиз.

Весьма перспективными в этом отношении представляются иммуногистохимические исследования нервных центров и сосудистых нервов головного и спинного мозга [52, 56, 70, 71]. Предложенные в настоящее время методы определения количественного содержания ферментов, участвующих в синтезе классических медиаторов и нового класса нейротрансмиттеров – газотрансмиттеров [44, 58], а также пространственных отношений между такими нейронами [45, 53, 59, 69], позволяют достаточно точно выстроить шкалу посмертных изменений этих веществ в биологических образцах [72, 73]. При этом в нервных центрах необходимо отличать несколько популяций иммунопозитивных нейронов, обладающих неодинаковой чувствительностью к различным воздействиям [57, 60, 61].

Таким образом, судебная медицина, являясь прикладной дисциплиной, опирается в своем развитии на достижения фундаментальных наук, интеграция с которыми способствует ее совершенствованию. На

этой базе создаются новые методы исследования материала, повышается качество экспертиз в судебно-медицинской практике.

References

1. Amanmuradov A.Kh., Pigolkin Yu.I., Bogomolov D.V., Zolotenkova G.V., Bogomolova I.N. Value of general and specific traits in forensic identification with morphological methods // *Forensic Examination*. 2003. No. 1. P. 33.
2. Bogomolov D.V., Bogomolova I.N., Zavalishina L.E. [et al.] Prospects of using immunohistochemistry to determine lifetime ago, and mechanical damage in the forensic practice // *Forensic Examination*. 2014. Vol. 57, No. 5. P. 35–39.
3. Lapteva M.I., Iskhizova L.N., Baranova M.Ya. [et al.]. Establishment of injury limitations with morphological methods // *Forensic Examination*. 2005. No. 5. P. 44–46.
4. Motavkin P.A. The innervation of the blood vessels of the spinal cord // *Morphology*. 1964. Vol. 46, No. 6. P. 56–64.
5. Motavkin P.A. Modern understanding of the mechanisms of regulation of cerebral circulation // *Morphology*. 1992. Vol. 103, No. 7–8. P. 7–12.
6. Motavkin P.A. What and how the brain innervated? // *Morphology*. 2007. Vol. 131, No. 1. P. 82–84.
7. Motavkin P.A., Bakhtinov A.P. Nervous system of ependymomas human spinal cord during postnatal development // *Morphology*. 1972. Vol. 62, No. 5. P. 26–32.
8. Motavkin P.A., Dudina Yu.V. Morphological and biochemical aspects of temporal lobe epilepsy in humans and animals // *Pacific Medical Journal*. 2010. No. 1. P. 8–12.
9. Motavkin P.A., Lomakin A.V., Pigolkin Yu.I. Immunochemical identification of vasopressin granule neurons and cells of blood vessels of the human brain // *Morphology*. 1989. Vol. 96, No. 5. P. 18–23.
10. Motavkin P.A., Lomakin A.V., Pigolkin Yu.I. [et al.]. Receptor glomeruli and their ultrastructural organization in the arteries of the brain and spinal soft human brain membranes // *Morphology*. 1989. Vol. 97, No. 9. P. 14–19.
11. Motavkin P.A., Lomakin A.V., Chertok V.M. Brain capillaries. Vladivostok: DVNTS Press, 1983. 140 p.
12. Motavkin P.A., Markina-Palaschenko L.D., Bozhko G.G. Comparative morphology of vascular mechanisms of cerebral circulation in vertebrates. M.: Nauka, 1981. 225 p.
13. Motavkin P.A., Pigolkin Yu.I. Adrenergic innervation of the arteries soft human brain membranes // *Morphology*. 1981. Vol. 80, No. 9. P. 45–49.
14. Motavkin P.A., Pigolkin Yu.I., Kaminskiy Yu.V. Histophysiology of circulation in the spinal cord. M.: Nauka, 1994. 234 p.
15. Motavkin P.A., Chertok V.M. The ultrastructure of the nerves of the arteries of the brain base // *Morphology*. 1979. Vol. 76, No. 1. P. 13–19.
16. Motavkin P.A., Chertok V.M. Control of cerebral blood circulation disorders. M.: Znanie, 1986. 63 p.
17. Motavkin P.A., Chertok V.M. Innervation of the brain // *Pacific Medical Journal*. 2008. No. 3. P. 11–23.
18. Motavkin P.A., Karedina V.S., Chertok V.M. Effect of agonists and simpatolitikov on adrenergic nerve fibers // *Morphology*. 1977. Vol. 72, No. 5. P. 26–32.
19. Motavkin P.A., Chertok V.M., Lomakin A.V. [et al.]. Age-related changes of the nervous apparatus of the brain and spinal cord vessels // *Forensic Examination*. 2012. Vol. 55, No. 3. P. 27–30.
20. Motavkin P.A., Chertok V.M., Pigolkin Yu.I. Morphological studies of regulatory mechanisms of cerebral blood circulation // *Morphology*. 1982. Vol. 82, No. 6. P. 42.
21. Motavkin P.A., Chertok V.M., Pigolkin Yu.I. Dynamics of post-mortem changes of adrenergic nerve fibers of the brain arteries // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1983. No. 5. P. 96–98.
22. Nikolenko V.N., Zolotenkova G.V. Scientific activity of a corresponding member of RAMS Pigolkin Yu.I. and his disciples: main trends, achievements and future prospects // *Forensic Examination*. 2012. No. 1. P. 10–13.
23. Pigolkin Yu.I. Disorders of blood circulation in the spinal cord with blunt trauma // *Forensic Examination*. 1987. No. 3. P. 21–24.
24. Pigolkin Yu.I. Comparative characteristics of the adrenergic innervation of the spinal cord arteries vertebrate animals and a human // *Morphology*. 1988. Vol. 95, No. 10. P. 36–43.
25. Pigolkin Yu.I. Functional morphology of the nervous apparatus of the blood vessels of the spinal cord under normal and mechanical injury: thesis abstract, MD. Leningrad, 1991. 56 p.
26. Pigolkin Yu.I. The dynamics of early changes of monoaminergic apparatus spinal cord arteries in blunt trauma // *Forensic Examination*. 1995. No. 1. P. 3.
27. Pigolkin Yu.I. Modern methods of forensic identification of the person // *Russian Medical News*. 2004. No. 3. P. 73–75.
28. Pigolkin Yu.I. Forensic evaluation of neurovascular unit with spinal cord injury // *Forensic Examination*. 2012. Vol. 55, No. 1. P. 22–29.
29. Pigolkin Yu.I., Bogomolov D.V., Bogomolova I.N. [et al.]. The possibilities of using the morphological methods for identification // *Problems of Expertise in Medicine*. 2001. No. 2. P. 36–37.
30. Pigolkin Yu.I., Bogomolov D.V., Korovin A.A. Modern methods of determining the time of death // *Forensic Examination*. 1999. Vol. 42, No. 3. P. 31.
31. Pigolkin Yu.I., Volodin S.A., Sherstyuk B.V. [et al.]. Histoenzymological diagnosis limitation closed spinal cord injury // *Forensic Examination*. 1992. No. 4. P. 6.
32. Pigolkin Yu.I., Volodin S.A., Sherstyuk B.V. [et al.]. Morphofunctional characteristic of microcirculatory bed spinal cord injury in an experimental trauma // *Neurosurgery Issues*. 1989. No. 4. P. 30–31.
33. Pigolkin Yu.I., Zolotenkova G.V., Romanenko G.Kh. [et al.]. State and perspectives of research in forensic medicine in Russia // *Tajikistan Healthcare*. 2008. No. 3. P. 20–27.
34. Pigolkin Yu.I., Zolotenkova G.V. Age-related changes in brain capillaries // *Forensic Examination*. 2014. Vol. 57, No. 1. P. 4–10.
35. Pigolkin Yu.I., Lomakin A.V., Motavkin P.A. Cholinergic innervation of blood vessels containing vasopressin human brain cells // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1990. No. 1. P. 67–69.
36. Pigolkin Yu.I., Motavkin P.A., Lomakin A.V. [et al.]. Biogenic monoamines mild brain and spinal cord of vertebrates // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 1989. No. 5. P. 572–577.
37. Pigolkin Yu.I., Motavkin P.A., Chertok V.M. Dynamics of post-mortem changes of adrenergic nerve fibers of the brain arteries // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1983. No. 5. P. 96–98.
38. Pigolkin Yu.I., Nikolenko V.N., Zolotenkova G.V. [et al.]. The possibility of using morphological methods to establish the general and specific characteristics in the forensic identification of the person // *Saratov Scientific Medical Journal*. 2012. Vol. 8, No. 4. P. 900–905.
39. Pigolkin Yu.I., Sidorovich Yu.V. Mortality in the Russian Federation // *Forensic Examination*. 2011. No. 1. P. 14–18.
40. Pigolkin Yu.I., Tomilin V.V. Status of research in forensic medicine and implementation of research results in peer practices // *Forensic Examination*. 1997. No. 2. P. 8–10.
41. Pigolkin Yu.I., Chertok V.M., Motavkin P.A. Age-related characteristics of the efferent innervation of the arteries soft human brain membranes // *Morphology*. 1982. Vol. 83, No. 8. P. 14–23.
42. Pigolkin Yu.I., Sherstyuk V.V. Early morphological changes in the spinal cord with a closed blunt trauma // *Forensic Examination*. 1988. No. 1. P. 8–10.
43. Sokolova Z.Yu. Assessment of the dynamics of early postmortem changes from the perspective of a decision on the time of death // *Bulletin of Russian State Medical University*. 2008. No. 5. P. 75–77.

44. Startseva M.S., Chertok V.M. Quantification of the intensity of histochemical and immunohistochemical reactions using standard computer programs // *Pacific Medical Journal*. 2012. No. 1. P. 121–123.
45. Startseva M.S., Kotsyuba A.E., Chertok V.M. Spatial organization of gas-transmitted neurons in the brain // *Pacific Medical Journal*. 2015. No. 2. P. 38–42.
46. Forensic age determination / edited by Yu.I. Pigolkin, M.V. Fedulov, N.N. Goncharov. M.: MIA, 2006. 224 p.
47. Personal identification in emergency mass casualty: a monograph / edited by Yu.I. Pigolkin, E.Kh. Barinov, V.V. Scherbakov [et al.]. Kirov-M.: MIATS, 2008. 301 p.
48. Khizhnyakova K.I. The study of mechanical damage and lifetime issues resolved forensic examination // *Forensic Examination*. Riga, 1976. P. 108–113.
49. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Local differences in tissue basophils dura rats // *Morphology*. 1993. Vol. 104, No. 1–2. P. 40–49.
50. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. The receptor apparatus of cerebral vessels in hypertension // *Journal of Neurology and Psychiatry*. 2010. Vol. 110, No. 10. P. 40–47.
51. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Nitric oxide in the mechanisms of the afferent innervation of the cerebral arteries // *Cytology*. 2010. Vol. 52, No. 1. P. 24–29.
52. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. New neurotransmitters and their role in the central mechanisms of regulation of blood circulation // *Pacific Medical Journal*. 2013. No. 4. P. 27–36.
53. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Norepinephrine ergic and hydroxide ergic neurons 'vasomotor' nuclei in hypertensive rats // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2014. Vol. 158, No. 11. P. 649–654.
54. Chertok V.M., Pigolkin Yu.I. The innervation of human pial arteries of different diameters in atherosclerosis // *Journal of Neurology and Psychiatry*. 1990. Vol. 90, No. 12. P. 43–46.
55. Chertok V.M., Pigolkin Yu.I. Changes in the nervous apparatus of the brain arteries in atherosclerosis // *Archives of Pathology*. 1990. Vol. 52, No. 8. P. 48–52.
56. Chertok V.M., Kotsyuba A.E., Babich E.V. The efferent innervation of the arteries of the human pia mater of brain with hypertension // *Morphology*. 2009. Vol. 135, No. 3. P. 35–41.
57. Chertok V.M., Kotsyuba A.E., Kotsyuba E.P. [et al.]. Two pool of interneurons in the bulbar of cardio-vascular center in rats // *Report of the Academy of Sciences*. 2015. Vol. 463, No. 5. P. 619–623.
58. Chertok V.M., Kotsyuba A.E., Startseva M.S. The use of the pixel method to quantify enzyme histochemistry // *Morphology*. 2012. No. 5. P. 71–75.
59. Chertok V.M., Kotsyuba A.E., Startseva M.S. Using of computer image registration for the geochemical mapping of brain neurons // *Pacific Medical Journal*. 2014. No. 3. P. 95–98.
60. Chertok V.M., Kotsyuba A.E., Startseva M.S. Topochemistry internuclear internuclear interneurons and vasomotor medulla in hypertensive rats // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015. Vol. 160, No. 9. P. 374–379.
61. Chertok V.M., Kotsyuba A.E., Startseva M.S. Interneurons in the human brainstem // *Bulletin of Russian Academy of Medical Sciences*. 2015. Vol. 70, No. 5. P. 582–588.
62. Chertok V.M., Lomakin A.V., Pigolkin Yu.I. Adrenergic innervation of the arteries of different diameters soft brain membranes of humans and animals // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1987. Vol. 103, No. 2. P. 215–218.
63. Chertok V.M., Pigolkin Yu.I., Miroshnichenko N.V. A comparative study of cholinergic and adrenergic innervation of the human brain vessels and some laboratory animals // *Morphology*. 1989. Vol. 96, No. 4. P. 28–33.
64. Chertok V.M., Pigolkin Yu.I., Motavkin P.A. Cholinergic and adrenergic innervation of intracranial arteries in human ontogeny // *Morphology*. 1983. Vol. 84, No. 2. P. 22–29.
65. Chertok V.M., Reutov V.P., Okhotin V.E. Pavel A. Motavkin – a man, a teacher, a scientist // *Pacific Medical Journal*. 2012. No. 3. P. 7–8.
66. Chertok V.M., Ryzhavskiy B.Ya., Tseluyko S.S. In the memory of Pavel A. Motavkin // *Morphology*. 2015. Vol. 148, No. 4. P. 107.
67. Chertok V.M., Kotsyuba A.E., Laryushkina A.V. The histophysiology of tissue basophils in the dura mater of the rat during laser irradiation // *Bull. Experim. Biol. Med.* 1989. Vol. 108, No. 10. P. 493–495.
68. Chertok V.M., Laryushkina A.V., Kozhevnikova T.A. Local characteristics of the temporal organization of tissue basophils in the dura mater in adult rats // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2001. Vol. 31, No. 3. P. 339–343.
69. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Comparative study of catecholaminergic and nitroxidergic neurons in the vasomotor nuclei of the caudal part of the brainstem in rats // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2016. Vol. 46, No. 2. P. 229–234.
70. Kotsyuba A.E., Chertok V.M., Kotsyuba E.P. Nitroxidergic nerve fibers of intracerebral vessels // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2010. Vol. 40, No. 4. P. 451–455.
71. Kotsyuba A.E., Chertok V.M. Distribution of heme oxygenase 2 in the brainstem nuclei of rats // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2013. Vol. 43, No. 8. P. 979–983.
72. Lavenex P., Lavenex P.B., Bennett J.L., Amaral D.G. Postmortem changes in the neuroanatomical characteristics of the primate brain: the hippocampal formation // *J. Comp Neurol*. 2009. Vol. 512, No. 1. P. 27–51.
73. Lyck L., Dalmau I., Chemnitz J. [et al.]. Immunohistochemical markers for quantitative studies of neurons and glia in human neocortex // *J. Histochem. Cytochem.* 2008. Vol. 56, No. 3. P. 201–221.
74. Pigolkin Y. Vasculo-capillary channel nervous system in mechanical injury of the spinal cord // *International association of forensic sciences*. Oxford, 1984. P. 31–32.
75. Pigolkin Y., Chertok V., Motavkin P. Age characteristic of efferent innervation in the human pia mater arteries // *Neuroscience and Behavioural Physiology*. 1985. Vol. 15, No. 4. P. 343–350.

Поступила в редакцию 19.10.2015.

Внедрение современных достижений нейрогистологии в судебно-медицинскую практику

Ю.И. Пиголкин¹, Г.В. Золотенкова²

¹ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8/2),

² Бюро судебно-медицинской экспертизы Московской области (111401, г. Москва, 1-я Владимирская ул., 33/1)

Резюме. Обсуждается значение фундаментальных исследований по нейрогистологии, выполненных коллективом ученых под руководством П.А. Мотавкина, для судебно-медицинской практики. Закономерности, выявленные при изучении вазомоторной иннервации используются для решения таких значимых проблем судебно-медицинской экспертизы, как установление видовой принадлежности вещественных доказательств, их биологического происхождения, установление давности наступления смерти, прижизненности и давность спинальной травмы, установление возрастного интервала при идентификации личности.

Ключевые слова: иннервация сосудов, возраст, спинальная травма, давность наступления смерти.

УДК 591.48:591.88

НЕЙРОГЕНЕЗ У ВЗРОСЛЫХ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ: ВОПРОСЫ АДАПТАЦИИ, ЭВОЛЮЦИИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ СПЕЦИАЛИЗАЦИИ

Е.В. Пущина, Е.И. Жарикова, А.А. Вараксин

Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук
(690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17)

Ключевые слова: нейрональные стволовые клетки, нейроны, глия, немлекопитающие позвоночные.

NEUROGENESIS IN THE ADULT VERTEBRATE ANIMALS: THE ISSUES OF ADAPTATION, EVOLUTION AND FUNCTIONAL SPECIALIZATION

E.V. Puschina, E.I. Zharikova, A.A. Varaksin

A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences (17 Palchevskogo St. Vladivostok 690041 Russian Federation)

Summary. The review compares the current data on neurogenesis in the mammalian brain and understanding of the process in fish, reptiles, amphibians and birds. In the course of studying the molecular and cellular long-lived features of neuronal precursor cells, defined for each class, we obtained evidence that adult neuronal progenitor cells non-mammalian vertebrates are equivalent in its properties mammalian stem cells. These observations raise the fundamental question of why neurogenesis is present in some species and is absent in others. Discussions on the subject, brings together consideration of internal and external factors that enhance or hinder brain plasticity and the way in which it changes throughout life in different animal species.

Keywords: neural stem cells, neurons, glia, non-mammalian vertebrates.

Pacific Medical Journal, 2016, No. 2, p. 55–61.

Тканеспецифичные (тотипотентные) стволовые клетки имеют большое значение для функционирования многих органов, поскольку являются донорами при физиологическом обновлении клеток и в случае их потери в результате травмы или болезни. Отсутствие подобных стволовых клеток считается причиной ограниченной регенерации в центральной нервной системе взрослых млекопитающих. Однако недавно в мозге взрослых млекопитающих, в субэпендимной зоне бокового желудочка, где формируются интернейроны обонятельной луковицы, мигрирующие в составе рострального миграционного потока, и субгранулярной зоны зубчатой извилины гиппокампа, продуцирующей гранулярные нейроны, были обнаружены клетки, обладающие функциями стволовых [30, 39]. Физиологические факторы и молекулярные механизмы, управляющие судьбой нейральных стволовых клеток, в настоящее время интенсивно исследуются [32].

Большое внимание изучению нейрогенеза уделял П.А. Мотавкин. К началу 70-х годов прошлого века был известен ряд факторов, позволяющих считать, что в эпендимной зоне спинного мозга наблюдается не просто облитерация центрального канала, а образование многокомпонентного нейроэндокринного

комплекса. П.А. Мотавкин был первым, кто рассмотрел пролиферацию эпендимных клеток, ангио- и нейрогенез в хроно- и топологическом единстве и доказал, что он формируется в определенном возрасте в результате взаимодействия этих процессов, и назвал это образование интраспинальным органом. При его исследовании П.А. Мотавкиным впервые были рассмотрены процессы пролиферации глиоцитов эпендимы, их последующая дифференцировка и формирование дефинитивного органа [1, 44]. На сегодняшний день мозг грызунов (мышей и крыс) используется в качестве общепринятой модельной системы, имитирующей условия в мозге человека. Тем не менее нейрогенез в зрелом мозге обнаруживается не только у млекопитающих, но и у других позвоночных, в том числе птиц, рептилий, амфибий и рыб [11, 28]. Интересные данные были получены при исследовании этих видов немлекопитающих позвоночных, обеспечивающие сравнительные модели для изучения «взрослого» нейрогенеза. Это связано, в частности, с анализом влияния клеточного микроокружения и факторов, необходимых для поддержания жизнедеятельности нейрональных стволовых клеток (НСК), регулирующих скорость образования взросло-рожденных нейронов в пролиферативных областях мозга [33, 50].

Локализация нейрогенных зон у взрослых немлекопитающих позвоночных

Нейрогенез во взрослом возрасте значительно ярче представлен в мозге у птиц, рептилий, амфибий и рыб, чем у млекопитающих [3]. Этот процесс, как правило, регистрируется в перивентрикулярных областях мозга и выполняет адаптивные функции. Однако области мозга, в которых расположены пролиферативные зоны, могут варьировать у разных видов в соответствии с их последующей функциональной специализацией [35, 58]. Можно рассмотреть данные для некоторых широко распространенных модельных объектов, хотя в настоящее время сказывается нехватка детальной информации для сравнительной оценки видоспецифических отличий и определения общего значения таких наблюдений для каждой систематической группы.

Впервые исследования нейрогенеза у взрослых немлекопитающих животных были проведены на певчих птицах [4, 14, 51]. Певчие птицы, у которых обучение потомства не ограничено возрастом, и птицы,

Пущина Евгения Владиславовна – д-р биол. наук, профессор РАН, ведущий научный сотрудник ИБМ; e-mail: puschina@mail.ru

ограниченные возрастными рамками при обучении птенцов (канарейка, черный дрозд, скворец, воробей, зебровая амадина) – известные модели для нейрогенетических исследований [11]. Часть наблюдений проводилась в естественной среде обитания этих птиц, что доказало наличие нейрогенеза во взрослом мозге не только как исключительно лабораторного феномена. Нейрогенез также обнаружен у взрослых рептилий (ящериц и черепах) и у амфибий [18]. Он зарегистрирован у нескольких видов рыб: *Nothobranchius furzeri*, колюшки, аптеронотуса, золотой рыбки, симы и форели [9, 17, 45, 55, 58, 60]. Однако в вышеперечисленных работах не были представлены данные о конкретных фенотипах клеток, участвовавших в нейрогенезе. Недавно описаны особенности нейрогенеза у взрослых данио (*Danio rerio*), имеющего существенные отличия от нейрогенеза у других видов рыб [27, 32, 35]. Эти исследования позволяют более полно охарактеризовать сравнительную картину организации нейрогенных зон, а также исследовать выживание и интегрирование в нейрональные сети взросло-рожденных нейронов.

У всех исследованных до настоящего времени немлекопитающих животных нейрогенез в мозге идет в течение всей жизни. У птиц зоны пролиферации чаще всего расположены вдоль стенок бокового желудочка конечного мозга и продуцируют новые нейроны в дорсальных ядрах теленцефалона, в нидопаллиуме (являющимся высшим голосовым центром), гиппокампе и параolfакторной доле стриатума, содержащей ядро блуждающего нерва [4, 14]. У рептилий нейрогенез регистрируется во всех крупных отделах мозга и, в меньшей степени, – в мозжечке [18]. У лягушек и аксолотля он происходит в конечном мозге, преоптических ядрах и коре большого мозга [13]. Фундаментальное отличие от других видов выявлено у рыб, нейрогенез у которых хотя и распространен во всех подразделениях головного мозга, как и у других позвоночных, однако, концентрируется в локальных участках (что свидетельствует о существовании каких-либо особых условий его регуляции) [13, 60].

Нейрональные стволовые клетки у взрослых немлекопитающих позвоночных

Источниками новых нейронов у взрослых млекопитающих являются НСК, и важно выяснить, имеют ли они и предшественники нейронов у немлекопитающих сходные характеристики. Зрелая НСК должна обладать двумя основными свойствами, первое из них – мультипотентность [7]. Так, НСК способны преобразовываться в нейроны и глиальные элементы, как в условиях организма, так и *in vitro*, хотя направление дифференцировки может определяться клеточным микроокружением и другими факторами [2]. Второе свойство – способность НСК к самовозобновлению. В ходе деления клетка либо дает начало двум дочерним стволовым клеткам, либо порождает стволовую

клетку и клетку, которая впоследствии дифференцируется в нейрон или глиоцит [26]. Теоретически самовозобновление не является предопределенным. Более того, одной из базовых характеристик стволовых клеток можно назвать состояние покоя, то есть процессы деления регистрируются сравнительно редко [7].

Несмотря на то, что выявление НСК – относительно простая процедура, ее довольно трудно продемонстрировать на практике. В частности, способность к пролиферации и мультипотентность могут быть проверены только путем выполнения повторяющихся последовательных трансплантаций одиночных клеток и последующего истощения всей популяции, как было установлено для кроветворной системы [40]. Медленное деление обычно констатируют постфактум: стволовыми являются либо те клетки, которые сохраняются в цикле без разбавления бромдезоксифлуоридиновой (BrdU) метки в течение достаточно долгого времени. Следовательно, точная идентификация эндогенных взрослых НСК в настоящее время трудноосуществима. На практике определяются «долгосрочные», «самовозобновляющиеся» или «медленно пролиферирующие» группы клеток-предшественников, то есть те, которые включают BrdU при накопительной экспозиции и остаются в цикле в течение длительного времени (по сравнению с продолжительностью жизни) без разбавления и/или удаленной миграции метки [11, 27]. Вслед за доказательством существования нейрогенеза в мозге взрослых позвоночных основная дискуссия связана с тем, какие элементы могут рассматриваться в качестве НСК в соответствии с описанными критериями. Также актуален вопрос, какой из этих критериев однозначно реализуем для НСК млекопитающих. С момента появления первых доказательств существования нейрогенеза в мозге взрослых грызунов, опубликованных более 40 лет назад, набор инструментов для выявления и изучения НСК значительно расширился [30, 32].

Медленнопролиферирующие клетки-предшественники

В исследованиях на мышах были получены противоречивые результаты, относительно того, что эндимициты, выстилающие стенки бокового желудочка, являются стволовыми клетками [50]. Одно время была широко распространена гипотеза о том, что астроциты, экспрессирующие глиальный фибриллярный кислый белок, и есть источники новых нейронов [16]. Однако в дальнейшем эта гипотеза не подтвердилась: было установлено, что астроциты формируют гетерогенную популяцию, и только некоторые из них могут быть названы стволовыми [54]. Одна из морфологических характеристик НСК – наличие одной реснички, контактирующей с просветом мозгового желудочка [16]. Существование медленно пролиферирующих астроцитов было установлено с помощью фармакологических препаратов, снижающих скорость пролиферации,

и маркирования BrdU. Например, цитозинарабиноза убивает пролиферирующие клетки, при этом не оказывая подобного влияния на покоящуюся популяцию [16]. Таким образом, маркировка BrdU в условиях воздействия цитозинарабинозы позволяет выявить медленно пролиферирующие клетки.

В субэпендимной зоне были идентифицированы три популяции клеток. Медленно делящиеся В-клетки, представляют собой астроциты, связанные с желудочком через эпендиму и дающие начало популяции быстро пролиферирующих С-клеток, которые затем производят А-клетки – мигрирующие нейробласты [20]. На основе ретровирусных методик (с помощью цитозинарабинозы) и электронной микроскопии в субгранулярной зоне были выявлены первичные предшественники – клетки радиальной или горизонтальной популяции медленно делящихся астроцитов. Они преобразуются в пролиферирующие клетки D1, которые генерируют молодые нейроны [53].

Иммуномаркирование глиальным фибриллярным кислым протеином и жиросвязывающим белком мозга позволило установить наличие клеток радиальной глии вдоль всего мозга рыб *D. rerio*. Эта популяция медленно пролиферирующих клеток была также обнаружена *in vivo* с помощью BrdU и ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA – proliferating cell nuclear antigen) [5, 10]. Этот эксперимент проводился с целью разделить популяции быстро пролиферирующих (BrdU⁺/PCNA⁺) и медленно пролиферирующих (BrdU⁻/PCNA⁺) клеток. Суть эксперимента заключалась в том, что PCNA должен присутствовать во всех фазах клеточного цикла за исключением фазы G1, когда ингибитор клеточного цикла p21 вызывает деградацию PCNA [31], а BrdU включался только в S-фазе. В целом, если клеточный цикл будет коротким, большое количество клеток останется в S-фазе, а если клеточный цикл будет длинным, то количество маркированных BrdU клеток уменьшится. Опираясь на эту парадигму, а также на факт сохранения BrdU-метки, у *D. rerio* были выявлены элементы с длинным клеточным циклом в конечном мозге, ножке шишковидного тела, гипоталамусе, мозжечке, крыше среднего мозга и в районе перешейка [5, 10, 21]. Используя BrdU в качестве маркера быстро пролиферирующей популяции клеток в этих областях в дальнейшем было установлено наличие нейробластов и нейронов [36].

Самообновление нервных клеток-предшественников у позвоночных

Доказательства процесса самовозобновления нервных клеток у млекопитающих основаны на так называемом анализе нейросфер [19]. Диссоциированные клетки из субгранулярной или субэпендимной зоны культивировали *in vitro* в присутствии факторов роста, (эпидермального или фактора роста фибробластов), в результате чего клетки начинали формировать кластеры

сферической формы. После этого анализировали клетки, полученные из вторичных нейросфер, которые в свою очередь были получены из одиночных клеток первичной нейросферы. Хотя преимущество подобного подхода заключается в выявлении потенциала выделенных элементов, тем не менее данный метод не позволяет полностью раскрыть существо процессов клеточного самовозобновления. К примеру, неясно, каким образом клетки в нейросфере формируют прогениторы переходного типа. Этот вопрос особенно актуален для субгранулярной зоны, где способность клеток генерировать вторичные нейросферы остается спорной [52]. Кроме того, накапливается все больше свидетельств, что клетки в нейросферах ведут себя иначе, чем *in vivo*. Например, в культуре этих клеток были обнаружены такие комбинации маркеров, которые никогда не встречались *in vivo* [41]. Более того, даже такой параметр, как плотность распределения клеток, может влиять на состояние их пролиферации и/или жизнеспособность [43]. Наконец, культивирование *in vitro* может изменить генетические и эпигенетические свойства клеток [41].

В условиях *in vivo*, «неопределенное самовозобновление» НСК у млекопитающих также может быть поставлено под сомнение. Снижение уровня пролиферации, связанное с возрастом (как показывает маркирование BrdU) и выживание новорожденных нейронов наблюдали как в субгранулярной, так и в субэпендимной зонах [2, 37]. Предположительно, НСК фактически не самовозобновляются, в отличие, например, от гематопоэтических стволовых клеток. Является ли данный феномен результатом изменений внутренних свойств стволовых клеток или он возникает из-за отсутствия внешнего влияния, оказываемого нейрогенной нишей, предстоит выяснить в будущих исследованиях.

Свойство мультипотентности клеток-предшественников у грызунов и рыб

Потенциальные судьбы клеток-предшественников субгранулярной и субэпендимных зон часто прослеживаются *in vitro* с помощью нейросфер, поскольку они содержат не только сами «стволовые клетки», но и их уже дифференцированных потомков. Впрочем, этот способ имеет значительные ограничения.

НСК и в субгранулярной, и в субэпендимной зонах в основном производят новые нейроны. Обновление глии несколько ограничено, хотя олигодендроциты могут происходить либо из клеток субэпендимной зоны, либо путем глиальной дифференцировки клеток-предшественников в составе рострального миграционного потока [23]. *In vivo* при инъекции ретровирусов в желудочки головного мозга наблюдали пролиферацию клеток [42]. Тем не менее данный метод ограничен двумя факторами. Во-первых, из-за небольшого временного окна, аналогично BrdU, вирус интегрируется в геном только быстропролиферирующих популяций, и не затрагивает медленно

размножающиеся стволовые клетки. Во-вторых, по статистике, вирус интегрируется только в одну из двух дочерних клеток [24]. Лентивирусы, напротив, могут включаться в покоящиеся клетки, и, следовательно, подходят для использования при отслеживании потомков субгранулярных субэпендимных стволовых клеток [12]. При данном подходе мультипотентность одиночной инфицированной клетки позволяет использовать нейросферный анализ во время диссоциации и роста культуры прогениторных зон, инфицированных лентивирусами [34].

У рыб нейросферы из конечного мозга и мозжечка аптеронотуса могут дифференцироваться в нейроны, а также в клетки глии [25]. Однако ограничения, существующие при интерпретации данных нейросферных исследований, здесь также справедливы. Для того, чтобы определить мультипотентность клеток-предшественников *in vivo*, важно исследовать их без пересева в культуру. У *D. rerio*, как и у млекопитающих, из клеток-предшественников образуются в основном нейроны, а не глиальные клетки. Ранее у этой рыбы были описаны несколько новых ненейрональных клеток во внешнем слое обонятельной луковицы и в паренхиме конечного мозга [36]. Кроме того, небольшое число вновь образованных клеток, экспрессирующих маркер астроцитов – белок S100, было обнаружено вдоль желудочка конечного мозга, в дорсальной части гипоталамуса и в мозжечке [21]. Каковы причины такого паттерна распределения нейронов и ненейрональных клеток у данио пока неясно, однако, ограниченная продукция астроцитов во взрослом мозге находится в соответствии с их общим низким содержанием в мозге костистых рыб.

В наших исследованиях при получении первичной культуры клеток мозга симы *Oncorhynchus masou* и форели *Oncorhynchus mykiss* и маркировке PCNA было установлено, что пролиферативная активность в большей степени характерна для суспензионной фракции и в меньшей степени – для монослоя [47]. Однако пролиферирующие клетки *in vitro* часто экспрессируют фермент синтеза сероводорода – цистатионин β-синтазу, что свидетельствует об участии данного газотрансмиттера во взрослом нейрогенезе. Эти данные соответствуют ранее полученным результатам маркирования этой синтазой клеток в перивентрикулярной и вторичной пролиферативной зонах мозга взрослого карпа и симы *in situ* [46, 49]. Другой особенностью первичной культуры клеток мозга лососевых рыб является их способность экспрессировать маркер нейродифференцировки Nu/CD как в крупных дифференцированных клетках, так и в мелких недифференцированных клетках из нейрогенных зон. Различный уровень интенсивности маркирования в нейронах дефинитивных центров и пролиферативных зонах конечного мозга, мозжечка, зрительного тельца и продолговатого мозга у форели установлен после нанесения механического повреждения зрительного нерва *in vivo* [48].

Все эти наблюдения указывают на сопоставимые свойства клеток-предшественников, которые дают начало большинству новых нейронов в мозге взрослых рыб и млекопитающих. К настоящему времени достигнут существенный прогресс в вопросах идентификации НСК и несколько расширены их определения в обоих таксонах. Однако показано, что возможность к их неограниченному самовозобновлению не поддерживается в экспериментах *in vivo*. Это предполагает дальнейший анализ мультипотентности единичной прогениторной клетки.

Образование, поддержание и функции взрослых нервных стволовых клеток у немлекопитающих позвоночных

Пролиферативная активность и дальнейшая судьба НСК у взрослых особей зависит от их локализации. Учитывая, что данные свойства имеют существенные межвидовые отличия, сравнение различных моделей помогает раскрытию механизмов, ответственных за пролиферацию и дифференцировку клеток. При рассмотрении отдельно взятого региона мозга возникает вопрос: что именно определяет здесь судьбу отдельных групп НСК у разных видов? Например, субпаллиальная прогениторная зона у *D. rerio*, продуцирующая нейроны обонятельной луковицы, также производит клетки теленцефалона [5]. Это никогда не наблюдается у мышей, чья субэпендимная зона «поставляет» только нейроны обонятельной луковицы.

Результаты наших исследований распределения тирозингидроксилазы и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) в перивентрикулярном диэнцефалоне, мезенцефалоне и ромбэнцефалоне молодого карпа (рис., а, б) свидетельствуют о наличии катехоламин- и ГАМК-продуцирующих клеток в перивентрикулярных зонах мозга лососей разных возрастных групп [45]. У карпа, напротив, в перивентрикулярной зоне клетки, маркируемые тирозингидроксилазой и PCNA не имеют радиальных отростков (рис., в, г), однако расположены среди волокон радиальной глии. Классические нейромедиаторы, таким образом, выступают не только как регуляторы функциональной активности нейронов и модуляторы синаптической передачи в зрелых нейронных сетях, но и рассматриваются в качестве индукторов развития (морфогенетических факторов) мозга в постэмбриональном онтогенезе рыб. Доказательством этому служит обнаружение фенотипических незрелых элементов, экспрессирующих вышеуказанные молекулы в пролиферативных зонах мозга трехлетней симы, а также элементов, имеющих морфологию радиальной глии.

Паттерны экспрессии маркеров радиальной глии в эмбриональном и взрослом мозге млекопитающих несколько отличаются. Во время эмбрионального развития эта глия в мозге млекопитающих экспрессирует жироразвязывающий белок и глутамат/аспартатный транспортер [6]. Согласно другим данным клетки радиальной глии, расположенные вдоль желудочка во взрослом мозге мыши имеют низкую иммунопозитивность к глутамат/аспартатному транспортеру, но

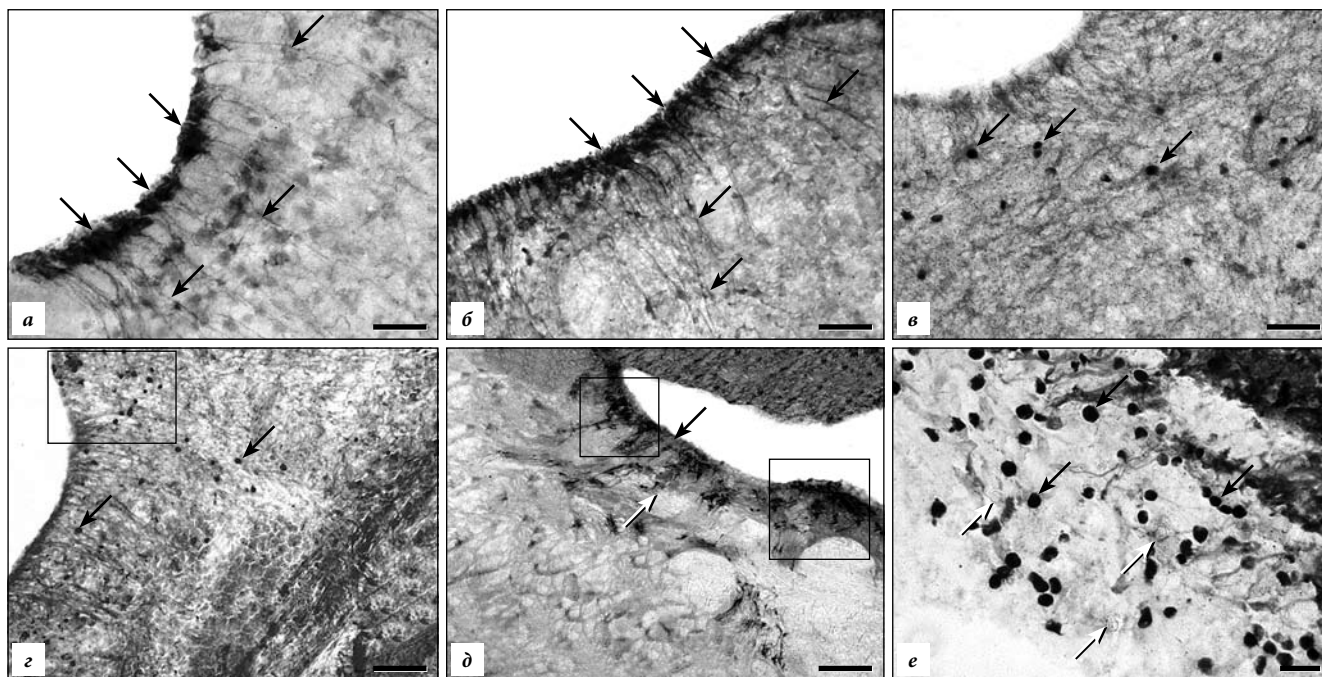


Рис. Маркеры клеток перивентрикулярной области симы *Oncorhynchus masou* (а, б, д) и карпа *Cyprinus carpio* (в, г, е):

а – тирозингидроксилаза в перивентрикулярном диэнцефалоне; б – ГАМК в вентральном таламусе; в – тирозингидроксилаза в клетках перивентрикулярной зоны ствола мозга; г – ядерный антиген пролиферирующих клеток в перивентрикулярных клетках ствола (скопление клеток выделены прямоугольником); д – NADPH-диафораза в клетках перивентрикулярной зоны ствола (скопления реактивных клеток выделены прямоугольником); е – цистатионин β-синтаза-иммунопозитивные клетки перивентрикулярной зоны продолговатого мозга. Черными стрелками показаны иммунопозитивные клетки и радиальные волокна, белыми – иммунонегативные. Масштаб: а, в – 50 мкм, б, г – 100 мкм, д – 200 мкм, е – 20 мкм.

при этом экспрессируют глиальный фибриллярный кислый протеин и виментин [56]. В мозге взрослых рыб клетки радиальной глии вырабатывают глиальный фибриллярный кислый протеин, что сходно с мозгом млекопитающих, но эти клетки в мозге рыб также являются позитивными на жиросвязывающий белок [57]. Подобные клетки участвуют в нейрогенезе и нейрональной миграции как в интактном, так и в поврежденном мозге рыб, что в свою очередь определяет высокий нейрорегенеративный потенциал [59].

Гипотеза о том, что радиальная глия во взрослом мозге направляет миграцию нейронов, была подтверждена в многочисленных исследованиях на рыбах. В частности, морфология и размеры клеток радиальной глии с длинными отростками, достигающими базальной мембраны и играющими ключевую структурную роль во время нейрональной миграции во взрослом мозге рыб, являются очень сходными с таковыми в развивающемся мозге [15]. Распределение и ориентация волокон этой глии в мозге взрослых особей указывает на направления миграции вновь образованных нейронов, использующих радиально-ориентированные волокна как направляющие для достижения дефинитивного месторасположения внутри кортикальной пластинки [61]. Подобная стратегия оправдана в случае миграции клеток на большие расстояния. Другой особенностью радиальной глии можно назвать экспрессию микро-тубулин-связывающего белка даблкортина, обнаруженного вблизи от мигрирующих нейронов и радиальных волокон в мозге взрослых крыс, что подтверждено данными электронно-микроскопических исследований [8, 22].

Результаты иммунофлуоресцентного маркирования BrdU и нейронального протеина Hu/CD, идентифицирующие вновь образованные нейроны, перекрываются с маркированием волокон радиальной глии, иммунопозитивных к кислому глиальному фибриллярному белку, показывая, что вновь образованные нейроны мигрируют вдоль радиальных волокон [59, 38].

Согласно другой гипотезе, прогениторы из вентрального субпаллиума во взрослом теленцефалоне данио, мигрирующие в обонятельную луковицу в составе рострального миграционного потока, затем дифференцируются в катехоламин- и ГАМК-ергические клетки [5]. Популяция реснитчатых серотонинергических клеток на границе среднего мозга и мозгового ствола данио дифференцируется в нейроны и глию [10]. В мозжечке взрослого данио НСК обладают характеристиками нейроэпителиальных элементов и продуцируют предшественники гранулярных клеток в присутствии фактора роста фибробластов [29]. Эти данные указывают, что клетки-предшественники во взрослом мозге данио сохраняют свойства, сходные с таковыми в центральной нервной системе млекопитающих. Таким образом, взрослый мозг рыб может рассматриваться как удачная модель взрослого нейрогенеза позвоночных [11, 28].

Наличие маркеров газообразных посредников (оксида азота и сероводорода) в областях, экспрессирующих PCNA, свидетельствует об участии газотрансмиттеров в регуляции постэмбрионального нейрогенеза рыб. У рыб с пролонгированным циклом развития (сима и карп) экспрессия таких маркеров

в перивентрикулярных пролиферативных областях мозга может различаться (рис., д, е), что согласуется с представлением о том, что в функционально сходных комплексах у животных могут быть задействованы различные сигналотрансдукторные системы [46]. Развитие нервной системы лососей, карпов и осетров, в отличие от широко распространенной нейрогенетической модели *D. rerio*, происходит в течение длительного времени. По нашим данным, развитие различных структур центральной нервной системы характеризуется выраженной гетерохронией, т.е. клетки каудальных отделов мозга значительно раньше, чем нейроны переднемозговых отделов, приобретают черты фенотипической специализации. Мы полагаем, что мозг этих животных долгое время сохраняет признаки фетальной организации, и наличие в течение первого и второго годов жизни малодифференцированных фенотипически незрелых клеточных форм, подтверждает эту гипотезу.

Если рассматривать проблему более глобально, на уровне всего мозга, главным вопросом становится определение того, какие механизмы и молекулярные компоненты содействуют активному нейрогенезу у одних видов, и почему они не работают у других, как например, долгоживущие клетки-предшественники, расположенные вдоль поверхности желудочков конечного мозга *D. rerio* [35]. У мышей нейрогенез не регистрируется в коре головного мозга. Таким образом, выяснение его механизмов в конечном мозге у позвоночных различных филогенетических групп поможет выявить то, что отсутствует, или, наоборот, то, что должно присутствовать у млекопитающих во взрослом мозге для формирования новых нейронов. Это обоснование справедливо и для других областей, где был обнаружен нейрогенез у взрослых особей. Наконец, сравнивая модели животных с разными стилями жизни, особенностями поведения и обитающих в различных экологических условиях мы сможем достичь более глубокого понимания механизмов нейрогенеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ (МД 4318.2015.04) и программы фундаментальных исследований ДВО РАН «Дальний Восток» (проект № 15-I-6-116).

