

А.Е. Коцюба, Е.П. Коцюба<sup>1</sup> и В.М. Черток

## НИТРОКСИДЕРГИЧЕСКИЕ НЕРВНЫЕ ВОЛОКНА ВНУТРИМОЗГОВЫХ СОСУДОВ

Кафедра анатомии человека (зав. — проф. В.М. Черток) Владивостокского государственного медицинского университета;  
<sup>1</sup>лаборатория цитофизиологии (зав. — канд. биол. наук М.А. Ващенко) Института биологии моря ДВО РАН, г. Владивосток

Методами световой и электронной гистохимии изучено строение и распределение нейронов, содержащих NADPH-диафору, и их отростков в теменной области коры большого мозга крысы. Установлено, что для большинства нейронов характерна тесная связь с внутримозговыми сосудами. В коре мозга наименьшее расстояние между плазмолеммой аксонов и гладкими миоцитами стенки внутримозговых артерий составляет не менее 0,3–0,5 мкм. Тела нейронов располагаются в функционально важных участках сосудов (у мест ответвления боковых стволов, у истоков артериол), а их отростки сопровождают сосуд, плотно обвивая его своими ветвями. Нередко нейроны, дендриты которых контактируют с телами или отростками выше- или нижележащих нейронов, посылают нервные проводники к артериям, венам или капиллярам. Таким образом, нитроксидаергические нейроны или их группы могут контролировать состояние кровотока в различных участках сосудистого русла, выполняя функции локального нервного центра.

**Ключевые слова:** головной мозг, сосуды, нитроксидаергические нервные волокна, мозговой кровоток.

Регуляция локального мозгового кровотока осуществляется в результате взаимодействия различных механизмов, среди которых важное место отводится нейрогенным факторам [3, 4, 7, 8], в частности, адрен- и холинергическим нервным проводникам [4, 7]. В последние годы появились убедительные доказательства наличия еще одного участника нейрогенной регуляции мозговой гемодинамики. Это так называемые нитроксидаергические нервы, которые опосредуют свое влияние через оксид азота (NO) — нейромедиатор, обладающий сосудорасширяющим свойством [12, 13]. Предполагается, что с помощью этой специфической сигнальной молекулы, топохимическим маркером которой является NADPH-диафороза (NADPH-d) [1, 5], нейроны адаптируют состояние локальной гемодинамики к метаболическим потребностям мозга. Однако морфологических данных, подтверждающих участие NO-ергических нервов в регуляции просвета сосудов мозга, явно недостаточно [5, 6].

Целью данной работы явилось изучение внутримозговой NO-ергической иннервации сосудов разного типа в теменной области большого мозга крысы.

**Материал и методы.** Исследование выполнено в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР) на 12 половозрелых белых крысах, массой 180–200 г, содержащихся в стандартных условиях лабораторного вивария. Головной мозг извлекали тотчас после декапитации животных. Для гистохимического исследования NADPH-d использовали образцы, взятые из правой теменной доли большого мозга. Из них изготавливали криостатные срезы толщиной 30 мкм, которые инкубировали в

среде, содержащей 0,5 мМ  $\beta$ -NADPH, 0,5 мМ нитросинего тетразолия и 0,3 % Тритона Ч-100 в 0,15 М Трис-НСI-буфере (рН 8,0) (Sigma, США) в термостате при 37 °С в течение 1 ч [9]. Контрольные препараты помещали в среду с добавлением ингибитора NO-синтазы — N<sup>ω</sup>-нитро-L-аргинина (10 мМ). После инкубации срезы промывали в дистиллированной воде, обезжизивали в этаноле возрастающей концентрации и заключали в канадский бальзам (Биовитрум, Россия).

Для электронно-цитохимического изучения локализации энзима использовали тетразолиевую реакцию на NADPH-d [15]. Образцы мозга фиксировали 4 % раствором параформальдегида на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,2), при 4 °С в течение 6 ч. Затем промывали 15% раствором сахарозы в 0,15 М Трис-НСI-буфере (рН 8,0) (Sigma, США) в течение 24 ч при той же температуре. После промывки образцы инкубировали в среде, содержащей 0,5 мМ  $\beta$ -NADPH, 0,5 мМ нитро-синего тетразолия и 0,3% Тритона Ч-100 в 0,15 М Трис-НСI-буфере (рН 8,0) (Sigma, США) в термостате при 37 °С в течение 1 ч. После инкубации кусочки мозга промывали в Трис-НСI-буфере, затем дофиксировали в 1% растворе OsO<sub>4</sub> (Реахим, Россия), обезжизивали и заливали в эпон (Poliscience, США). Ультратонкие срезы исследовали с помощью электронного микроскопа JEM-100B (Jeol, Япония).

