Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

СТАРЦЕВА

Марина Сергеевна

ГИСТОФИЗИОЛОГИЯ ГАЗОТРАНСМИТТЕРНЫХ НЕЙРОНОВ В ВАЗОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ПРОДОЛГОВАТОГО МОЗГА У НОРМО- И ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

> Научный руководитель: доктор медицинских наук профессор В.М. Черток

Владивосток - 2016

оглавление

введі	ЕНИЕ	5							
ГЛАВА	А 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10							
1.1	Центральные механизмы регуляции гемодинамики	10							
1.1.1	Бульбарный отдел вазомоторного центра	10							
1.1.2	Нейрохимическая организация вазомоторной области	11							
	продолговатого мозга								
1.2	Газообразные посредники в центрах регуляции гемодинамики	13							
1.2.1	Медиаторная функция оксида азота	13							
1.2.2	Организация нитроксидергических систем мозга 16								
1.2.3	Роль монооксида углерода в регуляции кровообращения 13								
1.2.4	Распределение СО-продуцирующих нейронов в мозге								
1.2.5	Сероводород и его вазомоторное действие	21							
1.2.6	Локализация H ₂ S-продуцирующих нейронов в вазомоторных								
	центрах мозга	22							
1.3	Роль газообразных посредников в развитии гипертензии	24							
1.3.1	Оксид азота	24							
1.3.2	Монооксид углерода	25							
1.3.3	Сероводород	26							
1.4	Морфофункциональные аспекты взаимодействия								
	газотрансмиттерных нейронов в вазомоторной области								
	головного мозга	27							
ГЛАВА	А 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	30							
2.1	Характеристика исследованного материала	30							
2.2	Гистологические и гистохимические методы исследования	32							
2.3	Иммуногистохимические методы исследования	33							
2.4	Морфометрические исследования	35							
2.5	Статистические методы исследования	39							

ГЛА	ВА 3. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ NO-, СО- и Н ₂ S-ПРОДУЦИРУЮЩИХ	
ней	РОНОВ В ВАЗОМОТОРНЫХ ЯДРАХ ПРОДОЛГОВАТОГО	
MO3	ΓΑ	41
3.1	Ядро солитарного тракта	41
3.2	Ретикулярное гигантоклеточное ядро	53
3.3	Ретикулярное мелкоклеточное ядро	63
3.4	Ретикулярное латеральное ядро	74
3.5	Математический анализ взаимосвязи между морфометрическими	
	показателями газотрансмиттерных нейронов	84
ГЛА	ВА 4. ИММУНОЛОКАЛИЗАЦИЯ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ	
B MF	ЕЖЪЯДЕРНЫХ НЕЙРОНАХ ПРОДОЛГОВАТОГО МОЗГА	91
4.1	Группа 1	91
4.2	Группа 2	103
4.3	Группа 3	114
4.4	Локальные особенности структурной организации межъядерных	
	нейронов	124
ГЛА	ВА 5. ТОПОХИМИЯ NO-, СО- и H ₂ S-ПРОДУЦИРУЮЩИХ	
ней	РОНОВ В ВАЗОМОТОРНЫХ ЯДРАХ ПРОДОЛГОВАТОГО	
MO3	ГА ПРИ РЕНОВАСКУЛЯРНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ	132
5.1	Ядро солитарного тракта	132
5.2	Ретикулярное гигантоклеточное ядро	137
5.3	Ретикулярное мелкоклеточное ядро	142
5.4	Ретикулярное латеральное ядро	146
5.5	Математическое обоснование взаимосвязи величин некоторых	
	количественных показателей, вычисленных среди популяции	
	внутриядерных NO-, CO- и H ₂ S-нейронов, и продолжительности	
	РВГ	151
ГЛА	ВА 6. ГАЗОТРАНСМИТТЕРЫ В МЕЖЪЯДЕРНЫХ НЕЙРОНАХ	
ПРИ	РЕНОВАСКУЛЯРНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ	162
6.1	Группа 1	162

6.2	Группа 2	170
6.3	Группа 3	177
6.4	Математическое обоснование взаимосвязи величины некоторых	
	количественных показателей, вычисленных в популяции	
	межъядерных газотрансмиттерных нейронов, и продолжительности	
	РВГ	184
ОБСУЖДЕНИЕ		191
ЗАКЛ	ЮЧЕНИЕ	197
вывс	Эды	203
спис	СОК СОКРАЩЕНИЙ	205
спис	СОК ЛИТЕРАТУРЫ	206

введение

Актуальность В центральных темы. механизмах управления гемодинамикой роль области немаловажная принадлежит вазомоторной продолговатого мозга, морфологическим воплощением которого является небольшой участок ромбовидного мозга, лежаший позали нижнего четверохолмия. Анализ литературы дает достаточное количество доказательств решающей роли этого участка мозга в регуляции гемодинамики [80,91,172].

Более полувека тому назад в нейронах вазомоторного центра впервые обнаружено присутствие норадреналина [9]. Позднее здесь были выявлены нервные клетки, содержащие и другие классические медиаторы нервного импульса (ацетилхолин, адреналин, допамин, серотонин), благодаря которым, по мнению большинства исследователей, и осуществляется центральная регуляция гемодинамики [63,80,154]. Однако после открытия нового класса биологически активных веществ – газообразных посредников (NO, CO, H₂S), принимающих участие, как в межклеточной, так и внутриклеточной регуляции разнообразных физиологических процессов, появились предположения об их возможном значении в центральных механизмах регуляции гемодинамики [15,58]. В отличие от классических мессенджеров, они являются простыми молекулами, обладающими липофильными свойствами. Эти сигнальные молекулы не накапливаются в синаптических пузырьках, не освобождаются экзоцитозом, могут выделяться из любого участка клетки [53,160,164]. Они химически модифицируют внутриклеточные протеины, изменяя клеточный метаболизм более быстрым, чем классические медиаторы, способом, что позволяет им эффективно участвовать в передаче нервного импульса [48,91].

Учитывая, что газообразные посредники выполняют особенно важные функции в межклеточных коммуникациях, они могли бы обеспечивать работу любого нервного центра. Однако имеющиеся гипотезы об участии газотрансмиттеров В центральных механизмах регуляции гемодинамики базируются в основном на результатах физиологических исследований и лишены

материального подтверждения. Морфологические данные о наличии и распределении этих веществ в вазомоторной области продолговатого мозга немногочисленны и противоречивы. Особенно мало таких сведений в отношении СО и H₂S.

Экспериментальные материалы, полученные в последние годы, свидетельствуют, что газообразные посредники принимают активное участие в пластических перестройках нейронов в норме и при различных патологических процессах [48, 91,184,190]. Тем не менее, в отношении вазомоторного центра эти вопросы практически не изучены.

Степень разработанности. Топохимию нейронов продолговатого мозга несколько лет назад стали изучать особенно интенсивно. Не так давно появились работы ПО исследованию нейронов сердечно-сосудистого центра, экспрессирующих нейрональную NO-синтазу (nNOS), гемоксигеназу-2 (HO-2) и цистатионин β-синтазу (CBS) [2,13,30]. Однако при описании вазомоторной области продолговатого мозга объектом исследования обычно служат внутриядерные нейроны. Вместе с тем, между ядрами находятся клетки, которые, физиологические исследования обладают как показали [142], особыми функциональными свойствами, отличающими их от внутриядерных нейронов. Нельзя интернейроны исключить, что межъядерные структурно И нейрохимически также отличаются от внутриядерных клеток. Однако в известной нам литературе мы не встретили сравнительных материалов по локализации и количественной оценке газотрансмиттеров в указанных двух популяциях клеток. До сих пор также не представлено морфологических данных, свидетельствующих об участии межъядерных интернейронов в регуляции мозговой гемодинамики, несмотря на постоянное присутствие этих клеток в вазомоторной области мозга.

Цель исследования. Изучить закономерности распределения газотрансмиттерных нейронов в вазомоторной области продолговатого мозга у крыс в обычных условиях функционирования организма и при развитии у них экспериментальной гипертензии.

Задачи исследования:

1) С помощью гистохимических и иммуногистохимических методов изучить распределение nNOS-, HO-2- и CBS-иммунопозитивных нейронов в вазомоторных ядрах продолговатого мозга.

2) Исследовать качественные и количественные характеристики межъядерной популяции газотрансмиттерных нейронов.

3) Изучить динамику преобразований внутриядерных и межъядерных популяций газотрансмиттерных нейронов в процессе развития реноваскулярной гипертензии.

 Изучить пространственную организацию NO-, CO- и H₂Sпродуцирующих нейронов в вазомоторной области продолговатого мозга в норме и при развитии артериальной гипертензии.

5) Провести математический анализ изменений количественных параметров внутриядерных и межъядерных популяций газотрансмиттерных нейронов в различные временные отрезки развития реноваскулярной гипертензии.

Научная новизна. В работе новыми являются материалы по качественной и количественной характеристике nNOS, HO-2 и CBS-иммунопозитивных межъядерных нейронов продолговатого мозга крысы. Впервые установлены качественные и количественные характеристики межъядерных интернейронов в норме и их преобразования в процессе развития РВГ. Проведен сравнительный анализ внутриядерных и межъядерных нейронов продолговатого мозга, их топохимии в норме и при гипертензии. Впервые выявлены характерные особенности реакции крупных и мелких межъядерных интернейронов на повышение артериального давления.

С использованием методов математического анализа представлены дополнительные доказательства различий реакции межъядерных и внутриядерных газотрансмиттерных нейронов в процессе развития РВГ.

В работе использованы авторские методы изучения пространственной организации нейронов различной медиаторной принадлежности [95], а также

определения интенсивности гисто- и иммуногистохимической реакции в клетках [70,96].

Теоретическое И практическое значение работы. Проведенные закономерностях распределения nNOS-, HO-2- и CBSисследования 0 иммунопозитивных нейронов в вазомоторной области продолговатого мозга являются частью фундаментальных исследований в области нейробиологии. Полученные в работе данные могут служить теоретической базой для понимания роли газотрансмиттерных систем в механизмах регуляции мозговой гемодинамики в обычных условиях жизнедеятельности организма и некоторых видах сосудистой патологии. Результаты исследования могут быть использованы при проведении занятий на кафедрах гистологии, нормальной и патологической анатомии, нормальной и патологической физиологии, неврологии.

Методология и методы диссертационного исследования. В данной работе использовали гистохимический метод на NADPH-диафоразу для выявления NO-продуцирующих нейронов, а также иммуногистохимические методы для выявления nNOS, HO-2 и CBS, которые определяли непрямым иммунопероксидазным методом.

Для изучения распределения газотрансмиттеров в продолговатом мозге крысы при патологии воспроизводили модель реноваскулярной гипертензии, для чего проводили хирургическую операцию по перевязке левой почечной ножки. Операция приводила к уменьшению почечной массы и увеличению артериального давления.

Положения, выносимые на защиту:

1) В вазомоторной области продолговатого мозга находятся внутриядерные и межъядерные популяции газотрансмиттерных нейронов, отличающиеся качественными и количественными характеристиками.

2) Реакция газотрансмиттерных нейронов, расположенных в вазомоторной области продолговатого мозга, на повышение артериального давления зависит от их локализации, медиаторной принадлежности, размеров.

3) В процессе развития реноваскулярной гипертензии происходят изменения пространственных отношений между nNOS-, HO-2- и CBS-иммунопозитивных нейронами, которые можно описать уравнениями множественной линейной регрессии.

Степень достоверности результатов. Достоверность данных, полученных в работе, обеспечена современными методами исследования и использованием современных методов статистической обработки, которые соответствуют поставленным целям и задачам. Интерпретация результатов и выводов подкреплена данными, приведенными в таблицах и рисунках. Математический аппарат, используемый в работе, позволил подтвердить выводы, полученные морфологическими методами.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на XII Тихоокеанской научно-практической конференции студентов и молодых ученых (Владивосток, 2011, 2012), IV Всероссийской научной конференции С международным участием «Микроциркуляция в клинической практике» (Москва, 2012), XIX Международной научно-практической конференции «Интеллектуальный капитал и способы его применения (Новосибирск, 2016), Международной научной конференции (Чехия, Карловы-Вары, 2016).

Публикации результатов работы. По материалам диссертации опубликовано 9 работ в рецензируемых журналах.

Объем и структура диссертации. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания, материалов и методов, 6 глав собственных исследований, результатов и выводов. Объем диссертации составляет 227 страниц. Работа иллюстрирована 125 рисунками, 49 таблицами. Указатель литературы включает 196 источников, из них 91 иностранный.

Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Центральные механизмы регуляции гемодинамики 1.1.1. Бульбарный отдел вазомоторного центра

В центральных механизмах регуляции кровообращения важное значение придается бульбарному отделу сердечно-сосудистого центра, морфологическим воплощением которого является небольшой участок ромбовидного мозга, лежащий каудальнее нижнего четверохолмия [77]. Главный компонент сосудодвигательного центра расположен в продолговатом мозге и состоит из прессорной и депрессорной зоны. Эти зоны не имеют четких границ и перекрывают друг друга. Сосудодвигательный центр находится в состоянии постоянного тонического возбуждения [80].

Первыми исследованиями, доказавшими, что тонус сосудов и деятельность сердца зависит от активности нейронов, локализованных в области каудальных отделов мозгового ствола, явились эксперименты с перерезками на разных уровнях мозга [50], а также электрическая и химическая стимуляция отдельных нервных элементов внутри продолговатого мозга [2].

Было установлено, что при последовательных пересечениях мозгового ствола до уровня каудальнее нижнего четверохолмия не происходит выраженного снижения АД, и только разрезы в области бульбарного отдела мозга сопровождаются гипотензией [80]. Было также отмечено, что при раздражении некоторых зон мозга, можно получить резкие изменения АД [9].

Эксперименты с локальным разрушением отдельных нервных структур в пределах прессорных зон продолговатого мозга и моста не вызывают существенной гипотензии. Только билатеральное разрушение небольшого участка вентролатеральной поверхности продолговатого мозга приводит к значительному снижению АД [2,80].

Вышеописанные эксперименты послужили основанием для гипотезы, что нейронные структуры, ответственные за поддержание вазомоторного тонуса, локализованы в вентролатеральной части продолговатого мозга. На основании именно структуры этих данных предполагается, ЧТО вентролатеральной поверхности продолговатого мозга формируют бульбарный вазомоторный центр, выполняющий автоматического саморегулирующего Ему роль центра. принадлежит роль в осуществлении рефлекторных реакций важная при поступлении афферентной информации от рецепторов легких, аортальной и каротидной зон. Свои влияния на тонус сосудов бульбарный вазомоторный центр осуществляет через ядра черепных нервов или через симпатические нейроны спинного мозга.

1.1.2. Нейрохимическая организация вазомоторной области продолговатого мозга

Современные представления нейрохимической организации 0 вазомоторного на результатах центра основываются классических гистохимических методов, методах иммуноцитохимической диагностики нейромедиаторов, методов гибридизации и-РНК [18]. В составе вазомоторного центра описаны нервные клетки, содержащие большое количество нейроактивных веществ: катехоламины, серотонин, ацетилхолин, глутамат, нейропептиды и др. [30,33].

Присутствие катехоламинов в нейронах продолговатого мозга было впервые обнаружено более полувека тому назад [9]. Катехоламинергическая система на норадренергическую, адренергическую делится И Совокупность дофаминергическую. нейронов, использующих В качестве передатчика нервных импульсов норадреналин и дофамин, обозначена как клеточная группа А1. У крысы нейроны этой группы локализованы в области латерального ретикулярного ядра [80]. Норадренергические нейроны небольших

размеров (10-15 мкм), мультиполярные, овальной или угловатой формы [2,18]. Совокупность нейронов, содержащих адреналин, обозначена как группа С1-С2. Нейроны данной группы расположены в зоне бульбарного отдела вазомоторного ретикулярного гигантоклеточного (C1), центра, вентральнее ядра И В дорсомедиальной зоне ядра одиночного пути (С2) [80]. Их аксоны образуют восходящие и нисходящие адренергические пути, достигающие медиального центрального серого вещества среднего мозга И латерального ядра промежуточной зоны спинного мозга.

В ядрах продолговатого мозга находятся группы серотонинергических нейронов В1-В3 групп. Аксоны этих нейронов имеют нисходящие в спинной мозг проекции и регулируют уровень болевой чувствительности [98]. В ряде нервных клеток вентральной поверхности продолговатого мозга обнаружена ацетилхолинэстераза [9], которая используется как индикатор присутствия ацетилхолина в клеточных телах. Такие нейроны выявлены в гигантоклеточном и мелкоклеточном ретикулярных ядрах. В этих же ядрах обнаружены также нейропептиды: субстанция P, соматостатин, нейротензин, холецистокинин и др. [48].

В конце прошлого века после открытия сигнальных функций оксида азота (NO) представления о роли нейротрансмиттеров в процессах регуляции гемодинамики кардинально изменились. Было признано существование нового класса сигнальных молекул – газообразных посредников. В начале 90-х годов в эту группу включили монооксид углерода (CO) и сероводород (H₂S). Несмотря на то, что некоторые функции газотрансмиттеров в передаче нервного импульса сходны с классическими посредниками, имеются отличительные признаки. Например, классические мессенджеры, передают сигнал по принципу каскада, газотрансмиттеры химически модифицируют внутриклеточные протеины, быстро изменяя, таким образом, клеточный метаболизм [72,91].

В нейронах продолговатого мозга обнаружены ферменты, синтезирующие NO, CO и H_2S . Тем не менее, морфологические данные о наличии и распределении этих веществ в нервных клетках практически отсутствуют.

1.2 Газообразные посредники в центрах регуляции гемодинамики 1.2.1. Медиаторная функция оксида азота

Активное изучение физиологической роли оксида азота началось с 80-х годов, когда группа исследователей в США (Furchdott, Zavardski) показала, что тонус гладкой мускулатуры сосудов регулируется синтезируемыми в эндотелии биологически активными веществами [2]. Вещество, выделяющееся эндотелиальными клетками и приводящее к расширению сосудов, получило название «сосудорасширяющий эндотелиальный фактор». Несколько позже было доказано, что это вещество является NO и в клетках имеются особые ферментные системы, способные его синтезировать [68]. В последующем было показано, что NO широко представлен в структурах нервной системы животных и человека и принимает участие в регуляции множества функций организма [49,83].

Оксид азота это бесцветный газ, растворимый в воде и жирах. В химическом отношении NO представляет собой молекулу, состоящую из одного атома азота и одного атома кислорода и имеющую непарный электрон, что превращает ее в высоко реактивный радикал, свободно проникающий через биологические мембраны и легко вступающий в реакции с другими соединениями [39]. Время его полужизни не велико (около 10 секунд) и расстояние возможной диффузии около 30 мкм [2,68], после чего он при участии кислорода и воды превращается в нитраты (NO_2^-) и нитриты (NO_3^-).

Оксиду азота присущи свойства внутри- и межклеточного мессенджера. Он так же является паракринным соединением, т.к. может оказывать воздействие на соседние клетки. Молекула оксида азота является одним из биорегуляторов тонуса кровеносных сосудов [83], респираторной функции [19], участвует в развитии боли, выполняет про- и противовоспалительную роль в развитии инфекционных процессов [66].

В организме человека и животных существуют два пути биосинтеза оксида азота: ферментативный (нитритредуктазный и NO-синтазные реакции) и

неферментативный (протонирование ионов NO_2^- с последующим распадом азотистой кислоты и высвобождением NO) [17,38,39]. Оба механизма связаны между собой и являются компонентами цикла оксида азота. В первом случае оксид азота синтезируется из аминокислоты L-аргинина под воздействием ферментов семейства цитохром P-450-подобных гемопротеинов – NO-синтаз с участием никотинамидадениндинуклеотида (NADPH), как источника электронов, и кофакторов [1,44].

NO-синтаза (NOS) – фермент, состоящий из двух одинаковых белковых субъединиц, к каждой из которых присоединено несколько кофакторов, определяющих каталитические свойства фермента. В группу NOS входят три изофермента: нейрональная NO-синтаза (nNOS, 1тип), макрофагальная (iNOS, 2 тип) и эндотелиальная (eNOS, 3 тип). nNOS впервые была обнаружена в нейронах, где продуцируемый ею оксид азота действует как медиатор. В дальнейших исследованиях нейрональная NO-синтаза была обнаружена в скелетных мышцах, кардиомиоцитах, эпителии бронхов и трахеи [38].

Макрофагальная NO-синтаза экспрессируется в макрофагах при патологических процессах (например, при воспалении) и обеспечивает иммунную защиту организма [1]. Впервые выделенная из активированных лейкоцитов, она также обнаружена в кардиомиоцитах, эндотелиоцитах, гладкомышечных клетках, гепатоцитах, однако основным ее источником являются макрофаги [116,156].

Эндотелиальная NO-синтаза генерирует оксид азота, который понижает артериальное давление и ингибирует агрегацию тромбоцитов. eNOS, помимо эндотелиальных клеток, встречается в целом ряде тканей (кардиомиоциты, пейсмекерные клетки, тромбоциты, гиппокамп, легочный и почечный эпителий) [17].

Конститутивная NOS постоянно присутствует в цитоплазме и ее активность зависит от *Ca*²⁺ или кальмодулина [48]. Уровень NO, поддерживаемый конститутивной NO-синтазой в тканях, не превышает нескольких мкМ [55,74]. Врожденная или приобретенная недостаточность конститутивной NOS приводит к артериальной гипертонии.

Индуцибельная NO-синтаза проявляет активность через некоторое время (6-8 часов) [68] и может экспрессироваться в клетках сосудистой стенки и макрофагах только при патологических процессах (например, при воспалении) [39] и при физических нагрузках [51]. Активность iNOS не зависит от уровня ионов кальция. Количество NO, образующееся под влиянием iNOS может варьировать и достигать больших значений (в 1000 раз больше, чем при конститутивной NOS) [22,37].

Действие, оказываемое NO на клетки, зависит от количества газа. Уровень оксида азота, синтезированного всеми синтазами, не превышает 10⁻⁷, 10⁻⁸ M [74]. Начиная с концентрации 10⁻⁴ M образующейся, как правило, индуцибельной NOS, NO оказывает на клетки токсическое действие, развивается интоксикация [2]. NO способен окислять SH-группы аминокислоты цистеина, разрывать ковалентную связь -S-S-, изменять третичную структуру протеинов [74]. Кроме того NO может непосредственно повреждать ДНК, что является одной из причин развития апоптоза [48,68].

Несмотря на то, что оксид азота был впервые идентифицирован как фактор релаксации гладкой мускулатуры сосудов [49] – это была первая газообразная молекула, открытие которой привело к пересмотру классических представлений о сигнальной трансдукции в нейронах [58].

NO широко представлен как в центральной, так и в периферической нервной системе. В центральной нервной системе оксид азота не является самостоятельным нейротрансмиттером, а выделяется в постсинаптических нейронах под влиянием других медиаторов, из которых наиболее изучен глутамат [40,49]. Глутамат, синтезируемый пресинаптическими нейронами, стимулирует N-метил-D-аспарат рецепторы постсинаптических нейронов. Это способствует повышению внутриклеточной концентрации Ca²⁺ и усилению активности нейрональной NOS, что приводит к повышению синтеза NO [61,118]. NO-синтаза сосуществует в нервных клетках с другими традиционными нейромедиаторами и нейропептидами.

нервной системе NO играет важную роль, как в нормальных В физиологических условиях, так и при различной патологии. Источниками оксида ЦНС являются нейроны, нейроглиальные азота В клетки и эндотелий кровеносных сосудов. В отличие от других нейротрансмиттеров, NO является очень реактивной молекулой, способен быстро диффундировать через мембрану в другие нейроны и глиальные клетки (то есть действовать как ретроградный мессенджер) [54]. Согласно некоторым данным, под влиянием NO происходят электрофизиологической активности изменения плазматической И внутриклеточных мембран, функционального состояния митохондрий И оптических свойств нейронов [7].

1.2.2. Организация нитроксидергических систем мозга

В настоящее время накоплен большой объем информации по нейронной организации нитроксидергических систем мозга [2,98]. Повышенный интерес исследователей к NO во многом объясняется его участием в обеспечении функций нейрона, включая регуляцию гемодинамики [31,91]. В связи с этим приобретают особую важность объективные данные о распределении NO-нейронов в мозге. На основе гистохимических и иммуногистохимических методов было установлено, что NO-ергические нейроны выявляются в различных структурах головного мозга [39,76,92].

У человека и крысы нитрооксидпозитивные нейроны постоянно определяются в ядрах продолговатого мозга и моста [93,98]. Нервные клетки различаются структурой и плотностью выпавшего осадка, в результате чего цитоплазма клеток окрашивается в различные оттенки синего цвета – от голубого до фиолетового. Нейроны с умеренной активностью NADPH-диафоразы преобладают в ядре одиночного пути и ретикулярном латеральном ядре. Особенно много их обнаружено в дорсальном ядре блуждающего нерва крысы [70, 88].

У человека и крысы клеток с высокой активностью больше всего обнаружено в ретикулярном гигантоклеточном ядре, а у крысы, кроме того, в ретикулярном мелкоклеточном и центральном ядрах. Клетки, в которых массивный гомогенный осадок фиолетового цвета заполняет все тело клетки, постоянно определяются в вентральном гигантоклеточном и мелкоклеточном ретикулярных ядрах, ретикулярном центральном ядре [82,93]. В других ядрах (ядро одиночного пути или ретикулярное латеральное ядро) определяются немногочисленные, редко расположенные нервные клетки, большая часть которых обладает невысокой активностью фермента [90]. NADPH-диафоразапозитивные протонейроны постоянно выявляются в нижнем яремном узле, в некоторых отделах гиппокампальной формации, латеральном ядре гипоталамуса, обонятельных луковицах [78].

Наличие NO-нейронов установлено также в гиппокампе и новой коре [65], конечном мозге [49], в неокортексе и старой коре [46]. В гиппокампе NO повышает чувствительность NMDA-рецепторов к глутамату – наиболее возбуждающему нейромедиатору распространенному мозге. В вызывая повышение эффективности проведения возбуждения через синапс для каждого последующего импульса. В гиппокампе и мозжечке обнаружен наиболее высокий уровень экспрессии ферментов, участвующих NO, В синтезе а иммуногистохимическим методом показано присутствие соответствующих групп нейронов в указанных отделах мозга у крыс и мышей [91].

Оксид азота вовлечен и в другие функции мозга, обеспечивая пластические перестройки нейронов, входящих в состав соответствующих нервных центров. Это постоянно происходит в обычных условиях жизнедеятельности организма и обеспечивает перестройку нервных центров при патологии [30,31]. В центральной нервной системе NO специфически связывается не С рецепторами постсинаптической мембраны, как В случаях с классическими нейротрансмиттерами, а выделяется из различных участков нейрона. По результатам электронно-гистохимического исследования локализации NOS в нейронах установлено, что маркеры энзима откладываются в перикарионе, по

всей длине дендритов и аксона, на плазматической мембране терминальных расширений аксона, в аксоплазме, митохондриях и мембранах синаптических везикул [92].

1.2.3. Роль монооксида углерода в регуляции кровообращения

Монооксид углерода СО, наряду с оксидом азота, принадлежит к семейству газотрансмиттеров и вовлечен в регуляцию многих физиологических процессов организма. Хотя изначально СО рассматривался как вещество с исключительно токсическими свойствами, позднее он был описан как фактор, участвующий в нейрональной активности, были установлены его вазорелаксирующие свойства [157,184]. Как и другие газовые посредники монооксид углерода является простой молекулой, обладающей липофильными свойствами. СО легко проникает через клеточные мембраны, а значит, его внутриклеточное действие не связано с распознаванием мембранных рецепторов [58].

Субстратом для эндогенного образования СО служит молекула гема, расщепление которой катализируется ферментом гемоксигеназой (НО). При этом образуется биливердин, двухвалентное железо и СО [84]. Известны три изоформы гемоксигеназы: индуцибельная – НО-1 и две конститутивные – НО-2 и НО-3. Изофермент НО-1 играет важную роль в адаптации клеток и тканей в ответ на действие стрессорных факторов различной природы [48]. Ранее считалось, что НО-1 определяется, в основном, в эндоплазматическом ретикулуме. Однако позднее он был обнаружен в цитоплазме, ядерном матриксе, пероксисомах и митохондриях селезенки и печени [20]. НО-1 контролирует образование СО, необходимое для размножения клеток и роста капилляров [58].

Изоформа HO-2 определяется в различных отделах нервной и сердечнососудистой системы [17,27,30]. СО вовлечен в регуляцию тонуса сосудов, передачу импульсов в мозге, обладает цитопротекторными, противовоспалительными и антиапоптотическими свойствами. Показано как стимулирующее, так и ингибирующее действие СО на апоптоз гладкомышечных, эндотелиальных и эпителиальных клеток [48]. Монооксид углерода участвует в подавлении эндотоксического шока, отторжении тканей при трансплантации органов, защищает от септического шока, предотвращает повреждение тканей легких [27].

При увеличении цитозольной концентрации Ca²⁺ увеличивается синтез CO. Монооксид углерода активирует растворимую гуанилатциклазу, что приводит к увеличению концентрации гуанозинмонофосфата в клетках. В отличие от оксида азота СО оказывает на сосуды хотя и слабые, но долговременные тонические эффекты [173]. Мишенями действия монооксида углерода в гладкомышечных клетках могут быть также потенциалзависимые калиевые каналы и Ca²⁺активируемые калиевые каналы. Монооксид углерода увеличивает калийзависимый ток индуцирует гиперполяризацию в изолированных И гладкомышечных клетках сосудов, выполняя в миоцитах функцию модулятора сосудистого тонуса.

НО-3 в синтезе СО участия не принимает, и ее функциональное значение в организме точно не установлено.

1.2.4. Распределение СО-продуцирующих нейронов в мозге

Монооксид углерода является гораздо менее изученным газотрансмиттером, чем оксид азота. В связи с этим, данные о пространственном и количественном распределении СО-нейронов в мозге весьма ограничены.

В головном мозге крыс определяется высокая активность HO-2 [84]. Анализ литературы показывает, что активность HO-2 преобладает в нейронах переднего мозга, мозжечка, гиппокампа, среднего мозга, базальных ганглиев, таламуса, ствола мозга, обонятельной луковице [30]. В местах локализации HO выпадает гранулярный осадок, который в зависимости от интенсивности реакции окрашивает нейроны в различные оттенки коричневого цвета [27].

В различных участках головного и спинного мозга нейроны, экспрессирующие НО, распределены неравномерно. Во многих ядрах нейроны с такой функцией не обнаружены, в других ядрах выявляется достаточно большое число НО-позитивных нейронов. Кроме того, нейроны отличаются между собой интенсивностью иммуногистохимической реакции, размерами, формой. Большая часть нейронов, экспрессирующих НО, имеет овальную и веретеновидную форму [15,20].

В продолговатом мозге человека наиболее многочисленную группу СОпозитивные нейроны образуют в проекции ядра солитарного тракта и ретикулярного латерального ядра. Почти вдвое ниже доля СО-нейронов в дорсальном ядре блуждающего нерва, ретикулярном мелкоклеточном ядре, нижнем оливарном ядре. Небольшое число клеток выявляется в ретикулярном гигантоклеточном и парагигантоклеточном ядрах, ядрах шва задней группы [30,84].

Установлена определенная функциональной зависимость между принадлежностью ядер, числом СО-нейронов и оптической плотностью фермента в нейронах этих ядер. В двигательных ядрах доля СО-нейронов в 4-6 раз меньше, Значение оптической фермента чем В чувствительных. плотности В чувствительных ядрах в 1,5-4 раза выше, чем в двигательных. Крупные СОнейроны, как правило, демонстрируют отрицательную реакцию или низкую интенсивность реакции [84].

СО, продуцируемый в организме под влиянием фермента НО, является как и NO, ретроградным синаптическим посредником. СО и NO могут действовать на различные механизмы возникновения и поддержания долговременной потенциации, взаимодействуя друг с другом. Однако в мозге они могут оказывать антагонистическое действие [17].

1.2.5. Сероводород и его вазомоторное действие

Негативное действие на организм сероводорода известно давно. H₂S легко проникает сквозь клеточные мембраны, связывает ионы железа и нарушает клеточное дыхание. Вдыхание сероводорода в концентрации 1,0 мг/л и выше приводит к судорогам и потере сознания [47]. В настоящее время сероводород, как и оксид азота и монооксид углерода, относят к газотрансмиттерам – газообразным внутриклеточным сигнальным молекулам, выполняющим в клетке специфические регуляторные функции.

Молекула H_2S образуется практически во всех тканях организма. Ферменты, синтезирующие H_2S , были обнаружены в клетках печени, почек [10,57,58], поджелудочной железы [47], нервной и сердечно-сосудистой системах [46,50]. В синтезе сероводорода принимает участие микрофлора кишечника. Как газотрансмиттер, H_2S проникает через мембраны клеток без специфических транспортных молекул.

Различают ферментативный и неферментативный пути синтеза H_2S . Синтез происходит с помощью ферментов цистатионин- β -синтазы (CBS) и цистотионин- γ -лиазы (CSE) [58], а также 3-меркаптипируват-сульфуртрансферазы (3MST). CBS и CSE используют в качестве субстрата для продукции эндогенного H_2S L-цистеин.

Цистатионин-β-синтаза особенно активна в центральной нервной системе, а цистатионин-γ-лиаза – в клетках гладкой мускулатуры сосудистой стенки и кардиомиоцитах. В печени и почках обнаружены оба фермента [30, 58]. В качестве субстрата могут использоваться и другие серосодержащие аминокислоты, такие как метионин и цистин [188].

Неферментативный путь образования H_2S заключается в восстановлении серы до H_2S при окислении глюкозы. Кроме того возможно получение H_2S из глутатиона [17].

В организме сероводород стимулирует антиоксидантную систему и оказывает цитопротекторное действие [47]. Установлено, что эндогенный H_2S необходим для защиты почек от травм и дисфункций при ишемии-реперфузии. H_2S вызывает ряд противовоспалительных эффектов. Ингибирование эндогенного H_2S сопровождается потерей целостности эпителия в различных органах и активацией в них воспалительных процессов. H_2S обладает способностью изменять апоптотическую реакцию клеток. Этот газотрансмиттер может иметь как индуцирующее, так и ингибирующее воздействие на указанный процесс [48,58].

Многие работы показывают, что сероводород является важным регулятором расслабление ГМК кровеносных сосудов, вызывая сосудистых [4,5]. Электрофизиологические исследования показали, что сероводород увеличивает АТФ-зависимый каналов. В ток калиевых результате чего происходит гиперполяризация гладкомышечных клеток сосудов. Таким образом, сероводород релаксирует сосуды путем открытия К_{АТФ} каналов в гладкомышечных клетках [10].

Анализ литературы свидетельствует о важной роли сероводорода в процессах внутриклеточного метаболизма и реализации физиологических функций организма. Эта сигнальная молекула играет важную роль в регуляции функций нервной системы, сердечно-сосудистой, иммунной, сенсорной, желудочно-кишечной системы.

1.2.6. Локализация H₂S-продуцирующих нейронов в вазомоторных центрах мозга

В мозгу за синтез сероводорода отвечает фермент цистатионин-β-синтаза, где его концентрация колеблется от 50 до 160 мкМ [17]. При некоторых заболеваниях, например, болезни Альцгеймера, уровень сероводорода ниже, чем у

здоровых людей. А при болезни Дауна наблюдается его избыточный синтез в мозге [47].

Сведения о распределении H₂S-продуцирующих систем в головном мозге в литературе практически отсутствуют. Известно наличие H₂S-нейронов в гиппокампе и мозжечке [138].

Иммуногистохимическими методами выявлено наличие CBS-позитивных нейронов во многих ядрах продолговатого мозга и моста, имеющих отношение к центральной регуляции сосудистого тонуса [89]. CBS-позитивные нейроны отличаются структурой, плотностью и цветом выпавшего осадка. Большинство этих клеток (более 50% от общего количества CBS-нейронов) имеют низкое содержание фермента. Таких клеток много в чувствительных и ассоциативных ядрах (ядро одиночного пути, ретикулярное мелкоклеточное и ретикулярное При иммуногистохимической латеральное ядро). реакции ЭТИ клетки окрашиваются в бледно коричневый цвет. В нейронах с умеренным содержанием CBS продукт реакции откладывается более плотно, окрашивая клетки в более темные тона. Такие нейроны особенно часто встречаются в ядрах моста, в дорсальном ядре блуждающего нерва. Клетки с высокой интенсивностью реакции преобладают в двигательных ядрах продолговатого мозга и моста. В таких нейронах осадок выпадает не только в цитоплазме, но и в отростках клеток [81].

Кроме нейронов, CBS обнаруживается также в нервных волокнах, эндотелии артериол и капилляров. CBS выявляется в нейронах чувствительных корешков спинного мозга, в ядрах солитарного тракта и ретикулярного латерального ядра [91]. Сероводород принимает участие в восприятии и передаче болевой информации к нервным центрам.

В нервной системе H₂S играет важную роль в формировании памяти и ассоциативных процессов. Кроме того, сероводород защищает нейроны от действия глутамата, который в избытке образуется при эпилептических припадках, ишемии мозга или травмах [30].

1.3 Роль газообразных посредников в развитии гипертензии

1.3.1. Оксид азота

гипертензия $(A\Gamma)$ Артериальная является ОДНИМ ИЗ самых распространенных сосудистых заболеваний. Накопилось большое количество данных, свидетельствующих о важной роли газотрансмиттеров в развитии артериальной гипертензии. Bce газообразные посредники обладают вазорелаксирующим эффектом, что позволяет им принимать непосредственное участие в регуляции артериального давления.

Установлено, что NO оказывает ингибирующее влияние на симпатическую активность и способствует снижению артериального давления. При сокращении синтеза NO выявляется противоположный эффект – повышение сосудистого тонуса [30,43,63]. При гипертензии, как в чувствительных, так и в двигательных ядрах отмечено уменьшение NO-позитивных нейронов и активности в них фермента [3]. Снижение активности нитроксидергической системы является одной из причин гиперактивации симпатической нервной системы и стойкого [31,97]. Снижения повышения артериального давления синтеза NO и сопутствующая гиперактивация симпатической нервной системы провоцирует ремоделирование сосудистой стенки и способствует закреплению АГ [8,103].

Дефицит NO при гипертензии может быть обусловлен снижением активности эндотелиальной NO-синтазы, разрушением или захватом NO свободными радикалами [42], ослабленным действием NO на гладкую мышцу. Стимулирование эндогенного синтеза NO при гипертензии нормализует эндотелий-зависимое расслабление и снижение АД.

При изучении роли NO в регуляции кровяного давления было показано, что внутривенное введение ацетилхолина вызывает снижение АД. Введение блокатора NO-синтазы L-NNA предупреждает эти изменения [43]. Хроническое ингибирование NO-синтазы блокаторами L-NNA или L-NAME у крыс приводит к

зависимому от времени и дозы повышению АД и достаточно быстро вызывает развитие атеросклеротических поражений сосудов.

1.3.2. Монооксид углерода

Анализ литературы показывает, что СО, наряду с оксидом азота, обладает вазорелаксирующим эффектом, что позволяет ему играть заметную роль в регуляции артериального давления. При подавлении активности ферментов, отвечающих за синтез данного газа в стенке сосудов, развивается гипертензия [91]. Уменьшения активности ферментов приводит не только к сокращению синтеза СО, но и последующему снижению концентрации растворимой гуанилатциклазы и цГМФ, что, в свою очередь, уменьшает один из главных эффектов газотрансмиттеров – расслабление сосудистой стенки [30,88]. Снижение синтеза СО (также как и NO) в нейронах сосудодвигательного центра поддерживает гиперактивацию симпатической нервной системы, провоцируя ремоделирования сосудистой стенки и закрепление АГ.

Монооксид углерода является гораздо менее изученным газотрансмиттером, чем NO. В связи с этим, данные о пространственном и количественном распределении СО-позитивных нейронов в мозге весьма ограничены. Функциональные свойства и механизмы действия СО до сих пор вызывают противоречивые оценки. Для выяснения механизмов, лежащих в основе работы вазомоторного центра, необходимы материалы по изучению НО-позитивных нейронов в тех областях мозга, которые управляют вазомоторикой при изменениях кровяного давления.

Опубликованы материалы [88], что при АГ в ядрах продолговатого мозга крыс наблюдается уменьшение доли НО-позитивных нейронов и средних значений оптической плотности продукта реакции. Сокращение числа НОпозитивных нейронов в большей степени затрагивает нейроны чувствительных ядер, а также дорсальное ядро блуждающего нерва и некоторых ретикулярных

показателей СО-позитивных ядер. Изменение количественных нейронов наблюдается в первую очередь в небольших клетках с высокой или умеренной Менее плотностью отложения продукта реакции. всего изменения количественных показателей наблюдаются в ретикулярном гигантоклеточном и околоцентральном ядрах. В ядре одиночного пути наблюдается наиболее выраженное снижение изменение содержания НО, что может быть связано с серьезными нарушениями механизмов синтеза СО при АГ в афферентном звене рефлекторной дуги.

1.3.3. Сероводород

О роли H_2S в центральных механизмах регуляции кровотока в литературе сведений очень мало. Установлено, что H_2S вызывает гипотонию в условиях *in vivo* и имеет сосудорасширяющий эффект в условиях *in vitro* путем открытия K^+ -АТФ-каналов в сосудистых гладкомышечных клетках [47]. Длительный прием ингибиторов CSE вызывает артериальную гипертензию у крыс. Однако отсутствие этого фермента не сказывается на концентрации H_2S в мозге, где его синтез обеспечивает другой фермент – CBS [28].

Снижение синтеза H₂S было продемонстрировано в ходе исследования сосудов V спонтанно гипертензивных крыс при экспериментально сформированной блокады NO-синтазы, гипоксии путем а также при индуцированной легочной гипертензии. Введение экзогенного донора H_2S вызывало значительный терапевтический эффект [47].

В последние годы появились работы, показывающие наличие морфологического субстрата, посредством которого H_2S может участвовать в реализации центральных механизмах регуляции гемодинамики [10,11,30]. Клетки, обладающие активностью CBS, обнаружены в некоторых ядрах продолговатого мозга и моста, имеющих отношение к бульбарному отделу сердечно-сосудистого центра [28].

В процессе развития гипертензии в большинстве ядер продолговатого мозга у человека и крыс наблюдается все более выраженное уменьшение содержания H₂S-нейронов и активности в них CBS, причем наибольшее изменение этих показателей отмечаются в нейронах двигательных ядер [28,86]. Количественные изменения параметров и пространного распределения H₂S-нейронов наступают позднее и выражены в меньшей степени, чем NO-нейронов. В результате этого процесса происходит изменения пространственного расположения H₂S- и NOнейронов в ядре. Изменение топографии двух типов нейронов внутри ядер отражаются как на характере связей между ядрами, так и организации работы нервного центра.

На ранних этапах развития гипертензии происходит компенсаторное замещение недостаточности функции одних газотрансмиттерных систем другими. В результате наступает временная стабилизация артериального давления. При дальнейшем уменьшении активности NO-синтезы, CBS (а также HO-2) в нейронах и концентрации иммунопозитивных клеток ведет к повышению АД и стабилизации его на новом уровне [91].

1.4 Морфофункциональное взаимодействие газотрансмиттерных нейронов

В последние годы появляется все больше доказательств, что сигнальная функция нейронов в мозге контролируется не каждым газотрансмиттером в отдельности, а при активном взаимодействии этих веществ [58,91]. Все известные газовые посредники являются простыми молекулами, легко проникают через клеточные мембраны, а значит, их внутриклеточное действие не связано с распознаванием мембранным рецепторов [58]. Все они могут активировать Кканалы высокой проводимости, а их внутриклеточное действие сопряжено с химической модификацией белков-мишеней. Все газообразные посредники регулируют многочисленные реакции клетки, облегчают индукцию долговременной потенциации в гиппокампе, оказывают вазорелаксирующее действие [17,78].