References

1. Motavkin P.A., Bakhtinov A.P. Intraspinal human organ // *Archive of Anatomy, Histology, Embryology*. 1990. Vol. 99, No. 10. P. 5–19.
2. Abrous D.N., Koehl M., Le Moal M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology // *Physiol. Rev.* 2005. Vol. 85. P. 523–569.
3. Abrous D.N., Koehl M., Le Moal M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology // *Physiol. Rev.* 2005. Vol. 85. P. 523–569.
4. Absil P., Pinxten R., Balthazart J., Eens M. Effect of age and testosterone on autumnal neurogenesis in male European starlings (*Sturnus vulgaris*) // *Behav. Brain Res.* 2003. Vol. 143. P. 15–30.
5. Adolf B., Chapouton P., Lam C.S. [et al.]. Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon // *Dev. Biol.* 2006. Vol. 295. P. 278–293.
6. Anthony T.E., Klein C., Fishell G., Heintz N. Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system // *Neuron*. 2004. Vol. 41. P. 881–890.
7. Berninger B., Hack M.A., Gotz M. Neural stem cells: on where they hide, in which disguise, and how we may lure them out // *Handb. Exp. Pharmacol.* 2006. Vol. 174. P. 319–360.
8. Brunne B., Zhao S., Derouiche A. [et al.]. Origin, maturation, and astroglial transformation of secondary radial glial cells in the developing dentate gyrus // *Glia*. 2010. Vol. 58. P. 1553–1569.
9. Candal E., Anadon R., DeGrip W.J., Rodriguez-Moldes I. Patterns of cell proliferation and cell death in the developing retina and optic tectum of the brown trout // *Brain Res. Dev. Brain Res.* 2005. Vol. 154. P. 101–119.
10. Chapouton P., Adolf B., Leucht C. [et al.]. *her5* expression reveals a pool of neural stem cells in the adult zebrafish midbrain // *Development*. 2006. Vol. 133. P. 4293–4303.
11. Chapouton P., Jagasia R., Bally-Cuif L. Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates // *Bioessays*. 2007. Vol. 29. P. 745–757.
12. Consiglio A., Gritti A., Dolcetta D. [et al.]. Robust *in vivo* gene transfer into adult mammalian neural stem cells by lentiviral vectors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. Vol. 101. P. 14835–14840.
13. Coumaillieu P., Pellegrini E., Adrio F. [et al.]. Aromatase, estrogen receptors and brain development in fish and amphibians // *Biochim. Biophys. Acta*. 2015. Vol. 1849. P. 152–162.
14. DeWulf V., Bottjer S.W. Age and sex differences in mitotic activity within the zebra finch telencephalon // *J. Neurosci.* 2002. Vol. 22. P. 4080–4094.
15. Diotel N., Vaillant C., Gueguen M.M. [et al.]. *Cxcr4* and *Cxcl12* expression in radial glial cells of the brain of adult zebrafish // *J. Comp. Neurol.* 2010. Vol. 518. P. 4855–4876.
16. Doetsch F., Caillé I., Lim D.A. [et al.]. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain // *Cell*. 1999. Vol. 97. P. 703–716.
17. Ekstrom P., Johnsson C.M., Ohlin L.M. Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones // *J. Comp. Neurol.* 2001. Vol. 436. P. 92–110.
18. Font E., Desfilis E., Perez-Canellas M.M., Garcia-Verdugo J.M. Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult reptilian brain // *Brain Behav. Evol.* 2001. Vol. 58. P. 276–295.
19. Gage F.H. Mammalian neural stem cells // *Science*. 2000. Vol. 287. P. 1433–1438.
20. Garcia A.D., Doan N.B., Imura T. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain // *Nat. Neurosci.* 2004. Vol. 7. P. 1233–1241.
21. Grandel H., Kaslin J., Ganz J. [et al.]. Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate // *Dev. Biol.* 2006. Vol. 295. P. 263–277.
22. Gubert F., Zaverucha-do-Valle C., Pimentel-Coelho P.M. [et al.]. Radial glia-like cells persist in the adult rat brain // *Brain Res.* 2009. Vol. 1258. P. 43–52.
23. Hack M.A., Saghatelian A., de Chevigny A. [et al.]. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis // *Nat. Neurosci.* 2005. Vol. 8. P. 865–872.
24. Hajihosseini M., Iavachev L., Price J. Evidence that retroviruses integrate into post-replication host DNA // *EMBO J.* 1993. Vol. 12. P. 4969–4974.
25. Hinsch K., Zupanc G.K. Isolation, cultivation, and differentiation of neural stem cells from adult fish brain // *J. Neurosci. Meth.* 2006. Vol. 158. P. 75–88.
26. Huttner W.B., Kosodo Y. Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2005. Vol. 17. P. 648–657.
27. Ito Y., Tanaka H., Okamoto H., Ohshima T. Characterization of neural stem cells and their progeny in the adult zebrafish optic tectum // *Dev. Biol.* 2010. Vol. 342. P. 26–38.
28. Kaslin J., Ganz J., Brand M. Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2008. Vol. 363. P. 101–122.
29. Kaslin J., Ganz J., Geffarth M. [et al.]. Stem cells in the adult zebrafish cerebellum: initiation and maintenance of a novel stem cell niche // *J. Neurosci.* 2009. Vol. 29. P. 6142–6153.

30. Kempermann G. Adult neurogenesis: stem cells and neuronal development in the adult brain. New York: Oxford Univ. Press, Inc., 2006. 434 p.
31. Kippin T.E., Martens D.J., van der Kooy D. p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity // *Genes Dev.* 2005. Vol. P. 756–767.
32. Krogh K., Sørensen C., Nilsson G.E., Øverli Ø. Forebrain cell proliferation, behavior, and physiology of zebrafish, *Danio rerio*, kept in enriched or barren environments // *Physiol. Behav.* 2010. Vol. 101. P. 32–39.
33. Lema S.C., Hodges M.J., Marchetti M.P., Nevitt G.A. Proliferation zones in the salmon telencephalon and evidence for environmental influence on proliferation rate // *Comp. Biochem. Physiol.* 2005. Vol. 141A. P. 327–335.
34. Lie D.C., Colamarino S.A., Song H.J. [et al.]. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis // *Nature.* 2005. Vol. 437. P. 1370–1375.
35. Lindsey B.W., Darabie A., Tropepe V. The cellular composition of neurogenic periventricular zones in the adult zebrafish forebrain // *J. Comp. Neurol.* 2012. Vol. 520. P. 2275–2316.
36. Lindsey B.W., Donato S., Kaslin J., Tropepe V. Sensory-specific modulation of adult neurogenesis in sensory structures is associated with the type of stem cell present in the neurogenic niche of the zebrafish brain // *Eur. J. Neurosci.* 2014. Vol. 40. P. 3591–3607.
37. Luo J., Daniels S.B., Lenington J.B. [et al.]. The aging neurogenic subventricular zone // *Aging Cell.* 2006. Vol. 5. P. 139–152.
38. Marin O., Rubenstein J. Cell migration in the forebrain // *Annu. Rev. Neurosci.* 2003. Vol. 26. P. 441–483.
39. Ming G.L., Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system // *Annu. Rev. Neurosci.* 2005. Vol. 40. P. 223–250.
40. Morrison S.J., Wandycz A.M., Hemmati H.D. [et al.]. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors // *Development.* 1997. Vol. 124. P. 1929–1939.
41. Morshead C.M., Benveniste P., Iscove N.N., van der Kooy D. Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations // *Nat. Med.* 2002. Vol. 8. P. 268–273.
42. Morshead C.M., Craig C.G., van der Kooy D. In vivo clonal analyses reveal the properties of endogenous neural stem cell proliferation in the adult mammalian forebrain // *Development.* 1998. Vol. 125. P. 2251–2261.
43. Morshead C.M., van der Kooy D. Disguising adult neural stem cells // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2004. Vol. 14. P. 125–131.
44. Motavkin P.A., Bactinov A.P. Postnatal development of human spinal cord ependymal innervation // *Neurosci. Behav. Physiol.* 1973. Vol. 6. P. 253–259.
45. Pushchina E.V., Obukhov D.K., Varaksin A.A. Features of adult neurogenesis and neurochemical signaling in the cherry salmon *Oncorhynchus masou* brain // *Neur. Regen. Res.* 2013. Vol. 8. P. 13–23.
46. Pushchina E.V., Obukhov D.K., Varaksin A.A. Participation of catecholamines, H₂S and NO in neurotransmission, neuromodulation and regulation of adult neurogenesis in carp brain // *Carp and Catfish: Biology, Behavior and Conservation Strategies* / Ed. B. Regan. New York: Nova Sci. Publishers, Inc., 2015. P. 135–191.
47. Pushchina E.V., Shukla S., Varaksin A.A. Hydrogen sulfide factor regulates differentiation and proliferation of nerve cells in primary culture of cells of brain and spinal cord of the salmonids // *Nitric Oxide.* 2014. Vol. 39. P. S34.
48. Pushchina E.V., Shukla S., Varaksin A.A., Obukhov D.K. Expression of neuronal marker HuCD in matrix areas in the brain of trout *Oncorhynchus mykiss* after mechanical injury of the optic nerve // *Proc Joint Symp. 4th Intern. Neural Regen. Symp., 6th Intern. Spinal Cord Injury Treatments and Trials Symp. and 9th Asia Pacific Symp. Neural Regen.* Nanjing, China. 2014. P. 75–76.
49. Pushchina E.V., Varaksin A.A., Obukhov D.K. Cystathionine β-synthase in the CNS of masu salmon *Oncorhynchus masou* (Salmonidae) and carp *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) // *Neurochem. J.* 2011. Vol. 5. P. 24–34.
50. Riquelme P.A., Drapeau E., Doetsch F. Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2008. Vol. 363. P. 123–137.
51. Scharff C., Kirn J.R., Grossman M. [et al.]. Targeted neuronal death affects neuronal replacement and vocal behavior in adult songbirds // *Neuron.* 2000. Vol. 25. P. 481–492.
52. Seaberg R.M., van der Kooy D. Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors // *J. Neurosci.* 2002. Vol. 22. P. 1784–1793.
53. Seri B., Garcia-Verdugo J.M., Collado-Morente L. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus // *J. Comp. Neurol.* 2004. Vol. 478. P. 359–378.
54. Spassky N., Merkle F.T., Flames N. [et al.]. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis // *J. Neurosci.* 2005. Vol. 25. P. 10–18.
55. Sullivan S.A., Barthel L.K., Largent B.L., Raymond P.A. A goldfish Notch-3 homologue is expressed in neurogenic regions of embryonic, adult, and regenerating brain and retina // *Dev. Genet.* 1997. Vol. 20. P. 208–223.
56. Sundholm-Peters N.L., Yang H.K., Goings G.E. [et al.]. Radial glia-like cells at the base of the lateral ventricles in adult mice // *J. Neurocytol.* 2004. Vol. 33. P. 153–164.
57. Takeuchi A., Okubo K. Post-proliferative immature radial glial cells female specifically express aromatase in the medaka optic tectum // *PLoS ONE.* 2013. Vol. 8. doi: 10.1371/journal.pone.0073663.
58. Tozzini E.T., Baumgart M., Battistoni G., Cellerino A. Adult neurogenesis in the short-lived teleost *Nothobranchius furzeri*: localization of neurogenic niches, molecular characterization and effects of aging // *Aging Cell.* 2012. Vol. 11. P. 241–251.
59. Zupanc G.K., Clint S.C. Potential role of radial glia in adult neurogenesis of teleost fish // *Glia.* 2003. Vol. 43. P. 77–86.
60. Zupanc G.K., Sirbulescu R.F. Teleost fish as a model system to study successful regeneration of the central nervous system // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2013. Vol. 367. P. 193–233.
61. Zupanc G.K., Sirbulescu R.F., Ilies I. Radial glia in the cerebellum of adult teleost fish: implications for the guidance of migrating new neurons // *Neuroscience.* 2012. Vol. 210. P. 416–430.

Поступила в редакцию 03.12.2015.

Нейрогенез у взрослых позвоночных животных: вопросы адаптации, эволюции и функциональной специализации

Е.В. Пушина, Е.И. Жарикова, А.А. Вараксин
Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17)

Резюме. В обзоре сравниваются современные сведения о нейрогенезе в мозге млекопитающих и понимание этого процесса у рыб, рептилий, амфибий и птиц. В ходе изучения молекулярных и клеточных особенностей долгоживущих нейрональных клеток-предшественников, определенных для каждого класса, получены доказательства, что взрослые клетки-предшественники нейронов немлекопитающих позвоночных эквивалентны по своим свойствам стволовым клеткам млекопитающих. Эти наблюдения поднимают принципиальный вопрос о том, почему нейрогенез присутствует у одних видов животных и отсутствует у других. Дискуссия, посвященная данной теме, объединяет рассмотрение внутренних и внешних факторов, усиливающих или препятствующих пластичности мозга и того, каким образом она изменяется в течение жизни у разных видов животных.

Ключевые слова: нейрональные стволовые клетки, нейроны, глия, немлекопитающие позвоночные.

УДК 616.831-02:613.84:611.018

СУБСТАНЦИЯ P В МЕХАНИЗМАХ РАЗВИТИЯ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ТАБАКОКУРЕНИИ

Н.В. Захарчук, В.А. Невзорова, В.Б. Шуматов, Н.В. Шестакова, Е.Ю. Гончар

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

Ключевые слова: никотин, головной мозг, нейрокининовые рецепторы, сосуды.

SUBSTANCE P IN THE MECHANISMS OF THE DEVELOPMENT OF CEREBRAL DYSFUNCTION IN CHRONIC TOBACCO SMOKING

N.V. Zakharchuk, V.A. Nevzorova, V.B. Shumatob, N.V. Shestakova, E.Yu. Gonchar

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

Summary. The review summarizes the literature data and the results of our studies of the role of substance P in the development of cerebral dysfunction associated with smoking. We described the pathophysiological aspects of exposure to tobacco smoke in the structure of the brain mediated by substance P and neurokinin receptors. It substantiates the position of the link between enhanced release of substance P, neurokinin receptor activation, pro-inflammatory cytokines, and the development of neurogenic inflammation, resulting in damage to the blood-brain barrier, neuronal and glial cells of the brain. Cytokines, stimulating afferent nerve fibers, on the feedback principle cause the release of new portions of substance P, forming and maintaining the vicious circle of inflammation, thereby exacerbating the increasing cerebral dysfunction.

Keywords: nicotine, brain, neurokinin receptors, vessels.

Pacific Medical Journal, 2016, No. 2, p. 62–66.

Курение – один из факторов, провоцирующих каскад необратимых морфофункциональных изменений многих органов вследствие развития системных воспалительных реакций [2, 16, 18]. Компоненты табачного дыма обладают как прямым токсическим действием, так и способностью активировать провоспалительный потенциал лейкоцитов, запускать оксидативный и цитокиновый стрессы, инициировать развитие эндотелиальной дисфункции [6, 23, 49, 50]. Первые органы, контактирующие с табачным дымом – верхние дыхательные пути. Воздействуя на их слизистую оболочку, компоненты дыма вызывают раздражение находящихся здесь афферентных С-волокон блуждающего нерва, что сопровождается мощным выбросом из нервных окончаний пептидов и нейромедиаторов, выходом их в периферические ткани, где в зоне влияния данных веществ оказываются кровеносные сосуды, тучные и иммунокомпетентные клетки [6, 16, 38].

Важнейшим регуляторным пептидом, участвующим в реализации многоуровневого нейрогенного воспаления, провоцируемого курением, является субстанция P (SP), которая высвобождается из окончаний сенсорных нейронов. В дыхательных путях SP-содержащие нервные волокна расположены субэпителиально, а также вокруг желез подслизистой, сосудов и в гладких мышцах бронхов [1, 19]. Под воздействием

компонентов табачного дыма SP генерирует импульсный ноцицептивный поток и одновременно с этим запускает ряд патофизиологических реакций различной модальности вследствие активации тканевых и плазменных медиаторов воспаления (серотонина, гистамина, ацетилхолина, брадикинина и др.), под влиянием которых меняются тонус и проницаемость сосудов, тканевой состав клеток крови и иммунной системы. Но особенно важная роль в механизмах неблагоприятного воздействия табакокурения отводится нейрокининовым рецепторам, стимуляция которых SP сопровождается избыточным высвобождением нейрокининов и развитием «нейрогенного» воспаления [1, 16, 18].

SP вовлечена в реализацию двух механизмов воспаления. Во-первых, она способна непосредственно модулировать функцию иммунной системы, воздействуя на иммунокомпетентные клетки; во-вторых, обладая вазодилататорными свойствами, участвовать в обеспечении локальных воспалительных реакций, увеличивая сосудистую проницаемость, способствуя адгезии и миграции лейкоцитов в окружающие ткани. Участие SP в иммунных механизмах связано, прежде всего, с тем, что она оказывает влияние на разные клетки воспалительной реакции: макрофаги, ацидофильные гранулоциты, лимфоциты и микроглию [45]. Неисключено, что ее эффекты во многом обеспечены селективным воздействием на соответствующие нейрокининовые рецепторы (NK-рецепторы) 1-го типа, а дегранулирующее действие на тучные клетки опосредуется активацией плазмалеммальных нейрокининовых рецепторов [1, 56].

Важные участники цитокинового каскада при воспалении – интерлейкин-1 и фактор некроза опухоли-α – также способствуют высвобождению SP из сенсорных нервных окончаний, вызывают дегрануляцию тучных клеток, сопровождающуюся выбросом гистамина [56]. Избыточный синтез SP индуцирует продукцию кислородных радикалов, производных арахидоновой кислоты, усиливая повреждение тканей и воспалительный ответ [37]. Опубликованы данные, что NK₁-рецепторы способны повышать активность цитокина хемокина CCL2, который известен как мощный фактор хемотаксиса моноцитов к очагу воспаления и их дифференцировки в макрофаги [21]. Кроме того, активация NK₁-рецепторов стимулирует производство провоспалительных цитокинов – интерлейкинов 1, 6, 8, 12 и фактора некроза опухоли-α моноцитами и макрофагами [40, 42]. В то же время интерлейкины 1 и 6 могут

воздействовать на окончания афферентных нервных волокон, вызывая выброс из них нейрокининов, запуская порочный круг, и поддерживая, таким образом, на протяжении длительного времени воспалительный процесс [53].

Компоненты табачного дыма, диффундируя через аэрогематический барьер в альвеолах легких, способны вызвать системные эффекты, обусловленные участием NK_1 -рецепторов, которые имеются на бокаловидных клетках слизистой оболочки бронхов, эндотелии вен и артерий легкого [28, 47]. Доказано наличие SP и нейрокининовых рецепторов в автономной нервной системе желудочно-кишечного тракта, мочевой и половой системах [44].

SP широко представлена в центральной нервной системе: в головном мозге она обнаружена в обонятельном тракте, основных ганглиях, гиппокампе, миндалине, гипоталамусе, где локализуется в нейронах, клетках глии и кровеносных сосудах [52]. В нейронах SP синтезируется в рибосомах и затем транспортируется по аксонам, входящим в состав периадвентициальных нервных сплетений пиальных и внутримозговых сосудов, в «крупные плотные пузырьки» нервных окончаний [3, 34, 52]. Эффекты SP в мозге опосредуются через тахикининовые рецепторы, при этом наибольшее сродство отмечено, как и в других органах, к NK_1 -рецепторам, которые в настоящее время выявлены в хвостатом ядре, обонятельной луковице, гипоталамусе, коре головного мозга, стриатуме [26, 45, 55]. Трансдукция сигнала субстанции происходит посредством G-белков, связанных с внутриклеточным доменом NK_1 -рецепторов, что способствует их активации [36, 55]. Указанные рецепторы в свою очередь активируют фосфолипазу C, которая катализирует гидролиз фосфотидилинозитол-4,5-дифосфата с образованием инозитол-1,4,5-трифосфата и 1,2-диацилглицерина. Оба эти соединения являются вторичными мессенджерами: инозитол-1,4,5-трифосфат вызывает высвобождение ионов кальция из внутриклеточных структур, 1,2-диацилглицерин активирует протеинкиназу C [54].

В физиологических условиях избыток SP в нейронах инактивируется различными протеолитическими ферментами, включая эндопептидазу [46]. Угнетение активности ферментов, метаболизирующих SP, является одной из причин нейрокининового дисбаланса. Так, в исследованиях на морских свинках было показано, что даже низкие концентрации табачного дыма значительно снижают активность нейтральной эндопептидазы, приводя к увеличению локальной концентрации SP [41]. Цитокиновый дисбаланс и длительное повышение уровня SP в мозге при некоторых условиях побуждают астроциты и микроглиальные клетки к выработке провоспалительных интерлейкинов 12 и 23 [25].

Компоненты табачного дыма – угарный газ, нитрозамины, фенолы, ароматические смолы, альдегиды – будучи цитостатическими веществами, способны

повреждать нейроны и глиальные клетки [50]. Наиболее изученным компонентом табачного дыма является никотин. Реализация его эффектов происходит через никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, многочисленные подтипы которых представлены в различных отделах нервной системы и выполняют различные функции. Например, $\alpha 7$ -подтип этих рецепторов участвует в обеспечении скорости синаптической передачи, реализации когнитивных функций и наряду с $\alpha 4\beta 2$ -подтипом обеспечивает процессы вазорегуляции. По некоторым данным, активация подтипа $\alpha 7$ никотиновых ацетилхолиновых рецепторов повышает число капилляров в зоне экспериментального инфаркта миокарда [43]. Активация $\alpha 5$ -подтипа вызывает выброс SP из нервных окончаний за счет активации NK_1 - и NK_3 -рецепторов [27]. Другие продукты сгорания табака (нитрозамины, фенолы, альдегиды, кетоны) могут быть причиной прямого повреждения клеточных мембран нейронов за счет усиления в них процессов перекисного окисления липидов, поломки нитей ДНК и РНК, нарушения дыхательной митохондриальной цепи [24, 35].

Высокие концентрации свободных радикалов, образующиеся при курении, вызывают окислительный стресс, способствуют повреждению клеточных структур и макромолекул, включая мембранные липиды, белки, углеводы и ДНК, интенсифицируют апоптоз нейронов [48, 59]. Нарушается ионный гомеостаз нейронов и глиальных клеток: наблюдается значительное увеличение концентрации Ca^{2+} и Na^+ в цитозоле и митохондриях, но снижается содержание аденозинтрифосфатазы [15, 60]. Немаловажным фактором, способствующим повышению концентрации SP в мозге, по-видимому, является гипоксия курильщиков, возникновение которой связано с накоплением окиси углерода в организме. Имеются данные, что увеличение высвобождения SP из нейронов при гипоксии сопряжено с усилением активности Ca^{2+} -каналов N и L типов в плазмолемме этих клеток [39].

Указанные выше процессы стимулируют повышенное выделение SP из секреторных гранул нервных терминалей. Так, 8-недельное воздействие никотина у крыс вызывает кратное увеличение содержания SP в нейронах головного мозга [31]. Проведенное нами иммуногистохимическое исследование [7, 14] позволило выявить пиксельным методом у «крыс-курильщиков» достоверный прирост в нейронах коры головного мозга содержания SP и NK_1 -рецепторов (рис. 1).

Хроническое табакокурение оказывает неблагоприятное действие на церебральный метаболизм, что подтверждается данными магнитно-резонансной томографии [29] и функциональными пробами, свидетельствующими об изменениях в когнитивной сфере [17, 22]. Особенно опасные последствия наблюдаются в центральной нервной системе подростков и беременных женщин. В экспериментах на крысах было показано, что воздействие компонентов табачного дыма в период беременности нарушает процессы накопления

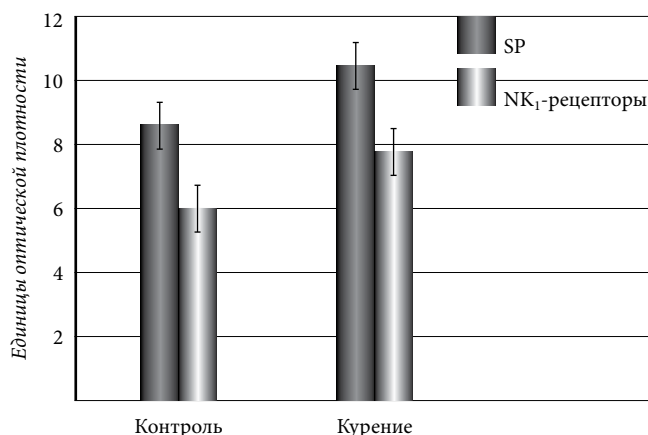


Рис. 1. Содержание SP и NK₁-рецепторов в нейронах коры головного мозга при моделировании табакокурения у крыс.

миелина в аксонах эмбрионов, что приводит впоследствии к демиелинизации нервных отростков у молодых и взрослых животных, провоцируя разнообразные проявления дисфункции мозга [33, 50].

Курение ввиду инициируемой им эндотелиальной дисфункции – один из факторов риска цереброваскулярных заболеваний. Неоднократно отмечалась тесная связь между продолжительностью и интенсивностью табакокурения и частотой ишемических инсультов [2, 57]. Доказано нарушение вазомоторной активности эндотелия церебральных артерий у курильщиков с длительным стажем курения [6]. Немаловажная роль в патогенезе цереброваскулярной дисфункции, возникающей под влиянием компонентов табачного дыма, отводится усилению образования SP в стенке мозговых артерий, что провоцирует увеличение ее проницаемости [30]. Именно увеличение в нервах концентрации SP, обладающей вазодилататорными свойствами, объясняет ее участие в локальных воспалительных реакциях при курении.

SP опосредует вазодилататорный эффект через NK₁-рецепторы, активацию которых усиливает оксид азота [20], играющий ключевую роль в регуляции мозговой гемодинамики [9, 12, 13]. Тот факт, что эндотелиальная дисфункция артерий у начинающих курильщиков восстанавливается при назначении L-аргинина, являющегося субстратом синтеза оксида азота, лишний раз подтверждает участие этой сигнальной молекулы в механизмах нарушения вазомоторики [23, 49]. При длительном воздействии продуктов горения табачного дыма избыток SP приобретает постоянный характер, что стимулирует экспрессию индуцибельной нитроксидсинтазы и способствует увеличению количества оксида азота в сосудистой стенке в сотни раз [20]. Одновременно происходит накопление гидроперекиси и высокореактивных форм кислорода. Образуется пероксинитрит ONOO⁻, накопление которого вызывает вазоконстрикцию [58].

Весьма перспективным направлением представляется изучение влияния табачного дыма на продукцию эндогенного монооксида углерода и сероводорода, экспрессия которых, наряду с эндотелиальной

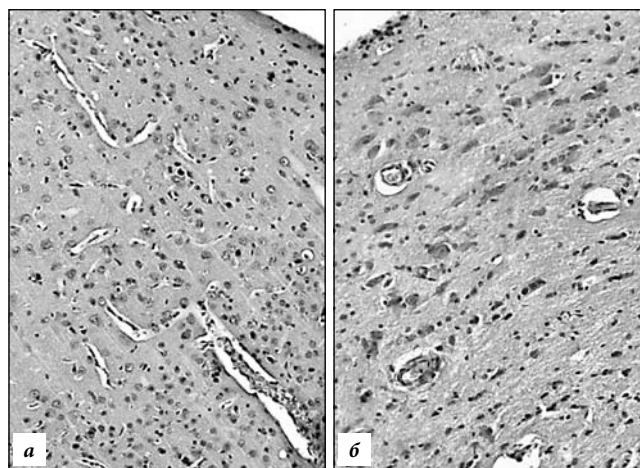


Рис. 2. Выраженный периваскулярный отек и стаз эритроцитов в коре головного мозга при моделировании табакокурения у крысы.

Окр. гематоксилином и эозином; а – $\times 100$; б – $\times 200$.

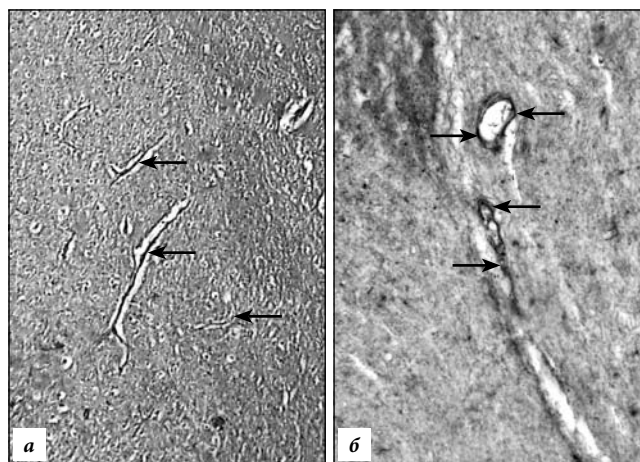


Рис. 3. Усиление экспрессии SP (стрелки) во внутримозговых сосудах при моделировании табакокурения у крысы.

Иммуногистохимия; а – $\times 100$; б – $\times 200$.

и индуцибельной NO-синтазами, установлена в стенке внутримозговых и пияльных артерий в норме и при некоторых видах сосудистой патологии [9–13, 22].

Исследования последних лет показали важную роль компонентов табачного дыма в повреждении гемато-энцефалического барьера [2, 30]. По нашим данным, повышение его проницаемости у «крыс-крыльчиков» сопровождается периваскулярным отеком, стазом и выходом форменных элементов крови за пределы сосудистого русла (рис. 2).

При иммуногистохимических исследованиях экспрессия маркеров SP наблюдается в пияльных и внутримозговых сосудах разного диаметра, но особенно интенсивная реакция определяется в прекапиллярных ветвях радиальных артерий и капиллярах белого вещества мозга (рис. 3). При экспериментальном моделировании хронического табакокурения у крыс нами установлено более чем двукратное увеличение содержания SP в церебральных сосудах по сравнению с интактными животными: в среднем до 3,18 при норме 1,37 ЕОП [6, 49].

В физиологических условиях на эндотелиоцитах капилляров мозга формируются специализированные структуры типа *zonula occludens*. Их отличительной особенностью служит слияние наружных слоев цитомембран смежных клеток, которое распространяется на всю область контакта [4, 5, 8]. Такие контакты обеспечивают высокую прочность соединения клеток в составе пласта и избирательную проницаемость эндотелия для большинства молекул, циркулирующих в крови. Увеличение проницаемости гематоэнцефалического барьера при усилении выработки SP может быть связано с нарушением процессов внутриклеточной регуляции содержания ионов Ca^{2+} [51]. Известно, что в норме базальный уровень свободного Ca^{2+} в эндотелиальных клетках мозговых сосудов не превышает 100 мкМ. Нарастание концентрации SP в этих клетках на порядок увеличивает в них содержание Ca^{2+} , что приводит к уменьшению размеров эндотелиоцитов в составе пласта, изменению структуры плотных контактов и усилению проницаемости гематоэнцефалического барьера. При введении SP структура плотных контактов нарушается и в более крупных сосудах оболочек мозга [3, 32].

Таким образом, компоненты табачного дыма оказывают неблагоприятное воздействие на различные органы и системы, в том числе, на клеточные и сосудистые образования головного мозга, что приводит к развитию церебральной дисфункции. В патофизиологических эффектах хронического табакокурения участвуют многоуровневые механизмы, реализация которых в немалой степени связана с избыточным содержанием SP в тканях и с активацией нейрокининовых рецепторов. Токсические вещества табачного дыма вызывают усиленное высвобождение SP из нервных окончаний с последующей активацией этих рецепторов и провоспалительных цитокинов, что провоцирует нейрогенное воспаление, приводящее, в конечном счете, к повреждению гематоэнцефалического барьера, нейронов и глиальных клеток головного мозга. Цитокины, в свою очередь, стимулируя афферентные нервные волокна, по принципу обратной связи вызывают высвобождение все новых порций SP, формируя порочный круг и поддерживая дальнейшее развитие воспалительного процесса, усугубляя тем самым нарастающую церебральную дисфункцию.

References

1. Lepeyko Yu.B., Dyuyzen I.V., Nevzorova V.A., Gilifanov E.A. Dynamics of neurokinin receptors and activity of enzymes of the extracellular matrix (MMP9 and TIMP-2) in the nasal mucosa in chronic tobacco smoking // *Journal of Otorhinolaryngology*. 2014. No. 3. P. 12–16.
2. Motavkin P.A., Chertok V.M. Control of cerebral blood circulation disorders. M.: Znanie, 1986. 64 p.
3. Motavkin P.A., Chertok V.M. Innervation of the brain // *Pacific Medical Journal*. 2008. No. 3. P. 11–23.
4. Motavkin P.A., Lomakin A.V., Chertok V.M. Brain capillaries. Vladivostok: DVNTS AS USSR, 1983. 140 p.
5. Lomakin A.V., Chertok V.M. The development of the human brain capillaries // *Journal of Neurology and Psychiatry*. 1983. Vol. 82. No. 7. P. 1004–1007.
6. Nevzorova V.A., Zakharchuk N.V., Agafonova I.G., Sarafanova N.S. Features of development of cerebral vascular dysfunction in hypertension and tobacco smoking // *Pacific Medical Journal*. 2013. No. 4. P. 9–16.
7. Startseva M.S., Chertok V.M. Quantification of the intensity of histochemical and immunohistochemical reactions using standard computer programs // *Pacific Medical Journal*. 2012. No. 1. P. 121–123.
8. Chertok V.M. Local features of intracerebral arteries ultrastructure of human fetuses // *Journal of Neurology and Psychiatry*. 1988. Vol. 88. No. 10. P. 55–58.
9. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Changes inducible NO-synthase in pial arteries of different diameters in hypertensive rats // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2011. Vol. 152, No. 8. P. 220–224.
10. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Immunolocalization cystathionine β -synthase and cystathionine γ -lyase in the wall of a brain artery in normo and hypertensive rats // *Report of the Academy of Sciences*. 2012. Vol. 445, No. 5. P. 595–599.
11. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Features of distribution of H2S synthesizing enzyme in the wall of the cerebral arteries in rats // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2012. Vol. 154, No. 7. P. 116–120.
12. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Endothelial (intimal) mechanism of regulation of cerebral hemodynamics: the transformation of views // *Pacific Medical Journal*. 2012. No. 2. P. 17–26.
13. Chertok V.M., Kotsyuba A.E., Startseva M.S. Gaseous mediators in the regulation of functions of microvascular // *Angiology and Vascular Surgery*. 2012. Vol. 18. P. 58–59.
14. Chertok V.M., Kotsyuba A.E., Startseva M.S. The use of the pixel method to quantify enzyme histochemistry // *Morphology*. 2012. Vol. 142, No. 5. P. 71–75.
15. Anbarasi K., Vani G., Balakrishna K. [et al.]. Effect of bacoside A on membrane-bound ATPases in the brain of rats exposed to cigarette smoke // *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2005. Vol. 19. P. 59–65.
16. Andre E., Campi B., Materazzi S. [et al.]. Cigarette smoke-induced neurogenic inflammation is mediated by α , β -unsaturated aldehydes and the TRPA1 receptor in rodents // *J. Clin. Invest.* 2008. Vol. 118. P. 2574–2582.
17. Antonelli I.R., Marra C., Giordano A. [et al.]. Cognitive impairment in chronic obstructive pulmonary disease – a neuropsychological and SPECT study // *J. Neurol.* 2003. Vol. 250 (3). P. 325–332.
18. Barnes P.J. Neurogenic inflammation in the airways // *Respir. Physiol.* 2001. Vol. 125. P.145–154.
19. Barnes P.J., Baraniuk J.N., Belvisi M.G. Neuropeptides in the respiratory tract. Part I. // *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991. Vol. 144 (5). P. 1187–1198.
20. Bossaller C., Reither K., Hehlert-Friedrich C. [et al.]. In vivo measurement of endothelium-dependent vasodilation with substance P in man // *Herz*. 1992. Vol. 17. P. 284–290.
21. Castellani M.L., Vecchiet J., Salini V. et al. Stimulation of CCL2 (MCP-1) and CCL2 mRNA by substance P in LAD2 human mast cells // *Transl. Res.* 2009. Vol. 154. P. 27–33.
22. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Age-associated characteristics of vasomotor regulation of the pia mater arteries in rats // *Bull. Experim. Biology and Medicine*. 2010. T. 149. No. 3. C. 364–368.
23. Christos M.P., Konstantinos A.A., Kimon S.S. [et al.]. Endothelial dysfunction and type of cigarette smoked: the impact of 'light' versus regular cigarette smoking // *Vascular Medicine*. 2004. Vol. 9. P. 103–105.
24. Circu M.L., Aw T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis // *Free Radic. Biol. Med.* 2010. Vol. 48. P. 749–762.
25. Constantinescu C.S., Tani M., Ransohoff R.M. [et al.]. Astrocytes as antigen-presenting cells: expression of IL-12/IL-23 // *J. Neurochem.* 2005. Vol. 95. P. 331–340.
26. Dam T.V., Quirion R. Pharmacological characterization and autoradiographic localization of substance P receptors in guinea pig brain // *Peptides*. 1986. Vol. 7 (5). P. 855–864.

27. Dang Q. Dao, Perez E.E., Yanfen Teng. Nicotine enhances excitability of medial habenular neurons via facilitation of neurokinin signaling // *J. Neurosci.* 2014. Vol. 34 (12). P. 4273–4284.
28. De Swert K.O., Joos G.F. Extending the understanding of sensory neuropeptides // *Eur. J. Pharmacol.* 2006. Vol. 8 (533). P. 171–181.
29. Dodd J.W., Chung A.W., van den Broek M.D. [et al.]. Brain structure and function in chronic obstructive pulmonary disease: a multimodal cranial magnetic resonance imaging study // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012. Vol. 186 (3). P. 240–245.
30. Donkin J.J., Nimmo A.J., Cernak I. [et al.]. Substance P is associated with the development of brain edema and functional deficits after traumatic brain injury // *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 2009. Vol. 29. P. 1388–1398.
31. Ferrari M.F., Coelho E.F., Farizatto K.L. [et al.]. Modulation of tyrosine hydroxylase, neuropeptide Y, glutamate, and substance P in ganglia and brain areas involved in cardiovascular control after chronic exposure to nicotine // *Int. J. Hypertens.* 2011. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3147125> (дата обращения: 14.12.2015).
32. Ghabriel M.N., Lu M. X., Leigh C. [et al.]. Substance P-induced enhanced permeability of dura mater microvessels is accompanied by pronounced ultrastructural changes, but is not dependent on the density of endothelial cell anionic sites // *Acta Neuropath.* 1999. Vol. 97 (3). P. 297–305.
33. Guo X., Oldham M.J., Kleinman M.T. [et al.]. Effect of cigarette smoking on nitric oxide, structural, and mechanical properties of mouse arteries // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006. Vol. 291 (5). P. 2354–2361.
34. Harrison S., Geppetti P. Substance P // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2001. Vol. 33, No. 6. P. 555–576.
35. Hawkins B.T., Abbruscato T.J., Egleton [et al.]. Nicotine increases in vivo blood-brain barrier permeability and alters cerebral microvascular tight junction protein distribution // *Brain Res.* 2004. Vol. 1027. P. 48–58.
36. He-Bin Tang, Yu-Sang Li, Koji Arihiro [et al.]. Activation of the neurokinin-1 receptor by substance P triggers the release of substance P from cultured adult rat dorsal root ganglion neurons // *Molecular Pain.* 2007. Vol. 3 (42). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2235838> (дата обращения: 25.12.2015).
37. Holzer P., Holzer-Petsche U. Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural excitation, secretion, and inflammation // *Pharmacol. Ther.* 1997. Vol. 73 (3). P. 219–263.
38. Joos G.F., De Swert K.O., Schelfhout V. [et al.]. The role of neural inflammation in asthma and chronic obstructive pulmonary disease // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2003. Vol. 992. P. 218–230.
39. Kim D.K., Oh E.K., Summers B.A. [et al.]. Release of substance P by low oxygen in the rabbit carotid body: evidence for the involvement of calcium channels // *Brain Research.* 2001. Vol. 892 (2). P. 359–369.
40. Kincy-Cain T., Bost K.L. Substance P-induced IL-12 production by murine macrophages // *J. Immunol.* 1997. Vol. 158. P. 2334–2339.
41. Kwong K., Wu Z., Kashon M.L. [et al.]. Chronic smoking enhances tachykinin synthesis and airway responsiveness in Guinea pigs // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2001. Vol. 25. P. 299–305.
42. Laurenzi M.A., Persson M.A., Dalsgaard C.J. [et al.]. The neuropeptide substance P stimulates production of interleukin 1 in human blood monocytes: activated cells are preferentially influenced by the neuropeptide // *Scand. J. Immunol.* 1990. Vol. 31. P. 529–533.
43. Li X.W., Wang H. Non-neuronal nicotinic alpha 7 receptor, a new endothelial target for revascularization // *Life Sci.* 2006. Vol. 78. P. 1863–1870.
44. Maggi C.A. Principles of tachykinergic co-transmission in the peripheral and enteric nervous system // *Regul. Pept.* 2000. Vol. 93 (1–3). P. 53–64.
45. Marriott I. The role of tachykinins in central nervous system inflammatory responses // *Front. Biosci.* 2004. Vol. 9. P. 2153–2165.
46. Matsas R., Kenny A.J., Turner A.J. The metabolism of neuropeptides. The hydrolysis of peptides, including enkephalins, tachykinins and their analogues, by endopeptidase-24 // *Biochemical Journal.* 1984. Vol. 223 (2). P. 433–440.
47. Mechiche H., Koroglu A., Candenas L. [et al.]. Neurokinins induce relaxation of human pulmonary vessels through stimulation of endothelial NK1 receptors // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2003. Vol. 41, No. 3. P. 343–455.
48. Moriarty S.E., Shah J.H., Lynn M. [et al.]. Oxidation of glutathione and cysteine in human plasma associated with smoking // *Free Radic. Biol. Med.* 2003. Vol. 35. P. 1582–1588.
49. Nevzorova V.A., Zakharchuk N.V., Agafonova I.G. [et al.]. Endothelium-dependent and endothelium-independent cerebral vessels reactions in a chronic smoking model // *Intern. J. Biomedicine.* 2011. Vol. 2. P. 103–107.
50. Park E.M., Park Y.M., Gwak Y.S. Oxidative damage in tissues of rats exposed to cigarette smoke // *Free Radic. Biol. Med.* 1998. Vol. 25. P. 79–86.
51. Revest P.A., Abbott N.J., Gillespie J.I. Receptor-mediated changes in intracellular $[Ca^{2+}]$ in cultured rat brain capillary endothelial cells // *Brain Research.* 1991. Vol. 549 (1). P. 159–161.
52. Ribeiro-da-Silva A., Hökfelt T. Neuroanatomical localisation of substance P in the CNS and sensory neurons // *Neuropeptides.* 2000. Vol. 34 (5). P. 256–271.
53. Richardson J.D., Vasko M.R. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2002. Vol. 302 (3). P. 839–845.
54. Rolland I., Dreux C., Imhoff V. [et al.]. Importance of the presence of the N-terminal tripeptide of substance P for the stimulation of phosphatidylinositol metabolism in rat parotid gland: a possible activation of phospholipases C and D // *Neuropeptides.* 1989. Vol. 13 (3). P. 175–185.
55. Saria A. The tachykinin NK1 receptor in the brain: pharmacology and putative functions // *Eur. J. Pharmacol.* 1999. Vol. 375. P. 51–60.
56. Severini C., Improta G., Falconieri-Erspamer G. [et al.]. The tachykinin peptide family // *Pharmacological Reviews.* 2002. Vol. 54 (2). P. 285–322.
57. Shinton R., Beevers G. Meta-analysis of relation between cigarette smoking and stroke // *BMJ.* 1989. Vol. 298. P. 789–794.
58. Somers M.J., Harrison D.G. Reactive oxygen species and control of vasomotor tone // *Curr. Hypertens Rep.* 1999. Vol. 1. P. 102–108.
59. Xiao A.Y., Wei L., Xia S. [et al.]. Ionic mechanism of ouabain-induced concurrent apoptosis and necrosis in individual cultured cortical neurons // *J. Neurosci.* 2002. Vol. 22. P. 1350–1362.
60. Yang Y.M., Liu G.T. Injury of mouse brain mitochondria induced by cigarette smoke extract and effect of vitamin C on it in vitro // *Biomed. Environ. Sci.* 2003. Vol. 16. P. 256–266.

Поступила в редакцию 25.02.2016.

Субстанция Р в механизмах развития церебральной дисфункции при хроническом табакокурении

Н.В. Захарчук, В.А. Невзорова, В.Б. Шуматов, Н.В. Шестакова, Е.Ю. Гончар

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

Резюме. В обзоре суммированы данные литературы и результаты собственных исследований авторов о роли субстанции Р в развитии церебральной дисфункции, ассоциированной с табакокурением. Описаны патофизиологические аспекты воздействия табачного дыма на структуры головного мозга, опосредованные субстанцией Р и нейрокининовыми рецепторами. Обосновывается положение о связи между усиленным высвобождением субстанции Р, активацией нейрокининовых рецепторов, провоспалительных цитокинов и развитием нейрогенного воспаления, приводящим к повреждению гематоэнцефалического барьера, нейронов и глиальных клеток головного мозга. Цитокины, в свою очередь, стимулируя афферентные нервные волокна, по принципу обратной связи вызывают высвобождение новых порций субстанции Р, формируя порочный круг и поддерживая воспалительный процесс, усугубляя тем самым нарастающую церебральную дисфункцию.

Ключевые слова: никотин, головной мозг, нейрокининовые рецепторы, сосуды.

УДК 616.216.1-002-08:616-008.092.18

КЛЕТОЧНО-МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ОКОЛОНОСОВЫХ ПАЗУХ

С.С. Едранов

Тихоокеанский государственный медицинский университет (6900950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Ключевые слова: оксид азота, индуцибельная нитроксидсинтаза, апоптоз, верхнечелюстной синус.