**Результаты исследования.** В коре большого мозга крысы NADPH-d локализуется в отдельных нейронах, в сети разнонаправленных нервных волокон, проходящих в нейропиле, в стенке внутримозговых артерий, капилляров и вен. Активность фермента идентифицируется по наличию продукта гистохимической реакции, который в зависимости от плотности выпавшего осадка окрашивает структуры в различные оттенки синего цвета — от светло-голубого до фиолетового.

Клетки, содержащие NADPH-d, обычно представлены одиночными, редко расположенными

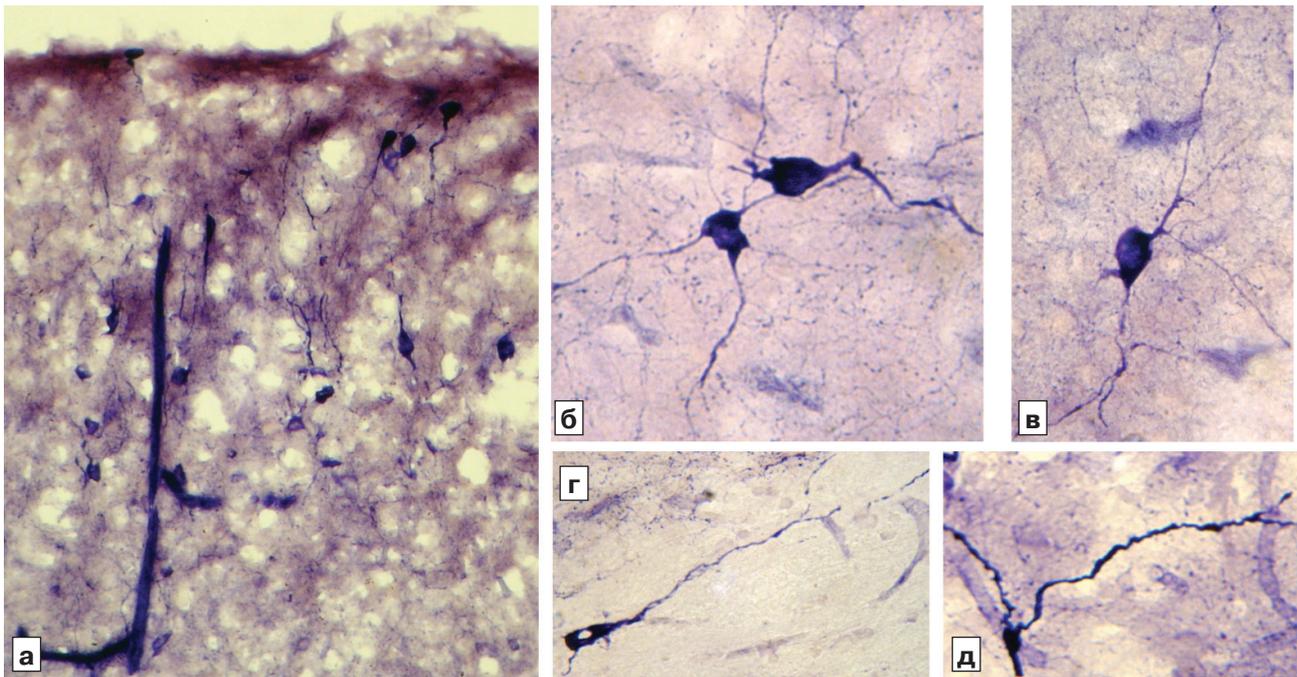


Рис. 1. NADPH-диафоразо-позитивные нейроны теменной доли головного мозга крысы.

а — в — нейроны, их локализация и взаимоотношение в различных слоях коры; г, д — нейроны белого вещества. Метод В.Т. Норе и S.R. Vincent [9]. а — об. 10, ок. 10; б — д — об. 40, ок. 10.