В различных разделах мозга обнаружены NO- и CO- и H₂S-позитивные нейроны. Причем распределены они по исследуемым областям крайне неравномерно. Размеры, концентрация и доля этих клеток в различных частях мозга также сильно отличаются [94,99,84]. Большинство выявленных здесь клеток располагается в непосредственной близости друг от друга, образуя более или менее выраженные скопления нейронов различной медиаторной специфичности. Однако, нередки примеры, когда NO- и CO-иммунопозитивные нейроны формируют объемные кластеры и в тех областях ядра, где нейроны с экспрессией в-синтазы отсутствуют или наблюдаются цистатионин В ограниченном количестве. В связи с этим, несмотря на определенную схожесть функций и общность периферических эффектов газообразных посредников, в нейрональной трансдукции часто наблюдаются «параллельные» эффекты оксида азота и оксида углерода, тогда как сероводород в ряде случаев подавляет активность этих газов [72].

Встречаются работы, рассматривающие вопросы взаимодействия газотрансмиттеров СО и NO в реализации вазодилатирующих эффектов [17]. Предполагается, что NO не только потенцирует опосредованную цГМФ передачу сигнала, но также выступает в роли ретроградного мессенджера для СО-зависимой системы [113]. Кроме того, СО способен напрямую связывать и инактивировать эндотелиальную NO-синтазу, уменьшая тем самым продукцию NO [134].

Известно, что NO и его доноры способны стимулировать экспрессию HO-1 и тем самым повышать продукцию CO в различных типах клеток [164]. Таким образом, газы функционально тесно связаны между собой и работают вместе, регулируя клеточные процессы в норме и патологии. Что касается взаимодействия NO и H₂S в ядрах мозга, то таких сведений в литературе мы не встретили.

Возможно, Н₂S облегчает освобождение из эндотелия NO [195]. Механизмы действия NO и H₂S различны. Действие NO осуществляется через активацию растворимой гуанилатциклазы и синтез цГМФ. Влияние NO на клетки связывают, очередь, с изменениями электрофизиологической В первую активности и энергообеспечения нейронов за счет взаимодействия NO с белками плазматической и митохондриальной мембран [7]. Известно, что NO активирует К⁺-каналы постоянного тока, вызывая деполяризации нейронов, а с другой стороны, инактивирует НМДА-рецепторы глутамата, уменьшая вход Ca²⁺ в нейроны и ингибируя синаптическую передачу [7].

Эффекты H_2S осуществляются через гиперполяризацию, которая обеспечивается активностью $K_{AT\Phi}$ -каналов [10]. Кроме того, оксид азота и монооксид углерода осуществляют свое действие на пресинаптическом уровне, усиливая секрецию глутамата, в то время как сероводород меняет активность постсинаптических НМДА-рецепторов [6].

Из сказанного выше следует, что в нейронной организации вазомоторных ядер имеются структурные предпосылки для обеспечения взаимодействия газов. В процессе реализации своей деятельности газотрансмиттерные нейроны могут не взаимодействовать собой, только между но И С нервными клетками, продуцирующими классические нейромедиаторы, которые также находятся в центральной части ядра [58,78,98]. Согласно современным представлениям, множественность и разнообразие эффектов классических нейромедиаторов во многом обеспечивают нейромодуляторы, в качестве которых часто выступают оксид азота, монооксид углерода и сероводород. Оказывая действие на нейроны, включающие ацетилхолин, норадреналин или серотонин, они создают условия для объединения отдельных нейронов в функциональные нервные центры, расширяя возможности мозга по управлению сложными процессами в организме.

Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика исследованного материала

Работа выполнена на 128 крысах-самцах линии Wistar массой 230-250 г, которых разделили на три группы: интактные (15 крыс), ложно оперированные (38 крыс) и с реноваскулярной гипертензией (75 крыс). Реноваскулярную гипертензию (РВГ) вызывали описанным ранее методом [30], который заключался в хирургической операции по перевязки левой почечной ножки и наложение восьмиобразного шва на границе верхней/средней трети правой почки. В результате операции наступал инфаркт левой почки и верхней трети правой, приводящий к уменьшению почечной массы и подъему систолического давления.

Данные распределения животных по группам и срокам исследования представлены в таблице 1.

Группа	Сроки исследования (недели)									
исследования	2	4	6	8	10	12	14	16	20	24
Интактные	5	-	-	-	5	-	-	-	-	5
Ложно оперированные	3	3	3	3	5	5	3	3	5	5
Реноваскулярная гипертензия	5	5	6	7	7	7	6	6	5	5

Таблица 1. Распределение крыс по группам исследования

Исследования проводили согласно Правилам проведения работ и использования экспериментальных животных (Приложение 3 к приказу МЗ СССР №755 от 12.08.1977 г.) и Стандарта отрасли «Правила проведения качественных клинических испытаний в Российской Федерации» (утверждены МЗ РФ 29.12.1998 г. и введены в действие с 01.01.1999 г.). Животных содержали в виварии в соответствии с «Санитарными правилами по устройству, оборудованию

и содержанию экспериментально-биологических клиник» (№1045-73 от 06.04.1973 г.). Кормление крыс осуществлялось в соответствии с нормами, утвержденными МЗ СССР от 10.03.1986 г. №163.

использовались гистологические, В работе иммуногистохимические, гистохимические, морфометрические и статистические методы. При изучении образцов у гипертензивных крыс в качестве контроля использовали материал, взятый у ложно оперированных крыс, которые, как и интактные животные, имели показатели давления 114,7±3,7 мм рт. ст. Все использованные в работе крысы содержались на стандартном рационе в одинаковых условиях лабораторного вивария. У крыс с вызванной реноваскулярной гипертензией на 2-й неделе после операции артериальное давление составляло 118,1±8,6 мм рт. ст., на 4-й – 138,4±6,4 мм рт. ст., на 6-й – 151,7±7,4 мм рт. ст., на 8-й – 164,3±6,5 мм рт. ст., на 10-й – 166,2±6,4 мм рт. ст., на 12-й – 167,6±7,1 мм рт. ст., на 14-й – 169,6±6,3 мм рт. ст., на 16-й – 177,4±6,1 мм рт. ст., на 20-й – 174,5±6,1 мм рт. ст., на 24-й – 172,1±6,3 мм рт. ст. Систолическое давление измеряли при помощи системы неинвазивного мониторирования кровяного давления у крыс ML U/4c501 методом хвостовой манжеты (MedLab, China).

Эвтаназию всем крысам производили передозировкой введенного внутрибрюшинно 3% раствора тиопентала Na (Приложение 4 к приказу №755 M3 СССР). Этот метод, в отличие от эфирного наркоза, не отражается на результатах гисто- и иммуногистохимических исследований [30]. Забор материала производили непосредственно после наступления смерти животного.

Объектом для исследования служил продолговатый мозг, в котором ядре исследовали внутриядерные (ВЯ) нейроны В солитарного тракта, ретикулярных латеральном, мелкоклеточном и гигантоклеточном ядрах, и межъядерные клетки (МЯ), находящиеся между ретикулярным гигантоклеточным 1), И ретикулярным мелкоклеточным ядрами (группа ретикулярным мелкоклеточным ядром и ядром солитарного тракта (группа 2), в окружении ретикулярного латерального ядра (группа 3). Для этого в серии из не менее 16 последовательных сагиттальных или фронтальных срезов (толщина среза 30-40

мкм) продолговатого мозга каждого животного, первый срез окрашивали метиленовым синим или на NADPH-d, второй – для исследования nNOS (NOнейроны), третий – CBS (H₂S-нейроны), четвертый – HO-2 (СО-нейроны). Каждое ядро на смежных срезах ориентировали по характерным признакам в фронтальной контуры сагиттальной И плоскостях, после чего ядер воспроизводили на экране монитора в соответствии с ИХ положением относительно координат сетки. Местоположение и границы уточняли на препаратах, окрашенных метиленовым синим. При определении локализации продолговатом исследуемых ядер В мозге У крысы использовали цитоархитектоническую карту, приведенную В «The Rat Brain» [175]. Анатомическая номенклатура ядер в настоящей работе представлена В соответствии с атласом мозгового ствола человека и животных [60].

2.2. Гистологические и гистохимические методы исследования

Для изучения цитоархитектоники продолговатого мозга использовали парафиновые или криостатные срезы, окрашенные 0,5 % раствором метиленового синего.

Для выявления нитроксидергических нейронов применяли два метода: гистохимический Scherer-Singler [182], в модификации Норе a. Vinsent [145] для выявления NADPH-диафоразы (NADPH-d), и имунногистохимический – для определения локализации нейрональной NO-синтазы. В первом случае материал инкубировали в среде, содержащей 0,5 мМ β-NADPH, 0,5 мМ нитросинего тетрозолиевого и 0,3 % Тритона Ч-100 в 0,15 М Трис-HCL-буфере (pH 8,0) в течение 1 ч в термостате при 37°С. После инкубации препараты промывали в дистиллированной воде, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заключали в канадский бальзам. Контрольные образцы помещали в среду с добавлением ингибитора NO-синтазы – N-нитро-L-аргинина (10 мМ).

Специфичность гистохимической реакции проверялась инкубацией нескольких срезов в растворах, не содержащих нитросиний тетразолий или NADPH, а также в растворе, содержащем NADP вместо NADPH. Поскольку химическая реакции заключается В образовании преципитата формазана основа при восстановлении солей тетразолия в присутствии NADPH-d, то гистохимическая реакция не наблюдается при отсутствии в инкубационной среде любого из основных ее компонентов. При этом препараты остаются прозрачными, либо окрашиваются в светло-розовый цвет за счет неспецифической адсорбции формазана.

2.3. Иммуногистохимические методы исследования

Иммуногистохимические методы в работе были использованы для выявления нейрональной NO-синтазы (nNOS), гемоксигеназы-2 (HO-2) и цистатионин β-синтазы (CBS) в продолговатом мозга крысы, которые определяли непрямым иммунопероксидазным методом.

Иммуногистохимическое выявление всех выше названных ферментов в структурах продолговатого мозга крысы проводили в несколько этапов. После извлечения мозга из полости черепа, и фиксации небольших (около 0,5 см³) кусочков исследуемого материала, их промывали в течение 24 ч в 0,1 М фосфатно-солевом буфере (pH 7.4).

Фиксированный материал пропитывали в холодном 15 % растворе сахарозы на 0,1 М фосфатном буфере и готовили криостатные срезы толщиной 30–40 мкм. После подавления эндогенной активности пероксидазы в 1 % растворе H_2O_2 и подавления неспецифического связывания антител в 2–3 % растворе нормальной сыворотки козы, препараты инкубировали в течение 18 ч при комнатной температуре с поликлональными антителами, полученными у кролика, против nNOS, (Cayman, CША) в разведении 1:200; Затем срезы отмывали в нескольких сменах забуференного (0,05 М трис-буфер, pH 7,6) физиологического раствора, проводили инкубацию в течение 1 ч при комнатной температуре в биотинилированной козьей антисыворотке против IgG кролика (Vectastain, CШA) для nNOS, в разведении 1:200, (Vector Labs, CШA). В качестве растворителя для первых и вторых антител использовали забуференный физиологический раствор, содержащий 0,03–0,1% тритон X-100 и 1–3% нормальную сыворотку козы. После отмывания, срезы инкубировали в течение 1 ч с комплексом авидин-биотинилированной пероксидазы хрена (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Labs, CШA) в разведении 1:50 – 1:100 в забуференном физиологическом растворе, содержащем 0,1 % тритон. Активность пероксидазы для nNOS выявляли инкубированием срезов в диаминбензидине (VIP Substrate Kit, Vector Labs, CШA) под контролем микроскопа.

Для иммунногистохимического выявления CBS и HO-2 криостатные срезы последовательно инкубировали с 1 % нормальной сывороткой лошади 1 ч при комнатной температуре; мышиными моноклональными антителами против CBS (Abcam, Великобритания) в разведении 1:500, против НО-2 в разведении 1:1000 при температуре 4°C в течение 18 ч; биотинилированными антителами лошади против IgG мыши (Vector Labs, США) в разведении 1:100 2 ч при комнатной температуре и с авидин-пероксидазным комплексом (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Labs, США) 1 ч при комнатной температуре. Для выявления продуктов реакции для CBS, срезы инкубировали в субстрате красного цвета для обнаружения пероксидазы (VIP Substrate Kit, Vector Labs, США). Для НО-2, иммунопреципитат визуализировали как с помощью определения диаминбензидина (DAB Substrate Kit for Peroxidase, Vector Labs, США), так и в субстрате красного цвета (VIP Substrate Kit, Vector Labs, США). Затем срезы промывали, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в полистерол.

Для оценки специфичности иммуногистохимической реакции использовали метод негативного контроля. Для этого срезы, вместо первичных антител, инкубировали с 1% неимунной сывороткой. Во всех контрольных экспериментах иммунопозитивная реакция отсутствовала.

Пространственные отношения между исследуемыми группами клеток изучали методом компьютерного совмещения изображений [95]. Смежные срезы исследовались раздельно в двух микроскопах, окуляры которых оснащены одинаковыми координатными сетками с равновеликими квадратами. Ha предметный столик одного из микроскопов помещали препарат, окрашенный метиленовым синим. Срез, обработанный для выявления нейронов другим методом, размещался под объективом второго микроскопа. В программе Adobe Photoshop два оцифрованных изображения совмещались путем наложения друг на друга. Первый слой в совмещенном изображении занимал снимок препарата, окрашенный метиленовым синим, последующие – другими использованными в работе методами. Препараты просматривали под световым микроскопом Carl Zeiss Jena (Германия) со встроенным осветителем. Регулировку яркости и контраста цифровых фотоизображений осуществляли при помощи компьютерных программ Adobe Photoshop. Стандартизация параметров измерений освещенности при проведении исследований осуществлялась с помощью люксметра ТКА-Люкс/Эталон (Россия).

2.4. Морфометрические исследования

В проекции среза каждого ядра, а также в области между ядрами определяли общее количество нейронов, выявленных метиленовым синим, NADPH-d-позитивных нейронов, а также nNOS-, HO-2 и CBS-позитивных нейронов. Для каждого исследования использовали не менее 16 срезов для каждого ядра. Кроме того, вычисляли процентное содержание энзимопозитивных нейронов от общего количества нервных клеток, выявленных метиленовым синим, отдельно для каждого фермента по формуле:

$$\frac{N_{NO}}{N_{Mem}} \cdot 100\%, \quad \frac{N_{HO}}{N_{Mem}} \cdot 100\%, \quad \frac{N_{CBS}}{N_{Mem}} \cdot 100\%$$
(1)

Где *N_{NO}*, *N_{HO}*, *N_{CBS}* – количество NO-, HO- и CBS-позитивных нейронов,

N_{мет} – количество нейронов, выявленных метиленовым синим.

Для каждого нейрона вычисляли средние значения интенсивности реакции (средний показатель оптической плотности осадка – СПОП). Вычисления проводили в программах Adobe Photoshop и Mathcad [70]. Как показали наши наблюдения, при гисто- и иммуногистохимических исследованиях нейроны в одних и тех ядрах существенно отличаются между собой интенсивностью реакции, структурой и плотностью выпавшего осадка. Клетки, в которых осадок имеет гомогенную структуру и равномерно заполняет всю цитоплазму, встречаются довольно редко, примерно в 6-10 %. Большинство же нейронов окрашивается крайне неравномерно: имеются участки цитоплазмы с отдельно лежащими мелкими и крупными ярко окрашенными гранулами преципитата, между которыми могут находиться разного размера гранулы с бледной окраской, зачастую едва отличимые от фона. В других клетках осадок образует объемные конгломераты с более или менее интенсивной окраской.

Для вычисления оптической плотности осадка, образующегося в результате гисто- и иммунохимической реакции, использовали «пиксельный метод» обработки оцифрованных цветных изображений. В его основе лежит принцип измерений, который заключается в автоматическом подсчете стандартными компьютерными программами Adobe Photoshop и Mathcad суммы всех пикселей, образующих данное изображение в выделенном участке препарата. Анализ света, отразившегося от объекта позволяет получить данные об изображении, основываясь на значениях яркости в каждой точке изображения или выделенного участка.

В работе использована обычная шкала из 256 градаций интенсивности и общепринятая для RGB модель цветового пространства. Сложение яркостей пикселей в исследуемом участке изображения позволяет определить средние значения интенсивности цвета отдельных его компонентов (в нашем случае – окрашенных гранул в цитоплазме одного нейрона или всех нейронов в исследуемом ядре продолговатого мозга). Для вычисления значений оптической плотности продукта гистохимической реакции оцифрованное полноцветное
изображение препарата отображалось на экран компьютера и помещалось в окно программы Adobe Photoshop (рисунок 1а). Adobe Photoshop присваивает черному цвету – значение 0, белому – 255 из 256 градаций интенсивности. После пересохранения документа из формата Jpg в формат BMP (8 бит/pix) (рисунок 1б), изображение автоматически перемещалось в программу Mathcad с помощью встроенной функции READBMP, что приводило к построению матрицы размерностью m × n, где m – количество пикселей в столбце, n – количество пикселей в строке. Каждому пикселю в такой матрице соответствует свой номер яркости. Функция «imhist» делает подсчет пикселей определенных значений яркостей. Эти данные используются для дальнейшего вычисления суммарной яркости пикселей, в одной или во всех клетках выделенного участка препарата.



Рисунок 1. Нейроны с разной степенью интенсивности реакции в окне документа Adobe Photoshop: а – оцифрованное полноцветное изображение препарата; б – изображение того же препарата в формате BMP (8 бит/pix).

Для определения суммарной яркости пикселей (*I*) изображения в исследуемом фрагменте препарата применялась следующая формула:

$$I = j_0 \cdot 0 + j_1 \cdot 1 + \ldots + j_{255} \cdot 255 = \sum_{i=0}^{255} j_i \cdot i$$
(2)

где j_i – количество пикселей с определенной яркостью, i – значение градации яркости (от 0 до 255).

Поскольку оптическая плотность равна десятичному логарифму отношения интенсивностей падающего и поглощенного света, то для среднего показателя оптической плотности клеток (СПОП) в выделенном участке изображения можно

записать формулу:

$$C\Pi O\Pi = \lg \frac{I_0}{I} = \lg \left(\frac{255 \cdot P_N}{\sum_{i=0}^{255} j_i \cdot i} \right)$$
(3)

где *I* – суммарная яркость пикселей в клетках,

 I_0 – суммарная яркость пикселей в клетках при отсутствии поглощения (так как максимально возможное значение яркости пикселей равно 255, то умножив его на количество пикселей в исследуемых клетках P_N , получим максимально возможное значение интенсивности – без поглощения).

В зависимости от величины СПОП нейроны делили на клетки с низкой интенсивностью реакции (СПОП<20 усл.ед.), средней интенсивностью реакции (20<СПОП<40 усл.ед.) и высокой интенсивностью реакции (СПОП>40 усл.ед.).

У межъядерных и внутриядерных нейронов вычисляли среднюю площадь профильного поля клеток (мкм²) также пиксельным методом с помощью программы Adobe Photoshop. Для этого использовалась формула:

$$S = \frac{NR^2}{\Gamma},\tag{4}$$

где *N* – количество пикселей в указанной клетке (программа автоматически выдает это значение во вкладке «анализ»),

R линейное разрешение документа (количество пикселей в 1 см),

Г – увеличение, при котором производилась съемка.

В зависимости от полученного результата клетки делили на мелкие – площадью до 200 мкм², средние – 200-400 мкм² и крупные – более 400 мкм². Рассчитывали также отдельно долю клеток, приходящуюся на мелкие нейроны, средние и крупные, как отношение числа мелких (средних, крупных) клеток к общему количеству нейронов в ядре. Кроме того, определяли концентрацию (относительную плотность) энзимопозитивных клеток на 0,01 мм².

2.5. Статистические методы исследования

Статистический анализ данных, полученных в работе, проводили с использованием программы STATISTICA 10.

В статистическую обработку данных входило:

1) Проверка распределения на нормальность. Выбор критериев значимости при статистической обработке данных определяется распределением случайной При отклонениях нормального величины. OT распределения точность параметрических критериев существенно падает. Поэтому необходимо проверить предположение о нормальности распределения членов выборки. Нулевая гипотеза Н₀ в этом случае представляет собой утверждение о том, что распределение отличается от нормального. Проверка проводилась с помощью критерия Колмогорова-Смирнова на уровне значимости $\alpha = 0.05$. Выяснилось, что расчетное значение критерия ниже теоретического, что говорит о том, что модель нормального распределения может быть принята.

2) Первичная статистическая обработка. Первичная статистическая обработка результатов эксперимента заключалась в определении среднего значения измеренной величины и доверительного интервала. Для определения доверительного интервала использовался t-критерий Стьюдента и величина доверительной вероятности P=95%. Данные количественного анализа представлялись в виде: $x = \overline{x} \pm ts$, (5), где \overline{x} – среднее значение изучаемой величины, t – коэффициент Стьюдента, s – среднеквадратичное отклонение.

Значения были получены от каждого объекта при обработке не менее 16 срезов с двух уровней продолговатого мозга.

3) Метод множественной регрессии. Для исследования взаимосвязи между изучаемыми количественными показателями, а также для построения математической модели связи между независимой переменной и влияющими на нее факторами был использован метод множественной линейной регрессии. Применялось следующее регрессионное уравнение:

$$Y = \sum_{i=1}^{n} b_i x_i + b_0 + e,$$
 (6)

где b_i – регрессионные коэффициенты, b_0 – свободный член, e – член содержащий ошибку. Оценка значимости коэффициентов регрессии проводилась с помощью t-распределения при заданном уровне значимости p=0,05.

Для вычисления силы связи между исследуемыми факторами вычислялся множественный коэффициент корреляции и коэффициент детерминации, который показывает долю изменчивости *Y*, которая объясняется с помощью *x* в линейной регрессионной модели.

Проверка адекватности модели сводится к проверке нулевой гипотезы H₀: равенство нулю всех параметров регрессионной модели. Проверка осуществляется с помощью критерия Фишера. Если табличное значение критерия Фишера меньше расчетного, то нулевая гипотеза отвергается и модель признается адекватной.

В моделях регрессии автокорреляция между остатками модели может привести к негативным результатам всего процесса оценивания неизвестных коэффициентов модели. Поэтому следует провести исследование на автокорреляцию и, если нужно, устранить ее. Для обнаружения автокорреляции остатков модели регрессии используется критерий Дарбина-Уотсона. Нулевая гипотеза в этом случае представляет собой гипотезу об отсутствии корреляции. Оценка значимость коэффициентов автокорреляции проводится в соответствии с рисунком 2.



Рисунок 2. Статистика Дарбина-Уотсона. Определение значимости коэффициента автокорреляции.

Глава З РАСПРЕДЕЛЕНИЕ NO-, СО- и Н₂S-ПРОДУЦИРУЮЩИХ НЕЙРОНОВ В ВАЗОМОТОРНЫХ ЯДРАХ ПРОДОЛГОВАТОГО МОЗГА

3.1 Ядро солитарного тракта

Ядро солитарного тракта (nucleus tractus solitaries, чувствительное) проецируется латеральнее пограничной борозды ромбовидной ямки на протяжении дорсальных отделов продолговатого мозга от уровня мозговых отделов вплоть до первого шейного сегмента спинного мозга. Из четырех изучаемых в работе ядер оно имеет наименьший объем – около 2,7 мм³.

При окраске по Нисслю в ядре солитарного тракта (ЯСТ) определяются нейроны треугольной, овальной, веретеновидной формы (рисунок 3а,б). Площадь нервных клеток варьируется достаточно сильно, поэтому можно выделить несколько размерных групп: мелкие нейроны – имеющие площадь профильного поля менее 200 мкм², средние нейроны – 200-400 мкм², крупные нейроны – более 400 мкм².



Рисунок 3. Нейроны ядра солитарного тракта: $\mathbf{a} - \mathbf{y}_{B.:}$ об. 3,7^x, ок. 10^x, $\mathbf{6} - \mathbf{o}_{5.}$ 20^x, ок. 10^x. Окраска метиленовым синим.

Большинство нейронов (57-58 %), выявляемых метиленовым синим, представлено мелкими клетками с профильным полем 70-200 мкм². Крупные

нейроны составляют около 2-3 %. Поэтому и средняя площадь профильного поля нервных клеток в ядре невелика, в среднем составляя 220 мкм².

Ростральная часть ЯСТ состоит преимущественно из мелких (62 %) и средних клеток (34 %). На долю крупных клеток приходится не более 4 %. В центральной части ядра наблюдается увеличение доли мелких нейронов, а в каудальной – крупных. По мере приближения к центральной части ядра уменьшается концентрация нейронов и достигает 163 нейрона/0,01 мм². В каудальной части нередко встречаются группы клеток, тесно прилегающие друг к другу. В результате концентрация нервных клеток в этой области ядра возрастает до 258 нейронов/0,01 мм² (рисунок 4).



Рисунок 4. Концентрация и средняя площадь нейронов в разных частях ядра солитарного тракта. Концентрация выражена в количестве нейронов на 0,01 мм², площадь – в мкм². Данные представлены: $x = \bar{x} \pm ts$ (глава 2). Достоверность различий по сравнению с центральной частью ядра *p<0,05.

О распределении нейрональной NO-синтазы в структурных образованиях мозга часто судят по наличию в них активности NADPH-диафоразы. В этом случае можно выявить клетки с многочисленными длинными и короткими отростками. Кроме того, при гистохимическом изучении NADPH-диафоразы можно вычислить активность фермента в нейроне.

NADPH-диафораза. NO-нейроны, выявляемые гистохимическим методом, отличаются структурой и плотностью выпавшего осадка (рисунок 5). При

вычислении активности фермента в зависимости от интенсивности реакции можно выделить три типа клеток. І тип отличается низкой степенью активности фермента. В таких клетках окрашиваются в основном только контуры. Остальная часть цитоплазмы остается неокрашенной или имеет бледно-голубой осадок с редкими гранулами преципитата. Для таких клеток средний показатель оптической плотности фермента ≤ 20 усл. ед. II тип характеризует нейроны с умеренной степенью активности фермента. В таких клетках преципитат заполняет большую часть цитоплазмы, может откладываться также в отростках клеток. Средний показатель оптической плотности фермента (СПОП) для таких клеток – 20-40 усл. ед. III тип: клетки с высоким уровнем активности. В этом случае осадок заполняет все тело клетки плотными слившимися между собой гранулами. СПОП в этих клетках превышает 40 усл. ед.



Рисунок 5. NADPH-d-позитивные нейроны в ядре солитарного тракта разной степени интенсивности реакции: а – низкой, б – умеренной, в – высокой. Гистохимический метод.

Большинство NADPH-d-позитивных нейронов ЯСТ имеют среднюю и низкую степень активности фермента. СПОП в ЯСТ меньше, чем в других исследуемых ядрах и составляет 24 усл.ед. В ростральной части СПОП составляет 10,1 усл. ед., в центральной 27,2 усл. ед., в каудальной 38,1 усл. ед. (рисунок 6). В основном в ЯСТ определяются нейроны с низким и умеренным уровнем интенсивности реакции. Такие клетки составляют более 80 % от общего количества NADPH-d-положительных нейронов.

Нейроны с положительной реакцией на NADPH-d, определяющиеся в ЯСТ, отличаются разнообразной формой и размерами (рисунок 5).

Средняя площадь профильного поля клеток составляют 375 мкм². В различных частях ЯСТ величина этого показателя отличается: в ростральной части она составляет 281 мкм², в центральной – 387 мкм², в каудальной – 320 мкм² (рисунок 6).



Рисунок 6. Количественные показатели NADPH-d-позитивных нейронов в разных частях ядра солитарного тракта. Площадь выражена в мкм²/10, доля – в %, концентрация – в количестве нейронов на 0,01 мм², СПОП – в усл.ед. Обозначения те же, что и на рисунке 4.

NADPH-d-клетки, выявляемые в ЯСТ, не очень многочисленны. Их доля от общего числа нейронов, выявляемых метиленовым синим, колеблется около 24 %. В ростральной части ядра доля нервных клеток с положительной реакцией на NADPH-диафоразу составляет всего 11 %, в центральной – 25,5 %, в каудальной – 38,2 %.

NO-синтаза (*nNOS*). Для идентификации NO-ергических нейронов иммуногистохимический метод имеет несомненное преимущество перед гистохимическим. Однако при иммуногистохимическом методе практически не выявляются отростки нейронов, а количество фермента определяется по концентрации белка в клетке. Очень часто концентрация не совпадает с уровнем

активности. Поэтому полную картину организации нитроксидергических систем в мозге можно получить при использовании обоих методов выявления NOергических нейронов.

Иммуногистохимическим методом на nNOS выявляются нейроны треугольной, овальной и грушевидной формы (рисунок 7, а-в).



Рисунок 7. nNOS-иммунопозитивные нейроны в ядре солитарного тракта разной степени интенсивности реакции: а – низкой, б – умеренной, в – высокой.

NO-нейроны, выявляемые в ЯСТ иммуногистохимическим методом, отличаются плотностью выпавшего осадка, а также расположением его в цитоплазме клетки. Клетки в этом случае окрашиваются в разные оттенки коричневого цвета. Среди nNOS-нейронов можно выделить три типа клеток. К I типу мы отнесли клетки с низким уровнем интенсивности реакции, имеющие значение СПОП менее 20 усл. ед. Клетки характеризуются наличием в цитоплазме мелкозернистого преципитата светло-коричневого цвета, который выпадает в виде отдельно лежащих или слившихся между собой гранул, плотность которых увеличивается по направлению к периферии клетки. В ЯСТ определяется 78 % таких нейронов. Ко II типу относятся нейроны, СПОП которых находится в интервале 20-40 усл. ед. (умеренная степень реакции). В цитоплазме нейронов формируется более грубый осадок, сливающийся иногда в сплошное околоядерное кольцо. В остальной части цитоплазмы находится редкая россыпь гранул коричневого цвета. Таких нейронов в ЯСТ около 20 %. Нейроны III типа с высоким уровнем реакции имеют СПОП величиной более 40 усл. ед. Нейроны III имеют темно-коричневые гранулы преципитата, которые равномерно ТИП заполняют всю цитоплазму клеток, оставляя свободным лишь область ядра. 2 %

нейронов имеют высокие значения СПОП. Средняя площадь NO-нейронов составляет 220-440 мкм².

Распределение нейронов по площади профильного поля в ЯСТ весьма неравномерное. На протяжении ядра встречаются мелкие (до 200 мкм²), средние (200-400 мкм²) и крупные (более 600 мкм²) нейроны. Но их количество в размерных группах (рисунок 8) и в различных частях ядра (рисунок 9) неодинаково.



Рисунок 8. Кривая распределения nNOS-иммунопозитивных нейронов ядра солитарного тракта по их площади. Данные представлены: $x = \bar{x} \pm ts$ (глава 2).



Рисунок 9. Количественные показатели nNOS-иммунопозитивных в разных частях ядра солитарного тракта. Площадь выражена в мкм²/10, доля – в %, концентрация – в количестве нейронов на 0,01 мм², СПОП – в усл. ед. Обозначения те же, что и на рисунке 4.

Доля мелких nNOS-нейронов в ЯСТ составляет 15 %, средних 67,2 %, крупных 17,8 %. Кривая распределения для NO-нейронов по площади профильного поля достаточно широка, поскольку в ЯСТ встречаются нейроны различных размерных групп. Однако большинство нейронов имеют площадь профильного поля 220-440 мкм², поэтому максимум распределения приходится на 280 мкм². Нейроны площадью более 500 мкм² практически не встречаются (0,2-0,3 %).

Доля nNOS-нейронов в среднем по ядру составляет 12,5 % от общего количества, но на протяжении ядра они распределены крайне неравномерно. Иммунопозитивные нейроны чаще встречаются в центральной части ядра, где лежат одиночно или образуют небольшие группы, поэтому доля нейронов здесь выше, чем в других отделах ЯСТ (рисунок 9). Наибольшая концентрация nNOS-нейронов прослеживается в центральной области ядра.

Гемоксигеназа-2 (НО-2). Проведенное исследование показало, что в ЯСТ постоянно определяются НО-2-позитивные нейроны, которые отличаются плотностью и локализацией продукта реакции (рисунок 10, а-г).



Рисунок. 10. НО-2-иммунопозитивные нейроны ядра солитарного тракта (а) разной степени интенсивности реакции: б – низкой, в – умеренной, г – высокой.

Доля нейронов с высоким уровнем СПОП достаточно высока – около 73 %, в связи с этим, и СПОП в среднем по ядру достигает 65 усл.ед. Нейроны с умеренным содержанием продукта реакции составляют 15 %, с низким – 12 %.

В различных частях ядра содержание НО-2-позитивных нейронов сильно отличается. Гемоксигеназа-2 откладывается по большей части в мелких клетках. Площадь профильного поля таких нейронов не превышает 200 мкм². Они составляют около 35 % от общего количества НО-2-нейронов. Крупных клеток, площадь которых более 400 мкм², очень мало, примерно 2 %. Средние по размеру клетки составляют около 63 %.

На рисунке 11 представлена кривая распределения СО-нейронов по площади профильного поля. Как видно, гемоксигеназа-2, в основном, откладывается в мелких и средних клетках. Максимум распределения НО-2-позитивных нейронов смещен в сторону мелких клеток (220 мкм²). Большинство нейронов имеет площадь 100-380 мкм².



Рисунок 11. Кривая распределения НО-2-иммунопозитивных нейронов ядра солитарного тракта по их площади. Обозначение те же, что и на рисунке 8.

Доля клеток экспрессирующих HO-2 в ЯСТ составляет около 16 % от общего числа нейронов, выявленных метиленом синим. Однако в одних частях ядра наблюдаются довольно плотные скопления клеток, в других – количество клеток минимально или они не определяются. Средняя концентрация СОнейронов в ЯСТ составляет 6,1 нейронов/0,01 мм², т.е. их количество в ядре солитарного тракта, гораздо меньше, чем NO-нейронов. Большинство HO-2позитивных клеток находятся в тех же участках ядра, что и NO-нейроны. Наибольшая их концентрация наблюдается в центральной части ядра (9,5 нейронов/0,01 мм²). В ростральной и каудальной области значение концентрации гораздо ниже: 3,2 и 4,5 нейронов/0,01 мм², соответственно (рисунок 12).



Рисунок 12. Количественные показатели НО-2-иммунопозитивных нейронов в разных частях ядра солитарного тракта. Площадь выражена в мкм²/10, доля – в %, концентрация – в количестве нейронов на 0,01 мм², СПОП – в усл. ед. Обозначения те же, что и на рисунке 4.

Цистатионин-β-синтаза (CBS). Проведенные исследования H₂Sпродуцирующих нейронов показывают, что CBS-иммунопозитивные клетки постоянно определяются в ЯСТ (рисунок 13а-г). Они обладают различной интенсивностью реакции. Встречаются нейроны, где осадок откладывается лишь в ограниченной части цитоплазмы в виде отдельных гранул. Визуально такие клетки выглядят более светлыми (рисунок 13б). Расчеты показывают, что средний показатель оптической плотности фермента в таких клетках составляет не более 20 усл. ед. Доля таких нейронов (I тип) в ЯСТ составляет 52 % от всех CBSпозитивных нейронов, определяемых в ядре. Нейроны II-типа, в которых осадок откладывается более плотно (рисунок 13в), определяются в 35-36 % случаях. Расчеты СПОП в этом случае дают значения 20-40 усл.ед. 12,6 % составляют нейроны III типа (с высокой степенью интенсивности реакции), где плотный гомогенный осадок полностью заполняет всю цитоплазму, оставляя свободным только зону ядра, и может также откладываться в отростках нейронов (рисунок 13г). Большинство нейронов крупные. Их доля составляет 53 %. Средних по размеру нейронов чуть меньше – 42,8 %, мелкие H₂S-нейроны встречаются очень редко – 4,2 %. СПОП в CBS-позитивных нейронов в ЯСТ составляет 12,7 усл. ед.



Рисунок 13. CBS-иммунопозитивные нейроны ядра солитарного тракта (а) разной степени интенсивности реакции: б – низкой, в – умеренной, г – высокой.

Распределение количества H₂S-нейронов по площади профильного поля в ядре солитарного тракта представлено на рисунке 14. Кривая распределения H₂Sнейронов смещена в сторону крупных клеток с максимумом 380 мкм². Большинство CBS-позитивных нейронов имеют площадь 300-490 мкм², т.е. CBS, в основном, откладывается в средних и крупных клетках. По сравнению с NO- и CO-нейронами, где явно выражен пик на кривой, H₂S-нейроны в разных размерных группах распределены относительно равномерно. Однако в центральной части ядра средняя площадь нейронов достоверно больше, чем в других его частях. Мелкие нейроны чаще встречаются в каудальной части ЯСТ, что приводит к соответствующему изменению величины этого показателя (рисунок 15).



Рисунок 14. Кривая распределения CBS-иммунопозитивных нейронов ядра солитарного тракта по их площади. Обозначения те же, что и на рисунке 8.



Рисунок 15. Распределение CBS-иммунопозитивных нейронов в разных частях ядра солитарного тракта. Площадь выражена в мкм²/10, доля – в %, концентрация – в количестве нейронов на 0,01 мм², СПОП – в усл. ед. Обозначения те же, что и на рисунке 4.

Доля H_2S -позитивных нейронов в ЯСТ очень мала – не превышает 3-4 %. В одних частях ядра их определяется больше, в других они встречаются значительно реже. В связи с этим, доля этих нейронов от общего количества, выявляемых метиленовым синим, в разных частях ЯСТ сильно отличается (рисунок 15).

CBS-позитивные нейроны в ЯСТ формируют скопления в центральной части ядра, где их концентрация наибольшая по ядру и составляет 16,4 нейрона/0,01 мм². В других областях CBS-нейроны заметных скоплений не образуют, а их концентрация (7-8 %) имеет минимальные значения (рисунок 15).

Таким образом, NO-, CO- и H_2S -нейроны встречаются на всем протяжении ЯСТ. Размеры, доля, концентрация, и средний показатель оптической плотности фермента этих нейронов, а также их распределение в ядре отличаются в различных медиаторных системах (таблица 2).

Исследуемый фермент	nNOS	HO-2	CBS
Общее количество нейронов	12790±62	16781±81*	3581±16*
Доля нейронов от общего количества нервных клеток, %	12,5±0,4	16,4±0,6*	3,5±0,2*
Относительная плотность нейронов на 0,01 мм ²	18,2±0,9	6,1±0,3*	13,4±0,7*
Средняя площадь нейронов, мкм ²	323,6±12,8	274,5±15,1*	423,5±21,3*
Доля мелких нейронов,%	15±0,7	35±1,5*	4,1±0,2*
Доля средних нейронов,%	67,2±3,2	62,7±3,5	42,8±2,8*
Доля крупных нейронов,%	17,8±0,8	2,3±0,2*	53,1±2,7*
СПОП, усл. ед.	13,2±0,7	65,0±3,8*	12,7±0,6*
Доля клеток с низким содержанием фермента, %	78,1±14,1	12,4±6,5*	52,1±12,2*
Доля клеток со средним содержанием фермента,%	20,1±1,1	15,7±0,7*	35,4±2,3*
Доля клеток с высоким содержанием фермента,%	1,9±0,1	72,3±3,8*	12,6±0,5*

Таблица 2. Количественные показатели NO-, СО- и H₂S-продуцирующих нейронов, выявленных в ядре солитарного тракта

*Различия достоверны (p<0,05) по сравнению с соответствующими показателями NO-нейронов.

Самая большая доля иммунопозитивных нейронов приходится на NOнейроны. Однако наибольшие значения СПОП имеют СО-нейроны, т.к. 73 % из них обладают высоким уровнем оптической плотности фермента.

Распределение продукта реакции в NO-, CO- и H_2S -нейронов в ЯСТ зависит от размеров нейронов, а точнее – от содержания мелких, средних и крупных нейронов в ядре, а также от концентрации нейронов в ядре.

3.2. Ретикулярное гигантоклеточное ядро

В ретикулярной формации в верхнем отделе продолговатого мозга находится гигантоклеточное ядро (nucleus reticularis gigantocellularis, двигательное). Оно занимает 2/3 ретикулярной формации. Располагается ядро дорсальнее верхней оливы, вверху распространяется до ядра лицевого нерва.

Ретикулярное гигантоклеточное ядро (РГЯ) занимает объем около 7,6 мм³. При окраске метиленовым синим в РГЯ выявляются нейроны треугольной, овальной и звездчатой формы (рисунок 16).





Большинство нейронов имеют площадь профильного поля менее 200 мкм² (мелкие нейроны). Доля таких клеток в ядре составляет 57-59 %. Средних и крупных нейронов несколько меньше – 21 % и 20 % соответственно. Средняя

площадь профильного поля нейронов в РГЯ составляет 425,2 мкм². Мелкие, средние и крупные нейроны распределены достаточно равномерно по всему ядру. Характерным признаком данного ядра является наличие числа гигантских нейронов, диаметр тел которых иногда достигает 110 мкм и более. Клетки расположены довольно густо, их средняя концентрация в ядре составляет 148 нейронов/0,01 мм².

В различных частях ядра концентрация нейронов не сильно отличается: в ростральной области концентрация составляет 149,1 нейронов/0,01 мм², в центральной – чуть меньше – 146 нейронов/0,01 мм², а в каудальной – вновь увеличивается до 149,5 нейронов/0,01 мм² (рисунок 17).



Рисунок 17. Концентрация и средняя площадь нейронов в разных частях ретикулярного гигантоклеточного ядра. Концентрация выражена в количестве нейронов на 0,01 мм², площадь – в мкм². Обозначения те же, что и на рисунке 4.

NADPH-диафораза. При окраске препаратов на NADPH-диафоразу выявляются нейроны округлой, овальной и треугольной формы (рисунок 18). При исследовании активности фермента установлено, что в РГЯ определяется около 59 % нейронов, имеющих высокие значения показателя СПОП. Доля нейронов с низким уровнем СПОП в РГЯ составляет всего 7 %. В таких нейронах выпадает осадок бледно фиолетового цвета (рисунок 18). СПОП в РГЯ составляет 55,4 усл. ед. В центральной части РГЯ число NO-нейронов с низкой степенью интенсивности

реакции увеличивается, а в каудальной – преобладают нейроны с интенсивной реакцией.



Рисунок 18. NADPH-d-позитивные нейроны в ретикулярного гигантоклеточного ядра разной степени интенсивности реакции: а – низкой, б – умеренной, в – высокой. Гистохимический метод.

Средняя площадь профильного поля клеток составляет 453,1 мкм². Распределение NADPH-d-позитивных нейронов по их площади профильного поля в РГЯ достаточно равномерное (рисунок 19).



Рисунок 19. Количественные показатели NADPH-d-позитивных нейронов в разных частях ретикулярного гигантоклеточного ядра. Площадь выражена в мкм²/10, доля – в %, концентрация – в количестве нейронов на 0,01 мм², СПОП – в усл. ед. Обозначения те же, что и на рисунке 4.

По всему ядру определяются мелкие, средние и крупные нейроны. В ростральной части ядра наблюдается небольшое уменьшение доли средних клеток и увеличение крупных, в каудальной части – уменьшение доли крупных клеток. В результате в ростральной части ядра средняя площадь нейронов составляет 465,2 мкм², в центральной – 456,3 мкм², в каудальной – 452,8 мкм².

Популяция NADPH-d-позитивных нейронов в РГЯ относительно большая. Их доля составляет 49,4% от общего числа нейронов в ядре, выявленных метиленовым синим. В РГЯ они выявляются, главным образом, в центральном отделе. Наибольшие скопления определяются в дорсомедиальной области центральной части ядра. В результате концентрация NO-позитивных нейронов в центре составляет 88,5 нейронов/0,01 мм², что гораздо выше, чем в других частях ядра.

NO-синтаза (nNOS). В РГЯ иммуногистохимическим методом постоянно выявляются нервные клетки полигональной, треугольной формы с низкой, умеренной и высокой концентрацией nNOS (рисунок 20).