CELLULAR AND MOLECULAR ASPECTS OF POSTTRAUMATIC REGENERATION OF THE MUCOSA OF THE PARANASAL SINUSES

S.S. Edranov

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

Summary. Reparative regeneration is the process of restoration of the lost cells and their interactions with the nearest microenvironment. The article provides the analysis of literature data and own researches of the author on the regenerative potential of injured mucosa of the maxillary sinus in humans and animals. It was examined the regulatory mechanisms of reparative regeneration, as well as the importance of nitric oxide and other trophic factors in maintaining the cytoprotective effects of second messengers. It is emphasizes the leading role of nitric oxide in the potentiation of apoptosis in damaged and newly formed cells of the mucous membrane, as well as summarizes the pharmacological correction of the exposure.

Keywords: nitric oxide, inducible nitroxide synthase, apoptosis, maxillary sinus.

Pacific Medical Journal 2016, No. 2, p. 67–71.

Регенерация реализуется через сложный процесс взаимодействия различных камбиальных и коммитированных клеток и малых регуляторных молекул [8, 12]. Модулирующие влияния со стороны ближайшего микроокружения осуществляют контроль за экспрессией вторичных клеточных мессенджеров, цитокинов и трофических факторов, а также участвуют в запуске генетических программ эндогенной цитопротекции и апоптоза [4–6]. Суммарная активность этих факторов устраняет дезинтеграцию во взаимодействии сложных и часто разнонаправленных молекулярно-биохимических механизмов, возникающих при травме или воспалении, восстанавливая их нормальный баланс [10].

В настоящей работе рассмотрены наиболее общие закономерности взаимодействия клеток и их регуляции при восстановлении тканей околоносовых пазух (ОНП) после повреждения.

Морфогенез регенераторного процесса и его регуляция

Все регенераторные процессы имеют общие морфогенетические свойства и складываются из двух этапов – пролиферации и дифференцировки [4, 8]. В фазу пролиферации размножаются камбиальные или молодые недифференцированные клетки. В слизистой оболочке верхнечелюстной пазухи описаны как внутриклеточная (элементарная и универсальная),

так и клеточная формы регенерации, отражающие непрерывно текущий процесс распада и синтеза веществ на молекулярном и ультраструктурном уровнях [2, 4]. Особенно это явление подчеркнуто на начальных стадиях онтогенеза, когда закономерно превалирует клеточная регенерация. С возрастом ее интенсивность понижается, а удельный вес внутриклеточного механизма, напротив, возрастает [8]. Это положение косвенно подтверждается рентгенологическими изменениями. Так, структура губчатого вещества кости альвеолярных отростков челюстей с крупнопетлистого рисунка, характерного для детей, изменяется на мелкопетлистый, присущий людям зрелого возраста [4]. Одновременно с этим происходят изменения содержания стромальных стволовых клеток-предшественников фибробластов, а также остеогенных клеток-предшественников, количество которых уменьшается обратно пропорционально возрасту [1, 4, 12]. Изменение границ между морфологическими элементами структур различной природы наблюдается и в условиях патологии, когда на месте одной, частично дегенерирующей ткани, происходит компенсаторно-регенераторное разрастание другой. Например, при пародонтите нарушение целостности зубодесневой связки и сопровождается вращением в нее эпителия слизистой оболочки [1]. Отметим, что молекулярно-клеточные процессы физиологической и репаративной регенерации базируются на фундаментальных гистогенетических закономерностях: интеграции (взаимообусловленное развитие различных локусов поврежденной ткани), детерминации (наследственно обусловленное развитие) и гетерохронии (разновременное развитие) [8]. Обновление морфофункциональной целостности поврежденной слизистой оболочки представляет результат корректирующего взаимодействия клеток эпителиального пласта, подслизистой соединительной ткани и кости [1, 4].

Большинство исследователей разделяет точку зрения о существовании «двойного обеспечения» слизистой оболочки за счет так называемых детерминированных и индуцибельных клеток-предшественников, отличных по локализации, регенераторному потенциалу и механизмам дифференцировки [1, 8]. Однако детерминированные клетки не требуют для проявления своих свойств каких-то дополнительных воздействий или индукторов [12, 19]. Коммитированные стромальные клетки-предшественники (общие для клеток фибробластического ряда) могут быть выделены из костного мозга в виде диплоидных штаммов. Они

представляют собой клетки, которые рассматриваются как детерминированные, то есть не требуют для проявления камбиальных свойств каких-то дополнительных воздействий [16]. Направление дифференцировки таких элементов определяется состоянием микроокружения и наличием специфического молекулярного индуктора или трофического фактора [10]. Однако, по другой точке зрения, в регенерации кости и ассоциированной с ней слизистой оболочки участвуют гетерогенные популяции клеток-предшественников, которые различаются локализацией, происхождением и исходными потенциями к дифференцировке [12, 16, 19]. Так, наличие тесной взаимосвязи эпителия слизистой оболочки и кости в области прикрепления десны позволяет предполагать наличие особой формы регенерации, возникающей при взаимодействии клеток разной тканевой природы. Примером такого взаимодействия служит зуб, как продукт формообразующего взаимоотношения мезенхимы и эпителиальной выстилки первичной полости рта. Архитектоника пульпы и костного содержимого альвеолярных отростков челюстей, периферийное расположение одонтобластов и остеобластов, а также сходство микроциркуляторного окружения могут указывать на органнотип регенерации зуба путем взаимодействия вышеупомянутых тканей между собой.

Гомеостатическую регуляцию сбалансированности процессов синтеза и распада в соединительной ткани слизистой оболочки можно представить в виде системы замкнутых взаимосвязанных контуров [8, 10]. Относительно верхнечелюстной пазухи внутренний контур саморегуляции замыкается на фибробластах, находящихся на разных стадиях дифференцировки. Этот феномен строится на взаимодействии между гистогенетически разными, но топографически взаимосвязанными типами мезенхимальных клеток [16]. Следующий контур базируется на прямых и обратных связях клеток из разных источников – эпителия и мезенхимы. В целостном организме постоянно осуществляется коррекция этих короткодистантных взаимодействий через иммунонейроэндокринные связи, которые обеспечивают тонкую подстройку соединительной и эпителиальной ткани к требованиям конкретной метаболической ситуации [1, 4, 10]. Иммунонейроэндокринная система, составляющая внешний контур регуляции, посредством выработки гормонов и нейрогуморальных стимулов осуществляет оперативное перераспределение потоков энергетического и пластического обеспечения в зоне повреждения [8].

На модели травмы верхнечелюстного синуса установлена смена последовательности клеточных реакций, отражающих основной дизайн клеточных перестроек, характерных для описанных контуров регуляции репаративного процесса [4]. После моделируемой травмы в слизистой оболочке наблюдаются характерные деструктивные и репаративно-пролиферативные изменения. С первых по третьи сутки после травмы на срезах слизистой оболочки регистрируется выраженная

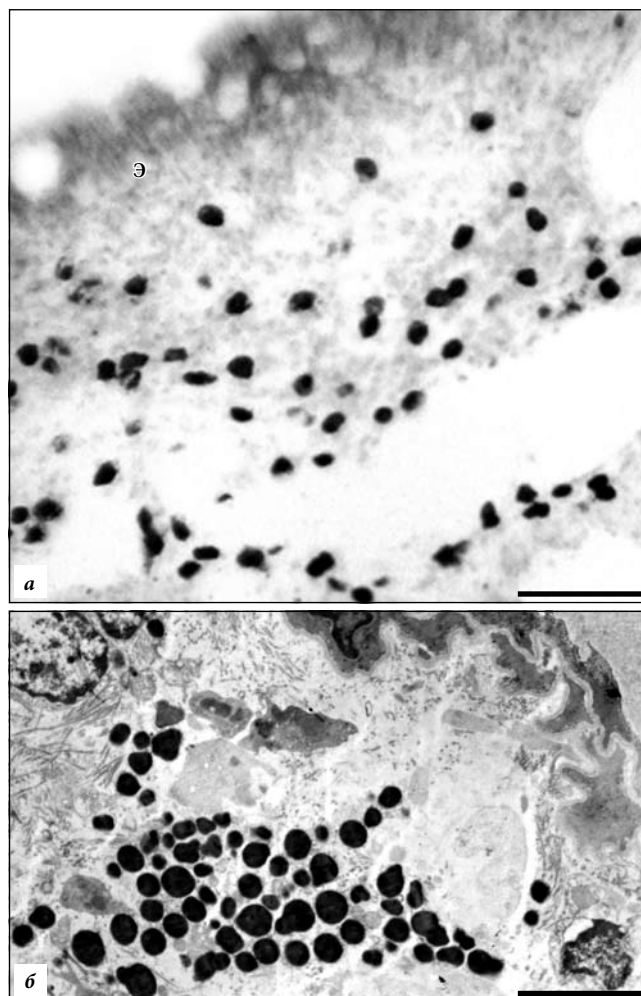


Рис. 1. Тучные клетки слизистой оболочки ОНП крысы при экспериментальном переломе верхней челюсти:

а – тучноклеточная инфильтрация подслизистой основы на 3-и сутки эксперимента (Э – эпителиальный слой); б – дегрануляция тучной клетки на 7-е сутки после травмы; а – реакция на NADPH-диафору, б – электронограмма. Масштаб: а – 50 мкм; б – 5 мкм.

воспалительная и тучноклеточная реакция (рис. 1, а). На 7-е сутки эксперимента вблизи зоны повреждения определяются тканевой отек и выброс секреторных гранул тучных клеток в межклеточное пространство (рис. 1, б). Изменения слизистой оболочки репаративно-продуктивного характера начинаются примерно на 14-е сутки. В этом случае тучноклеточная реакция уже незначительна, секреторные гранулы лаброцитов выявляются лишь во внеклеточном пространстве и в меньшем количестве. Наряду с этим определяется пролиферация фибробластов, а в межклеточном пространстве видны явления коллагенообразования. В отдаленные сроки после травмы (21–28-е сутки) в слизистой оболочке остаются в небольшом количестве недифференцируемые клетки с поврежденным ядром и клеточный детрит, определяемый также в просвете некоторых лимфатических коллекторов, что свидетельствует о резорбции поврежденной ткани. Следует подчеркнуть, что на всех сроках после травмы отмечается своеобразная дегенерация клеток с резким изменением формы ядра и его фрагментацией,

что, возможно, служит проявлением травматического стресса и/или апоптоза.

При репаративной посттравматической регенерации в слизистой оболочке челюстных пазух экспрессируются различные трофические молекулы, направляющие процессы клеточной дифференцировки. К ним относятся семь костных морфогенетических белков кости, девять металлопротеиназ, два инсулиноподобных фактора роста, цитокины (в т.ч., интерлейкины 1, 6 и 11) [15, 22]. Блокада или недостаток этих факторов приводит к синтезу атипичного нестабильного коллагена, обедненного оксипролином. В этом случае репаративная регенерация легко переходит в патологическую, а сформированный рубец не способен выполнять надлежащую механическую нагрузку. Это ведет к рецидивирующей окклюзионной травме, которая может быть самостоятельным патогенетическим фактором хронического воспаления в пазухе [4]. Не исключено также нарушение образования фибрилл и во внеклеточном матриксе, когда агрегация молекул коллагена идет по принципу «спонтанной самосборки», образуя вместо рыхлой соединительной ткани грубоволокнистый остеонд [10].

Баланс между эпителиальным и остеогенерирующим пулом клеток поддерживает RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand) и остеокластический фактор дифференцировки. Они идентифицированы как лиганды и рецепторы семейства фактора некроза опухоли и выполняют роль критических регуляторов остеокластогенеза [12, 15, 19]. Предшественники остеокластов, которые экспрессируют RANKL, распознают остеокластический фактор дифференцировки и через межклеточные взаимодействия с остеобластами и стромальными клетками дифференцируются в остеокласты при наличии макрофагального колониестимулирующего фактора [10, 12]. Межклеточную сигнализацию в слизистой оболочке обеспечивает также оксид азота.

Оксид азота и апоптоз как факторы повреждения и посттравматической репарации клеток

Взаимосвязь выработки оксида азота и трофических факторов продемонстрирована при регенерации утраченных клеток эпителия и соединительной ткани кожи, верхних дыхательных путей и слизистой оболочки кишечника [9, 22]. В этой ситуации оксид азота выполняет функцию стыковочного звена в пространственных взаимодействиях между клетками и обеспечивает выраженный цитопротективный эффект в условиях гипоксии, травмы или воспаления [7, 11, 25]. Эти эффекты поддерживаются нитрооксидопосредованной вазодилатацией и положительным влиянием этого газа на процессы метаболической компенсации повреждения.

Эндогенное образование оксида азота в ответ на какое-либо изменение внутренней среды приводит к высвобождению ряда других регуляторов, в том числе и модуляторных пептидов, для которых

нитрооксидзависимый сигнал является индуктором. Эффекторная последовательность факторов образует своеобразный регуляторный «континуум», где их совместное действие однонаправленно, а конечный эффект будет суммированным и продолжительным. Так, оксид азота способен регулировать активность про- и противовоспалительных цитокинов через модуляцию активности их рецепторов [9, 13]. Подобные эффекты проявляют выраженные трофические и генераторные свойства [14].

Данные гистохимических исследований и количественного биохимического анализа позволяют выделить несколько источников, поддерживающих основной пул оксида азота в слизистой оболочке ОНП (рис. 2, а). Валовый синтез оксида азота здесь неизменно регистрируется в эпителии, фибробластах, тучных клетках, эндотелиоцитах и многочисленных нервных волокнах. Редукция его выработки отмечается при полной обструкции остиомеатального комплекса и риносинуситах [21]. В организме человека наибольшая концентрация оксида азота определяется именно в полости ОНП [24]. Этот показатель – прецизионный метод диагностики функциональных состояний слизистой оболочки пазух, а также при лечении их заболеваний и риносинуситов различного генеза [14].

По нашим наблюдениям, в слизистой оболочке верхнечелюстной пазухи человека определяется кальций-независимая индуцибельная нитрооксидсинтаза (iNOS). Энзим находится преимущественно в растворимой форме, менее зависим от кальмодулина и может экспрессироваться в эпителиальных клетках (рис. 2, а, б). Имуннореактивность к iNOS наблюдается в шиповатом слое, нейрональная NOS локализуется, главным образом, в подапикальной части эпителия, а эндотелиальная NOS – только в его наиболее верхних слоях [21]. Таким образом, самой распространенной изоформой в слизистой оболочке пазух, по всей видимости, является iNOS [4]. За выработку оксида азота отвечает активная мембраносвязанная изоформа энзима; другая изоформа – растворимая – находится в цитоплазме эпителиоцитов в неактивном состоянии [21]. В условиях физиологической нормы цитопротективные и вазорелаксирующие эффекты оксида азота дополняются его локальным действием на мукоцилиарную активность [18, 23]. Так, экзогенное подведение L-аргинина или введение нитропруссид натрия ведут к усилению колебательных движений ресничек носовой полости [13]. Это явление коррелирует с изменениями активности NADPH-диафоразы в клетках слизистой оболочки верхнечелюстной пазухи и поступающих сюда нервных волокон [4].

Усиление активности iNOS при травме и хроническом риносинусите, как правило, сопровождается повышением апоптотического индекса клеток слизистой оболочки [4]. В этой ситуации обнаруживаются характерные признаки программированной гибели клеток: конденсация хроматина, сморщивание цитоплазмы при сохранных мембранных органеллах и разделение

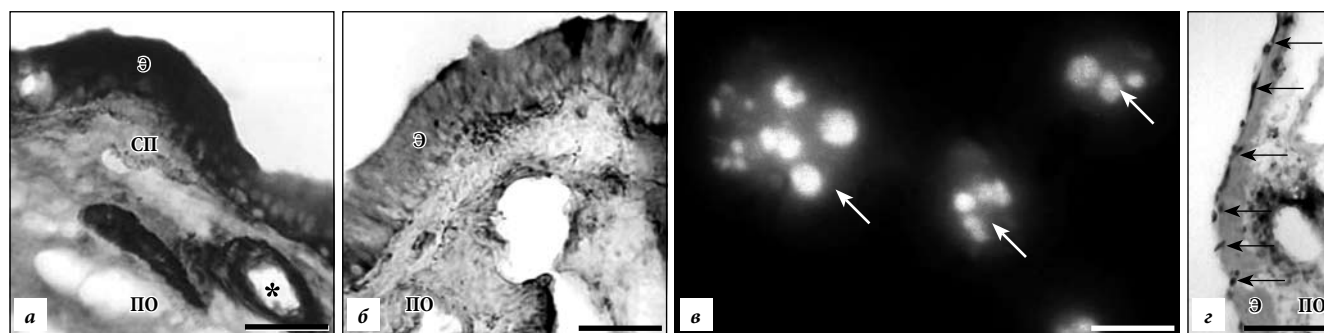


Рис. 2. Апоптоз NOS-реактивных клеток слизистой оболочки верхнечелюстной пазухи человека при хроническом риносинусите:

а – индукция NOS в эпителии и стенке микрососудов (звездочка); б – iNOS в эпителиоцитах, тучных клетках и фибробластах подслизистой основы; в – апоптотические тельца и фрагментированные ядра (стрелки) фибробластоподобных клеток подслизистой основы; г – TUNEL-иммунореактивные клетки (стрелки) в поверхностном уровне эпителиального слоя. Э – эпителий, СП – собственная пластинка (слизистой оболочки), ПО – подслизистая основа. Окр.: а–в – реакция на NADPH-диафору, г – иммунофлуоресцентный метод TUNEL. Масштаб: а, б, г – 100 мкм; в – 10 мкм.

на отдельные фрагменты – апоптотические тельца (рис. 2, в, г). Однако специфика повреждающего воздействия влечет за собой появление уникального паттерна распределения апоптотических клеток. Так, при травме апоптотические ядра визуализируются во всей толще многорядного эпителия и на протяжении слизистой оболочки имеют тенденцию к очаговым группировкам. Наряду с участками, содержащими активно погибающие клетки, встречаются зоны, где выраженность апоптоза минимальна. Кроме того, регистрируются участки, где в процесс вовлечены исключительно клетки, ядродержащие сегменты которых расположены в поверхностных слоях эпителиального пласта. В условиях хронического воспаления апоптотические клетки, напротив, доминируют в глубоких уровнях подслизистой основы и, по всей видимости, относятся к фибробластоподобным и тучным (рис. 2, в).

Распространенность апоптоза при травме ОНП и риносинусите коррелирует с началом активной выработки оксида азота и белка p53, а превалирование продукции Bcl-2 совпадает с падением синтеза оксида азота [3]. Однако в этом принципиальном положении есть исключения. Так, хронический синусит у человека характеризуется гетерогенным вовлечением нитрооксидергических клеток в апоптоз. Фибробласты и тучные клетки имеют здесь высокий апоптотический индекс, хотя и демонстрируют относительно низкую активность NOS [3, 5]. Между тем, эпителиальные клетки при массивном синтезе оксида азота подвержены апоптозу в значительно меньшей степени. Аналогичный феномен наблюдался в популяции тучных клеток в отсроченный период экспериментальной травмы пазухи у крыс [3].

Причины, ведущие к смещению апоптогенного действия оксида азота на противоположное представляются наиболее дискуссионными. Предлагается несколько сценариев развития этих событий. Так, оксид азота способен стимулировать апоптоз, непосредственно влияя на экспрессию p53 и цитокинов [17, 25]. Необходимо отметить, что подобные эффекты «срабатывают» только при его высоких концентрациях и массивной индукции NOS. С другой стороны, низкая

активность энзима и соответствующие низкие показатели выработки оксида азота могут активировать индукцию трофических факторов и таким образом предотвращать апоптоз [6, 15].

Показано, что при травме и/или хроническом воспалении оксид азота способен усиливать потенциал мембран митохондрий и изменять химическую структуру цитохрома С. В результате этого происходит повреждение цитохрома и высвобождение его из митохондрий, что в свою очередь активирует каспазу-3 [20]. *In vitro* установлено разрушающее действие оксида азота на клеточную ДНК [21]. Вместе с тем гистохимические исследования почек *in vivo* выявили значительное нарастание интенсивности апоптоза в клетках, где была наиболее выражена экспрессия iNOS [5, 6]. Это свидетельствует о действии iNOS и провоспалительных цитокинов, вырабатываемых макрофагами, в качестве триггерного механизма апоптоза. С другой стороны, имеются данные об антиапоптотном действии оксида азота. Согласно этим исследованиям, он стабилизирует каспазу, препятствуя их активации и блокируя Fas-индуцированный путь развития программированной гибели клеток [15].

Несмотря на то, что ключевая роль апоптоза в реализации физиологических процессов, связанных с поддержанием клеточного гомеостаза, не вызывает сомнений, показано, что он не является обязательной составляющей реализации большинства типовых патологических процессов. В этом можно убедиться на примере воспалительной реакции. Хотя для воспаления характерно повреждение тканей, гибель клеток при этом происходит преимущественно по механизму некроза и сопровождается выходом содержимого клеток в межклеточное пространство, что может стать причиной гибели соседних клеток и расплавления тканей [10]. Однако на завершающих этапах воспаления апоптозу принадлежит важная роль, поскольку в этот период происходит устранение вовлеченных в воспаление клеток, выполнивших свои функции [20].

Таким образом, активность нитрооксидсинтаз является значимым фактором, который определяет апоптогенное и/или антиапоптотическое действие

оксида азота в разные сроки после травматического повреждения. Можно выделить два основных направления развития этого процесса: предотвращение вторичного повреждения клеток путем влияния оксида азота на апоптоз, и второе – стимуляция трофики и регенераторных способностей слизистой оболочки. Ингибирование апоптоза может способствовать регенерации, а его стимуляция в перспективе – оказывать цитопротективное влияние при вторичном повреждении продуктами воспалительных реакций. Необходимо отметить, что исследования различных путей регуляции апоптоза способствуют более глубокому и полному пониманию молекулярных механизмов формирования различных форм повреждения ткани, что, в свою очередь, необходимо для разработки новых подходов к коррекции этих состояний. Так, ведутся активные разработки фармакологического применения низкомолекулярных ингибиторов каспаз. Использование олигонуклеотидов-ингибиторов гена, отвечающего за выработку белка Bcl-2, уже находится в стадии клинических испытаний у онкологических больных [26]. Несомненно, исследования в области гистофизиологии апоптоза открывают широкие возможности для регуляции репаративных процессов после повреждения.

References

1. Baydik O.D., Sysolyatin P.G., Rudenskikh N.V. Features of structural changes in the mucosa of the maxillary sinus in odontogenic cysts // Institute of Dentistry. 2011. No. 2. P. 86–87.
2. Durnovo E.A. Inflammatory diseases of the maxillofacial region: diagnosis and treatment based on the immune reactivity of the organism // N. Novgorod: Nizhniy Novgorod State Academy Press, 2007. 196 p.
3. Edranov S.S., Motavkin P.A. Apoptosis as a mechanism of mucosal damage to the maxillary sinus in rats under experimental crossing of the maxillary nerve // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2012. Vol. 153, No. 4. P. 518–523.
4. Edranov S.S. Post-traumatic sinusitis: pathogenesis questions. Experimental and clinical study. Vladivostok: Meditsina DV, 2013. 167 p.
5. Edranov S.S., Tsoy Khak Bon, Kheteeva I.P. Dynamics of apoptosis and its regulation at maxillary sinus injury // Pacific Medical Journal. 2013. No. 1. P. 12–16.
6. Kalinichenko S.G., Matveeva N.Yu. Morphological characteristics of apoptosis and its importance in neurogenesis // Morphology. 2007. Vol. 131, No. 2. P. 16–28.
7. Kalinichenko S.G., Schava S.P., Matveeva N.Yu. Angiogenic and cytoprotective influence of basic fibroblast growth factor in the focus of experimental cerebral ischemia // Pacific Medical Journal. 2009. No. 2. P. 66–69.
8. Serov V.V. From cellular Virchow pathology to molecular pathology today // Archive of Pathology. 2001. No. 1. P. 3–6.
9. Filippova N.A., Kaminskaya L.Yu., Mikhalenkova I.V. Products of NO-synthase activity and airway inflammation: pathophysiological role in allergic diseases // Clinical and Laboratory Diagnostics. 2006. No. 8. P. 3–9.
10. Shekhter A.B., Serov V.V. Inflammation, regeneration and adaptive de-regeneration (analysis of cell-cell interactions) // Archive of Pathology. 1991. No. 7. P. 7–14.
11. Abba A.A. Exhaled nitric oxide in diagnosis and management of respiratory diseases // Ann. Thorac. Med. 2009. Vol. 4, No. 4. P. 173–181.
12. Aravamudhan A., Ramos D.M., Nip J. [et al.]. Osteoinductive small molecules: growth factor alternatives for bone tissue engineering // Curr. Pharm. Des. 2013. Vol. 19, No. 19. P. 3420–3428.
13. Crosswhite P., Sun Z. Nitric oxide, oxidative stress and inflammation in pulmonary arterial hypertension // J. Hypertens. 2010. Vol. 28, No. 2. P. 201–212.
14. Degano B., Génestal M., Serrano E. [et al.]. Effect of treatment on maxillary sinus and nasal nitric oxide concentrations in patients with nosocomial maxillary sinusitis // Chest. 2005. Vol. 128, No. 3. P. 1699–1705.
15. Dubikov A.I., Kalinichenko S.G. Small molecules regulating apoptosis in the synovium in rheumatoid arthritis // Scand. J. Rheumatol. 2010. Vol. 39, No. 5. P. 368–372.
16. Gardner O.F., Alini M., Stoddart M.J. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Bone Marrow // Methods Mol. Biol. 2015. Vol. 1340. P. 41–52.
17. Khoury M.P., Bourdon J.C. P53 isoforms: an intracellular microprocessor? // Genes Cancer. 2011. Vol. 2, No. 4. P. 453–465.
18. Landis B.N., Lacroix J.S. Olfactory function and nasal nitric oxide // Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg. 2009. Vol. 17, No. 1. P. 18–22.
19. Lo K.W., Ashe K.M., Kan H.M., Laurencin C.T. The role of small molecules in musculoskeletal regeneration // Regen. Med. 2012. Vol. 7, No. 4. P. 535–549.
20. Perecko T., Drabikova K., Rackova L. [et al.]. Molecular targets of the natural antioxidant pterostilbene: effect on protein kinase C, caspase-3 and apoptosis in human neutrophils *in vitro* // Neuroendocrinol. Lett. 2010. Vol. 28. P. 34–38.
21. Petruson K., Stalfors J., Jacobsson K.E. [et al.]. Nitric oxide production in the sphenoidal sinus by the inducible and constitutive isozymes of nitric oxide synthase // Rhinology. 2005. Vol. 43, No. 1. P. 18–23.
22. Raap U., Kapp A. Neurotrophins in healthy and diseased skin // G. Ital. Dermatol. Venereol. 2010. Vol. 145, No. 2. P. 205–211.
23. Serrano C., Valero A., Picado C. Nasal nitric oxide // Arch Bronconeumol. 2004. Vol. 40, No. 5. P. 222–230.
24. Torretta S., Bossi A., Capaccio P. [et al.]. Nasal nitric oxide in children with adenoidal hypertrophy: a preliminary study // Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. 2010. Vol. 74, No. 6. P. 689–693.
25. Tzeng S.F., Huang H.Y. Downregulation of inducible nitric oxide synthetase by neurotrophin-3 in microglia // J. Cell Biochem. 2003. Vol. 90, No. 2. P. 227–233.
26. Van Delft M.F., Huang D.C. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis // Cell Res. 2006. Vol. 16. P. 203–213.

Поступила в редакцию 27.10.2015.

Клеточно-молекулярные аспекты посттравматической регенерации слизистой оболочки околоносовых пазух

С.С. Едранов

Тихоокеанский государственный медицинский университет (6900950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Резюме. Репаративная регенерация представляет собой процесс восстановления утраченных клеток и их взаимосвязей с ближайшим микроокружением. В статье приведен анализ данных литературы и собственных исследований автора по регенераторному потенциалу травмированной слизистой оболочки верхнечелюстного синуса у человека и животных. Рассмотрены регуляторные механизмы репаративной регенерации, а также значение оксида азота и других трофических факторов в поддержании цитопротективных эффектов вторичных мессенджеров. Подчеркивается ведущее значение оксида азота в потенциации апоптоза поврежденных и новообразованных клеток слизистой оболочки, а также обобщены данные по фармакологической коррекции этого воздействия.

Ключевые слова: оксид азота, индуцибельная нитрооксидсинтаза, апоптоз, верхнечелюстной синус

УДК 611.8:611.1.018.74. DOI 10.17238/1609-1175.2016.2.72

РЕГУЛЯТОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КАПИЛЛЯРОВ МОЗГА

В.М. Черток, А.Г. Черток

Тихоокеанский государственный медицинский университет (690650, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Ключевые слова: микроциркуляция, нейроны, сосудистый эндотелий, газотрансмиттеры.

REGULATORY CAPACITY OF THE BRAIN CAPILLARIES

V.M. Chertok, A.G. Chertok

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

Summary. The review provides the material evidence of the active role of capillaries in the circulatory regulation. The endothelium plays an important role in the blood-brain barrier permeability primarily by the release of chemical messengers that influence both on endothelial cells, pericytes and astroglia, and noncellular components on capillaries. The mechanisms that regulate the dynamic balance between these components are diverse, complex and not fully understood, but it is already clear that they all have the potential to participate in the management functions of the capillaries.

Keywords: microcirculation, neurons, vascular endothelium, gas-transmitters.

Pacific Medical Journal, 2016, No. 2, p. 72–81.

За последние 10–15 лет взгляды на функциональные свойства сосудистого эндотелия кардинально изменились. По современным представлениям, этот монослой клеток играет ведущую роль в управлении вазомоторикой [9, 10, 29, 48]. Он участвует в регуляции тонуса и проницаемости сосудов, модулирует гемостаз и контролирует рост во многом за счет освобождения сильных вазоактивных веществ, включая синтезируемые эндотелием релаксирующие факторы (простациклин, оксид азота, аденомодулин, С-пептид) и факторы констрикции (эндотелин, эндопероксиды, тромбоксан А₂, простагландин F_{2a} и др.), которые действуют аутокринно и/или паракринно на эндотелиальные клетки и миоциты. Иначе говоря, выдвинутая нами около трех десятков лет назад гипотеза о решающем вкладе эндотелиального (интимального) механизма в регуляцию функций сосудов, получает новые доказательства [9, 29].

Эндотелий сосудов постоянно приспосабливается к меняющимся условиям гемодинамики, обновляется. Пока эндотелий не поврежден, он синтезирует главным образом факторы противосвертывания, являющиеся также вазодилататорами [4, 12]. Эти биологически активные вещества препятствуют росту гладких мышц, поэтому стенка сосуда не утолщается, и его диаметр не увеличивается. Сочетание в эндотелии антикоагулянтов и вазодилататоров в физиологических условиях способствует поддержанию адекватного кровотока, особенно в микроциркуляторном русле. Отжившие фрагменты эндотелия вместе с биологически активными веществами попадают в кровь, разносятся по всему организму и могут воздействовать на системный кровоток.

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

Сосудистый эндотелий разных органов неоднороден ни по своей структуре, ни по генной или биохимической организации. Эндотелиальное древо церебральных, коронарных, почечных, яичниковых или маточных сосудов, хотя и схоже анатомически, но отличается набором ферментов, белков-предшественников, типами рецепторов, транзиттеров [11, 16, 23, 30], что объясняет различную чувствительность этих сосудов к одним и тем же воздействиям [4, 17, 31–33, 35, 36].

Организация капиллярной сети мозга

Строение цереброваскулярной системы максимально приспособлено для своевременной доставки питательных веществ к нейронам и удалению продуктов их обмена [3, 9, 10, 19]. Однако значение эндотелия резистивных, обменных и емкостных сосудов в обеспечении трофического гомеостаза мозга неодинаково. Безусловно, центральное место в реализации этой функции занимают капилляры, поскольку итогом адекватной работы сосудистой системы любого органа является нормальный обмен веществ. Тем не менее капиллярное русло мозга оказалось исследованным слабее всего, что, вероятно, связано с труднодоступностью данного объекта и ограниченностью применяемых для его изучения методик.

Впервые капиллярную сеть мозга в 30-х годах прошлого века выявил А. Пфайфер с помощью инъекционного метода. Он отверг существовавшее ранее представление о конечных артериях для мозга, продемонстрировав наличие непрерывной сосудистой сети. Не были обнаружены в мозге и артерио-венозные анастомозы, поэтому единственным связующим звеном между артериальной и венозной системами признаны капилляры. В связи с этим особенно важное значение для мозга приобретает еще одна функция капилляров – микроциркуляторная, связанная с транспортировкой крови из артериального русла в венозное [9, 35, 38]. Кроме того, в мозге не выявлены закрытые капилляры, а основным видом нефункционирующих микрососудов признаются их плазматические формы. Это объясняется тем, что при работе мозга всегда может возникнуть необходимость внезапного увеличения локального кровотока, а раскрытие нефункционирующих капилляров замедлило бы этот процесс.

Капилляры теснее, чем сосуды другого типа, связаны с работой мозга, что выражается в различном устройстве капиллярных сетей не только в белом и сером веществе, но и в отдельных слоях коры полушарий большого мозга [8, 9, 23]. Во многом неравномерностью кровотока объясняется многообразие сосудистого

рисунка даже в небольших, зачастую расположенных рядом, участках мозга. Чем интенсивнее обмен в ткани, тем гуще располагаются капилляры, что выражается в высокой плотности сосудистой сети и малых размерах ее петель [9, 42]. Локальные изменения мозговой гемодинамики могут быть вызваны местным воздействием некоторых химических веществ, фотостимуляцией, двигательной нагрузкой, различными видами психической деятельности [3, 9, 23, 35]. И во всех случаях специфическая работа нейронов сопровождается соответствующими перестройками сосудистой сети и нейро-капиллярных отношений, что гарантирует единство трофики и функции.

Размеры капиллярных петель, рассчитанные по средней площади, дают интересную информацию о преобразованиях капиллярного русла мозга в онтогенезе: наиболее мелкие ячейки соответствуют возрасту 20–40 лет, широкие – плодам и людям после 60 лет [9]. В капиллярных петлях располагается разное количество нейронов. У плодов и стариков один капилляр обеспечивает трофику 5–7 нервных клеток, близких по микроанатомической структуре, у взрослых людей замкнутые петли капилляров обычно включают от одного до трех нейронов. В перинеурональном пространстве одной клетки IV слоя зрительной коры человека нередко находятся 2–3 капилляра, а в ее I и VI слоях один капилляр обслуживает до 3–5 нейронов [6, 42]. Чем ближе к нервной клетке расположен капилляр, тем лучше условия обмена. Наибольшее расстояние от нервной клетки до кровоснабжающих их капилляров не превышает 25 мкм. Экспериментально установлено, что капилляры, находящиеся за пределами этого расстояния, к васкуляризации данной клетки отношения не имеют [9, 23]. Интересно, что именно в пределах этой зоны отмечается эффективное кровоснабжение структурных элементов и в таких, казалось бы, далеких от мозга по строению и функции органах, как сердце, яичник, матка и скелетные мышцы [4, 7, 31, 36, 37, 40].

Ультраструктура стенки капилляров мозга

В литературе неоднократно обсуждался вопрос об органной специализации кровеносных капилляров [4, 7, 16, 17, 36]. По ультраструктурным признакам капилляры большинства отделов мозга относят к типу 1Аβ [44], т.е. их эндотелий не имеет фенестр, окружен перичеситами, заключенными в непрерывную и довольно толстую (40–80 нм) трехслойную базальную мембрану (рис. 1, а, б). Для эндотелиоцитов характерно наличие немногочисленных органелл, за исключением митохондрий, которые в этих клетках встречаются чаще других внутриклеточных мембранных структур. Митохондрии относительно крупные (0,2–0,6 мкм) с умеренно плотным гомогенным матриксом и короткими кристами. Пиноцитозные пузырьки, вакуоли и микровыросты на поверхности клеток встречаются редко. Небольшая подвижность эндотелиальных клеток в составе пласта находит отражение и в организации межклеточных соединений (рис. 1, в, г). Они не отличаются разнообразием:

контактируют в основном своими боковыми поверхностями или способом наложения периферических отростков клеток друг на друга, на которых формируются специализированные структуры типа *zonula occludens* (ZO). Отличительной особенностью таких соединений служит наличие протяженных участков слияний наружных слоев цитомембран смежных клеток, которые в эндотелии капилляров мозга, как правило, проходят через всю область контакта [8, 19, 22].

Плотные контакты (*tight junction*) обеспечивают высокую прочность соединения клеток в составе пласта и высокие барьерные свойства эндотелия. На криофрактограммах области плотных контактов видны внутримембранные глобулы, имеющие вид «гребешков» диаметром около 10 нм, расположенные в виде цепочки на А-поверхности плазмалеммы, тогда как на В-поверхности находятся комплементарные им бороздки [7, 16].

Согласно последним данным, в состав плотных контактов входят белки семейства окклюдина и клаудинов 3, 5 и 11 [54, 59, 61]. При этом наибольшая экспрессия окклюдина отмечена в эндотелии мозговых капилляров и сетчатки, что предполагает их участие в реализации барьерной функции [54, 55, 58]. При патологических состояниях (гипоксия, гипер- и гипогликемия), которые сопровождаются повышенной проницаемостью эндотелия, экспрессия окклюдина снижена [53, 55, 63]. При повышении проницаемости гематоэнцефалического барьера отмечен дефицит клаудина-5 [60, 68]. Окклюдина и клаудина имеют четыре трансмембранных участка, а их внеклеточные домены образуют две петли, соединяющие соседние эндотелиоциты [41, 57]. Окклюдина и клаудина являются трансмембранными белками, которые пронизывают плазматическую мембрану эндотелиоцитов и присутствуют как на внешней, так и на внутренней ее сторонах. Внеклеточные домены этих белков взаимодействуют с такими же доменами на другой эндотелиальной клетке, обеспечивая плотное соединение плазматических мембран, а внутриклеточные домены взаимодействуют с белками семейства ZO. Белки ZO имеют участки для ряда сигнальных и актин-связывающих белков. Они служат центром сборки мультибелковых комплексов на цитоплазматической стороне плотных контактов, посредством которых они соединяются с актиновыми филаментами и интегрируются с цитоскелетом [59, 61].

С люминальной поверхностью эндотелия тесно связан тонкий слой макромолекул, получивший название гликокаликс. Он выполняет функцию молекулярного фильтра и хорошо различим при использовании специальных методов окраски для электронной микроскопии [4, 7, 16, 65]. Толщина слоя непосредственно закрепленных на мембране компонентов гликокаликса составляет около 70 нм. Однако его размеры непостоянны и во многом зависят от функционального состояния сосудов. Гликокаликс довольно устойчив к реологическим сдвигам, но разрушается под действием некоторых энзимов и цитокинов, циркулирующих в крови при воспалении [59, 62, 65].

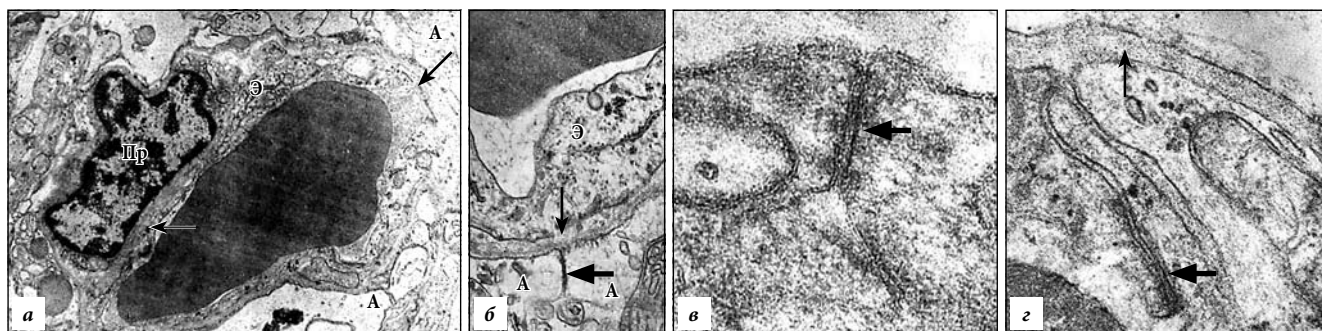


Рис. 1. Ультраструктура стенки капилляра:

а – эндотелиоцит с подстилающей его базальной мембраной, в дубликатуру которой располагается перицит и ножки астроцитов; б, в – межэндотелиальные соединения, д – соединение астроцитов; А – астроцит, Пр – перицит, Э – эндотелиоцит, тонкие стрелки – базальные мембраны, толстые стрелки – соединения клеток. Электронограммы; а – $\times 30\,000$, б, з – $\times 80\,000$, в – $\times 120\,000$.

Помимо гликокаликса с эндотелием функционально связан так называемый «эндотелиальный поверхностный слой», состоящий из адсорбированных компонентов плазмы – протеинов, гликозаминогликанов гликопротеидов и гиалуроновой кислоты [61]. Эндотелиальный поверхностный слой очень лабилен и может быть смыт различными плазмозамещающими жидкостями. Наличие этого слоя существенно влияет на гемокрит и гидравлическое сопротивление микрососудов, а также защищает эритроциты от чрезмерных деформаций при прохождении их через наиболее узкие участки капиллярной сети [4, 61].

Снаружи от базальной мембраны капилляров располагается сплошной футляр из астроцитов (рис. 1, а, г). Их отростки лежат довольно плотно друг к другу, нередко образуя плотные или адгезивные соединения. В цитоплазме астроцитов обнаружены микровезикулы и некоторые ферменты, связанные с массопереносом, что указывает на участие этих клеток в транспорте веществ между капиллярами и нейронами. Отмеченные выше особенности строения капилляры мозга приобретают к концу второй половины беременности и окончательно формируются в первые годы после рождения [8, 19, 21]. На ранних этапах развития эндотелий содержит большое количество органелл, пиноцитозных пузырьков и вакуолей. На люминальной и базальной поверхностях клеток постоянно встречаются микровыросты, а в образовании межэндотелиальных соединений нередко принимают участие щелевые контакты, которые в отличие от ZO, осуществляют в эндотелиальном пласте в основном коммуникативную функцию [7, 48, 57].

Базальная мембрана у плодов первой половины беременности образована узким слоем тончайших фибрилл, расположенных в осмиофильном матриксе. Часто базальная мембрана прерывается, и тогда перициты, плотно прилегая к эндотелию капилляров, формируют вокруг них подобие муфт. Перикапиллярные ножки астроцитов, напротив, в этот период отделены друг от друга и сплошного слоя не образуют.

Топохимия транспортных ферментов капилляров мозга

Углубленное понимание механизмов обменной и барьерной функций капиллярной стенки стало возможным

во многом благодаря успешному применению энзимологических методов, связанных с визуализацией ферментов, обеспечивающих трансмембранный транспорт молекул (рис. 2).

Хорошо известно, что активный транспорт требует значительных энергетических затрат, и это объясняет наличие в клетке большого количества активных митохондрий и окислительных ферментов. В эндотелии капилляров мозга выявлена обширная группа ферментов, однако лишь часть из них напрямую связана с обеспечением функций энзимологических барьеров. Например, ацетилхолинэстераза, локализованная в стенке этих сосудов, не относится к числу транспортных энзимов. Она способствует быстрому распространению трансмембранного потенциала вдоль эндотелиального пласта, обеспечивая координированные реакции входящим в его состав клеткам [47], тогда как L-DOPA не может попасть в мозг, поскольку ферменты, участвующие в его метаболизме, имеются в эндотелии капилляров [9, 45]. Щелочная фосфатаза способствует транспортировке фосфора через эндотелий, а также обеспечивает фосфорно-кальциевый гомеостаз в капиллярах [66]. Гистохимическими методами этот фермент определяется в микрососудах многих областей мозга, а неодинаковая плотность выпавшего осадка на отрезках сосудистого русла, свидетельствует о различной интенсивности перемещения через эндотелий соответствующих молекул (рис. 2, а). Имеются данные о локальных, видовых и возрастных особенностях распределения щелочной фосфатазы в капиллярной сети мозга [9, 21–23, 35], сердца, яичников, матки в норме и при экспериментальных воздействиях [17, 30, 31, 36, 37, 40]. Надежный и неприхотливый, этот метод селективно выявляет капилляры и дает их контрастное изображение, что позволяет проводить морфометрические измерения автоматизированными системами анализа изображений [1].

Тем не менее одним из основных энзимов активного транспорта признается аденозинтрифосфатаза (АТФаза). Выделено несколько видов АТФаз: Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^{+} , H^{+} , K^{+} и т.д. Они работают как симпортные или антипортные молекулярные транспортеры, обеспечивая перемещение соответствующих ионов через мембрану клеток против градиента концентрации

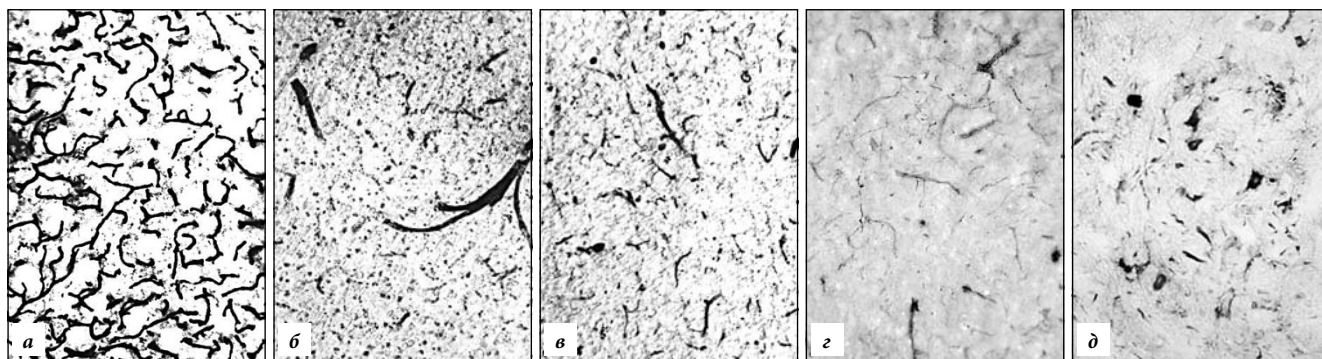


Рис. 2. Капиллярное русло мозга при разных методах выявления:

а – щелочная фосфатаза, б – Mg^{2+} -АТФаза, в – Na^+, K^+ -АТФаза, г – нитроксидсинтаза, д – цистатионин- β -синтаза; $\times 140$.