непирамидными нейронами, которые имеют весьма высокую активность диафоразы, и окрашиваются в темно-фиолетовый цвет. Реже встречаются группы из 2–3 NO-ергических клеток (рис. 1, а, б). Тела нейронов имеют полигональную, овальную или грушевидную форму и размеры от 9 до 30 мкм. Большинство из них локализуется во II и III слоях коры. Ограниченное количество нейронов с высокой и умеренной активностью фермента наблюдаются в I слое коры, где они располагаются в непосредственной близости от мягкой оболочки мозга, а также в IV слое и белом веществе (см. рис. 1, г, д). Окрашиваются также аксон и дендриты клетки, где продукт гистохимической реакции откладывается в виде

обособленных гранул, придавая отросткам неравномерно-прерывистый вид.

NADPH-d-позитивные нейроны, лежащие в различных слоях серого вещества, от соседних участков коры отделяются радиальными артериями, которые ограничивают комплексы из NO-ергических нейронов, напоминающие в целом элементы корковой колонки (см. рис. 1, а). Эти клетки контактируют между собой, а также с проходящими в коре и белом веществе кровеносными сосудами. Отростки нейронов не только сопровождают сосуды, но и взаимодействуют с ними, оплетая своими терминалями. Складывается впечатление, что большинство (если не все) NO-ергические нейроны имеют отношение к

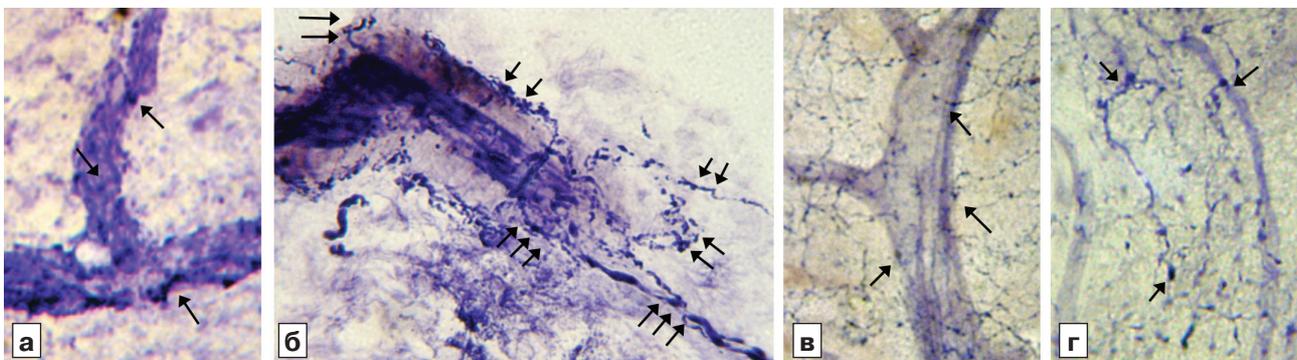


Рис. 2. Нитроксид (NO) ергическая иннервация внутримозговых сосудов крысы.

а, б — нервные сплетения в стенке артериальных сосудов; в, г — NO-ергические нервные сплетения венозных сосудов. Стрелки — NO-ергические нервные волокна; две стрелки — нервные волокна мягкой оболочки головного мозга; три стрелки — корковые нервные волокна. Метод В.Т. Норе и S.R. Vincent [9]. Об. 40, ок. 10.