Рисунок 20. nNOS-иммунопозитивные нейроны в ретикулярном гигантоклеточном ядре разной степени интенсивности реакции: а – низкой, б – умеренной, в – высокой.

При вычислении значений СПОП в nNOS-позитивных нейронах РГЯ установлено, что она не превышает 24 усл. ед. Основной вклад в данный показатель вносят средние по размеру нейроны. Нейронов с высоким содержанием фермента определяется в ретикулярном гигантоклеточном ядре всего 3,3 %, тогда как с низкими значениями СПОП (менее 20 усл. ед.) – 61 %.

Средняя площадь профильного поля NO-нейронов в ЯСТ составляет 397,6 мкм². На долю мелких и средних нейронов площадью до 400 мкм² приходится около 65 % от общего количества nNOS-нейронов, крупных – в 2 раза меньше (33 %). На рисунке 21 представлена кривая зависимости количества нейронов по площади профильного поля для nNOS-нейронов в РГЯ. Кривая имеет максимум на 380 мкм². Расчеты показывают, что основной размерный диапазон этих клеток находится в пределах 220-500 мкм².



Рисунок 21. Кривая распределение nNOS-иммунопозитивных нейронов ретикулярного гигантоклеточного ядра по их площади. Обозначения те же, что и на рисунке 8.

NO-нейроны, выявляемые иммуногистохимическим методом, достаточно равномерно распределены по всему объему ядра. Доля таких нейронов составляет 25 % от общего количества нейронов, окрашенных метиленовым синим. Большинство nNOS-позитивных клеток сосредоточены в центральной части ядра, где они образуют небольшие группы из 3-5 нейронов. Концентрация клеток в этой области достигает наибольшего значения 42,3 нейрона/0,01 мм². В ростральной области определяется наименьшее количество NO-нейронов, и концентрация клеток в этой области минимальна 34,1 нейронов/0,01 мм². В каудальной части ядра концентрация клеток составляет 37,5 нейронов/0,01 мм²



Рисунок 22. Количественные показатели nNOS-нейронов в разных частях ретикулярного гигантоклеточного ядра. Площадь выражена в мкм²/10, доля – в %, концентрация – в количестве нейронов на 0,01 мм², СПОП – в усл. ед. Обозначения те же, что и на рисунке 4.

Гемоксигеназа-2 (НО-2). В РГЯ также определяются НО-2-продуцирующие нейроны. Нейроны, выявляемые иммуногистохимическим методом, отличаются между собой интенсивностью реакции (рисунок 23).



Рисунок 23. НО-2-иммунопозитивные нейроны ретикулярного гигантоклеточного ядра разной степени интенсивности реакции: а – низкой, б – умеренной, в – высокой.

Средний показатель оптической плотности фермента составляет всего 9 усл. ед. По значению СПОП все СО-позитивные клетки можно также разделить на

58

нейроны с низкой, умеренной и высокой степенью активности фермента. Большинство нейронов (82 %) представлены клетками с низким значением СПОП (до 20 усл. ед.). Клетки с высоким содержанием фермента практически не встречаются (1-2 %). Высокое содержание низкоактивных СО-клеток, так же как их малое количество в ядре, определяет низкий показатель СПОП НО-2 в РГЯ.

Средняя площадь профильного поля нервных клеток в РГЯ – 306,2 мкм². Зависимость количества нейронов от их площади представлена на рисунке 24. Большинство НО-2-нейронов имеют небольшие размеры (77,4 %). Иногда встречаются крупные треугольные и звездчатые нейроны (6,8 %). В ядре в разных количествах встречаются нейроны, имеющие площадь от 50 до 600 мкм². Максимум распределения для НО-2-позитивных клеток смещен в сторону мелких клеток (360 мкм²).



Рисунок 24. Кривая распределения НО-2-иммунопозитивных нейронов ретикулярного гигантоклеточного ядра по их площади. Обозначения те же, что и на рисунке 8.

Доля СО-нейронов в РГЯ составляет 2 % от общего количества, выявленных метиленовым синим, а их плотность составляет 3 нейрона/0,01 мм². Наиболее объемные скопления в РГЯ наблюдаются в центральной части ядра, где концентрация клеток также выше, чем в других участках ядра и составляет 6,2 нейронов/0,01 мм² (рисунок 25).



Рисунок 25. Количественные показатели НО-2-иммунопозитивных нейронов в разных частях ретикулярного гигантоклеточного ядра. Площадь выражена в мкм²/10, доля – в %, концентрация – в количестве нейронов на 0,01 мм², СПОП – в усл. ед. Обозначения те же, что и на рисунке 4.

Цистатионин-β-синтаза (CBS). В РГЯ, наряду с NO- и CO-нейронами, постоянно определяются H₂S-позитивные клетки с низкой, умеренной и высокой концентрацией фермента (рисунок 26).

Проведенное исследование свидетельствуют, что в зависимости от величины СПОП, среди CBS-иммунопозитивных нейронов можно выделить три типа клеток: нейроны первого типа с низкой интенсивностью реакции имеют показатель < 20 усл. ед. Таких нейронов в РГЯ около 25 %. Нейроны со средней интенсивностью реакции (II тип) имеют СПОП 20-40 усл. ед. и составляют в РГЯ примерно 23 %. Нейроны с высокой концентрацией фермента (III тип) обладают СПОП>40 усл. ед. Они составляют большинство в РГЯ – 52-53 %. Такие нейроны отличаются плотным осадком темно-красного цвета, который равномерно заполняет цитоплазму и отростки клеток.

Количественное распределение H₂S-нейронов в соответствии с площадью профильного поля представлено на рисунке 27. Как видно, максимум кривой приходится на крупные клетки площадью 470 мкм². Кривая распределения для CBS-нейронов имеет узкий, ярко выраженный максимум, что говорит о том, что разброс размеров H₂S-нейронов небольшой и находится в области 380-550 мкм².

60

Мелкие клетки очень редко определяются в ядре (1-2 %), доля средних клеток составляет 37 %, крупных – 61,6 %.



Рисунок 26. CBS-иммунопозитивные нейроны ретикулярного гигантоклеточного ядра разной степени интенсивности реакции: а – низкой, б – средней, в – высокой.



Рисунок 27. Кривая распределения CBS-иммунопозитивных нейронов в ретикулярном гигантоклеточном ядре по их площади. Обозначения те же, что и на рисунке 8.

Общая доля H₂S-нейронов в среднем по ядру составляет 14 %. Но большая часть H₂S-нейронов находится на центральную часть ядра. Концентрация нейронов в связи с этим в этой области составляет 39,4 нейронов/0,01 мм², в ростральной и каудальной области, где CBS-нейроны заметных скоплений не образуют, равна 14,8 и 18,3 нейронов/0,01 мм² соответственно (рисунок 28).

Распределение значений количественных параметров среди NO-, CO- и H₂Sнейронов в РГЯ представлено в таблице 3.

Таблица 3. Количественные показатели NO-, СО- и H₂S-продуцирующих нейронов,

Исследуемый фермент	nNOS	HO-2	CBS
Общее количество нейронов	28155±403	2252±98*	15767±256*
Доля нейронов от общего количества нервных клеток, %	25,0±1,4	2,0±0,1*	14,0±0,7*
Относительная плотность нейронов на 0,01 мм ²	37,0±1,6	3,0±0,1*	20,7±1,2*
Средняя площадь нейронов, мкм ²	427,3±20,7	306,2±13,4*	474,1±23,4*
Доля мелких нейронов,%	78,0±3,1	77,4±3,4	1,4±0,2*
Доля средних нейронов,%	14,4±0,6	15,8±0,5*	37,1±1,4*
Доля крупных нейронов,%	7,6±0,3	6,8±0,3*	61,6±4,2*
СПОП, усл. ед.	24,2±1,2	9,1±0,4*	66,1±3,8*
Доля клеток с низким содержанием фермента, %	61,0±3,7	82,4±4,1*	25,6±1,8*
Доля клеток со средним содержанием фермента,%	35,7±1,5	16,6±0,7*	22,7±1,1*
Доля клеток с высоким содержанием фермента,%	3,3±0,1	1,0±0,03*	51,7±2,5*

выявленных в ретикулярном гигантоклеточном ядре

*Различия достоверны (p<0,05) по сравнению с соответствующими показателями NO-нейронов.



Рисунок 28. Количественные показатели CBS-иммунопозитивных нейронов в разных частях ретикулярного гигантоклеточного ядра. Площадь выражена в мкм²/10, доля – в %, концентрация – в количестве нейронов на 0,01 мм², СПОП – в усл. ед. Обозначения те же, что и на рисунке 4.

3.3. Ретикулярное мелкоклеточное ядро

Ретикулярное мелкоклеточное ядро (nucleus reticularis harvocellularis, вставочное) в продолговатом мозге расположено в латеральной части ретикулярной формации, дорсолатеральнее от гигантоклеточного ретикулярного ядра. Объем ядра составляет 15,2 мм³.

При окраске по Нисслю в ядре выявляются мелкие, средние и крупные нейроны различной формы (рисунок 29а,б).



Рисунок 29. Нейроны ретикулярного мелкоклеточного ядра: $\mathbf{a} - \mathbf{y}_{B.:}$ об. 3,7^x, ок. 10^x , $\mathbf{6} -$ об. 20^x , ок. 10^x . Окраска метиленовым синим.

63

В РМЯ в основном преобладают мелкие клетки размером 5-15 мкм. Их доля от общего количества составляет 73 %. На долю средних клеток приходится 19 % нейронов. Крупные клетки встречаются значительно реже и сосредоточены в основном в ростральной области ядра. Нейроны в ядре распределены крайне неравномерно. Относительная плотность их в разных частях ядра различна. Наибольшее количество нейронов сосредоточено в рострально-латеральной части ядра (рисунок. 30).





NADPH-диафораза. При окраске срезов гистохимическим методом выявляются NO-нейроны, имеющие различную форму, размеры и интенсивность реакции (рисунок 31).

СПОП в NADPH-d-нейронах имеет значение 29,5 усл. ед. Как крупные, так и мелкие нейроны окрашиваются в различные оттенки фиолетового цвета. Нейроны с показателем активности более 40 усл. ед. встречаются в РМЯ чаще всего (50 %). Нейроны с СПОП от 20 до 40 усл. ед. составляют чуть больше 30 %. На долю нейронов с оптической плотностью до 20 усл. ед., где осадок имеет бледно-фиолетовый цвет или выпадает в виде отдельных мелких гранул, приходится 10 % нейронов.



Рисунок 31. NADPH-d-позитивные нейроны ретикулярного мелкоклеточного ядра разной степени интенсивности реакции: а – низкой, б – умеренной, в – высокой. Гистохимический метод.

В РМЯ большинство составляют мелкие NO-нейроны (70,8 %), обычно овальной или треугольной формы площадью 50-200 мкм². Доля средних клеток площадью 200-400 мкм² составляет 26,8 мкм². Крупные нейроны площадью более 400 мкм² практически не встречаются. В каудальной части ядра наблюдается небольшое число мелких и средних клеток и много – крупных. Крупные клетки локализуются на границе с гигантоклеточным ядром, в дорсальной и вентральной части ядра. В ростральной области крупные клетки практически не встречаются, а доля мелких клеток достигает 90 %.

В среднем по ядру общая доля NADPH-d-нейронов составляет 41,7 %, но в ростральной части снижается до 32,6 %, а в каудальной, наоборот, возрастает до 48 %. Средняя концентрация NADPH-d-нейронов в РМЯ составляет 29,2 нейронов/0,01 мм², и варьирует в различных частях ядра (рисунок 32).



Рисунок 32. Количественные показатели NADPH-d-позитивных нейронов в разных частях ретикулярного мелкоклеточного ядра. Площадь выражена в мкм²/10, доля – в %, концентрация – в количестве нейронов на 0,01 мм², СПОП – в усл. ед. Обозначения те же, что и на рисунке 4.

NO-синтаза (*nNOS*). При иммуногистохимическом выявлении NOнейронов в PMЯ определяются клетки полигональной, треугольной, овальной и веретеновидной формы с низкой, средней и высокой интенсивностью реакции (рисунок 33). Среди nNOS-позитивных нейронов также можно выделить три типа клеток, отличающиеся локализацией фермента в клетке и разными значениями показателя оптической плотности. В РМЯ СПОП составляет 13,2 усл. ед. В центральной области чаще выявляются клетки с умеренной и высокой интенсивностью реакции, а СПОП составляет 16,1 усл. ед. В каудальной части ядра много нейронов с низкой и умеренной концентрацией фермента, окрашивающих клетку в бледно-коричневый цвет, а СПОП в этой области составляет 12,2 усл. ед.



Рисунок 33. nNOS-иммунопозитивные нейроны ретикулярного мелкоклеточного ядра разной степени интенсивности реакции: а – низкой, б – умеренной, в – высокой.

В РМЯ nNOS-нейроны имеют размеры от 50 до 550 мкм², которые мы разделили на мелкие с площадью профильного поля менее 200 мкм², средние – 200-400 мкм², крупные – более 400 мкм².

Большинство крупных нейронов располагаются в каудальной части ядра. Однако общее их количество составляет не более 25 %. Средних nNOS-нейронов большинство – 64 %. На рисунке 34 приведена зависимость количества nNOS-нейронов от площади их профильного поля.

Кривая распределения показывает, что 70 % всех нервных клеток сосредоточено в области 200-420 мкм², т.е. приходится на средние по размеру клетки. Кривая имеет выраженный максимум на площади нейронов размером 360 мкм².

Общая доля nNOS-нейронов в среднем по ядру составляет 28 %. В разных частях ядра встречается неодинаковое количество клеток. В каудальной части, где определяется наибольшее число крупных клеток, доля клеток составляет 26,1 %. В ростральной и центральной области расположены клетки меньшего размера, но их больше (рисунок 35).



Рисунок 34. Кривая распределения nNOS-иммунопозитивных нейронов ретикулярного мелкоклеточного ядра по их площади. Обозначения те же, что и на рисунке 8.



Рисунок 35. Количественные показатели nNOS-иммунопозитивных нейронов в разных частях ретикулярного мелкоклеточного ядра. Площадь выражена в мкм²/10, доля – в %, концентрация – в количестве нейронов на 0,01 мм², СПОП – в усл. ед. Обозначения те же, что и на рисунке 4.

В РМЯ выявляются компактные группы небольших по размеру NOнейронов, поэтому концентрация в нем выше, чем в других исследуемых ядрах и составляет 23,9 нейронов/0,01 мм². В центральной части NO-нейроны распределены достаточно равномерно и заметных скоплений не образуют. Концентрация клеток в этой части ядра равна 21,7 нейронов/0,01 мм². В каудальной части концентрация меньше и составляет 19,4 нейронов/0,01 мм². В ростральной области значения концентрации максимальны и составляют 25,7 нейронов/0,01 мм².

Гемоксигеназа-2 (НО-2). В РМЯ гемоксигеназа-2 откладывается преимущественно в небольших нейронах, среди которых определяются клетки с низкой, умеренной и высокой интенсивностью реакции (рисунок 36).



Рисунок 36. НО-2-иммунопозитивные нейроны ретикулярного мелкоклеточного ядра разной степени интенсивности реакции: а – низкой, б – умеренной, в – высокой.

Большинство НО-2-нейронов, выявленных в РМЯ, имеют средний и высокий уровень интенсивности реакции, соответствующий СПОП>30 усл. ед. Локализованы такие клетки в основном в центральной части ядра, где СПОП достигает 41 усл. ед. Доля клеток с низким содержанием фермента составляют 15,2 %. Большинство этих клеток определяется в каудальной части РМЯ.

Среди НО-2-позитивных нейронов в РМЯ выявляются мелкие, средние и крупные формы. Мелкие и средние нейроны составляют большинство. На их долю приходится 91 % от общего количества СО-продуцирующих нейронов. Площадь профильного поля таких клеток лежит в интервале 70-400 мкм². Крупные нейроны встречаются значительно реже. Средняя площадь профильного поля НО-2-нейронов составляет 272,4 мкм².

Количественное распределение СО-нейронов по их площади показывает, что основная доля НО-2-нейронов в РМЯ приходится на средние клетки. Площадь большинства НО-нейронов лежит в интервале 160-400 мкм². Однако, как и для ЯСТ, максимум кривой смещен в сторону мелких нейронов и приходится на величину 280 мкм² (рисунок 37).



Рисунок 37. Кривая распределения НО-2-иммунопозитивных нейронов ретикулярного гигантоклеточного ядра по их площади. Обозначения те же, что и на рисунке 8.

В РМЯ СО-нейроны определяются в небольшом количестве. Их доля составляет 7 % от общего количества нейронов, выявленных метиленовым синим. В разных частях ядра определяется неодинаковое количество нервных клеток, в связи с чем, на протяжении ядра меняется и доля СО-нейронов. На рисунке 37 представлено соотношение площади, доли, концентрации и СПОП в разных частях РМЯ.



Рисунок 38. Количественные показатели НО-2-продуцирующих нейронов в разных частях ретикулярного мелкоклеточного ядра. Площадь выражена в мкм²/10, доля – в %, концентрация – в количестве нейронов на 0,01 мм², СПОП – в усл. ед. Обозначения те же, что и на рисунке 4.

Как видно, большинство СО-нейронов локализуются в тех же участках ядра, что и NO-нейроны. Однако в РМЯ наибольшая концентрация наблюдается в ростральной части ядра и составляет 7,2 нейронов/0,01 мм². В центральной части распределение НО-нейронов более равномерное и значение концентрации снижается до 6,1 нейронов/0,01 мм². В каудальной части увеличивается доля крупных нейронов, но уменьшается их количество.

Цистатионин-β-синтаза (CBS). В РМЯ встречаются нейроны треугольной, овальной и веретеновидной формы (рисунок 39). CBS откладывается в клетках весьма неравномерно: определяются клетки различной степени интенсивности реакции и локализации в них фермента.

Доля клеток с низким содержанием фермента составляет 52 %. В этих клетках СПОП не превышает 20 усл. ед. С умеренным содержанием фермента – 29 %. Расчеты СПОП в этих клетках колеблется от 20 до 40 усл. ед. В РМЯ нейронов с высоким содержанием фермента выявляется 19 %, а СПОП в них превышает 40 усл. ед.



Рисунок 39. CBS-иммунопозитивные нейроны ретикулярного мелкоклеточного ядра разной степени интенсивности реакции: а – низкой, б – умеренной, в – высокой.

В РМЯ встречаются мелкие, средние и крупные нейроны. Среднее значение площади профильного поля CBS-нейронов в РМЯ составляет 418,5 мкм². При этом доля мелких нейронов составляет 3 % и локализованы они в основном в центральной части ядра. Из-за большого количества мелких клеток средняя площадь нейронов в этой области составляет 385 мкм² (рисунок 40).



Рисунок 40. Кривая распределения CBS-иммунопозитивных нейронов ретикулярного гигантоклеточного ядра по их площади. Обозначения те же, что и на рисунке 8.
Большинство H₂S-нейронов (64,6 %) составляют крупные клетки площадью профильного поля более 400 мкм². На долю средних клеток приходится 32,4 %. Распределение CBS-нейронов показывает, что в отличие от гигантоклеточного ядра в РМЯ выявляется H₂S-нейронов меньше, чем CO-нейронов. Кривая распределения довольно сильно растянута с 150 до 650 мкм² и лежит в области средних и крупных нейронов. Максимум кривой приходится на площадь клеток 420 мкм². На долю H₂S-нейронов в РГЯ приходится всего 6 % от общего количества нейронов. В центральной части ядра определяется самое большое количество нейронов, но и здесь их доля составляет 7,8 %. В каудальной части количество нервных клеток минимально, не превышая 5 % (рисунок 41).



Рисунок 41. Количественные показатели CBS-иммунопозитивных нейронов в разных частях ретикулярного мелкоклеточного ядра. Площадь выражена в мкм²/10, доля – в %, концентрация – в количестве нейронов на 0,01 мм², СПОП – в усл. ед. Обозначения те же, что и на рисунке 4.

Несмотря на то, что NO-, CO- и H₂S-нейроны в РМЯ выявляются постоянно, размеры, их количество, значения СПОП существенно отличаются между собой (таблица 4). Как видно, большинство в ядре составляют NO-нейроны. HO-2- и CBS-позитивные нейроны определяется в РМЯ в 4 раза реже. NO-синтаза и HO-2 откладывается в основном в мелких и средних клетках, а CBS – в крупных. nNOS- и HO-2-позитивные нейроны находятся в основном в ростральной части ядра, а CBS-нейроны – в центральной.

Исследуемый фермент	nNOS	НО-2	CBS
Общее количество нейронов	36398±625	9067±221*	7771±112*
Доля нейронов от общего количества нервных клеток, %	28,1±1,4	7,0±0,2*	6,0±0,2*
Относительная плотность нейронов на 0,01 мм ²	23,9±0,9	6,0±0,1*	5,1±0,1*
Средняя площадь нейронов, мкм ²	320,0±14,1	272,4±12,5*	418,5±16,3*
Доля мелких нейронов,%	11,2±0,6	27,1±1,4*	3,0±0,1*
Доля средних нейронов,%	64,7±3,5	64,8±2,9	32,4±1,5*
Доля крупных нейронов,%	24,1±0,9	8,1±0,2*	64,6±3,8*
СПОП, усл. ед.	13,2±0,7	41,5±2,1*	22,3±1,1*
Доля клеток с низким содержанием фермента, %	58,0±2,7	15,2±0,7*	52,0±2,9*
Доля клеток со средним содержанием фермента,%	42,0±1,9	44,3±2,1	29,0±0,8*
Доля клеток с высоким содержанием фермента,%	0,0	40,5±2,3*	19,0±0,9*

Таблица 4. Количественные показатели NO-, СО- и H₂S-продуцирующих нейронов,

выявленных в ретикулярном мелкоклеточном ядре

Фермента, 20
 *Различия достоверны (p<0,05) по сравнению с соответствующими показателями NO-нейронов.

3.4. Ретикулярное латеральное ядро

Ретикулярное латеральное ядро (nucleus reticularis lateralis, чувствительное) располагается в латеральной области ретикулярной формации и каудальнее нижней оливы. Объем РЛЯ составляет 5 мм³.

Для выяснения характера расположения нейронов в ядре, их размеров, формы, концентрации применялся метод окраски препаратов по Нисслю (рисунок 42a,б). Установлено, что на всем протяжении ядра встречаются нейроны различной формы (треугольные, овальные, округлые) и размеров. Мелкие нейроны определяются чаще всего (75 %). Среди нейронов иногда попадаются крупные нейроны площадью более 400 мкм² (7 %) Они расположены в основном в центральной части ядра.



Рисунок 42. Нейроны ретикулярного латерального ядра: $\mathbf{a} - \mathbf{y}_{B.:}$ об. 3,7^x, ок. 10^x , $\mathbf{6} - \mathbf{o}_{C.}$ 20^x, ок. 10^x . Окраска метиленовым синим.

Средняя площадь профильного поля клеток здесь составляет 299,4 мкм², однако в ростральной области средняя площадь нейронов равна 376,1 мкм², а в центральной – 254,3 мкм². Количество нейронов, определяемых в РЛЯ невелико. Их концентрация в ядре оставляет всего 23 нейрона/0,01 мм². Наиболее густо клетки расположены в центральной и каудальной части ядра. В ростральной части концентрация клеток уменьшается, составляя 16 нейронов/0,01 мм² (рисунок 43).



Рисунок 43. Концентрация и средняя площадь нейронов в разных частях ретикулярного латерального ядра. Концентрация выражена в количестве нейронов/0,01 мм², площадь – в мкм². Обозначения те же, что и на рисунке 4.

NADPH-диафораза. При гистохимическом окрашивании продукт реакции распределяется неравномерно по всему телу нейронов (рисунок 44).



Рисунок 44. NADPH-d-позитивные нейроны ретикулярного латерального ядра разной степени интенсивности реакции: а – низкой, б – умеренной, в – высокой. Гистохимический метод.

В зависимости от интенсивности окрашивания выявляются клетки, в которых осадок откладывается только по периферии (слабая активность) (рисунок 44а) или заполняют часть цитоплазмы отдельными гранулами (умеренная активность) (рисунок 44б). В других клетках преципитат заполняет все тело клетки (высокая активность) (рисунок 44в). Осадок также маркирует отростки нейрона. Средний показатель оптической плотности фермента в РЛЯ равен 34 усл. ед.

Размеры нейронов, содержащих диафоразу, значительно отличаются. Выявляются мелкие нейроны площадью менее 200 мкм², средние нейроны площадью от 200 до 400 мкм² и крупные нейроны площадью более 400 мкм². В РЛЯ доля мелких NADPH-d-позитивных нейронов составляет 75,2 %. На долю средних клеток приходится 17,9 %, крупных – 6,9 %. Средняя площадь профильного поля в ядре составляет 298,6 мкм² (рисунок 45).

Средние по размеру клетки достаточно равномерно распределены по всему ядру. В каудальной части ядра уменьшается доля крупных клеток и увеличивается доля мелких. В результате в этой части ядра средняя площадь нейронов несколько меньше, чем в других областях и составляет 252,7 мкм². В ростральной области

площадь профильного поля NO-нейронов имеет максимальное значение за счет большого количества крупных клеток и составляет 327,1 мкм². В центральной области площадь нейронов равна 287,2 мкм². Около 40 % нейронов от общего количества, выявляемых метиленовым синим, содержат NADPH-диафоразу (рисунок 45). В разных частях ядра определяется неодинаковое количество клеток: больше всего в каудальной части ядра, минимальное число – в ростральной части. В РЛЯ не выявлено крупных скоплений NO-нейронов.



Рисунок 45. Количественные показатели NADPH-d-позитивных нейронов в разных частях ретикулярного латерального ядра. Площадь выражена в мкм²/10, доля – в %, концентрация – в количестве нейронов на 0,01 мм², СПОП – в усл. ед. Обозначения те же, что и на рисунке 4.

NO-синтаза (nNOS). При иммуногистохимическом окрашивании в РЛЯ определяются нейроны разной интенсивности реакции, формы и размеров (рисунок 46). Большинство нейронов, определяемых в РЛЯ, составляют клетки с низким содержанием продуктом реакции. Наибольшее значение СПОП определяется среди нейронов ростральной части ядра (15,6 усл. ед.). В большинстве выявляются нейроны с низкой центральной его части в интенсивностью реакции, СПОП в этой части ядра составляет 10,5 усл. ед. Среднее значение оптической плотности в РЛЯ равно 13,1 усл. ед.

Размеры nNOS-позитивных нейронов сильно отличаются и занимают область от 100 до 650 мкм². Большая часть нейронов составляет средние клетки с

площадью от 200 до 400 мкм². Крупные и мелкие нейроны присутствуют в ядре приблизительно в одинаковом количестве – 18,5, 16,3 % соответственно.



Рисунок 46. nNOS-иммунопозитивные нейроны ретикулярного латерального ядра с разной степени интенсивности реакции: а – низкой, б – средней, в – высокой.

Количественное распределение нейронов по площади профильного поля в ретикулярном латеральном ядре представлено на рисунке 47. Для nNOS-позитивных нейронов максимум приходится на средние нейроны площадью 380 мкм². Кривая зависимости количества нейронов от площади довольно широка, что говорит о том, что в РЛЯ встречаются нейроны разных размерных групп.



Рисунок 47. Кривая распределения nNOS-иммунопозитивных нейронов ретикулярного латерального ядра по их площади. Обозначения те же, что и на рисунке 8.

При иммуногистохимическом исследовании NO-нейронов всегда выделяется меньше, чем при гистохимическом. Доля nNOSпозитивных нейронов составляют всего 19%. Большая часть нейронов сосредоточена в центральной области РЛЯ. Доля нервных клеток в этой части ядра составляет 27,2 %. В ростральной части количество клеток уменьшается до 18,7 %, а в каудальной до 11,2 %. Средние значения концентрация клеток в РЛЯ составляет 4,4 нейрона/0,01 мм² (рисунок 48).



Рисунок 48. Количественные показатели nNOS-позитивных нейронов в разных частях ретикулярного латерального ядра. Площадь выражена в мкм²/10, доля – в %, концентрация – в количестве нейронов на 0,01 мм², СПОП – в усл. ед. Обозначения те же, что и на рисунке 4.

Гемоксигеназа-2 (НО-2). При иммуногистохимической реакции на НО-2 в клетках РЛЯ определяются СО-продуцирующие нейроны. Они отличаются интенсивностью реакции и распределением осадка в цитоплазме клеток (рисунок 49). СПОП в среднем по ядру составляет довольно большую цифру – 59,5 усл. ед., в основном за счет того, что около половины СО-позитивных нейронов имеет высокий показатель оптической плотности фермента (>40 усл. ед.).

СО-нейроны имеют размеры от 50 до 550 мкм². Большинство клеток составляют средние нейроны. На их долю приходится 54,1 % от общего количества СО-позитивных клеток. Доля мелких нейронов увеличивается до 27,5 %. Крупные нейроны определяются в 18,4%. На рисунке 50 представлена кривая зависимости количества СО-нейронов от площади профильного поля. Как видно,

максимум кривой распределения для HO-2-нейронов приходится на 320 мкм², т.е. смещен в сторону более мелких клеток.



Рисунок 49. НО-2-иммунопозитивные нейроны ретикулярного латерального ядра разной степени интенсивности реакции: а – низкой, б – умеренной, в – высокой.



Рисунок 50. Кривая распределения НО-2-иммунопозитивных нейронов ретикулярного латерального ядра по их площади. Обозначения те же, что и на рисунке 8.

Большинство клеток лежат в области 180-380 мкм². В центральной части ядра расположены в основном крупные иммунопозитивные нейроны. Их средняя площадь в этой области составляет 345,2 мкм². В ростральной и каудальной

области увеличивается количество мелких и уменьшается количество средних и крупных клеток.

Количество НО-нейронов в ядре невелико. Их доля от общего количества, выявляемых метиленовым синим, в среднем по ядру составляет 14 %. В центральной части РЛЯ наблюдается сокращение количества клеток, в связи с чем, доля СО-нейронов здесь ниже, чем в других частях ядра (рисунок 51). Их средняя концентрация по ядру составляет 3,2 нейрона/0,01 мм². В ростральной области концентрация СО-нейронов чуть выше среднего (4,8 нейрона/0,01 мм²), в



Рисунок 51. Количественные показатели НО-2-иммунопозитивных нейронов в разных частях ретикулярного латерального ядра. Площадь выражена в мкм²/10, доля – в %, концентрация – в количестве нейронов на 0,01 мм², СПОП – в усл. ед. Обозначения те же, что и на рисунке 4.

центре ядра клетки расположены еще реже, а их концентрация уменьшается до 2,3 нейрона/0,01мм², а в каудальной части значения показателя увеличиваются до 6 нейрона/0,01мм².

Цистатионин- β -синтаза (CBS). В нейронах РЛЯ определяются H₂Sнейроны. В местах локализации CBS выпадает осадок, который в зависимости от структуры, расположения и плотности образующегося продукта реакции, позволяет выделить нейроны с низкой, умеренной и высокой интенсивностью реакции (рисунок 52).



Рисунок 52. CBS-иммунопозитивные нейроны ретикулярного латерального ядра разной степени интенсивности реакции: а – низкой, б – умеренной, в – высокой.

Доля нейронов со средним (20-40 усл. ед.) и высоким (>40 усл. ед.) содержанием фермента составляет соответственно (25,1 % и 23 %). Средний показатель оптической плотности фермента в ретикулярном латеральном ядре составляет 17,1 усл. ед.

(78,2%), РЛЯ Большинство нейронов выявляемых при В иммуногистохимической реакции на CBS, крупные. Основная доля нейронов лежит в области 400-600 мкм². Мелких и средних нейронов не так много. Поэтому при изучении количественного распределения H₂S-нейронов ретикулярного латерального ядра по площади профильного поля можно видеть, что максимум распределения приходится на крупные клетки величиной 480 мкм² (рисунок 53).

Доля CBS-нейронов в РЛЯ составляет 3% от общего количества нейронов, выявляемых метиленовым синим. Средняя концентрация этих клеток составляет 0,7 нейронов/0,01 мм². На рисунке 54 представлены локальные отличия распределения величины площади, доли, концентрации и СПОП H₂S-нейронов в разных частях ядра. Как видно, все показатели имеют максимальные значения в ростральной части ядра.



Рисунок 53. Кривая распределения CBS-иммунопозитивных нейронов ретикулярного латерального ядра по их площади. Обозначения те же, что и на рисунке 8.



Рисунок 54. Кривая распределения CBS-продуцирующих нейронов в разных частях ретикулярного латерального ядра. Площадь выражена в мкм²/10, доля – в %, концентрация – в количестве нейронов на 0,01 мм², СПОП – в усл. ед. Обозначения те же, что и на рисунке 4.

Сравнительная характеристика NO-, CO- и H₂S-нейронов в РЛЯ представлена в таблице 5. Нетрудно заметить, что количественные показатели среди нейронов разной медиаторной принадлежности существенно отличаются между собой.

Исследуемый фермент	nNOS	НО-2	CBS
Общее количество нейронов	2181±85	1607±33*	344±15*
Доля нейронов от общего количества нервных клеток, %	19,0±1,1	14,1±0,7*	3,0±0,1*
Относительная плотность нейронов на 0,01 мм ²	4,4±0,2	3,2±0,1*	0,7±0,02*
Средняя площадь нейронов, мкм ²	375,0±14,5	324,3±12,8*	463,3±13,8*
Доля мелких нейронов,%	16,3±0,8	2,9±0,2*	18,9±1,1*
Доля средних нейронов,%	65,2±3,2	54,1±2,7*	18,9±1,1*
Доля крупных нейронов,%	18,5±0,6	18,4±0,7	78,2±4,5*
СПОП, усл. ед.	13,2±0,5	59,5±0,6*	17,1±0,6*
Доля клеток с низким содержанием фермента, %	13,1±0,5	32,1±0,3*	51,8±0,4*
Доля клеток со средним содержанием фермента,%	29,6±0,5	21,5±0,6*	25,1±0,3*
Доля клеток с высоким содержанием фермента,%	4,4±0,1	46,4±0,8*	23,1±0,6*

Таблица 5. Количественные показатели NO-, СО- и H₂S-продуцирующих нейронов,

выявленных	В	ретику	лля	рном	лате	ральном	ядре
<i>DDD1D11</i>	~	P • • • • • • •	,	P 0			- mp

*Различия достоверны (p<0,05) по сравнению с соответствующими показателями NO-нейронов.

3.5. Математический анализ взаимосвязи между морфометрическими показателями газотрансмиттерных нейронов

При математическом анализе взаимосвязи между одними морфометрическими показателями, характеризующими энзимопозитивные нейроны, обнаружены положительные корреляции, между другими они не прослеживаются. Так, например, при сравнении нейронов различной медиаторной принадлежности установлена математическая зависимость между долей мелких, средних и крупных нейронов и значениями СПОП. Для NO- и CO-нейронов большое количество мелких нейронов в ядре увеличивает СПОП, крупных нейронов, наоборот, уменьшает. Для CBS характерно другое распределение: при увеличении доли крупных клеток, возрастают средние значения интенсивности реакции.

Для определения функциональной зависимости между вычисляемыми характеристиками (долей иммунопозитивных нейронов в ядре, долей мелких и крупных клеток, СПОП, концентрацией и площадью нейронов) был использован метод множественной регрессии, результатом которого явилось построение регрессионной модели для каждого нейротрансмиттера в отдельности.

В качестве зависимой переменной выбиралась величина СПОП, независимыми переменными (факторами) являлись доля иммунопозитивных нейронов (D) в ядре, доля мелких (D_m), крупных клеток (D_k), концентрация (C), площадь нейронов (S).

В качестве модели выбиралась линейная множественная регрессия вида:

$$y = B + B_1 x_1 + B_2 x_2 + B_3 x_3 + B_4 x_4 + B_5 x_5$$
(8)

или: СПОП =
$$B + B_1 D + B_2 D_m + B_3 D_k + B_4 C + B_5 S$$
 (9)

NO-нейроны. Результаты множественной регрессии в численном виде представлены в таблице 6. В первом столбце таблицы приведены значения коэффициентов β – стандартизованные коэффициенты регрессионного уравнения, во втором – стандартные ошибки β , в третьем – точечные оценки параметров модели *B*. Далее, стандартные ошибки для коэффициентов модели *B*, значения статистик t-критерия.

	β	Ошибка	В	Ошибка	t	р
		β		В		
Свободный член			11,77380	7,070986	1,665086	0,146949
Доля нейронов	-0,045033	0,148855	-0,03063	0,101030	-0,302532	0,772461
Доля мелких	0,898243	0,201372	0,28665	0,064262	4,460612	0,004280
Доля крупных	0,018119	0,163355	0,01541	0,138953	0,110916	0,915300
Концентрация	0,096959	0,220305	0,04295	0,097598	0,440112	0,675267
Площадь	-0,091376	0,114840	-0,09559	0,120130	-0,795686	0,456531

Таблица 6. Результаты множественной регрессии для NO-внутриядерных нейронов

Коэффициент множественной корреляции составляет R=0,97859; коэффициент детерминации R²=0,95764; скорректированный на потерю степеней свободы коэффициент множественной детерминации равен 0,92235; критерий Фишера F=27,13061; уровень значимости модели p<0,00048.

Из таблицы видно, что линейная регрессионная модель имеет вид:

 $C\Pi O\Pi = 11,774 - 0,0306D + 0,2867D_m + 0,01541D_k + 0,04295C - 0,0956S (10)$

Коэффициент регрессии будет статистически значим только при переменной «доля мелких нейронов». Коэффициенты уравнения показывают количественное воздействие каждого фактора на результативный показатель при неизменности других. В данном случае существенно влияние только одного фактора.

Множественный коэффициент корреляции построенной модели R=0,97859 очень высок, что говорит о сильной связи между исследуемыми факторами.

Расчетное значение критерия Фишера превышает табличное для доверительной вероятности p=0,95 и числа степеней свободы v_1 =5 и v_2 =12 (F_{0.05;5;12}=4,39), что говорит об адекватности модели экспериментальным данным.

Для исследования степени зависимости между переменными построена корреляционная матрица (таблица 7).

	Доля	Доля	Доля	Концентрация	Площадь	СПОП
	нейронов	мелких	крупных			
Доля нейронов	1,00000	-0,06693	0,20811	0,45220	-0,13718	-0,04500
Доля мелких	-0,06693	1,00000	-0,67851	0,74741	-0,01468	0,97426
Доля крупных	0,20811	-0,67851	1,00000	-0,56890	-0,39027	-0,62022
Концентрация	0,45220	0,74741	-0,56890	1,00000	-0,01468	0,73898
Площадь	-0,13718	-0,14036	-0,39027	-0,01468	1,00000	-0,21977
СПОП	-0,04500	0,97426	-0,62022	0,73898	-0,21977	1,00000

Таблица 7. Коэффициенты корреляции между количественными характеристиками внутриядерных NO-нейронов

Из данных, приведенных в матрице видно, что самая большая положительная корреляционная связь прослеживается между долей мелких NO-

нейронов и СПОП (r=0,97426). Довольно сильная положительная корреляция наблюдается между долей мелких NO-нейронов и концентрацией этих клеток в ядре (r=0,74741), а также концентрацией NO-нейронов и СПОП (r=0,73898). Связь между остальными переменными незначительна.

Результаты измерений критерия Дарбина-Уотсона (2,5523, r=-0,355397) свидетельствуют о незначимости коэффициента автокорреляции.

СО-нейроны. Результаты множественной регрессии в численном виде представлены в таблице 8.

	β	Ошибка β	В	Ошибка В	t	р
Свободный член			-28,0709	28,80996	-0,97435	0,367514
Доля нейронов	0,104461	0,135247	0,3499	0,45304	0,77237	0,469216
Доля мелких	0,889555	0,128594	2,1386	0,30916	6,91757	0,000452
Доля крупных	-0,200779	0,139300	-0,7295	0,50611	-1,44135	0,199570
Концентрация	-0,200779	0,111872	2,3949	11,24922	1,91715	0,103675
Площадь	0,044334	0,179123	0,2032	0,82082	0,24751	0,812768

Таблица 8. Результаты множественной регрессии для внутриядерных СО-нейронов

Коэффициент множественной корреляции составляет R=0,98204; коэффициент детерминации R²=0,9644; скорректированный на потерю степеней свободы коэффициент множественной детерминации равен 0,93473; критерий Фишера F=32,50816; уровень значимости модели p<0,00028.

Обозначения в таблицах те же, что и для NO-нейронов. Из таблицы 8 видно, что линейная регрессионная модель для CO-нейронов имеет вид:

 $C\Pi O\Pi = -28,0709 + 0,3499D + 2,1386D_m - 0,7295D_k + 2,3949C - 0,2032S$ (11)

Из этой же таблицы следует, что коэффициент регрессии будет статистически значим только при переменной «доля мелких нейронов».

Критическое (табличное) значение критерия Фишера для доверительной вероятности $\rho=0,95$ и числа степеней свободы $v_1=5$ и $v_2=12$ $F_{\kappa p.}=F_{0,05;5;12}=4,39$. Расчетное значение критерия Фишера F=32,5 превышает табличное значение критерия, что говорит об адекватности модели экспериментальным данным.

Построенная регрессия достоверна при р=0,00028 уровне значимости.

Для исследования степени зависимости между переменными построена корреляционная матрица (таблица 9).

	Доля	Доля	Доля крупни іх	Концентрация	Площадь	СПОП
	нсиронов	мелких	крупных			
Доля нейронов	1,00000	0,75710	0,17501	0,35961	-0,46898	0,79914
Доля мелких	0,75710	1,00000	0,31602	0,18322	-0,29356	0,93147
Доля крупных	0,17501	0,31602	1,00000	-0,20810	0,58615	0,07997
Концентрация	0,35961	0,18322	-0,20810	1,00000	-0,66212	0,42745
Площадь	-0,46898	-0,29356	0,58615	-0,66212	1,00000	-0,52549
СПОП	0,79914	0,93147	0,07997	0,42745	-0,52549	1,00000

Таблица 9. Коэффициенты корреляции между количественными характеристиками внутриядерных СО-нейронов

Из матрицы видно, что наиболее тесная положительная корреляционная связь прослеживается между долей мелких СО-нейронов и средним показателем оптической плотности фермента (r=0,93147). Довольно сильная положительная корреляция наблюдается между общей долей СО-нейронов и СПОП (r=0,79914), а также между общей долей NO-нейронов и долей мелких NO-нейронов (0,75710). Связь между остальными переменными незначительна.

Результаты проверки остатков регрессионной модели на автокорреляцию показывают незначимость коэффициента Дарбина-Уотсона (2,424422)

*H*₂*S*-*нейроны.* Результаты множественной регрессии в численном виде представлены в таблице 10.

	β	Ошибка β	В	Ошибка В	t	р
Свободный член			-70,1063	20,03664	-3,49891	0,002843
Доля нейронов	0,045622	0,159996	0,2660	0,93293	0,28514	0,785122
Доля мелких	-0,185932	0,088687	-3,9571	1,88747	-2,09649	0,080870
Доля крупных	0,700227	0,133945	1,6621	0,31794	5,22774	0,001961
Концентрация	0,259214	0,111851	0,5121	0,22099	2,31748	0,059654
Площадь	-0,003933	0,081011	-0,0144	0,29682	-0,04856	0,962850

Таблица 10. Результаты множественной регрессии для внутриядерных H₂S-нейронов

Коэффициент множественной корреляции составляет R=0,98786; коэффициент детерминации $R^2=0,97587$; скорректированный на потерю степеней свободы коэффициент множественной детерминации равен 0,95576; критерий Фишера *F*=48,53383; уровень значимости модели p<0,00009.

Обозначения в таблицах те же, что и для NO-нейронов. Из данных таблицы 10 следует, что линейная регрессионная модель для H₂S-нейронов имеет вид:

$$C\Pi O\Pi = -70,1063 + 0,266D - 3,9571D_m + 1,6621D_k + 0,5121C - 0,0144S$$
(12)

Для H₂S-нейронов коэффициент регрессии будет статистически значим только при переменной «доля крупных нейронов».