[18, 20, 38]. Немаловажная роль в этих процессах отводится потенциал-зависимым (K^+ , Ca^{2+}) и рецептор-управляемым ионным каналам мембраны, которые обеспечивают селективное поступление в цитозоль определенных типов ионов. Несмотря на то, что транспортные АТФазы имеют разную специализацию, все они встроены в мембрану клеток, являются представителями гетеродимерных АТФаз L- и Р-типов и схожи между собой строением и механизмом действия.

Модифицируя известные прописи биохимических методов определения Mg^{2+} -, Ca^{2+} - и Na^+, K^+ -АТФаз, нам удалось визуализировать соответствующие типы энзимопозитивных капилляров мозга у человека и нескольких видов лабораторных животных [9, 18, 20]. Во всех этих случаях капилляры выявлялись в виде коротких, порой разветвленных трубочек с весьма четкими контурами (рис. 2, б, в). Однако количественные исследования доказали наличие выраженных отличий в значениях суммарной длины, площади обменной поверхности, активности ферментов в капиллярах, выявленных каждым из указанных выше методов. Исследованные ферменты имеют собственную шкалу возрастных, локальных и видовых изменений капиллярного русла мозга, что предполагает наличие в этих случаях определенных особенностей ионных транслокаций [20, 21, 38].

Электронноцитохимические исследования демонстрируют разную локализацию маркеров АТФаз в стенке капилляра [9]. Гранулы преципитата при реакции на Ca^{2+} -АТФазу откладываются преимущественно в пиноцитозных пузырьках люминальной, реже базальной поверхности, и в цитоплазме эндотелиоцитов, а также в гранулярной эндоплазматической сети и митохондриях. Mg^{2+} -АТФаза имеет более разнообразную локализацию: люминальная и, в большей степени, базальная поверхность клеток, гранулярная эндоплазматическая сеть, пластинчатый комплекс, митохондрии, ядро и ядрышко, пиноцитозные пузырьки и вакуоли. Электронноплотные свидетели активности обоих ферментов также обильно представлены в базальной мембране и в виде мелких гранул – в перикаплярных ножках астроцитов.

Маркеры Na^+, K^+ -АТФазы выявляются в основном на базальной поверхности плазмалеммы эндотелиоцитов и в мембранных структурах отростков астроцитов,

контактирующих с базальной мембраной капилляров. По современным представлениям, этот фермент участвует в организации ионного натрий-калиевого насоса, разнося по разным поверхностям цитомембраны Na^+ и K^+ , т.е. является типичным антипортным транспортером, который использует встречный транспорт двух веществ с разной потенциальной энергией диффузии. Специфика функциональной активности этого фермента в поддержании ионного гомеостаза позволяет рассматривать Na^+, K^+ -АТФазу в качестве истинного маркера проницаемости гематоэнцефалического барьера. При этом Na^+, K^+ -АТФаза, как и всякая другая, для своей транспортной активности получает энергию путем расщепления аденозинтрифосфата.

Несомненное достижение последних лет – выявление в структурах мозга нового класса биологических посредников – газотрансмиттеров (NO , CO , H_2S) – и расшифровка механизмов их вазоактивного действия. Несмотря на существующие различия химической природы, мишеней и механизмов действия, все они присутствуют в сосудах и активизируются при увеличении внутриклеточной концентрации Ca^{2+} (за исключением индуцибельной формы нитроксидсинтазы). Газотрансмиттеры свободно проникают в соседние клетки через плазматические и внутриклеточные мембраны, диффундируют к гладким миоцитам по градиенту парциального давления, вызывая их расслабление и вазодилатацию [29, 32, 46].

Неоднократно отмечалось, что наиболее выраженное действие газотрансмиттеры оказывают на пиллярные артерии [29, 32, 33]. Однако визуализация ферментов, участвующих в образовании этих веществ, связана с серьезными трудностями, поэтому топочимия газотрансмиттеров в сосудах разного типа изучена весьма слабо, а в отношении капилляров мозга такие данные единичны [27, 28, 34]. Иммулокализация ферментов, участвующих в обмене NO , H_2S и CO , установлена нами в пиллярных и внутримозговых сосудах различного типа, включая капилляры (рис. 2, г, д). Принадлежность к тому или иному газотрансмиттеру определяет интенсивность ферментативной реакции в стенке сосудов. При повышении функциональной нагрузки нейронов и при сосудистой патологии эти различия особенно очевидны [26, 28, 29]. Изменения NO -синтезирующих

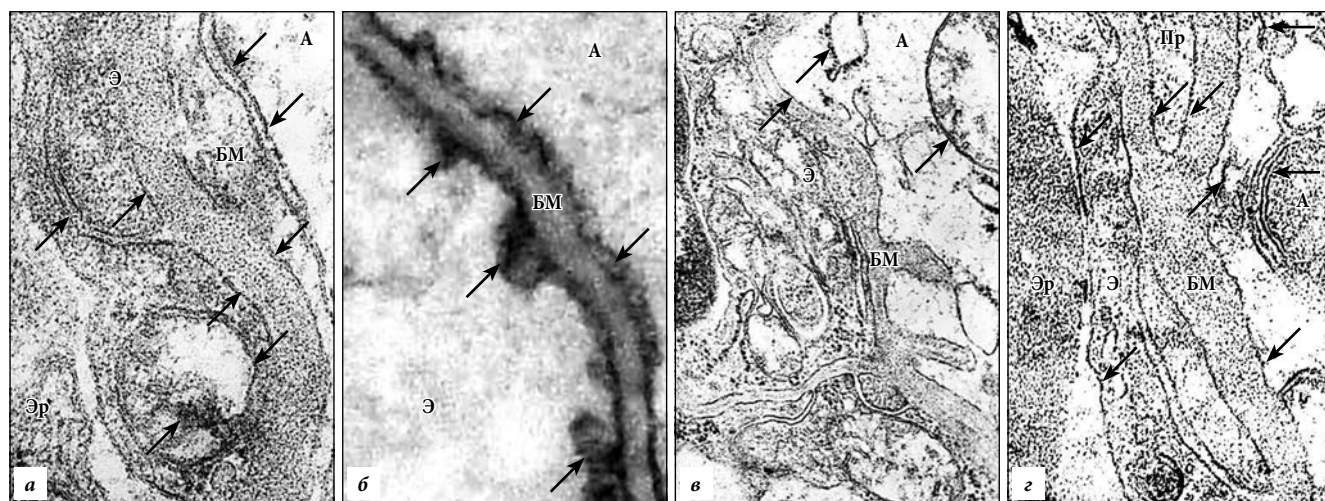


Рис. 3. Ультраструктурная локализация маркеров (стрелки) эндотелиальной нитрооксидсинтазы (а), цистатионин-β-синтазы (б), гемоксигеназы-2 (в, г) в стенке капилляров:

А – астроглия, БМ – базальная мембрана, Пр – перицит, Э – эндотелиоцит, Эр – эритроцит. Электронная цитохимия с дополнительным контрастированием уранилацетатом (а, в, г) и без дополнительного контрастирования (б); а, в, г – $\times 60\,000$, б – $\times 100\,000$.

ферментов в сосудистой стенке обычно наступают раньше и проявляются в большей степени, чем энзимов, участвующих в обмене CO и H_2S . Заметим, что из двух цитозольных пиридоксаль-5'-фосфат-зависимых ферментов, с помощью которых происходит ферментативный синтез сероводорода в клетках, в капиллярах мозга нами выявлена только цистатионин-β-синтаза. Ранее она была описана в нейронах и макроглии, тогда как цистатионин-γ-лиаза, деятельность которой обычно связывают с миоцитами сосудов [27, 28, 29, 46], в капиллярах мозга нами не обнаружена.

С помощью электронноцитохимических исследований установлены особенности локализации в стенке капилляров мозга маркеров эндотелиальной нитрооксидсинтазы, цистатионин-β-синтазы и гемоксигеназы-2, участвующих в образовании соответственно: NO, H_2S и CO (рис. 3, а–в).

При реакции на нитрооксидсинтазу гранулы преципитата откладываются в эндотелиальных клетках и астроцитах на поверхности плазмалеммы, в прикрепленных к ней пиноцитозных пузырьках, а также в митохондриальной мембране и эндоплазматической сети (рис. 3, а, б). Имеются данные, что в плазматической мембране эндотелиоцитов эта синтаза ассоциирована с caveолином [64]. В таком состоянии ее активность очень низка, но под влиянием ряда рецептор-зависимых стимулов (ацетилхолин, брадикинин, гистамин и др.), способствующих вытеснению энзима из комплекса caveолин-нитрооксидсинтаза и повышающих концентрацию кальция в эндотелиоцитах, происходит высвобождение эндотелиальной нитрооксидсинтазы из плазматической мембраны, ее активация кальций-кальмодулином, окисление L-аргинина и синтез небольших количеств оксида азота.

Маркеры цистатионин-β-синтазы откладываются преимущественно во внутриклеточных мембранных структурах – эндоплазматической сети и митохондриях эндотелиоцитов и астроцитов (рис. 3, в). Известно,

что H_2S быстро окисляется до тиосульфата, главным образом в митохондриях, который далее преобразуется в сульфит и сульфат. Основной путь окисления H_2S до тиосульфата происходит неферментативно и связан с электрон-транспортной цепью в митохондриях [46].

При реакции на гемоксигеназу гранулы локализуются на поверхности плазмалеммы клеток, в эндоплазматической сети, митохондриях, ядре эндотелиоцитов и астроцитов (рис. 3, г). Известно, что в интактных сосудах мозга увеличение внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} иономицином или активация протеинкиназы C фторболовыми эфирами усиливает CO-сигнал за счет повышения доступности гема [29, 46].

Молекулярные механизмы регуляции избирательного обмена гематоэнцефалического барьера

Еще не так давно господствовало представление, что функции капилляров обеспечиваются регуляторными механизмами пияльных или внутримозговых артерий, а через них путем изменения гемодинамических условий, оказывается влияние на капиллярное русло, приводя его в соответствие с работой мозга. Наличие активного эндотелия, мышечных клеток, развитой системы афферентной и эфферентной иннервации, способных регулировать тонус церебральных артерий при изменении функциональной активности мозга, создавало необходимый фундамент для признания состоятельности данной концепции [3, 5, 24, 25, 39, 48, 49].

В последние годы появляется все больше фактов, позволяющих считать, что капилляр – относительно «самостоятельная фигура», способная обеспечить регуляцию одной наиболее важной своей функции – избирательного обмена. Несомненно, главную роль в этом процессе играет эндотелий, однако нельзя исключать регуляторный потенциал других элементов стенки капилляра, также участвующих в формировании гематоэнцефалического барьера: базальной мембраны, перicyтов, перикапиллярной глии.

Эндотелий капилляров мозга в обычных условиях непроницаем ни для белков плазмы крови, ни для молекул диаметром больше 2 нм и относительной молекулярной массы выше 2000 кДа [16, 52, 60]. Для эндотелия характерно наличие ограниченного числа пиноцитозных везикул (кавеол) и многочисленных плотных контактов, что подтверждает представление о нем, как о структуре мало приспособленной для реализации активного трансэндотелиального обмена. Регуляция эндотелием барьерной функции действительно важный фактор поддержания тканевого гомеостаза. Нарушение этой функции является важным патогенетическим звеном многих заболеваний и патологических состояний, приводящих к ишемии и отеку мозга [53, 54, 55]. Тем не менее эндотелий церебральных капилляров представляет собой полупроницаемый барьер, регулирующий двусторонний избирательный обмен веществ между просветом сосуда и его окружением – нейронами и глией [2, 12, 56]. Барьерные свойства эндотелия, безусловно, имеют решающее значение для трофики мозга, однако считать, что регуляторный потенциал эндотелиоцитов направлен лишь на постоянное поддержание низкой проницаемости и высокой селективности барьера, было бы неверно. Эндотелий капилляров мозга представляет собой физиологически активный, динамичный и пластичный барьер, который позволяет изменять интенсивность прохождения различных веществ через него в зависимости от запросов окружающей ткани [10, 18, 38, 51].

В результате отмеченных выше особенностей организации эндотелиальной выстилки капилляров мозга наибольшее развитие получили альтернативные механизмы трансэндотелиального транспорта: диффузия, облегченная диффузия, активный транспорт [2]. Вода, мочевины и газы (O_2 , NO, CO, CO_2 , H_2S) попадают в мозг путем диффузии. Газы и летучие анестетики проникают в мозг очень быстро. Поступление воды считается активно регулируемым процессом. Селективными каналами для воды являются белки аквапорины, которые встроены в мембрану эндотелиальных клеток. В «протекающих» незрелых капиллярах с большим количеством пиноцитозных пузырьков, вакуолей, «открытых» межэндотелиальных контактов и тонкой неоформленной базальной мембраной, наблюдается высокий уровень экспрессии аквапорина-1 [67]. Аквапоринам придается большое значение в развитии отека мозга. Как и другие мембранные каналы, аквапорины могут регулироваться эндотелием путем: 1) изменения уровня экспрессии их генов; 2) изменения плотности каналов на мембране; 3) воротного механизма, контролирующего открытое/закрытое состояние канала; 4) изменения величины проницаемости открытого канала.

Облегченная диффузия (опосредованный транспорт) некоторых аминокислот и большинства ионов осуществляется с помощью белков-переносчиков, которые транспортируют их через цитомембрану также без затраты энергии. К этой же группе относятся глюкозные транспортеры (GLUT 1 и 3). Эти белки

образуют гидрофильные трансмембранные каналы, которые обеспечивают постоянный приток глюкозы к нервным и глиальным клеткам [2].

Активный транспорт водорастворимых веществ осуществляется с помощью специальных белковых транспортных структур – транспортеров. В отличие от диффузии, он требует энергетических ресурсов, получаемых в результате использования энергии расщепления аденозинтрифосфата. Разные молекулярные транспортеры АТФазы, расщепляя аденозинтрифосфат, обеспечивают перемещение соответствующих ионов через мембрану против градиента концентрации [18, 20, 59].

Основным механизмом перемещения молекул через стенку капилляра служит трансэндотелиальный транспорт. При его блокаде происходит компенсаторное увеличение транспорта некоторых молекул, в частности воды и газов, через межэндотелиальные контакты, по-видимому, за счет торможения ингибирующего влияния кавеолина на эндотелиальную нитроксидсинтазу [64]. Повышенная продукция оксида азота и пероксинитрита, наблюдаемая в эндотелии при дефиците кавеолина-1, приводит к нарушению структуры контактов. Компонентами цикла оксида азота регулируется система трансцеллюлярного транспорта инсулина. Показано, что введение ингибитора нитроксидсинтазы уменьшает, а доноры оксида азота увеличивают его трансэндотелиальный транспорт [70]. Тем же путем перемещаются CCL2-хемокин и MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) [52, 68]. Транспорт MCP-1 является кавеолинзависимым и так же как аквапоринзависимый транспорт воды регулируется эндотелием. При связывании специфических рецепторов на поверхности эндотелиальных клеток кавеолинзависимый транспорт активируется. Предполагается, что этот механизм имеет особенно большое значение для транспорта MCP-1 через гематоэнцефалический барьер [68].

Однако первыми компонентами гематоэнцефалического барьера на границе кровь–ткань являются его функциональные составляющие – эндотелиальный поверхностный слой и гликокаликс. При сохранности эндотелиального поверхностного слоя поддерживается биохимическая активность эндотелия, что способствует предотвращению сосудистой дисфункции. Этот слой работает как преобразователь для запуска биохимических реакций в эндотелиоцитах и, кроме того, уменьшает функциональный просвет сосудов [61]. Неисключено, что благодаря ему в мозге нефункционирующие капилляры представлены плазматическими формами, а незакрытыми структурами, свойственными большинству других органов [7, 16, 37].

Гликокаликс эндотелиальных клеток выполняет функцию фильтра, избирательно проницаемого для различных молекул. Удаление его компонентов и уменьшение толщины приводят к выраженному повышению проницаемости сосудистой стенки и накоплению жидкости в тканях [62, 65]. Это подтверждает особую роль гликокаликса в реализации барьерной функции эндотелия. В химическом отношении он представляет собой

сложную многокомпонентную систему, состоящую из гликопротеинов, протеогликанов, гликозаминогликанов и белков, адсорбированных из плазмы [62]. Гликопротеиновый комплекс гликокаликса представлен белками трех структурных семейств – селектинов (Р- и Е-селектины), интегринов (αV , $\alpha 5$, $\alpha 2$) и иммуноглобулинов (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, PECAM-1). Из гликозаминогликанов наиболее часто в состав гликокаликса эндотелия входят гиалуроновая кислота, гепаринсульфат и хондроитинсульфат. Гиалуроновая кислота – наиболее важный компонент гликокаликса, который не связывается ковалентно с коровыми белками протеогликанов, а фиксируется посредством взаимодействия со специфическими рецепторами, такими как гликопротеин CD44, RHAMM (рецептор опосредованной гиалуронаном подвижности), CD168 и др. [65]. Протеогликаны могут быть связаны с плазмалеммой эндотелиоцитов или с отрицательно заряженными компонентами гликокаликса через катионные участки своей структуры – растворимые протеогликаны (биглукан, перлукан, декорин, версикан, мимекан и др.), что определяет активность этого слоя в обменных процессах.

Поскольку гликокаликс имеет отрицательный заряд, он непроницаем для нейтральных или отрицательно заряженных декстранов. Это обстоятельство делает гликокаликс селективным барьером, который отталкивает отрицательно заряженные макромолекулы, например альбумин, и сорбирует положительно заряженные соединения [12, 41]. Кроме того, структура гликокаликса оказывает влияние на взаимодействие клеток крови с адгезивными молекулами на мембране эндотелиоцитов, что регулирует процесс адгезии и последующей трансмиграции лейкоцитов. Известен ряд ферментов, обеспечивающих отщепление протеогликанов (синдеканов, глипиканов) и гликозаминогликанов от поверхности эндотелиальных клеток при действии различных стимулов. В частности, расщепление синдеканов и гликозаминогликанов опосредуется матриксными металлопротеазами и гепараназой [50]. В этой связи матриксные металлопротеазы фагоцитов и эндотелия рассматриваются в качестве основных эффекторов деградации компонентов гликокаликса.

Снижение селективности гликокаликса, нередко связывают с избыточной генерацией оксида азота и пероксинитрита при оксидативном и нитрозативном стрессах, сопровождающих гипоксию, ишемию/реперфузию и ряд других состояний, способствующих деградации гликозаминогликанов и протеогликанов. Высказывается предположение, что активные формы азота ($\cdot NO$, $\cdot NO_2$) и кислорода ($\cdot O_2$, $\cdot OH$ -радикал), а также пероксинитриты способны участвовать в деградации гликокаликса и нарушении проницаемости эндотелиального барьера [13]. Однако взаимосвязь между активными формами азота и кислорода, а также конкретные механизмы, участвующие в процессах активации металлопротеаз, до сих пор не ясны. Выдвинута концепция, согласно которой нарушение циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала может

быть ключевым моментом активации ряда ферментов, способных вызывать повреждения гликокаликса эндотелиальных клеток [13–15]. Эти процессы, по мнению авторов, представляют собой универсальный механизм, и могут быть реализованы не только в эндотелии, но и в нейронах, глиальных и в других клетках мозга.

Заметная роль в процессах проницаемости стенки капилляра принадлежит базальной мембране, что обусловлено наличием в ней трехмерной решетки из фибриллярных белков коллагеноподобного типа и углеводсодержащих биополимеров, способных сорбировать воду, ионы, а также образовывать обратимые связи с другими соединениями [2]. По сравнению с межтучным веществом соединительной ткани в базальной мембране содержатся более высокие концентрации оксипролина, оксипиперидина и цистеина [7, 16]. Кроме того, в ее составе определяются сиаловые кислоты, липиды и фосфолипиды. Электронноцитохимическими исследованиями в базальной мембране капилляров мозга показано наличие многих транспортеров: Mg^{2+} , Ca^{2+} и Na^+ , K^+ -АТФаз, а также щелочной фосфатазы [9, 18, 23].

Отметим еще одну важную функцию базальной мембраны – связующую. Соприкасаясь с отдельными компонентами стенки капилляра, она объединяет между собой эндотелий, перициты и перикапиллярную глию. Эндотелиальные клетки взаимодействуют с подлежащей базальной мембраной, формируя с ней множественные соединения в виде небольших бляшек – фокальных контактов [41]. Основными связующими белками этих контактов являются интегрины – гликопротеиновые гетеродимеры из α - и β -субъединиц, которые в эндотелии представлены в сочетании αV , $\alpha 5$, $\alpha 2$ с $\beta 1$ -субъединицей. Важное свойство интегринов – способность передавать информацию снаружи внутрь клетки и обратно. Интегрины соединены с актиновым цитоскелетом эндотелиоцитов, в результате чего эндотелий и базальная мембрана физически объединены в единую систему. Следовательно, специализированные фокальные контакты, расположенные по периметру эндотелиальных клеток, могут рассматриваться как еще один тип соединений, которые обеспечивают взаимодействия и селективность капилляров мозга. Сродство интегринов к внеклеточному матриксу и, соответственно, прочность прикрепления эндотелиальных клеток к нему может изменяться при молекулярных перестройках в области цитоплазматического домена белка, а механические силы, действующие на внеклеточный домен интегрина, способны активировать сигнальные белки, связанные с цитоплазматическим доменом, и запускать генерализованные реакции с участием цитоскелета [41, 61]. Нарушение интегрин-матриксных взаимодействий с помощью специфических антител и пептидов, приводит к изменению структуры контактов в эндотелии, повышению его проницаемости и развитию отека.

Эндотелий и перициты также связаны между собой при помощи контактов – плотных или адгезивных, которые чаще образуются апикальными микровыростами перицитов или базальными – эндотелиоцитов [8, 19, 22].

Большая часть перicyтов, так называемые эндотелиоформные клетки, структурно напоминает эндотелиоциты, другие – микроглиоциты (микроглиоцитарные формы). Выделяют также миоформные перicyты, которые содержат миофиламенты, сходные с сократительными нитями гладких миоцитов [69]. Активизацию миозина как в эндотелии, так и, по-видимому, в перicyтах определяет киназа легких цепей миозина, протеинкиназа и их функциональный антагонист – фосфатаза легких цепей миозина [43]. Регуляторами этого процесса могут быть NO, CO и H₂S, синтез которых, как нами было показано, может проходить в эндотелии капилляров мозга. Затем электротонически через эндотелиоперicyтарные контакты или непосредственно базальную мембрану сигнальные молекулы, достигая перicyтов, могут воздействовать на их сократительный аппарат, по аналогии с теми механизмами, которые описаны в миоцитах артерий [6, 27, 28, 48]. Уместно напомнить, что впервые идея о капиллярно-моторном механизме клеток Руже (перicyтов) была высказана еще в начале прошлого века [56], но затем была отвергнута. В последнее время возможность участия перicyтов в регуляции просвета капилляров вновь обсуждается, хотя прямых доказательств наличия соответствующих механизмов в этих клетках пока не представлено.

Помимо перicyтов базальная мембрана граничит с отростками глиальных клеток. По некоторым данным, астроциты составляют примерно 80–85% периваскулярного окружения [8, 9, 57]. При помощи специализированных контактов перикапиллярная глия объединяется в систему, способную регулировать молекулярный состав ближайшего окружения капилляров. Астроглия в этом случае представляется связующим звеном между нейронами и стенкой капилляров. Роль триггера здесь могут играть газотрансмиттеры, концентрация которых в периваскулярной среде определяется уровнем функциональной активности нейронов. Повышение этого уровня в нейронах, содержащих NO, CO и H₂S, и/или астроцитах, в которых также может индуцироваться синтез газотрансмиттеров, приводит к увеличению кровотока в области возбуждения [6, 15, 34]. Торможение нейрональной активности сопровождается сокращением кровотока: быстро и локально. В отличие от NO, время полужизни которого в среднем составляет 5 с, а расстояние диффузии – около 100 мкм, CO и H₂S стимулируют развитие длительного возбуждения с более широкой зоной воздействия. Высказывается мнение, что NO, CO и H₂S обеспечивают кальциевый гомеостаз в нейронах, регулируя его поступление в цитозоль через Ca²⁺-каналы L- и P-типов [46]. Нарушение этого процесса сопровождается разнообразными изменениями в работе нервных клеток и, прежде всего, изменениями их сигнальной функции. Сигналы завершаются при снижении концентрации газотрансмиттера, вследствие уменьшения его продукции, а также в результате реакций с внутриклеточными молекулярными компонентами или выхода их из клеток.

Заключение

Господствующую до недавнего времени концепцию о пассивной роли капилляров в регуляции кровообращения, с позиций современных знаний нельзя признать удовлетворительной. Все больше фактов свидетельствует в пользу того, что теория нейронов, как основа для объяснения работы центральной нервной системы, расширяясь и углубляясь, не может обойтись без включения в орбиту своего изучения глии и капилляров. Классический принцип «все нервное только в нейроне», постулированный еще Р. Кахалем, должен уступить такому толкованию нейронной теории, в котором было бы отражено функциональное единство нейронов и глии. Интегрируя капилляры, нейронная теория тем самым вступает в новый этап своего развития, что, несомненно, усиливает синтетическую направленность в поиске структур и механизмов, регулирующих работу мозга.

Эндотелий играет важную роль в регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера, прежде всего, через освобождение химических посредников, которые оказывают влияние, как на эндотелиальные клетки, перicyты, астроглию, так и на не клеточные компоненты капилляров. Механизмы, регулирующие динамическое равновесие между этими компонентами многообразны, сложны и не до конца изучены, но уже сейчас очевидно, что все они обладают потенциальными возможностями для участия в управлении функциями капилляров. Впрочем, насколько реализуемы такие возможности, еще предстоит выяснить.

References

1. Afanasyev A.A., Chertok V.M. Using automated image analysis system Allegro-MC to quantify biomicroscopy microvasculature // Pacific Medical Journal. 2004. No. 2. P. 82–86.
2. Bredberry M. The concept of blood-brain barrier. M.: Meditsina, 1983. 480 p.
3. Kalinichenko S.G., Matveeva N.Yu., Motavkin P.A. Morphofunctional characteristic neurovascular connections of the cerebellar cortex // Pacific Medical Journal. 2015. No. 1. P. 26–29.
4. Kozlov V.I. Capillaroscopy in clinical practice. M.: Prakticheskaya Meditsina, 2015. 232 p.
5. Kotsyuba A.E., Chertok V.M. Nitric oxide-containing elements of sensory innervation of cerebral arteries // Pacific Medical Journal. 2009. No. 2. P. 69–72.
6. Kotsyuba A.E., Beshpalova E.P., Chertok V.M. Effect of nitric oxide on microvasculature reactivity when exposed to laser // Pacific Medical Journal. 2007. No. 4. P. 44–46.
7. Kupriyanov V.V., Karaganov Ya.L., Kozlov V.I. Microvasculature. M.: Meditsina, 1975. 216 p.
8. Lomakin A.V., Chertok V.M. The development of the human brain capillaries // Journal of Neurology and Psychiatry. 1983. Vol. 82, No. 7. P. 1004–1007.
9. Motavkin P.A., Lomakin A.V., Chertok V.M. Brain capillaries. Vladivostok: DVNTS AS USSR, 1983. 140 p.
10. Motavkin P.A., Chertok V.M., Pigolkin Yu.I. Morphological studies of regulatory mechanisms of cerebral circulation // Morphology. 1982. Vol. 82, No. 6. P. 42–48.
11. Nemkov Yu.K., Chertok A.G., Chertok V.M. Changes in the capillary bed of uterine endometrium of rats during the estrous cycle (histochemical study) // Morphology. 1999. Vol. 102, No. 4. P. 56–59.
12. Ivanov A.N., Puchinyan D.M., Norkin I.A. The barrier function of the endothelium, the mechanisms of its regulation and disorders // Uspekhi fiziologicheskikh nauk. 2015. Vol. 46, No. 2. P. 87–111.

13. Reutov V.P. The cycle of nitric oxide in the mammals organism and cyclic principle // *Biochemistry*. 2002. Vol. 67, No. 3. P. 353–376.
14. Reutov V.P., Sorokina E.G., Kositsyn N.S. Problems of nitrogen oxide and cyclicism in biology and medicine // *Biology Bulletin Reviews*. 2005. No. 1. P. 41–65.
15. Samosudova N.V., Reutov V.P., Larionova N.P. [et al.]. Neuro-glial contacts formed in the cerebellum during electrical stimulation in the presence of NO-generating compound // *Morphology*. 2007. Vol. 131, No. 2. P. 53–58.
16. Vascular endothelium / edited by V.V. Kupriyanov, I.I. Bobrik, Ya.L. Karaganov. Kiev: Health, 1986. 248 p.
17. Chertok A.G., Nemkov Yu.K., Chertok V.M. Functional morphology of the capillary bloodstream of the uterus after the administration of sinestrol // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1990. No. 6. P. 605–607.
18. Chertok V.M. Identification of vessels of the dura mater using the ATPase // *Morphology*. 1981. Vol. 81, No. 12. P. 45–50.
19. Chertok V.M. The ultrastructure of the cellular elements of the human brain capillaries // *Cytology*. 1982. Vol. 24, No. 10. P. 1172–1176.
20. Chertok V.M. Histochemical characteristics of the transport ATPase in the human brain capillaries // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1984. Vol. 97, No. 3. P. 375–377.
21. Chertok V.M. Age-related changes in the human brain capillaries (histochemical study) // *Morphology*. 1985. Vol. 88, No. 2. P. 28–34.
22. Chertok V.M. Local features of intracerebral arteries ultrastructure of human fetuses // *Journal of Neurology and Psychiatry*. 1988. Vol. 88, No. 10. P. 55–58.
23. Chertok V.M., Bykov D.V. Effect of low-intensity laser radiation on the brain capillaries of rats // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1993. Vol. 115, No. 2. P. 219–221.
24. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. The receptor apparatus of cerebral vessels in hypertension // *Journal of Neurology and Psychiatry*. 2010. Vol. 110, No. 10. P. 40–47.
25. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Nitric oxide in the mechanisms of the afferent innervation of the cerebral arteries // *Cytology*. 2010. Vol. 52, No. 1. P. 24.
26. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Changes of inducible NO-synthase in pial arteries of different diameters in hypertensive rats // *Bul. Exp. Biol. Med.* 2011. Vol. 152, No. 8. P. 220–223.
27. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Features of distribution of H2S synthesizing enzyme in the wall of the cerebral arteries in rats // *Bul. Exp. Biol. Med.* 2012. Vol. 154, No. 7. P. 116–120.
28. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Immunolocalization cystathionine β -synthase and cystathionine γ -lyase in the wall of a brain artery in normal and hypertensive rats // *Reports of the Academy of Sciences*. 2012. Vol. 445, No. 5. P. 602.
29. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Endothelial (intimal) mechanism of regulation of cerebral hemodynamics: the transformation of views // *Pacific Medical Journal*. 2012. No. 2. P. 17–26.
30. Chertok V.M., Momot L.N. Microcirculatory bloodstream of an ovary of rats in norm and under laser irradiation // *Morphology*. 1998. Vol. 114, No. 5. P. 74–78.
31. Chertok V.M., Zenkina V.G., Kargalova E.P. Functional morphology of the ovary. Vladivostok: Meditsina, 2015. 152 p.
32. Chertok V.M., Kotsyuba A.E., Bepalova E.P. Features of the reaction vessels of the microvasculature of some organs on the impact of a helium-neon laser // *Pacific Medical Journal*. 2007. No. 3. P. 48–52.
33. Chertok V.M., Kotsyuba A.E., Bepalova E.P. Reaction of microvessels of organs on laser irradiation // *Morphology*. 2008. Vol. 133, No. 2. P. 150–151.
34. Chertok V.M., Kotsyuba A.E., Startseva M.S. Gaseous mediators in the regulation of functions of microvascular bloodstream // *Angiology and Vascular Surgery*. 2012. Vol. 18. P. 58–59.
35. Chertok V.M., Miroshnichenko N.V., Votkina M.V. [et al.]. Histochemical characteristics of the capillary bloodstream of the brain under the influence of low-intensity laser irradiation // *Journal of Neurology and Psychiatry*. 1993. Vol. 93, No. 5. P. 58–60.
36. Chertok V.M., Momot L.N., Kargalova E.P. Morphofunctional characteristics of the capillary bloodstream of the ovary in rats when exposed to low-intensity laser irradiation // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1998. Vol. 126, No. 7. P. 110–112.
37. Chertok V.M., Nemkov Yu.K., Mironov A.A. Uterine microvasculature of rats in norm and under the influence of laser radiation // *Morphology*. 1991. Vol. 100, No. 3. P. 35–40.
38. Chertok V.M., Pigolkin Yu.I., Miroshnichenko N.V. Histochemical features of brain capillary bloodstream of a human in aging and in atherosclerosis // *Journal of Neurology and Psychiatry*. 1984. Vol. 76, No. 7. P. 991–993.
39. Chertok V.M., Pigolkin Yu.I., Motavkin P.A. Cholinergic and adrenergic innervation of intracranial arteries in human ontogeny // *Morphology*. 1983. Vol. 84, No. 2. P. 22–29.
40. Chertok V.M., Nedobylskaya Yu.P., Nemkov Yu.K. [et al.]. Effect of laser radiation on the background of estrone on the uterine capillaries rats // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1997. Vol. 123, No. 6. P. 718–720.
41. Shirinskiy V.P. Molecular physiology and mechanisms of endothelial vascular permeability // *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 2011. Vol. 42, No. 1. P. 18–32.
42. Adams D.L., Piserchia V., Economides J.R. [et al.]. Vascular supply of the cerebral cortex is specialized for cell layers but not columns // *Cerebral Cortex*. 2015. Vol. 10. P. 3673–3681.
43. Afonso P.V., Ozden S., Prevost M.C. [et al.]. Human blood-brain barrier disruption by retroviral-infected lymphocytes: role of myosin light chain kinase in endothelial tight-junction disorganization // *J. Immunol.* 2007. Vol. 179, No. 4. P. 2576–2583.
44. Bennett H., Luft J., Hampton J. Morphological classification of vertebrate blood capillaries // *Amer. J. Physiol.* 1959. Vol. 196, No. 2. P. 381–390.
45. Bertler A., Falck B., Rosengren J. The direct demonstration of a barrier mechanism in the brain capillaries // *Acta Pharmacol. Toxicol.* 1966. Vol. 20. P. 317–321.
46. Boehning D., Snyder S.H. Novel neural modulators // *Ann. Rev. Neurosci.* 2003. Vol. 26. P. 105–131.
47. Carter T.D., Ogden D. Acetylcholine-stimulated changes of membrane potential and intracellular Ca^{2+} concentration recorded in endothelial cells in situ in the isolated rat aorta // *Pflugers Arch.* 1994. Vol. 428. P. 476–484.
48. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Age-associated characteristics of vasomotor regulation of the pia mater arteries in rats // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2010. Vol. 149, No. 3. C. 364–368.
49. Kotsyuba A.E., Chertok V.M., Kotsyuba E.P. Nitroxidergic nerve fibers of intracerebral vessels // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2010. Vol. 40, No. 4. C. 451–455.
50. Feng S., Cen J., Huang Y. [et al.]. Matrix metalloproteinase-2 and -9 secreted by leukemic cells increase the permeability of blood-brain barrier by disrupting tight junction proteins // *PLoS One*. 2011. Vol. 6, No. 8. P. e20599.
51. Fernandez-Martin L., Marcos-Ramiro B., Bigarella C.L. [et al.]. Crosstalk between reticular adherens junctions and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 regulates endothelial barrier function // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012. Vol. 32, No. 8. P. e90–102.
52. Ge S., Song L., Serwanski D.R. [et al.]. Transcellular transport of CCL2 across brain microvascular endothelial cells // *J. Neurochem.* 2008. Vol. 104, No. 5. P. 1219–1232.
53. Hyun S.W., Jung Y.S. Hypoxia induces FoxO3a-mediated dysfunction of blood-brain barrier // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. Vol. 450, No. 4. P. 1638–1642.
54. Jiao H., Wang Z., Liu Y. [et al.]. Specific role of tight junction proteins claudin-5, occludin, and ZO-1 of the blood-brain barrier in a focal cerebral ischemic insult // *J. Mol. Neurosci.* 2011. Vol. 44, No. 2. P. 130–139.
55. Koto T., Takubo K., Ishida S. [et al.]. Hypoxia disrupts the barrier function of neural blood vessels through changes in the expression of claudin-5 in endothelial cells // *Am. J. Pathol.* 2007. Vol. 170, No. 4. P. 1389–1397.

56. Krogh A. The number and distribution of capillaries in muscles the calculations of the oxygens pressure head necessary for supplying the tissue // J. Physiol. 1919. Vol. 52. P. 409.
57. Kroll S., El-Gindi J., Thanabalasundaram G. [et al.]. Control of the blood-brain barrier by glucocorticoids and the cells of the neurovascular unit // Ann. NY Acad. Sci. 2009. No. 1165. P. 228–239.
58. McCaffrey G., Staats W.D., Quigley C.A. [et al.]. Tight junctions contain oligomeric protein assembly critical for maintaining blood-brain barrier integrity in vivo // J. Neurochem. 2007. Vol. 103, No. 6. P. 2540–2555.
59. Mehta D., Malik A.B. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability // Physiol. Rev. 2006. Vol. 86, No. 1 P. 279–367.
60. Nitta T., Hata M., Gotoh S. [et al.]. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice // J. Cell. Biol. 2003. Vol. 161. P. 653–660.
61. Pries A.R., Kuebler W.M. Normal endothelium // Handb. Exp. Pharmacol. 2006. Vol. 176, No. 1. P. 1–40.
62. Reitsma S., Slaaf D.W., Vink H. [et al.]. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization // Pflugers. Arch. 2007. Vol. 454, No. 3. P. 345–359.
63. Sajja R.K., Prasad S., Cucullo L. Impact of altered glycaemia on blood-brain barrier endothelium: an in vitro study using the hC-MEC/D3 cell line // Fluids Barriers CNS. 2014. Vol. 11, No. 1. P. 8.
64. Siddiqui M.R., Komarova Y.A., Vogel S.M. [et al.]. Caveolin-1-eNOS signaling promotes p190RhoGAP-A nitration and endothelial permeability // J. Cell. Biol. 2011. Vol. 193, No. 5. P. 841–850.
65. Speziale S., Sivaloganathan S. Poroelastic theory of transcapillary flow: effects of endothelial glycocalyx deterioration // Microvasc. Res. 2009. Vol. 78, No. 3. P. 432–441.
66. Samorajski T., Mc Cloud J. Alkaline phosphomonoesterase and blood-brain permeability // Lab. Invest. 1961. No. 10. P. 492–501.
67. Song Y., Fukuda N., Bai C. [et al.]. Role of aquaporins in alveolar fluid clearance in neonatal and adult lung, and in oedema formation following acute lung injury: studies in transgenic aquaporin null mice // J. Physiol. 2000. Vol. 525, Pt 3. P. 771–779.
68. Stamatovic S.M., Keep R.F., Wang M.M. [et al.]. Caveolae-mediated internalization of occludin and claudin-5 during CCL2-induced tight junction remodeling in brain endothelial cells // J. Biol. Chem. 2009. Vol. 284, No. 28. P. 19053–19066.
69. Stensaas L.J. Pericytes and perivascular microglial cells in the basal forebrain of neonatal rabbit // Cell a. Tissue Res. 1975. Vol. 158, No. 4. P. 517–541.
70. Wang H., Wang A.X., Aylor K. [et al.]. Nitric oxide directly promotes vascular endothelial insulin transport // Diabetes. 2013. Vol. 62, No. 12. P. 4030–4042.

Поступила в редакцию 03.12.2015.

Регуляторный потенциал капилляров мозга

В.М. Черток, А.Г. Черток

Тихоокеанский государственный медицинский университет (690650, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Резюме. В обзоре представлены материалы, свидетельствующие об активной роли капилляров в регуляции кровообращения. Эндотелий играет важную роль в проницаемости гемато-энцефалического барьера, прежде всего, через освобождение химических посредников, которые оказывают влияние, как на эндотелиальные клетки, перicytes и астроглию, так и на нектоточные компоненты капилляров. Механизмы, регулирующие динамическое равновесие между этими компонентами многообразны, сложны и не до конца изучены, но уже сейчас очевидно, что все они обладают потенциальными возможностями для участия в управлении функциями капилляров.

Ключевые слова: микроциркуляция, нейроны, сосудистый эндотелий, газотрансмиситтеры.

УДК 616.831-006.6-092.81. DOI 10.17238/1609-1175.2016.2.81

Светлой памяти учителя –

профессора Павла Александровича Мотавкина – посвящается.

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ГЛИОБЛАСТОМЫ ИНДУЦИРУЮТ МИГРАЦИЮ НОРМАЛЬНЫХ СТОЛОВОВЫХ КЛЕТОК

И.С. Брюховецкий^{1,2}, И.В. Дюйзен^{1,2,4}, В.Е. Шевченко^{1,3}, Ю.С. Хотимченко^{1,2}

¹ Дальневосточный федеральный университет (690091, Владивосток, ул. Суханова, 8), ² Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (690059, Владивосток, ул. Пальчевского 17), ³ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина (115478, Москва, Каширское шоссе, 23), ⁴ Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Ключевые слова: мультиформная глиобластома, нейральные стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки, опухолевые стволовые клетки.

CANCER STEM CELLS OF GLIOBLASTOMA INDUCE THE MIGRATION OF NORMAL STEM CELLS

I.S. Bryukhovetskiy^{1,2}, I.V. Duyizen^{1,2,4}, V.E. Shevchenko^{1,3}, Yu.S. Khotimchenko^{1,2}

¹ Far Eastern Federal University, School of Biomedicine (8 Sukhanova St. Vladivostok 690091 Russian Federation), ² A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology of Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences (17 Palchevskogo St. Vladivostok 690059 Russian Federation), ³ N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center (23 Kashirskoe HW Moscow 115478 Russian Federation), ⁴ Pacific States Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690950 Russian Federation)

Background. The research objective is a comparative evaluation of abilities glioblastoma cells to attract various types of tissue-specific

stem cells (SC), as well as identifying the principal similarities and differences between normal and tumor SC.

Methods. The study had 3 stages: 1) the study of human SC migration processes to cells of malignant tumors in vitro; 2) comparison of cellular proteomes of some SC including tumor SC; 3) study of SC migration in vivo. It was used modern cellular and post-genomic technologies.

Results. Neural SC had a higher mobility as compared to the multipotent mesenchymal SC and fibroblasts. We received the data on a sufficiently high affinity tumor glioblastoma SC and normal SC. Administration of mesenchymal SC labeled with fluorochrome to animals with glioma showed that the maximum number of these cells (57,6±8,9%) was recorded in the brain.

Conclusions. The transplantation of SC is the one of the main directions in the treatment of cancer due to high capacity of a cell transplant to find the damage zone. Among all the cells of glioblastoma, tumor SC have the best ability to attract normal SC.

Брюховецкий Игорь Степанович – канд. мед. наук, заведующий лабораторией молекулярной и клеточной нейробиологии Школы биомедицины ДВФУ; e-mail: briukhovetski.iis@dvfu.ru

Critical differences of cellular proteomes allows considering the mesenchymal SC as the best tool for influencing tumor glioblastoma SC.

Keywords: glioblastoma multiforme, neural stem cells, mesenchymal stem cells, tumor stem cells.

Pacific Medical Journal, 2016, No. 2, p. 81–89.

Мультиформная глиобластома – агрессивная злокачественная опухоль головного мозга человека. Прогноз ее неблагоприятен, стандартное лечение неэффективно, медиана выживаемости больных – 6–12 месяцев. Одну из ведущих причин резистентности этой опухоли к лечению связывают с наличием в ее клеточной популяции стволовых элементов, обладающих уникальными сигнальными и морфогенными свойствами [11].

Опухолевые стволовые клетки (СК) – это особая группа клеток, обладающих максимальной независимостью от внешних сигналов. Сравнительно небольшого количества их достаточно для быстрого запуска процессов инвазивного роста и метастазирования. Клетки этого типа мультипотентны, способны к бесконечному самообновлению и обладают самой высокой пролиферативной активностью среди всех клеток глиобластомы. К особенностям опухолевых СК относятся гипоксический тип метаболизма и способность восстанавливать поврежденную ДНК [9,15].

Длительное время считалось, что появление опухолевых СК вызвано системными нарушениями контроля за пролиферацией дифференцированных клеток. Но в последние годы в качестве основного источника их происхождения рассматриваются нормальные СК. Современная концепция канцерогенеза расценивает злокачественные опухоли как генетическое заболевание ядра нормальной СК, вследствие чего ее потомки – опухолевые СК – не распознаются и не уничтожаются иммунной системой [1]. Эффективных способов уничтожать опухолевые СК в организме больного в настоящее время практически не существует, что позволяет отнести поиск решения этой проблемы к числу приоритетных направлений науки.