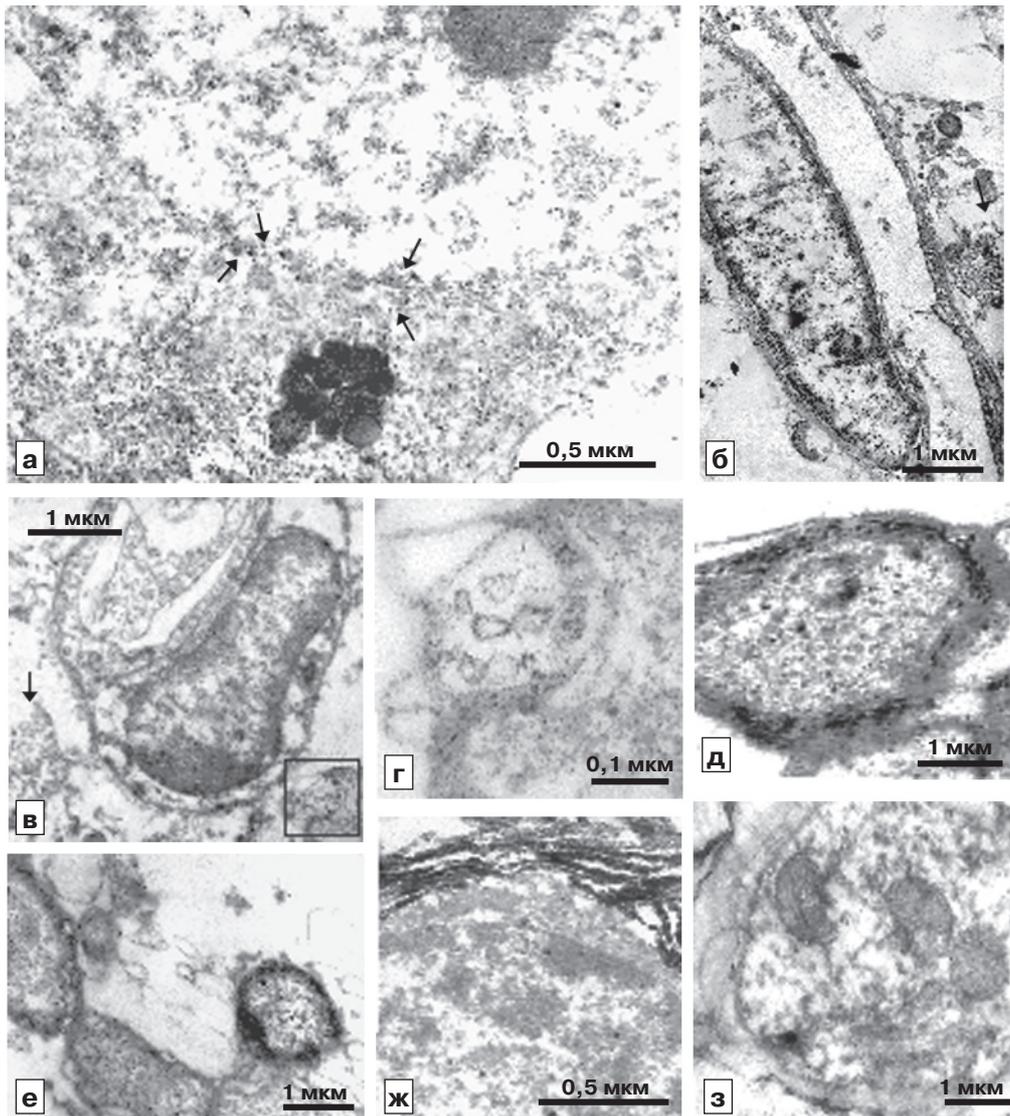


Рис. 3. Ультраструктурная локализация NADPH-диафоразы в теле и отростках нейронов в коре головного мозга крысы.

а — отложение продукта реакции на NADPH-диафорузу в теле нейрона; б, в — взаимоотношение терминальных расширений аксонов с сосудами; г — агранулярные пузырьки терминальной части аксона (фрагмент рис. 3, в); д — з — отложение продукта реакции в миелиновой оболочке дендритов (д, е), на мембранах эндоплазматической сети (ж) и в митохондриях (з). Стрелки — глыбки преципитата при реакции на NADPH-диафорузу.

иннервации сосудов. На наших препаратах мы наблюдали разные варианты нейровазальных отношений в коре мозга (рис. 2). Очень часто тела нейронов располагаются на поверхности сосуда или в непосредственной близости от его стенки. В других случаях отростки нейронов, прежде чем достигнуть сосуда, проходят значительное (до 1500–2000 мкм) расстояние от IV слоя коры до I, или наоборот. При этом дендриты и аксоны одного нейрона нередко взаимодействуют одновременно с несколькими нейронами и сосудами. NADPH-d-позитивные нейроны могут устанавливать связи одновременно с сосудами разного типа — артериями и венами, артериями и капиллярами, артериями, венами и капиллярами, находящимися в

поверхностных и глубоких слоях коры. При этом в стенке артерий выявляются типичные нервные сплетения, образованные продольными и небольшим количеством циркулярно идущих NO-ергических нервных волокон (см. рис. 2, а, б). Особый интерес вызывает организация нервного аппарата радиальных артерий (см. рис. 2, б). На продольном срезе стенки артерии в месте ее погружения в вещество мозга определяются 2 вида волокон: первые — тонкие с небольшими варикозностями подходят со стороны мягкой оболочки, вторые — более толстые с относительно крупными гранулами продукта реакции на NADPH-d направляются со стороны коры. На серийных срезах отчетливо видно, что толстые волокна представляют

собой отростки NADPH-d-позитивных нейронов. NO-ергические нервные сплетения наблюдаются и в стенке вен, хотя чаще нервные волокна проходят в непосредственной близости от стенки сосудов, а на их поверхности определяются терминальные утолщения с высокой активностью фермента (см. рис. 2, в, г).