Критическое (табличное) значение критерия Фишера для доверительной вероятности $\rho=0,95$ и числа степеней свободы $v_1=5$ и $v_2=12$ $F_{\kappa p} =F_{0,05;5;12} =4,39$. Расчетное значение критерия Фишера F=48,5 превышает табличное значение критерия, что говорит об адекватности модели экспериментальным данным. Построенная регрессия достоверна при p=0,00009 уровне значимости.

Самая большая положительная корреляционная связь прослеживается между долей крупных H_2S -нейронов и средним показателем оптической плотности (r=0,92899). Довольно сильная положительная корреляция наблюдается между общей долей H_2S -нейронов и СПОП (r=0,844979), между общей долей H_2S -нейронов и долей крупных H_2S -нейронов (r=0,73741), между общей долей H_2S -нейронов и концентрацией этих клеток в ядре (r=0,72859), отрицательная корреляция между долей мелких H_2S -нейронов и СПОП (=-0,75707) (таблица 13).

	Доля нейронов	Доля мелких	Доля крупных	Концентрация	Площадь	СПОП
Доля нейронов	1,00000	-0,55697	0,72859	0,73741	0,18310	0,844979
Доля мелких	-0,55697	1,00000	-0,64679	-0,36509	-0,46384	-0,75705
Доля крупных	0,72859	-0,64679	1,00000	0,29804	0,50768	0,92899
Концентрация	0,73741	-0,36509	0,29804	1,00000	0,00466	0,56942
Площадь	0,18310	-0,46384	0,50768	0,00466	1,00000	0,44736
СПОП	0,844979	-0,75705	0,92899	0,56942	0,44736	1,00000

Таблица 11. Коэффициенты корреляции между количественными характеристиками внутриядерных H₂S-нейронов

Связь между остальными переменными незначительна.

Результаты расчета критерия Дарбина-Уотсона (2,573265, r=-0,360957) позволяет сделать вывод о незначимости коэффициента автокорреляции.

Таким образом, построенные математические модели на основе метода множественной регрессии показывают, что на значение показателя СПОП для NO-нейронов и CO-нейронов влияет, в основном, доля мелких клеток в ядре. Причем, из уравнений, полученных для этих нейронов, видно, что с увеличением доли мелких клеток в ядре увеличивается также СПОП. Это подтверждает предположение о том, что преципитат в NO- и CO-нейронах маркирует в основном мелкие и средние клетки. Из построенных моделей также следует, что такие показатели как общая доля энзимпозитивных клеток в ядре, средняя площадь профильного поля клеток и их концентрация не вносят существенного вклада в значение СПОП, поскольку прямой зависимости между ними не наблюдается.

Что касается H_2S -нейронов, то полученное уравнение регрессии говорит о том, что СПОП в этих клетках, в отличие от NO- и CO-нейронов, определяется, в основном, долей крупных клеток в ядре. Как видно из уравнения, чем больше D_{κ} , тем больше СПОП. Остальные показатели существенного вклада в величину СПОП не вносят.

Глава 4

ИММУНОЛОКАЛИЗАЦИЯ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ В МЕЖЪЯДЕРНЫХ НЕЙРОНАХ ПРОДОЛГОВАТОГО МОЗГА

Между исследованными ядрами продолговатого мозга постоянно находятся нервные клетки, которые структурными и энзимологическими характеристиками отличаются от внутриядерных нейронов. Суммарное количество межъядерных интернейронов в каудальном отделе ствола мозга составляет 4-6 % от общего числа нервных клеток.

Нами изучены три группы межъядерных интернейронов: МЯ1 – находящиеся между гигантоклеточным и мелкоклеточным ретикулярными ядрами; МЯ2 – расположенные между ретикулярным мелкоклеточным ядром и ядром одиночного пути; МЯ3 – в окружении ретикулярного латерального ядра.

4.1. Группа 1

Популяция МЯ1 неоднородна. При окраске метиленовым синим выявляются нейроны разных форм и размеров. Преобладают интернейроны веретеновидной и треугольной формы (рисунок 55). Реже встречаются овальные и полигональные клетки. Площадь МЯ1-нейронов варьируется от 50 до 550 мкм². Большинство клеток имеют площадь от 150 до 200 мкм². На их долю приходится 63,4 % всех МЯ1-нейронов. Достаточно большую группу клеток (29,7 %) составляют интернейроны площадью 350-500 мкм².

Межъядерные нейроны встречаются реже и расположены с меньшей плотностью, чем внутриядерные нейроны. Концентрация интернейронов между гигантоклеточным и мелкоклеточным ретикулярными ядрами при окраске метиленовым синим составляет 14 клеток/0,01 мм².



Рисунок 55. Межъядерные интернейроны (МЯ1) между ретикулярным гигантоклеточным (РГЯ) и ретикулярным мелкоклеточным ядрами (РМЯ). Окраска метиленовым синим.

NADPH-диафораза. Реакцией на NADPH-d выявляются МЯ1-нейроны, которые отличаются между собой формой, размерами, структурой и плотностью осадка гистохимической реакции, длиной отростков и другими признаками (рисунок 56а-в).

Как внутриядерные клетки, NADPH-d-позитивные МЯ1-нейроны И отличаются между интенсивностью реакции. В зависимости от активности фермента встречаются нейроны с различной окраской цитоплазмы – от бледноголубой до интенсивно фиолетовой. По интенсивности окраски и локализации осадка в клетки среди межъядерных нейронов мы также выделили три типа нейронов. Нейроны с низкой активностью фермента отличаются бледной окраской большей части цитоплазмы и имеют СПОП менее 20 усл. ед. Нейроны с умеренной активностью фермента имеют более интенсивную окраску за счет гранул преципитата, заполняющих большую часть цитоплазмы, а СПОП – от 20 до 40 усл. ед. Третий тип нейронов с высокой активностью фермента имеют СПОП более 40 усл. ед. В таких нейронах плотный осадок заполняет практически всю цитоплазму, включая отростки, окрашивая клетки в темно-фиолетовый цвет. Среди МЯ1 интернейронов встречается достаточно большое количество клеток с

высоким значением СПОП. Их доля составляет 43,2 % от общего количества NADPH-d MЯ1 клеток. На долю клеток с низким значением активности фермента приходится 15,7 % интернейронов.



Рисунок 56. NADPH-d-позитивные межъядерные нейроны 1 группы (МЯ1): локализация межъядерных нейронов (а), крупные (б) и мелкие (в) клетки. Гистохимический метод.

МЯ1-нейроны имеют площадь от 50 до 550 мкм². Однако большая часть из них представлена мелкими клетками площадью до 200 мкм². На их долю приходится 67,8 % всех NADPH-d-позитивных МЯ1-нейронов (таблица 15). При окраске на NADPH-d у клеток площадью 150-200 мкм² выявляются интенсивно окрашенные дендриты, напоминающие куст ИЗ нескольких коротких расходящихся веточек (рисунок 56б). Они контактируют с лежащими поблизости клетками или интернейронами, находящимися на периферии ядер, участвуя в образовании локальных межъядерных нейронных цепей. У более крупных нейронов, площадью свыше 350 мкм² отростки удаляются на значительное расстояние от тела клетки, отдавая несколько более тонких горизонтальных, восходящих или нисходящих ветвей в другие отделы мозга (рисунок 56в). В

отличие от дендритов, аксоны обладают низкой степенью активности и плохо различимы на общем фоне. Среди МЯ1также выявляется относительно большая популяция более крупных клеток, площадью 400-500 мкм². Их доля составляет 27,2 %.

Межъядерные интернейроны встречаются, как правило, поодиночке. Иногда выявляются небольшие группы по 2-4 нейрона, поэтому концентрация этих клеток очень мала. В среднем в группе МЯ1 величина этого показателя составляет 12,2 нейрона/0,01 мм².

NO-синтаза (nNOS). Между ретикулярным гигантоклеточным И ретикулярным мелкоклеточным ядрами определяются нервные клетки, nNOS. Клетки формой, экспрессирующие отличаются размерами, интенсивностью реакции (рисунок 57).



Рисунок 57. nNOS-иммунопозитивные межъядерные интернейроны 1 группы (МЯ1).

Большинство межъядерных интернейронов популяции МЯ1 имеют треугольную форму. Иногда встречаются полигональные и звездчатые нейроны. Размеры нервных клеток варьирут от 50 до 650 мкм². На рисунке 58 представлена кривая распределения nNOS-нейронов по их площади. Нетрудно заметить, что в отличие от внутриядерных нейронов, большинство межъядерных нейронов составляют две основные размерные группы. Первую группу образуют мелкие клетки от 100 до 250 мкм². Пик распределения (максимальное количество нейронов) имеют площадь 200 мкм². Клетки менее 50 мкм² практически не встречаются. На кривой имеется «провал» в области средних по размеру клеток площадью 230-350 мкм². Мелкие клетки в общей сложности составляют 57 % от общего количества МЯ1-нейронов, маркированных nNOS.





Вторую группу нейронов составляют крупные клетки площадью 350-550 мкм². Пик распределения для этой группы нейронов приходится на величину 400 мкм². В общей сложности на долю крупных клеток приходится 33,2 % от общего количества nNOS MЯ1-нейронов. Средняя площадь профильного поля nNOS-позитивных нейронов MЯ1составляет 303,7 мкм².

Межъядерные nNOS-нейроны образуют небольшие группы из 2-4 нейронов или чаще располагаются поодиночке (рисунок 57). Концентрация МЯ1-нейронов гораздо ниже, чем внутриядерных клеток и составляет 8,9 нейронов/0,01 мм².

Среди nNOS-позитивных межъядерных нейронов встречаются клетки с различной интенсивностью реакции, окрашивая их цитоплазму в цвета – от светло

до темно-коричневого (рисунок 57). Средний показатель оптической плотности в этом случае принимает значения: при низкой интенсивности реакции до 20 усл. ед., умеренной – 20-40 усл. ед., высокой – более 40 усл. ед. Средний показатель оптической плотности nNOS в MЯ1 составляет 30,1 усл. ед.

На рисунке 59 показано распределение оптической плотности преципитата в различных по размеру клетках. Самые большие значения СПОП имеют мелкие клетки площадью 90-190 мкм². В клетках площадью менее 80 мкм² и 200-260 мкм² определяются наименьшие значения СПОП.



Рисунок 59. Зависимость среднего показателя оптической плотности NO-синтазы от площади межъядерных нейронов 1 группы. Обозначения те же, что и на рисунке 8.

Группу с высокими значениями СПОП составляют нейроны площадью 290-450 мкм². В общей сложности на долю этих клеток приходится около трети от общего количества nNOS-позитивных МЯ1-нейронов (таблица 12).

Исследуемый фермент	NADPH-d	nNOS	HO-2	CBS
Доля нейронов от общего количества нервных клеток, %	18,5±1,2*	12,7±0,6	6,8±0,3*	3,2±0,2*
Концентрация, нейронов/0,01 мм ²	12,2±0,8*	8,9±0,5	5,3±0,2*	3,4±0,2*
Средняя площадь нейронов, мкм ²	283,8±15,4	303,7±15,1	260,1±12,5*	402,1±20,4*
Доля мелких нейронов,%	67,8±3,2*	57±2,8	67,2±3,6*	33,4±2,1*
Доля средних нейронов,%	5±0,2*	9,8±0,5	7,2±0,3*	27,3±2,2*
Доля крупных нейронов,%	27,2±1,3*	33,2±1,4	25,6±1,4*	39,3±2,8*
СПОП, усл. ед.	33,4±1,5*	30,1±1,3	35,6±1,7*	21,6±1,8*
Доля клеток с низким содержанием фермента, %	15,7±0,9*	35,3±1,6	15,0±0,7*	62,8±4,5*
Доля клеток со средним содержанием фермента,%	41,1±1,7*	33,1±1,5	36,4±1,8*	36,7±2,7
Доля клеток с высоким содержанием фермента,%	43,2±1,7*	31,6±1,4	48,6±1,9*	0,5±0,03*

*Различия достоверны (p<0,05) по сравнению с соответствующими показателями NO-нейронов.

Гемоксигеназа-2 (НО-2). В группе МЯ1 постоянно определяются НО-2-

Таблица 12. Количественные показатели NO-, СО- и H₂S-продуцирующих нейронов,

Рисунок 60. НО-2-иммунопозитивные межъядерные нейроны 1 группы (МЯ1).

выявленных в МЯ1

РМЯ 1 K МЯ 1 50 мкм РГЯ

позитивные нейроны (рисунок 60).

Наиболее часто они имеют треугольную, овальную, веретеновидную форму. Размеры НО-2-позитивных нейронов колеблются от 50 до 550 мкм². Клетки площадью менее 50 мкм² и более 500 мкм² практически не встречаются (рисунок 61). Большинство нейронов составляют мелкие клетки площадью 80-180 мкм². Их доля составляет 67,2% от общего количества НО-2 МЯ1-нейронов. Клеток площадью 200-280 мкм² встречается очень мало, на их долю приходится 7,2 % нейронов.



Рисунок 61. Кривая распределения НО-2-иммунопозитивных межъядерных нейронов 1 группы по их площади. Обозначения те же, что и на рисунке 8.

Вторую большую группу интернейронов составляют крупные клетки площадью 280-450 мкм² (рисунок 61). На их долю приходится 25,6 % нейронов. Пик кривой распределения приходится на величину 350 мкм². Можно сказать, что в МК1 среди межъядерных СО-продуцирующих нейронов отчетливо выделяются две размерные группы: мелкие клетки площадью 80-180 мкм² и крупные площадью 280-450 мкм². Доля нейронов других размеров незначительна. Концентрация НО-2-позитивных нейронов в МЯ1 значительно ниже, чем во внутриядерных нейронах. Межъядерные клетки расположены очень редко, в результате чего плотность их распределения составляет всего 5,3 нейрона/ 0,01 мм². Доля таких клеток в МЯ1 составляет 6,8 % от общего их количества, окрашенных метиленовым синим.

Проведенное исследование показало что НО-2-позитивные также, интернейроны, определяющиеся МЯ1, собой В отличаются между интенсивностью окраски. Структура и особенности распределения осадка в цитоплазме межъядерных нейронов позволяет выделить три типа клеток с низким, умеренным и высоким содержанием НО-2 (рисунок 60). Клетки с высоким содержанием фермента, для которых СПОП>40 усл. ед., составляют достаточно большую группу. На их долю приходится 48,7 % нейронов от общего количества МЯ1-нейронов. Клетки с низкой концентрацией НО-2, где осадок выпадает в виде отдельных редких гранул, окрашивая клетки в бледнокоричневый цвет, встречаются гораздо реже (14,7 %). Доля клеток со средней интенсивностью реакции составляет 36,6 % (таблица 12). Большое количество нейронов с высоким значением СПОП приводит к увеличению СПОП в МЯ1 до 35,6 усл. ед.



СПОП также зависит от размеров клеток (рисунок 62).

Рисунок 62. Зависимость среднего показателя оптической плотности гемоксигеназы-2 от площади межъядерных нейронов 1 группы. Обозначения те же, что и на рисунке 8.

НО-2 чаще откладывается в мелких клетках. Зависимость СПОП от площади профильного поля клеток показывает, что в МЯ1 интенсивность

99

иммуногистохимической реакции примерно в 1,5 раза выше в мелких клетках, чем в крупных. Основную долю НО-2-позитивных клеток составляют нейроны площадью 80-180 мкм². В этих клетках СПОП имеет значение более 40 усл.ед. (высокая степень интенсивности реакции). Относительно многочисленную группу иммунопозитивных нейронов составляют также клетки площадью 280-400 мкм². Большинство этих нейронов имеют умеренное и высокое содержание фермента. Клетки площадью 200-280 мкм² имеют минимальные значения СПОП.

Цистатионин-β-синтаза (CBS). Между РГЯ и РМЯ определяется небольшое количество нейронов, продуцирующих H₂S. Они имеют различную форму, размеры, интенсивность реакции (рисунок 63).



Рисунок 63. CBS-иммунопозитивные межъядерные интернейроны 1 группы (МЯ1).

Размеры клеток, экспрессирующих H_2S варьируются от 50 до 500 мкм². Клетки менее 50 мкм² и более 500 мкм² встречаются в единичных случаях. В отличие от NO- и CO-межъядерных нейронов, H_2S -клетки распределены более равномерно по площади профильного поля и явного разделения на две размерные группы среди них не определяется (рисунок 64). Тем не менее, определенное увеличение количества крупных клеток площадью 300-480 мкм² – их доля от общего числа H₂S-позитивных нейронов в МЯ1 составляет 39,3 % – и мелких клеток площадью 50-200 мкм², определяется. Доля последних составляет 33,4 %, тогда как средних по размеру клеток – 27,3% нейронов. Средняя площадь профильного поля H₂S-нейронов в МК1 составляет 402,1 мкм². Концентрация CBS-нейронов в МЯ1 еще ниже, чем СО-нейронов и в 2-3 раза меньше, чем концентрация внутриядерных нейронов, и составляет 3,4 нейрона/0,01мм².



Рисунок 64. Кривая распределения CBS-иммунопозитивных межъядерных интернейронов 1 группы по их площади. Обозначения те же, что и на рисунке 8.

СВЅ-нейроны, определяемые в МЯ1, отличаются интенсивностью реакции (рисунок 63). В местах локализации СВЅ выпадает гранулярный осадок, который, в зависимости от структуры, расположения и плотности образующегося продукта реакции, маркирует нейроны в различные оттенки красного цвета. В связи с этим среди СВЅ-иммунопозитивных межъядерных интернейронов также можно выделить три типа клеток с разным уровнем интенсивности реакции: низким, умеренным и высоким. Клетки I типа составляют 62,8% от общего количества H₂S-нейронов МЯ1. В таких клетках выпадает осадок бледно-красного цвета в основном на периферии клетки. Клетки II типа составляют 36,7% нейронов. В этих нейронах осадок имеет умеренную интенсивность и располагается более плотно в цитоплазме клетки. На долю клеток III типа приходится не более 0,5%. СПОП в CBS-нейронах в МЯ1 ниже, чем других исследованных ферментов (таблица 15) и среди остальных популяций межъядерных интернейронов и составляет 21,6 усл. ед.

СПОП зависит от размеров нейронов (рисунок 65). Плотность отложения продукта реакции невысока во многих мелких нейронах, в большинстве которых площадью 80-180 мкм² СПОП составляет 20-32 усл. ед., а в крупных клетках площадью 300-450 мкм² – 15-25 усл. ед. Средние по размеру клетки площадью 180-280 мкм² имеют минимальные значения СПОП – не более 15 усл. ед.



Рисунок 65. Зависимость среднего показателя оптической плотности цистатионин-βсинтазы от площади межъядерных нейронов 1 группы. Обозначения те же, что и на рисунке 8.

В таблице 12 приведены данные основных количественных параметров, характеризующие газотрансмиттерные нейроны разной медиаторной принадлежности.

4.2. Группа 2

При окраске метиленовым синим между ретикулярным мелкоклеточным ядром и ядром солитарного тракта выявляются МЯ2-нейроны разных форм и размеров (рисунок 66). Большая часть нейронов имеют треугольную и овальную форму. Площадь профильного поля клеток варьирует от 30 до 600 мкм².



Рисунок 66. Межъядерные интернейроны (МЯ2) между ретикулярным мелкоклеточным ядром (РМЯ) и ядром солитарного тракта (ЯСТ). Окраска метиленовым синим.

Большинство межъядерных интернейронов представлено мелкими клетками площадью 80-180 мкм². Их доля составляет 71,8% всех МЯ2 нейронов. Крупные клетки площадью 300-600 мкм² встречаются почти в 3 раза реже. На долю средних по размеру клеток приходится всего 1,2% нейронов. Количество межъядерных нейронов во второй популяции невелико. МЯ2-нейронов встречаются в несколько раз меньше, чем внутриядерные. Клетки расположены чаще одиночно, иногда группами по3-4 нейрона. Концентрация МЯ2-нейронов, находящихся между РМЯ и ЯСТ составляет 12 нейронов/0,01 мм².

NADPH-диафораза. При исследовании срезов методом на NADPHдиафоразу определяются MЯ2-нейроны различные по форме и размерам (рисунок 67а). Большую часть NADPH-d-позитивных нейронов составляют мелкие клетки площадью 50-200 мкм² и крупные клетки площадью 300-500 мкм². На их долю приходится 74,3 и 23,2% соответственно. Средние клетки составляют 2,5%. Нейроны площадью менее 50 мкм² и более 600 мкм² встречаются в единичных случаях. Средняя площадь профильного поля MЯ2 NADPH-d-позитивный нейронов составляет 268,4 мкм².

Межъядерные NADPH-d-нейроны отличаются также интенсивностью реакции (рисунок 67).



Рисунок 67. NADPH-d-позитивные межъядерные интернейроны 2 группы (МЯ2) разной степени активности фермента. Гистохимический метод.

Осадок окрашивает клетки в различные оттенки фиолетового цвета в зависимости от активности фермента. СПОП в МЯ2 составляет 44,8 усл. ед. Доля клеток с высокой активностью фермента в МЯ2 составляет 52,1 %. 11,7 % NADPH-d-позитивных МЯ2-нейронов имеют значения СПОП менее 20 усл. ед.,

соответствующие низкой активности реакции. Клетки с умеренной активностью составляют 36,2 %. Как длинные, так и короткие отростки нередко контактируют между собой, участвуя в организации дендритных и дендро-аксональных взаимодействий. Как правило, межъядерные нейроны довольно далеко отстают друг от друга, в связи с чем плотность их расположения невелика и составляет 14,7 нейронов/0,01 мм² (таблица 16). Иногда тела МЯ2-нейронов тесно прилежат друг к другу, образуя кластеры из 3-4 нейронов, или находятся на небольшом расстоянии друг от друга. Доля МЯ2 NADPH-d-позитивных нейронов составляет 21,4% от общего количества нейронов, окрашенных метиленовым синим.

NO-синтаза (nNOS). Среди МЯ2 постоянно определяются клетки с положительной реакцией на nNOS, отличающиеся размерами и формой (рисунок 68). Чаще всего встречаются треугольные, овальные и веретеновидные клетки площадью от 50 до 600 мкм².



Рисунок 68. nNOS-иммунопозитивные межъядерные нейроны 2 группы.

В зависимости от интенсивности реакции нервные клетки окрашиваются в различные оттенки коричневого цвета. В тех клетках, где осадок откладывается в небольших количествах, нейроны окрашиваются в светло-коричневые тона со СПОП менее 20 усл. ед. Клетки с более плотным осадком имеют СПОП от 20 до 40 усл. ед. Встречаются также клетки со СПОП более 40 усл. ед, в которых продукт реакции заполняет всю цитоплазму плотными гранулами, окрашивая тело клетки в темно-коричневый цвет (рисунок 68).

СПОП напрямую зависит от размеров клеток (рисунок 69). NO-синтаза маркирует в основном мелкие клетки площадью 80-180 мкм². В них СПОП более чем в два раза больше, чем в крупных клетках площадью 280-400 мкм². Из графика видно, что на долю клеток с высокой степенью интенсивности реакции приходится 57,3 %. Умеренный уровень реакции фермента к имеют в основном крупные клетки площадью 280-380 мкм², а также небольшое количество мелких клеток площадью 60-80 мкм². На долю нейронов со СПОП от 20 до 40 усл. ед. приходится 38,1 %. Клетки с низким содержанием фермента составляют средние клетки площадью 200-280 мкм², а также небольшое количество мелких клеток до 50 мкм² и крупных клеток свыше 380 мкм². СПОП в МЯ2-нейронах составляет 39,6 усл. ед.



Рисунок 69. Зависимость СПОП nNOS-иммунопозитивных межъядерных нейронов 2 группы, от их площади. Обозначения те же, что и на рисунке 8.

На рисунке 70 представлена кривая распределения количества нейронов по площади профильного поля. Из графика видно, что большинство МЯ2 nNOSнейронов по этому признаку относятся к двум группам: первой – площадью 50-200 мкм². Это мелкие клетки, которые составляют большинство (71,1 %). Вторая группа включает клетки площадью 310-450 мкм². На их долю приходится 25,3 % от общего количества nNOS-нейронов. Клетки площадью менее 50 мкм² и более 500 мкм², а также средние клетки площадью 220-300 мкм² встречаются очень редко. Пик распределения в первой размерной группе приходится на величину 150 мкм², а во второй – на 350 мкм². Эти значения имеют большинство выявленных нейронов в МЯ2. Всего на долю nNOS-нейронов в МЯ2приходится 14,3 %, а их концентрация составляет12,9 нейронов/0,01мм² (таблица 16).



Рисунок 70. Кривая распределения nNOS-иммунопозитивных межъядерных нейронов 2 группы по их площади. Обозначения те же, что и на рисунке 8.

Гемоксигеназа-2 (НО-2). Между ретикулярным мелкоклеточным ядром и ядром солитарного тракта постоянно определяются интернейроны, продуцирующие СО. Нейроны отличаются формой, размерами, интенсивностью реакции (рисунок 71). По большей части встречаются нейроны треугольной, полигональной и овальной формы. Размеры нейронов также очень разнообразны: встречаются мелкие клетки площадью 30-200 мкм², средние – 200-300 мкм² и крупные – 400-600 мкм².

В зависимости от концентрации фермента в клетке осадок окрашивает ее в разные оттенки коричневого цвета (рисунок 71). В клетках с низкой интенсивностью реакции СПОП < 20 усл. ед. Они характеризуются наличием в цитоплазме мелкозернистого преципитата светло-коричневого цвета. В клетках с умеренной реакцией СПОП колеблетсяот 20 до 40 усл. ед., а преципитат откладывается в большей части цитоплазмы и имеет темно-коричневый оттенок. В клетках с высокой интенсивностью реакции СПОП превышает 40 усл. ед., а осадок равномерно плотно заполняет всю цитоплазму, оставляя свободным лишь ядро.



Рисунок 71. НО-2-позитивные межъядерные интернейроны 2 группы.

Разные по размеру клетки отличаются интенсивностью реакции (рисунок 72). Клетки со СПОП > 40 усл. ед. имеют преимущественно площадь 80-190 мкм² (мелкие клетки). Максимальное значение СПОП (84 усл. ед.) приходится на клетки площадью 150 мкм². Более крупные клетки (300-320 мкм²) также имеют
высокую степень интенсивности реакции, но она гораздо ниже, чем у мелких клеток, и равна 40,8 усл. ед. Доля таких клеток в несколько раз меньше, чем крупных.

Клетки с умеренной концентрацией фермента составляют группу крупных нейронов площадью 170-390 мкм², а также мелких клеток площадью до 80 мкм². Доля клеток с высоким СПОП в МЯ2 составляет 83,6 %, средним СПОП – 14,1 %. Средний показатель оптической плотности НО-2 в МЯ2 равен 49,8 усл. ед. (таблица 13).



Рисунок 72. Зависимость среднего показателя оптической плотности гемоксигеназы-2 от площади межъядерных нейронов 2 группы. Обозначения те же, что и на рисунке 8.

При распределении НО-2-нейронов в МЯ2 по площади профильного поля отчетливо виден максимум в области мелких клеток площадью 150 мкм² (рисунок 73). На их долю приходится 78,3 % СО-интернейронов. Второй максимум – менее выраженный – приходится на клетки площадью 280-450 мкм². В указанном интервале кривая не имеет ярко выраженного «горба», нейроны этой группы более равномерно распределены по площади профильного поля. Доля таких нейронов в МЯ2 составляет 18,3 % от общего количества СО-нейронов. Клетки более 450 мкм² практически не встречаются. Учитывая большое количество мелких клеток, средняя площадь профильного поля НО-2-нейронов небольшая, составляя 217 мкм².



Рисунок 73. Кривая распределения НО-2-иммунопозитивных межъядерных нейронов 2 группы по их площади. Обозначения те же, что и на рисунке 8.

Второй максимум – менее выраженный – приходится на клетки площадью 280-450 мкм². В указанном интервале кривая не имеет ярко выраженного «горба», зависимость количества нейронов в этой группе от площади более равномерное. Доля таких нейронов в МЯ2 составляет 18,3 % от общего количества СОнейронов. Клетки более 450 мкм² практически не встречаются. Учитывая большое количество мелких клеток, средняя площадь профильного поля HO-2-нейронов небольшая, составляя 217 мкм².

НО-2 межъядерные нейроны выявляются гораздо реже, чем внутриядерные в ЯСТ и РМЯ. Их концентрация составляет 9,3 нейрона/0,01 мм². Однако в МЯ2 концентрация СО-нейронов выше, чем в других популяциях и составляет 12,3 %.

Цистатионин-*β***-синтаза (CBS).** Среди межъядерных МЯ2-нейронов постоянно определяются клетки продуцирующие H₂S. CBS-клетки отличаются формой, размерами, интенсивностью реакции. Преобладают нейроны веретеновидной треугольной формы, встречаются округлые И реже И полигональные клетки, в единичных случаях звездчатые (рисунок 74).



Рисунок 74. CBS-иммунопозитивные межъядерные интернейроны 2 группы.

В зависимости от интенсивности реакции нервные клетки окрашиваются в различные оттенки красного цвета. В тех клетках, где осадок откладывается в небольших количествах, нейроны окрашиваются в светло-красный цвет со СПОП менее 20 усл. ед. Клетки с более плотным осадком имеют СПОП от 20 до 40 усл. ед. Встречаются также клетки со СПОП более 40 усл. ед, в которых продукт реакции заполняет всю цитоплазму плотными гранулами, окрашивая тело клетки в темно-красный цвет (рисунок 74).

Клетки низкой интенсивности реакции составляют 68,7 % от общего количества H_2S -продуцирующих МЯ2 нейронов. В таких клетках выпадает осадок бледно-красного цвета в основном на периферии клетки. Клеток с умеренным содержанием фермента 31 %. В этих нейронах осадок располагается более плотно. На долю клеток с высокой плотностью преципитата приходится не более 0,3 %. СПОП в CBS-нейронах в МЯ2 ниже, чем других исследованных ферментов (таблица 13).

СПОП зависит от размеров нейронов (рисунок 75). H_2S -нейроны с низкой интенсивностью реакции встречаются во всех размерных группах, но самая большая доля их приходится на клетки площадью около 230 мкм² и составляет 68,7 %.





Клетки с умеренной интенсивностью реакции определяются в гораздо меньшем количестве (около 31 %). СПОП в этом случае лежит в области от 20 до 40 усл. ед. Такое значение оптической плотности встречается у клеток площадью 90-160 мкм². Крупные (300-400 мкм²) H₂S-нейроны с высоким содержанием фермента в МЯ2 практически не определяются.

В отличие от NO- и CO-нейронов, среди H₂S-нейронов одинаково часто встречаются мелкие клетки с площадью профильного поля до 200 мкм² и крупные – около 400 мкм² (рисунок 76). Доля первых в МЯ2 составляет 36,7 %, вторых – 35 % от общего количества CBS-нейронов. Средние клетки площадью 200-350 мкм² встречаются в 28,3 %. Клетки площадью более 500 мкм² встречаются редко. Средняя площадь профильного поля CBS-нейронов 2-ой популяции составляет 354,2 мкм². В таблице 13 приведены данные основных количественных параметров, характеризующие газотрансмиттерные нейроны МК2 разной медиаторной принадлежности.

Исследуемый фермент	NADPH-d	nNOS	HO-2	CBS
Доля нейронов от общего количества нервных клеток, %	21,4±1,7*	14,3±0,6	12,3±0,6*	4,1±0,2*
Концентрация, нейронов/0,01 мм ²	14,7±1,3	12,9±0,5	9,3±0,4*	3,9±0,2*
Средняя площадь нейронов, мкм ²	268,4±13,1	258,4±13,6	217,3±9,8*	354,2±8,6*
Доля мелких нейронов,%	74,3±4,2	71,1±3,5	78,3±3,8	36,7±2,3*
Доля средних нейронов,%	2,5±0,1*	3,6±0,2	3,4±0,2	28,5±1,7*
Доля крупных нейронов,%	23,2±1,8	25,3±1,4	18,3±0,9*	35,1±1,2*
СПОП, усл. ед.	44,8±2,3*	39,6±1,7	49,8±2,1*	25,4±1,3*
Доля клеток с низким содержанием фермента, %	11,7±0,9*	4,6±0,3	2,3±0,1*	68,7±3,4*
Доля клеток со средним содержанием фермента,%	36,2±2,9	38,1±1,7	14,1±0,5*	31±1,5*
Доля клеток с высоким содержанием фермента,%	52,1±4,1*	57,3±1,9	83,6±4,2*	0,3±0,01*

Таблица 13. Количественные показатели NO-, СО- и H₂S-продуцирующих нейронов,

выявленных в	в МЯ2
--------------	-------

*Различия достоверны (p<0,05) по сравнению с соответствующими показателями NO-нейронов.

Концентрация CBS-клеток в МЯ2 составляет 3,9 нейронов/0,01 мм². Клетки располагаются очень редко, на большом расстоянии друг от друга. Их доля от общего количества МЯ2-нейронов не превышает 4,1 %.



Рисунок 76. Кривая распределения CBS-иммунопозитивных межъядерных нейронов 2 группы по их площади. Обозначения те же, что и на рисунке 8.

4.3. Группа 3

При исследовании нейронов, локализованных между ретикулярными гигантоклеточным и латеральным ядрами, метиленовым синим выявляются разные по форме и размеру клетки (рисунок 77). В основном выявляются треугольные и овальные нейроны, реже звездчатые и полигональные. Площадь межъядерных нейронов колеблется от 30 до 550 мкм². Нейроны площадью более 550 мкм² встречаются очень редко. Большая часть МЯЗ-нейронов представлена мелкими клетками площадью 70-200 мкм². На их долю приходится 73 % всех нейронов и 25 % нейронов – на крупные клетки площадью 300-550 мкм².

В МЯЗ концентрация клеток гораздо меньше, чем в ядрах продолговатого мозга и составляет 19,7 нейронов/0,01мм².

114



Рисунок 77. Межъядерные нейроны 3 группы (МЯЗ) на границе ретикулярных латерального (РЛЯ) и гигантоклеточного (РГЯ) ядер. Окраска метиленовым синим.

NADPH-диафораза. При окраске на NADPH-диафоразу определяются нейроны треугольной, овальной, округлой формы (рисунок 78). Иногда встречаются звездчатые нейроны. Площадь NADPH-d-позитивных клеток варьируется от 30 до 550 мкм². Средняя площадь профильного поля MЯЗ NADPH-d-нейронов составляет 274,1 мкм².

NADPH-d-позитивные нейроны в МЯЗ обладают различным уровнем активности реакции. Большинство клеток окрашивается в светлые оттенки фиолетового цвета, имея низкий (меньше 20 усл. ед.) показатель оптической плотности фермента. На долю таких клеток приходится 57,8 % нейронов. Клетки с высоким значением СПОП (больше 40 усл. ед.) составляют 10,1 %, с умеренным – 32,1 %.



Рисунок 78. NADPH-d-позитивные нейроны 3 группы (МЯЗ). Гистохимический метод.

В отличие от других межъядерных групп в МЯЗ NADPH-d-позитивные нейроны располагаются в основном небольшими группами по 2-4 клетки. Доля таких нейронов в МЯЗ составляет 19,7 %, из них большинство (63,2 %) приходится на мелкие клетки площадью до 200 мкм². Еще одну группу составляют клетки площадью 300-550 мкм². На их долю приходится 26,8 % клеток. Клетки площадью 200-300 мкм² и более 550 мкм² встречаются очень редко. Концентрация NADPH-d-позитивных клеток в МЯЗ выше, чем в МЯ1, но ниже, чем в МЯ2 и составляет 13,7 нейронов/0,01 мм² (таблица 17).

NO-синтаза (*nNOS*). При иммуногистохимическом исследовании среди МЯЗ постоянно выявляются NO-нейроны, отличающиеся формой, размерами, интенсивностью реакции (рисунок 79). В зависимости от концентрации фермента клетки окрашиваются в различные оттенки коричневого цвета. Светло-коричневый цвет имеют нейроны с низким содержанием nNOS. В этом случае осадок в основном откладывается на периферии клетки (I тип). В других нейронах преципитат заполняет большую часть цитоплазмы, окрашивая клетку в более

темные тона (II тип). В нейронах III типа с высокой интенсивностью реакции образуется густой осадок темно-коричневого цвета, который заполняет все тело клетки. В клетках I типа СПОП не превышает 20 усл. ед., а их доля в МЯЗ составляет 14,2 % от общего количества nNOS-позитивных нейронов. СПОП для клеток III типа с высокой интенсивностью реакции превышает 40 усл. ед., а их количество превышает 50 % (таблица 17). Около трети всех nNOS-позитивных нейронов среди МКЗ составляет II тип клеток, в которых значения СПОП колеблются от 20 до 40 усл. ед.



Рисунок 79. nNOS-иммунопозитивные нейроны 3 группы.

СПОП клеток зависит от их размеров (рисунок 80). Наибольшим уровнем оптической плотности в МЯЗ обладают нейроны площадью около 150 мкм² и 300 мкм². Нейроны с минимальными значениями СПОП имеют средние по величине клетки площадью 200-280 мкм², а также более крупные клетки (около 400 мкм²).



Рисунок 80. Зависимость среднего показателя оптической плотности nNOS от площади межъядерных нейронов 3 группы. Обозначения те же, что и на рисунке 8.

nNOS-позитивные нейроны представляют собой треугольные и округлые клетки площадью от 30 до 550-600 мкм². Основное большинство составляют мелкие клетки площадью до 200 мкм² (рисунок 81). На их долю приходится 64,4 % всех nNOS-позитивных нейронов. Вторую по величине группу составляют крупные клетки площадью 350-450 мкм². На их долю приходится 32,9 % нейронов.



Рисунок 81. Кривая распределения nNOS-иммунопозитивных межъядерных нейронов 3 группы по их площади. Обозначения те же, что и на рисунке 8.

В отличие от внутриядерных нейронов, для которых максимум распределения такой кривой приходится на область средних по величине клеток, межъядерные нейроны средних размеров площадью 200-350 мкм² практически не встречаются. Доля таких клеток в МЯЗ не превышает 2-3 %. Средняя площадь МЯЗ nNOS-позитивных нейронов составляет 263,4 мкм².

Концентрация nNOS-позитивных клеток в МЯЗ составляет 10,2 нейронов/0,01 мм², а их доля – 13,7 % от общего количества nNOS-нейронов (таблица 17).

Гемоксигеназа-2 (НО-2). СО-нейроны, также как и NO-нейроны, отличаются интенсивностью реакции (рисунок 82).



Рисунок 82. НО-2-иммунопозитивные межъядерные нейроны 3 группы.

Клетки с высокой интенсивностью реакции в основном представляют собой мелкие клетки площадью 80-180 мкм² (рисунок 83).

Наибольшее значение СПОП имеют клетки площадью около 130-150 мкм². СПОП этих клеток более 40 усл. ед., а их доля в МЯЗ составляет 73,1 %. Мелкие клетки до 70 мкм², а также средние по размеру клетки площадью 200-300 мкм² и небольшая часть более крупных нейронов (более 400 мкм²) имеют, как правило, СПОП меньше 20 усл. ед. В общей сложности на долю НО-2 клеток с низким значением СПОП приходится около 2 % нейронов. Клетки площадью 300-400

мкм² в основном имеют умеренную степень интенсивности реакции. СПОП таких клеток колеблется между 20-40 усл. ед., а доля составляет 34,7 % (таблица 17).



Рисунок 83. Зависимость среднего показателя оптической плотности гемоксигеназы-2 от площади межъядерных нейронов 3 группы. Обозначения те же, что и на рисунке 8.

Площадь НО-2-нейронов колеблется от 30 до 600 мкм², хотя нейроны площадью 500-600 мкм² встречаются очень редко, как и клетки менее 30 мкм² (рисунок 84). Средняя площадь СО-нейронов в МЯЗ равна 232,8 мкм².



Рисунок 84. Кривая распределения НО-2-иммунопозитивных позитивных нейронов 3 группы по их площади. Обозначения те же, что и на рисунке 8.

Большую часть НО-2-позитивных нейронов в МЯЗ составляют мелкие клетки (73 %). Они имеют площадь до 200 мкм². Кривая распределения СОнейронов по их площади показывает, что максимальное количество нейронов имеет площадь около 150 мкм². На графике отчетливо видно, что СО-нейроны формируют и другую размерную группу: это нейроны площадью 280-400 мкм². Их доля составляет 24,3 % от общего количества НО-2-позитивных нейронов в МЯЗ. Среднее значение СПОП в этих нейронах МЯЗ составляет 46,6 усл. ед.

Концентрация СО-нейронов примерно в 1,5 раза меньше, чем NO-нейронов и составляет 8,2 нейрона/0,01 мм², а доля этих клеток – 9,2 % от общего количества нейронов (таблица 17).

Цистатионин-β-синтаза (CBS). В МЯЗ постоянно определяются H₂Sпродуцирующие нейроны, отличающиеся между собой оптической плотностью продукта реакции (рисунок 85).



Рисунок 85. CBS-иммунопозитивные нейроны 3 группы.

На этом основании, как и при изучении других газотрансмиттеров, мы выделили три группы клеток с низкой, умеренной и высокой интенсивностью реакции. На рисунке 86 представлен график, демонстрирующий зависимость СПОП от размеров CBS-нейронов.





Большая часть клеток площадью 50-280 мкм² и более 400 мкм² имеет СПОП ниже 20 усл. ед. Клетки площадью 280-390 мкм² чаще всего обладают умеренной степенью интенсивности реакции (20<СПОП<40 усл. ед.). В крупных клетках оптическая плотность фермента выше, чем в мелких. В общей сложности на долю клеток с низким значением СПОП приходится 40,1 %, с высоким СПОП – 56,8 % от общего количества H_2S -нейронов в МЯЗ. Среднее значение СПОП в этих нейронах МЯЗ составляет 23,6 усл. ед.

В отличие от NO- и CO-нейронов, которые отчетливо разделяются на две размерные группы, среди H₂S-нейронов эти отличия выражены слабее. Мелких нейронов выявляется немногим больше, чем крупных. Площадь мелких нейронов колеблется в области 50-220 мкм², крупных – 320-500 мкм² (рисунок 87).

Концентрация CBS-позитивных нейронов в МЯЗ составляет 3,7 клеток/0,01 мм³, а их доля – 4,4 % (таблица 14).

Исследуемый фермент	NADPH-d	nNOS	HO-2	CBS
Доля нейронов от общего количества нервных клеток, %	19,7±1,1*	13,7±0,6	9,2±0,4*	4,4±0,2*
Концентрация, нейронов/0,01 мм ²	13,7±0,6*	10,2±0,4	8,2±0,8*	3,7±0,2*
Средняя площадь нейронов, мкм ²	274,1±12,1	263,4±12,3	232,8±8,4*	361,1±17,1*
Доля мелких нейронов,%	63,2±3,2	64,4±3,8	73,0±3,6*	43,2±2,7*
Доля средних нейронов,%	10,2±0,5*	2,7±0,1	2,7±0,1	10,0±0,6*
Доля крупных нейронов,%	26,8±1,4*	32,9±1,6	24,3±1,3*	46,8±2,4*
СПОП, усл. ед.	38,3±1,8	37,0±1,5	46,6±2,1*	23,6±1,1*
Доля клеток с низким содержанием фермента, %	10,1±0,6*	14,2±0,6	2,0±0,1*	40,1±2,5*
Доля клеток со средним содержанием фермента,%	32,1±1,7	34,7±1,7	24,9±1,4*	3,1±0,2*
Доля клеток с высоким содержанием фермента,%	57,8±2,8*	51,1±2,4	73,1±3,5*	56,8±2,9*

Таблица 14. Количественные показатели NO-, CO- и H₂S-продуцирующих нейронов, выявленных в МЯЗ

*Различия достоверны (p<0,05) по сравнению с соответствующими показателями NO-нейронов.



Рисунок 87. Кривая распределения CBS-иммунопозитивных нейронов 3 группы по их площади. Обозначения те же, что и на рисунке 8.