Одним из подходов к ее решению можно назвать создание таргетных химиопрепаратов, способных поражать отдельные мишени, свойственные данному типу клеток. Однако опухолевые СК – это исключительно гетерогенная популяция с широким спектром адаптационных возможностей, которая в ответ на любое сублетальное воздействие реагирует появлением новых, более устойчивых клонов. В работах ряда известных биологов звучит мысль, что опухолевые СК – особая форма выживания эукариотических клеток, продукт непрерывной борьбы за существование [4]. Уничтожение такой цели требует высокоточного и сверхсильного воздействия, превосходящего адаптационные возможности объекта, что возможно при появлении принципиально нового инструмента, адекватного степени сложности этих клеток.

Действенным инструментом в данной области могут стать собственные СК больного. Уже доказана их способность мигрировать в опухолевый очаг и активно взаимодействовать с клетками новообразования

[2, 3]. Предложены технологии адресной доставки лекарственных веществ, наночастиц металлов и других противоопухолевых средств с использованием миграционного потенциала СК. Разработаны методы продукции СК-специфических антител непосредственно в зоне неоплазии [7, 13]. Однако такая терапия все еще носит симптоматический характер и не нацелена на опухолевые СК. Причина создавшейся ситуации заключается в отсутствии ясного ответа на вопросы: к каким именно клеткам опухоли мигрируют СК, какова роль этого феномена в канцерогенезе, и какие именно линии СК нужно использовать для разработки и создания противоопухолевых клеточных технологий? Ответы на эти вопросы и определяют основной вектор прикладных и фундаментальных исследований в этой области.

Цель настоящей работы – сравнительная оценка способностей клеток глиобластомы привлекать различные типы тканеспецифических СК, а также выявление принципиальных сходств и отличий между нормальными и опухолевыми СК.

Материалы и методы. Работа выполнялась в три этапа: 1) изучение процессов миграции СК человека к клеткам злокачественных опухолей *in vitro*; 2) сравнение клеточных протеомов некоторых СК, в том числе опухолевых СК; 3) изучение миграции СК *in vivo*.

На первом этапе использованы опухолевые СК (CD133⁺), сепарированные из глиобластомы человека линий U87 и U251, нативные клетки данных новообразований, а также клетки линии MCF7 рака молочной железы человека и клетки линии A549 рака легкого человека. Оценивали способность данных типов опухолевых элементов индуцировать миграционную активность нейрональных и мезенхимальных СК, а также фибробластов.

Опухолевые клетки в количестве 5×10^3 вносили в культуральные вставки, закрепленные в лунках 12-луночного планшета (рис. 1). Пространство планшета заполняли нейральными, мезенхимальными СК и фибробластами в количестве 5×10^3 . Предварительно клетки были окрашены флуоресцентным маркером CellTracker Red CMTPX Dye (Molecular Probes, США). Культивирование проводили в автоматическом режиме

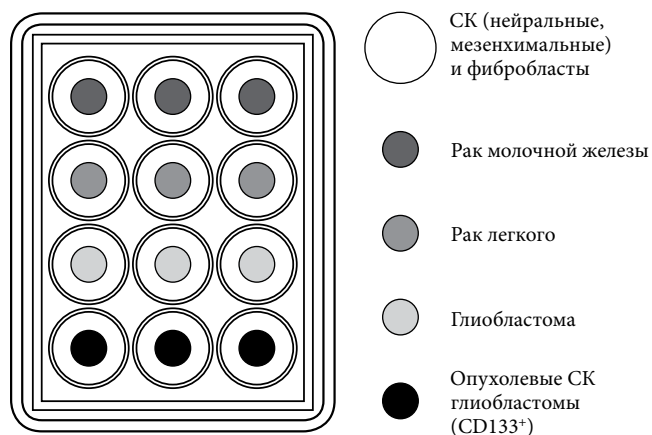


Рис. 1. Общая схема эксперимента по изучению процессов направленной миграции тканеспецифических СК.

при стандартных условиях. Подсчет числа клеток, переместившихся к стенкам культуральных вставок, выполняли с использованием системы интеллектуального мониторинга Cell IQ (CM Technologies, США) через 120 часов совместного культивирования.

В работе применялись клетки линий U87 (ATCC HTB-14) и U251 (ATCC, Manassas) глиобластомы человека, линии MCF7 (ATCC, HTB-22) аденокарциномы молочной железы человека и линии A549 (ATCC, CCL-185) рака легких человека.

Все клеточные линии культивировали при 37 °C, в атмосфере 5 % CO₂, в среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотик-антимиотик «100X» (Gibco, США). Культуральную среду обновляли каждые 72 часа. Для проведения эксперимента клетки снимали при помощи TrypLE 7 мин при 37 °C, центрифугировали при 120g 3 мин, сливали супернатант, добавляли свежей среды DMEM. Подсчет проводился в камере Горяева, жизнеспособность клеток определяли путем окрашивания 0,4 % трипановым синим.

Для выделения из линий U87 и U251 пула опухолевых СК клетки глиобластомы суспензировали в растворе диспазы/колагеназы (Roche: Dispase – 0,8 Ед./мл PBS; Collagenase – 0,1 Ед./мл PBS; инкубация 1 час при 37 °C). Инактивировали энзиматическую реакцию EDTA, центрифугировали 5 мин, при 800g. Ресуспензировали клетки в среде DMEM/F12. Культивирование осуществляли во флаконах T75 при 37 °C в 5 % CO₂. Добавление свежих ростовых факторов проводили каждые 72 часа. Прикрепившиеся клетки культивировали до достижения 80 % конfluence, пассировали из расчета 1:3. При достижении достаточного количества клеток проводили селекцию элементов иммунофенотипа CD133⁺ методом иммуносортинга (autoMACS Pro) с использованием магнитных шариков с иммобилизованными на них антителами к CD133 (Miltenyi Biotec, США). Клетки CD133⁺ культивировали в упомянутой выше среде, их чистоту проверяли проточной цитометрией с антителами к CD133 (BD Accuri C6).

Культура нейральных СК человека из обонятельного эпителия верхней носовой раковины предоставлена клиникой восстановительной и интервенционной неврологии и терапии «Нейровита». После выделения и обработки раствором диспазы/колагеназы (Roche, инкубация 1 час при 37 °C), клетки ресуспензировали в среде DMEM/F12 и культивировали до образования цитосфер, которые характеризовали по экспрессии нестина, тимоцитарного антигена-1, белка нейрофиламентов (NF200) и глиального фибриллярного кислого протеина. Методом иммуносепарации на магнитных шариках нейральные СК выделяли по маркеру клеточной поверхности CD133.

Культура мультипотентных мезенхимальных СК предоставлена клиникой восстановительной и интервенционной неврологии и терапии «Нейровита». Клетки получали из костного мозга по методу M.F. Pittenger [12]. Культуру характеризовали методом проточной

цитометрии по экспрессии основных поверхностных антигенов: CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD34⁻.

Фибробласты (ATCC PCS-420-013) культивировали в среде DMEM плюс 10 % FBS, 10 нг/мл EGF (Gibco; PHG0311), 10 нг/мл FGF-β (Gibco; PHG0023), антибиотик-антимикотик «100X». Культуральную среду заменяли на новую каждые 4 дня. Культивирование продолжали до достижения 70 % слоя конfluence. Клетки снимали при помощи ферментативной диссоциации 0,25 % раствором трипсина в течение 5 мин при 37 °C. Центрифугировали при 120g 3 мин. Оценивали жизнеспособность окрашиванием 0,4 % трипановым синим и проводили подсчет в камере Горяева (перед использованием в эксперименте обрабатывали флуоресцентным красителем).

На втором этапе для сравнительного картирования клеточных протеомов нейральных, мезенхимальных и опухолевых СК глиобластомы готовили лизаты клеточных культур. В работе использована комбинация высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. Для достижения целей эксперимента воспользовались методологией двумерного разделения триптических пептидов на катионообменной, а затем – обращено-фазовой колонке. Для оценки изменения экспрессии белков применяли метод label-free, так как он дает корректные количественные результаты для СК.

Клетки лизировали в Mammalian Cell Lysis Kit (Sigma, США). Образцы очищали от низкомолекулярных соединений, рассчитывали количество лизата, в котором содержалось 300 мкг белка, и упаривали досуха при 60 °C в вакуумном испарителе CentriVar. Проводили энзиматический гидролиз образцов и по 3 мкл растворов анализировали масс-спектрометрически для контроля трипсинолиза. По окончании реакции содержимое упаривали досуха при 60 °C, проводили разделение триптических пептидов, и полученные фракции повторно упаривали до 100 мкл при 60 °C на центрифужном испарителе Eppendorf Concentrator 5301 (Германия). Анализ триптических пептидов проводили на нанопоточном хроматографе Dionex Ultimate 3000 в сочетании с масс-спектрометром LTQ Orbitrap XL с источником ионизации. Разделение пептидов осуществляли на колонке Acclaim C18 PepMap100, снабженной предколонкой.

Для идентификации белков масс-спектры конвертировали программой Proteome Discoverer 1.0 (Thermo). Поиск белков осуществляли на локальном сервере с помощью программы Mascot Server 2.3.02 (Matrix Science, Великобритания). Идентифицированные белки сортировали по шкале MudPIT, отображая их на уровне значимости $p < 0,05$. Полученные списки идентифицированных белков вместе с хромато-масс-спектрами загружали в программу Skyline 1.2.0.3303 и получали площади пиков пептидов в каждой пробе. Затем суммировали площади всех пиков каждого белка и нормализовывали относительно полной площади всех белков, идентифицированных в пробе.

На третьем этапе оценивали миграционную активность мезенхимальных СК в организме животных с привитой глиобластомой. Эксперимент выполнен на 50 половозрелых крысах-самках породы Вистар, массой тела не более 220 г на момент начала исследования. Контрольную группу сформировали 25 животных. В основную группу вошли 25 крыс, которым в головной мозг стереотаксически имплантировали 2×10^5 клеток глиобластомы линии C6. Развитие опухоли подтверждали с помощью высокоразрешающей компьютерной томографии с контрастированием. Характеризировали центральную хвостовую вену и всем животным вводили СК окрашенные флуоресцентными трейсерами CellTracker Red CMTPX Dye и Vybrant CFDA SE (Molecular Probes). Содержание и уход за крысами, а также выведение их из эксперимента осуществлялся в соответствии с требованиями стандартов GLP и Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным. Работа одобрена комиссией по биомедицинской этике Школы биомедицины ДВФУ (протокол № 1 от 15.02.2015 г.). Клетки глиобластомы культивировали согласно общепринятому протоколу, описанному выше. Перед внесением в культуру их обрабатывали флуоресцентным красителем.

Перед началом эксперимента проведено иммуноцитохимическое типирование состава опухоли. После фиксации в 4 % параформальдегиде, промывки в растворе 0,1M PBS (pH 7,4), 0,2 % tween 20, 0,2 % triton-X100 и блокировки неспецифического связывания в 0,3 % BSA клетки инкубировали в первичных антителах, специфичных к белку p53, нестину, глияльному фибриллярному кисломu протеину, тубулину- β III, белку S100 и рецептору хемокинов 4-го типа (CXCR4). После отмычки наносили видоспецифические вторичные антитела, конъюгированные с Alexa 488 и с Alexa 633, на 2 часа при 37°C. Ядра контрастировали DAPI (Molecular Probes; D1306) и после отмычки заключали в Mowiol (Sigma-Aldrich; 324590). Контрольные образцы окрашивали без использования первичных антител.

Моделирование глиобластомы *in vivo* осуществляли с помощью внутримозговой стереотаксической имплантации (Narishige, Japan). Животных наркотизировали путем внутривенного введения смеси, содержащей золетил-100 и рометар (1:4, из расчета 10 мг/кг массы тела). В стерильных условиях рассекали мягкие ткани, в соответствии с установленными координатами микродрелью накладывали трепанационное отверстие. Клетки опухоли вводили с помощью гамильтоновского шприца в область каудопутамена по координатам атласа мозга крысы (Paxinos, 2007): Ар – 1 мм; L – 3 мм, V – 4,5 мм, TBS – 2,4 мм, скорость – 3 мкл/мин.

В данном эксперименте оценивали миграционную активность мультипотентных мезенхимальных СК, полученных из костного мозга крыс. Клетки вымывали с помощью иглы и фосфатно-солевого буфера, два раза промывали средой DMEM и центрифугировали (800g, 10 мин). Суспензию фильтровали через нейлоновый

фильтр с диаметром пор 100 мкм. Перед введением животным клетки характеризовали методом проточной цитометрии, окрашивали флуоресцентными красителями – CFDA SE (эксцизия 488 нм, эмиссия 492/517 нм) и CMTPX (эксцизия 546 нм, эмиссия 577/602 нм).

Для гистологического исследования спустя 7 и 14 дней с момента введения трансплантата крыс глубоко наркотизировали и перфузировали трансаортально 4 % забуференным параформальдегидом. Серийные срезы головного мозга толщиной 20 и 40 мкм готовили на криостатном микротоме или делали парафиновые срезы толщиной 7 мкм. Срезы окрашивали по стандартному протоколу гематоксилином и эозином и 0,1 % толуидиновым синим на 0,1M ацетатном буфере (pH 3,5). Препараты анализировали на световом и конфокальном микроскопах.

Данные иммуноцитохимического и иммуногистохимического анализа подвергали статистической обработке, используя дисперсионный анализ ANOVA, сравнение разностей средних проводили по методу Тьюки. Результаты выражали в виде средних значений и стандартной ошибки. Все статистические тесты выполнены с использованием пакета Graph Pad Prism 4.00.

Результаты исследования. Миграция стволовых клеток *in vitro*. Нейральные СК обладали большей подвижностью в сравнении с мультипотентными мезенхимальными СК и фибробластами. Миграционная активность нейральных СК зависела от типа опухолевых клеток в совместной культуре. Нейральные СК наиболее активно мигрировали к опухолевым СК двух типов глиобластомы. При этом несепарированные клетки глиобластомы обладали несколько меньшей способностью индуцировать миграцию нейральных СК, однако опухолевые клетки ненейронального происхождения в значительно меньшей степени индуцировали процессы миграции нейральных СК (рис. 2).

Мультипотентные мезенхимальные СК, несколько уступая нейральным в способности мигрировать к клеткам глиобластомы, тем не менее, активнее двигались по направлению к опухолям из клеток эктодермального происхождения. В нашем эксперименте дифференцированные фибробласты также демонстрировали способность к миграции к опухолевым клеткам различных типов, однако в значительно меньшей степени, чем нейральные и мезенхимальные СК. В целом, из всех типов опухолевых клеток наибольшим аттрактивным потенциалом для подвижных элементов обладали сепарированные CD133⁺-клетки линий U87 и U251.

По современным представлениям, опухолевые СК определяют ключевые свойства глиобластомы – терапевтическую резистентность и инвазивный потенциал. Следует отметить, что состав использованных нами культур глиобластомы весьма различался по числу опухолевых СК. Популяция CD133⁺-клеток составляла $1,3 \pm 2,8$ % от общего числа элементов линии U87 и $3,4 \pm 2,6$ % от общей популяции клеток линии U251 глиобластомы человека. В этой связи прямая зависимость между числом опухолевых СК в сочетанной

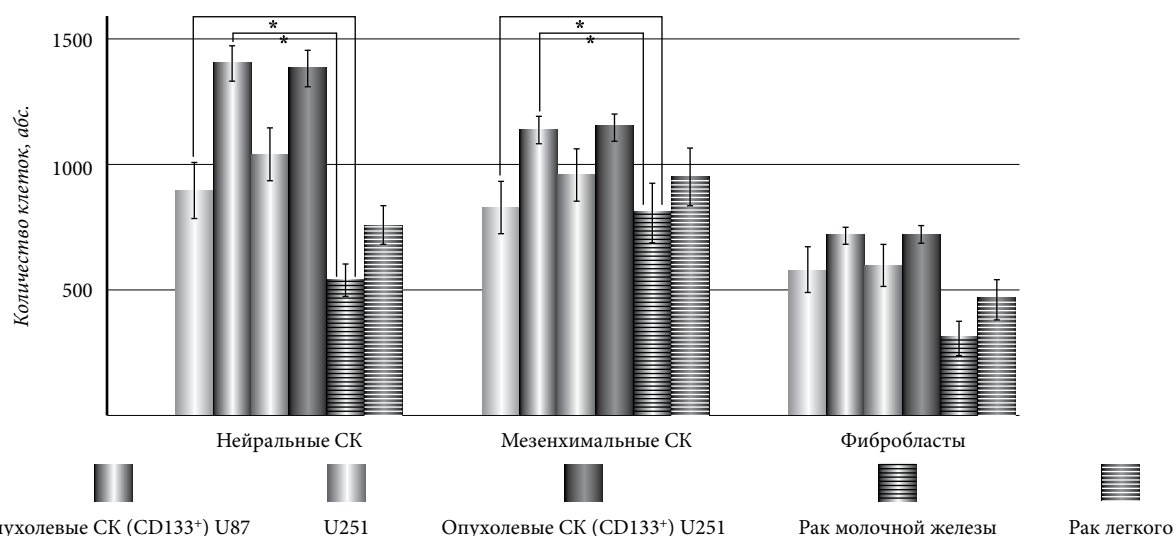


Рис. 2. Количество нейральных и мезенхимальных СК, а также дифференцированных клеток, мигрировавших через культуральную вставку в ходе 120-часового эксперимента (* $p < 0,05$).

культуре и способностью привлекать СК наводит на мысль о том, что запуск и поддержание миграционной активности к опухоли обеспечивается именно субпопуляцией СК, находящихся в ее составе.

Следует обратить внимание, что наблюдавшаяся в эксперименте относительно слабая способность культур клеток рака молочной железы и рака легкого привлекать СК не должна вводить в заблуждение. Рак молочной железы – гормонально зависимая злокачественная опухоль, которая по распространенности и масштабу летальности уступает только раку легких – заболеванию, лидирующему в статистике онкологической смертности среди лиц обоих полов. Не исключено, что способность привлекать СК определяется как молекулярным фенотипом опухоли, а также может быть связана с многочисленными пассажами данной линии *in vitro*, приводящими к потере ряда важных сигнальных механизмов.

Кроме того, обращал на себя внимание тот факт, что нейральные СК проявляли максимальную тропность в отношении опухолей нейроэпителиального происхождения и значительно уступали мезенхимальным СК в активности по отношению к опухолям иного тканевого происхождения. Можно предполагать, что вектор миграционной активности более выражен между клетками, имеющими единый гистогенетический источник и, соответственно, сходные транскриптомный и протеомный профили. В этой связи детальный анализ метаболических карт нормальных и опухолевых СК может пролить свет на вопрос об источниках онкогенетической трансформации и определить возможные мишени адресного воздействия на опухолевые СК и механизмы его реализации.

Протеомные профили нейрональных, мезенхимальных и опухолевых СК. После проведения лизиса клеток количество общего белка в лизатах составило: нейральные СК (образец 1) – 2032 ± 85 мкг/мл, опухолевые СК линии U87 (образец 2) – 2150 ± 360 мкг/мл, мультипотентные мезенхимальные СК (образец 3) – 3198 ± 281 мкг/мл.

Обработка данных высокоэффективной жидкостной хроматографии – масс-спектрометрии программой Mascot Server позволила идентифицировать 1664 белка во всех пробах. В результате обработки данных программой Skyline 3,1 были определены уровни: в образце 1 – 1447 белков по 11176 пептидам (диапазон молекулярных весов от 3,53 до 3908,10 кДа), в образце 2 – 1225 белков по 13674 пептидам (диапазон молекулярных весов от 4,60 до 3908,10 кДа), в образце 3 – 842 белков по 10932 пептидам (диапазон молекулярных весов от 5,02 до 1017,07 кДа). Динамический диапазон для идентифицированных белков составлял семь порядков, что позволило выявить низкокопийные протеины.

Далее из протеомных профилей сравниваемых групп были исключены белки, идентифицированные только в одном типе клеток. Из 1664 белков получили группу сравнения А – нейральные и опухолевые СК (1052 белка), и группу сравнения Б – мультипотентные мезенхимальные и опухолевые СК (607 белков). Результаты в группе сравнения А (63,2 % идентичных белков) отражали близость морфофункциональных фенотипов нейральных и опухолевых СК глиобластомы человека, как особого типа клеток, имеющих специфическую дифференцировку и локализацию в центральной нервной системе. В группе сравнения Б выявлено только 607 (36,5 %) идентичных белков в анализируемых протеомах.

Полученные данные позволяют сделать заключение о достаточно высоком родстве опухолевых СК глиобластомы и нормальных СК, что в значительной степени объясняет их лучшую подвижность, но не позволяет рассматривать в качестве потенциального средства терапии. При этом значительные различия протеомов опухолевых и мезенхимальных СК позволяют предположить, что эти клетки в значительно меньшей степени вовлечены в неопластический процесс в головном мозге, следовательно, в большей мере сохранили регуляторные свойства. Хорошая способность этих элементов мигрировать к опухолевым CD133⁺-клеткам

линий U87 и U251 позволяет рассматривать их как наиболее перспективный инструмент для воздействия на опухолевые СК глиобластомы. По этим соображениям оценка миграционного потенциала *in vivo* проводилась только с использованием мультипотентных мезенхимальных СК.

Миграция мультипотентных мезенхимальных СК к клеткам глиомы in vivo. *In vivo* для моделирования опухолевого процесса у животных были использованы клетки глиобластомы линии С6. Предварительный иммуноцитохимический анализ (рис. 3) позволил выявить в составе культуры $98,8 \pm 13,3\%$ клеток, позитивных к нестину и $82,3 \pm 16,4\%$ клеток, имеющих реактивность к мутантному белку р53. Часть клеток была иммунопозитивна к белку CXCR4 (53,7%), кальций-связывающему белку S100 (9,4%), глиальному фибриллярному кислом протеину (7,2%) и тубулину- β III (9,3%). Стереотаксическая имплантация клеток глиомы в мозг крыс приводила к быстрому формированию опухолей, визуализируемых методом высокоразрешающей компьютерной и магнитно-резонансной томографии.

При морфологическом исследовании, опухоль была представлена клетками разнообразной формы с различным количеством ядер. Ткань опухоли содержала многочисленные микрососуды, что свидетельствовало о высокой скорости метаболических процессов. По периферии опухолевого очага клетки глиомы вторгались в дистрофически измененную паренхиму мозга. На некотором удалении от первичного узла клетки группировались, формируя конгломераты, из которых возникали вторичные, сателлитные очаги, в центре которых формировался питающий кровеносный сосуд. С 20-го дня наблюдения в неопластической ткани начинались процессы гибели опухолевых элементов. Появление некрозов в центре опухолевого узла на некотором расстоянии от питающих кровеносных сосудов указывало на принципиальную неспособность кровеносной сети обеспечить потребности быстрорастущей ткани. Опухолевые клетки формировали плотные узловое скопления вокруг питающего кровеносного сосуда, обнаруживая характерную картину «розеол» на фоне участков некроза, занимающих основное место в морфологической картине (рис. 4).

Введение меченных флуорохромом мезенхимных СК животным с глиомой позволило определить особенности их распределения в мозге и паренхиматозных органах. Максимальное число этих СК на всех сроках наблюдения ($57,6 \pm 8,9\%$) было зафиксировано в мозге. Спустя 7 суток после введения участки флуоресценции обнаруживались в паренхиме мозга в непосредственной близости от опухоли, размеры флуоресцирующих объектов соответствовали величине трансплантированных клеток (10–20 мкм). Достигая неопластического узла, эти клетки образовывали большие скопления на границе со здоровой тканью (более 100 клеток в поле зрения) и диффузно проникали в ткань опухоли. Спустя 14 дней СК хорошо визуализировались как вдоль границ опухоли, так и в глубине новообразования (рис. 5).

Флуоресценция клеток, окрашенных CFDA SE (эксцизия 488 нм, эмиссия 492/517 нм), сохранялась дольше, чем CMTPX (эксцизия 546 нм, эмиссия 577/602 нм). В мозге животных контрольной группы (без опухоли) на 7-е сутки были обнаружены только одиночные объекты, флуоресцирующие в спектре, соответствующем ранее установленному диапазону, и совпадающие с размерами единичных клеток. Большая часть трансплантированных клеток, демонстрирующих устойчивый сигнал, располагалась вблизи или в составе стенок паренхиматозных сосудов, или локализовалась в мозговой паренхиме, где СК длительно сохраняли флуоресценцию, спектральные характеристики которой отличались от автофлуоресценции мозговой ткани.

В паренхиматозных органах животных экспериментальной группы единичные флуоресцирующие объекты, соответствующие требуемым параметрам, выявлялись в легких, селезенке и костном мозге до 7 суток после введения. На 14-й день в органах крыс контрольной и экспериментальной групп трансплантированных клеток не обнаружено. Большинство исследованных органов содержало клетки, обладающие автофлуоресценцией, интенсивность которой в тканях крыс контрольной группы оценивали при тех же параметрах, что и у экспериментальных животных.

В легких, селезенке и печени была отмечена слабая флуоресценция, однако ее спектр отличался от параметров флуоресценции введенных клеток. В почках такой сигнал давали эпителиоциты канальцев, в легочной ткани – небольшая популяция альвеолоцитов и клетки межальвеолярных септ с вытянутыми или округлыми телами. Следует отметить, что в случае, если у животного в легочной паренхиме наблюдаются признаки воспаления, число аутофлуоресцирующих клеток в этой зоне значительно возрастало, что отмечено как в контроле, так и в эксперименте (рис. 6).

Обсуждение полученных данных. Трансплантация стволовых клеток – одно из магистральных направлений в лечении злокачественных опухолей за счет высокой способности клеточного трансплантата самостоятельно находить зону повреждения. Сегодня она является единственным методом, способным радикально изменить судьбу пациентов при ряде гемобластозов. Важнейшим этапом лечения онкогематологических заболеваний и некоторых других форм новообразований является облучение и высокодозная химиотерапия. Уничтожая собственные гемолимопоэтические клетки, эти факторы разрушают их локальное микроокружение в костном мозге, а трансплантируемые в последующем СК сами мигрируют в область повреждения, заселяют и ремоделируют ее, формируя новые условия локальной микросреды [8].

В этой связи до недавнего времени направленную миграцию СК в область повреждения было принято рассматривать только в репаративном аспекте. В индигировании этого процесса принимают участие многочисленные факторы, высвобождающиеся в очаге повреждения и воздействующие на соответствующие рецепторы СК. Доказана роль фактора стромальных

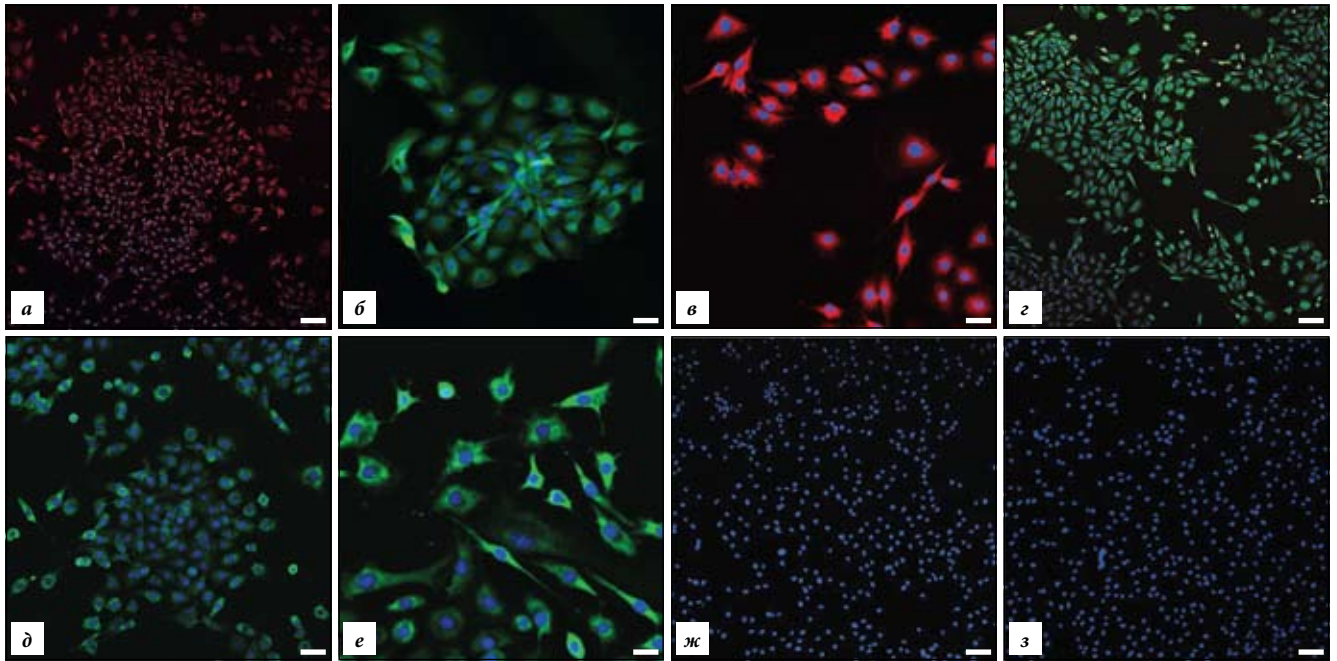


Рис. 3. Иммуноцитохимическая характеристика клеток глиобластомы линии С6:

окраска антителами к нестину (а), белку p53 (б), белку CXCR4 (в), тубулину-βIII (г), белку S100 (д), кисломu глиальному фибриллярному протеину (е); а, в – флуоресценция вторичных антител Alexa 633, б, г, д, е – флуоресценция вторичных антител Alexa 488, отсутствие флуоресценции при контрольном окрашивании вторичными антителами Alexa 488 (ж) и Alexa 633 (з); ядра клеток докрашены DAPI. Мультифотонная сканирующая лазерная микроскопия. Масштаб: а, г, д, ж, з – 100 мкм, б, е – 20 мкм, в – 30 мкм.

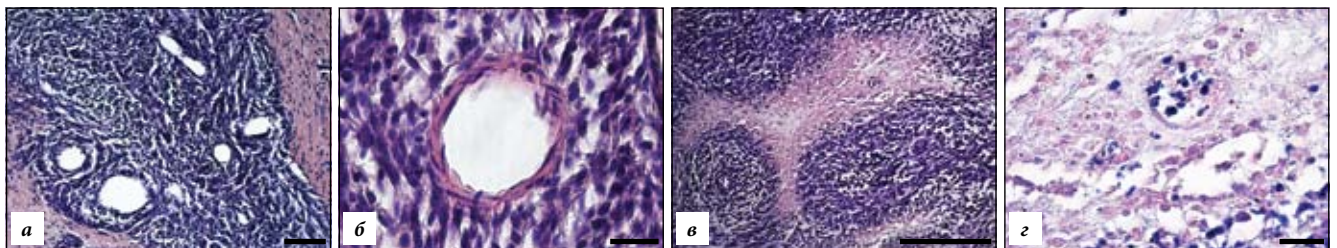


Рис. 4. Опухоль в мозге крысы:

а – опухолевая ткань с новообразованными кровеносными сосудами, 20-е сутки; б – формирование кровеносного сосуда среди опухолевых клеток сателлитного очага; в – ангиоцентрическая группировка опухолевых клеток; г – зоны некроза в опухолевой ткани, 30-е сутки. Окр. гематоксилином и эозином. Масштаб: а – 100 мкм, б, г – 20 мкм, в – 200 мкм.

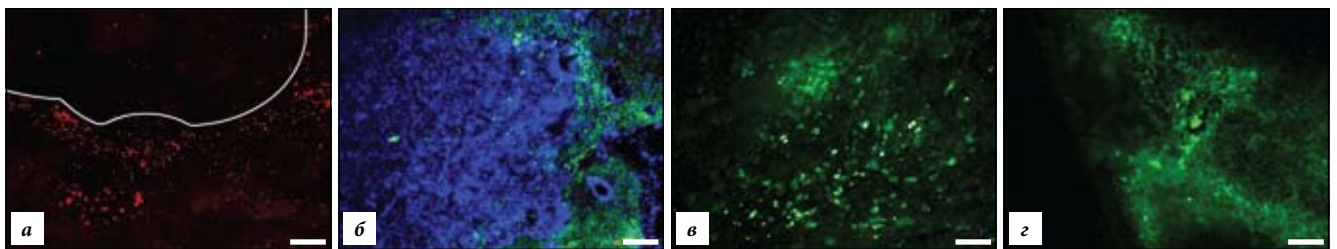


Рис. 5. Распределение мезенхимальных СК в мозге крысы с глиобластомой:

а, б – мигрирующие клетки локализованы вдоль границ неопластического узла; в, г – миграция стволовых клеток в паренхиму опухоли. Окраска прижизненным трейсером: а – Red CMTPX (546 нм), б, в, г – Vybrant CEDA SE (488 нм); флуоресцентная лазерная микроскопия. Масштаб: а, б – 50 мкм, в, г – 100 мкм..

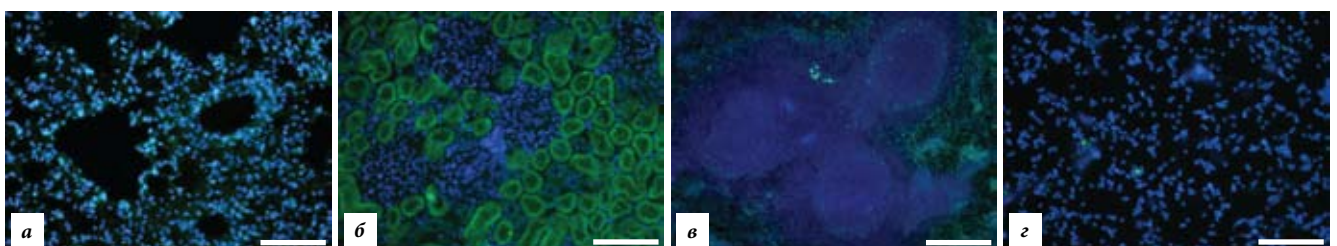


Рис. 6. Ткани паренхиматозных органов и костного мозга животных через 7 суток после трансплантации мезенхимальных СК, окрашенных Vybrant CFDA SE:

а – легкое, контрольная группа, аутофлуоресценция; б – почка, контрольная группа, аутофлуоресценция; в – флуоресценция трансплантированных клеток в селезенке животных экспериментальной группы; г – флуоресценция трансплантированных клеток в костном мозге экспериментальных животных. Ядра клеток докрашены DAPI. Масштаб: а, б – 50 мкм, в-г – 100 мкм.

клеток-1α, взаимодействующего с рецептором CXCR4 мембраны СК, обоснована роль фактора стволовых клеток, фактора роста гепатоцитов, фактора роста эндотелия кровеносных сосудов, белка хемотаксиса моноцитов, белка, ингибирующего миграцию макрофагов, и еще около 80 различных факторов, высвобождаемых поврежденными тканями [3].

Однако миграция стволовых клеток в неопластический очаг – это не только репаративный феномен. По данным нашего эксперимента, первичным источником сигналов, активирующих направленную миграцию СК к очагу малигнизации служат непосредственно опухолевые клетки. Приобретая автономность, они синтезируют цитокины, которые принципиально изменяют направление трафика СК, а, следовательно, – ход процессов регенерации. Способность нейроэпителиальных опухолей продуцировать тенасцин, фибронектин, ламинин и коллагены различных типов неоднократно доказана. Именно с высвобождением поврежденными тканями этих белков традиционно связывают процессы направленной миграции СК в зону повреждения. Кроме того, важной особенностью глиобластомы считается гипоксия, которая позволяет длительно сохранять клетки в недифференцированном состоянии и запускает экспрессию более ста генов – индукторов миграции СК [2, 3, 8, 10].

Среди всей популяции опухолевых клеток наилучшей способностью привлекать стволовые элементы обладают именно опухолевые СК, что тоже не является неожиданностью. Идентифицировано множество цитокинов, секретируемых опухолевыми СК, среди которых молекулы CH3L1, ADAM9, ADAM10, катепсины В и L1, остеопонтин, семафорин 7А и другие индукторы направленной миграции и хоуминга стволовых клеток [5, 10]. В нашем эксперименте в протеоме опухолевых СК идентифицированы 33 белка, потенциально способных влиять на процессы миграции и стволовых клеток.

Нейральные СК обладают существенно большей подвижностью в отношении опухолевых СК глиобластомы, что может быть очень важным моментом. В условиях развития опухолевого процесса в нервной ткани между нейральными и опухолевыми СК устанавливаются очень сложные взаимомодулирующие влияния. С одной стороны, известно, что развитие глиобластомы ингибирует пролиферацию нейральных СК в герминативных зонах мозга, что особенно выражено по мере увеличения возраста экспериментальных животных. С другой стороны, именно нейральные СК могут стать источником клеточного пула, рекрутируемого опухолью для усиления своего пролиферативного и метаболического потенциала. Оба типа клеток (нейральные и опухолевые СК глиобластомы) имеют много схожих морфологических и биохимических свойств: они активно пролиферируют *in vitro* и формируют нейросферы (глиомасферы), а при добавлении в среду различных факторов роста способны дифференцироваться в морфологические элементы других типов. Нестин – важнейший идентификатор нейральных

СК; этот маркер присутствует в большинстве клеток глиобластомы линии С6, использованной в нашем эксперименте. Потомки нейральных СК – нейральные прогениторные клетки – постоянно мигрируют из субвентрикулярной зоны, что отчасти объясняет их высокую мобильность в эксперименте.

Стратегической функцией СК является регуляторное межклеточное взаимодействие в патологическом очаге, что позволяет предположить возможность трансформации нейральных СК в опухолевые СК под воздействием сигналов патологически измененного матрикса и микроокружения. Обнаруженная в настоящем исследовании высокая идентичность (63,5 %) протеомных профилей нейральных и опухолевых СК – весомый аргумент в пользу этой гипотезы. Напротив, мезенхимальные клетки, обладающие достаточно хорошей подвижностью в отношении опухолевых СК в совместных культурах, имеют значительно меньшее число белков, характерных для опухолевых СК, что позволяет считать данный тип клеток наименее подверженным неопластической трансформации. Эти факты дают возможность рассматривать именно этот тип СК в качестве потенциального инструмента для разработки технологий управления активностью опухолевых СК глиобластомы. Результаты проведенного исследования миграционной активности СК у животных с моделью глиомы, а также некоторые результаты других авторов, полученные на иных опухолевых моделях, подтверждают данное предположение.

При оценке распределения в организме экспериментального животного различного типа клеток экзогенного происхождения, стандартным методом является флуоресцентная лазерная микроскопия [6], однако выявленные к настоящему времени особенности тканевого распределения имплантированных СК демонстрируют не всегда однозначные результаты. Флуоресценция мультипотентных мезенхимальных СК в паренхиматозных органах описана у крыс с привитой аденокарциномой Льюис, Эрлиха и Фишера и на некоторых других экспериментальных моделях. При этом удавалось идентифицировать в опухолевой ткани только солитарные флуоресцирующие клетки на фоне значительного накопления клеточного трансплантата в потенциальных «нишах». Скопления трансплантированных клеток в организме опухоленосителя часто наблюдалось в легких, селезенке и костном мозге. Данный факт принято объяснять малым количеством вводимых клеток, а также помехами, вызванными автофлуоресценцией исследуемых тканей или неадекватностью выбранного типа клеток и линий животных цели и задачам эксперимента [6, 7].

Положительные результаты, свидетельствующие о направленной миграции СК в неопластический очаг, были получены на экспериментальных моделях глиобластомы в отношении гемопоэтических, нейральных, а также фетальных и эмбриональных СК [2, 3, 10]. Можно считать, что способность привлекать СК следует отнести к категории ключевых свойств глиобластомы. Неисключено, что данное обстоятельство

связано с большим содержанием в составе культуры опухолевых СК.

Взаимодействие нормальных и опухолевых СК в зоне неоплазии формирует ряд условий, позволяющих достичь торможения опухолевой пролиферации, ангиогенеза, метастазирования, стимулировать усиление воспалительных процессов и тотальный запуск апоптоза. Некоторые механизмы такого взаимодействия уже описаны – это усиление продукции специфических цитокинов, арест цикла опухолевых клеток в фазе G1, проапоптотическая модификация СК, повышающая эффективность обмена цитоплазматических белков, эффект by stander и феномен молекулярной адгезии [14].

Последний феномен впервые описан научной группой Карен Эбоди в 2000 г. Его суть заключается в уникальной особенности СК следовать за опухолевой клеткой в глубину паренхимы мозга по «цитокиновому следу», достигая ее и прикрепляясь к ней, «оседлав подобно наезднику» [2]. Нашей научной группой описан механизм межклеточной коммуникации между стволовыми и опухолевыми клетками посредством образования экзосом, делающих возможным активный обмен цитоплазматическими белками, подавляющими пролиферацию опухолевых клеток. Следует предположить, что модификация протеомного профиля мультипотентных мезенхимальных СК позволит создать клеточные системы, способные таргетно запускать апоптоз в неопластических СК.

Таким образом, проведенное исследование позволяет сделать следующие выводы. Среди клеток глиобластомы наилучшей способностью привлекать нормальные СК обладают опухолевые СК. Критические различия клеточных протеомов позволяют рассматривать мультипотентные мезенхимальные СК как оптимальный инструмент для воздействия на опухолевые СК глиобластомы. При введении в кровоток экспериментальных животных с глиобластомой основная часть мультипотентных мезенхимальных СК мигрирует в полушарие мозга с опухолью и прилипает к неопластической ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда. Проект 14-15-00084.

References

1. Zaridze D.G. Carcinogenesis. M.: Meditsina., 2004. 576 p.
2. Aboody K.S., Brown A., Rainov N.G. [et al.]. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97, No. 23. P. 12846–12851.
3. Bryukhovetskiy I.S., Mischenko P.V., Tolok E.V. [et al.]. Directional migration of adult hematopoietic progenitors to C6 glioma *in vitro* // Oncol. Lett. 2015. Vol. 9, No. 4. P. 1839–1844.
4. Duesberg P., Mandrioli D., McCormack A. [et al.]. Is carcinogenesis a form of speciation? // Cell Cycle. 2011. Vol. 10, No. 13. P. 2100–2114.
5. Formolo C.A., Williams R., Gordish-Dressman H. [et al.]. Secretome signature of invasive glioblastoma multiforme // J. Proteome Res. 2011. Vol. 10, No. 7. P. 3149–3159.
6. Furia L., Pelicci P., Faretta M. Confocal microscopy for high-resolution and high-content analysis of the cell cycle // Curr. Protoc. Cytom. 2014. Vol. 70, No. 7. P. 1–14.
7. Hide T., Makino K., Nakamura H. [et al.]. New treatment strategies to eradicate cancer stem cells and niches in glioblastoma // Neurol. Med. Chir. 2013. Vol. 53, No. 11. P. 764–772.
8. Kidd S., Spaeth E., Dembinski J.L. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using *in vivo* bioluminescent imaging // Stem Cells. 2009. Vol. 27, No. 10. P. 2614–2622.
9. Lathia J.D., Mack S.C., Mulkearns-Hubert E.E. [et al.]. Cancer stem cells in glioblastoma // Genes Dev. 2015. Vol. 29, No. 12. P. 1203–1217.
10. Moore X.L., Lu J., Sun L. [et al.]. Endothelial progenitor cells “homing” specificity to brain tumors // Gene therapy. 2004. Vol. 10, No. 11. P. 811–818.
11. Omuro A., De Angelis L.M. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review // JAMA. 2013. Vol. 310, No. 17. P. 1842–1850.
12. Pittenger M.F. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow // Methods Mol. Biol. 2008. Vol. 449. P. 27–44.
13. Soltanian S., Matin M.M. Cancer stem cells and cancer therapy // Tumour Biology. 2011. Vol. 32, No. 3. P. 425–440.
14. Stupp R., Hegi M.E. Brain cancer in 2012: molecular characterization leads the way. National review // Clinical Oncology. 2013. Vol. 10, No. 2. P. 69–70.
15. Tabatabai G., Weller M. Glioblastoma stem cells // Cell and Tissue Research. 2011. Vol. 343, No. 3. P. 459–465.

Поступила в редакцию 10.02.2016.

Стволовые клетки глиобластомы индуцируют миграцию нормальных стволовых клеток

И.С. Брюховецкий^{1,2}, И.В. Дюйзен^{1,2,4}, В.Е. Шевченко^{1,3}, Ю.С. Хотимченко^{1,2}

¹ Дальневосточный федеральный университет (690091, Владивосток, ул. Суханова, 8), ² Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (690059, Владивосток, ул. Пальчевского 17), ³ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина (115478, Москва, Каширское шоссе, 23), ⁴ Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Введение. Цель работы – сравнительная оценка способностей клеток глиобластомы привлекать различные типы тканеспецифических стволовых клеток (СК), а также выявление принципиальных сходств и отличий между нормальными и опухолевыми СК.

Материалы и методы. Работа выполнялась в три этапа: 1) изучение процессов миграции СК человека к клеткам злокачественных опухолей *in vitro*; 2) сравнение клеточных протеомов некоторых СК, в том числе опухолевых СК; 3) изучение миграции СК *in vivo*. Использовались современные клеточные и постгеномные технологии.

Результаты исследования. Нейральные СК обладали большей подвижностью в сравнении с мультипотентными мезенхимальными СК и фибробластами. Получены данные о достаточно высоком родстве опухолевых СК глиобластомы и нормальных СК. Введение меченных флуорохромом мезенхимных СК животным с глиомой показало, что максимальное число этих клеток (57,6±8,9%) фиксировалось в мозге.