Электронно-цитохимические исследования позволяют уточнить структуру нейровазальных отношений. Как показали наши наблюдения, в коре мозга продукт реакции на NADPH-d откладывается в телах нейронов, их отростках, терминальных расширениях аксона (рис. 3). В нейронах мелкодисперсный продукт реакции обнаруживается на внутренней ядерной мембране и мембранах эндоплазматической сети, в цитозоле, на внутренней поверхности плазмолеммы. В митохондриях чаще всего отмечалась невысокая активность фермента. Изучение продольных срезов показало, что положительная реакция на NADPH-d наблюдается по всей длине дендритов и аксонов. В дендро- и аксоплазме некоторых отростков отмечаются крупные скопления электронно-плотного материала. В дендритах преципитат определяется в миелиновой оболочке, незначительное его количество содержится в микрофиламентах и митохондриях. При этом плотность продукта реакции, откладывающегося в миелиновой оболочке, зачастую существенно отличается даже в проходящих рядом волокнах: в одних он практически не определяется, в других — откладывается в виде мелких зерен, в третьих — представлен темными дискретными и относительно крупными гранулами (см. рис. 3, д, е).

В аксонах NO-ергических нейронов мелкодисперсный продукт реакции локализуется как в их проксимальных частях, так и в терминалях (см. рис. 3, б — г). В расширениях аксонов он связан с мембраной большей части агранулярных пузырьков диаметром 40–60 нм. Скопления продукта реакции локализируются в мембране и цитоплазме терминального расширения аксона. Незначительное его количество обнаруживается на мембранах митохондрий и микротрубочках.

Везикулодержущие аксоны, маркированные NADPH-d, располагаются как в непосредственной близости от стенки сосудов — на расстоянии 80–120 нм, так и нескольких десятков микрометров. Терминали аксонов наблюдаются около стенки артерий, вен и капилляров. Некоторые венулы и капилляры иннервированы очень хорошо: в непосредственной близости от их стенки располагаются 1–2, а иногда 3 терминальных расширения аксона, включающие синаптические пузырьки (см. рис. 3, г).

Обсуждение полученных данных. Положение о том, что интенсивность мозгового кровотока соответствует величине локального метаболизма, подтверждено экспериментальными исследованиями и признается в настоящее время большинством исследователей. Разногласия возникают при оценке факторов, обеспечивающих коррелятивную связь кровотока и обмена. Не останавливаясь на многочисленных теориях с большей или меньшей степенью достоверности, объясняющих механизмы такого взаимодействия, отметим, что после некоторого забвения вновь приобретает сторонников некогда популярная нейрогенная концепция регуляции локального кровотока [1, 3, 8]. Во многом это связано с открытием особых свойств NO, позволяющих рассматривать его в качестве одного из важнейших регуляторов физиологических и патофизиологических процессов в организме [12, 13]. Большое значение придается NO и в обеспечении функций ЦНС. NADPH-d-позитивные непирамидные интернейроны постоянно выявляются во всех слоях коры и белом веществе полушарий большого мозга. По некоторым данным, в коре их число составляет около 2%. В большем количестве NO-продуцирующие нейроны встречаются в некоторых отделах гиппокампальной формации, обонятельных луковицах, полосатом теле [1, 6]. Как показали результаты проведенного нами электронно-гистохимического исследования, локализация NADPH-d типична для синтезирующих NO нейронов в ЦНС и ПНС [2, 15]. Преципитат откладывается в перикарионе, по всей длине дендритов и аксона. Кроме того, нами обнаружено скопление продукта реакции на плазмолемме терминальных расширений аксона, в аксоплазме, митохондриях и синаптических пузырьках. Эти данные свидетельствуют о том, что, наряду с ортоградным транспортом NO, не исключена возможность локального синтеза фермента в терминалях аксона. Иначе говоря, при возбуждении нейрона синтез и выделение NO могут происходить в любом участке тела и отростков клетки. Поскольку время полужизни NO в среднем составляет 5 с, а расстояние, на которое он диффундирует, не превышает 100 мкм [13], то ареал воздействия образующегося в нейроне NO ограничен небольшим участком мозга. Посредством NO, обладающего мощными сосудорасширяющими свойствами, нейроны способны адаптировать состояние локальной гемодинамики к уровню своей метаболической активности. В нейронах NO колокализован с другими нейромедиаторами и нейропептидами (VIP, нейропептидом Y, серотонином, простагландинами) [1, 6, 10], но чаще, как удалось показать и нам, определяется