Средние по размеру CBS-позитивные клетки встречаются в MЯЗ в минимальном количестве: кривая площади нейронов 220-320 мкм² снижается до 3-4 %. Клетки крупнее 500 мкм² практически не определяются. Доля мелких и крупных MЯЗ CBS-нейронов составляет 43,2 % и 46,8 % соответственно. Средняя площадь профильного поля H_2S -позитивных нейронов в MЯЗ составляет 361,1 мкм².

4.4. Локальные особенности структурной организации межъядерных нейронов

При сравнительном исследовании структурной организации трех групп межъядерных нейронов в вазомоторной области крыс установлены определенные отличия. Так, в МЯ1 выявляется относительно большое число крупных нейронов, в том числе «гигантских». Тогда как в nNOS- и HO-2-позитивных нейронах МЯ2 и МЯ3 существенно выше концентрация и СПОП. В отношении клеток, содержащих CBS, локальные отличия количественных показателей выражены слабее, особенно концентрации клеток.

На рисунке 88а-в представлены отличия количественного распределения NO-, H₂S- и CO-нейронов в MЯ1-MЯ3. При сравнении средних значений площади нейронов в MЯ1-MЯ3 установлены различия ее величины среди клеток различной медиаторной принадлежности. В MЯ2 наблюдается минимальный уровень этого показателя ввиду большого количества выявленных здесь мелких клеток. Среди NO- и CO-нейронов отчетливо прослеживаются локальные отличия интенсивности реакции: в MЯ2 и MЯ3 они существенно выше, чем в MЯ1. Выраженных отличий значений СПОП между клеточными MЯ группами среди H₂S-нейронов не наблюдается.

Популяции межъядерных интернейронов сильно отличаются долей мелких и крупных клеток. Это касается всех исследуемых газотрансмиттеров. Самая большая доля мелких клеток определяется в МЯ2. Доля крупных нейронов для NO- и CO-клеток практически одинаковая, для H₂S-нейронов самая большая доля определяется в МЯ1.

Популяции межъядерных интернейронов сильно отличаются между собой долей мелких и крупных клеток. Наиболее высока доля мелких клеток в МЯ2. Содержание крупных NO- и CO-нейронов здесь практически не отличается, хотя доля H₂S-нейронов наибольшая в МЯ1.

Плотность расположения клеток в МЯ различной медиаторной принадлежности во всех клеточных группах невелика и колеблется от 3,4 до 12,9 нейронов/0,01 мм². Наиболее высокие значения концентрации установлены среди nNOS-позитивных интернейронов, для СО и CBS-нейронов они существенно ниже. Концентрация СО-нейронов в МЯ1 значительно меньше, чем в МЯ2 и МЯ3, между которыми существенных различий нет.

При сравнении межъядерных нейронов различной медиаторной принадлежности прослеживается прямая зависимость между долей мелких и крупных нейронов и СПОП. Для NO- и CO-нейронов большое количество мелких нейронов в ядре приводит к увеличению СПОП, т.к. nNOS и HO-2 откладывается в основном в мелких и средних клетках. Количество крупных нейронов, наоборот, способствует сокращению значений СПОП. Для CBS характерна другая зависимость: при увеличении доли крупных клеток возрастает и СПОП.

Для исследования взаимосвязи между количественными характеристиками межъядерных нейронов и величиной СПОП для NO-, CO- и H₂S-нейронов была построена математическая модель методом множественной регрессии.



Рисунок 88. Количественные показателей NO- (a), CO- (б) и H₂S-нейронов (в) в MЯ1-MЯ3. Площадь выражена в мкм²/10, доля – в %, концентрация – в количестве нейронов на 0,01 мм², СПОП – в усл. ед. Данные представлены: $x = \bar{x} \pm ts$ (глава 2). Достоверность различий по сравнению с соответствующими показателями MЯ1 *p<0,05.

NO-нейроны. В качестве зависимой переменной выбиралась величина СПОП, независимыми переменными (факторами) являлись доля мелких клеток в ядре (D_m), и концентрация клеток (C). В качестве модели выбиралась линейная множественная регрессия вида:

$$y = B + B_1 x_1 + B_2 x_2 \tag{13}$$

или: СПОП =
$$B + B_1 D_m + B_2 C$$
 (14)

Результаты множественной регрессии для NO-нейронов в численном виде представлены в таблице 15.

Ошибка В В Ошибка В t β р -10,1646 2,039330 -4,98429 0,002491 Свободный член 0,045282 0,062234 0,094084 0,72760 0,494262 Концентрация 0,0685 Доля мелких 0,958463 0,062234 0,6975 0,045292 15,40086 0,000005

Таблица 15. Результаты множественной регрессии для межъядерных NO-нейронов

В первом столбце таблицы 15 приведены значения коэффициентов β — стандартизованные коэффициенты регрессионного уравнения, во втором — стандартные ошибки β, в третьем – *B* – точечные оценки параметров модели. Далее, стандартные ошибки для коэффициентов модели *B*, значения статистик t-критерия.

Коэффициент множественной корреляции R=0,9964; коэффициент детерминации $R^2=0,9928$; скорректированный на потерю степеней свободы коэффициент множественной детерминации 0,9904; критерий Фишера F=413,0568; уровень значимости модели p<0,0005.

Из данных, приведенных в таблице видно, что линейная регрессионная модель имеет вид:

$$C\Pi O\Pi = -10,1646 + 0,6975D_m + 0,0685C \tag{15}$$

Коэффициент регрессии значим только при переменной «доля мелких нейронов».

Множественный коэффициент корреляции построенной модели R=0,9964 очень высок, что говорит о сильной связи между исследуемыми факторами.

Коэффициент детерминации R^2 =0,9928, что говорит о том, что 99% вариации переменной СПОП объясняется вариацией независимых переменных, а на 1% приходятся на долю других неучтенных факторов.

Расчетное значение критерия Фишера F=413,06 превышает табличное значение (5,14) критерия, что говорит об адекватности модели экспериментальным данным. Построенная регрессия значима при уровне значимости p=0,0005.

Самая большая положительная корреляционная связь прослеживается между долей мелких NO-нейронов и СПОП (r=0,99607). Довольно сильная положительная корреляция наблюдается между долей мелких NO-нейронов и концентрацией (r=0,83049), а также между концентрацией и СПОП (r=0,84128) (таблица 16).

Таблица 16. Коэффициенты корреляции между количественными характеристиками межъядерных NO-нейронов

	Доля мелких	Концентрация	СПОП
Доля мелких	1,00000	0,83049	0,84128
Концентрация	0,83049	1,00000	0,99607
СПОП	0,84128	0,99607	1,00000

Результаты измерений критерия Дарбина-Уотсона (2,336417, r=-0,288715) показывают, что данной регрессионняя модель заходит в «область неопределенности» (рисунок 2, глава 2). Используя таблицу критериев Дарбина - Уотсона для степеней свободы k=2 и n=9, находим две величины, по которым можно сделать вывод об автокорреляции остатков (d₁=0,63, d_u=1,7). Полученные значения говорят о том, что нельзя утверждать, что в модели отсутствует автокорреляция, но и нельзя подтвердить присутствие автокорреляции.

Итак, регрессионная модель, СПОП = $-10,16+0,70D_m + 0,07C$ (15), построенная нами, отражает связь между СПОП nNOS, концентрацией NOнейронов и долей мелких клеток, имеет следующие недостатки: невозможно утверждать отсутствие автокорреляции, не все коэффициенты регрессии статистически значимы. Перечисленные недостатки могут привести к ненадежности оценок коэффициентов регрессии.

СО-нейроны. В качестве зависимой переменной выбиралась величина СПОП. Независимыми переменными (факторами) являлись доля мелких клеток в ядре (D_m), и концентрация клеток(С). Результаты множественной регрессии для СО-нейронов в численном виде представлены в таблице 17.

Таблица 17. Результаты множественной регрессии для межъядерных СО-нейронов

	β	Ошибки β	В	Ошибка В	t	р
Свободный член			-27,3772	3,458873	-7,91508	0,000216
Концентрация	0,235333	0,068961	0,9863	0,289005	3,411258	0,014273
Доля мелких	0,778104	0,68961	0,87140	0,0077459	11,28332	0,000029

Обозначения в таблице повторяют приведенные для NO-нейронов. Коэффициент множественной корреляции R=0,9976; коэффициент детерминации R^2 =0,9953; скорректированный на потерю степеней свободы коэффициент множественной детерминации 0,9937; критерий Фишера *F*=630,0199; уровень значимости модели p<0,0005.

Из данных таблицы 17 видно, что линейная регрессионная модель имеет вид:

$$C\Pi O\Pi = -27,3772 + 0,8714D_m + 0,9863C \tag{16}$$

При этом коэффициенты регрессии будут значимы при всех переменных. В данном случае существенно влияние всех факторов.

Расчетное значение критерия Фишера F=630,02 превышает табличное (5,14) что говорит об адекватности модели экспериментальным данным. Построенная регрессия достоверна при уровне значимости p=0,0005.

Самая большая положительная корреляционная связь прослеживается между долей мелких СО-нейронов и средним показателем оптической плотности (r=0,99301). Также сильная положительная корреляция наблюдается между долей мелких СО-нейронов и концентрацией (r=0,91319) и между концентрацией и СПОП (r=0,94589) (таблица 18).

	Доля мелких	Концентрация	СПОП
Доля мелких	1,00000	0,91319	0,94589
Концентрация	0,91319	1,00000	0,99301
СПОП	0,94589	0,99301	1,00000

Таблица 18. Коэффициенты корреляции между количественными характеристиками HO-2иммунопозитивных межъядерных нейронов

Расчетное значение критерия Дарбина-Уотсона (1,896283, r=-0,009964) попадает в область принятия гипотезы (рисунок 2, глава 2), из чего можно сделать вывод о незначимости коэффициента автокорреляции.

Таким образом, построенная регрессионная модель, отражающая связь между СПОП НО-2-позитивных нейронов, концентрацией и долей мелких клеток может применяться для практических расчетов, поскольку все коэффициенты регрессии являются значимыми, автокорреляция отсутствует.

 H_2 *S-нейроны*. В качестве зависимой переменной выбиралась величина СПОП, независимыми переменными (факторами) являлись доля крупных клеток в ядре (D_к), и концентрация клеток (C).

Результаты множественной регрессии в численном виде представлены в таблице 19.

Таблица 19. Результаты множественной регрессии для CBS-иммунопозитивных межъядерных нейронов

	β	Ошибка β	В	Ошибка В	t	р
Свободный член			22,78084	5,827996	3,90886	0,007903
Концентрация	0,529452	0,153001	2,60629	0,753167	3,46044	0,013460
Доля крупных	-0,476172	0,153001	-0,22332	0,071755	-3,11221	0,020790

Обозначения в таблице повторяют приведенные для NO-нейронов. Коэффициент множественной корреляции R=0,9933; коэффициент детерминации R^2 =0,9866; скорректированный на потерю степеней свободы коэффициент множественной детерминации 0,9921; критерий Фишера *F*=220,3993; уровень значимости модели p<0,0005.

Из данных, приведенных в таблице 19 видно, что линейная регрессионная

модель имеет вид: СПОП = $22,78 - 0,22D_k + 2,61C(17)$ и существенно влияние всех факторов.

Самая большая положительная корреляционная связь прослеживается между концентрацией H₂S-нейронов и СПОП (r=0,98229). Также сильная отрицательная корреляция наблюдается между долей крупных H₂S-нейронов и СПОП (r=-0,97968), концентрацией и долей крупных нейронов (-0,95099) (таблица 20).

Таблица 20. Коэффициенты корреляции между количественными характеристиками межъядерных H₂S-нейронов

	Доля мелких	Концентрация	СПОП
Доля крупных	1,00000	-0,95099	0,98229
Концентрация	-0,95099	1,00000	-0,97968
СПОП	0,98229	-0,97968	1,00000

Наблюдаемое значение критерия Дарбина-Уотсона равно 1,913916. Это значение попадает в область принятия гипотезы (рисунок 2, глава 2), из чего можно сделать вывод о незначимости коэффициента автокорреляции.

Построенная регрессионная модель, отражающая связь между СПОП CBSпозитивных нейронов, концентрацией и долей крупных клеток, может применяться для практических расчетов, поскольку все коэффициенты регрессии являются значимыми, автокорреляция отсутствует.

Построенные модели показывают связь между СПОП и некоторыми характеристиками межъядерных нейронов различной медиаторной принадлежности. Что касается NO-нейронов, то уравнение показывает, что с увеличением доли мелких клеток возрастает их средний показатель оптической плотности. СПОП СО-нейронов зависит от доли мелких клеток, но здесь значимым является также коэффициент перед переменной «концентрация». СПОП H₂S-позитивных клеток зависит от доли крупных клеток и концентрации H₂S-нейронов. Причем, при увеличении D_{κ} СПОП уменьшается, а при увеличении концентрации, наоборот, возрастает.

Глава 5

ТОПОХИМИЯ NO-, СО- и H₂S-ПРОДУЦИРУЮЩИХ НЕЙРОНОВ В ВАЗОМОТОРНЫХ ЯДРАХ ПРОДОЛГОВАТОГО МОЗГА ПРИ РЕНОВАСКУЛЯРНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

При повышении артериального давления у крыс изменяются количественные характеристики нейронов (интенсивность продукта реакции, количество иммунопозитивных нейронов, доля мелких и крупных клеток, площадь нейронов), пространственное положение нейронов, содержащих nNOS, HO-2 и H₂S. Наиболее ранние и выраженные изменения количественных показателей при РВГ наблюдаются в ядре солитарного тракта.

5.1. Ядро солитарного тракта

NO-синтаза (nNOS). На рисунке 89 показаны преобразования значений СПОП, доли NO-иммунопозитивных нейронов, средней площади профильного поля и концентрации этих клеток от времени развития реноваскулярной гипертензии (РВГ).

В ЯСТ для до 4-ой недели достоверных изменений оптической плотности nNOS-позитивных нейронов не наблюдается (p>0,05), несмотря на то, что значимое повышение уровня АД регистрируется уже на 2-ой неделе после операции (p<0,05). В период между 4-ой и 6-ой неделями определяется резкий спад оптической плотности nNOS в клетках за счет повышения доли нейронов с низкой степенью интенсивности реакции и уменьшению доли нейронов с высоким показателем СПОП (p<0,05). С 4 до 8 недели значения СПОП снижаются почти в 2 раза (p<0,05), но затем стабилизируется на новом минимальном уровне.



Рисунок. 89. Изменение количественных показателей nNOS-иммунопозитивных нейронов в зависимости от времени развития PBГ. • доля, • – СПОП, • – площадь, • – концентрация клеток. Площадь выражена в мкм²/10, доля – в %, концентрация – в количестве нейронов на 0,01 мм², СПОП – в усл. ед. Данные представлены: $x = \overline{x} \pm ts$ (глава 2). Различия достоверны по сравнению с контрольной группой крыс (p<0,05) начиная с 6 недели PBГ.

Сокращается также доля нейронов, содержащих NO-синтазу (p<0,05). Однако уменьшение данного показателя происходит не так резко и на 10 неделе он устанавливается на новом более низком уровне. При повышении АД уменьшается (p<0,05) концентрация клеток. Причем, сокращение концентрации и доли клеток происходит в большей степени в тех частях ядра, где плотность клеток наибольшая (рисунок 90), в результате чего нейроны после 10 недели начинают располагаться в ядре все более равномерно.

При увеличении времени развития РВГ возрастает и доля крупных клеток в ядре, а мелких клеток, наоборот, уменьшается, что ведет к увеличению средней площади профильного поля NO-позитивных нейронов (p<0,05).



Рисунок 90. Изменение доли (а) и концентрации (б) nNOS-иммунопозитивных нейронов в разных частях ядра солитарного тракта. \equiv – ростральная, \equiv – центральная, = – каудальная. Данные представлены: $x = \bar{x} \pm ts$ (глава 2). *Различия достоверны по сравнению с центральной частью ядра (p<0,05).

Гемоксигеназа-2 (НО-2). НО-2-нейроны, выявляемые в ЯСТ в различные периоды РВГ, также отличаются значениями количественных параметров. Происходят изменения средней площади профильного поля СО-клеток, их концентрации, интенсивности реакции, а также доли этих клеток (рисунок 91).



Рисунок 91. Изменение количественных показателей НО-2-иммунопозитивных нейронов ядра солитарного тракта в зависимости от времени развития РВГ. Обозначения те же, что на рисунке 89. Различия достоверны по сравнению с контрольной группой крыс (p<0,05) начиная с 10 недели РВГ.

Изменение количественных показателей НО-2-позитивных нейронов начинаются несколько позже, чем в NO-нейронах и выражены не так сильно. Начиная с 8 недели, среди СО-нейронов все чаще выявляются клетки с низкой интенсивностью реакции. Средний показатель оптической плотности в таких клетках не превышает 20 усл. ед. Клетки с высокой концентрацией фермента наоборот встречаются все реже. Все это приводит к тому, что СПОП НО-2 в ЯСТ уменьшается по мере развития РВГ. Сокращение СПОП особенно заметно (в 2,1 раза) в период с 8 по 14 неделю (p<0,05), после чего наступает период стабилизации его значений (p>0,05). Существенно меняется соотношение между содержанием мелких, средних и крупных нейронов: доля мелких клеток уменьшается, крупных – увеличивается, что отражается на величине СПОП в этих нейронах (р<0,05).

Помимо СПОП на повышение АД реагируют также такие количественные показатели, как доля СО-позитивных клеток и их концентрация. Доля СОнейронов на 16 неделе РВГ уменьшается в зависимости от участка ядра в 1,1-1,5 раза, концентрация – в 1,1-1,8 раз (рисунок 92).



Рисунок 92. Изменение доли (а) и концентрации (б) НО-2-иммунопозитивных нейронов в разных частях ядра солитарного тракта. Обозначения те же, что на рисунке 90.

Цистатионин-β-синтаза (CBS). При повышении АД доля CBS-нейронов, их концентрация, средняя площадь профильного поля клеток и СПОП изменяются (рисунок 93). Достоверные изменения количественных характеристик CBS-нейронов также как и CO-нейронов определяются после 8 недели PBГ (p<0,05). До этого периода значения количественных показателей остаются в пределах контрольных величин (p>0,05). Раньше других параметров наблюдается снижение СПОП, который в период между 10 по 12 неделями сокращается более чем на треть (p<0,05). Это объясняется тем, что при увеличении АД доля крупных CBS-нейронов с высоким содержанием фермента уменьшается, а мелких с низкой его концентрацией – возрастает. В этих клетках значения СПОП в ядре не превышает 20 усл. ед. Закономерно уменьшается средняя площадь профильного поля CBS-клеток (p<0,05).



Рисунок 93. Изменение количественных показателей CBS-иммунопозитивных нейронов ядра солитарного тракта в зависимости от времени развития РВГ. Обозначения те же, что на рисунке 89. Различия достоверны по сравнению с контрольной группой крыс (p<0,05) начиная с 10 недели РВГ для СПОП и с 12 недели для остальных показателей.

Изменение доли и концентрации H_2S -нейронов также начинается позднее, чем NO-нейронов. Но сокращение этих параметров для H_2S -нейронов выражено не так значительно, как для CO- и NO-нейронов. Причем уменьшение доли иммунопозитивных клеток наиболее существенно в тех частях ядра, где их плотность наибольшая (рисунок 94). В результате изменений количественных показателей происходит изменение пространственных отношений между NO-, CO- и H_2S -нейронами в ядре.



Рисунок 94. Изменение доли (а) и концентрации (б) CBS-иммунопозитивных-нейронов в разных частях ядра солитарного тракта. Обозначения те же, что на рисунке 90.

5.2. Ретикулярное гигантоклеточное ядро

NO-синтаза (nNOS). В процессе развития РВГ в РГЯ наблюдаются последовательные изменения количественных показателей нейронов: уменьшение интенсивности реакции nNOS-позитивных нейронов, их числа и размеров. На представлена зависимость между значениями СПОП, рисунке 95 долей иммунопозитивных нейронов, концентрацией, средней площадью профильного поля клеток и временным промежутком в развитии РВГ. Нетрудно заметить, что в РГЯ изменение исследуемых параметров при повышении АД, по сравнению с ЯСТ, начинаются на 2-4 недели позже и выражены в меньшей степени (рисунок 89, 95). При РВГ до 6-8 недели СПОП и доля NO-нейронов остаются в пределах контрольных значений. Наиболее выраженное уменьшение значений СПОП и доли нейронов происходит с 8 по 12 неделю РВГ, после чего эти параметры устанавливаются на новом, более низком уровне. Параллельно количество клеток с высоким и умеренным уровнем содержания фермента сокращается в среднем в 2,1 раза. Поскольку доля клеток с низким содержанием фермента, наоборот, возрастает, то и значения СПОП nNOS-позитивных нейронов также уменьшается.



Рисунок 95. Изменение количественных показателей nNOS-иммунопозитивных в ретикулярном гигантоклеточном ядре в зависимости от времени развития PBГ. Обозначения те же, что на рисунке 89. Различия достоверны по сравнению с контрольной группой крыс (p<0,05) начиная с 10 недели PBГ для всех показателей, кроме средней площади нейронов.

Изменение доли NO-нейронов и их концентрации при PBГ имеет локальные особенности (рисунок 96). В отличие от нормотензивных, где плотность клеток в различных частях ядра различна, при PBГ происходит выравнивание концентрации и доли клеток и распределение их более равномерно по ядру.



Рисунок 96. Изменение доли (а) и концентрации (б) nNOS-иммунопозитивных нейронов в разных частях ретикулярного гигантоклеточного ядра. Обозначения те же, что на рисунке 90.

Гемоксигеназа-2 (НО-2). Достоверные изменения количественных параметров, вычисленные среди НО-2-позитивных нейронов, также начинаются

между 8-10 неделями РВГ, после чего практически не меняются, оставаясь на своем минимальном уровне (рисунок 97). Однако выражены эти изменения в меньшей степени, чем у NO-нейронов и у HO-2-позитивных нейронов в ЯСТ.

При развитии РВГ увеличивается (в 1,2-1,6 раза) доля клеток с низкой интенсивностью реакции, а клетки с высоким и умеренным содержанием фермента встречаются все реже, что ведет к уменьшению значений СПОП среди НО-2-позитивных нейронов. Повышение артериального давления у крыс сопровождается также снижением содержания мелких клеток и увеличением крупных, в результате чего средняя площадь профильного поля СО-нейронов возрастает в 1,3-1,8 раза (рисунок 97).



Рисунок 97. Изменение количественных показателей НО-2-иммунопозитивных нейронов в ретикулярном гигантоклеточном ядре в зависимости от времени развития РВГ. Обозначения те же, что на рисунке 89. Различия достоверны по сравнению с контрольной группой крыс (p<0,05) начиная с 12 недели РВГ для площади нейронов и с 10 недели – для остальных показателей.

На 16 неделе РВГ особенно существенно сокращаются значения доли иммунопозитивных клеток и их концентрация. При этом по мере развития РВГ происходит выравнивание этих показателей в разных частях ядра. Так, например, если у нормотензивных крыс максимальное значение доли и концентрации СОнейронов наблюдается в центральной части ядра, то спустя 16 недель величина этих показателей в ростральной, центральной и каудальной части ядра практически не отличается (рисунок 98).



Рисунок 98. Изменение доли (а) и концентрации (б) НО-2-иммунопозитивных нейронов в разных частях ретикулярного гигантоклеточного ядра. Обозначения те же, что на рисунок 90.

Цистатионин-β-синтаза (CBS). В преобразованиях количественных показателей CBS-позитивных нейронов при развитии PBГ также прослеживаются три периода: 1-й – характеризуется минимальными изменениями исследуемых показателей и продолжается первые 6-8 недель, несмотря на стойкое повышение АД. 2-й – сопровождается выраженным снижением большинства показателей и характерен для 10-14 недели PBГ. 3-й – начинается с 14 недели PBГ, когда значения показателей устанавливаются на новом минимальном для данного газотрансмиттера уровне (рисунок 99).

При этом доля нейронов и их концентрация уменьшаются значительнее в тех частях ядра, где у нормотензивных крыс выявлено наибольшее количество нейронов. Так, в норме большинство H₂S-нейронов локализуются в центральной части ядра. В ростральной и каудальной части ядра эти цифры значимо ниже. Однако спустя 16 после операции доля и концентрация нейронов в различных частях ядра практически не отличается (рисунок 100).



Рисунок 99. Изменение количественных показателей CBS-иммунопозитивных нейронов в ретикулярном гигантоклеточном ядре в зависимости от времени развития PBГ. Обозначения те же, что на рисунке 89. Различия достоверны по сравнению с контрольной группой крыс (p<0,05) начиная с 10 недели PBГ для СПОП и с 12 недели – для остальных показателей.



Рисунок 100. Изменение доли (а) и концентрации (б) CBS-иммунопозитивных нейронов в разных частях ретикулярного гигантоклеточного. Обозначения те же, что на рисунке 90.

5.3. Ретикулярное мелкоклеточное ядро

NO-синтаза (*nNOS*). В РМЯ изменения СПОП в nNOS-позитивных нейронах опережают другие показатели. Между 4-8 неделями величина этого показателя снижается особенно существенно, составляя 38-40 % от его значений у контрольных животных. Уменьшение оптической плотности происходит из-за уменьшения доли клеток с высоким СПОП и увеличением с низким (рисунок 101).



Рисунок 101. Изменение количественных показателей nNOS-иммунопозитивных нейронов в ретикулярном мелкоклеточном ядре в зависимости от времени развития РВГ. Обозначения те же, что на рисунке 89. Различия достоверны по сравнению с контрольной группой крыс (p<0,05) начиная с 6 недели РВГ для СПОП и с 8 недели – для остальных показателей.

На 8 неделе развития РВГ отмечено достоверное изменение средней площади профильного поля NO-нейронов, которая на 12 неделе РВГ увеличивается в 1,5 раза за счет почти двукратного увеличения доли крупных клеток. Изменяется также доля nNOS-нейронов и их концентрация, причем в тех частях ядра, где локализуются наибольшее количество нейронов, наблюдается более выраженное их сокращение (рисунок 102).



Рисунок 102. Изменение доли (а) и концентрации (б) nNOS-иммунопозитивных нейронов в разных частях ретикулярного мелкоклеточного ядра. Обозначения те же, что на рисунке 90.

Гемоксигеназа-2 (НО-2). Достоверные изменения количественных показателей НО-2-позитивных нейронов в РМЯ определяются позже, чем NOнейронов (рисунок 103). Для СПОП такие изменения наступают раньше, чем для других показателей, на 6 неделе РВГ, тогда как для большинства других параметров – после 8-10 недели РВГ. В это же время наиболее существенно меняется средняя площадь профильного поля СО-нейронов. Значение этого показателя увеличивается в 1,3 раза за счет возросшего числа крупных и средних клеток.

Доля СО-нейронов и концентрация изменяются в РМЯ особенно существенно между 10-12 неделями РВГ. При этом величина показателей уменьшаются значительнее в тех частях ядра, где у контрольных крыс выявлено наибольшее количество нейронов. В результате этих процессов локальные различия указанных параметров в РМЯ сглаживаются (рисунок 104).



Рисунок 103. Изменение количественных показателей НО-2-иммунопозитивных нейронов в ретикулярном мелкоклеточном ядре в зависимости от времени развития РВГ. Обозначения те же, что на рисунок 89. Различия достоверны по сравнению с контрольной группой крыс (p<0,05) начиная с 8 недели РВГ для СПОП и с 10 недели – для остальных показателей.



Рисунок 104. Изменение доли (а) и концентрации (б) НО-2-иммунопозитивных нейронов в разных частях ретикулярного мелкоклеточного ядра. Обозначения те же, что на рисунке 90.
Цистатионин-*β***-синтаза (CBS).** При РВГ доля CBS-позитивных клеток,

их концентрация, СПОП и средняя площадь изменяются (рисунок 105).



Рисунок 105. Изменение количественных показателей CBS-иммунопозитивных нейронов в ретикулярном мелкоклеточном ядре в зависимости от времени развития РВГ. Обозначения те же, что на рисунке 89. Различия достоверны по сравнению с контрольной группой крыс (p<0,05) начиная с 10 недели РВГ для СПОП и с 12 недели – для остальных показателей.

Раньше других изменяется средний показатель оптической плотности фермента. Между 8 и 10 неделями наблюдается резкое сокращение значений этого параметра. За 16 недель РВГ СПОП уменьшается в 1,6 раз. Изменение СПОП происходит, в основном, за счет снижения доли клеток с высокой интенсивностью реакции, и увеличения – с низкой (p<0,05). Достоверное сокращение других показателей определяется между 10 и 12 неделями развития РВГ. Средняя площадь профильного поля клеток уменьшается за это время почти вдвое. На изменение площади клеток влияет изменение соотношения в ядре количества мелких, средних и крупных клеток.

Доля мелких и средних клеток за 16 недель увеличивается, крупных – сокращается, что ведет к уменьшению средней площади профильного поля СОнейронов в 2,1 раз (p<0,05). Доля CBS-нейронов уменьшается в 1,5 раз, концентрация в 1,8 раз (рисунок 105). Причем снижение величины этих показателей особенно выражено в тех частях ядра, где плотность клеток наибольшая (рисунок 106).



Рисунок 106. Изменение доли (а) и концентрации (б) CBS-иммунопозитивных нейронов в разных частях ретикулярного мелкоклеточного ядра. Обозначения те же, что на рисунке 90.

5.4. Ретикулярное латеральное ядро

NO-синтаза (nNOS). В РЛЯ до 4 недели РВГ достоверных изменений исследуемых показателей не наблюдается. Однако уже на 6 неделе отмечено существенное снижение доли (на 26,7 %) и СПОП (на 32,4 %) nNOS-позитивных нейронов (рисунок 107).

Преобразования величины СПОП происходят в РЛЯ в основном за счет уменьшения доли нейронов с высокой и умеренной интенсивностью реакции и соответствующим увеличением – с низкой. При повышении АД изменяется соотношение между долей мелких, средних и крупных клеток, что приводит к изменению средней площади профильного поля NO-позитивных нейронов, а поскольку размеры клеток связаны с содержанием в них фермента, то изменение указанного соотношения также оказывает влияние на величину СПОП. Начиная с 6 недели гипертензии, определяется увеличение средней площади, но снижение концентрации nNOS-позитивных нейронов. На 10 неделе происходит стабилизация величины показателей на новом уровне.



Рисунок 107. Изменение количественных показателей nNOS-иммунопозитивных нейронов в ретикулярном латеральном ядре в зависимости от времени развития PBГ. Обозначения те же, что на рисунке 89. Различия достоверны по сравнению с контрольной группой крыс (p<0,05) начиная с 8 недели PBГ для площади нейронов и с 6 недели – для остальных показателей.

На рисунке 108 представлены значения доли (а) и концентрации (б) nNOSпозитивных нейронов на 16 неделе РВГ в разных частях ядра. Как видно, сокращение величины показателей в большей степени выражено в тех частях ядра, где плотность нейронов максимальна, что приводит к перераспределению клеток в разных частях ядра.



Рисунок 108. Изменение доли (а) и концентрации (б) nNOS-иммунопозитивных нейронов в разных частях ретикулярного латерального ядра. Обозначения те же, что на рисунке 90.

Гемоксигеназа-2 (НО-2). В РЛЯ в процессе развития РВГ все основные количественные показатели СО-нейронов (доля, концентрация, СПОП, средняя площадь профильного поля клеток) изменяется сходным образом с NO-нейронами. Однако значимые изменения этих показателей среди HO-2-позитивных нейронов в РЛЯ определяются на 2-4 недели позднее (рис. 109).



Рисунок 109. Изменение количественных показателей НО-2-иммунопозитивных нейронов в ретикулярном латеральном ядре в зависимости от времени развития РВГ. Обозначения те же, что на рисунке 89. Различия достоверны по сравнению с контрольной группой крыс (p<0,05) начиная с 10 недели РВГ для площади нейронов и с 8 недели – для остальных показателей.

Для СПОП такие преобразования наступают раньше, чем для других показателей, но лишь между 6-8 неделями РВГ, они приобретают значимый характер, тогда как для большинства других параметров – после 8-10 недели РВГ. В это время наиболее существенно меняется средняя площадь профильного поля СО-нейронов. Значение этого показателя увеличивается в 1,5-1,8 раз за счет возросшего числа крупных и средних клеток.

Между 6 и 8 неделями наблюдается спад уровня интенсивности реакции в клетках. Между 10 и 14 неделями для НО-2-иммунопозитивных нейронов наступает прекращение изменение СПОП и установка его на уровне 47 % от величины данного показателя, установленного у контрольных крыс. Уменьшение количества иммунопозитивных клеток происходит к 6-8 недели. Причем особенно выражено сокращение количества клеток с высокой интенсивностью реакции, а увеличение – с низкой, что приводит к уменьшению величины СПОП в среднем в 2,3 раза.

При гипертензии в РЛЯ уменьшается доля и концентрация СО-клеток, причем особенно значительно в тех частях ядра, где их плотность наибольшая (рисунок 110). В результате величина этих показателей в разных частях ядра выравнивается.



Рисунок 110. Изменение доли (а) и концентрации (б) НО-2-иммунопозитивных нейронов в разных частях ретикулярного латерального ядра. Обозначения те же, что на рисунке 90.

Цистатионин-β-синтаза (CBS). Количественные характеристики CBSпозитивных нейронов в РЛЯ изменяются в зависимости от времени развития PBГ. В отличие от NO-и CO-нейронов, реакция CBS-позитивных клеток проявляется на 2-4 недели позднее и выражена в меньшей степени (рисунок 111).



Рисунок 111. Изменение количественных показателей CBS-иммунопозитивных нейронов в ретикулярном латеральном ядре в зависимости от времени развития РВГ. Обозначения те же, что на рисунок 89. Различия достоверны по сравнению с контрольной группой крыс (p<0,05) начиная с 10 недели РВГ СПОП и с 12 недели – для доли и концентрации нейронов.

Наиболее выраженная реакция на гипертензию наблюдается со стороны СПОП фермента. Самый значительный спад значений этого параметра наблюдается между 8 и 14 неделями после операции. В течение 16 недель РВГ СПОП уменьшается в 1,7-2,2 раза. Долее значения СПОП стабилизируются примерно на уровне 59 % от контрольных значений. Это связано с выраженным сокращением доли клеток с высокой интенсивностью реакции и увеличением – с высоким. Прирост доли клеток, имеющих низкую концентрацию фермента, составил почти 40 %. За счет снижения доли крупных CBS-нейронов и увеличения мелких в 1,3 раза сокращается средняя площадь профильного поля CBS-нейронов.

Повышение АД в РЛЯ сопровождается уменьшением доли и концентрации H₂S нейронов. Однако эти изменения выражены не так сильно, как в случае с NO

и СО-нейронами. За 16 недель РВГ доля и концентрация H₂S-нейронов в РЛЯ уменьшается в 1,4 раза, причем особенно существенно в каудальной части ядра, где выявляется наибольшее количество клеток (рисунок 112).



Рисунок 112. Изменение доли (а) и концентрации (б) CBS-иммунопозитивных-нейронов в разных частях ретикулярного латерального ядра. Обозначения те же, что на рисунке 90.

5.5. Математическое обоснование взаимосвязи величин некоторых количественных показателей, вычисленных в популяции внутриядерных NO-, CO- и H₂S-нейронов, и продолжительности РВГ

Как было отмечено выше, количественные характеристики иммунопозитивных нейронов в процессе развития РВГ постоянно меняются. При этом у каждого газотрансмиттера и ядра определяется своя динамика изменения увязанная с PBC. В исследованных параметров, продолжительностью чувствительных ядрах наиболее сильные изменения происходят среди NO- и COнейронов. В двигательном ядре РГЯ значительнее на изменение АД реагируют CBS-нейроны. Во всех исследованных ядрах в разные временные промежутки развития РВГ наблюдается уменьшение всех основных показателей. Вместе с тем, наблюдается снижение доли NO- и CO- мелких нейронов, но увеличение доли CBS-мелких нейронов, что приводит к приросту средней площади профильного поля NO- и CO-нервных клеток и уменьшению площади CBS-нейронов.

Математический анализ взаимосвязи значений количественных показателей внутриядерных NO, CO и H_2S -нейронов и продолжительности PBГ показал, что изменения каждого из изученных параметров с большой степенью точности (коэффициент аппроксимации 0,94< R^2 <1) описываются полиномом третьей степени. Так как изменение количественных характеристик для чувствительных и двигательных ядер сильно отличаются между собой, исследование проводилось для каждого газотрансмиттера и ядра раздельно.

На рисунке 113 в качестве примера приведен график зависимости СПОП от продолжительности РВГ для ЯСТ, а также линия тренда, аппроксимирующая данные в период падения показателя оптической плотности (с 4 по 16 неделю), а также уравнение регрессии и величина достоверности аппроксимации R².



Рисунок 113. Изменение СПОП в nNOS-иммунопозитивных нейронах ядра солитарного тракта в процессе развития РВГ. Различия достоверны по сравнению с контрольной группой крыс (p<0,05) с 6 недели РВГ.

В таблице 21 представлены уравнения аппроксимирующих функций и коэффициентов R² для NO, CO и H₂S-нейронов ядер ЯСТ и РГЯ.

Таблица 21. Уравнения регрессии и коэффициенты достоверности аппроксимации зависимостей количественных характеристик газотрансмиттерных нейронов в ядре солитарного тракта и ретикулярном гигантоклеточном ядре от времени развития РВГ

Тип	Исследуемый	ЯСТ		РГЯ	
нейронов	показатель	уравнение	R ²	уравнение	R ²
	СПОП	$y=-0,0039t^{3}+0,2053t^{2}-3,49t+23,428$	R ² =0,982	$y=-0,0179t^3+0,7345t^2-10,078t+61,583$	R ² =1
NO	Доля	y=0,0036t ³ +0,0028t ² -2,1824t+28,344	R ² =0,991	$y=-0,0002t^3+0,1326t^2-3,6036t+41,574$	R ² =0,984
	Концентрация	y=0,0017t ³ +0,0394t ² -2,0393t+22,869	R ² =0,968	$y=-0,0635t^3+2,7018t^2-38,089t+201,11$	R ² =1
	Площадь	y=0,0723t ³ +1,3953t ² +3,4118t+305,49	R ² =0,988	y=0,1063t ³ -5,0518t ² +78,893t+63,597	R ² =0,993
	СПОП	$y=-0,0273t^3+1,3189t^2-21,321t+141,08$	R ² =1	y=0,0052t ³ -0,1349t ² +0,6821t+8,545	R ² =0,882
CO	Доля	y=0,0056t ³ -0,1208t ² -0,0679t+15,68	R ² =0,998	y=0,0266t ³ 0,8411t ² +7,4929t-4,6505	R ² =0,985
	Концентрация	y=0,0088t ³ -0,2673t ² +2,204t-0,5159	R ² =0,979	y=0,0027t ³ -0,0704t ² +0,3552t+2,769	R ² =0,982
	Площадь	$y=-0,1566t^3+4,3447t^2-27,349t+338,16$	R ² =0,990	y=0,1938t ³ -8,3214t ² +118,44t-209,39	R ² =1
	СПОП	y=-0,0146t ³ +0,6871t ² -10,704t+66,131	R ² =1	y=0,0621t ³ -1,8092t ² +11,751t+51,67	R ² =0,982
	Доля	y=0,0047t ³ -0,1528t ² +1,3788t+0,4076	R ² =1	y=0,0637t ³ -2,2443t ² +24,528t-71,831	R ² =0,983
H_2S	Концентрация	y=0,0236t ³ -0,8101t ² +8,5234t-22,223	R ² =0,952	y=0,0562t ³ -1,9411t ² +20,636t-56,486	R ² =0,946
	Площадь	y=0,2955t ³ -7,4738t ² +29,314t+529,57	R ² =0,982	$y=1,9969t^3-69,55t^2+745,89t-2061,7$	R ² =0,981

Установлено, что для всех характеристик наиболее близкой к распределению функцией является полином 3 степени с соответствующими коэффициентами для каждого газотрансмиттера.

Полученные уравнения позволяют предсказывать значение количественных характеристик в те моменты времени, в которые измерения не были проведены.

Для установления взаимосвязи между исследуемыми характеристиками, а также выявления влияния количественных факторов (доли, площади, концентрации позитивных нейронов в ядре) на изменение СПОП был использован метод множественной линейной регрессии.

Исследование проводилось для NO, CO и H₂S-нейронов в ЯСТ и РГЯ отдельно. В качестве зависимой переменной выбиралась величина СПОП, независимыми переменными (факторами) являлись доля иммунопозитивных нейронов (D) в ядре, концентрация (C), площадь нейронов (S). В качестве модели выбиралась линейная множественная регрессия вида:

$$y = B + B_1 x_1 + B_2 x_2 + B_3 x_3 \tag{18}$$

или: СПОП =
$$B + B_1 D + B_2 S + B_3 C$$
 (19)

NO-нейроны ЯСТ. Результаты множественной регрессии в численном виде представлены в таблице 22.

Таблица 22. Результаты множественной регрессии. nNOS-иммунопозитивные нейроны ядра солитарного тракта при РВГ

	β	Ошибка β	В	Ошибка В	t	р
Свободный член			24,43983	7,389941	3,30718	0,003077
Доля нейронов	0,579142	0,178138	0,30471	0,093726	3,25109	0,003521
Площадь	-0,666385	0,230662	-0,04701	0,016272	-2,88901	0,008280
Концентрация	-0,453808	0,255592	-0,24117	0,135834	-1,77552	0,089048

Обозначения в таблице те же, что и в главе 5.

Коэффициент множественной корреляции R=0,7521; коэффициент детерминации R²=0,5657; скорректированный на потерю степеней свободы

коэффициент множественной детерминации 0,5091; критерий Фишера *F*=9,9863; уровень значимости модели p<0,0002.

Таблица 22 показывает, что линейная регрессионная модель для NOнейронов ЯСТ имеет вид:

$$C\Pi O\Pi = 24,43983 - 0,30471D - 0,4701S - 0,24117C$$
(20)

Коэффициенты уравнения показывают количественное воздействие каждого фактора на результативный показатель при неизменности других. В данном случае значимыми будут факторы «доля» и «площадь».

Проверка адекватности модели сводится к проверке нулевой гипотезы H_0 (аналогично в главе 5). Расчетное значение критерия Фишера F=9,99 превышает табличное (3,03) значение критерия для доверительной вероятности ρ =0,95 и числа степеней свободы v_1 =3 и v_2 =23, что говорит об адекватности модели экспериментальным данным.

Самая большая отрицательная корреляционная связь прослеживается между площадью и концентрацией нейронов в ядре (r=-0,803117). Средняя степень корреляции наблюдается между долей NO-нейронов и концентрацией этих клеток в ядре (r=0,636226), долей NO-нейронов и СПОП (r=0,636148), а также между площадью нейронов и СПОП (r=-0,602392). Связь между остальными переменными незначительна (таблица 23).

иммунопозитивных нейронов в ядре солитарного тракта при РВГ Лоля нейронов Плошаль Концентрация СПОП

Таблица 23. Корреляционная матрица взаимосвязи количественных характеристик nNOS-

	Доля нейронов І		Концентрация	СПОП
Доля нейронов	1,000000	-0,518816	0,636226	0,636148
Площадь	-0,518816	1,000000	-0,803117	-0,602392
Концентрация	0,636226	-0,803117	1,000000	0,449842
СПОП	0,636148	-0,602392	0,449842	1,000000

Вычисленное значение критерия Дарбина-Уотсона (1,6060, r=0,1297) для данной регрессионной модели заходит в «область неопределенности» (рисунок 2, глава 2), что говорит о том, что мы не можем утверждать, что в модели

отсутствует автокорреляция, но и не можем утверждать присутствие автокорреляции.