Обсуждение полученных данных. Трансплантация СК – одно из магистральных направлений в лечении злокачественных опухолей за счет высокой способности клеточного трансплантата самостоятельно находить зону повреждения. Среди всех клеток глиобластомы наилучшей способностью привлекать нормальные СК обладают опухолевые СК. Критические различия клеточных протеомов позволяют рассматривать мезенхимальные СК как оптимальный инструмент для воздействия на опухолевые СК глиобластомы.

Ключевые слова: мультиформная глиобlastoma, нейральные стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки, опухолевые стволовые клетки.

УДК 591.481.1.081:615.849.19

ЛАЗЕРНАЯ ФОТОСТИМУЛЯЦИЯ КРОВотоКА В ПИАЛЬНЫХ МИКРОСОСУДАХВ.И. Козлов¹, Ф.Б. Литвин², С.М. Рыжакин¹¹ Российский университет дружбы народов (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8),² Смоленская академия физической культуры, спорта и туризма (214018, г. Смоленск, пр-т Гагарина, 23)**Ключевые слова:** низкоинтенсивное лазерное излучение, головной мозг, микроциркуляция, крысы.**LASER PHOTOSTIMULATION OF THE BLOOD FLOW IN PIAL MICROCIRCULATORY VESSELS**V.I. Kozlov¹, F.B. Litvin², S.M. Ryzhakin¹¹ Peoples' Friendship University of Russia (8 Miklukho-Maklaya St. Moscow 117198 Russian Federation), ² Smolensk State Academy of Sports and Tourism (23 Gagarina St. Smolensk 214018 Russian Federation)**Background.** It was experimentally conducted a comparative analysis of a pial microcirculatory vessels reactivity on exposure to laser irradiation.**Methods.** The work was carried out on Wistar rats. The reaction of microcirculatory vessels to the laser irradiation was performed in the condition of an 'open window'. Together with the method of laser Doppler flowmetry we studied the state of tissue blood flow in the cortical area of the brain. Low-intensity laser irradiation at a dose of 3 and 6 J/cm² was carried out in the red and infrared spectral ranges.**Results.** Low-intensity laser irradiation of blood vessels of the pia mater at a dose of 3 J/cm² has a stimulating effect on the microcirculation. The response was dose-dependent up to the threshold limit reactivity. Most sensitive to laser irradiation were the smallest pre-cortical arterioles, which are the final link of multiple branching pial vessels. The high reactivity of the pial microcirculatory vessels was found out in newborn and young animals, and its decline – in mature rats. Increasing the dose of laser irradiation to 6 J/cm² led to a drop in blood flow and the appearance of signs of microcirculation disorders.**Conclusions.** Within the therapeutic doses the laser irradiation has a photo stimulating effect on cerebral blood flow.**Keywords:** low-intensity laser irradiation, brain, microcirculation, rats.

Pacific Medical Journal, 2016, No. 2, p. 90–93.

Нарушения мозгового кровообращения являются одной из наиболее актуальных проблем современной медико-биологической науки из-за высокой частоты и тяжелых медико-социальных последствий. Сосудистая система мозга обладает хорошо развитой ауторегуляцией, которая заключается в способности артериол за счет изменения диаметра поддерживать постоянство кровотока в широком диапазоне перфузионного давления. Для микроциркуляторного русла мягкой мозговой оболочки характерна модульная организация из относительно автономных структурно-функциональных блоков [6], при этом установлена тесная функциональная взаимосвязь артериоло-венулярных блоков пиальных сосудов с отдельными группами корковых нейронов. По мере усложнения гематотканевых взаимоотношений в онтогенезе появляется функциональная неравнозначность разных сосудистых компонентов микроциркуляторного русла, во многом связанная с его реактивностью, которая

непосредственно зависит от чувствительности гладких миоцитов стенки сосуда к гидравлическим, нейрогенным и гуморальным воздействиям [6]. В этой связи возникает вопрос о том, в какой мере реактивность микрососудов зависит от их структурных параметров и положения в системе микроциркуляции на путях движения крови, в частности, в пределах артериоло-венулярных блоков пиальных сосудов?

Перспективным направлением в изучении сосудистой реактивности служит исследование фотовоздействия гелий-неонового лазера, излучение которого вызывает дилатацию микрососудов и повышает уровень тканевого кровотока [7, 8, 11, 15].

Цель настоящего исследования – сравнительный анализ реактивности микрососудов мягкой мозговой оболочки при воздействии лазерного излучения красного и инфракрасного спектрального диапазонов и ее влияния на состояние тканевого кровотока в эксперименте.

Материал и методы. Использованы 124 крысы линии Вистар массой от 30 до 250–300 г разных возрастных групп: 7, 30, 45 и 90 дней (26, 34, 34 и 34 животных, соответственно). Крыс наркотизировали внутримышечным введением раствора тиопентала натрия из расчета 3–5 мг препарата на 100 г массы тела. В эксперименте соблюдались все требования по этике работы с животными, предложенные European Communities Council Directive (86/609 EEC) и положения приказа № 267 МЗ РФ от 19.06.2003 г. Проведение исследований разрешено этической комиссией РУДН (протокол № 55 от 2005 г.).

Биомикроскопия пиальных сосудов проводилась в условиях «открытого окна» в черепе при вскрытой твердой мозговой оболочке с помощью микроскопа МБС-2, на котором была укреплена телевидеометрическая установка, позволявшая вести видеорегистрацию во время эксперимента. Морфометрическую обработку данных биомикроскопии после передачи с телекамеры на компьютер осуществляли с использованием программы Image Tools 2.0 (Техасский университет, США). Полученные данные обрабатывались методами вариационной статистики и выражались в средней арифметической и ее стандартной ошибке.

Раздельно изучали реакцию артериол 1-го и 2-го порядков ветвления и прекартикальных артериол, а также сосудов посткапиллярного звена: посткартикальных венул и венул 1-го и 2-го порядков ветвления. В соответствии с положением в иерархии микрососудов



Рис. 1. Реакция микрососудов на лазерное фотовоздействие в дозе 3 Дж/см²:
а – исходное состояние; б – сразу после воздействия; в – через 5 мин после воздействия. Биомикрото, ×80.

их диаметр в артериальном звене характеризовался следующими параметрами: артериолы 1-го порядка – 43–45 мкм, артериолы 2-го порядка – 29–31 мкм и пре-кортикальные артериолы – 22–23 мкм; в венозном звене: посткортикальные вены – 28–29 мкм, вены 2-го порядка – 50–51 мкм, а вены 1-го порядка – 68–70 мкм.

Реакцию микрососудов оценивали по изменению их диаметра. Наряду с этим методом лазерной доплеровской флуометрии (на аппарате ЛАКК-01) оценивали состояние кровотока в кортикальной зоне. При этом регистрировали средние значения тканевой перфузии – показатель микроциркуляции (ПМ) и уровень колебаний тканевого кровотока, или «флакс», – среднее квадратичное отклонение ПМ, а также соотношения колебаний кровотока в разных частотных диапазонах [9].

Низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ) осуществляли в красном и инфракрасном спектральных диапазонах при длине волн 0,63–0,89 мкм с помощью аппаратов ЛГН-108 и АЛТ «Мустанг-2000». Доза воздействия составила 3 и 6 Дж/см².

Результаты исследования. Воздействие НИЛИ приводило к расширению пиллярных сосудов и повышению уровня мозгового кровотока. У взрослых животных через 10 мин после воздействия гелий-неонового лазера расширилось подавляющее большинство артериол и венул (рис. 1). В отдельных случаях отмечена и противоположная направленность реакции: локальная констрикция отдельных артериол. Частота такой инвертированной реакции у молодых крыс (7- и 30-дневных) не превышала 5 %, а у зрелых (90-дневных) – 15 %. Параллельно с дилатацией микрососудов происходило повышение уровня тканевой перфузии на 26 %, в 1,7 раза поднимался уровень флакса. Основные сдвиги происходили за счет увеличения в спектре доли медленных колебаний, обусловленных вазомоциями (рис. 2). Она возрастала в 1,7 раза, что приводило к существенному росту индекса флаксмоций (ИФМ), который характеризует соотношение активных (обусловленных вазомоциями) и пассивных (обусловленных дыхательными колебаниями и кардиоритмом) модуляций тканевого кровотока (табл. 1).

При НИЛИ между диаметром микрососудов и уровнем их дилатации существовала обратная зависимость: артериолы малого диаметра (прекортикальные)

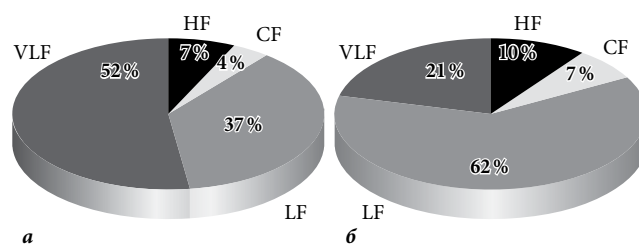


Рис. 2. Вклад различных ритмических составляющих в общий частотно-амплитудный спектр:

а – исходные показатели; б – через 10 мин после НИЛИ в дозе 3 Дж/см². LF (low frequency) – медленные волны флаксмоций в диапазоне частот 0,07–0,2 Гц; HF (high frequency) – быстрые волны флаксмоций в диапазоне частот 0,2–0,4 Гц; CF (cardio frequency) – пульсовые волны флаксмоций в диапазоне частот 0,8–1,5 Гц; VLF (very low frequency) – очень медленные колебания (в диапазоне частот 0,01–0,03 Гц).

Таблица 1

Тканевый кровоток в кортикальной зоне при НИЛИ в дозе 3 Дж/см² (M±m)

Время регистрации		ПМ, перф. ед.	Флакс, перф. ед.	ИФМ
Исходно		21,3±1,3	0,54±0,11	0,67±0,31
По воз- действию	сразу	22,2±1,6	0,58±0,13	0,97±0,15
	через 5 мин	24,1±1,4	0,91±0,16	1,24±0,06
	через 10 мин	26,8±1,9	0,74±0,24	1,27±0,04

реагировали максимальным расширением просвета, более крупные сосуды отвечали умеренной дилатацией. У взрослых животных наибольшей реактивностью обладали пре-кортикальные артериолы, диаметр которых увеличивался на 37 %. Реакция артериол 2-го порядка оказалась более чем в 2 раза ниже, а артериол 1-го порядка – самой минимальной. Расширение венул и посткортикальных микрососудов было незначительным и, по-видимому, носило характер вторичного явления, обусловленного интенсификацией кровотока в артериальном звене (табл. 2).

Реакция микрососудов на лазерное воздействие была дозозависимой, и существовал порог их предельной реактивности. Первые признаки вазодилатации артериол отмечались с 1-й минуты фотостимуляции. Расширение сосудов демонстрировало выраженную локальность в месте действия лазерного пучка и исчезало спустя 3–4 мин после завершения облучения. Увеличение экспозиции до 12 мин сопровождалось нарастающей вазодилатацией по всем порядкам ветвления

Таблица 2

Изменения диаметра пиальных микрососудов на 10-й минуте после лазерного воздействия ($M \pm m$)

Микрососуды		Доза НИЛИ, Дж/см ²			
		3		6	
		Диаметр, мкм	Изменение, %	Диаметр, мкм	Изменение, %
Артериолы	1-го порядка	48,5±4,1	7	46,4±3,6	5
	2-го порядка	37,1±1,7	16	35,9±1,4	24
	прекортикальные	31,8±1,5	37	27,4±1,6	20
Венулы	посткортикальные	32,7±1,4	14	31,1±1,6	7
	2-го порядка	55,1±1,4	7	52,5±1,2	4
	1-го порядка	74,1±3,6	6	72,0±3,1	6

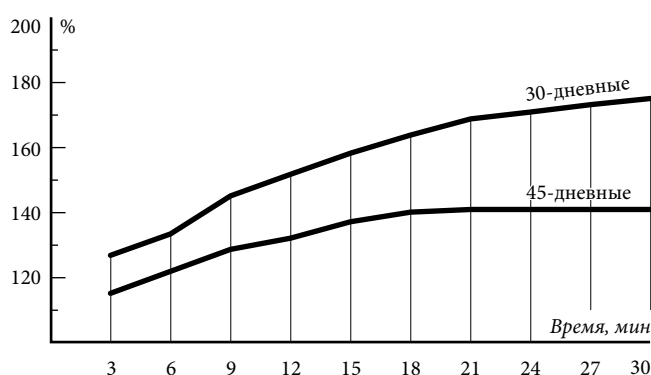


Рис. 3. Реакция прекортикальных артериол на воздействие гелий-неонового лазера у животных разного возраста.

сосудов. Явное опережение этой реакции было характерно для прекортикальных артериол (рис. 3). К 18-й минуте НИЛИ прирост диаметра микрососудов достигал у взрослых животных максимальных значений, после чего существенно не изменялся.

При сравнении изменений пиальных микрососудов при воздействии НИЛИ в дозах 3 и 6 Дж/см² выявлена сходная тенденция их дилатации и усиления тканевого кровотока в кортикальной зоне, что свидетельствовало об однотипных механизмах регуляции. Ведущим механизмом здесь оказался вазомоторный. Однако стимулирующее влияние НИЛИ на кровоток при дозе 3 Дж/см², проявлявшееся в его усилении и повышении флуксуаций, было выражено более отчетливо. При увеличении дозы до 6 Дж/см² дилатация микрососудов становилась менее выраженной и сопровождалась расстройствами микроциркуляции (ослабление колебаний кровотока и снижение доли вазомоторных колебаний в частотном спектре). Поэтому изменения микроциркуляции в кортикальной зоне при 6 Дж/см², скорее характеризует эффект передозировки НИЛИ.

У более молодых (30-дневных) животных реактивность сосудов микроциркуляторного русла оказалась более высокой. Это касалось не только прекортикальных артериол, но и более крупных микрососудов.

Обсуждение полученных данных. Таким образом, реактивность разных отделов микроциркуляторного русла прежде всего обусловлена различиями

морфологических, функциональных и гемодинамических свойств микрососудов, расположенных в разных зонах тканевого микрорегиона. Наиболее чувствительны к лазерному воздействию оказались самые мелкие прекортикальные артериолы, которые являются конечным звеном многократно ветвящихся пиальных сосудов. Следовательно, реактивность микрососудов определяется не только параметрами лазерного воздействия, но и гистотопографическими свойствами артериол и венул, которые меняются по мере приближения к капиллярной сети коры мозга.

Сосудистая реактивность обеспечивает расширение возможностей по дополнительной мозговой перфузии. Адекватное кровоснабжение головного мозга представляет собой результат взаимодействия нескольких механизмов [11]. Полученные результаты заставляют искать адекватные объяснения разному уровню реактивности различных генераций пиальных микрососудов в ответ на лазерное воздействие. Известно, что в основе механизма воздействия НИЛИ на ткани в красной и инфракрасной спектральных областях лежат процессы, происходящие на клеточном и молекулярном уровнях [2, 5]. Основными мишенями, опосредующими лазерное воздействие и преобразующее его в изменения микроциркуляторного потока, служат сократительный аппарат гладких миоцитов и функциональная подвижность эндотелия [5, 7, 10, 12]. Наиболее изучена к настоящему времени сократительная активность гладких миоцитов, благодаря спонтанной активности которых поддерживается базальный тонус микрососудов. Полученные данные свидетельствуют в пользу доминирования миогенного механизма, обеспечивающего реактивность крупных артериол и венул, содержащих хорошо развитый слой гладкомышечных клеток [12]. Одним из проявлений миогенной активности можно назвать вазомоции на уровне нутритивного звена системы микроциркуляции [6, 9].

Возможность воздействия лазерного излучения на сократительную активность гладких миоцитов и усиление в результате фотоактивации вазомоций является патофизиологическим обоснованием применения лазерной терапии при нарушениях микроциркуляции и сопутствующих трофических расстройствах. В пользу миогенного механизма дилатации свидетельствует и низкая реактивность прекортикальных артериол у 7-дневных крыс, связанная с незрелостью у них мышечного слоя сосудистой стенки. Менее выраженная структурная организация этого слоя в венулярных сосудах предопределяет снижение их реактивности по сравнению с артериолами одного порядка ветвления. Более того, по данным Е.Р. Андреевой и др. [1], А.Е. Коцубы и В.М. Чертока [8, 12] расширение венул происходит преимущественно за счет изменения геометрии эндотелия. Работой одного миогенного механизма с большой натяжкой можно объяснить

продолжающуюся в течение нескольких десятков минут дилатацию после завершения действия НИЛИ.

Этот и другие вопросы снимает концепция, согласно которой ведущая роль в регуляции функций сосудистой системы отводится эндотелию [8, 10, 12]. НИЛИ вызывает фотостимуляцию эндотелиальных клеток [1]. По существующим представлениям, в механизме вазодилатации здесь основную роль играет увеличение образования оксида азота в эндотелиоцитах и уменьшение содержания кальция в гладкомышечных клетках [14, 15]. При повышении энергии и интенсивности лазерного излучения увеличивается кальцийзависимая активность нитроксидсинтазы [3]. С позиций эндотелийзависимой реакции объясняется высокая реактивность прекортикальных артериол, поскольку с уменьшением диаметра сосудов усиливается эндотелийзависимая реакция [4, 12]. Общеизвестной является структурно-морфологическая закономерность, согласно которой с уменьшением диаметра артериол их чувствительность к нервным импульсам ослабевает, а чувствительность к вазоактивным веществам стремительно растет. Известно, что вазодилатация модулируется через эндотелийзависимый механизм, опосредуемый повышением напряжения сдвига за счет увеличения объемного кровотока, вызванного воздействием низкоинтенсивного излучения [13].

Заключение

НИЛИ в дозе 3 Дж/см² оказывает фотостимулирующее влияние на микроциркуляцию в мягкой оболочке головного мозга крыс, что проявляется усилением кровотока на фоне снижения сосудистого тонуса. Реакция микрососудов на лазерное воздействие носит дозозависимый характер до порога предельной реактивности. Наиболее чувствительны к лазерному излучению самые мелкие прекортикальные артериолы, которые служат конечным звеном многократно ветвящихся пиальных сосудов. Повышение дозы облучения до 6 Дж/см² приводит к падению скорости кровотока и появлению признаков расстройств микроциркуляции.

References

1. Andreeva E.P., Udartseva O.O., Vozovikov I.N. [et al.]. Effect of photodynamic treatment on endothelial cells in the in vitro model // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2010. Vol. 149, No. 2. P. 228–231.
2. Vladimirov Yu.A., Klebanov G.I., Borisenko G.G. [et al.]. Molecular and cellular mechanisms of the effect of low-intensity laser radiation // *Biophysics*. 2004. Vol. 49, No. 2. P. 339–350.
3. Gorshkova O.P. Dynamics of changes in the reactivity of the pial vessels after a brief cerebral ischemia // *Regional Haemodynamics and Microcirculation*. 2014. Vol. 14, No. 2. P. 69–74.
4. Kamalyan N.S. Biophysical bases of the mechanism of action of low-intensity laser radiation // *Bulletin of IASES*. 2002. Vol. 7, No. 6. P. 64–69.
5. Klebanov G.I., Poltanov E.A., Chichuk T.V. [et al.]. Changes in the activity of superoxide and peroxynitrite content in peritoneal macrophages irradiated He-Ne laser // *Biochemistry*. 2005. Vol. 70, No. 12. P. 1623–1630.

6. Kozlov V.I. Development of the system of microcirculation. M.: Peoples' Friendship University Press, 2012. 314 p.
7. Kozlov V.I., Livin F.B., Ryzhakin S.M. Effect of helium-neon laser on microvascular bloodstream of pia mater of the brain // *Laser Medicine*, 2002, Vol. 6, Iss. 2. P. 22–24.
8. Kotsyuba A.E., Bessalova E.P., Chertok V.M. Effect of nitric oxide on microvasculature reactivity when exposed to laser // *Pacific Medical Journal*. 2007. No. 4. P. 44–46.
9. Krupatkin A.I., Sidorov V.V. Functional diagnostics of microcirculation-tissue systems: vibrations, information, nonlinearity / guidelines for physicians. M.: Librikom, 2014. 498 p.
10. Petrishev N.N. Dysfunction of endothelium. Causes, mechanisms, pharmacological correction. StP.: StPSMU, 2003. 184 p.
11. Chertok V.M., Kotsyuba A.E., Bessalova E.V. Features of the reaction vessels of the microvasculature of some organs on the impact of a helium-neon laser // *Pacific Medical Journal*. 2007. No. 3. P. 48–52.
12. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Endothelial (intimal) mechanism of regulation of cerebral hemodynamics: the transformation of views // *Pacific Medical Journal*. 2012. No. 2. P. 17–26.
13. Shuvaeva V.N., Gorshkova O.P., Kostylev A.V., Dvoretzkiy D.P. Effect of laser radiation on adrenoactivity of pial arterial vessels in rats // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2011. No. 1. P. 4–8.
14. Gensert J.M., Ratan R.R. The metabolic coupling of arginine metabolism to nitric oxide generation by astrocytes // *Axntioxid. Redox. Signal*. 2006. Vol. 8, No. 5–6. P. 919–928.
15. Shimizu E., Tang Y.P., Rampon C., Tsien J.Z. NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation // *Science*. 2000. Vol. 290. P. 1170–1174.

Поступила в редакцию 07.10.2015.

Лазерная фотостимуляция кровотока в пиальных микрососудах

В.И. Козлов¹, Ф.Б. Литвин², С.М. Рыжакин¹

¹ Российский университет дружбы народов (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8), ² Смоленская академия физической культуры, спорта и туризма (214018, г. Смоленск, пр-т Гагарина, 23)

Введение. Проведен сравнительный анализ реактивности микрососудов мягкой мозговой оболочки при воздействии лазерного излучения в эксперименте.

Материал и методы. Работа выполнена на крысах линии Вистар. Реакцию микрососудов на лазерное воздействие проводили в условиях «открытого окна». Наряду с этим методом лазерной доплеровской флуометрии изучали состояние тканевого кровотока в кортикальной зоне мозга. Низкоинтенсивное лазерное излучение в дозе 3 и 6 Дж/см² осуществляли в красном и инфракрасном спектральных диапазонах.

Результаты исследования. Низкоинтенсивное лазерное облучение сосудов мягкой мозговой оболочки в дозе 3 Дж/см² оказывало стимулирующее влияние на микроциркуляцию. Реакция имела дозозависимый характер до достижения порога предельной реактивности. Наиболее чувствительны к лазерному воздействию оказались самые мелкие прекортикальные артериолы, которые являются конечным звеном многократно ветвящихся пиальных сосудов. Выявлена высокая реактивность пиальных микрососудов у новорожденных и молодых животных и ее снижение у зрелых крыс. Повышение дозы лазерного облучения до 6 Дж/см² приводило к падению скорости кровотока и появлению признаков расстройств микроциркуляции.

Обсуждение полученных данных. В пределах терапевтических доз лазерное воздействие оказывает фотостимулирующее влияние на мозговую циркуляцию.

Ключевые слова: низкоинтенсивное лазерное излучение, головной мозг, микроциркуляция, крысы.

УДК 591.481.1.081:575.16

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ АКСЕЛЕРАЦИИ В НЕОНАТАЛЬНОМ И МОЛОЧНОМ ПЕРИОДАХ ОНТОГЕНЕЗА

Б.Я. Рыжавский, О.В. Ткач

Дальневосточный государственный медицинский университет (680000, г. Хабаровск, ул. Муравьева-Амурского, 35)

Ключевые слова: кора мозга, нейроны, дегидрогеназы, морфометрия.

THE MORPHOLOGICAL FEATURES OF THE RATS BRAIN AT AN ACCELERATION IN THE NEONATAL DAIRY AND PERIODS OF ONTOGENESIS

B.Ya. Ryzhavskii, O.V. Tkach

*Far Eastern State Medical University (35 Muravyova-Amurskogo St. Khabarovsk 680000 Russian Federation)***Background.** It was conducted the analysis of morphometric and histological features of rats brain development in the neonatal rats and dairy periods of ontogenesis when grown in litters, whose number has been greatly reduced.**Methods.** We studied the brain 5-, 14- and 30-day-old rats from the artificially reduced after a day birth of litters. Control rats were from intact litters. On the basis of morphometry we analyzed the brain mass and degree of development of its cortex, the state of neurons and the intensity of enzymatic reactions.**Results.** Animals of all age groups from small litters differed significantly by increased body weight, significantly greater than in the controls, and the mass of the brain hemispheres. Relative brain weight in rats of the experimental group was lower than in controls. Experimental animals had a range of morphological features to accelerate the maturation of the cerebral cortex.**Conclusions.** Experimental animals had an important sign of acceleration - a significant advance rate of body weight increase. Differences from control brain morphometric and histochemical parameters can be regarded as evidence of intensification of intramitochondrial and extramitochondrial biological oxidation. As they grow older early developed animals, a part of the differences of early life stages, reflecting both the level of brain ontogeny and functional state of neurons is negated.**Keywords:** cerebral cortex, neurons, dehydrogenase, morphometry

Pacific Medicak Journal, 2016, No. 2, p. 94-97.

Темпы онтогенетического развития детей в течение многих десятилетий в разных странах существенно менялись, что проявлялось такими процессами, как акселерация и ретардация. Наиболее яркими и характерными признаками акселерации считаются опережающие темпы роста массы тела и полового развития [3, 4, 7]. В связи с тем, что масса тела на ранних стадиях постнатального онтогенеза как у человека, так и у таких животных как крысы, имеет положительную связь с массой головного мозга [1, 8, 9], возник вопрос о том, каково влияние ускоренного соматического развития на его массу, морфологию различных отделов, в том числе коры. Ответ на него, представляющий как теоретический, так и практический интерес, может быть получен при исследовании мозга животных, имеющих признаки акселерации.

Учитывая данные о влиянии численности помётов у крыс на темпы их роста, в нашей лаборатории были проведены эксперименты, показавшие, что путем экспериментального уменьшения численности помётов

можно получить животных, имеющих важные признаки акселерации: существенное увеличение темпов роста массы тела и гонад, а также показателей развития последних [8]. При этом было также установлено, что в 40-дневном возрасте, то есть в препубертатном периоде онтогенеза, мозг экспериментальных животных отличался от мозга контрольных крыс увеличенной массой, а также рядом морфометрических и гистохимических характеристик нейронов неокортекса и гиппокампа [9]. В то же время известно, что наиболее интенсивно развитие мозга происходит на более ранних, чем препубертатный период, этапах [1, 6, 8]. Отражением этого служит, в частности, тот факт, что в течение первого года жизни у ребенка масса мозга возрастает почти в три раза, а у 14-дневных крыс этот показатель больше, чем у однодневных, примерно вчетверо [1, 8].

Целью настоящей работы стал анализ морфометрических и гистохимических особенностей развития мозга крыс в неонатальном (5-дневные) и молочном (14- и 30-дневные) периодах онтогенеза при выращивании в помётах, численность которых была значительно уменьшена.

Материал и методы. В работе изучался головной мозг 5-, 14-, 30-дневных белых крыс. Экспериментальная группа состояла из животных, выращенных в малочисленных помётах, уменьшение численности которых осуществлялось через сутки после родов путем оставления в помёте по четыре особи. В каждой экспериментальной возрастной группе было исследовано по три помёта. Контрольная группа включала в себя крысят из интактных помётов численностью от 10 до 13 особей. В каждой возрастной группе контроля было изучено по два помёта. Животные «больших» и «уменьшенных» помётов содержались одновременно в условиях одного вивария, корм и воду получали *ad libitum*. Условия содержания животных соответствовали нормам международного и российского законодательства.

После выведения из опыта взвешиванием на электронных весах определяли массу тела, головного мозга и его полушарий. Для суждения о степени миелинизации волокон из собственно теменной доли (СТД) правого полушария готовили криостатные срезы толщиной 30 мкм, которые окрашивали суданом черным В (для выявления липидов). Концентрацию липидов в I слое и белом веществе головного мозга (под неокортексом) измеряли на аппарате МЕКОС при длине волны 600 нм. В строго стандартизированных условиях проводили

Рыжавский Борис Яковлевич – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии ДВГУ; e-mail: nauka@mail.fesmu.ru

гистохимические реакции на никотинамидадениндинуклеотид- и никотинамидадениндинуклеотидфосфат-дегидрогеназу (НАДН-д, НАДФН-д) [5]. Об интенсивности ферментативных реакций судили при помощи компьютерной цитоспектрофотометрии на аппарате МЕКОС по оптической плотности продуктов реакции в цитоплазме клеток, при длине волны 550 нм. При этом в каждом случае измерялась активность не менее чем в 25 нейронах каждой локализации.

Левое полушарие мозга фиксировали в жидкости Карнуа. Из переднетеменной доли (ПТД) и СТД после заливки в парафин готовили срезы толщиной 7 мкм, которые окрашивали на нуклеиновые кислоты галлоцианином по Эйнарсону. На этих срезах измеряли толщину коры и I слоя в ПТД и СТД, площади сечения ядрышек, ядер и цитоплазмы нейронов II и V слоев ПТД, СТД и гиппокампа. На этих же препаратах цитоспектрофотометрически при длине волны 550 нм определяли концентрацию РНК в цитоплазме клеток. Все перечисленные показатели находили на основании измерений, проведенных в каждом случае на 25 нейронах каждой локализации. О численной плотности нейронов в коре ПТД и СТД судили по подсчету их числа в пяти стандартных полях зрения II и V слоев. Статистический анализ количественных данных проводили методом вариационной статистики и выражали средней арифметической и ее средней ошибкой.

Результаты исследования. Масса тела крыс из уменьшенных пометов в 5-дневном возрасте превосходила таковую у контрольных на 19,1 %, в 14-дневном – на 82,3 %, в 30-дневном – на 29,9 %, абсолютная масса мозга – на 13,5, 12 и 10,8 % соответственно (табл.).

Максимальное количество достоверных морфометрических и гистохимических межгрупповых различий наблюдалось у крыс самой младшей группы. Животные из малочисленных пометов характеризовались увеличенной массой мозга и полушария, толщиной коры в ПТД и СТД, уменьшенной плотностью нейронов в СТД и ПТД, увеличенными размерами их ядрышек, ядер и цитоплазмы, концентрации в ней РНК. I слой и белое вещество полушария при этом имели большую степень суданофилии, чем в контроле. В 5-дневном возрасте нейроны гиппокампа отличались большей активностью НАДН-д и НАДФН-д. Активность НАДФН-д была увеличена также в нейронах II слоя (табл.).

Прирост масс тела и мозга у подопытных крыс был больше, чем у контрольных, до 14-дневного возраста. В интервале от 14- до 30-дневного возраста темпы роста массы тела и мозга у сравниваемых групп животных практически не различались, хотя масса мозга, как и масса тела у крыс из малочисленных пометов, достоверно превышала контрольные показатели (табл.).

Мозг 14-дневных подопытных крыс имел ряд признаков ускоренного развития неокортекса: большая толщина коры СТД и ПТД, I слоев СТД и ПТД, а также меньшую плотность нейронов во II и V слоях СТД и во II слое ПТД. Площадь цитоплазмы на срезах была

достоверно увеличена в нейронах II слоя СТД, II и V слоев ПТД и гиппокампа. Поскольку концентрация РНК в цитоплазме данных клеток была у животных сравниваемых групп близкой (табл.), можно полагать, что суммарное количество РНК в цитоплазме перикарионов у животных из экспериментально уменьшенных пометов было большим, чем у контрольных. Перечисленные межгрупповые отличия корковых нейронов сочетались с гистохимическими признаками ускоренной миелинизацией I слоя неокортекса, а также – белого вещества, расположенного под корой, что проявлялось большей суданофилией: в I слое концентрация суданофильных липидов в подопытной группе была на 20,8 % больше, а в белом веществе полушария – почти на 37 % больше, чем в контроле (табл.). Активность НАДН-д и НАДФН-д в нейронах не имела достоверных межгрупповых различий. В совокупности изложенные результаты свидетельствуют, что, как и у 5-дневных крыс из малочисленных пометов, у 14-дневных подопытных животных имелись признаки ускоренного созревания коры мозга.

В 30-дневном возрасте (окончание молочного периода) крысы с акселерацией характеризовались большей абсолютной массой мозга и гораздо меньшей его относительной массой, увеличенной толщиной коры, уменьшенной плотностью нейронов в неокортексе, а также повышенной концентрацией липидов в белом веществе коры. В то же время, практически все размерные характеристики нейронов, а также концентрация РНК, активность НАДН-д и НАДФН-д в их цитоплазме не имели достоверных межгрупповых различий (табл.).

Обсуждение полученных данных. Подопытные животные имели ярко выраженный важный признак акселерации – значительное опережение темпов роста массы тела, что согласуется с ранее полученными данными [9]. Усиленные темпы роста массы тела могут быть объяснены лучшей доступностью питания (материнское молоко), большим вниманием со стороны матери, меньшей конкуренцией за пищу и меньшей стрессогенностью среды в малочисленных пометах [7, 12]. При этом полученные данные свидетельствовали о том, что темпы роста головного мозга были значительно ниже, чем темпы увеличения массы тела, вследствие чего относительная масса мозга у животных-акселераторов была намного меньшей, чем в контроле.

Статистически значимые отличия от контроля морфометрических и гистохимических параметров у животных самой младшей группы можно расценить как свидетельство интенсификации процессов внутримитохондриального и немитохондриального биологического окисления. При этом последнее тесно связано с такими важными для роста и созревания мозга процессами, как синтез нуклеиновых кислот и других биомолекул [10]. Хотя исследованные зоны коры мозга и ее слои функционально разнятся [6], характер межгрупповых отличий в них оказался однотипным. Максимальное количество отличий от контроля зарегистрировано у крысят 5-дневного возраста,

Таблица

Морфометрические и гистохимические особенности неокортекса и гиппокампа крыс в молочном периоде при акселерации

Показатель		Группа животных					
		5-дневные		14-дневные		30-дневные	
		контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Масса тела, г		8,9±0,6	10,6±0,7	18,1±0,3	33,0±1,1	61,4±2,2	79,9±3,0
Масса головного мозга (абс.), мг		424,0±22,7	478,0±12,3	1048,0±16,3	1174,0±16,2	1371,0±23,6	1486,0±17,8
Масса головного мозга (отн.), мг/г		48,1±0,9	46,2±2,0	58,3±0,8	35,9±0,9	22,6±0,6	18,8±0,5
Масса полушария, мг		150,3±9,4	180,3±6,6	397,4±6,4	431,1±14,5	513,6±11,8	549,9±10,5
Толщина коры СТД, мкм		865,0±21,7	1014,0±18,2	1185,0±25,8	1248,0±18,5	1318,0±27,8	1261,0±26,0
Толщина I слоя СТД, мкм		73,0±2,0	94,0±2,7	142,0±4,7	160,0±2,3	134,0±4,5	155,0±4,4
Число нейронов в п/з, слой II СТД		54,0±3,6	42,8±1,4	27,4±0,6	25,9±0,6	19,5±0,5	16,8±0,4
Число нейронов в п/з, слой V СТД		23,0±1,0	16,7±0,3	11,5±0,4	10,3±0,3	11,4±0,4	10,1±0,3
Площадь, мкм ²	ядрышек нейронов слоя II СТД	2,5±0,1	3,0±0,1	4,5±0,1	4,9±0,2	3,8±0,1	3,7±0,1
	ядер нейронов слоя II СТД	23,4±1,2	28,8±0,9	53,5±1,8	58,0±2,8	58,7±2,1	58,9±2,1
	цитоплазмы нейронов слоя II СТД	22,1±0,5	25,4±0,9	42,7±0,9	46,6±1,0	41,0±1,3	43,2±1,3
	ядрышек нейронов слоя V СТД	3,9±0,2	4,8±0,1	6,6±0,2	6,9±0,2	5,7±0,2	5,6±0,1
	ядер нейронов слоя V СТД	45,4±3,7	59,7±2,8	99,9±4,7	104,0±6,3	94,8±3,8	95,3±3,8
	цитоплазмы нейронов слоя V СТД	35,2±2,1	41,1±1,5	81,1±3,1	85,9±2,8	85,8±4,2	74,8±3,0
	ядрышек нейронов гиппокампа	3,3±0,1	3,7±0,1	4,9±0,1	5,2±0,1	4,2±0,2	4,1±0,1
	ядер нейронов гиппокампа	39,9±1,6	45,4±1,4	77,9±3,9	82,2±3,5	66,2±3,3	69,1±1,9
цитоплазмы нейронов гиппокампа		29,9±1,0	31,7±0,1	49,9±1,7	57,9±1,9	45,7±1,3	46,7±0,9
Толщина коры ПТД, мкм		985,0±14,0	1091,0±22,0	1550,0±13,0	1615,0±8,0	1581,0±30,0	1714,0±19,0
Толщина I слоя ПТД, мкм		87,0±2,3	99,0±3,1	153,0±4,3	166,0±4,3	158,0±4,2	167,0±4,7
Число нейронов в п/з, слой II ПТД		49,2±2,8	36,3±0,6	24,4±0,8	22,8±0,6	18,6±0,5	15,4±0,3
Число нейронов в п/з, слой V ПТД		22,7±1,0	16,4±0,2	10,9±0,4	10,1±0,3	12,6±0,4	9,4±0,3
Площадь, мкм ²	ядрышек нейронов слоя II ПТД	2,8±0,1	3,1±0,1	4,8±0,1	5,0±0,2	3,9±0,1	3,9±0,1
	ядер нейронов слоя II ПТД	23,8±1,0	27,8±1,6	58,7±1,7	62,0±2,8	60,4±2,8	61,5±1,7
	цитоплазмы нейронов слоя II ПТД	23,9±0,9	26,6±1,0	45,6±1,7	51,0±1,5	42,0±1,2	46,8±1,4
	ядрышек нейронов слоя V ПТД	4,0±0,1	5,0±0,2	6,7±0,2	7,3±0,2	5,5±0,2	6,3±0,2
	ядер нейронов слоя V ПТД	47,5±3,3	61,3±2,8	98,2±4,4	107,0±5,1	97,5±4,3	101,0±3,4
	цитоплазмы нейронов слоя V ПТД	37,7±2,8	44,8±2,1	85,4±4,9	94,7±2,6	96,6±4,4	85,1±4,1
Концентрация РНК в цитоплазме нейронов, усл. ед.							
слой II СТД		0,276±0,012	0,328±0,016	0,402±0,014	0,413±0,022	0,288±0,011	0,314±0,014
слой V СТД		0,255±0,014	0,310±0,020	0,416±0,023	0,435±0,025	0,339±0,011	0,367±0,010
гиппокампа		0,315±0,011	0,349±0,018	0,386±0,013	0,422±0,026	0,347±0,014	0,381±0,020
слой II ПТД		0,286±0,021	0,308±0,023	0,394±0,014	0,401±0,012	0,308±0,013	0,306±0,014
слой V ПТД		0,275±0,017	0,287±0,022	0,411±0,025	0,413±0,016	0,341±0,018	0,366±0,019
Активность ферментов, усл. ед.							
НАДН-д в слое II		0,446±0,016	0,460±0,031	0,368±0,018	0,380±0,024	0,392±0,020	0,348±0,017
НАДН-д в слое V		0,367±0,021	0,402±0,019	0,328±0,021	0,371±0,031	0,313±0,013	0,315±0,011
НАДН-д в гиппокампе		0,496±0,024	0,557±0,017	0,375±0,019	0,390±0,022	0,465±0,020	0,468±0,028
НАДФН-д в слое II		0,412±0,017	0,507±0,020	0,416±0,013	0,417±0,020	0,462±0,022	0,445±0,015
НАДФН-д в слое V		0,362±0,013	0,390±0,016	0,382±0,018	0,376±0,021	0,448±0,019	0,405±0,017
НАДФН-д в гиппокампе		0,450±0,012	0,502±0,015	0,412±0,026	0,426±0,021	0,664±0,031	0,597±0,027
Концентрация липидов, усл. ед.							
в слое I		0,360±0,017	0,461±0,030	0,327±0,014	0,395±0,028	0,553±0,039	0,635±0,031
в белом веществе		0,264±0,012	0,303±0,018	0,276±0,015	0,378±0,014	0,382±0,023	0,579±0,041

Примечание: серым выделены ячейки со статистически значимыми отличиями от соответствующего контроля.

что, по-видимому, обусловлено тем, что в первые дни жизни зависимость животных от количества молока и внимания матери особенно сильна. С другой стороны, в данном возрасте важнейшая «деятельность» крысят – получение пищи и контакты с матерью, условия

которых у животных малочисленных и контрольных помётов существенно различались.

Полученные данные свидетельствуют о том, что прирост массы тела и мозга в возрастном интервале от 14 до 30 суток у животных опытной и контрольной

групп не имел значимых отличий, хотя при этом возникшие ранее межгрупповые различия массы тела и массы мозга сохранялись. Уравнивание темпов увеличения массы тела и мозга сравниваемых групп может быть объяснено происходящим с возрастом уменьшением зависимости крысят от матери и началом питания не только материнским молоком. В результате этого различия условий развития в экспериментальных и контрольных пометах значительно уменьшались.

Стабильность межгрупповых различий была неодинаковой у разных показателей развития коры. Мы полагаем, это связано с тем, что исследованные нами морфометрические характеристики можно разделить на две группы. К первой могут быть отнесены толщина неокортекса, его I слоя, численная плотность нейронов во II и V слоях, а также концентрация липидов в I слое и белом веществе. Эти показатели отражают процессы онтогенетического развития мозга [6, 8] и не могут, как и масса мозга и полушария, существенно меняться при кратковременных изменениях функционального состояния. Именно эти показатели имели у животных-акселераторов достоверные отличия от контроля, направленность которых однозначно свидетельствовала об ускоренных темпах развития неокортекса. Вторая группа показателей (размеры разных структур нейронов, их гистохимические характеристики) также претерпевала изменения в процессе онтогенеза мозга. В то же время, они могли меняться и в зависимости от функционального состояния указанных структур [2, 6, 8, 11]. Возможно, что именно этот момент обуславливал разную степень выраженности и стабильности межгрупповых различий.

Таким образом, по мере взросления животных-акселераторов часть имевшихся в ранние периоды жизни различий, отражающих как уровень онтогенеза мозга, так и функциональное состояние нейронов, в большей или меньшей степени нивелируется, что можно расценивать как отражение принципа эквивалентности. В то же время, целый ряд важных морфологических и гистохимических показателей развития мозга, его коры при акселерации отличались от контрольных до конца молочного периода, знаменующего у крыс «приближение» структуры коры мозга к таковой у взрослых животных [6, 8]. В целом, оценивая выявленные возрастные различия, можно полагать, что они могут определять не только функциональные особенности мозга в конкретном возрасте, но и, как следует из данных литературы [8, 9, 13–15], влиять на характер дальнейшего онтогенеза этого органа.

References

1. Avtandilov G.G. Medical morphometry. M.: Meditsina, 1990. 384 p.
2. Gershteyn L.M., Sergutina A.V. Some morphochemical features of the hippocampus of rats that differ in motor activity in the 'open field' // *Neurochemistry*. 2003. Vol. 20, No. 2. P. 116–119.
3. Godina E.Z. The secular trend: History and Prospects // *Human Physiology*. 2009. Vol. 35, No. 6. P. 128–135.
4. Krasilnikov V.A., Buduk-ool L.K., Ayzman R.I. Morphofunctional development of students of the Chuvash and Russian nationalities // *Human Physiology*. 2008. Vol. 34, No. 1. P. 74–81.

5. Loyda Z., Gossrau R., Shibley T. *Histochemistry of enzymes: laboratory methods*. M.: Mir, 1980. 270 p.
6. Maksimova E.V. *The ontogeny of the cerebral cortex*. M.: Nauka, 1990. 183 p.
7. Netrebenko O.K. Nutrition impact on the development // *Pediatrics*. 2007. Vol. 87, No. 3. P. 96–103.
8. Ryzhavskiy B.Ya., Demidova O.V. Effect of sex hormones on brain development. Morphological analysis // *Far Eastern Medical Journal*. 2013. No. 2. P. 100–103.
9. Ryzhavskiy B.Ya., Litvintseva E.M., Uchakina R.V. Comparing the value of brain mass with morphometric and histochemical characteristics of neurons, indices of higher nervous activity in rats in prepubertal ontogenesis // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2009. Vol. 148, No. 8. P. 236–240.
10. Stayer L. *Biochemistry*. Vol. 2 / translated from English. M.: Mir, 1984. 312 p.
11. Hucho F. *Neurochemistry. Fundament and concepts*. Federal Republic of Germany, 1986. 384 p.
12. Guesty P. The role of nutrition in brain development // *Prev. Med.* 1998. Vol. 27, No. 2. P. 269–270.
13. Kesler S.R., Reiss A.L., Vohr B. [et al.]. Brain volume reductions within multiple cognitive systems in male preterm children at age twelve // *J. Pediatr.* 2008. Vol. 152, No. 4. P. 513–520.
14. Maia C.D., Ferreira V.M., Kahwage R.L. [et al.]. Adult brain nitroergic activity after concomitant prenatal exposure to ethanol and methyl mercury // *Acta. Histochem.* 2009. Vol. 4, No. 9. P. 134–139.
15. Räikkönen K., Forsen T., Henriksson M. [et al.]. Growth trajectories and intellectual abilities in young adulthood: The Helsinki Birth Cohort // *Am. J. Epidemiol.* 2009. Vol. 170, No. 4. P. 447–455.

Поступила в редакцию 15.09.2015.

Морфологические особенности головного мозга крыс при акселерации в неонатальном и молочном периодах онтогенеза

Б.Я. Рыжавский, О.В. Ткач

Дальневосточный государственный медицинский университет (680000, г. Хабаровск, ул. Муравьева-Амурского, 35)

Введение. Проведен анализ морфометрических и гистохимических особенностей развития мозга крыс в неонатальном и молочном периодах онтогенеза при выращивании в пометах, численность которых была значительно уменьшена.