в стенке агранулярных пузырьков предположительно холинергических нейронов. Установлена модулирующая роль NO в процессе высвобождения ацетилхолина, норадреналина и дофамина [6, 12, 13]. При этом NO способен стимулировать выделение дофамина из нейронов не только посредством экзоцитоза синаптических пузырьков, а с помощью трансмембранной диффузии при участии специального мембранного переносчика этого нейромедиатора, захватывающего его из межклеточной среды.

Для большинства NADPH-d-позитивных нейронов характерна тесная связь с внутримозговыми сосудами [3, 5, 6]. Тела нейронов нередко располагаются в функционально важных участках сосудов — у мест ответвления боковых стволов, у истоков артериол, а их отростки сопровождают сосуд, плотно обвивая его своими ветвями. Мы неоднократно наблюдали нейроны, дендриты которых контактируют с телами или отростками выше- или нижележащих нейронов, и одновременно посылают нервные проводники к артериям, венам или капиллярам. Дендровазальные контакты способны, вероятно, обеспечивать рецепцию изменений сосудистого тонуса, стимулируя, в свою очередь, адекватные сосудодвигательные реакции.

Таким образом, NO-ергические нейроны или их группы могут контролировать состояние кровотока на различных отрезках сосудистого русла, выполняя функции локального нервного центра.

Нейровазальные комплексы формируются в составе корковой колонки, ограниченной радиальными артериями. Создается впечатление, что радиальные артерии, имеющие двойную, экстра- и интрамедуллярную NO-ергическую иннервацию, играют особую роль в регуляции внутримозговой гемодинамики. В свое время, изучая нейростологическими методами иннервацию кровеносных сосудов мозга A. Weber [14] и G. Palumbi [11], наряду с вегетативными нервами, которые подвергались дегенерации после вычленения шейных ганглиев, описали периферические и центральные волокна с относительно крупными четковидными утолщениями, которые сохраняли свою структуру после этой операции. Авторы разошлись лишь в оценке функциональной принадлежности нервных проводников, относя их то к чувствительным, то к эффекторным — или симпатическим, или парасимпатическим. Возможно, что волокна с крупными четковидными утолщениями, описанные этими исследователями, в действительности содержали отростки NO-ергических нейронов коры мозга. Распространяясь по внутримозговому сосудистому ложу, нервные проводники по ради-

альным артериям вступают в мягкую оболочку мозга, участвуя в иннервации ее артерий. Наличие NO-ергической иннервации придает дополнительную устойчивость внутримозговой гемодинамике при различных повреждениях мозга. Эти нейроны резистентны к некоторым патологическим воздействиям и остаются неповрежденными, в то время как большинство других клеток погибают [2, 8, 13]. Механизмы такого необычного свойства клеток окончательно не выяснены. Одним из возможных объяснений данного феномена может быть то, что NO оказывает на нейроны протективное действие, купируя окислительный стресс. Этот процесс включает несколько механизмов, в частности, ограничение входа ионов кальция через каналы N-метил-D-аспартатных (NMDA) рецепторов, ингибирование выработки супероксидных радикалов и пр. На уровне отдельных нейронов и синапсов эти механизмы реализуются через регуляцию локальной гемодинамики, которую, в свою очередь, опосредуют нейровазальные сигнальные молекулы и нейромедиаторы. В этой связи следует упомянуть о NADPH-d-позитивных нейронах белого вещества, которые могут передавать иницирующий импульс нейронам коры мозга. Успешному выполнению этой функции способствует динамический характер медиаторной специализации этих клеток [3, 10]. Помимо NO, при определенных условиях они экспрессируют разные нейромедиаторы, нейромодуляторы и специфические рецепторы. Эти клетки, с одной стороны, образуют контакты с микрососудами, с другой — являются первыми мишенями для волокон, приходящих в кору из таламуса, и могут таким образом оказывать влияние на внутримозговую кровоток в пределах корковой колонки.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Дюйзен И.В., Калинин С.Г., Охотин В.Е. и Мотавкин П.А. Нитроксидаергические нейроны белого вещества гиппокампальной формации человека. Морфология, 1998, т. 113, вып. 1, с. 47–51.
2. Коцюба А.Е. и Коцюба А.Е. NO-синтаза в центральной нервной системе пресноводного двухстворчатого моллюска в норме и при гипоксии. Журн. эвол. биохим., 2003, т. 39, № 2, с. 179–183.
3. Мотавкин П.А. и Черток В.М. Иннервация мозга. Тихоокеанск. мед. журн., 2008, № 2, с. 12–24.
4. Мотавкин П.А., Черток В.М. и Пиголкин Ю.И. Морфологические исследования регуляторных механизмов внутримозгового кровообращения. Арх. анат., 1982, т. 82, вып. 6, с. 42–49.
5. Охотин В.Е. и Куприянов В.В. Нейровазальные отношения в новой коре головного мозга человека. Морфология, 1996, т. 110, вып. 4, с. 17–22.
6. Хрулев С.В. и Дюйзен И.В. Солокализация серотонина и нитроксидаергических нейронов в нейронах подкоркового белого вещества.