Построена регрессионная модель:

$$C\Pi O\Pi = 24,43983 + 0,30471D - 0,04701S - 0,24117C.$$
(20)

В ней отражена связь между СПОП, концентрацией NO-нейронов, долей этих клеток и их площадью. Но она имеет следующие недостатки: невозможно автокорреляции, не коэффициенты утверждать отсутствие все регрессии значимы. Перечисленные недостатки привести статистически могут К ненадежности оценок коэффициентов регрессии.

NO-нейроны РГЯ. Аналогичное исследование, проведенное для двигательного ядра, дает следующие результаты (таблица 24).

Таблица 24. Результаты множественной регрессии. nNOS-иммунопозитивные-нейроны ретикулярного гигантоклеточного ядра при РВГ

	β	Ошибка β	В	Ошибка В	t	р
Свободный член			38,14189	16,17627	2,35789	0,064921
Доля нейронов	1,569542	0,052213	1,74177	0,05794	30,06053	0,000001
Площадь	-0,384944	0,143943	-0,08128	0,03039	-2,67429	0,044121
Концентрация	-0,979971	0,171939	-0,61308	0,10757	-5,69954	0,002320

Коэффициент множественной корреляции R=1,000; коэффициент детерминации $R^2=0,999$; скорректированный на потерю степеней свободы коэффициент множественной детерминации 0,999; критерий Фишера F=2230,483; уровень значимости модели p<0,0001.

Полученная регрессионная модель имеет вид:

$$C\Pi O\Pi = 38,14189 + 1,74177D - 0,08128S - 0,61308C.$$
(21)

Все коэффициенты при независимых переменных являются значимыми. Расчетный критерий Фишера больше теоретического (9,01).

Корреляционная матрица (таблица 25) показывает наличие сильной связи между всеми переменными.

	Доля нейронов	Площадь	Концентрация	СПОП
Доля нейронов	1,000000	-0,950378	0,965489	0,989232
Площадь	-0,950378	1,000000	-0,995528	-0,901014
Концентрация	0,965489	-0,995528	1,000000	0,918627
СПОП	0,989232	-0,901014	0,918627	1,000000

Таблица 25. Корреляционная матрица взаимосвязи количественных характеристик nNOSиммунопозитивных нейронов в ретикулярном гигантоклеточном ядре при РВГ

Проведя анализ автокорреляции остатков с помощью критерия Дарбина-Уотсона можно сделать вывод об отсутствии автокорреляции.

Полученные результаты показывают, что регрессионная модель, описывающая изменение СПОП в зависимости от доли, концентрации и площади NO-нейронов, является адекватной, все коэффициенты регрессии являются Данная быть значимыми, автокорреляция отсутствует. модель может использована для вычисления среднего показателя оптической плотности фермента.

СО-нейроны ЯСТ. Результаты множественной регрессии для СО-нейронов представлены в таблице 26.

Таблица 26. Результаты множественной регрессии. НО-2-иммунопозитивные нейроны ядра солитарного тракта при РВГ

	β	Ошибка β	В	Ошибка В	t	р
Свободный член			-34,1954	25,57820	-1,33690	0,194330
Доля нейронов	0,945869	0,068148	3,6513	0,26307	13,87954	0,000000
Площадь	0,211266	0,156151	0,0762	0,05631	1,35256	0,189220
Концентрация	0,377233	0,142416	3,6365	1,37287	2,64881	0,014348

Коэффициент множественной корреляции R=0,9666; коэффициент детерминации R²=0,9343; скорректированный на потерю степеней свободы коэффициент множественной детерминации 0,9258; критерий Фишера F=109,094; уровень значимости модели p<0,0001.

Из таблицы 26 видно, что линейная регрессионная модель имеет вид:

$$C\Pi O\Pi = -34,1954 + 3,6513D + 0,0762S - 3,6365C$$
(22)

Коэффициенты уравнения являются значимыми при переменных «доля» и «концентрация». Расчетное значение критерия Фишера F=109,1 превышает табличное значение критерия, что говорит об адекватности модели экспериментальным данным.

Корреляционная матрица (таблица 27) показывает наличие сильной положительной связи между СПОП и долей СО-нейронов (r=0,944441) и сильной отрицательной связи между площадью и концентрацией (r=-0,906979).

Таблица 27. Корреляционная матрица взаимосвязи количественных характеристик

	Доля нейронов	Площадь	Концентрация	СПОП
Доля нейронов	1,000000	-0,474660	0,262043	0,944441
Площадь	-0,474660	1,000000	-0,906979	-0,579842
Концентрация	0,262043	-0,906979	1,000000	0,433478
СПОП	0,944441	-0,579842	0,433478	1,000000

НО-2-иммунопозитивных нейронов в ядре солитарного тракта при РВГ

Проведенный анализ автокорреляции остатков показывает, что критерий Дарбина-Уотсона (1,1295, r=0,4196) лежит в области неопределенности. Наличие автокорреляции не опровергнуто и не доказано.

СО-нейроны РГЯ. Анализ полученных результатов для СО-нейронов двигательного ядра, показывает (таблица 28), что построенная регрессионная модель является не очень удачной для описания изменений СПОП гемоксигеназы-2 в зависимости от концентрации, доли и площади СО-нейронов, так как коэффициенты регрессии не являются значимыми ни при каких переменных. Хотя коэффициент корреляции построенной модели очень высок (0,9942). Критерий Фишера (0,9814) также превосходит табличный, что, на первый взгляд, подтверждает адекватность модели. Уровень значимости модели р<0,0001.

Таблица 28. Результаты множественной регрессии. НО-2-иммунопозитивные нейроны ретикулярного гигантоклеточного ядра при РВГ

	β	Ошибка в	В	Ошибка В	t	р
Свободный член			6,398077	7,057506	0,90656	0,406205
Доля нейронов	0,975247	0,427166	5,970104	2,614954	2,28306	0,071265
Площадь	-0,385900	0,269336	-0,024050	0,016786	-1,43278	0,211357
Концентрация	-0,362831	0,508602	-0,643025	0,901366	-0,71339	0,507509

Корреляционная матрица показывает сильную связь между всеми переменными, входящими в регрессионную модель (таблица 29).

Таблица 29. Корреляционная матрица взаимосвязи количественных характеристик HO-2иммунопозитивных нейронов в ретикулярном гигантоклеточном ядре при РВГ

	Доля нейронов	Площадь	Концентрация	СПОП
Доля нейронов	1,000000	-0,977021	0,993609	0,991767
Площадь	-0,977021	1,000000	-0,983846	-0,981767
Концентрация	0,993609	-0,983846	1,000000	0,985850
СПОП	0,991767	-0,981767	0,985850	1,000000

Тест на наличие автокорреляции (критерий Дарбина-Уотсона – 1,1931, r=0,3771) не может подтвердить отсутствие автокорреляции в данной модели.

H2S-нейроны ЯСТ. Результаты анализа множественной регрессии для H₂Sнейронов ЯСТ показывают значимость всех коэффициентов регрессии (таблица 30). Построенная модель имеет вид:

$$C\Pi O\Pi = -2,52498 + 2,76599D + 0,02375S - 0,36923C$$
(23)

Таблица 30. Результаты множественной регрессии. CBS-иммунопозитивные нейроны ядра солитарного тракта при РВГ

	β	Ошибка β	В	Ошибка В	t	р
Свободный член			-2,52498	1,366281	-1,84807	0,077494
Доля нейронов	0,822851	0,052791	2,76599	0,177454	15,58703	0,000000
Площадь	0,386636	0,052573	0,02375	0,003229	7,35431	0,000000
Концентрация	-0,395349	0,052753	-0,36923	0,049268	-7,49435	0,000000

Коэффициент корреляции полученной регрессионной модели равен 0,9681, что говорит о сильной связи между факторами. Коэффициент детерминации R²=0,9371; скорректированный на потерю степеней свободы коэффициент множественной детерминации 0,9289. Величина расчетного коэффициента Фишера (114,2662) также подтверждает адекватность полученной модели. Уровень значимости модели p<0,0001.

Для установления силы связи между отдельными факторами была построена корреляционная матрица (таблица 31), из которой следует наличие достаточно сильной положительной связи между СПОП и долей нейронов (r=0,808665). Между остальными переменными корреляции практически не наблюдается.

Таблица 31. Корреляционная матрица взаимосвязи количественных характеристик CBSиммунопозитивных нейронов в ядре солитарного тракта при РВГ

	Доля нейронов	Площадь	Концентрация	СПОП
Доля нейронов	1,000000	0,082427	0,116494	0,808665
Площадь	0,082427	1,000000	0,073275	0,425492
Концентрация	0,116494	0,073275	1,000000	-0,271160
СПОП	0,808665	0,425492	-0,271160	1,000000

Критерий Дарбина-Уотсона, имеющий расчетное значение 1,7467 попадает в область принятия нулевой гипотезы об отсутствии автокорреляции.

Полученные результаты показывают, что регрессионная модель описывающая изменение СПОП в зависимости от доли, концентрации и площади H₂S-нейронов является адекватной, все коэффициенты регрессии являются значимыми, автокорреляция отсутствует. Данная модель быть может использована, например, для вычисления среднего показателя оптической плотности фермента.

*H*₂*S*-*нейроны РГЯ*. Регрессионная модель для H₂*S*-нейронов двигательного ядра построена по результатам, отраженным в таблице 32. Анализ результатов показывает, что коэффициенты уравнения регрессии не являются значимыми ни при каких переменных.

	β	Ошибка β	В	Ошибка В	t	р
Свободный член			-13,8614	19,06232	-0,727161	0,499734
Доля нейронов	1,859339	1,847416	9,1413	9,08267	1,006454	0,360391
Площадь	0,051821	2,157273	0,0074	0,30828	0,024022	0,981764
Концентрация	-0,958424	1,418151	-2,6107	3,86296	-0,675826	0,529141

Таблица 32. Результаты множественной регрессии. CBS-иммунопозитивные нейроны ретикулярного гигантоклеточного ядра при РВГ

Несмотря на это, в пользу полученной модели говорит высокий коэффициент корреляции (0,96227) и коэффициент детерминации (0,92597). Корреляционная матрица показывает наличие сильной связи между всеми переменными (таблица 33).

Таблица 33. Корреляционная матрица взаимосвязи количественных характеристик CBS-иммунопозитивных нейронов в ретикулярном гигантоклеточном ядре при PBГ

	Доля нейронов	Площадь	Концентрация	СПОП
Доля нейронов	1,000000	0,997782	0,994860	0,957548
Площадь	0,997782	1,000000	0,996233	0,952223
Концентрация	0,994860	0,996233	1,000000	0,942984
СПОП	0,957548	0,952223	0,942984	1,000000

Тест на наличие автокорреляции остатков показывает, что критерий Дарбина-Уотсона (2,0253, r=-0,0376) лежит в области принятия гипотезы, что говорит об отсутствии автокорреляции.

Для РГЯ адекватную регрессионную модель удалось построить только для NO-нейронов, где все включенные факторы оказались значимыми.

Глава 6

ГАЗОТРАНСМИТТЕРЫ В МЕЖЪЯДЕРНЫХ НЕЙРОНАХ ПРИ РЕНОВАСКУЛЯРНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

Особенности локализации межъядерных СО-, NО- и H₂S-нейронов в МЯ1-МЯЗ отражаются не только на различиях их нейрохимической организации в обычных условиях жизнедеятельности организма (глава 4), но особенно отчетливо – при гипертензии.

6.1. Группа1

NO-синтаза (nNOS). В процессе развития РВГ в МЯ1 наблюдаются изменения количественных показателей NO-нейронов по сравнению с контрольной группой животных (таблица 34).

Однако в первые 4 недели РВГ, несмотря на стойкое повышение АД, не выявлено существенных изменений доли, средней площади, концентрации и СПОП NO-нейронов (p>0,05). Начиная с 6 недели после операции, наблюдается все более выраженное уменьшение значений количественных показателей. Наибольшие изменения затрагивают показатели доли и средней площади МЯ1 nNOS-позитивных нейронов. В период с 6 по 16 недели они сокращаются более чем в 2,5 раза (p<0,05). Снижение СПОП происходит в основном за счет уменьшения клеток с высоким содержанием фермента (таблица 34). В этот период сокращается также концентрация клеток, хотя меньше, чем указанных выше показателей. Тем не менее, концентрация nNOS-позитивных нейронов в МЯ1 к 24 неделям РВГ уменьшается в 2,2 раза по сравнению с нормотензивными крысами (p<0,05). Между 16-24 неделями РВГ происходит стабилизация значений количественных показателей на более низком уровне.

Ранее (глава 4) отмечалось, что наиболее существенные отличия структуры и нейрохимии выявлены между двумя популяциями межъядерных нейронов –

мелкими, площадью 100-250 мкм², и крупными, площадью 350-550 мкм², в связи с чем проведено исследование реакции именно этих популяций нейронов на увеличение АД. Оценивались изменения наиболее лабильных показателей: доли nNOS-позитивных клеток и СПОП. В результате проведенных исследований установлены существенные отличия изменений величины этих показателей в каждой из двух групп клеток при развитии РВГ (рисунок 115, таблица 34).

Как видно, достоверные изменения обоих показателей при РВГ наблюдаются только в крупных NO-нейронах (p<0,05). Хотя значения доли и СПОП NO-нейронов в группе крупных MЯ1 в первые 6 недель остаются на уровне контрольных значений (p>0,05), начиная с 8 недели, наблюдается все более выраженное снижение доли клеток и концентрации в них фермента. К 24 неделе величина СПОП снижается в 3,7 раз, доля NO-нейронов в 3,3 раза по сравнению с соответствующими значениями, установленными у контрольных животных (p<0,05).



Рисунок 115. Изменения значений СПОП крупных () и мелких () nNOSиммунопозитивных межъядерных нейронов в 1 группе в зависимости от продолжительности РВГ. Данные представлены: $x = \bar{x} \pm ts$ (глава 2). Достоверность различий по сравнению с контрольной группой крыс *p<0,05.

Таблица 34. Изменение количественных показателей nNOS-иммунопозитивных межъядерных нейронов 1 группы в зависимости от величины

артериального давления и продолжительности РВГ

РВГ, нед	контр	2	4	6	8	12	16	20	24
АД, мм рт. ст.	114,7±3,7	118,1±8,6	138,4±6,4*	151,7±7,4*	164,3±6,5*	166,2±6,4*	167,6±7,1*	177,4±6,3*	174,5±6,1*
Доля нейронов, %	12,7±0,6	12,7±0,7	12,6±0,6	10,3±0,5*	7,4±0,3*	5,3±0,2*	3,2±0,2*	2,1±0,1*	2,0±0,1*
Площадь, мкм ²	303,7±14,8	303,5±15	303,1±15,6	278,6±14,2	257,4±13,1*	234,1±12,8*	204,8±10,7*	187,4±8,9*	180,2±9,9*
Доля мелких клеток, %	57,0±2,8	57,0±2,8	56,8±3,1	55,9±2,5	55,3±2,9	54,9±2,7	54,2±2,6	57,6±2,4	54,7±2,8
Доля средних клеток, %	9,8±0,4	9,8±0,4	10,2±0,5	12,0±0,6*	17,5±0,9*	18,7±0,9*	20,2±10*	24,1±10*	34,3±1,6*
Доля крупных клеток, %	33,2±1,6	33,2±1,5	33,0±1,7	32,1±1,5	27,2±1,4*	26,4±1,4*	25,6±1,4*	18,3±0,9*	11,0±0,6*
Концентрация, нейроны/0,01 мкм ²	8,9±0,4	8,8±0,4	8,5±0,3	7,3±0,3*	6,5±0,4*	4,8±0,2*	3,4±0,2*	3,5±0,2*	3,3±0,1*
СПОП, усл.ед.	30,1±1,5	30,0±1,4	30,1±1,2	27,8±1,1*	26,2±1,3*	24,7±1,2*	24,1±1,4*	20,3±1*	20,4±1,1*
Доля нейронов с низким содержанием фермента, %	35,3±1,6	35,8±1,7	36,0±1,8	38,5±1,8	41,5±2*	46,1±1,7*	51,7±2,2*	53,6±2,3*	56,5±2,2*
Доля нейронов с умеренным содержанием фермента, %	33,1±1,7	33,0±1,6	33,0±1,7	32,8±1,8	31,4±1,6	30,8±1,5*	28,1±1,4*	27,7±1,4*	25,4±1,3*
Доля нейронов с высоким содержанием фермента, %	31,6±1,5	31,2±1,6	31,0±1,5	28,7±1,4	27,1±1,3*	23,1±1,3*	20,2±1,0*	18,7±1,2*	18,1±1,2*

*Различия достоверны (p<0,05) по сравнению с контрольной группой крыс.

Гемоксигеназа-2 (НО-2). При РВГ также наблюдаются изменения количественных показателей СО-нейронов в МЯ1 (таблица 35).

Из графика видно, что ранние и наиболее существенные изменения претерпевает показатель оптической плотности НО-2. Достоверное снижение СПОП определяется уже на 6 неделе после операции (p<0,05), когда значения других показателей остаются в пределах контрольного уровня (p>0,05). В течение 16 недель его величина уменьшается в 3,4 раза по сравнению с контролем.

Изменение оптической плотности HO-2 в нейронах происходит в основном за счет уменьшения клеток с высоким содержанием фермента. Клетки с низким содержанием фермента встречаются все чаще, а доля их доля увеличивается более чем в 3 раза (таблица 35).

Площадь МЯ1 СО-позитивных нейронов при РВГ также изменяется, но в меньшей степени, чем СПОП, в отличие от которого до 8 недель ее величина остается практически постоянной (p>0,05). Затем площадь СО-нейронов медленно, но постоянно снижается и к концу наблюдаемого периода значение этого показателя сокращаются почти в 1,5 раза (p<0,05). В процессе развития РВГ изменяется также доля и концентрация HO-2-позитивных клеток. Значимое уменьшение концентрации начинается примерно с 10 недели, а доли с 8 недели РВГ (p<0,05).

В процессе развития РВГ количественные показатели в мелких и крупных СО-нейронах имеют собственную шкалу изменений (рисунок 116, таблица 35). Как видно, мелкие СО-нейроны практически не реагируют на повышение АД: в течение всего периода наблюдений доля этих клеток и СПОП меняются в пределах ошибки измерения (p>0,05).

В отличие от них, в крупных клетках, начиная с 6 недели РВГ, установлено значимое уменьшение СПОП, а с 8 недели – доли этих нейронов. Доля СОнейронов к 20 неделе РВГ уменьшается в 2,3 раза, а СПОП – в 2,4 раза (p<0,05).

Таблица 35. Изменение количественных показателей СО-нейронов в МЯ1в зависимости от величины артериального давления и

РВГ, нед	контр	2	4	6	8	12	16	20	24
АД, мм рт. ст.	114,7±3,7	118,1±8,6	138,4±6,4*	151,7±7,4*	164,3±6,5*	166,2±6,4*	167,6±7,1*	177,4±6,3*	174,5±6,1*
Доля нейронов, %	6,8±0,4	6,8±0,4	6,8±0,3	6,7±0,3	5,3±0,2*	4,0±0,3*	2,8±0,2*	2,0±0,1*	2,0±0,1*
Площадь, мкм ²	260,1±11,5	260,1±11,8	253,4±12	252,4±11,2	238,7±10,2*	218,4±10,5*	201,5±10,5*	178,5±9,6*	178±9,5*
Доля мелких клеток, %	67,2±2,1	65,8±3,5	67,6±2,4	67,0±2,5	65,8±2,6	64,1±3,2	66,8±3,5	65,1±3,8	63,2±3,1
Доля средних клеток, %	7,2±0,3	8,6±0,4	6,9±0,4	7,6±0,3	13,4±0,5*	19,5±0,8*	20,9±1,1*	23,4±1,5*	25,8±1,5*
Доля крупных клеток, %	25,6±1,4	25,6±1,5	25,5±1,5	25,4±1,3	20,8±1,1*	16,4±0,8*	12,3±0,6*	11,5±0,6*	11,0±0,6*
Концентрация, нейроны/0,01 мкм ²	5,3±0,2	5,2±0,3	5,3±0,3	5,1±0,2	4,8±0,2	4,1±0,3*	3,2±0,2*	2,7±0,1*	2,5±0,2*
СПОП, усл.ед.	35,6±1,8	35,4±1,7	35,4±1,8	30,1±1,5*	24,6±1,5*	20,8±1,1*	16,7±0,8*	15,8±0,7*	15,5±0,7*
Доля нейронов с низким содержанием фермента, %	15,0±0,6	15,9±0,7	17,5±0,9	24,7±1,2*	32,2±1,6*	39±1,8*	44,2±2,2*	45,4±2,3*	46,5±2,1*
Доля нейронов с умеренным содержанием фермента, %	36,4±1,7	36,6±1,8	35,1±1,6	35,1±1,6	32,4±1,8*	30,8±1,2*	28,4±1,5*	29,0±1,5*	28,5±1,4*
Доля нейронов с высоким содержанием фермента, %	48,6±2,2	47,5±2,3	47,4±2,3	40,2±2,3*	35,4±1,8*	30,2±1,5*	27,4±1,3*	25,6±1,3*	25,0±1,2*

*Различия достоверны (p<0,05) по сравнению с контрольной группой крыс.



Рисунок 120. Изменения значений СПОП крупных и мелких НО-2-иммунопозитивных межъядерных нейронов 1 группы в зависимости от продолжительности РВГ. Обозначения те же, что и на рисунке 115.

Цистатионин-β-синтаза (CBS). В процессе развития РВГ наблюдаются изменения доли, СПОП, средней площади, концентрации CBS-позитивных нейронов в МЯ1 (таблица 36).

Расчеты показывают, что изменения большинства количественных показателей H_2S -нейронов, в отличие от NO- и CO-нейронов, начинаются позже, с 10-12 недель PBГ. Но более ранние и заметные изменения также установлены для СПОП и доли CBS-позитивных клеток. Достоверные изменения СПОП наблюдаются между 6 по 8 неделями. Значение данного показателя уменьшается в среднем в 2 раза (p<0,05). После 16 недели СПОП стабилизируется на новом более низком уровне. Уменьшение оптической плотности фермента связано в первую очередь с выраженным сокращением доли нейронов с умеренной и высокой концентрацией CBS, тогда как содержание нейронов с низкой интенсивностью реакции соответственно возрастает (таблица 36).

Таблица 36. Изменение количественных показателей CBS-иммунопозитивных межъядерных нейронов 1 группы зависимости от

величины артериального давления и продолжительности РВГ

РВГ, нед	контр	2	4	6	8	12	16	20	24
АД, мм рт. ст.	114,7±3,7	118,1±8,6	138,4±6,4*	151,7±7,4*	164,3±6,5*	166,2±6,4*	167,6±7,1*	177,4±6,3*	174,5±6,1*
Доля нейронов, %	3,2±0,1	3,1±0,1	3,2±0,2	3,2±0,1	3±0,2	2,5±0,1*	1,8±0,07*	1,5±0,05*	1,4±0,06*
Площадь, мкм ²	402,1±20,5	402,3±21,2	401,5±19,8	401,8±19,5	395,1±18,7	358,7±19,1*	310,4±16,4*	289,6±13,2*	288,7±14,5*
Доля мелких клеток, %	33,4±1,6	32,9±1,6	32,8±1,5	32,8±1,4	32,9±1,6	33,1±1,3	31,8±1,7	32,6±1,7	33±1,5
Доля средних клеток, %	27,3±1,3	27,8±1,5	27,7±1,4	28,4±1,5	31,7±1,2*	35,4±1,3*	42,5±1,8*	43,3±1,9*	43±1,9*
Доля крупных клеток, %	39,3±2	39,3±2,1	39,5±2,2	38,8±1,9	35,4±1,7*	31,5±1,5*	25,7±1,3*	24,1±1,3*	24±1,2*
Концентрация, нейронов/0,01 мкм ²	4,8±0,3	4,7±0,3	4,7±0,2	4,6±0,2	4±0,2*	3±0,3*	2,4±0,3*	2,4±0,2*	2,4±0,2*
СПОП, усл.ед.	21,6±1,1	21,5±1,1	21,5±0,9	20,8±0,8	17±0,9*	12±0,7*	8±0,5*	7,2±0,4*	7±0,4*
Доля нейронов с низким содержанием фермента, %	62,7±3,2	64,3±3,5	64,6±2,8	64,5±2,9	67,4±3	69,2±3,1*	71,0±3,6*	73,3±3,5*	73,9±3,6*
Доля нейронов с умеренным содержанием фермента, %	36,7±1,8	35,1±1,7	34,8±1,7	34,9±1,5	32,1±1,6*	30,4±1,5*	28,7±1,5*	26,4±1,3*	25,8±1,3*
Доля нейронов с высоким содержанием фермента, %	0,54±0,02	0,54±0,03	0,53±0,03	0,53±0,02	0,48±0,02*	0,38±0,03*	0,27±0,02*	0,25±0,01*	0,22±0,01*

*Различия достоверны (p<0,05) по сравнению с контрольной группой крыс.

Значимые изменения доли и концентрации H₂S-продуцирующих нейронов в МЯ1 наступают соответственно между 8-10 и 10-12 неделями РВГ (p<0,05). Значение доли H₂S-нейронов за 24 недели уменьшается в 2,3 раза, концентрации – в 2 раза (таблица 36). В тоже время площадь CBS-позитивных нейронов уменьшается лишь в 1,4 раза (p<0,05).

Особенности реакция крупных и мелких межъядерных нейронов на повышение АД представлены на графике (рисунок 117).

Проведенное исследование показывает, что мелкие межъядерные нейроны практически не реагируют на повышение АД: изменения доли (таблица 36) этих клеток и СПОП (рисунок 117) в течение всего периода наблюдений не существенны (p>0,05).



Рисунок 117. Изменения значений СПОП крупных и мелких CBS-иммунопозитивных межъядерных нейронов 1 группы в зависимости от продолжительности РВГ. Обозначения те же, что и на рисунке 115.

Крупные межъядерные CBS-позитивные нейроны, напротив, активно реагируют на повышение АД. Начиная с 8 недели, изменения СПОП быстро сокращаются, уменьшаясь к 16 неделе в 3,3 раза (p<0,05). Соответствующие изменение доли H₂S-нейронов определяются чуть позже, с 12 недели РВГ.

6.2. Группа 2

NO-синтаза (nNOS). По сравнению с контрольной группой крыс при РВГ в МЯ2 наблюдаются существенные изменения количественных показателей среди NO-нейронов (таблица 37). Однако до 4 недель РВГ значения всех параметров не выходят за пределы статистически значимой погрешности (p>0,05). В последующие 4 недели РВГ наблюдается значительное уменьшение величины всех исследуемых показателей, но особенно оно выражено для доли и СПОП NO-нейронов.

Начиная с 8 недели РВГ, доля nNOS-позитивных нейронов достоверно сокращается, достигая минимального уровня на 20 неделе РВГ (таблица 37). В процессе развития РВГ величина этого параметра уменьшается в 2,8 раза. Однако достоверные изменения (p<0,05) показателя при РВГ наблюдаются только среди крупных NO-нейронов.

Значительные изменения установлены также для СПОП и, в меньшей степени, концентрации NO-нейронов. За 24 недели исследования СПОП фермента уменьшается в 1,8 раза, концентрации клеток в 1,4 раза (p<0,05). Уменьшение СПОП происходит в основном за счет сокращения клеток с высокой интенсивностью реакции. Доля таких клеток за исследуемый период уменьшилась в 1,6 раз, клеток с низкой интенсивностью реакции – возрастает (таблица 37).

Значения СПОП NO-нейронов в группе крупных МЯ2 в первые 6 недель остаются на уровне контрольных значений (p>0,05), начиная с 8 недели, наблюдается все более выраженное снижение в них СПОП (рисунок 118). К 20 неделе величина СПОП в группе крупных клеток снижается в 1,7 раза (p<0,05).

Меньше других показателей при развитии РВГ изменяется средняя площадь нитроксидергических нейронов – в 1,3 раза (p<0,05). Уменьшение средней площади NO-нейронов вызвано, прежде всего, снижением доли крупных клеток в МЯ2. Их содержание сокращается в 1,8 раз (p<0,05). Напротив, доля мелких нейронов меняется незначительно (таблица 37).

Таблица 37. Изменение количественных показателей nNOS-иммунопозитивных межъядерных нейронов 2 группы в зависимости от величины

артериального давления и продолжительности РВГ

РВГ, нед	контр	2	4	6	8	12	16	20	24
АД, мм рт. ст.	114,7±3,7	118,1±8,6	138,4±6,4*	151,7±7,4*	164,3±6,5*	166,2±6,4*	167,6±7,1*	177,4±6,3*	174,5±6,1*
Доля нейронов, %	14,3±0,7	14,3±0,6	14,2±0,7	12,1±0,5*	8,6±0,5*	6,4±0,3*	5,8±0,3*	5,4±0,3*	5,2±0,3*
Площадь, мкм ²	258,4±12,5	257,3±12,6	257,4±13,7	238,2±12,4	224,6±11,8*	220,3±11,2*	219±12,1*	219±10,8*	218,3±9,8*
Доля мелких клеток, %	71,1±3,4	71,1±3,8	69,8±3,5	69,8±3,7	70,2±3,3	68,1±3,4	71±3,6	68,8±3,1	68,9±3,3
Доля средних клеток, %	3,6±0,2	3,6±0,2	5,0±0,3*	6,2±0,3*	8,7±0,2*	13,6±0,7*	12,6±0,6*	16,1±0,9*	16,0±0,8*
Доля крупных клеток, %	25,3±1,4	25,3±1,5	25,2±1,1	24,0±1,3	21,1±1,4*	18,3±0,9*	16,4±0,8*	15,1±0,8*	15,1±0,6*
Концентрация, нейроны/0,01 мкм ²	12,9±0,6	12,8±0,7	12,7±0,6	10,1±0,5*	9,8±0,4*	9,5±0,4*	9,3±0,5*	8±0,5*	8±0,3*
СПОП, усл.ед.	39,6±2,0	39,5±2,0	39,5±2,2	37,3±2,1	33,5±14,8*	30,2±15,2*	28,1±14,7*	26,3±13,8*	26±13,4*
Доля нейронов с низким содержанием фермента, %	4,6±0,2	4,8±0,3	5,0±0,3	7,8±0,4*	16,3±0,8*	26±1,5*	34,8±1,7*	38,1±2,0*	38,3±2,0*
Доля нейронов с умеренным содержанием фермента, %	38,1±2,1	38±2,2	38,0±1,9	36,1±1,7	32,8±1,6*	30,7±1,6*	27,1±1,7*	26,8±1,5*	26,5±1,5*
Доля нейронов с высоким содержанием фермента, %	57,3±3,1	57,2±2,7	57,0±2,8	56,1±2,5	50,9±2,7*	43,3±2,1*	38,1±2,4*	35,1±1,7*	35,2±1,6*

*Различия достоверны (p<0,05) по сравнению с контрольной группой крыс

После 20 недели начинается стабилизация этих параметров и дальнейшего уменьшения их значений не происходит (таблица 37).



Рисунок 118. Изменения значений СПОП крупных и мелких nNOS-иммунопозитивных межъядерных нейронов 2 группы в зависимости от продолжительности РВГ. Обозначения те же, что на рисунке 115.

Гемоксигеназа-2 (НО-2). В таблице 38 представлены изменения количественных показателей СО-клеток в МЯ2 при РВГ.

Как и в предыдущем случае, наиболее выраженные изменения наблюдаются для показателей доли и СПОП СО-нейронов: за весь период наблюдения значения первого уменьшаются в 3,2, второго – в 3,3 раза, по сравнению с контролем (p<0,05). Причем в отличие от NO-нейронов, достоверное уменьшение указанных параметров установлено после 8 недели РВГ. На 20 неделе значения обоих показателей стабилизируются на более низком уровне (таблица 38).

При РВГ в МЯ2 уменьшается также концентрация СО-нейронов, хотя не так сильно, как предыдущие два параметра. В период с 8 по 20 неделю концентрация СО-нейронов сокращается в 1,4 раза (p<0,05), а после 20 недели устанавливается на новом более низком уровне (таблица 38). В то же время средняя площадь НО-2-позитивных нейронов в МЯ2 уменьшается в 1,2 раза преимущественно за счет более выраженного сокращения доли крупных нейронов. Таблица 38. Изменение количественных показателей НО-2-иммунопозитивных межъядерных нейронов 2 группы в зависимости от величины

артериального давления и продолжительности РВГ

РВГ, нед	контр	2	4	6	8	12	16	20	24
АД, мм рт. ст.	114,7±3,7	118,1±8,6	138,4±6,4*	151,7±7,4*	164,3±6,5*	166,2±6,4*	167,6±7,1*	177,4±6,3*	174,5±6,1*
Доля нейронов, %	12,3±0,6	12,2±0,6	12,2±0,5	11,5±0,6	7,3±0,3*	5,4±0,2*	4,1±0,2*	3,8±0,2*	3,8±0,2*
Площадь, мкм ²	217,3±10,4	217±10,5	216,8±11,3	216,4±11,7	206,2±10,8	197,0±9,7	183,2±8,8*	175,4±9,9*	174,2±8,5*
Доля мелких клеток, %	78,3±4,2	77,8±4,5	77,7±5,1	77,9±4,1	76,2±4,8	77,2±5,2	77,4±4,9	76,7±4,2	76,6±4,3
Доля средних клеток, %	3,4±0,3	3,9±0,3	3,9±0,2	3,9±0,2	6,5±0,4*	9,4±0,5*	10,3±0,5*	11,5±0,4*	11,9±0,6*
Доля крупных клеток, %	18,3±0,9	18,3±0,9	18,4±1,0	18,2±1,1	17,3±0,8	13,4±0,7*	12,3±0,6*	11,8±0,6*	11,5±0,6*
Концентрация, нейронах/0,01 мкм ²	9,2±0,5	9,2±0,4	9,2±0,4	9,1±0,3	9,1±0,4	6,8±0,3*	5,1±0,2*	4,3±0,2*	4,3±0,2*
СПОП, усл.ед.	49,8±2,4	49,7±2,5	49,8±2,5	49,0±3,1	47,3±2,8	37,1±1,9*	24,3±1,5*	16,8±1,4*	15,1±1,0*
Доля нейронов с низким содержанием фермента, %	2,3±0,1	2,3±0,1	2,2±0,2	2,5±0,1	15,4±0,6*	27,1±1,4*	42,5±2,5*	46,4±2,3*	46,8±2,4*
Доля нейронов с умеренным содержанием фермента, %	14,1±0,7	14,1±0,6	14,0±0,6	14,0±0,5	13,5±0,6	11,1±0,5*	8,3±0,4*	8,3±0,4*	8,2±0,3*
Доля нейронов с высоким содержанием фермента, %	83,6±4,4	83,6±4,5	82,8±3,8	83,4±3,9	71,1±3,8*	61,8±3,3*	49,2±3,5*	45,3±2,9*	45,0±2,2*

*Различия достоверны (p<0,05) по сравнению с контрольной группой крыс.

Изменение значения СПОП мелких и крупных НО-2-позитивных нейронов в МЯ2 при РВГ представлены на графике (рисунок 119). Достоверные изменения этого показателя, как и доли СО-нейронов (таблица 38) затрагивает только крупные клетки. После 8 недели РВГ доля крупных нейронов уменьшается в 1,9 раз, СПОП – 1,6 раза (p<0,05).



Рисунок. 119. Изменения значений СПОП крупных и мелких НО-2-иммунопозитивных межъядерных нейронов 2 группы в зависимости от продолжительности РВГ. Обозначения те же, что и на рисунке 115.

Цистатионин-β-синтаза (CBS). В процессе развития РВГ наблюдаются изменения доли, СПОП, средней площади и концентрации CBS-позитивных нейронов в МЯ2 (таблица 39).

Значимые преобразования большинства количественных показателей H₂Sнейронов, в отличие от NO- и CO-нейронов, начинаются позднее, после 10-12 недель PBГ. При этом более ранние и заметные изменения также установлены для СПОП и доли CBS-позитивных клеток. Достоверные изменения СПОП наблюдаются между 6 по 8 неделями. Значение данного показателя уменьшается в среднем в 3,3 раза (p<0,05). При PBГ в 2 раза уменьшается количество нейронов с умеренной и высокой интенсивностью реакции, а число клеток с низкой – увеличивается, что приводит к существенному сокращению СПОП в МЯ2 (таблица 39). После 16 недели СПОП стабилизируется на новом более низком уровне. Меньше других показателей при развитии РВГ изменяется средняя площадь CBS-позитивных нейронов – в 1,3 раза (p<0,05). Уменьшение средней площади этих нейронов вызвано, прежде всего, снижением доли крупных клеток в МЯ2. Их содержание сокращается в 1,5 раза (p<0,05). Напротив, доля мелких нейронов увеличивается, но снижается концентрация. Оба параметра начинают изменяться примерно с 12 недели. За 24 недели РВГ их величина уменьшается в 2,3 и 2 раза соответственно. После 20 недели начинается стабилизация этих параметров и дальнейшего изменения их значений не происходит (таблица 39).

Преобразование СПОП мелких и крупных H₂S-нейронов в МЯ2 при РВГ представлено на графике (рисунок 120) и доли H₂S-нейронов в таблице 39.

Проведенное исследование показывает, что при РВГ происходит достоверное сокращение доли и СПОП H_2S -нейронов только среди крупных межъядерных нейронов). Начиная с 8 недели, СПОП в них уменьшается к 16 неделе в 2,1 раза, по сравнению с контролем (p<0,05). Соответствующие изменение доли H_2S -нейронов определяются с 12 недели РВГ. Изменения этих показателей среди мелких клеток в течение всего периода наблюдений не существенны (p>0,05).



Рисунок 120. Изменения значений СПОП крупных и мелких CBS-иммунопозитивных межъядерных нейронов 2 группы в зависимости от продолжительности РВГ. Обозначения те же, что на рисунке 115.

Таблица 39. Изменение количественных показателей CBS-иммунопозитивных межъядерных нейронов 2 группы в зависимости от величины

артериального давления и продолжительности РВГ

РВГ, нед	контр	2	4	6	8	12	16	20	24
АД, мм рт. ст.	114,7±3,7	118,1±8,6	138,4±6,4*	151,7±7,4*	164,3±6,5*	166,2±6,4*	167,6±7,1*	177,4±6,3*	174,5±6,1*
Доля нейронов, %	3,2±0,1	3,1±0,2	3,2±0,2	3,2±0,1	3,0±0,2	2,5±0,1*	1,8±0,1*	1,5±0,06*	1,4±0,07*
Площадь, мкм ²	402,1±20,1	402,3±20,5	401,5±21,4	401,8±19,8	395,1±17,2	358,7±14,8*	310,4±15,8*	289,6±13,2*	288,7±14,8*
Доля мелких клеток, %	33,4±1,4	32,9±1,6	32,8±1,6	32,8±1,7	32,9±1,5	33,1±1,6	31,8±1,5	32,6±1,4	33,0±1,2
Доля средних клеток, %	27,3±1,4	27,8±1,4	27,7±1,2	28,4±1,3	31,7±1,6*	35,4±1,7*	42,5±2,1*	43,3±2,5*	43,0±2,4*
Доля крупных клеток, %	39,3±2,8	39,3±2,4	39,5±2,6	38,8±2,5	35,4±1,9*	31,5±1,8*	25,7±2,3*	24,1±2,2*	24,0±2,2*
Концентрация, нейронах/0,01 мкм ²	4,8±0,3	4,7±0,3	4,7±0,2	4,6±0,3	4,0±0,2*	3,0±0,1*	2,4±0,1*	2,4±0,2*	2,4±0,2*
СПОП, усл.ед.	21,6±1,1	21,5±1,3	21,5±0,9	20,8±0,9	17,0±12,5*	12,0±0,8*	8,0±0,6*	7,2±0,4*	7,0±0,4*
Доля нейронов с низким содержанием фермента, %	62,7±3,9	64,3±3,7	64,6±3,8	64,5±3,8	67,4±3,5	69,2±3,4*	71,0±3,6*	73,3±3,7*	73,9±3,7*
Доля нейронов с умеренным содержанием фермента, %	36,7±1,8	35,1±1,5	34,8±1,7	34,9±1,7	32,1±1,6*	30,4±1,5*	28,7±1,3*	26,4±1,3*	25,8±1,2*
Доля нейронов с высоким содержанием фермента, %	0,54±0,02	0,54±0,02	0,53±0,03	0,53±0,02	0,48±0,01*	0,38±0,01*	0,27±0,01*	0,25±0,02*	0,22±0,01*

*Различия достоверны (p<0,05) по сравнению с контрольной группой крыс.

6.3. Группа 3

NO-синтаза (nNOS). В МЯЗ при РВГ наблюдаются выраженные изменения количественных показателей среди NO-нейронов (таблица 40). Однако до 4 недель РВГ значения всех параметров не выходят за пределы статистически значимой погрешности (p>0,05). В последующие 4 недели РВГ наблюдается значительное уменьшение величины всех исследуемых показателей, но особенно оно выражено для доли и СПОП NO-нейронов. Начиная с 8 недели РВГ, доля nNOS-позитивных нейронов достоверно сокращается в 2,8 раза, СПОП – в 2 раза, достигая минимального уровня на 20 неделе РВГ (таблица 40).

При РВГ наблюдаются существенные изменения значений концентрации NO-клеток. За период с 6 по 20 неделю количество нитроксидергических нейронов в МЯЗ уменьшается в 2,1 раза (p<0,05). В то же время средняя площадь профильного поля клеток по сравнению с контрольными значениями снижается лишь в 1,4 раза (p>0,05).

Сравнивая преобразование значений доли и СПОП среди крупных и мелких нейронов отметим, что достоверные изменения показателей при РВГ наблюдаются только среди крупных NO-нейронов (рисунок 121, таблица 40).

В процессе развития РВГ доля крупных клеток уменьшается в 1,7 раз (p<0,05), мелкие же клетки практически не реагируют на повышение АД (p>0,05). Среди крупных клеток более выражены, чем среди мелких нейронов и изменения СПОП (рисунок 121).

Значения СПОП в течение 20 недель РВГ среди крупных клеток уменьшаются в 2,1 раза (p<0,05). Среди мелких клеток на протяжении всего периода наблюдений величина этого показателя существенно не меняется (p>0,05).



Рисунок 121. Изменения значений СПОП крупных и мелких nNOS-иммунопозитивных межъядерных нейронов в 3 группе в зависимости от продолжительности РВГ. Обозначения те же, что на рисунке 115.

Таблица 40. Изменение количественных показателей nNOS-иммунопозитивных межъядерных нейронов3 группы в зависимости от величины

артериального давления и г	продолжительности РВГ
----------------------------	-----------------------

РВГ, нед	контр	2	4	6	8	12	16	20	24
АД, мм рт. ст.	114,7±3,7	118,1±8,6	138,4±6,4*	151,7±7,4*	164,3±6,5*	166,2±6,4*	167,6±7,1*	177,4±6,3*	174,5±6,1*
Доля нейронов, %	13,7±0,6	13,7±0,7	13,5±0,7	12,8±0,6	10,3±0,5*	9,4±0,5*	8,8±0,4*	8,2±0,4*	8,1±0,4*
Площадь, мкм ²	263,4±10,7	263,0±11,2	263,1±12,8	248,1±11,4	212,7±13,7*	198,4±10,1*	190,2±9,4*	188,1±9,7*	189±10,3*
Доля мелких клеток, %	64,4±3,4	64,4±3,2	64,4±3,6	62,8±3,5	63,1±2,4	63,7±2,8	63,6±2,7	63,9±3,1	64,2±3,3
Доля средних клеток, %	2,7±0,2	2,8±0,1	2,7±0,1	9,1±0,4*	11,0±0,5*	15,7±0,8*	19,2±0,9*	21,3±1,1*	21,7±1,1*
Доля крупных клеток, %	32,9±1,7	32,8±1,6	32,9±1,6	28,1±1,5*	25,9±1,2*	20,6±0,8*	17,2±0,9*	14,8±0,6*	14,1±0,7*
Концентрация, нейроны/0,01 мкм ²	10,2±0,5	10,2±0,5	10,3±0,3	10,1±0,6	7,4±0,4*	5,8±0,3*	5,2±0,3*	4,9±0,3*	4,8±0,2*
СПОП, усл.ед.	37,0±1,8	37,0±2,1	36,5±1,7	34,2±1,7	30,8±1,5*	26,3±1,4*	21,4±1,2*	16,2±0,9*	15,8±0,7*
Доля нейронов с низким содержанием фермента, %	14,2±0,7	14,5±0,8	16,4±0,7	36,6±1,9*	42,8±2,3*	44,8±2,3*	46,4±2,5*	46,9±2,4*	47,6±2,1*
Доля нейронов с умеренным содержанием фермента, %	34,7±1,8	34,5±1,7	34,4±1,7	32,1±1,6	30,8±1,3*	29,6±1,5*	28,6±1,5*	28,3±1,4*	28,1±1,4*
Доля нейронов с высоким содержанием фермента, %	51,1±2,8	51,0±2,5	49,2±2,3	31,3±1,5*	26,4±1,3*	25,6±1,4*	25,2±1,2*	24,8±1,2*	24,3±1,2*

*Различия достоверны (p<0,05) по сравнению с контрольной группой крыс.