Материал и методы. Изучался головной мозг 5-, 14- и 30-дневных крыс из искусственно уменьшенных через сутки после рождения пометов. Контролем служили крысята из интактных пометов. На основании морфометрии анализировали массу мозга и степень развития его коры, состояние нейронов и интенсивность ферментативных реакций.

Результаты исследования. Животные всех возрастных групп из малочисленных пометов отличались значительно увеличенной массой тела, достоверно большими, чем в контроле, массой мозга и полушария. Относительная масса мозга у крысят подопытных групп была меньше, чем в контроле. Экспериментальные животные имели ряд морфологических признаков ускорения созревания коры мозга.

Обсуждение полученных данных. Подопытные животные имели ярко выраженный важный признак акселерации – значительное опережение темпов роста массы тела. Отличия от контроля морфометрических и гистохимических параметров мозга можно расценить как свидетельство интенсификации процессов внутримитохондриального и внемитохондриального биологического окисления. По мере взросления животных-акселераторов часть имевшихся в ранние периоды жизни различий, отражающих как уровень онтогенеза мозга, так и функциональное состояние нейронов, нивелируется.

Ключевые слова: кора мозга, нейроны, дегидрогеназы, морфометрия.

УДК 591.28-005.4: 591.8

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ НЕРВНОЙ ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА В ПОСТИШЕМИЧЕСКОМ ПЕРИОДЕ С ПОЗИЦИЙ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПРОВИЗОРНОСТИ В РЕПАРАТИВНОМ ГИСТОГЕНЕЗЕ

В.В. Семченко¹, С.С. Степанов², С.И. Еревин²

¹ Институт ветеринарной медицины и биотехнологии Омского государственного аграрного университета им. П.А. Столыпина (644008, г. Омск, ул. Институтская пл., 2) ² Омский государственный медицинский университет (644049, г. Омск, ул. Ленина, 12)

Ключевые слова: нейрон, неполный дифферон, провизорный субстрат, крысы.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL RECOVERY OF THE NERVOUS TISSUE OF THE BRAIN IN THE POST-ISCHEMIC PERIOD FROM THE STANDPOINT OF VIEW OF PROVISORY IN REPARATIVE HISTOGENESIS

V.V. Semchenko¹, S.S. Stepanov², S.I. Erevin²

¹ Institute of veterinary medicine and biotechnology of Omsk state agrarian University (2 Institutskaya Sq. Omsk 644008 Russian Federation), ² Omsk state medical University (12 Lenina St. Omsk 644049 Russian Federation)

Background. Education temporary (provisional) of the tissue in the process of reparative histogenesis is typical for bodies formed on the basis of full differones. The incomplete recovery of differones nervous tissue requires further study.

Methods. We conducted an experimental study on sexually mature white rats (n=50), the embryos (n=5) and neonatal (n=5). After acute ischemia was studied structural and functional recovery of the nervous tissue of the cerebral cortex, cerebellum, hippocampus, ventrobasal thalamus and spinal cord. The actual material obtained during light microscopy (hematoxylin and eosin, Nissl) and electron microscopic study of brain dynamics in post-ischemic period.

Results. Found that after ischemia, formed a special provisional substrate, "mobilized" to restore lost functions. It is characterized increased information capacity of the neural network – the excess plastic structural elements (immature, mature contacts, small spikes).

Conclusions. The study made it possible to extend the principle of provisional on incomplete differones was found and examine the temporary substrate as a "tool" for ensuring the execution of essential functions in damaged by ischemia of the brain.

Keywords: neuron, incomplete differon, provisional substrate, rats.

Pacific Medical Journal, 2016, No. 2, p. 98–102.

Репаративный гистогенез – образование новых тканей на месте поврежденных, наблюдается при различных патологических процессах. Тканевая специфичность реализации механизмов репаративного гистогенеза во многом зависит от типа тканевых дифферонов. Полный дифферон содержит клетки всех этапов развития (эритроцитарный или эпидермальный), неполный – переходные и зрелые или даже только зрелые формы клеток (нейрональный). Источником пополнения популяции прогениторных клеток всех типов дифферонов являются плюрипотентные стволовые клетки, не имеющие стойких биомаркеров [4, 5, 8, 11, 13, 15]. Репаративный гистогенез рассматривается как провизорный морфологический субстрат, обеспечивающий структурно-функциональное восстановление органа после его повреждения. Цито- и гистогенез на любом этапе онтогенеза может быть физиологическим,

репаративным и патологическим и существенно отличаться соотношением эмбриональных, фетальных стволовых и зрелых клеток, а также клеточным составом дифферонов в регенерирующих тканях [3, 6, 9].

Известно, что нервная ткань характеризуется в основном внутриклеточной формой физиологической регенерации. В этой ткани, не имеющей необходимых запасов камбиальных клеток и представленной сложными пространственными сетями, происходит непрерывное обновление внутриклеточных ультраструктур и реорганизация межнейронных отношений [9, 10]. В постнатальном периоде нейроны продолжают образовываться в гиппокампе и в обонятельной луковице, небольшая их часть выживает, остальные погибают и поглощаются фагоцитами. В регуляции нейрогенеза основную роль играют стволовые прогениторные клетки ниш нервной ткани, которые обеспечивают образование и удаление новых клеток мозга [1, 14, 15]. Восстановление функционирующих нейронных сетей в других отделах мозга, вероятно, происходит в основном за счет компенсаторной реорганизации структур уже имеющихся нейронов. Особенно это характерно для крупноклеточных нейронных популяций коры головного мозга [9].

Принцип провизорности – это детерминированная способность эмбрионального зачатка и/или его производных (плюрипотентных стволовых и прогениторных клеток) формировать на пути к дефинитивному состоянию временные (провизорные) структуры, обеспечивающие выполнение жизненно важных функций, моделирующие механизмы развития и построения структурно-функциональных единиц или целого органа на уровне дефинитивного морфологического субстрата [12]. Реализация этого принципа при восстановлении нервной ткани требует дальнейшего изучения. Особенно необходимо уточнение провизорного морфологического субстрата, который существует или формируется в разные периоды онтогенеза (в норме и при патологии).

Материал и методы. Изучены кора головного мозга, мозжечка, гиппокамп, вентробазальное ядро таламуса и спинной мозг половозрелых белых крыс линии Вистар массой 180–220 г в норме (5 животных) и в различные сроки после острой остановки системного кровотока (45 животных), вызванной пережатием интубационной трубки (тотальная асфиксия/ишемия), с последующей реанимацией. Кроме того, изучена

цито- и синаптоархитектоника коры головного мозга пяти эмбрионов и пяти новорожденных крысят, перенесших внутриутробную ишемию – пережатие маточных артерий (контроль – 5 и 5 животных, соответственно). Проведено гистологическое, ультрамикроскопическое и морфометрическое исследование образцов ткани головного мозга, направленные на поиск вероятного провизорного субстрата регенерации.

Головной мозг взрослых крыс фиксировали путем перфузии через восходящую часть дуги аорты 4% раствора параформа в 0,1М фосфатном буфере при pH 7,2–7,4, мозг эмбрионов и новорожденных крыс – таким же раствором, но путем иммерсии. Для электронной микроскопии блоки (1×1×0,5 мм) дополнительно обрабатывали в 1% водном растворе четырехоксида осмия. После фиксации и промывки материал заключался в парафин (для гистологического исследования) и в смесь эпон и аралдита (для ультраструктурного исследования). Затем изготавливались серийные фронтальные срезы со всего мозга толщиной 5–7 мкм и прицельные ультратонкие срезы (LKB-III, Ultracut E).

Для гистологического исследования срезы помещали на предметные стекла, окрашивали гематоксилином и эозином, тионином по Нислю, ультратонкие срезы контрастировали цитратом свинца и уранилацетатом по стандартным методикам [2, 7, 9]. С помощью светоптического микроскопа (Leica DM 1000) делались цифровые микрофотографии, а с помощью электронных микроскопов (ЭМВ-100ЛМ и Hitachi-600Н) – электронограммы. На полученных изображениях проводили общую и морфометрическую оценку структурно-функционального состояния нейронов и межнейронных синапсов. Определяли численную плотность нейронов, зрелых и незрелых синапсов, размеры контактов и содержание перфорированных контактов.

Полученные количественные данные обработаны методами вариационной статистики. Проверку статистических гипотез осуществляли при помощи непараметрических критериев. Количество измерений определялось требованиями выявления статистической значимости.

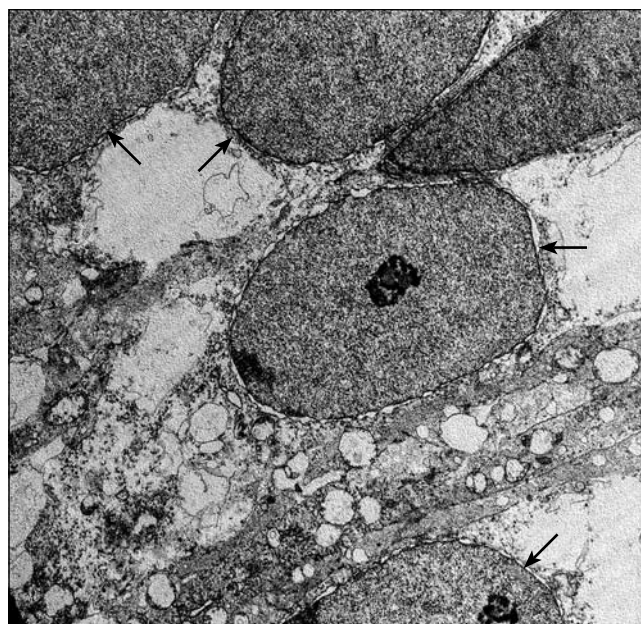


Рис. 1. 18-е сутки эмбриогенеза: группа незрелых нейронов в коре головного мозга белой крысы. Электронограмма, ×7500.

Результаты исследования. До момента формирования отростков и синаптических связей нейроны коры головного мозга обладали высоким пролиферативным потенциалом, а восстановление их популяции происходило за счет деления сохранившихся клеток (рис. 1). Поэтому при ишемическом повреждении головного мозга в эмбриональном периоде и сразу после рождения эти незрелые клетки, как и в любом полном диффероне, могли пролиферировать и быть основой для репаративного гистогенеза провизорного субстрата. По мере формирования нейронных сетей в процессе созревания и накопления информации о внутренней и внешней среде пролиферативный потенциал нервной ткани головного мозга резко снижался. В зрелом мозге деление нейронов отмечалось только в зонах ниш стволовых клеток (рис. 2). В позднем эмбриональном и раннем постнатальном периоде в нервной ткани

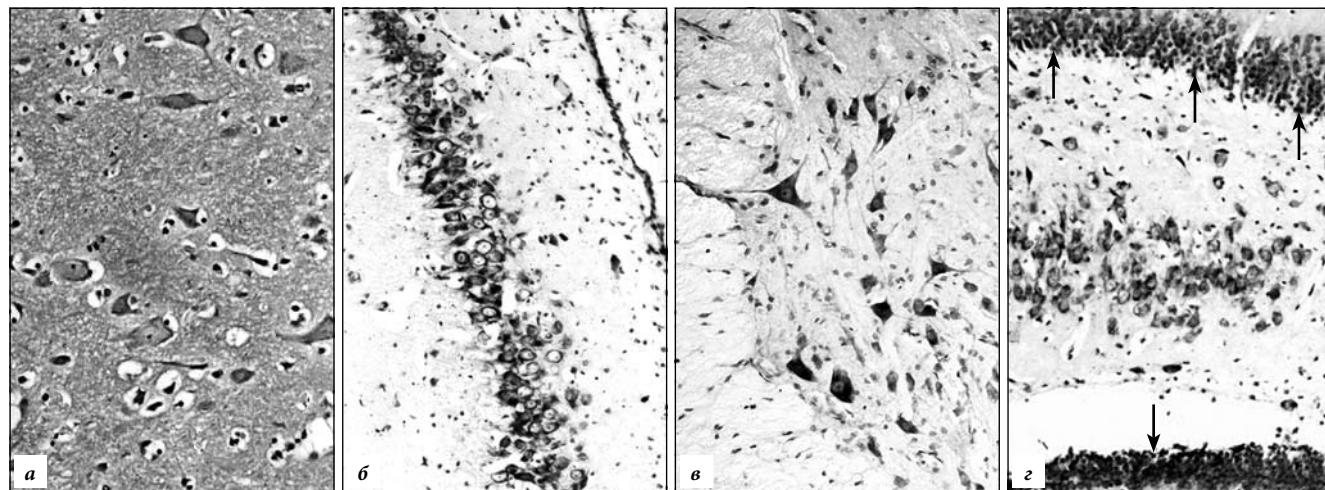


Рис. 2. Зоны зрелого головного мозга с низкой и высокой (стрелки) пролиферативной активностью нейронов: а – кора головного мозга, б – гиппокамп (CA1), в – спинной мозг, г – зубчатая фасция гиппокампа. Окраска по Нислю, ×400.

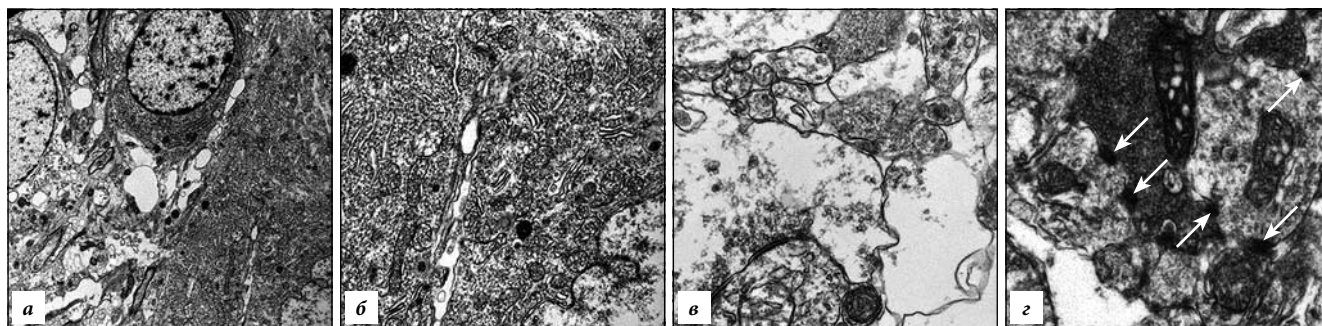


Рис. 3. Зрелые нейроны и синапсы в III слое коры головного мозга после острой ишемии (1–3-и сутки):

а – группа зрелых нейронов, б – гиперплазия внутриклеточных структур зрелого нейрона, в – деструкция синапсов по светлomu типу, г – большое количество мелких контактов (стрелки). Электронограммы, а – $\times 7500$, б – $\times 1500$, в, г – $\times 17500$.

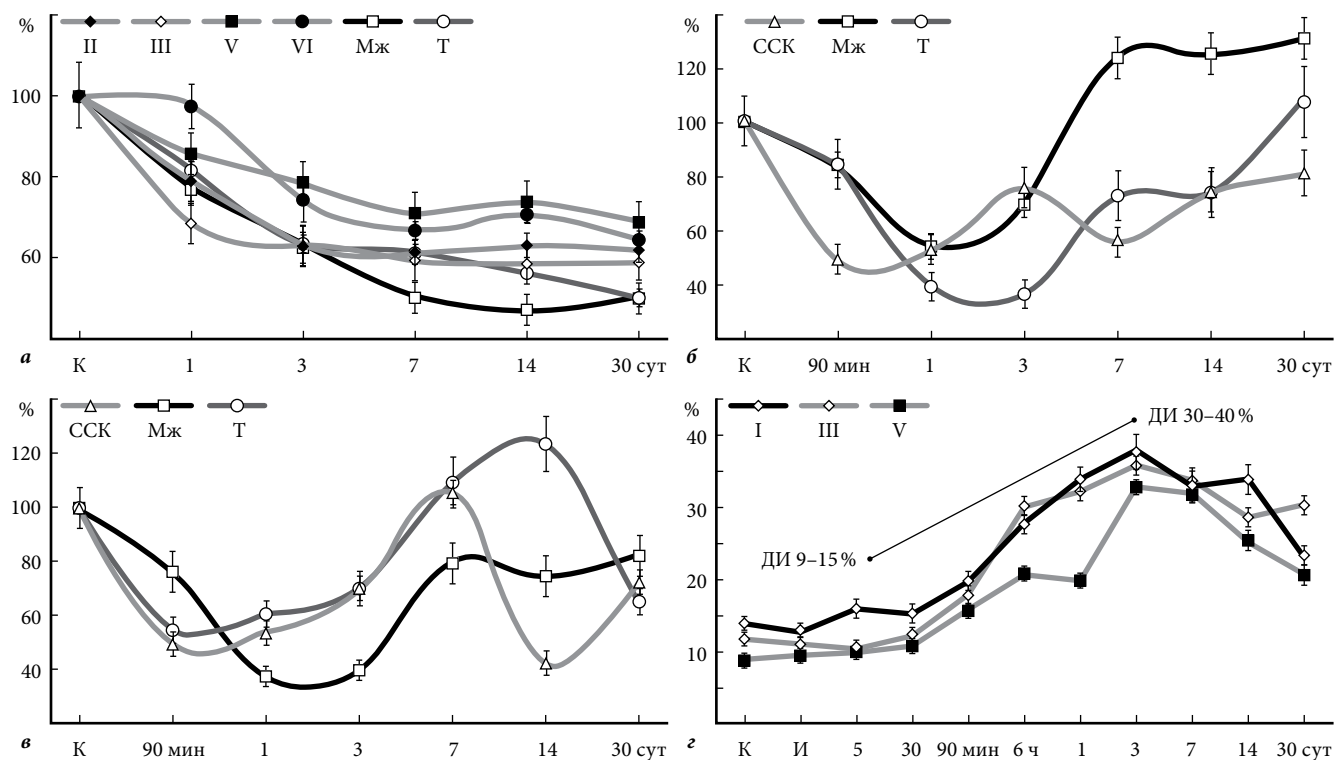


Рис. 4. Относительное содержание нейронов в различных отделах мозга в постишемическом периоде:

а – пирамидных нейронов в коре головного мозга, клеток Пуркинье в коре мозжечка и нейронов в вентробазальном ядре таламуса; зрелых (б), незрелых (в) и перфорированных (г) синаптических контактов (молекулярный слой) в коре головного мозга. I, II, III, V, VI – слои коры, Мж – мозжечок, Т – таламус, ССК – соматосенсорная кора, И – ишемия, К – контроль, ДИ – 95-ный доверительный интервал.

головного мозга, наряду со зрелыми синапсами содержалось большое количество (40–60 %) незрелых мелких (типа десмосом) контактов-предшественников. Эти контакты также могли играть роль провизорного субстрата репаративного гистогенеза.

Структурно-функциональное восстановление зрелого мозга, прежде всего, может быть связано с гиперплазией внутриклеточных органелл, гипертрофией нейронов и реорганизацией межнейронных отношений по типу избыточности пластических элементов (рис. 3). Функциональным императивом формирования необходимого для восстановления функций нервной ткани провизорного субстрата в постишемическом периоде служила деструкция нейронов и межнейронных синапсов (рис. 3, 4). Выявлено прогрессирующее снижение общей численной

плотности нейронов (рис. 4, а) и волнообразная динамика изменения численной плотности межнейронных контактов (рис. 4, б, в). Низкая численная плотность через 1–3 суток сменялась ее увеличением на 7–14-е сутки после ишемии, а также повышением относительного содержания гипертрофированных и перфорированных синапсов (рис. 4, г).

Гиперплазия/гипертрофия синапсов неизбежно вела к расщеплению активных контактов с образованием различных типов перфорированных синапсов и последующей их пространственной реорганизацией в более сложные синаптические устройства – множественные и сочетанные (рис. 5). Это сопровождалось увеличением количества инвагинаций мембран и активным ростом дистальных отростков нейронов (рис. 6), а также – усилением неосинаптогенеза.

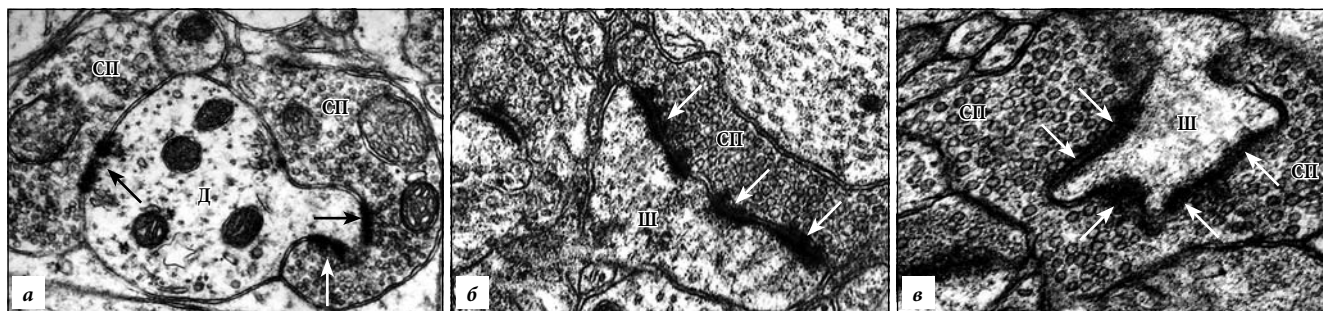


Рис. 5. Сложные синаптические устройства в коре головного мозга после острой ишемии: большое количество активных зон (стрелки), конвергентное усложнение. СП – синаптические пузырьки, Д – дендрит, Ш – шипик. Электронограммы, $\times 18000$.

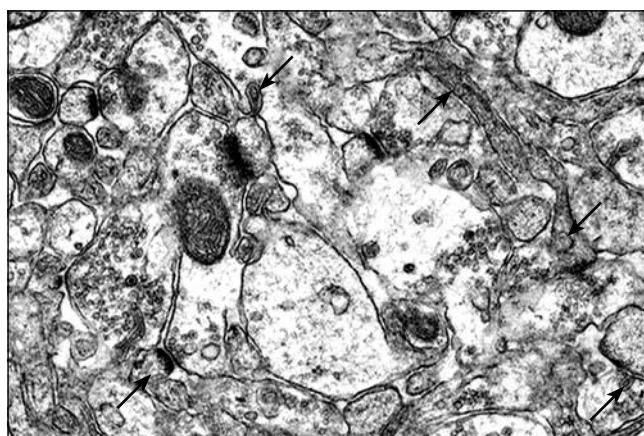


Рис. 6. Нейропил слоя I коры СА1 гиппокампа после острой ишемии (7-е сутки): инвагинации мембран и мелкие отростки нейронов (стрелки). Электронограмма, $\times 12000$.

Из сказанного следует, что провизорный морфологический субстрат репаративного гистогенеза неполных дифферонов зрелого головного мозга крысы после острой ишемии формировался в ответ на ишемическое повреждение части нейронов. Этот процесс характеризовался гиперплазией органелл нейронов, гипертрофией и усложнением синапсов, значительным увеличением плотности мелких незрелых (неосинаптогенез) и зрелых (созревание, реорганизация уже имеющихся) синаптических контактов, а также мелких отростков преимущественно на дистальной части дендритного дерева. При этом происходил своеобразный возврат к онтогенетически более раннему типу нейронных сетей (высокая избыточность содержания пресинапсов) и появлению провизорных гипертрофированных синапсов с высоким потенциалом самопроизвольной трансформации в более эффективные сложные синаптические устройства (простые и множественные перфорированные, сочетанные с конвергентным и дивергентным усложнением пространственной организации).

Обсуждение полученных данных. Анализ материала и сделанные на его основе выводы позволяют распространить принцип провизорности на восстановление неполных дифферонов нервной ткани головного мозга и сформулировать основные закономерности

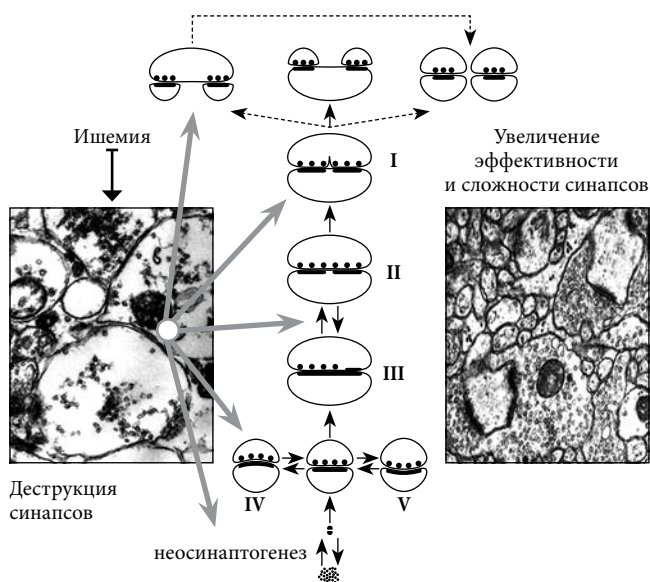


Рис. 7. Схема общих закономерностей реорганизации межнейронных синапсов головного мозга в процессе формирования провизорного субстрата для восстановления его функций в постинишемическом периоде

I – инвагинация мембраны, II – расщепление контакта, III – гипертрофия, IV – созревание, V – активация неповрежденных синапсов.

реорганизации межнейронных отношений головного мозга в процессе репаративной регенерации (рис. 7).

В ответ на ишемию и гибель нейронов на 3–7-е сутки формируется особый провизорный субстрат, «мобилизованный» на восстановление утраченных функций. Для него характерны: 1) связь с ишемией (функциональный императив), 2) повышенная информационная емкость нейронной сети – избыток пластических структурных элементов (незрелые, зрелые контакты, мелкие отростки) и 3) определенная продолжительность существования – до восстановления функций. После достижения дефинитивного структурно-функционального состояния потребность в существовании «энергозатратного» провизорного субстрата отпадает. Нервная ткань начинает функционировать в обычном режиме.

Однако необходимо отметить, что реализация потенциалов сформированного в ответ на острую ишемию мозга провизорного субстрата неизбежно приводит к реорганизации межнейронных отношений и интегративно-пусковой деятельности головного мозга



Рис. 8. Механизмы и конечные результаты реализации потенциального провизорного субстрата нейронных сетей головного мозга половозрелых белых крыс в постиншемическом периоде.

(рис. 8). Поэтому в процессе реорганизации происходит не только восстановление функций, но и возрастает опасность появления дисбаланса возбуждающих и тормозных систем мозга. Превалирование в восстановительном периоде активности одной из систем создает предпосылку к формированию патологических систем головного мозга (патологические детерминанты) [9, 10].

Таким образом, изучение структурно-функциональных механизмов репаративного гистогенеза нервной ткани головного мозга белых крыс позволило получить результаты, которые дают основание распространить принцип провизорности на неполные диффероны и рассматривать найденный временный субстрат как «средство», обеспечивающее восстановление жизненно важных функций в поврежденном мозге на уровне дефинитивного морфологического субстрата.

Изучение репаративного гистогенеза дает возможность получать новые знания, имеющие существенное значение для новых биотехнологий. В этой связи одним из наиболее интересных направлений можно назвать концепцию провизорности гистогенезов и морфогенезов. Накопленные знания позволяют в перспективе понять закономерности восстановления поврежденного головного мозга животных и человека, оценить роль всех составляющих нейронального дифферона (включая и стволовые клетки) в процессе регенерации и стать основой для разработки клеточных и тканевых технологий соответствующего направления (нейробиологического и неврологического) регенеративной биологии и медицины.

References

1. Aleksandrova M.A., Marey M.V. Stem cells in the brain of mammals and humans: fundamental and applied aspects // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2015. Vol. 65, No. 3. P. 271–305.
2. Bogolepov N.N. The ultrastructure of the brain in hypoxia. M.: Meditsina, 1979. 168 p.
3. Borisov I.N., Dunaev P.V., Bazhanov A.N. Phylogenetic bases of animal tissue organization. Novosibirsk: Nauka, 1986. 235 p.
4. Danilov R.K. Wound process: histogenetic bases. StP.: VMedA, 2008. 380 p.
5. Klishov A.A., Grafova G.Ya., Gololobov V.G. [et al.]. Cellular

- organization tissue and the problem of wound healing // *Archive of Anatomy*. 1990. Vol. 98, No. 4. P. 5–23.
6. Klochkov N.D. Gistion as elemental morphofunctional unit // *Morphology*. 1997. Vol. 112, No. 5. P. 87–88.
7. Sarkisov D.S., Perov Yu.L. Microscopic technique: a guide for physicians and laboratory technicians. M.: Meditsina, 1996. 544 p.
8. Semchenko V.V., Ereniev S.I., Stepanov S.S. [et al.]. *Regenerative Biology and Medicine*. Book 1. The gene technology and cloning / edited by V.P. Puzyrev, K.N. Yarygin, V.N. Yarygin, and V.V. Semchenko. Omsk-Moscow-Tomsk: Omsk Regional Press, 2012. 296 p.
9. Semchenko V.V., Stepanov S.S., Bogolepov N.N. Synaptic plasticity of the brain (the fundamental and applied aspects). M.: Direct-Media, 2014. 499 p.
10. Semchenko V.V., Stepanov S.S., bogolepov N.N., Ereniev S.I. Reorganization of the postischemic interneuron synapses, the neocortex of mammals // *Pathological Physiology and Experimental Therapy*. 2012. No. 4. P. 30–34.
11. Semchenko V.V., Stepanov S.S., Teltsov L.P. [et al.]. Methodological aspects of the study of histogenesis in animals and humans // *Morphological News*. 2013. No. 4. P. 69–75.
12. Solovyev G.S., Yanin V.L., Novikov V.D., Pantelev S.M. The principle of provisional morphogenesis. Tyumen: Akademiya, 2004. 128 p.
13. Yarygin K.N., Semchenko V.V., Ereniev S.I. [et al.]. *Regenerative Biology and Medicine*. Book 2. Cell technology in the treatment of nervous system diseases / edited by V.N. Yarygin, V.P. Puzyrev, K.N. Yarygin, and V.V. Semchenko. Ekaterinburg–Moscow–Khanty-Mansiysk: Omsk Regional Press, 2015. 360 p.
14. Aimone J.B., Li Y., Lee S.W. [et al.]. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition // *Physiol. Rev*. 2014. Vol. 94, No. 4. P. 991–1026.
15. Jessberger S., Gage F.H. Adult neurogenesis: bridging the gap between mice and humans // *Trends Cell Biol*. 2014. Vol. 24, No. 10. P. 558–563.

Поступила в редакцию 07.10.2015.

Структурно-функциональное восстановление нервной ткани головного мозга в постиншемическом периоде с позиций представления о провизорности в репаративном гистогенезе В.В. Семченко¹, С.С. Степанов², С.И. Еренев²

¹ Институт ветеринарной медицины и биотехнологии Омского государственного аграрного университета им. П.А. Столыпина (644008, г. Омск, ул. Институтская пл., 2) ² Омский государственный медицинский университет (644049, г. Омск, ул. Ленина, 12)

Введение. Образование временной (провизорной) ткани в процессе репаративного гистогенеза является типичным для органов, сформированных на основе полных дифферонов.

Материал и методы. В эксперименте на белых крысах моделировали тотальную ишемию головного мозга и анализировали в динамике процессы структурного и функционального восстановления нервной ткани с применением гистологических, ультраструктурных и морфометрических методов.

Результаты исследования. После ишемии в нервной ткани формируется особый провизорный субстрат, «мобилизованный» на восстановление утраченных функций. Для него характерна повышенная информационная емкость нейронной сети – избыток пластических структурных элементов (гипертрофия и гиперплазия органелл нейронов, незрелые, зрелые контакты, усложненные синаптические устройства, мелкие отростки).

Обсуждение полученных данных. Проведенное исследование позволило распространить принцип провизорности на неполные диффероны и рассматривать найденный временный субстрат как «средство», обеспечивающее восстановление жизненно важных функций в поврежденном при ишемии мозге.

Ключевые слова: нейрон, неполный дифферон, провизорный субстрат, крысы.

УДК 611.813.1:575.16

ГИСТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ КОРЫ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА В ОНТОГЕНЕЗЕ

*Т.А. Цехмистренко^{1,2}, В.И. Козлов¹,*¹ Российский университет дружбы народов (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8),² Институт возрастной физиологии (119121, г. Москва, Погодинская ул., 8/2)**Ключевые слова:** лобная область коры, нейроны, глия, сосуды.

HISTOPHYSIOLOGIC APPROACH IN THE STUDY OF THE STRUCTURAL ORGANIZATION OF THE HUMAN CEREBRAL CORTEX IN ONTOGENESIS

T.A. Tsekhmistrenko^{1,2}, V.I. Kozlov¹¹ RUDN University (8 Mikluho-Maklaya St. Moscow 117198 Russian Federation), ² Institute of Developmental Physiology (8/12 Pogodinskaya St. Moscow 119121 Russian Federation)**Background.** In the developing cerebral cortex there is a change of histophysiological parameters in accordance with the genetic program and environmental influences. Neurons and their processes, as well as vascular and glial cortical components can be considered as the system of interconnected units, the ratio of which varies at different stages of postnatal development.**Methods.** We have studied the III³ sublayer in the speech-motor area 44 and the integrative area 10 of the frontal region of the cortex of the 119 left cerebral hemispheres in patients of both sexes from birth to 20 years old. Histologic material was Nissl-stained with cresyle violet, and also Peters-stained with alternate argentic nitrate, and with Golgi method. The analysis of virtual images of neurons, fibers, gliocytes, and blood vessels was conducted with the program Image-Tools and stereometric method.**Results.** In postnatal ontogenesis in brain cortical formations on the growth and development associated changes took place in the specific volume of the main microstructural components, leading not only to a change in the structural organization of higher cortical brain formations, but also to the transformation of their natural histophysiology. The most significant changes in the opercular area were observed during the first year, as well as by 3, 5, 8 and 11 years. In anterolateral prefrontal cortex they were observed in the first year of life, in 3–6 years, and also in 9–10 and 12–13 years.**Conclusions.** It was detected the differences of postnatal changes in structures directly involved into information activity, as well as the entities that regulate trophic and metabolic processes in the cortex. It is showed the heterochrony and zonal differences in the rate and timing of the formation of the microstructure and histophysiology frontal cortex at different stages of postnatal ontogeny associated with advancing development opercular area.**Keywords:** frontal region of the cortex, neurons, glia, vessels.

Pacific Medical Journal, 2016, No. 2, p. 103–108.

Сегодня все больше внимания уделяется структурно-функциональной организации распределенных внутрикорковых сетей, составляющих функциональную основу модульной конструкции коры большого мозга [15]. На микроструктурном уровне компоненты сетей формируются нейронами, взаимодействие между которыми обеспечивается нейроглией и кровеносными сосудами. Сюда нужно отнести и внутрикорковые волокна, опосредующие межнейронные связи, и компоненты фиброархитектоники, участвующие в информационных взаимодействиях между нейронами, пиллярными и внутрикорковыми сосудами, а также асинаптические

дендриты нервных клеток церебральной коры (клеток Кахаля–Ретциуса, нитрооксидсинтезирующих нейронов и пр.). Предполагается, что фронтальный отдел коры больших полушарий как в микроструктурном, так и в функциональном плане – образование, наиболее длительно формирующееся в постнатальном онтогенезе [8]. Известно, что фронтальная кора участвует в программировании наиболее сложных форм поведения. В процессе постнатального развития здесь отмечается ряд этапных изменений, благодаря которым расширяются функциональные возможности мозга человека в реализации тех или иных видов умственной и физической деятельности [3].

В неврологии процесс возрастных изменений в нервной системе представляет одну из наиболее актуальных исследовательских проблем. Среди трудностей на пути ее решения – ограничения, накладываемые прижизненными методами визуализации нервных образований. Некоторые возможности открывает сочетание гистологических методик и количественного анализа специфики и направленности возрастных микроструктурных изменений через сравнительно небольшие (годовые) промежутки. В постнатальном онтогенезе увеличиваются размеры нейронов, кроме того, происходит их специализация на морфологическом и функциональном уровнях в соответствии с генетической программой и конкретным местом, занимаемым в системе распределенных функциональных сетей и цитоархитектонических слоев [11]. Глиальный и сосудистый компоненты коры в тесной связи с развивающимися нейронами формируют нейроглио-сосудистые ансамбли [1], которые предлагается рассматривать в качестве морфофункциональных модульных единицы коры головного мозга, т.е. гистофизиологических микросистем. В количественном отношении как глия, так и сосуды также претерпевают возрастные изменения [14]. Объективные представления о возрастных преобразованиях коры большого мозга нельзя получить без количественных данных об изменениях внутрикорковых сосудов [4]. Вызывает интерес, в какой степени и какими из вышеперечисленных компонентов коры большого мозга определяются изменения, протекающие в ней на том или ином возрастном этапе.

В связи с этим, в задачу исследования входило изучение возрастных изменений удельных объемов нейронов, глиоцитов, кровеносных сосудов и внутрикорковых волокон с целью выявления их количественных соотношений на разных этапах постнатального

онтогенеза в лобной области коры. В качестве рабочей гипотезы предполагалось, что гистофизиологический подход позволит выявить различия постнатальных преобразований не только в системе структур, непосредственно участвующих в информационных процессах, но и в системе образований, регулирующих трофические и метаболические процессы в коре.

Материал и методы. С учетом функциональной специализации для исследования были выбраны речедвигательное поле 44 (зона Брока, или оперкулярная зона) и интегративное поле 10 (переднелатеральный отдел префронтальной коры). Важным критерием выбора стало различие в степени влияния на развитие локусов фронтальной коры групп коррелирующих генов, контролирующих формирование лобных долей больших полушарий [9].

С помощью гистологических и количественных методик были изучены фрагменты коры большого мозга, полученные из 119 левых больших полушарий от трупов людей обоего пола в возрасте от рождения до 20 лет, погибших без травм мозга. Кусочки вырезали в области речедвигательного поля 44 и интегративного поля 10. Материал фиксировали в 10 % нейтральном формалине. Парафиновые срезы толщиной 10 мкм изготавливали во фронтальной проекции и окрашивали крезильовым фиолетовым по Нисслию, а также импрегнировали нитратом серебра по методу Петерса в собственной модификации [2]. Часть материала обрабатывали по методу Гольджи, после чего серийные срезы с целлоидиновых блоков толщиной 100 мкм заключали в бальзам.

Компьютерный анализ оптических изображений осуществлялся с применением программы ImageTools (National Institutes of Health, USA). Объемные соотношения структурных элементов определяли с помощью стереологического метода в собственной модификации [6]. При увеличении 15×40 при помощи встроенной в программу 4-узловой оптической сетки со случайным шагом рассчитывали относительные удельные объемы нейронов, волокон, глиоцитов и сосудов в III^3 подслое коры. Среднее число узлов (точек) морфометрической сетки, случайно

попавших на исследуемые структуры, определяло их среднюю долю от общего объема органа. При подсчете структур учитывали экстрацеллюлярный матрикс и неточно опознаваемые объекты (относительное содержание которых в итоге не превысило $3,3\pm 0,4\%$). Всего проводилось по 850–1080 измерений изучаемых компонентов в каждом возрасте при достижении 95 %-ного критерия надежности. Для унификации количественных данных, полученных с различных срезов, использовалась формула А. Аберкромби для подсчета истинного числа микрообъектов с учетом толщины среза. Достоверность различий между средними величинами изучаемых параметров различных возрастных групп или разных корковых полей в одной возрастной группе определяли методами вариационной статистики с вычислением ошибки средней и 95 %-ного доверительного интервала [7].

Результаты исследования. В поле 44 в III^3 подслое коры новорожденных относительное содержание нейронов составило $24,0\pm 1,2\%$, волокон – $14,2\pm 1,4\%$. Удельные объемы нейронов и волокон синхронно увеличивались к концу первого года жизни в 1,3 раза (по сравнению с новорожденными). К 3 годам удельный объем нейронов значимо снижался (в 1,1 раза по сравнению с годовалыми детьми), после чего оставался стабильным до 7 лет. Уменьшение относительного содержания нейронов отмечалось к 8 и 11 годам (в 1,3 и 1,7 раза, соответственно) по сравнению с 3-летними детьми, после чего этот показатель в речедвигательной зоне коры стабилизировался (рис. 1). На фоне снижения относительного содержания нейронов удельный объем внутрикорковых волокон у детей старше 3 лет продолжал увеличиваться, достигая значимых приростов к 5 и 11 годам (в 1,3 и 1,6 раза по сравнению с годовалыми детьми, соответственно). У подростков и юношей тенденция к увеличению волокнистого компонента в верхнем этаже коры сохранялась. К 20 годам удельный объем нейронов в III^3 подслое поля 44 составляет $17,0\pm 2,2\%$, удельный объем волокон – $34,4\pm 2,4\%$.

Удельные объемы глиоцитов и внутрикорковых кровеносных сосудов в III^3 подслое поля 44 лобной коры

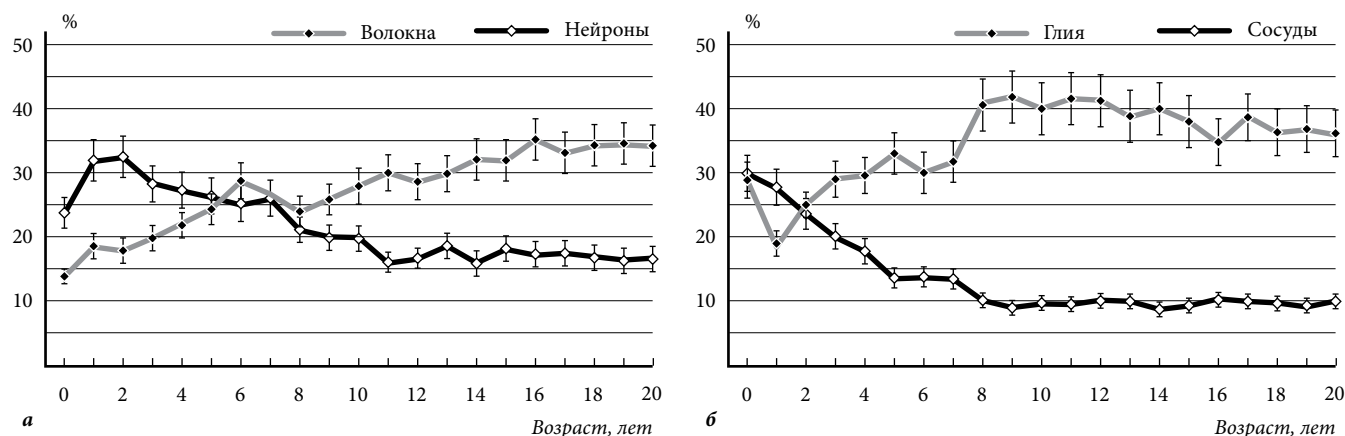


Рис. 1. Удельный объем нейронов и внутрикорковых волокон (а), глиоцитов и внутрикорковых кровеносных сосудов (б) в III^3 подслое поля 44 лобной области коры большого мозга человека от рождения до 20 лет.

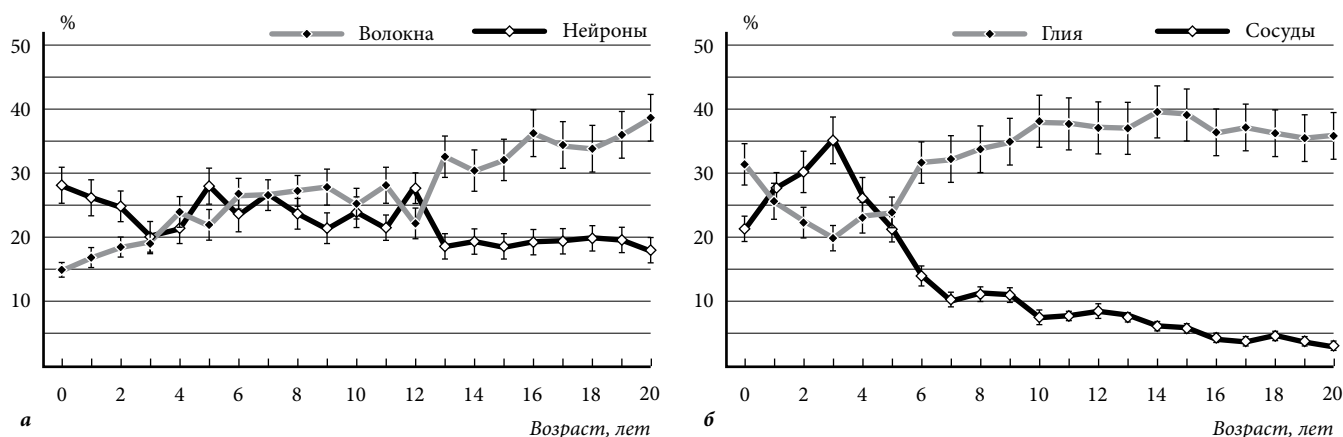


Рис. 2. Удельный объем нейронов и внутрикорковых волокон (а), глиоцитов и внутрикорковых кровеносных сосудов (б) в III³ подслое поля 10 лобной области коры большого мозга человека от рождения до 20 лет.

у новорожденных были примерно равны и составляют, соответственно, $28,6 \pm 1,8$ и $29,8 \pm 1,2$ %. В течение первых двух лет жизни отмечалось их снижение в единице объема мозговой ткани. Относительное содержание внутрикорковой глии уменьшалось в 1,5 раза уже к концу первого года, а удельный объем внутрикорковых кровеносных сосудов – в 1,3 раза к концу второго года жизни. У 3-летних детей, динамика возрастных изменений глиального компонента в зоне Брока принципиально менялась: удельный объем глиоцитов вновь нарастал, практически до уровня новорожденных, и оставался относительно стабильным до 8 лет, когда снова наблюдалось его увеличение в 1,4 раза по сравнению с 3-летним возрастом. Удельный объем микрососудов уменьшался к 5 и 8 годам по сравнению с 2-летним возрастом в 1,7 и 2,3 раза, соответственно. После 8 лет относительное содержание глии и внутрикорковых сосудов оставалось стабильным, и к 20 годам их удельные объемы равнялись $36,0 \pm 6,2$ и $10,0 \pm 1,2$ %, соответственно.