- ва мозга человека. Тихоокеанск. мед. журн., 2004, № 2, с. 23–26.
7. Черток В.М., Пиголкин Ю.И. и Мирошниченко Н.В. Сравнительное исследование холин- и адренергической иннервации сосудов мозга человека и некоторых лабораторных животных. *Арх. анат.*, 1989, т. 96, вып. 4, с. 28–33.
8. Del Zoppo G.J. and Mabuchi T. Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2003, v. 34, p. 879–894.
9. Hope B.T. and Vincent S.R. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase. *J. Neurochem. Cytochem.*, 1989, v. 37, p. 653–661.
10. Okamura H., Miyagawa A. and Takaqi H. Co-existence of PACAP and nitric oxide synthase in the rat hypothalamus. *NeuroReport*, 1994, v. 5, p. 1177–1180.
11. Palumbi G. Prime osservazioni sulla connessione fra il corredo nervosa della leptomeninge e dei vasi encefalici e la sostanza nervosa cerebrale. *Atti. Accad. Naz. Lin. rend. Cl. Sci fis-mat. e nature*, 1954, v. 16, № 3, p. 368–378.
12. Toda N. and Okamura T. The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels. *Pharmacol. Rev.*, 2003, v. 55, p. 271–324.
13. Vincent S.R. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. *Progr. Neurobiology*, 1994, v. 42, p. 129–160.
14. Weber A. Innervation des vaisseaux sanguins intracerebroux, chez la Cobaye adulte. *Comp. Rend. Soc. Biol.*, 1946, v. 140, p. 9–10.
15. Wolf G., Wurdig S. and Schunzel G. Nitric oxide synthase in rat brain is predominantly located at neuronal endoplasmic reticu-

lum: an electron microscopic demonstration of NADPH-diaphorase activity. *Neurosci. Lett.*, 1992, v. 147, № 1, p. 63–66.

Поступила в редакцию 16.10.08

## NITROXIDERGIC NERVE FIBERS OF INTRACERABRAL BLOOD VESSELS

*A.Ye. Kotsiuba, Ye.P. Kotsiuba and V.M. Chertok*

Methods of light and electron microscopic histochemistry were applied to study the structure and distribution of NADPH-diaphorase-positive neurons and processes in the parietal area of rat cerebral cortex. It was found that the most of the neurons displayed close connections with the intracerebral vessels. In the cerebral cortex, the smallest distance between the axonal plasma membrane and smooth muscle cells of the intracerebral arteries was found to be no less than 0.3–0.5  $\mu\text{m}$ . Neuronal cell bodies were located in the functionally important areas of the vessels (in the areas of lateral trunk branching and in arteriolar sources), while their processes accompanied the vessels, tightly embracing them with their branches. Quite often, the neurons, the dendrites of which make contacts with the bodies or processes of over- or underlying neurons, sent their nerve fibers to the arteries, veins and capillaries. Thus, nitroxidergic neurons or their groups may control the blood flow in the different areas of vascular bed, performing the functions of the local nerve center.

**Key words:** *brain, blood vessels, nitroxidergic nerve fibers, cerebral blood flow.*

Department of Human Anatomy, Vladivostok State Medical University; Laboratory of Cytophysiology, Institute of Marine Biology, RAS Far Eastern Branch, Vladivostok.