Гемоксигеназа-2 (НО-2). Исследование СО-нейронов в области МЯЗ в разные сроки экспериментальной гипертензии показывает наличие последовательных преобразований количественных показателей (таблица 41). Однако до 6-8 недель РВГ значения изученных параметров не выходят за пределы статистически значимых различий (р>0,05). В последующие 4-8 недель РВГ наблюдается значительное уменьшение величины всех исследуемых показателей, но особенно оно выражено для доли и СПОП СО-нейронов. Начиная с 8 недели РВГ, доля НО-2-позитивных нейронов достоверно сокращается, достигая минимального уровня на 16 неделе РВГ. В процессе развития РВГ величина этого параметра сокращается в 1,7 раза, а СПОП – в 2,3 раза (р<0,05).

В меньшей степени, хотя и достоверно (p<0,05), к 16 неделе снижается концентрация (в 1,3 раза) и средняя площадь профильного поля (1,2 раза) СОнейронов (таблица 41).

Однако на повышение АД реагируют преимущественно крупные межъядерные нейроны, значимые изменения доли и СПОП (p<0,05) которых выявляются на 8 неделе развития РВГ (рисунок 122, таблица 41). Мелкие клетки, напротив, судя по небольшим изменениям исследованных показателей (p>0,05), сохраняют относительно стабильную организацию на протяжении всего периода наблюдений.



Рисунок 122. Изменения значений СПОП крупных и мелких НО-2-иммунопозитивных межъядерных нейронов 3 группы в зависимости от продолжительности РВГ. Обозначения те же, что на рисунке 115.
Таблица 41. Изменение количественных показателей НО-2-иммунопозитивных межъядерных нейронов 3 группы в зависимости от

величины артериального давления и продолжительности РВГ

РВГ, нед	контр	2	4	6	8	12	16	20	24
АД, мм рт. ст.	114,7±3,7	118,1±8,6	138,4±6,4*	151,7±7,4*	164,3±6,5*	166,2±6,4*	167,6±7,1*	177,4±6,3*	174,5±6,1*
Доля нейронов, %	9,2±0,4	9,2±0,4	9,1±0,3	9,0±0,4	7,8±0,3*	7,2±0,3*	6,8±0,4*	6,7±0,2*	6,7±0,2*
Площадь, мкм ²	232,8±12,1	232,5±11,5	232,7±12,8	231,8±11,1	225,3±11,5	217,9±10,8*	215,4±10,2*	209,3±9,5*	208,2±9,4*
Доля мелких клеток, %	73,0±3,6	73,1±3,6	72,8±3,5	72,7±2,9	72,8±3,1	71,4±2,8	71,3±3,7	71,3±3,3	71,4±3,0
Доля средних клеток, %	2,7±0,1	2,7±0,1	3,0±0,2	3,3±0,2	6,4±0,3*	10,9±0,5*	11,9±0,6*	12,4±0,6*	12,4±0,6*
Доля крупных клеток, %	24,3±1,3	24,2±1,2	24,2±1,4	24,0±1,2	20,8±1,1*	17,7±0,9*	16,8±0,9*	16,3±0,7*	16,2±0,8*
Концентрация, нейроны/0,01 мкм ²	8,2±0,4	8,2±0,3	8,0±0,3	8,2±0,5	7,7±0,4	7,0±0,4*	6,8±0,3*	6,5±0,2*	6,4±0,3*
СПОП, усл.ед.	46,6±2,4	46,6±2,5	46,4±2,3	46,3±2,4	40,8±2,1*	35,9±1,9*	30,1±1,9*	28,8±1,7*	28,3±1,8*
Доля нейронов с низким содержанием фермента, %	2,0±0,1	2,2±0,1	2,6±0,1	7,9±0,4*	14,2±0,8*	21,1±1,1*	27,4±1,5*	33,4±1,8*	35,1±1,8*
Доля нейронов с умеренным содержанием фермента, %	24,9±1,2	24,7±1,3	24,7±1,3	23,8±1,1	20,6±1,1*	20,5±1,2*	19,4±1,1*	18,8±0,9*	18,1±0,9*
Доля нейронов с высоким содержанием фермента, %	73,1±3,6	73,1±3,4	72,7±3,7	68,3±3,8	65,2±3,2*	58,4±3,1*	53,2±2,9*	47,8±2,4*	46,8±2,3*

*Различия достоверны (p<0,05) по сравнению с контрольной группой крыс.

Цистатионин-β-синтаза (CBS). В процессе развития РВГ в МЯЗ наблюдаются изменения доли, СПОП, средней площади, концентрации CBS-позитивных нейронов (таблица 42). Расчеты показывают, что изменения большинства количественных показателей H₂S-нейронов, в отличие от NO- и CO-нейронов, начинаются позже, с 10-12 недели РВГ.

Более ранние и выраженные изменения установлены для СПОП и доли **CBS-позитивных** клеток. Достоверное сокращение величины СПОП наблюдаются между 6 по 8 неделями РВГ. Значение данного показателя уменьшается в среднем в 2 раза (р<0,05). После 20 недели СПОП стабилизируется на новом более низком уровне. Уменьшение оптической плотности фермента связано в первую очередь с выраженным сокращением доли нейронов с умеренной и высокой концентрацией CBS, тогда как содержание нейронов с низкой интенсивностью реакции соответственно возрастает (таблица 42). Значимые изменения доли и концентрации H₂S-продуцирующих нейронов в MЯ3 наступают соответственно между 8-10 и 10-12 неделями РВГ (p<0,05). Значение доли H₂S-нейронов за 24 недели уменьшается в 2,3 раза, концентрации – в 2 раза. В тоже время площадь CBS-позитивных нейронов уменьшается лишь в 1,4 раза (p<0,05).

Особенности реакция крупных и мелких межъядерных нейронов на повышение АД представлены на графике (рисунок 123). Проведенное исследование показывает, что мелкие межъядерные нейроны практически не реагируют на повышение АД: изменения СПОП в течение всего периода наблюдений не существенны (р>0,05). Крупные межъядерные CBS-позитивные нейроны, напротив, активно реагируют на повышение АД.

Начиная с 8 недели, значения СПОП быстро уменьшаются, и к 16 неделе опускаются в 3,3 раза ниже контрольного уровня (p<0,05). Соответствующие изменение доли H₂S-нейронов определяются на 12 неделе РВГ (рисунок 123).

Таблица 42. Изменение количественных показателей CBS-иммунопозитивных межъядерных нейронов 3 группы в зависимости от

РВГ, нед	контр	2	4	6	8	12	16	20	24
АД, мм рт. ст.	114,7±3,7	118,1±8,6	138,4±6,4*	151,7±7,4*	164,3±6,5*	166,2±6,4*	167,6±7,1*	177,4±6,3*	174,5±6,1*
Доля нейронов, %	4,4±0,2	4,4±0,2	4,3±0,1	4,3±0,2	4,4±0,2	2,9±0,1*	2,2±0,1*	2,0±0,1*	2,0±0,1*
Площадь, мкм ²	361,1±18,1	361,0±16,5	360,8±16,3	360,9±17,6	360,1±19,11	332,8±18,3*	315,3±15,2*	291,2±15,1*	283,2±13,4*
Доля мелких клеток, %	43,2±2,3	42,8±2,6	41,9±2,7	41,7±2,1	41,6±2,1	41,7±2,2	42,3±2,4	42,1±2,2	42,1±2,1
Доля средних клеток, %	10,0±0,5	10,5±0,6	11,4±0,6	11,7±0,7	13,4±0,7*	25,5±1,2*	30,4±1,5*	35,6±1,7*	37,2±1,7*
Доля крупных клеток, %	46,8±2,4	46,7±2,3	46,7±2,2	46,6±2,4	45,0±2,5	32,8±1,8*	27,3±1,3*	22,3±1,3*	20,7±1,1*
Концентрация, нейроны/0,01 мкм ²	3,7±0,2	3,7±0,3	3,6±0,2	3,6±0,2	3,4±0,3	2,1±0,2*	1,9±0,2*	1,8±0,1*	1,8±0,1*
СПОП, усл.ед.	23,6±1,2	23,4±1,4	23,5±1,3	23,0±1,5	17,3±1,1*	14,2±0,9*	12,8±0,8*	10,7±0,8*	10,1±0,8*
Доля нейронов с низким содержанием фермента, %	40,1±2,4	40,3±2,0	40,3±2,2	40,4±2,2	42,0±2,1	51,4±2,4*	57,2±2,7*	67,0±3,4*	75,3±4,2*
Доля нейронов с умеренным содержанием фермента, %	3,1±0,1	3,1±0,2	3,0±0,2	2,9±0,1	2,7±0,1*	2,4±0,1*	2,0±0,1*	1,7±0,1*	1,6±0,1*
Доля нейронов с высоким содержанием фермента, %	56,8±2,8	56,6±2,7	56,7±2,5	56,7±2,1	55,3±2,1	46,2±2,3*	40,8±1,8*	31,3±1,5*	23,1±1,0*

величины артериального давления и продолжительности РВГ

*Различия достоверны (p<0,05) по сравнению с контрольной группой крыс.



Рисунок 123. Изменения значений СПОП крупных и мелких CBS-иммунопозитивных межъядерных нейронов 3 группы в зависимости от продолжительности РВГ. Обозначения те же, что на рисунке 115.

6.4. Математическое обоснование зависимости величины некоторых количественных показателей, вычисленных в популяции межъядерных газотрансмиттерных нейронов, от продолжительности РВГ

Для установления зависимости наиболее лабильных количественных характеристик (СПОП и доли) крупных нейронов от продолжительности РВГ проведено математическое исследование отдельно для NO-, CO- и H₂Sмежъядерных нейронов. На рисунке 124 представлены доля нейронов, линия тренда, уравнение аппроксимирующей функции и коэффициент достоверности аппроксимации в МЯЗ в разные периоды развития РВГ. С большой степенью $(R^2 = 0.99)$ точности установлены изменение доли В зависимости OT продолжительности РВГ. На участке 6-24 недели эта зависимость для крупных клеток описывается полиномом 3 степени. Количественные показатели среди мелких клеток в течение всего периода наблюдений практически не меняются.





В таблице 43 представлена функция, описывающая изменение доли и СПОП крупных межъядерных нейронов при развитии артериальной гипертензии. Приведено уравнение регрессии и коэффициент достоверности аппроксимации.

Данные таблицы свидетельствуют, что из всех характеристик наиболее близкой к распределению функцией является полином 3 степени с соответствующими коэффициентами для каждого газотрансмиттера. Полученные уравнения позволяют предсказать значение количественных параметров в те временные промежутки, в которые не были проведены измерения.

Для установления взаимосвязи между исследуемыми характеристиками, а также для выяснения влияния факторов (доли, площади, концентрации иммунопозитивных нейронов в ядре) на изменения величины СПОП был использован метод множественной линейной регрессии.

В качестве зависимой переменной выбиралась величина СПОП, независимыми переменными (факторами) являлись доля иммунопозитивных нейронов (D) в ядре, концентрация (C), площадь нейронов (S).

185

Таблица 43. Уравнения регрессии и коэффициенты достоверности аппроксимации зависимостей количественных характеристик от

Тип нейронов	Исследуемый показатель в	МЯ1		МЯ2		МЯЗ	
	нейронах	уравнение	R^2	уравнение	R^2	уравнение	\mathbb{R}^2
	СПОП	y=0,000006t ³ +	R ² =0,9836	y=0,0004t ³ +0,0223t ² -	R ² =0,9929	y=0,008t ³ -0,326x ² +2,7527t	R ² =0,9953
NO		0,0045t ² -0,7515t+20,333		1,4521t+25,843		+19,446	
110	Доля	$y=-0,0091t^{3}+0,3503t^{2}-$	R ² =0,9807	$y=-0,0011t^3+0,0823t^2-$	R ² =0,9955	$y=0,0009t^3+0,0002t^2-$	R ² =0,9989
		4,8508t+49,724		2,1567t+34,002		1,4602t+36,812	
	СПОП	$y=-0,002t^{3}+0,1276t^{2}-$	R ² =0,9658	$y=-0,0027t^3+0,1524t^2-$	R ² =0,9831	y=0,0055t ³ -	R ² =0,9998
CO		2,7806t+42,429		2,8571t+30,162		0,2181t ² +1,48t+29,283	
00	Доля	$y=-0,0018t^{3}+0,138t^{2}-$	R ² =0,995	$y=-0,0007t^3+0,0639t^2-$	R ² =0,9808	$y=-0,0032t^{3}+0,1868t^{2}-$	R ² =0,9972
		3,6007t+42,189		1,7438t+26,865		3,577t+39,322	
	СПОП	$y=-0,0015t^{3}+0,1005t^{2}-$	R ² =0,9965	$y=-0,0058t^3+0,3378t^2-$	R ² =0,9996	y=0,0042t ³ -	R ² =0,9889
HaS		2,6105t+39,32		6,5086t+67,706		0,1598t ² +0,7952t+26,816	
1125	Доля	y=0,0059t ³ -	R ² =0,9814	y=0,0035t ³ -0,1221t ² +0,187t+37,639	R ² =0,9872	$y=0,0031t^{3}-0,0694t^{2}-$	R ² =0,9884
		0,2138t ² +1,0994t+39,423				1,7355t+59,799	

продолжительности РВГ в крупных межъядерных NO, CO и H₂S-нейронах

$$y = B + B_1 x_1 + B_2 x_2 + B_3 x_3 \tag{24}$$

или: СПОП =
$$B + B_1 D + B_2 S + B_3 C$$
 (25)

NO-нейроны. По результатам исследований межъядерных NO-нейронов была построена математическая модель (уравнение линейной множественной регрессии), коэффициенты которой, а также уровни значимости для них приведены в таблице 44.

Таблица 44 Результаты множественной регрессии для межъядерных nNOS-иммунопозитивных нейронов при РВГ

	β	Ошибка β	В	Ошибка В	t	р
Свободный член			-5,70738	3,903445	-1,46214	0,157233
Доля нейронов	0,231489	0,081498	0,61005	0,214776	2,84041	0,009266
Площадь	0,131381	0,055683	0,04705	0,019941	2,35947	0,027165
Концентрация	0,691288	0,078369	2,13657	0,242217	8,82090	0,000000

Таблица показывает значимость всех коэффициентов регрессии, уравнение которой имеет вид:

$$C\Pi O\Pi = -5,70738 + 0,61005D + 0,04705S + 2,13657C$$
(26)

Коэффициент корреляции и коэффициент достоверности аппроксимации регрессионной модели очень высоки и составляют 0,9783 и 0,9570 соответственно. Критерий Фишера (170,5422) превышает табличный, что говорит об адекватности построенной модели.

Как показывают результаты исследования, наиболее сильная положительная корреляция наблюдается между концентрацией NO-нейронов и показателей оптической плотности фермента (r=0,959315). Также достаточно сильная положительная корреляция наблюдается между концентрацией и долей нейронов (r=0,830019) и СПОП и долей нейронов (r=0,886666). Степень взаимосвязи между другими факторами менее значительна (таблица 45).

Величина расчетного критерия Дарбина-Уотсона (0,8397, r=0,5886) меньше нижней границы теоретического значения, что говорит о присутствии в модели автокорреляции. В моделях регрессии автокорреляции между остатками может

привести к негативным результатам всего процесса оценивания неизвестных коэффициентов модели. Следовательно, данная модель, несмотря на значимость всех коэффициентов регрессии, не может быть удовлетворительной и требует доработки.

Таблица 45. Корреляционная матрица взаимосвязи количественных характеристик межъядерных nNOS-иммунопозитивных нейронов при РВГ

	Доля нейронов	Площадь	Концентрация	СПОП
Доля нейронов	1,000000	0,619529	0,830019	0,886666
Площадь	0,619529	1,000000	0,577608	0,674089
Концентрация	0,830019	0,577608	1,000000	0,959315
СПОП	0,886666	0,674089	0,959315	1,000000

СО-нейроны. Построение модели множественной линейной регрессии для СО-нейронов показывает значимость коэффициентов только при двух независимых переменных: площади и концентрации нейронов (таблица 46). Регрессионная модель в этом случае имеет вид:

$$C\Pi O\Pi = -20,7540 + 0,4989D + 0,1067S + 4,4370C$$
⁽²⁷⁾

Таблица 46. Результаты множественной регрессии. НО-2-иммунопозитивные межъядерные нейроны при РВГ

	β	Ошибка β	В	Ошибка В	t	р
Свободный член			-20,7540	6,432301	-3,22653	0,003734
Доля нейронов	0,121708	0,148739	0,4989	0,609712	0,81827	0,421603
Площадь	0,218592	0,060051	0,1067	0,029322	3,64009	0,001369
Концентрация	0,763550	0,138050	4,4370	0,802220	5,53096	0,000013

Коэффициент корреляции регрессионной модели составляет 0,9717, коэффициент достоверности аппроксимации - 0,9570. Критерий Фишера (170,5422) превышает табличный, что говорит об адекватности построенной модели. Уровень значимости модели p<0,0001.

Корреляционная матрица (таблица 47) показывает силу связи между отдельными факторами. Между площадью нейронов и СПОП, площадью и долей

нейронов, а также между площадью и концентрацией коэффициент корреляции небольшой (0,509100, 0,468125 и 0,305853 соответственно), что говорит о невысокой связи между факторами. В остальных случаях коэффициент корреляции близок 1.

Таблица 47. Корреляционная матрица взаимосвязи количественных характеристик межъядерных НО-2-иммунопозитивных нейронов при РВГ

	Доля нейронов	Площадь	Концентрация	СПОП
Доля нейронов	1,000000	0,468125	0,923171	0,928923
Площадь	0,468125	1,000000	0,305853	0,509100
Концентрация	0,923171	0,305853	1,000000	0,942764
СПОП	0,928923	0,509100	0,942764	1,000000

Расчетное значение коэффициента Дарбина Уотсона (0,7019, r=0,6602), также как и для NO-нейронов, показывает наличие в автокорреляции остатков. Это говорит о том, что данную модель нужно с осторожностью применять для вычисления соответствующих параметров.

*H*₂*S*-*нейроны.* Проведено аналогичное исследование для H₂*S*-нейронов (таблица 48), которое позволило создать уравнение регрессионной модели следующего вида:

$$C\Pi O\Pi = -0,002001 + 4,585850D - 0,018957S + 3,002001C \dots (31)$$

Таблица 48. Результаты множественной регрессии. Межъядерные CBS-

-0,018957

3,002001

0,023045

1,048389

-0,822611

2,863441

р

0,999674

0,000000

0,419177

0,008786

	β	Ошибка β	В	Ошибка В	t
Свободный член			-0,002001	4,844187	-0,000413
Доля нейронов	0,711377	0,082632	4,585850	0,532685	8,608931

0,154497

0,154245

-0,127091

0,441671

Площадь

Концентрация

иммунопозитивные нейроны при РВГ

Коэффициент корреляции регрессионной модели составляет 0,9588, коэффициент достоверности аппроксимации - 0,99194. Критерий Фишера (87,428)

превышает табличный, что говорит об адекватности построенной модели. Уровень значимости модели p<0,0001.

Значимым оказывается влияние только двух факторов: доли и концентрации клеток. Корреляционная матрица (таблица 49) показывает наличие сильной положительной связи между СПОП и долей нейронов (r=0,926058), концентрацией и площадью нейронов (r=0,920524), СПОП и концентрацией (r=0,810517). Связь между остальными факторами заметно ниже.

Таблица 49. Корреляционная матрица взаимосвязи количественных характеристик CBS-иммунопозитивных межъядерных нейронов при РВГ

	Доля нейронов	Площадь	Концентрация	СПОП
Доля нейронов	1,000000	0,684225	0,682952	0,926058
Площадь	0,684225	1,000000	0,920524	0,766220
Концентрация	0,682952	0,920524	1,000000	0,810517
СПОП	0,926058	0,766220	0,810517	1,000000

Расчетный критерий Дарбина-Уотсона (1,2365, r=0,3806) лежит в промежутке между двумя теоретическими значениями. Это свидетельствует о том, что в автокорреляции наличие остатков не доказано, т.е. данная модель может быть принята.

Однако полученная для H_2S -нейронов математическая модель показывает низкую степень связи между рядом факторов, что требует осторожного ее применения для вычисления соответствующих характеристик крупных клеток, наиболее активно реагирующих на повышение АД.

Таким образом, при развитии РВГ на значения СПОП в межъядерных нейронах оказывают существенное влияние следующие факторы: для NOнейронов – доля клеток, площадь, концентрация, для СО-нейронов – площадь и концентрация, для H₂S-нейронов – доля и концентрация.

ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности локализации межъядерных и внутриядерных нейронов во многом определяют их топохимические и функциональные характеристики. Так, например, у внутриядерных нейронов, происходит стабилизация количественных параметров между 10-12 неделями РВГ, в то время как у МЯ она отмечается на 4-8 Ha 124 недель позднее. рисунке показаны изменения СПОП В нитроксидергических нейронах ЯСТ и МЯЗ в процессе развития РВГ. Как видно, при повышении АД СПОП в NO-нейронах чувствительных ядер уменьшается в 2,6-3,5 раз, а в МЯ нейронах – в 1,5-2 раза.



Рисунок 124. Изменение СПОП NO-синтазы в нейронах ЯСТ (\bigcirc) и МЯ3 (\bigcirc) в процессе развития РВГ. Данные представлены: $x = \bar{x} \pm ts$ (глава 2). Достоверность различий по сравнению с контрольной группой крыс *p<0,05.

Но и у нормотензивных животных установлены существенные отличия топохимии внутриядерных и МЯ нейронов. Межъядерные нейроны объемных скоплений не образуют: обычно они располагаются поодиночке или, реже, образуют группы из 2-3 клеток. Концентрация МЯ газотрансмиттерных нейронов намного меньше, чем внутриядерных (2-6% от общего количества) [85]. Большинство МЯ нейронов расположены между гигантоклеточным и мелкоклеточным ретикулярными ядрами (1 группа), между ретикулярным мелкоклеточным ядром и ядром одиночного пути (2 группа), в окружении ретикулярного латерального ядра (3 группа). Как показали некоторые авторы, в вазомоторной области продолговатого нейроны мозга ЭТИ составляют относительно многочисленную группу интернейронов, участвующих в обмене классических медиаторов нервного импульса: ацетилхолина, норадреналина и серотонина [80,33]. МЯ нейроны 1-3 групп отличаются между собой количеством иммунопозитивных клеток, размерами, средним показателем оптической плотности. Многие МЯ нейроны обладают высокой интенсивностью реакции, поэтому величина СПОП в них существенно выше, чем во внутриядерных нейронах [85]. Кроме того, в отличие от внутриядерных нейронов, большинство которых представляют собой средние по площади клетки, среди МЯ отчетливо выделяются две размерные группы: мелкие, площадью 50-150 мкм², и крупные нейроны, площадью 350-500 мкм².

Не так давно было показано, что популяция межъядерных нейронов и функционально [136]. Исследованиями, неоднородна выполненными С применением микроэлектродной техники, установлено, что реакция мелких и интернейронов раздражение афферентных крупных на систем имеет определенные особенности. Мелкие клетки, прежде всего, обеспечивают межнейрональное взаимодействие афферентных и эфферентных сигналов в локальных участках мозга. Крупные клетки, находясь в состоянии постоянного тонического возбуждения, стабильно посылают импульсы в вышележащие отделы мозга и на периферию.

По нашим данным, в реакции мелких и крупных МЯ нейронов на изменение АД наблюдаются существенные отличия [100]. Среди мелких МЯ клеток значительных изменений доли и СПОП в NO-, CO- и H₂S-нейронов при РВГ не установлено. В группе крупных МЯ нейронов, начиная с 8-й недели РВГ, наблюдается все более выраженное снижение доли клеток и концентрации в них ферментов. Приведенные выше данные позволяют предположить, что в центральные механизмы управления гемодинамикой могут быть вовлечены обе популяции нейронов: внутриядерные и межъядерные. Среди последних следует выделить крупные и мелкие нейроны, которые отличаются между собой не только рядом топохимических характеристик, но и функционально – различной устойчивостью к изменению АД.

Как показало проведенное исследование, внутриядерные нейроны также собой: СПОП, существенно отличаются между значениями долей иммунопозитивных клеток, содержанием среди них мелких, средних и крупных нейронов, соотношением нейронов с низкой, умеренной И высокой интенсивностью реакции и некоторыми другими признаками [73, 85]. Подобные результаты были получены и другими авторами [19,30].

Выявлена зависимость между функциональной принадлежностью ядер и СПОП. Оптическая плотность для СО-нейронов имеет наименьшее значение в двигательном ядре РГЯ. В чувствительных (ЯСТ, РЛЯ) и ассоциативном (РМЯ) ядрах эта величина значительно выше. Поскольку НО-2 откладывается в основном в мелких и средних нейронах, то при увеличении доли мелких клеток и сокращении крупных возрастают значения СПОП. Так, в РМЯ доля мелких клеток составляет 27 %, в РЛЯ – 30 %, в ЯСТ – 35%, а СПОП соответственно: 41, 59 и 65 усл. ед. В двигательном ядре РГЯ СПОП для CBS-нейронов значительно выше, чем в чувствительных ядрах (66 %, против 12-22 %). В чувствительных ядрах величина этого показателя в большей степени зависит от доли мелких клеток, которые в них встречаются значительно чаще.

В ЯСТ доля крупных CBS-позитивных клеток составляет 53 %, в РЛЯ – 57 %, в РМЯ – 65 %, а СПОП соответственно: 12, 17 и 22 усл. ед. NO-нейроны одинаково часто встречаются в РМЯ и РГЯ, но почти вдвое реже в ЯСТ. Доля СО-нейронов в ЯСТ оказалась в 2,5 раза выше, чем в РМЯ, а в последнем величина этого показателя почти в 4 раза больше, чем в РГЯ. Доля H₂S-нейронов в РГЯ вдвое превосходит соответствующие значения в РМЯ и в 4,5 раза – в ЯСТ.

Ядра отличаются между собой и концентрацией газотрансмиттерных нейронов, значения которой определяются не только количеством, но и размерами клеток. В РГЯ и ЯСТ, например, выявлены наибольшие значения этого показателя среди H₂S-нейронов, так как в РГЯ чаще всего встречаются крупные клетки, а в ЯСТ они имеют меньшие размеры, но встречаются в большем количестве. Поэтому цифры относительной плотности в нем выше. Наименьшая концентрация H₂S-нейронов наблюдается в РЛЯ, где клетки выявляются очень редко. Площадь большинства NO-нейронов колеблется от 200 до 380 мкм². Экспрессия HO-2 в ядрах наблюдается в мелких нейронах площадью 220–360 мкм², а CBS – от 350 до 500 мкм². В ЯСТ и РМЯ в основном встречаются мелкие клетки в РГЯ – крупные.

Ранее отмечалось, что подавляющее число медиаторноспецифицеских нейронов сконцентрировано в центральной части ядер ствола мозга [33,162]. Однако, как показали наши наблюдения, пространственная организация NO-, COи H₂S-нейронов в каждом ядре имеет свои особенности [72]. Например, в краниальной части ЯСТ немного NO- и CO-нейронов, а встречаются они в основном у рострального полюса, тогда как H₂S-нейронов в этой части ядра выявляется относительно много и распределены они довольно равномерно. В проекции центральной части ЯСТ NO-нейроны нередко формируют группы из 4-6 вентролатеральной области, В РМЯ нейроны располагаются клеток В РГЯ наиболее относительно равномерно, a В _ объемные скопления газотрансмиттерных клеток выявляются в его дорсомедиальной области. Большинство H₂S- и CO-нейронов находятся в тех же участках ядра, что и NOнейроны. H₂S-нейроны в ЯСТ и РГЯ формируют скопления и в центральной области ядра, а в РМЯ относительно плотные группы НО-2-иммунопозитивных нейронов находятся в латеральной области, т.е. там, где клетки с экспрессией nNOS встречаются редко. В каудальной части ЯСТ NO-нейроны образуют компактное скопление только в дорсомедиальной области, где редко встречаются клетки, экспрессирующие два других газотрансмиттера. В РГЯ наблюдается другая структура пространственных отношений нейронов: в краниальной и

каудальной частях преобладают H₂S-нейроны, которые в основном концентрируются в вентромедиальной области ядра. В указанных частях РГЯ NOи CO-нейроны встречаются очень редко. Иначе говоря, структурные предпосылки для взаимодействия газотрансмиттерных нейронов прослеживаются не только в центральной части, но и в краниальной или каудальной областях ядер.

При этом большая часть энзимпозитивных клеток в ядрах располагаются в непосредственной близости друг к другу, образуя небольшие скопления нейронов различной медиаторной принадлежности. На схеме представлено распределение газотрансмиттерных нейронов в центральной части ЯСТ, РМЯ и РГЯ (рисунок 125).



Рисунок 125. Пространственная организация газотрансмиттерных нейронов в центральной части ЯСТ (а), РМЯ (б) и РГЯ (в). ● – nNOS-, ● – HO-2-, ○ – CBS-иммунопозитивные нейроны.

Несмотря на то, что рассматриваемые нами ядра входят в единую интегративную систему центральной регуляции гемодинамики, в каждом из них установлена собственная динамика преобразований количественных параметров при РВГ, выраженность и направленность которых тесно связана с типом нейронов, исследуемым показателем и продолжительностью гипертензии. Однако до 4-й недели РВГ достоверных изменений количественных параметров среди NO-, CO- и H₂S-нейронов в исследуемых ядрах не происходит, хотя уже на 2-й неделе регистрируется значительное повышение АД. По-видимому, в этот период главная роль в регуляции кровообращения принадлежит местным рефлекторным и сосудистым механизмам. Как отмечается некоторыми авторами [2,29], и

подтверждается нашими исследованиями, между 4-8 неделями появляются значимые изменения исследуемых параметров среди газотрансмиттерных нейронов в ядрах. На повышение АД в первую очередь реагируют NO-нейроны, позднее выявляется реакция CO- и H₂S-нейронов. Причем, у H₂S-нейронов соответствующие изменения показателей выражены в меньшей степени, чем среди nNOS-позитивных клеток. В результате этих процессов при развитии PBГ происходят изменения пространственных отношений между NO-, CO- и H₂S-нейронами в ядре, что приводит к перераспределению нейронов различной медиаторной принадлежности в различных частях ядер в направлении от компактной «очаговой» их локализации к относительно равномерному («диффузному») расположению, что более свойственно мозгу примитивных организмов [99].

В межъядерных газотрансмиттерных нейронах с увеличением АД также происходят изменения величины количественных показателей. В МЯ1-МЯ3 установлены локальные особенности динамики их преобразований, но во всех случаях они уступают выявленным изменениям соответствующих параметров среди внутриядерных нейронов.

Как межъядерные, так и внутриядерные NO-, CO- и H_2S -нейроны могут взаимодействовать не только между собой, но и с клетками, продуцирующими классические медиаторы нервного импульса, создавая новые пространственные нейрохимические кластеры [91,95,101]. Согласно современным представлениям, множественность и разнообразие эффектов классических нейромедиаторов во многом обеспечивают газовые посредники – NO, CO и H_2S . Воздействуя на нейроны, включающие ацетилхолин, норадреналин или серотонин, они создают условие для объединения отдельных нейронов в функциональные нервные центры, расширяя возможности мозга по управлению сложными процессами в организме.

196

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В центральных механизмах регуляции гемодинамики особенно важное значение придается бульбарному отделу сердечно-сосудистого центра. Здесь находится большое количество ядер, нейроны которых используют для передачи нервного импульса многие классические медиаторы: ацетилхолин, норадреналин, серотонин и т.д. Однако представление о роли нейротрансмиттеров в процессах регуляции кардинально изменились после открытия газотрансмиттеров: оксида азота, монооксида углерода и сероводорода.

Оксид азота, оксид углерода и сероводород составляют семейство биологически активных газов, осуществляющих в мозге, прежде всего, сигнальную функцию. В последние годы появляется все больше доказательств, что эта функция нейронов в мозге контролируется не каждым газотрансмиттером в отдельности, а при активном взаимодействии этих веществ [98,101]. Все они могут активировать К-каналы высокой проводимости, а их внутриклеточное действие сопряжено с химической модификацией белков-мишеней. Все газообразные посредники участвуют в развитии мозга, облегчают индукцию долговременной потенциации в гиппокампе, оказывают вазорелаксирующее действие.

В нервных центрах нитроксидергические, СО и H₂S-нейроны образуют единую систему, внутри которой оказывают друг на друга синергическое и антагонистическое влияние [46]. Взаимодействуя между собой, а также с нервными клетками другой медиаторной принадлежности, газотрансмиттерные нейроны оказывают влияние на органы-мишени, что позволяет им участвовать во многих физиологических процессах. При этом, в отличие от классических нейромедиаторов, газотрансмиттеры действуют как объемные передатчики, создавая вокруг себя поле воздействия, модулируя активность окружающих клеток. При стимуляции нервных клеток повышается концентрация NO, CO и H₂S, а затем быстро снижается. Изменение концентрации газов происходит что ограничивает зону локально И кратковременно, воздействия газов относительно небольшим участком мозга. Это свойство мозга имеет решающее

значение в обеспечении механизмов срочных адаптаций, в основе которых лежит высокая пластичность нейронов и многообразие межнейронных связей [46].

Несмотря на определенную схожесть функций в нейрональной трансдукции отмечаются параллельные эффекты только в отношении оксида азота и монооксида углерода. Сероводород часто подавляет активность этих газов [112]. Механизмы действия NO и H₂S также различны. Эффекты H₂S опосредуются через гиперполяризацию, которая обеспечивается активностью $K_{AT\Phi}$ – каналов, NO – через растворимую форму гуанилатциклазы и модуляцию K_{Ca} [132,189]. При определенных условиях оксид азота подавляет активность CBS, вызывая снижение количества H₂S в клетках, а CO тормозит высвобождение NO из нейронов [17,126].

Но при этом газы функционально связаны между собой и работают вместе, регулируя клеточные процессы в норме и патологии [91,98,143,189]. Во всех изученных ядрах продолговатого мозга постоянно определяются NO-, CO- и H₂Sпозитивные нейроны, отличающиеся формой, размерами, интенсивностью реакции и плотностью расположения в ядре.

Зависимость количества энзимпозитивных нейронов от площади профильного поля клеток показывает, что кривая распределения отличается в чувствительных и двигательных ядрах, различна для NO-, CO- и H₂S-нейронов. Для чувствительных ядер NO-нейронов максимум распределения приходится на средние клетки площадью 300-320 мкм². У CO-нейронов максимум сдвинут в область мелких клеток (260-280 мкм²), у H₂S-нейронов – клеток площадью 380-420 мкм². В двигательном ядре все эти значения сдвинуты в сторону более крупных клеток, что соответствует результатам измерений таких клеток другими авторами [84,96,101].

В клеточных группах, находящихся между гигантоклеточным и мелкоклеточным ретикулярными ядрами, между ретикулярным мелкоклеточным ядром и ядром одиночного пути и в окружении ретикулярного латерального ядра также постоянно определяются клетки экспрессирующие nNOS, HO-2 и CBS. При повышении АД доля, концентрация, СПОП и средняя площадь профильного поля

этих нейронов постоянно меняются. Также как и среди внутриядерных нейронов, наиболее ранние изменения количественных признаков наблюдаются среди межъядерных нейронов, экспрессирующих NO. Изменения CO- и H₂S-нейронов начинаются на 2-4 недели позже. Однако у внутриядерных нейронов, начиная примерно с 10-12 недели РВГ, происходит стабилизация количественных характеристик, в то время как в межъядерных нейронах изменения продолжаются вплоть до 20-22 недели.

В отличие от внутриядерных нейронов, межъядерные энзимпозитивные клетки отчетливо делятся на две большие группы: мелкие и крупные клетки. Так, кривая распределения nNOS-нейронов по их площади имеет два ярко выраженных максимума: 150-200 мкм² – мелкие клетки и 350-400 мкм² – крупные клетки. Для HO-2-нейронов максимумы кривой приходятся на 150 мкм² и 350 мкм². Для CBS-позитивных нейронов – на 100-150 мкм² и 400 мкм².

Уравнение связи между СПОП и остальными изучаемыми количественными характеристиками позитивных нейронов, построенное методом множественной регрессии имеет вид:

для NO-нейронов: СПОП=11,77-0,03D+0,28 D_m +0,02 D_k +0,04C-0,09S,

для СО-нейронов: СПОП = $-28,07 + 0,35D + 2,13D_m - 0,73D_k + 2,39C - 0,20S$,

для H_2S -нейронов: СПОП = $-70,1+0,27D-3,96D_m-1,67D_k+0,51C-0,01S$,

где D – доля нейронов иммунопозитивных в ядре от общего количества, выявленных метиленовым синим, D_m – доля мелких, D_k – крупных клеток, C – концентрация, S – площадь нейронов.

Тест Дарбина-Уотсона показал отсутствие автокорреляции остатков. Наибольшая положительная корреляционная связь прослеживается между долей мелких NO-нейронов и СПОП (r=0,97), между долей мелких CO-нейронов и СПОП (r=0,93) и между долей крупных H₂S-нейронов и СПОП (r=0,93).

Среди межъядерных и внутриядерных нейронов встречаются клетки различной интенсивности реакции. Осадок окрашивает эти клетки в различные оттенки коричневого цвета. СПОП межъядерных интернейронов зависит от размеров клеток. График $C\Pi O\Pi = f(S)$ имеет два ярко выраженных максимума в области мелких и крупных клеток. Причем, для NO- и CO-нейронов наибольшее значение СПОП имеют мелкие клетки, H_2S присутствует также в крупных клетках.

Уравнение множественной регрессии, показывающее взаимосвязь между количественными характеристиками межъядерных интернейронов в различных областях мозга, имеет вид:

для NO-нейронов СПОП = $-10,16+0,70D_m+0,07C$,

для СО-нейронов СПОП = $-27,38 + 0,87D_m + 0,98C$,

для H_2 S-нейронов СПОП = 22,78 – 0,22 D_k + 2,61C,

где D_m – доля мелких, D_k – крупных клеток, С – концентрация.

Все модели множественной регрессии имеют коэффициент детерминации близким к 1. Наибольшая положительная корреляционная связь для NO- и COнейронов прослеживается между долей мелких клеток и СПОП, а для H₂Sнейронов – между долей крупных клеток и СПОП.

При развитии РВГ количественные характеристики NO-, CO- H₂S-нейронов непрерывно меняются. У каждого ядра определяется своя динамика изменения данных параметров. Во всех исследованных ядрах продолговатого мозга наблюдается уменьшение доли иммунопозитивных нейронов, концентрации, доли нейронов с высоким содержанием фермента, СПОП. Во всех изученных ядрах продолговатого мозга уменьшение количества иммунопозитивных нейронов при развитии экспериментальной гипертензии происходит в тех частях ядер, где плотность клеток наибольшая, что приводит к перераспределению нейронов в сторону более равномерного распределения их в ядре.

В результате этих процессов происходит изменения пространственных отношений между внутриядерными газотрансмиттерными интернейронами различной медиаторной принадлежности, что приводит к ремоделированию бульбарного отдела сердечно-сосудистого центра в целом. Зависимость СПОП, доли, концентрации и площади NO-, CO- и H₂S-нейронов от времени течения РВГ

с большой степенью точности (коэффициент аппроксимации $r^2=0,94-1$) описывается полиномом 3-ей степени вида: $y=b_1t^3+b_2t^2+b_3t+b_0$, где у – изучаемая количественная характеристика, b_1 , b_2 , b_3 , b_0 – коэффициенты, t – время (недели РВГ). Метод множественной регрессии, использованный для установления взаимосвязи между исследуемыми количественными показателями, а также для выявления влияния факторов (доли, площади и концентрации позитивных нейронов в ядре) на изменение СПОП в процессе развития РВГ, позволил построить математическую модель этой зависимости для чувствительных и двигательного ядер.

А) чувствительные ядра:

NO-нейроны: СПОП = 24,44 + 0,30D - 0,05S - 0,24C,

СО-нейроны: СПОП = -34,19+3,65D+0,08S-3,64C,

 H_2S -нейроны: СПОП = -2,52 + 2,77D + 0,024S - 0,37C.

Б) двигательное ядро:

NO-нейроны: СПОП = 38,14 + 1,74D - 0,08S - 0,61C

СО-нейроны: СПОП = 6,40 + 5,97D - 0,02S - 0,64C

 H_2S -нейроны: СПОП = -13,86 + 9,14D - 0,01S - 2,61C.

Наиболее сильная отрицательная связь (r=-0,8) прослеживается между площадью и концентрацией нейронов для NO-клеток чувствительных ядер. Для CO-нейронов чувствительных ядер наличие самой сильной корреляционной связи отмечено между СПОП и долей нейронов (r=0,94) и площадью и концентрацией (r=-0,91). Для H₂S-нейронов наблюдается сильная положительная корреляция между СПОП и долей нейронов (r=0,81).

Зависимость количественных характеристик межъядерных интернейронов от времени с большой степенью точности (r²=0,95-1) описывается полиномом 3-ей степени с соответствующими коэффициентами для каждого газотрансмиттера, между изменением СПОП и остальными изученными характеристиками нейронов описывается уравнением множественной линейной регрессии:

NO-нейроны: СПОП = -5,71+0,61D+0,05S+2,14C,

СО-нейроны: СПОП = -20,75+0,50D+0,11S+4,44C,

 H_2S -нейроны: СПОП = 4,59D – 0,02S + 3,00C.

Наиболее сильная положительная корреляция наблюдается для NOнейронов между концентрацией и СПОП (r=0,96), для CO-нейронов коэффициент множественной регрессии между долей и концентрацией нейронов близок к 1. Для H₂S-нейронов наиболее сильная связь прослеживается между СПОП и долей нейронов (r=0,93), концентрацией и площадью нейронов (r=0,92).

Внутриядерные нейроны обнаруживают высокую чувствительность газотрансмиттерных систем к длительному повышению артериального давления, что способствует нарушению работы бульбарного отдела сердечно-сосудистого центра. Реакция мелких и крупных межъядерных клеток на хроническое повышение артериального давления отличается между собой. Крупные нейроны активно реагируют на повышение артериального давления, что служит подтверждением их участия в регуляции гемодинамики, мелкие клетки, напротив, сохраняют относительно стабильную организацию при артериальной гипертензии и выполняют, по-видимому, иную функцию.

Таким образом, в процессе развития РВГ происходит формирование новой пространственной организации как внутриядерных, так и межъядерных нейронов различной медиаторной принадлежности, в результате чего образуется иной характер связей в вазомоторной области с дальнейшей нейрохимической реорганизацией нервного центра в целом. По-видимому, на ранних этапах развития АГ изменение пространственных отношений между NO, CO и H₂Sнейронами имеет положительное значение, поскольку приводит к компенсаторному замещению недостаточности функций одних медиаторных систем другими и, как следствие, временному удержанию АД на уровне контрольных значений. Дальнейшее сокращение концентрации NO, CO и H₂S в нейронах, а затем количества этих клеток способствует ремоделированию нервного центра и стабилизации АД на новом более высоком уровне.