В поле 10 III³ подслоя коры новорожденных соотношение удельных объемов нейронов и волокон ($28,2 \pm 2,4$ и $15,1 \pm 1,6$ %) мало отличалось от аналогичных показателей в поле 44, однако динамика их возрастных изменений оказалась несколько иной (рис. 2). Относительное количество нейронов в ассоциативном слое от рождения до 2 лет демонстрировало тенденцию к снижению, значимо уменьшаясь к 3 годам (в 1,4 раза по сравнению с новорожденными). От 3 до 12 лет отмечались колебания среднестатистических показателей относительного содержания нейронов порядка 7,5–8 %, включавшие увеличение удельного объема нейронов к 5 и 12 годам с последующим снижением к 9 и 13 годам. После 13 лет содержание нейронов в поле 10 стабилизировалось. Волокнистый компонент коры так же, как и в поле 44, имел постоянную тенденцию к нарастанию (рис. 3). Значимый прирост здесь наблюдался к 3 (в 1,3 раза), 6 (в 1,8 раза) и 13 (в 2,2 раза) годам. К 20-летнему возрасту удельный объем нейронов в III³ подслое поля 10 составлял $18,1 \pm 1,6$ %, удельный объем волокон – $38,6 \pm 2,8$ %.

Стереометрический анализ содержания глиоцитов и внутрикорковых кровеносных сосудов в III³ подслое

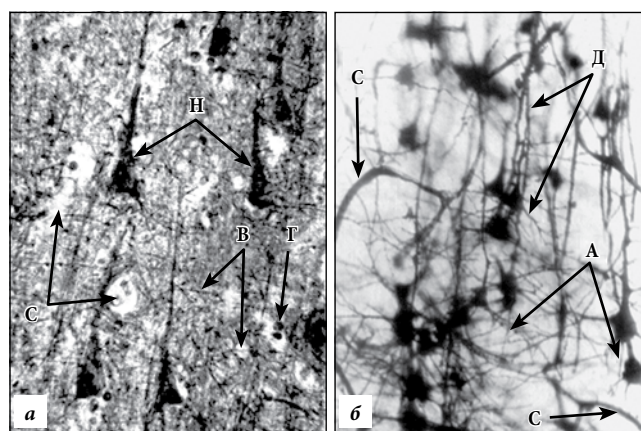


Рис. 3. Структура коры большого мозга:

а – подслей III³ в поле 10, юноша 16 лет; б – слой III в поле 44, ребенок 1 года 4 мес. Н – тела нейронов, В – внутрикорковые волокна, С – кровеносные сосуды, Г – глиоциты, Д – дендритные арборизации, А – аксоны нейронов; а – импрегнация нитратом серебра по Петерсу с докраской крезоловым фиолетовым по Нисслю, $\times 200$; б – импрегнация нитратом серебра по Гольджи, $\times 90$.

поля 10 показал, что у новорожденных глиальный компонент составлял $31,8 \pm 1,6$ %, а сосудистый – $21,9 \pm 0,9$ % объема ткани мозга. В течение первого года жизни в этом локусе коры удельный объем внутрикорковой глии достоверно уменьшался в 1,2 раза, а удельный объем микрососудов увеличивался в 1,3 раза. После первого года жизни удельный объем глиоцитов продолжал уменьшаться до 3 лет (в 1,3 раза), а удельный объем микрососудов – увеличиваться (в 1,3 раза) по сравнению с годовалыми детьми. После 3 лет, как и в поле 44, следовал этап стабилизации относительного содержания глии. Он продолжался до 6 лет, когда отмечалось значимое увеличение удельного объема глиоцитов в 1,6 раза по сравнению с 3 годами жизни. Удельный объем микрососудов по сравнению с 3-летним возрастом уменьшался к 6 годам в 2,4 раза и к 10 годам – в 4 раза. У 16–20-летних на фоне значительной индивидуальной изменчивости количественных данных в поле 10 фронтальной коры намечалась некоторая тенденция к нарастанию удельных объемов глиоцитов и снижению удельных объемов микрососудов (рис. 4). К 20 годам эти показатели составляли $36,1 \pm 6,6$ и $4,3 \pm 1,3$ %, соответственно.

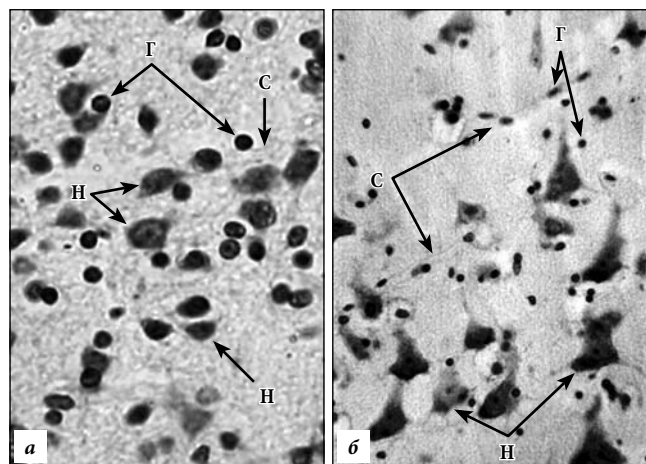


Рис. 4. Слой III в поле 10 коры большого мозга:
а – ребенка 2 лет; б – юноши 16 лет. Н – тела нейронов, С – кровеносные сосуды, Г – глиоциты. Окр. кризильовым фиолетовым по Нислю, $\times 200$.

Обсуждение полученных данных. Анализ соотношения удельных объемов нейронов и волокон позволил на количественной основе подтвердить, что у новорожденных в ткани мозга на уровне III³ подслоя коры лобной области относительное содержание нейронов больше, чем волокон. Этот факт соответствует представлениям о том, что на ранних этапах постнатального онтогенеза III цитоархитектонический слой верхнего этажа фронтальной коры отличается густоклеточностью, содержит незрелые нейроны малых размерных классов и имеет слабо развитую фибро- и миелоархитектонику. Густоклеточность особенно четко прослеживается в корковых зонах гетеротипического типа, таких как префронтальное поле 10. Интересно, что такое соотношение между нейрональным и волокнистым компонентом коры сохраняется в поле 44 от рождения до 3–4 лет, а в поле 10 – от рождения до 2 лет.

Кроме того, в поле 10 префронтальной коры новорожденных относительная плотность нейронов больше, чем в поле 44 оперкулярной зоны лобной области. Ранее нами было показано, что у детей первого месяца жизни толщина III³ подслоя в речедвигательных полях в среднем на 30–35 % меньше, чем в поле 10, но в течение первых 6 месяцев его утолщение происходит быстрее, чем в ростральном поле префронтальной коры [13]. По нашему мнению, эти детали могут указывать на малоизученные различия в темпах и интенсивности нейрогенеза в отдельных зонах фронтальной коры не только в грудном возрасте, но и в дородовом периоде [10].

Наблюдаемые нами различия возрастной динамики преобразований в полях фронтальной коры дают весомые аргументы против популярной гипотезы об идентичности процессов постнатального развития во всех корковых локусах больших полушарий. Так, в оперкулярной зоне коры увеличение размеров нейронов и их дифференцировка, сопровождающиеся усложнением фиброархитектоники, уже к концу первого года жизни приводят к значимому увеличению удельных объемов нейронов и волокон. Эти процессы настолько интенсивны в поле 44 (сугубо человеческом), что заметны вопреки значительному разрежению коры

и снижению количества нервных клеток в результате их естественной генетически запрограммированной гибели. В поле 10 дифференцировка нейронов и усложнение межнейронных связей на первом году жизни протекает менее интенсивно, чем в поле 44. Поэтому нарастания удельного объема нейронов и волокон в этом поле не регистрируется.

На возрастном отрезке от 5 до 8 лет в поле 44 и от 3 до 12 лет в поле 10 различия в удельных объемах нейронов и волокон большей частью недостоверны. На этом этапе развития нейроны приобретают специализированную форму, выявляются нервные клетки, относящиеся к крупноклеточным классам, четко оформляются миелоархитектонические слои (в частности, полоска Кез–Бехтерева в III слое). К 7–9 годам затухают процессы увеличения толщины цитоархитектонических слоев и коры в целом. Обращает на себя внимание, что значимое увеличение относительного содержания волокон по сравнению с нейронами в коре оперкулярной зоны происходит на 4 года раньше, чем в коре латеральной поверхности лобного полюса. В то же время, несмотря на сохранение некоторой тенденции к усложнению фиброархитектоники в коре лобной области подростков и юношей, объем волокнистого компонента к 20 годам в обоих полях практически одинаков. Из этого следует, что в ростральных отделах латеральной префронтальной коры отмечается более длительное по сравнению с речедвигательной зоной формирование внутрикорковых, межкорковых и проекционных связей в системе функционально специализированных распределенных сетей мозга. Это мнение находит подтверждение в исследованиях, продемонстрировавших значительный прогресс в повышении эффективности избирательного внимания и произвольной регуляции движений у детей от 7–8 до 12 лет.

Анализ возрастной динамики удельного объема глиоцитов и кровеносных внутрикорковых микрососудов показал, что в изученных полях у новорожденных этот компонент составляет около 54–58 % ткани мозга. С возрастом данный показатель снижается, достигая к 20 годам 40–46 % (в основном за счет уменьшения удельного объема микрососудов). Из этого отнюдь не следует, что в постнатальном онтогенезе снижается уровень васкуляризации лобной коры. Речь идет об изменении объемных соотношений, зависящих от темпа и интенсивности изменений всех микроструктурных компонентов в целом. Динамика изменений в паре «глия–сосуды» также позволяет выявить ряд специфических и локальных возрастных особенностей. Так, в поле 44 снижение удельного объема микрососудов происходит от рождения до 8 лет, после чего наступает стабилизация на довольно высоком уровне. В поле 10 от рождения до 3 лет прослеживается нарастание содержания внутрикорковых микрососудов, после чего происходит довольно резкое снижение этого показателя, несколько замедляющееся после 9–10 лет. По нашему мнению, характер изменений удельного объема кровеносных сосудов в поле 10 может

свидетельствовать о некотором отставании в развитии его микроструктуры по сравнению с оперкулярной зоной, что особенно четко проявляется у новорожденных и в период раннего детства.

Как следует из полученных данных, одной из причин снижения удельного объема микрососудов является увеличение глиального компонента, особенно выраженное в обоих полях после 6 лет. Известно, что по мере постнатального развития и этапного перехода от детского возраста к взрослому происходит повышение надежности и экономизация функций живого организма. Вероятно, нарастание удельного объема глиоцитов отражает оптимизацию метаболических процессов в коре в условиях повышения ее функциональной активности при реализации все более сложных механизмов мозговой деятельности. Ранее нами было показано, что возрастная биохимическая дифференцировка свободно лежащей и сателлитной астроцитарной глии также носит этапный характер: у детей от 2 до 6–7 лет отмечается наименьшее содержание нуклеиновых кислот в сателлитных глиоцитах, что свидетельствует о повышенном напряжении метаболических процессов в нервной ткани. Возможно, последнее служит одним из стимулирующих факторов, приводящих к наращиванию относительного количества глии в коре, которое, в свою очередь, способствует стабилизации функциональной системы «нейрон–глия–сосуды» и повышению ее резервных возможностей. Об этом у подростков свидетельствует увеличение вариабельности содержания нуклеиновых кислот в астроцитах (по сравнению с детьми 8–11 лет), а также появление значительной фракции свободно лежащих глиоцитов с высоким суммарным содержанием нуклеиновых кислот [5].

Возможно, снижение с возрастом удельных объемов внутрикорковых сосудов в сочетании с синхронным увеличением объема глиального компонента носит системный, генетически запрограммированный и, в известной степени, компенсаторный характер. Основанием для подобного предположения служит многообразие путей влияния астроцитарной глии на тонус внутрикорковых артериол. Интересно, что в регуляции объема сосудов в коре могут участвовать внутримозговые нервные клетки ядер шва, голубоватого пятна и базальных ядер. Имеются данные об афферентной иннервации ими пиальных и внутримозговых сосудов, доказанные экспериментально [12]. Неисключено, что в регуляции соотношения глиального и сосудистого компонентов задействованы механизмы рецепции межклеточного пространства мозга и регуляции гомеостаза экстрацеллюлярной жидкости в его тканях.

Заключение

Таким образом, в постнатальном онтогенезе в корковых формациях мозга по мере роста и развития происходят сопряженные изменения удельных объемов основных микроструктурных компонентов, приводящие

к закономерным преобразованиям гистофизиологии коры. Направленность этих преобразований в топографически и функционально различных зонах коры носит сходный характер. Вместе с тем показаны зональные отличия по темпам и срокам формирования микроструктуры фронтальной коры на различных этапах постнатального онтогенеза, определяющие опережающее развитие оперкулярной зоны по сравнению с префронтальной корой. В оперкулярной зоне наиболее значимые изменения отмечаются в течение первого года жизни, а также к 3, 5, 8 и 11 годам. В переднелатеральной префронтальной коре они наблюдаются на первом году жизни, в 3–6 лет, а также к 9–10 и 12–13 годам. Полученные данные служат убедительным доказательством информативности гистофизиологических критериев для изучения сроков и интенсивности морфофункциональных перестроек микроструктурной организации коры большого мозга в постнатальном онтогенезе.

References

1. Antonova A.M. Ensemble organization of the motor area of the cortex of the adult human brain // *Archive of Anatomy, Histology, and Embryology*. 1977. Vol. 73, No. 11. P. 22–23.
2. Antonova A.M., Stepanova S.B. Modification of the method of Peters in relation to cytological studies // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1973. Vol. 75, No. 4. P. 122–124.
3. Kozlov V.I., Tsekhmistrenko T.A., Chernykh N.A. Patterns and periodization of the development of screen human brain structures in postnatal ontogenesis // *Journal of Peoples' Friendship University [edition «Medicine»]*. 2006. No. 2. P. 9–13.
4. Motavkin P.A., Chertok V.M. *Histophysiology vascular mechanisms of cerebral circulation*. M.: Meditsina, 1980. 200 p.
5. Semenova L.K., Vasilyeva V.A., Tsekhmistrenko T.A. [et al.] Structural transformations of the human cerebral cortex in postnatal ontogenesis // *Physiology of Child Development*. M.–Voronezh: MODEK, 2010. P. 132–200.
6. Stefanov S.B., Kukharensko N.S. Accelerated methods of quantitative comparison of morphological features and systems. Blagoveshchensk: VSHI, 1989. 65 p.
7. Strelkov R.B. *Rapid method of statistical processing of experimental and clinical data*. M.: 2nd Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, 1986. 86 p.
8. Tsekhmistrenko T.A., Vasilyeva V.A., Shumeyko N.S. [et al.]. Quantitative changes fibrosis architectonics of the cerebral cortex of man from birth to 12 years // *Morphology*, 2003. Vol. 124, No. 4. P. 18–24.
9. Chen C.H., Panizzon M.S., Eyler L.T. [et al.]. Genetic influences on cortical regionalization in the human brain // *Neuron*. 2011. Vol. 72. P. 537–544.
10. Cholfin J.A., Rubenstein J.L. Frontal cortex subdivision patterning is coordinately regulated by Fgf8, Fgf17, and Emx2 // *J. Comp. Neurol.* 2008. Vol. 509. P. 144–155.
11. Elston G.N. The pyramidal neuron in occipital, temporal and prefrontal cortex of the owl monkey (*Aotus trivirgatus*): regional specialization in cell structure // *European Journal of Neuroscience*. 2003. Vol. 17. P. 1313–1318.
12. Hamel E. Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone // *J. Appl. Physiol.* 2006. Vol. 100, No. 3. P. 1059–1064.
13. Semenova L.K., Vasilyeva V.A., Tsekhmistrenko T.A. Structural transformations of the cerebral cortex in postnatal ontogenesis // *Pediatric Behavioural Neurology*. Vol. 4: *Developing Brain and Cognition*. Amsterdam: Suyi Publications, 1993. P. 9–43.
14. Senitz D., Reichenbach A., Smithy T.G. Surface complexity of human neocortical astrocytic cells: changes with development,

- aging and dementia // J. Brain Res. 1995. Vol. 346. P. 531–537.
15. Zylberberg A., Slezak D.F., Roelfsema P.R. [et al.]. The brain's router: a cortical network model of serial processing in the primate brain // PLoS Computational Biology. 2010. Vol. 6, No. 4. P. e1000765. 23 p.

Поступила в редакцию 07.10.2015.

Гистофизиологический подход в изучении структурной организации коры мозга человека в онтогенезе

Т.А. Цехмистренко^{1,2}, В.И. Козлов¹

¹ Российский университет дружбы народов (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8), ² Институт возрастной физиологии (119121, г. Москва, Погодинская ул., 8/2)

Введение. В развивающейся коре большого мозга происходит изменение гистофизиологических параметров в соответствии с генетической программой и внешнесредовыми воздействиями. Нейроны, их отростки, а также глиальный и сосудистый компоненты коры могут рассматриваться в качестве взаимосвязанных системных звеньев, соотношение которых изменяется на разных сроках постнатального развития.

Материал и методы. Исследован III³ подслон в области речедвигательного поля 44 и интегративного поля 10 лобной области коры 119 левых больших полушарий людей обоего пола в возрасте от рождения до 20 лет. Гистологический материал

окрашивался крезильовым фиолетовым по Нисслю, а также нитратом серебра по Петерсу в модификации и методом Гольджи. Анализа виртуальных изображений нейронов, волокон, глиоцитов и кровеносных сосудов проводился при помощи программы Image-Tools и стереометрического метода.

Результаты исследования. В постнатальном онтогенезе в корковых формациях мозга по мере роста и развития происходили сопряженные изменения удельных объемов основных микроструктурных компонентов, приводящие не только к изменению структурной организации высших корковых формаций мозга, но и к закономерным преобразованиям их гистофизиологии. В оперкулярной зоне наиболее значимые изменения отмечались в течение первого года, а также к 3, 5, 8 и 11 годам. В переднелатеральной префронтальной коре они наблюдались на первом году жизни, в 3–6 лет, а также к 9–10 и 12–13 годам.

Обсуждение полученных данных. Выявлены различия постнатальных преобразований структур, непосредственно участвующих в информационной деятельности, а также образований, регулирующих трофические и метаболические процессы в коре. Показаны гетерохронность и зональные отличия по темпам и срокам формирования микроструктуры и гистофизиологии фронтальной коры на различных этапах постнатального онтогенеза, связанные с опережающим развитием оперкулярной зоны.

Ключевые слова: лобная область коры, нейроны, глия, сосуды.

УДК 616.831-002-06:616.5-004.1

СКЛЕРОДЕРМИЧЕСКАЯ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛОПАТИЯ

Ю.В. Каминский, Н.Ю. Матвеева, Ю.А. Матвеев

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

Ключевые слова: системная склеродермия, центральная нервная система, дезорганизация соединительной ткани, микроциркуляторное русло.

SCLERODERMIC ENCEPHALOMYELOPATHY

Yu.V. Kaminsky, N.Yu. Matveeva, Yu.A. Matveev

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

Background. The study objective is to identify the structural patterns of central nervous system lesions in systemic sclerosis (SSc). **Methods.** It have been studied the results of autopsies of 12 women 44–56 years old, suffering from SSc. We used a set of neurohistological and morphometric methods.

Results. Different morphological changes were registered in all the structures of the central nervous system: sheaths, vessels, glial tissue, neurons and nerve fibers. The degree of their severity, topography, and extent depended on the severity of the disease. It was obtained a combination of major structural aspects – mucoid swelling, fibrinous changes, a variety of cellular responses, vasculitis, multiple sclerosis and hyalinosis.

Conclusions. The complex of these changes in the central nervous system in SSc can be characterized as sclerodermic encephalomyelopathy.

Keywords: systemic scleroderma, central nervous system, disorganization of connective tissue, microcirculatory bloodstream.

Pacific Medical Journal, 2016, No. 2, p. 108–112.

Системная склеродермия (ССд) относится к группе болезней, для которых характерна системная дезорганизация соединительной ткани и стенок сосудов с исходом в генерализованный склероз [5]. Общеизвестно, что

кожные изменения при ССд являются частным синдромом. Более грозным проявлением служит вовлечение в патологический процесс внутренних органов, в сосудах которых развиваются эксудативно-продуктивные изменения с исходом в своеобразный циркулярный склероз интимы [2]. Поражение сосудов при болезнях соединительной ткани по частоте и значимости выделены в отдельный морфологический признак [15].

Несмотря на достижения последних десятилетий в изучении ССд остается много вопросов, требующих специального исследования. Например, состояние нервной системы исследовано здесь недостаточно, хотя ее роль в патогенезе ССд весьма значительна, а в происхождении ряда симптомов – несомненна [7]. Отсутствующие в историях болезни указания на различную неврологическую симптоматику при ССд можно объяснить недостаточно целенаправленным неврологическим обследованием пациентов. Н.Г. Гусева [2] при тщательном анализе выявила различную неврологическую симптоматику у 52,5% лиц, страдавших данной патологией. И современные авторы – M.S. Abers et al. [7] и J.Y. Streifler и Y. Molad [15] – указывают на частое поражение центральной нервной системы при ССд.

Цель настоящей работы заключалась в выявлении с помощью комплекса морфологических, нейрогистологических и морфометрических методов структурных закономерностей поражений центральной нервной системы при ССд.

Каминский Юрий Валентинович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии, судебной медицины и права ТГМУ; e-mail: nymatveeva@mail.ru

Материал и методы. Изучены результаты аутопсий 12 женщин 44–56 лет, страдавших ССд: острое течение с активностью III ст. (4 человека), подострое течение с активностью II ст. (4 человека) и хроническое течение с активностью I ст. (4 человека). Взятие материала проводилось в 1983–2009 гг. в патолого-анатомических отделениях г. Владивостока и Бюро СМЭ Приморского края не позднее 12–15 часов после наступления смерти. Клинический и патологоанатомический диагнозы во всех случаях совпадали. Для сравнения использован материал аутопсий 10 «практически здоровых» женщин аналогичного возраста, погибших от травм (контрольная группа). Критериями включения в группу «практически здоровые» явилось отсутствие при жизни (согласно записям в медицинской документации, запрошенной из соответствующих медицинских учреждений) жалоб на состояние здоровья.

Исследование выполнено с учетом существующих этических норм и правил, в соответствии с приказом Министерства здравоохранения РФ № 354н от 06.06.2013 г. «О порядке проведения патологоанатомических вскрытий» и приказом Минздравсоцразвития России № 346н от 12.05.2010 г. «Порядок организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации».

Исследовали оболочки и ткань головного мозга. Твердая мозговая оболочка изучалась в пяти отделах: большой и малый серповидный отростки, области верхнего сагиттального и поперечного синусов, диафрагма турецкого седла. Мягкая мозговая оболочка иссекалась в области пахионовых грануляций, передних центральных извилин, нижней лобной извилины, затылочной доли, основания обонятельного мозга, аммонова рога, окружности перекреста зрительных нервов. Сосудистые сплетения выделялись целиком из боковых, третьего и четвертого желудочков мозга. Кора головного мозга изучалась в области передней центральной извилины (4 и 6 поля), задней центральной извилины (1, 2, 3 и 5 поля), нижней лобной извилины (44 поле), средней лобной извилины (8 поле), затылочной доли (17 поле), аммонова рога (11 поле). Изучались оба зрительных бугра, гипоталамус, варолиев мост (трапециевидное тело, собственные ядра серого вещества, ретикулярная формация), новое и старое полосатое тело (хвостатое и бледное ядра), продолговатый мозг на трех уровнях (зубчатое ядро, оливы, ретикулярная формация, ядра подъязычного, блуждающего, языкоглоточного и добавочного нервов), ножки мозга (черная субстанция и красное ядро), мозолистое ядро. Из каждой стенки четырех мозговых желудочков забирались участки эпендимной оболочки вместе с подлежащей тканью. Спинной мозг исследовался вместе с оболочками в пяти отделах: 5–7 шейные сегменты, 2–5 и 10–12 грудные сегменты, 2–5 поясничные сегменты, «конский хвост».

После забора образцы фиксировали в 10% нейтральном формалине на фосфатном буфере в течение 24 часов, после чего промывали в 0,1М натрий-

фосфатном буфере (рН 7,2) с 6–7-кратной сменой раствора, обезжировали и заливали в парафин по обычным правилам. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и по Ван-Гизону. Из нейростологических методов использовались окраска по Ниссля и импрегнация серебром по Кахалю и Кампосу. По мере необходимости применяли гистохимические методы Риттер–Олессона и Хейла, окраски конго-рот и по Клюверу–Баррера.

Глиальный индекс подсчитывали в коре передней центральной извилины (4 поле), коре затылочной доли (17 поле), зрительном бугре (переднее ядро), гипоталамусе (серый бугор) и продолговатом мозге (уровень ядер блуждающих нервов и ретикулярной формации). Подсчет выполнялся на серийных парафиновых срезах толщиной 5 мкм, окрашенных по методу Ниссля, в 50 полях зрения посредством окуляр-микрометра под объективом 40х и окуляром 7х. Нейроны учитывались только в том случае, если срез проходил через ядрышко. Нейроглиальный индекс вычислялся путем деления показателей плотности глиальных клеток на плотность нейронов [1]. Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики.

Результаты исследования. Структурной сущностью системной склеродермии наряду с распространенной сосудистой патологией считается генерализованная прогрессирующая дезорганизация соединительной ткани, что и обуславливает поражение различных органов, в том числе и нервной системы [15].

В твердой мозговой оболочке мелкие очаги мукоидно-фибриноидных изменений локализовались преимущественно в стенке венозных сосудов и сопровождалась умеренной перифокальной лимфоидно-плазмноклеточной реакцией. Следует отметить преобладание распространенных полей фиброза. Только в одном наблюдении выявлены флебиты, артериолиты, фибриноидный некроз единичных артериол и венул, а также интимы крупных венозных стволов.

Дистрофические и склеротические изменения в мягкой мозговой оболочке выявлялись с большим постоянством, но также сопровождалась умеренными клеточными реакциями (табл. 1). На значительном протяжении мягкая мозговая оболочка была резко утолщена, листки ее сращены. В таких участках среди полей фиброза просматривались кистозно расширенные полости, петрификаты. Иногда встречались очаги мукоидно-фибриноидных изменений соединительной ткани с незначительной перифокальной клеточной реакцией. Поражение микроциркуляторного русла было

Таблица 1
Толщина мягкой мозговой оболочки при ССд ($M \pm m$)

Группа наблюдения	Толщина оболочки, мкм	
	Головной мозг	Спинной мозг
Контроль	21,1±0,3	22,3±0,2
ССд, акт. III	32,7±0,2	27,1±0,2
ССд, акт. II	70,3±0,4	65,3±0,9
ССд, акт. I	91,6±0,2	88,4±0,2

представлено единичными фибриноидно измененными артериолами и венулами, эндоваккулитами. Постоянно отмечался артерио-, флебо- и капиллярсклероз. Весьма характерным следует считать циркулярный склероз интимы, сопровождавшийся значительным сужением просвета сосуда (рис., а–г). Это явление уже отмечалось многими авторами при ССд в других органах. Арахноэндотелий оказался относительно спокоен. Отдельные нервные волокна демиелинизировались, варикозно изменялись, частично фрагментировались. Обращал на себя внимание выраженный склероз пахионовых грануляций с обилием псаммомных телец. В отдельных сохранившихся полостях просматривались форменные элементы крови.

Весьма интересные изменения развивались в строении сосудистых сплетений головного мозга. При остром течении болезни отмечались яркие признаки мукоидно-фибриноидных изменений соединительной ткани со слабой перифокальной лимфоидно-плазмноклеточной инфильтрацией. При подостром и хроническом течении ССд формировались обширные поля фиброза с петрификатами (рис., б, д).

Закономерны изменения в сосудах, преимущественно микроциркуляторного русла, в виде фибриноидного набухания отдельных артериол и венул, воспалительных изменений с исходом в склероз, но без явлений гиалиноза. Отмечалась локальная пролиферация эндотелия, его дистрофические изменения с последующей десквамацией отдельных клеток.

Несколько меньше были выражены изменения эпендимальной оболочки. В артериолах и венулах подэпендимального слоя визуализировались воспалительные и дистрофические феномены, мелкие и крупные кровоизлияния. Но постоянными и характерными были поля фиброза в подэпендимальном слое III желудочка. Эпендимальный эпителий в отдельных местах дистрофически изменялся и слущивался. При подостром течении ССд отмечались сосочковидные разрастания в эпендиме боковых и III желудочков мозга и значительное сужение водопровода с развитием внутренней гидроцефалии.

Как известно, внутримозговые паренхиматозные изменения складываются из поражения сосудистого, преимущественно микроциркуляторного, русла и структурных нарушений нервных элементов. Самые глубокие и разнообразные изменения при ССд регистрировались в сосудистом русле подкорковых узлов и, особенно, лимбической области. Их динамика характеризовалась постепенным вовлечением в патологический процесс сначала мелких артерий и вен с развитием мукоидного набухания и фибриноидного некроза. Затем в более крупных сосудах развивались воспалительные изменения в виде бородавчатых эндоваккулитов, флебитов с исходом в циркулярный и сегментарный фиброз [4]. Характерным для ССд можно назвать выраженный периваскулярный склероз, на фоне которого возникали мукоидно-фибринозные процессы в рубцовой соединительной ткани. Изменения в сосудистом русле носили, в основном,

диффузный характер и не имели четкой локализации (рис., а–г).

Ткань мозга в большинстве случаев выглядела умеренно полнокровной, с единичными диапедезными кровоизлияниями и небольшим расширением периваскулярных и перичеллюлярных пространств. Изредка встречались мелкие очаги размягчений, колликативные некрозы с формированием кист, очаговые глиозы, петрификаты. Кора в отдельных полях, преимущественно левой височной доли, претерпевала атрофию в маргинальной зоне с наличием большого количества бляшек, очагового глиоза и петрификатов (рис., в, д).

В нейронах подкорковых ядер, в основном боковых стенок III желудочка, и несколько меньше в остальных ядерных формациях, определялись хроматолиз, деформация и эктопия ядер, вакуолизация цитоплазмы, острое набухание. Общее количество нейронов в этих ядрах уменьшалось более чем наполовину. Этим, вероятно, можно объяснить столь характерные для ССд различные вегетативные расстройства. Аналогичные процессы, особенно выраженные при остром течении ССд, развивались в нервных клетках ядер продолговатого мозга (рис., д, е). Астроциты и олигодендроциты претерпевали изменения, носившие равномерно диффузный характер и неотличавшиеся от неоднократно описанных изменений и реакций.

Не оставались интактными и нервные волокна. Наибольшие их повреждения (демиелинизация, фрагментация и зернисто-глыбчатый распад) выявлялись в лимбической области и варолиевом мосту. Там же определялось огромное количество различного диаметра миелиновых шаров, располагающихся преимущественно вблизи склерозированных венозных стволов (рис., ж, з).

Следует отметить, что диффузные изменения нервных элементов головного мозга не являются характерными для ССд в отличие от свойственных этому заболеванию повреждений соединительнотканых образований (оболочек и сосудистых стенок). Вероятно, целесообразно, учитывая крайнюю скудность воспалительных реакций в головном мозге при ССд, весь комплекс структурных нарушений характеризовать как «склеродермическую энцефалопатию».

Пожалуй, самые серьезные изменения регистрировались в спинном мозге и его оболочках, причем относительно равномерно – на всем его протяжении. В твердой и, особенно, мягкой мозговой оболочке начальными становились признаки фибриноидного набухания, сопровождавшиеся накоплением кислых мукополисахаридов. Исходом такой дезорганизации соединительной ткани был выраженный склероз со сращением и утолщением листков мягкой оболочки, что неизбежно должно вести к нарушению циркуляции ликвора. В стенках мелких сосудов, оболочек и ткани мозга встречались идентичные, уже неоднократно нами описанные, дистрофические и воспалительные изменения. Следующей особенностью ССд следует считать преимущественное поражение венозного русла спинного мозга, с развитием в стенках вен аналогичных изменений (рис., а–г).

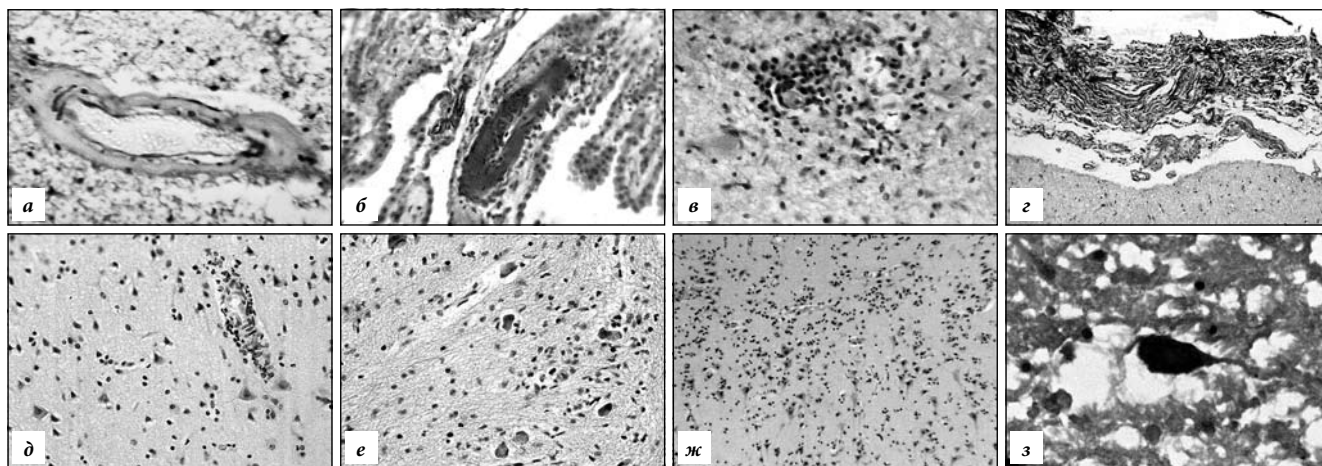


Рис. Патоморфология центральной нервной системы при ССд:

а – мукоидно-фибриноидное набухание артерии спинного мозга (метахромазия); *б* – фибриноидный некроз артерии сосудистого сплетения 3-го желудочка головного мозга; *в* – артериолит в гипоталамусе, нейтрофилы; *г* – фиброз мягкой мозговой оболочки спинного мозга; *д* – венулит на фоне глиоза в коре головного мозга, гипертрофия астроцитов, нейтрофилы и «сморщивание» нейронов; *е* – некролиз нейронов в гипоталамусе, глиоз, нейтрофилы и «сморщивание» нейронов; *ж* – некролиз нейронов на фоне глиоза коры головного мозга с остаточными узелками; *з* – очаговая демиелинизация в шейном отделе спинного мозга. *а* – окр. толуидиновым синим, *б*, *в*, *ж* – окр. гематоксилином и эозином, *г* – окр. по ван Гизону, *д* – импрегнация по Кахалю, *е* – окр. по Нисслю, *з* – окр. по Кювьеру–Барреру; *а*, *д*, *е*, *з* – $\times 400$, *б*, *в* – $\times 300$, *ж* – $\times 200$.

Закономерным оказалось поражение микроциркуляторного русла, преимущественно ткани спинного мозга. Исходом воспалительных и дистрофических процессов в стенках сосудов стал склероз. Ни при каком другом заболевании из группы коллагеновых мы не видели таких периваскулярных склерозов, артериосклерозов и фибросклерозов, как при ССд.

Эпендимальная оболочка центрального канала была относительно интактна, только в отдельных местах отмечалась пролиферация эпителия с дистрофией и десквамацией отдельных клеток. В подэпендимальном слое на уровне верхних грудных сегментов встречались единичные артериолы с фибриноидно измененными стенками и явлениями эндovasкулита (острое течение ССд).

Ткань спинного мозга характеризовалась умеренным полнокровием с незначительным расширением периваскулярных и перикеллюлярных пространств, единичными диапедзными кровоизлияниями, колликационными некрозами, микрокистами, очаговыми клеточными пролифератами и петрификациями. Более постоянными оказались дистрофические изменения в нейронах боковых рогов, которые наблюдались во всех случаях и на всем протяжении. Эти изменения заключались в явлениях хроматолиза, эктопии ядер, вакуолизации, гиперпигментации и остром набухании клеток. Отмечалось уменьшение количества нейронов практически во всех ядрах спинного мозга, особенно на уровне шейного утолщения, о чем свидетельствовало увеличение глиального индекса до $3,69 \pm 0,02$ (в контроле – $2,37 \pm 0,04$). Со стороны глиальных элементов на всем протяжении спинного мозга просматривались равномерные диффузные изменения.

В нервных волокнах развивались варикоз, демиелинизация, фрагментация и даже зернисто-глыбчатый распад аксонов, как правило, при остром течении ССд, вблизи пораженных сосудов и в маргинальной зоне (рис. 3). Закономерен факт глубокого поражения «кон-

ского хвоста», в оболочках которого регистрировались аналогичные дистрофические изменения (мукоидно-фибриноидное набухание), васкулиты, тромбозы, фиброз. В одном наблюдении (острое течение ССд) обнаружен очаговый некроз нервных волокон.

Вышеперечисленные структурные изменения, учитывая крайнюю умеренность воспалительных клеточных реакций, можно, вероятно, классифицировать как «склеродермическую миелопатию».

Обсуждение полученных данных. Морфологические изменения при болезнях соединительной ткани с иммунными нарушениями развиваются в различных образованиях нервной системы: оболочках, сосудах, глиальной ткани, нейронах и нервных волокнах [12]. При изучении данной патологии приходилось наблюдать ряд структурных изменений, степень выраженности которых, топография и распространенность зависели от остроты течения заболевания. К таким структурным изменениям можно отнести: дезорганизацию соединительной ткани, гранулематозные продуктивные клеточные реакции, диффузные неспецифические экссудативно-продуктивные процессы, дистрофические и воспалительные изменения сосудистых стенок, дистрофические изменения нейронов и глии, склероз, гиалиноз, амилоидоз, петрификацию.

Из процессов дезорганизации соединительной ткани в оболочках нервной системы самыми распространенными и общими можно назвать мукоидно-фибриноидные изменения. При ССд они отличаются мелкоочаговостью в сочетании с выраженным отеком ткани, что согласуется с данными других авторов [8, 13].

Самым постоянным и разнообразным оказалось поражение сосудистого русла нервной системы. Для ССд свойственно преимущественное вовлечение в патологический процесс вен и микроциркуляторного русла с развитием флебитов, тромбозов и капилляритов на фоне очагового умеренно выраженного мукоидного набухания [4]. Характерен так называемый

Таблица 2

Глиальный индекс в различных отделах центральной нервной системы при ССд ($M \pm m$)

Группа наблюдения	Кора		Зрительный бугор	Гипоталамус	Продолговатый мозг	Ретикулярная формация	Спинной мозг		
	передней извилины	затылочной доли					5–7 шейные сегменты	3–5 грудные сегменты	3–5 поясничные сегменты
ССд, акт. III	8,20±0,02	5,30±0,02	5,80±0,02	3,90±0,02	3,80±0,02	5,30±0,02	3,30±0,02	3,50±0,02	3,90±0,02
ССд, акт. II	6,70±0,02	7,10±0,03	4,30±0,02	2,80±0,01	2,30±0,01	3,70±0,02	2,10±0,02	2,80±0,01	2,60±0,01
ССд, акт. I	6,20±0,02	4,30±0,02	4,10±0,02	2,80±0,02	2,30±0,02	3,20±0,02	2,20±0,02	3,10±0,02	3,20±0,02

циркулярный склероз интимы, ведущий к резкому сужению просвета сосуда.

Что касается изменений нервных элементов, то они выражались в гибели нейронов в ядерных формациях, особенно гипоталамусе и зрительном бугре, преимущественно левого полушария [3]. Подтверждением тому служит значительное уменьшение количества нейронов (особенно при длительном течении заболевания) и увеличение глиального индекса (табл. 2).

О степени выраженности склеротических изменений в какой-то мере можно судить по толщине оболочек изученных отделов нервной системы. Цифровые показатели, приведенные в табл. 1, свидетельствуют о выраженности фиброза при ССд. Кроме того, они косвенно указывают на различную глубину повреждения соединительной ткани в том или ином отделе. При ССд склеротические процессы носят распространенный и выраженный характер в виде массивных полей и сращений на значительном протяжении листков мягкой мозговой оболочки [9]. Эти процессы сопровождаются ощутимым утолщением оболочек, сдавлением и деформацией соответствующих отделов нервной системы [6]. Кроме того, характерно частое нахождение петрификатов среди полей фиброза при отсутствии признаков гиалиноза и амилоидоза.

Особенности патологического процесса, развивающегося в различных отделах центральной нервной системы при ССд, находятся в соответствии с изменениями в других органах и системах [11]. Прогрессирующая дезорганизация соединительной ткани, динамика сосудистой патологии и склеротических изменений лежат в основе органного патоморфогенеза этого заболевания и ведут к гибели паренхиматозных элементов различных органов, в том числе и нервной системы [10]. Затем следует развитие их функциональной недостаточности, что еще более усугубляет течение заболевания, снижает эффективность комплексной терапии и заметно ухудшает прогноз [14]. С целью профилактики подобного исхода рекомендуется целенаправленное неврологическое обследование больных ССд несмотря на отсутствие жалоб и явной клинической симптоматики [15].

References

1. Blinkov S.M., Glezer I.I. Human brain in figures and tables. L.: Meditsina, 1964. 472 p.
2. Guseva N.G. Systemic scleroderma. M.: Meditsina, 1975. 269 p.
3. Kalinichenki S.G., Matveeva N.Yu., Motavkin P.A. Morphofunctional characteristic neurovascular connections of the cerebellar cortex // Pacific Medical Journal. 2015. No. 1. P. 26–29.
4. Motavkin P.A., Pigolkin Yu.I., Kaminskiy Yu.V. Histophysiology

- circulation in the spinal cord. M.: Nauka, 1994. 231 p.
5. Strukov A.I., Kopyeva T.N., Kakturskiy L.V. Immunopathology of collagen diseases // Clinical Medicine. 1974. No. 1. P. 20–30.
6. Chertok V.M., Kotsyuba A.E., Babich E.V. The ultrastructure of the intima of the arteries pia mater of a human with hypertension // Morphology. 2009. Vol. 136, No. 5. P. 50–54.
7. Abers M.S., Iluonakhamhe E.K., Goldsmith C.E., Kass J.S. Central nervous system vasculitis secondary to systemic sclerosis // J. Clin. Neurosc. 2013. No. 20. P. 1168–1170.
8. Chujo S., Shirasaki F., Kawara S. [et al.]. Connective tissue growth factor causes persistent proalpha2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factor-beta in a mouse fibrosis model // J. Cell Physiol. 2005. Vol. 203, No. 2. P. 447–456.
9. Jimenez S.A., Hitraya E., Varga J. Pathogenesis of scleroderma. Collagen // Rheum. Dis. Clin. North. Am. 1996. Vol. 22, No. 4. P. 647–674.
10. Jimenez S.A., Saitta B. Alterations in the regulation of expression of the alpha 1 (I) collagen gene (COL1A1) in systemic sclerosis // Spring. Semin. Immunopathol. 1999. Vol. 21, No. 4. P. 397–414.
11. Leinwand I., Duryee W., Richter M.N. Scleroderma (based on a study of over 150 cases) // Ann. Intern. Med. 1954. No. 41. P. 1003–1141.
12. Mayes M.D. Scleroderma epidemiology // Rheum. Dis. Clin. North. Am. 2003. No. 29. P. 239–254.
13. Medsger T.A. Natural history of systemic sclerosis and the assessment of disease activity, severity, functional status and psychologic well-being // Rheum. Dis. Clin. North. Am. 2003. No. 29. P. 255–273.
14. Pathak R., Gabor A.J. Scleroderma and central nervous system vasculitis // Stroke. 1991. No. 22. P. 410–413.
15. Streifler J.Y., Molad Y. Connective tissue disorders: systemic lupus erythematosus, Sjögren's syndrome, and scleroderma // Handb. Clin. Neurol. 2014. No. 119. P. 463–473.

Поступила в редакцию 13.04.2016.

Склеродермическая энцефаломиелопатия

Ю.В. Каминский, Н.Ю. Матвеева, Ю.А. Матвеев
Тихоокеанский государственный медицинский университет
(690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Введение. Цель работы – выявление структурных закономерностей поражений центральной нервной системы при системной склеродермии (ССд).

Материал и методы. Изучены результаты аутопсий 12 женщин 44–56 лет, страдавших ССд. Использовался комплекс нейрористологических и морфометрических методов.

Результаты исследования. Различные морфологические изменения зарегистрированы во всех структурах центральной нервной системы: оболочках, сосудах, глиальной ткани, нейронах и нервных волокнах. Степень их выраженности, топография и распространенность зависели от остроты течения заболевания. Выделены сочетания основных структурных проявлений – мукоидного набухания, фибриноидного изменения, различных клеточных реакций, васкулитов, склероз и гиалиноза.

Обсуждение полученных данных. Комплекс описанных изменений центральной нервной системы при ССд может быть охарактеризован как склеродермическая энцефаломиелопатия.

Ключевые слова: системная склеродермия, центральная нервная система, дезорганизация соединительной ткани, микроциркуляторное русло.