выводы

1) nNOS-, HO-2- и CBS-иммунопозитивные нейроны, выявленные в ядрах продолговатого мозга крысы, отличаются формой, площадью профильного поля, значениями интенсивности реакции, концентрацией и локализацией в ядре. nNOS и HO-2 чаще маркирует небольшие нейроны округлой, веретеновидной или треугольной формы с высокой и умеренной плотностью отложения продукта реакции в ЯСТ и РЛЯ. CBS чаще выявляется в крупных интенсивно окрашенных полигональных клетках РГЯ.

2) Между гигантоклеточным и мелкоклеточным ретикулярными ядрами, ретикулярным мелкоклеточным ядром и ядром одиночного пути, а также в окружении ретикулярного латерального ядра постоянно находятся одиночные и небольшие группы nNOS-, HO-2- и CBS-иммунопозитивных нейронов. Среди них наиболее часто встречаются клетки площадью 150-200 мкм² (62-73 %) и 350-500 мкм² (24-32 %). В мелких клетках интенсивность иммуногистохимической реакции при выявлении nNOS и HO-2 в 1,5-4 раза выше, чем в крупных нейронах.

3) Дендриты межъядерных нейронов площадью до 200 мкм² контактируют с ветвями или телами соименных клеток, а также нейронами вазомоторных ядер, участвуя в образовании локальных нейронных цепей. Дендриты более крупных клеток, как правило, организуются в пучки, которые отдают несколько более тонких горизонтальных, восходящих или нисходящих отростков, в выше- и нижележащие отделы мозга.

4) B процессе развития реноваскулярной гипертензии BO всех исследованных ядрах продолговатого мозга крысы установлено уменьшение доли иммунопозитивных нейронов, значений ИХ относительной плотности. реакции. Наиболее ранние изменения выявлены среди nNOSинтенсивности позитивных нейронов и в ядре одиночного пути.

5) Динамика количественных показателей внутриядерных и межъядерных нейронов при развитии реноваскулярной гипертонии существенно отличается:

внутриядерные нейроны обнаруживают более высокую чувствительность к повышению артериального давления, по сравнению с межъядерными нейронами. Для межъядерных нейронов наиболее выраженные изменения количественных параметров установлены среди крупных клеток.

6) Большинство внутриядерных нейронов, экспрессирующих nNOS, находятся в тех же участках ядер, что и HO-2- и CBS-иммунопозитивные нейроны. При развитии артериальной гипертензии изменения количественных показателей СО- и H₂S-продуцирующих нейронов в ядрах наступают позднее и выражены не так значительно, как у нитроксидергических нейронов. В результате этих процессов происходят преобразования пространственного положения различных типов газотрансмиттерных нейронов в ядрах вазомоторной области продолговатого мозга.

7) Зависимость интенсивности иммуногистохимической реакции, доли, концентрации и площади NO-, CO- и H₂S-нейронов от времени развития реноваскулярной гипертензии для внутриядерных нейронов описывается полиномом 3 степени вида: $y=b_1t^3+b_2t^2+b_3t+b_0$, (t – время в неделях). Связь между величиной СПОП и другими исследованными характеристиками нейронов при РВГ описывается уравнениями множественной линейной регрессии вида: СПОП = $B_0 + B_1D + B_2S + B_3C$, где D – доля иммунопозитивных нейронов, S – средняя площадь нейронов, C – концентрация, B – коэффициенты. Для межъядерных нейронов зависимость от времени прослеживается только для крупных клеток. Показатели мелких газотрансмиттерных нейронов остаются в пределах контрольных значений.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АГ артериальная гипертензия;
- АД артериальное давление;
- ВЯ внутриядерные нейроны
- МЯ межъядерные нейроны
- РВГ реноваскулярная гипертензия;
- РГЯ ретикулярное гигантоклеточное ядро;
- РЛЯ ретикулярное латеральное ядро;
- РМЯ ретикулярное мелкоклеточное ядро;
- СПОП средний показатель оптической плотности;
- цГМФ циклический гуанозинмонофосфат;
- ЯСТ ядро солитарного тракта;
- eNOS эндотелиальная нитрооксидсинтаза;
- CBS цистатионин β-синтаза;
- СО углекислый газ (монооксид углерода);
- сNOS конститутивная нитрооксидсинтаза;
- CSE цистатионин ү-лиаза;
- H₂S сероводород;
- НО гемоксигеназа;
- iNOS индуцибельная нитрооксидсинтаза;
- NADPH никотинамидаденин-динуклеотид фосфат;
- NADPH-d никотинамидаденин-динуклеотид фосфат-диафораза;
- NO оксид азота;
- NOS нитрооксидсинтаза;
- nNOS нейрональная нитрооксидсинтаза;

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

 Андронов Е.В. Роль оксида азота в регуляции микроциркуляторного звена системы гемостаза: обзор / Е.В. Андронов, В.Ф. Киричук, А.Н. Киричук, Н.В. Мамонтова // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2007. – Т. 3, № 3. – С. 39-44.

2. Бабич Е.В. Нитроксидергические нейроны в ядрах продолговатого мозга у нормо- и гипертензивных крыс: дисс. канд. мед. наук. – ВГМУ. – Владивосток, 2010. – 151 с.

3. Бабич Е.В. Нитроксидергические нейроны в ядрах продолговатого мозга у нормо- и гипертензивных крыс / Е.В. Бабич, В.М. Черток, А.Е. Кацюба // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 147, № 8. – С. 157-160.

4. Баскаков М.Б. Влияние сероводорода на сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы / М.Б. Баскаков, С.В. Гусакова, А.С. Желудева // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – № 6. – С. 12-17.

5. Баскаков М.Б. Ионные механизмы действия газотрансмиттеров на сократительную активность сосудистых гладких мышц / М.Б. Баскаков, С.В. Гусакова, А.С. Желудева, Л.В. Смаглий, И.В. Ковалев, Т.А. Вторушина, Д.С. Носов, К.В. Еременко, М.А. Медведев, С.Н. Орлов // Известия высших учебных заведений. – 2013. – Т. 56, № 4/2. – С. 73-78.

6. Баскаков М.Б. Роль оксида азота в механизмах действия монооксида углерода на сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы / М.Б. Баскаков, А.С. Желудева, С.В. Гусакова // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 2. – URL: http://www.science-education.ru/108-8689.

7. Браже Н.А. Механизмы действия оксида азота на мембраны нервных клеток: автореф. дисс. к.б.н. – Москва. – 2006. – 135 с.

8. Бувальцев В.И. Роль коррекции метаболизма оксида азота в организме при профилактике гипертонического ремоделирования сердечно-сосудистой

системы / В.И. Бувальцев, С.Ю. Машина, А.А. Пакидешев, Б.В. Смирин, Л.А. Вайда, И.Ю. Малышев, Е.Б. Манухина // Российский кардиологический журнал. – 2002. – № 5. – С. 85-89.

9. Вальдман А.В. Нейрофармакология центральной регуляции сосудистого центра / А.В. Вальдман // Л: Медицина. – 1976. – 326 с.

10. Вараксин А.А. Значение сероводорода в регуляции функции органов /
 А.А. Вараксин, Е.В. Пущина // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2012. – № 2.
 – С. 27-34.

Вараксин А.А. Сероводород как регулятор системных функций у позвоночных / А.А. Вараксин, Е.В. Пущина // Нейрофизиология. – 2011. – Т. 43, № 1. – С 73-84.

12. Виноградов С.Ю. Компьютерный анализ точечных цифровых изображений гистологических препаратов для определения концентрации гистамина в биологических структурах. / С.Ю. Виноградов, В.В. Криштоп, С.В. Диндяев // патент на изобретение RU №2392845 С2.

Гарцман Т.Ю. Нитроксидергические нейроны ядер черепных нервов продолговатого мозга позвоночных: дисс. канд. мед. наук: ВГМУ. – Владивосток. – 2002. – 123 с.

14. Герасимова Е.В. Влияние сероводорода на освобождение медиатора и выявление экспрессии цистатионин-γ-лиазы в диафрагмальной мышце крысы /
Е.В. Герасимова, С.Г. Вологин, Ю.А. Мухачева, Г.Ф. Ситдикова // Ученые записки Казанского университета. – 2010. – Т. 152, № 2. – С. 41-50.

15. Герасимова Е.В. Газообразные посредники в нервной системе / Е.В.
 Герасимова, Г.Ф. Ситдикова // Российский физиологический журнал. – 2006. – № 7.
 – С. 872-882.

16. Горбачев В.И. Нарушения нитроксидергической системы при травматическом повреждении головного мозга / В.И. Горбачев, В.В. Ковалев // Монография: РИО ИГИУВа. – 2006. – 158 с.

17. Гусакова С.В. Газовая сигнализация в клетках млекопитающих / С.В. Гусакова, И.В. Ковалев, Л.В. Смаглий, Ю.Г. Бирулина, А.В. Носарев, И.В.

Петрова, М.А. Медведев, С.Н. Орлов, В.П. Реутов // Успехи физиологических наук. – 2015. – Т. 46. – № 4. – С. 53-73.

18. Данилов Р.К. Руководство по гистологии / Р.К. Данилов // 2-е изд., испр. и доп. – СПб: «Спец. Лит». – 2010. – Т. 1. – 831с.

19. Елисеева Е.В. Морфологические основы нитроксидергической регуляции органов дыхания: дисс. д-ра мед. наук. Владивосток. – 2001. – 42 с.

20. Желудева А.С. Ионные механизмы действия монооксида углерода на сократительную активность сосудистых гладких мышц / А.С. Желудева // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 2. – С. 37-39.

21. Завгородняя А.Н. Эндотелиальные механизмы патогенеза цереброваскулярной патологии / А.Н. Завгородняя, В.А. Малахов // Український медичний часопис. – 2006. – № 2(52). – С. 32-39.

22. Задионченко В.С. Состояние эндотелия и оксид азота при сердечной недостаточности / В.С. Задионченко, И.В. Погонченкова, О.И. Нестеренко, Н.Б. Холодкова, К.М. Багатырова // Российский кардиологический журнал. – 2005. – № 1(51). – С. 80-87.

23. Ирьянов Ю.М. Обработка и анализ изображений в гистологических исследованиях с применением стандартных компьютерных программ / Ирьянов Ю.М., Силантьева Т.А., Горбач Е.В // Морфологические ведомости. – 2004. – № 12. – С. 11-13.

24. Калаева Е.А. Регрессионные модели в биофизических исследованиях: учебное пособие / Е.А. Калаева, В.Г. Артюхов // Воронеж: ИПЦ ВГУ. – 2007. – 36 с.

25. Князева И.С. Диагностика опухолей головного мозга методами интеллектуального анализа гистохимических данных. / И.С. Князева, Н.Г. Макаренко, А.А. Меклер, Ю.М. Забродская // Нейроинформатика. – 2011. – часть 3. – С. 72-79.

26. Койчубеков Б.К. Определение размера выборки при планировании научного эксперимента / Б.К. Койчубеков, М.А. Сорокина, К.Э. Мхитарян // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2014. – № 4. – С. 71-74.

28. Коржов В.И. Монооксид углерода / В.И. Коржов, А.В. Видмаченко // Журнал АМН Украины. – 2010. – Т. 16, № 1. – С. 23-27.

29. Коцюба А.Е. Иммуногистохимическое исследование H₂S-позитивных нейронов в некоторых структурах мозга человека при артериальной гипертензии / А.Е. Коцюба, В.М. Черток // Журнал неврологии и психиатрии. – 2012. – № 1. – С. 54-59.

30. Коцюба А.Е. Гистофизиология газотрансмиттерных систем нервнососудистых образований мозга: дисс. д.м.н. – ТГМУ. – Владивосток. – 2014. – 276 с.

31. Коцюба А.Е. Нитроксидергические нейроны бульбарного вазомоторного центра при артериальной гипертензии. / А.Е. Коцюба, В.М. Черток, Е.В Бабич // Журнал неврологии и психиатрии. – 2010 – № 2. – С. 61-65.

32. Коцюба А.Е. Нитроксидергические нервы внутримозговых сосудов /
А.Е. Коцюба, Е.П. Коцюба, В.М. Черток // Морфология. – 2009. – Т. 135, № 2. –
С. 27-32.

33. Коцюба А.Е. Пространственная организация серотонинергических и нитроксидергических нейронов в некоторых ядрах бульбарного отдела сердечнососудистого центра человека // А.Е. Коцюба, В.М. Черток // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2010. – № 4. – С. 43-46.

34. Коцюба А.Е. Распределение НАДФН-диафоразы и ферментов синтеза сероводорода в стенке артерий головного мозга. / А.Е. Коцюба // Вестник новых мед. технологий. – 2011. – Т. XVIII, № 2. – С. 255.

35. Кравченко Н.А. Биохимические и молекулярно-генетические механизмы регуляции синтеза оксида азота эндотелиальной NO-синтазой в норме и при сердечно-сосудистой патологии / Н.А. Кравченко, Н.В. Ярмыш // Украинский терапевтический журнал. – 2007. – № 1. – С. 82-89.

36. Кравченко Н.А. Регуляция экспрессии эндотелиальной NO-синтазы и дисфункция сосудистого эндотелия при сердечно-сосудистой патологии / Н.А. Кравченко, Н.В. Ярмыш // Цитология и генетика. – 2008. – № 4. – С. 69-79.

37. Лазуко С.С. Роль индуцированной NO-синтазы в эндотелий-зависимой регуляции тонуса артериальных сосудов при адаптации короткими стрессовыми воздействиями / С.С. Лазуко, А.Т. Солодков, К.А. Шимен // Вестник Витебского Государственного медицинского университета. – 2013. – Т. 12, № 4 – С. 44-49.

38. Лохова С.С. Новая медико-биологическая модель функционирования замкнутого цикла оксида азота / С.С. Лохова // Современные проблемы науки и образования. – 2008. – № 4. – С. 22-29.

39. Львова О.А. К вопросу о роли оксида азота в норме и при патологии нервной системы / О.А. Львова, А.Е. Орлов, В.В. Гусев, О.П. Ковтун, Д.А. Чегодаев // Системная интеграция в здравоохранении. – 2010. – № 4(10). – С. 20-35.

40. Малахов В.А. Проблема оксида азота в неврологии: монография / В.А. Малахов, А.Н. Завгородняя, В.С. Лючко, Т.Т. Джанилидже, Ф.А. Волох // Харьков, – 2009. – 242 с.

41. Малкоч А.В. Физиологическая роль оксида азота в организме (часть 1) /
А.В. Малкоч, В.Г. Майданник, Э.Г. Курбанова // Нефрология и диализ. – 2000. –
Т. 2, № 1. – С. 454-455.

42. Манухина Е.Б. Роль оксида азота и кислородных свободных радикалов в патогенезе артериальной гипертензии/ Е.Б. Манухина, И.Ю. Малышев, С.В. Лялина, С.Ю. Машина, Н.П. Лямина, А.А. Пакидешев, П.В. Долотовская // Кардиология. – 2002. – № 11. – С. 73-83.

43. Маянская С.А. Артериальная гипертония и дисфункция эндотелия: обзор / С.А. Маянская А.А. Попова, Н.Н. Маянская, Е.Н. Березикова, Л.Д. Хидирова // Вестник современной клинической медицины. – 2009. – Т. 2, № 3. – С. 43-48.

44. Меньщикова Е.Б. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, В.П. Реутов // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 4. – С. 485-503.

45. Метельская В.А. Оксид азота: роль в регуляции биологических функций, методы определения в крови человека / В.А. Метельская, Н.Г. Гуманова // Актуальные проблемы сердечнососудистой патологии. – 2005. – № 7. – С. 19-24.

46. Мотавкин П.А. Введение в нейробиологию: уч. пособие / П.А. Мотавкин // Владивосток: Медицина ДВ. – 2003. – 252 с.

47. Мясоедова О.Г. Роль сероводорода в реализации физиологических функций организма: обзор / О.Г. Мясоедова, В.И. Коржов // Журнал НАМН Украіни. – 2011. – Т. 17, № 3. – С. 191-200.

48. Новицкий В.В. Регуляция апоптоза клеток с использованием газовых трансмиттеров (оксид азота, монооксид углерода и сульфид водорода) / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.Г. Старикова, Л.А. Таширева // Вестник науки Сибири. – 2011. – № 1(1). – С. 635-640.

49. Обухов Д.К. Газообразные медиаторы в ЦНС позвоночных животных / Д.К. Обухов, Е.В. Пущина, А.А. Вараксин // Успехи современного естествознания. – 2011. – № 12. – С. 49-51.

50 Овсянников Ф.В. Тонические и рефлекторные центры сосудистых нервов / Ф.В. Овсянников. Избранные произведения // М. – 1955. – С. 57-64.

51 Осипенко А. Роль системы оксида азота в процессах адаптации организма к физическим нагрузкам / А. Осипенко // Наука в олимпийском спорте. – 2014. – № 1. – С. 23-30.

52. Парахонский А.П. Значение оксида азота в развитии патологии / А. П. Парахонский // Фундаментальные исследования. – 2007. – № 5 – С. 48.

53. Паронян Ж. А. Роль окиси азота в образовании и устранении аммиака в печеночной ткани / Г. С. Мисакян, Г. А. Туршян, Г. В. Априкян // Доклады Национальной Академии наук Армении. Биохимия. – 2007. – Т. 107, № 1. – С. 79-86.

54. Паршина С.С. Биологические эффекты оксида азота в развитии кардиоваскулярной патологии как основа терагерцовой терапии / С.С. Паршина, Т.Н. Афанасьева, В.Д. Тупикин // Бюллетень медицинских интернет-конференций. – 2012. – Т.2, № 6. – С. 446-452.

55. Паршина С.С. Современные представления о биологических эффектах оксида азота и его роли в развитии кардиоваскулярной патологии / С.С. Паршина // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2006. – № 1. – С. 88-94.

56. Пиридина И.З. Структурная характеристика ядер ствола головного мозга белых крыс в постнатальном онтогенезе в норме и после внутриутробной гипоксии: дис. канд. мед. наук. – Омск. – 2009. – 123 с.

57. Пущина Е.В. Сероводород как модулятор ГАМК-эргической нейротрансмиссии в ЦНС карпа CARPINUS CARPIO / Е.В. Пущина, Д.К. Обухов // Современные проблемы физиологии и биохимии. – 2010. – № 2. – С. 148-149.

58. Рязанцева Н.В. Внутриклеточные газовые посредники оксид азота, монооксид углерода и сульфид водорода участвуют в регуляции апоптоза / Н.В. Рязанцева, Е.Г. Старикова, Л.А. Таширева, Е.А. Степовая, Ю.В. Стариков, И.А. Осихов, В.В. Новицкий // Цитология. – 2012. – Т. 54, № 2. – С. 105-111.

59. Самосудова Н.В. Образование нейроглиальных контактов при электрической стимуляции и воздействии NO-генерирующего соединения / Н.В. Самосудова, В.П. Реутов, Н.П. Ларионова, Л.М. Чайлахем // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2007. – № 3(9) – С. 127-134.

60 Саркисов С.А. Атлас мозгового ствола человека и животных / С.А. Саркисов. – Изд-во: М.: Государственный институт мозга. – 1947. – 80 с.

61 Северьянова Л.А. Механизмы действия аминокислоты L-аргинина на нервную и иммунную регуляторные системы / Л.А. Северьянова, И.И. Бобынцев: обзор // Человек и его здоровье. – 2006. – № 3. – С. 60-75.

62. Ситдикова Г.Ф. Газообразные посредники как эндогенные модуляторы освобождения медиатора в нервно-мышечном синапсе : автореф. дисс. д. б. н. Казань. – 2008. – 46 с.

63. Скворцова В. И. Артериальная гипертония и головной мозг / В. И. Скворцова, А.Ю. Боцина, К.В. Кольцова, И.А. Платонова, К.И. Почигаева, К.В. Соколов, Т. В. Творогова // Журнал неврологии и психиатрии. – 2006. – № 10. – С. 68-78.

64. Смаглий Л.В. Роль Na⁺, K⁺, 2Cl⁻котранспорта в механизмах вазоконтрикторного действия сероводорода / Л.В. Смаглий // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – №2. – URL: http://www.science-education.ru/108-8675.

65. Смирнов А.В. Характеристика морфологических изменений гиппокампа старых крыс в результате стрессового воздействия. / А.В. Смирнов, И.Н. Тюренков, М.В. Шмидт, Г.Л. Снигур, В.Н. Перфилова, Н.В. Аксенова, Д.Д.

Бородин, В. И. Даниленко, П. А. Хлопонин, Н.В. Богомолова, Е.Н. Губанова // Вестник ВолгГМУ. – 2013. – № 2(46). – С. 14-17.

66. Сомова Л.М. Оксид азота как медиатор воспаления / Л.М. Сомова, Н.Г. Плехова // Вестник ДВО РАН. – 2006. – № 2. – С. 77-80.

67. Сорокина Е.Г. Оксид азота и нитритные ионы в энергетике нейронов мозжечка / Е.Г Сорокина, В.Г. Пенелис, В.П. Реутов, А.И. Юрявичус, Я.Е. Сенилова // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2007. – № 4(10). – С. 133-136.

68. Сосунов А.А. Оксид азота как межклеточный посредник / А.А. Сосунов // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 12. – С. 27-34.

69. Старикова Е.Г. Молекулярные механизмы действия газовых трансмиттеров при дизрегуляции апоптоза и пролиферации клеток линии Jurkat: дис. д.м.н: СГМУ. – Томск. – 2014. – 237 с.

70. Старцева М.С. Количественная оценка интенсивности гистохимических и иммуногистохимических реакций с применением стандартных компьютерных программ / М.С. Старцева, В.М. Черток // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2012. – № 1. – С. 121-123.

71. Старцева М.С. Применение методов системного анализа для оценки значимости изменений нитроксидергических нейронов в ядрах продолговатого мозга крыс при экспериментальной гипертензии / М.С. Старцева, А.Е. Коцюба, В.М. Колдаев // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2011. – № 3. – С. 61-64.

72. Старцева М.С. Пространственная организация газотрансмиттерных нейронов в мозге / М.С. Старцева, А.Е. Коцюба, В.М. Черток // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2015. – № 2. – С. 39-43.

73. Старцева М.С. Сравнительная характеристика NADPH-позитивных нейронов в ядрах продолговатого мозга человека и крысы / М.С. Старцева, Т.А. Шуматова, Л.Д. Маркина, В.М. Колдаев // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2012. – № 3. – С. 72-74.

74. Титов В.Н. Анатомические и функциональные основы эндотелийзависимой вазодилатации, оксид азота и эндотелий: обзор / В.Н. Титов // Российский кардиологический журнал. – 2008. – № 1. – С. 71-85.

75. Трещинская М.А. Особенности физиологии и патологии эндотелия сосудов головного мозга. Обзор современных представлений об эндотелиальной дисфункции // М.А. Трещинская, О.А. Ключникова, Ю.И. Головченко // Судинні захворювання головного мозку. – 2007. – № 4. – С. 24.

76. Турин, А.В. Функциональная роль оксида азота в центральной нервной системе / А.В. Турин // Успехи физиологических наук. – 1997. – Т. 28. – С. 53-60.

77. Хаютин В.М. Традиционные и новые представления о вазомоторном центре / В.М. Хаютин // Физиологический журнал СССР. – 1982. – Т. 68, № 8. – С. – 1032-1040.

78. Хрулев С.В. Солокализация серотонина и нитрооксидсинтазы в нейронах подкоркового белого вещества мозга человека / С.В. Хрулев, И.В. Дюйзен // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2004. – №2. – С. 23-26.

79. Худоерков Р.М. Методы компьютерной морфометрии в нейроморфологии: учебное пособие / Р.М. Худоерков // Москва. – ФГБУ НЦН РАМН. – 2014. – 53 с.

80. Цырлин В.А. Бульбарный вазомоторный центр – морфофункциональная и нейрохимическая организация / В.А. Цырлин // Артериальная гипертензия. – 2003. – Т. 9, № 3. – С.44-53.

81. Черток В.М. H₂S-позитивные нейроны в некоторых ядрах сердечнососудистого центра головного мозга крысы / В.М. Черток, А.Е. Коцюба // Морфология. – 2012. – Т. 141. – № 1. – С. 28-33.

82. Черток В. М. NO-позитивные нейроны в некоторых ядрах бульбарного вазомоторного центра человека при артериальной гипертензии / В.М. Черток, А.Е. Коцюба // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 147, № 5. – С. 571-575.

83. Черток В. М. Газообразные посредники в регуляции функций сосудов микроциркуляторного русла / В.М. Черток, А.Е. Коцюба, М.С. Старцева // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2012. – Т. 18. – С. 58-59.

84. Черток В.М. Гемоксигеназа-2 в нейронах головного и спинного мозга человека / В.М. Черток, А.Е. Коцюба, Е.П. Коцюба // Вестник РАМН РФ. – 2012.
– № 6. – С. 36-41.

85. Черток В. М. Два пула интернейронов в бульбарном отделе сердечнососудистого центра крыс / В.М. Черток, А.Е. Коцюба, Е.П. Коцюба, М.С. Старцева // Доклады Академии наук. – 2015. – Т 463, № 5. – С. 619-623.

86. Черток В.М. Иммуногистохимическая характеристика H₂S-нейронов в ядрах бульбарного отдела сердечно-сосудистого центра при развитии вазоренальной гипертензии / В.М. Черток, А.Е. Коцюба // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2012. – № 4. – С. 50-54.

87. Черток В.М. Иммунолокализация газотрансмиттеров в межъядерных интернейронах продолговатого мозга у крыс / В.М. Черток, А.Е. Коцюба, М.С. Старцева, Е.П. Коцюба // Нейрохимия. – 2016. – Т. 33, № 2. – С. 95-102.

88. Черток В.М. Иммунолокализация гемоксигеназы-2 в нейронах сосудодвигательного центра человека при артериальной гипертензии / В.М. Черток, А.Е. Коцюба // Журнал неврологии и психиатрии. – 2013. – №2. – С. 44-48.

89. Черток В.М. Морфофункциональная организация бульбарного отдела сердечно-сосудистого центра / В.М. Черток, А.Е. Коцюба // Владивосток: Медицина ДВ. – 2013. – 164 с.

90. Черток В.М. Нитроксидергические нейроны в некоторых ядрах продолговатого мозга человека и крысы. / В.М. Черток, А.Е. Коцюба, Е.В Бабич // Цитология. – 2009. – Т. 51, № 7. – С 612-615.

91. Черток В.М. Новые нейротрансмиттеры и их роль в центральных механизмах регуляции кровообращения / В.М. Черток, А.Е. Коцюба // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2013. – № 4. – С. 27-36.

92. Черток В.М. Оксид азота в механизмах афферентной иннервации артерий головного мозга / В.М. Черток, А.Е. Коцюба // Цитология. – 2010. – Т. 52, № 1. – С. 24-28.

93. Черток В. М. Особенности распределения нейрональной NO-синтазы и NADPH-диафоразы в ядрах головного и спинного мозга / В.М. Черток, А.Е. Коцюба, А.Г. Черток, Е.П. Коцюба, Т.А. Ботвич, Т.А. Кожевникова, Н.В. Вольская // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2013. – №11-1. – С. 22-23.

94. Черток В.М. Применение автоматизированной системы анализа изображений Allegro-MC для морфометрических исследований / В.М. Черток, А.А. Афанасьев, А.Е. Коцюба // Морфология. – 2003. – № 4. – С. 88-93.

95. Черток В.М. Применение метода компьютерного совмещения изображений для топохимического картирования нейронов мозга. / В.М. Черток, А.Е. Коцюба, М.С. Старцева // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2014. – № 3. – С. 77-79.

96. Черток В.М. Применение пиксельного метода в количественной оценке результатов гистохимических исследований / В.М. Черток, М.С. Старцева, А.Е. Коцюба // Морфология. – 2012. – Т. 142, № 5. – С. 71-75.

97. Черток В.М. Рецепторный аппарат сосудов головного мозга при артериальной гипертензии / В.М. Черток, А.Е. Коцюба // Журнал неврологии и психиатрии. – 2010. – № 10. – С. 40-47.

98. Черток В.М. Серотонин- и нитроксидергические нейроны в ядрах продолговатого мозга крыс. / В.М. Черток, А.Е. Коцюба, Е.П. Коцюба // Цитология. – 2011. – Т. 53, № 6. – С. 498-504.

99. Черток В.М. Сравнительная характеристика uNOS-позитивных структур в ЦНС некоторых видов ракообразных / В.М. Черток, Е.П. Коцюба // Цитология. – 2015. – Т. 57. – № 8. – С. 584-591.

100. Черток В.М. Топохимия межъядерных и внутриядерных интернейронов вазомоторной области продолговатого мозга у гипертензивных крыс / В.М.
Черток, А.Е. Коцюба, М.С. Старцева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 160, № 9. – С. 374-376.

101. Черток В.М. Цистатионин β-синтаза в структурных элементах головного и спинного мозга человека / В.М. Черток, А.Е. Коцюба // Цитология. – 2011. – Т. 53, № 8. – С. 664-669.

102. Шиманская Т.В. Влияние сероводорода на функциональное состояние и резервные возможности миокарда / Т.В. Шиманская, Ю.В. Гошовская, В.Ф. Сагач // Reports of the National Academy of Ukraine. – 2013. – № 1. – С. 156-161.

103. Шляхто Е.В. Клеточные аспекты ремоделирования сосудов при артериальной гипертензии: обзор / Е.В. Шляхто, О.М. Маисеева // Артериальная гипертензия. – 2003. – Т. 3, № 9. – С. 77-81.

104. Щудло М. М. Колориметрический анализ микропрепаратов суставного хряща наружного мыщелка бедра при удлинении голени в эксперименте. / М.М. Щудло, Т.А. Ступина // Украинский журнал телемедицины. – 2008. – Т. 6, № 2. – С. 17-22.

105. Юнкеров В.И. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований / В.И. Юнкеров, С.Г. Григорьев, М.В. Резванцев // Изд. Военно-мед. ордена Ленина академии им. Кирова. – 2011. – 320 с.

106. Abe V. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator / V. Abe, H. Kimura // Journal of Neuroscience. – 1996. – №. 16. – P. 1066-1071.

107. Aicher S.A. Monosynaptic projections from the medullary gigantocellular reticular formation to sympathetic preganglionic neurons in thoracic spinal cord / S.A. Aicher, D.J. Reis, R. Nicolae, T.A. Milner // Journal of Comparative Neurology. – 1995. – N_{2} . 363(4). – P. 563-580.

108. Ali M.Y. Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide / M.Y. Ali, C.Y. Ping, Y.Y. Mok // British Journal of Pharmacology. -2006. $- N_{\odot}$. 149. - P. 625-634.

109. Alkadi K.A. Retrograde carbon monoxide is required for induction of longterm potentiation in rat superior cervical ganglion / K.A. Alkadi, R.S. Al-Hijailan, K. Malik, et al // Journal of Neuroscience. – 2001. – No. 21(10). – P. 3515-3520.

110. Andresen J.J. Effects of carbon monoxide and heme oxygenase inhibitors in cerebral vessels of rats and mice / J.J. Andresen, N.I. Shafi, W. Durante, R.M. Bryan // American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology – 2006. –Vol. 291. – P. 223-230.

111. Araujo J.A. Heme oxygenase-1, oxidation, inflammation, and atherosclerosis / J.A. Araujo, M. Zhang, F. Yin // Frontiers in Pharmacology. – 2012. – Vol. 3. – P. 1-17.

112. Arevalo R. NADPH-diaphorase in the central nervous system of the tench /
R. Arevalo, J.R. Alonso, E Garcia-Ojeda // Journal of Comparative Neurology. – 1995.
– №. 352. – P. 398-420.

113. Attene-Ramos M.S. Evidence that hydrogen sulfide is a genotoxic agent / M.S. Attene-Ramos, E.D. Wagner, M.J. Plewa, H.R. Gaskins // Molecular Cancer Research. $-2006. - N_{\odot}. 4. - P. 9-14.$

114. Benarroch E.E. Localization and possible interactions of catecholamine-and NADPH-diaphorase neurons in human medullary autonomic regions / E.E. Benarroch // Brain Research. – 1995. – Vol. 684, – N_{\odot} . 2. – P. 215-220.

115. Bhatia M. Role of substance P in hydrogen sulfide-induced pulmonary inflammation in mice / M. Bhatia, L. Zhi, H. Zhang, S.W. Ng, P.K. Moore // American Journal of Physiology. Lung Cellular Molecular Physiology. – 2006. – Vol. 291. – P. 896-904.

116. Bredt D.S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology / D.S. Bredt // Free Radical Research. – 1999. – Vol. 31. – P. 577-596.

117. Bucci M. Hydrogen sulphide is involved in testosterone vascular effect / M. Bucci, V. Mirone, A. Di Lorenzo // European Urology – 2009. – Vol. 56. – P. 378-383.

118. Calabrese V. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity / V. Calabrese, C. Mancuso, M. Calvani, E. Rizzarelli, D. A. Butterfield, A. M. Giuffrida // Nature Publishing Group Neuroscience. – October 2007, – P. 766-774. 119. Catalano C. Blood pressure control: hydrogen sulfide, a new gasotransmitter, takes stage / C. Catalano, S. Rastelli // Nephrology Dialysis Transplantation. – 2009. – Vol. 24, № 5. – P. 1394-1396.

120. Cauli B. Revisiting the role of neurons in neurovascular coupling / B. Cauli,
E. Hemel // Front Neuroenergetics. – 2010 – № 2(9) – P. 1-9.

121. Cauli B. Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: relays for subcortical vasoactive pathways / B. Cauli, X.K. Tong, A. Rancillac, et al. // Journal of Neuroscience. -2004. - Vol. 41. - No 24. - P. 8940-8949.

122. Chalmers JP. Bulbospinal serotonin pathways and hypotensive action of methyldopa in the rat / J.P. Chalmers, J.B. Minson, V. Choy // Hypertension. – 1984. – Vol. $6. - N_{2} 5. - P. 16-21.$

123. Chertok V.M. Cystathionine β -Synthase in structural elements of human brain and spinal cord / V.M. Chertok, A.E. Kotsyuba, E.P Kotsyuba // Cell and Tissue Biology. – 2011. – Vol. 5 – Nº 6. – P. 573-579.

124. Chertok V.M. Neurons in Nuclei of Rat and Human Medulla Oblongata / V.M. Chertok, A.E. Kotsyuba, E.V. Babich // Cell and Tissue Biology. – 2009. – Vol. 3. – N_{2} 4. – P.335-339.

125. Chertok V.M. Serotoninergic and Nitroxidergic Neurons in the Nuclei of the Medulla Oblongata in the Rat / V.M. Chertok, A.E. Kotsyuba, E.P Kotsyuba // Neuroscience and Behavioral Physiology. – 2012. – Vol. 42. – №. 5. – P. 526-531.

126. Coletta C. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. / C. Coletta, A. Papapetropoulos, K. Erdelyi, G. Olah, K. Modis, P. Panopoulos, A. Asimakopoulou, D. Gero, I. Sharina, E. Martin, C. Szabo // Proceedings of National Academy of Sciences of USA. – 2012. – 109(23) – P. 9161-9166.

127. Crosswhite P. Nitric oxide, oxidative stress and inflammation in pulmonary arterial hypertension / P. Crosswhite, Z. Sun // Journal of Hypertension. – 2010. Vol. 28. –P. 201-212.

128. Dahlstrom A. Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system / A. Dahlstrom, K. Fuxe // Acta Physiologica. – 1964. – SUPPL 232:1-55.

129. Dallas M.L. Carbon monoxide protects against oxidant-induced apoptosis via inhibition of Kv2.1 / M.L. Dallas, J.P. Boyle, C.J. Milligan // The FASEB Journal. – 2011. – Vol. 25. – P. 1-12.

130. Dawe G.S. Hydrogen sulphide in the hypothalamus causes an ATP-sensitive K+ channel-dependent decrease in blood pressure in freely moving rats / G.S. Dawe, S.P. Han, J.S. Bian, P.K. Moore // Neuroscience. – 2008. – Vol. 152. – P. 169-177.

131. Distrutti E. The methionine connection: homocysteine and hydrogen sulfide exert opposite effects on hepatic microcirculation in rats / E. Distrutti, A. Mencarelli, L. Santucci, et al. // Hepatology. – 2008. – Vol. 47. – P. 659-667.

132. Distrutti E. Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels / E. Distrutti, L. Sediari, A. Mencarelli // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2006. – Vol. 316. – P. 325-335.

133. Dun NJ. Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat pontine medullary neurons. / N.J. Dun, S.L. Dun, U. Förstermann // Neuroscience. – 1994 – V. 59. – № 2. – P. 429-445.

134. Egberongbe Y.I. The distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human brain / Y.I. Egberongbe, S.M. Gentleman, P. Falkai // Neuroscience. – 1994. – Vol. 59. – P. 561-578.

135. Ellenberger H.H. Nucleus ambiguous and bulbospinal ventral respiratory group neurons in the neonatal rat / H.H. Ellenberger // Brain Reseach Bulletin. – 1999. – Vol. 50, Nol. – P. 1-13.

136. Elliot L. Gray's Clinical Neuroanatomy: The Anatomic Basis for Clinical Neuroscience / L. Elliot, M.D. Moncall, G. David // Philadelphia. – 2013. – 433 p.

137. Esplugues JV. NO as a signalling molecule in the nervous system / J.V. Esplugues // British Journal of Pharmacology. – 2002. – Vol. 135 (5) – P. 1079-1095.

138. Gadalla M.M. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter / M.M. Gadalla, S.H. Snayder // Journal of Neurochemistry. – 2010. – Vol. 113. – P. 14-26.

139. Garcia-Bereguiain M.A. Hydrogen sulfide raises cytosolic calcium in neurons through activation of L-type Ca2+ channels / M.A. Garcia-Bereguiain, A.K. Samhan-Arias, F.J. Martin-Romero, C. Gutierrez-Merino // Antioxidants Redox Signaling. – 2008. – Vol. 10, No. 1. – P. 31-42.

140. Geng B. H_2S generated by heart in rat and its effects on cardiac function / B. Geng, J. Yang, Y. Qi // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2004. – Vol. 313, No 2. – P. 362-368.

141. Giraldez-Perez R.M. Distribution of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase reactivity in the central nervous system of the goldfish (Carassiusauratus) / R.M. Giraldez-Perez R.M., S.P. Gaytan S.P., D. Ruano // Journal Chemical Neuroanatomy. – 2008. – Vol. 35, No. 1. – P. 12-32.

142. Granata A.R. Intracellular analysis in vivo different barosensitive bulbospinal neurons in the rat rostral ventrolateral medulla / A.R. Granata, S.T. Kitai // Journal Neuroscience. – 1992. – \mathbb{N}_{2} . 12. – P. 1-20.

143. Hermann A. Gasotransmitters: Physiology and Pathophysiology / A. Hermann, G.F. Sitdikova, T.M. Weiger // Berlin : Springer-Verlag. – 2012. – 204 p.

144. Hogg N. Nitric oxide expands scope to cover hydrogen sulfide and carbon monoxide / N. Hogg // Nitric Oxide. – 2013. – Vol. 35. – P. 1-3.

145. Hope B.T. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase /
B.T. Hope, S.R. Vincent // Journal of Neurochemistry and Cytochemistry. – 1989. –
Vol. 37. – P. 653-661.

146. Hovater M.B. Nitric oxide and carbon monoxide antagonize TGF-through ligandindependent internalization of TR1/ALK5 / M.B. Hovater, W.-Zh. Ying, A. Agarwal, P.W. Sanders // American Journal of Physiology. Renal Physiology. – 2014 Vol. $307. - N_{\odot}. 6. - P. 727-735.$

147. Huang C.C. cGMP/Protein Kinase G-Dependent Potentiation of Glutamatergic Transmission Induced by Nitric Oxide in Immature Rat Rostral

Ventrolateral Medulla Neurons in Vitro / C.C. Huang, SHH. Chan, K.S. Hsu // Molecular Pharmacology. – 2003. – Vol. 64. – P. 521-532.

148. Jaggar J.H. Heme is a carbon monoxide receptor for large-conductance Ca2+-activated K+-channels / J.H. Jaggar, A. Li, H. Parfenova // Circulation Research. – 2005. – Vol. – 97(8). – P. 805-812.

149. Jang G. Direct stimulation of KATP channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells / G. Jang, L. Wu, W Liang // Molecular Pharmacology. – 2005. – Vol. 68. – P. 1757-1764.

150. Jin R.C. Vascular nitric oxide: formation and function / R.C. Jin, J Loscalzo // Journal of Blood Medicine. $-2010. - N_{2} 1. - P. 147-162.$

151. Jones W. Heme Oxygenase-1deficiency leads to alteration of soluble guanylate cyclase redox regulation / W. Jones, W. Durante, R.J. Korthuis // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2010. – Vol. 335 (1) – P.85-91.

152. Kadekaro M. Role of NO on vasopressin and oxytocin release and blood pressure responses during osmotic stimulation in rats / M. Kadekaro, H. Liu, M.L. Terrell // American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. – 1997. – Vol. 273. – P. 1024-1030.

153. Kajimura M. Interactions of multiple gas-transducing systems: hallmarks and uncertainties of CO, NO, and H₂S gas biology / M. Kajimura, R Fukuda, R.M Bateman, et al. // Antioxid Redox Signal. – 2010. – Vol. 13, No. 2. – P. 157-192.

154. Kashihara K. Neuropeptide Y in the rostral ventrolateral medulla blocks somatosympathetic reflexes in anesthetized rats / K. Kashihara, S. McMullan, T. Lonergan et al. // Autonomic Neuroscience. – 2008. – Vol. 142, № 1-2. – P. 64-70.

155. Kaushik P.P. Role of nitric oxide in central sympathetic outflow / P.P. Kaushik, L. Yi-Fan, H. Yoshitaka // Experimental Biology and Medicine. – 2001. – Vol. 226. – P. 814-824.

156. Kazuhiro S. Expression and regulation of endothelial nitric oxide synthase /
S. Kazuhiro, T Michel // TCM. – 1997. – №7 (1). – P. 28-37.

157. Kim Y.M. Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities / Y.M. Kim, H.O. Pae, J.E. Park // Antioxidants and Redox Signaling. – 2011. – Vol. 14. – \mathbb{N} 1. – P. 137-167.

158. Kimura Y. Overexpression of inducible nitric oxide synthase in rostral ventrolateral medulla causes hypertension and sympathoexcitation via an increase in oxidative stress / Y. Kimura, Y. Hirooka, Y. Sagara // Circulation Research. – 2005. – Vol. 96. – P. 252-260.

159. Kluchova D. Neuronal nitric oxide synthase in the rabbit spinal cord visualized by histochemical NADPH-diaphorase and immunohistochemical NOS methods / D. Kluchova, R. Klimcik, P. Kloc // General Physiology Biophysics. – 2002. – N_{21} . – C. 163-174.

160. Kondo K. H₂S protects against pressure overload-induced heart failure via upregulation of endothelial nitric oxide synthase / K. Kondo, S. Bhushan, A.L. King, S.D. Prabhu, T. Hamid, S. Koenig, B.L. Predmore, G.Sr. Gojon, G.Jr. Gojon, R. Wang, N. Karusula, C.K. Nicholson, J.W. Calvert, D.J. Lefer // Circulation Research.. – 2013. – N_{2} . 127. – P. 1116-1127.

161. Kumagai H. Importance of rostral ventrolateral medulla neurons in determining efferent sympathetic nerve activity and blood pressure / H. Kumagai, N. Oshima, T. Matsuura // Hypertension Research. – 2012. – Vol. 35. – P. 132-141.

162. Kuo T.B. Altered freguency characteristic of central vasomotor control in SHR / T.B. Kuo, C.C. Yang // American Journal of Physiology. – 2000. – № 278. – P 201-207.

163. Lamon B.D., Zhang F.F., Puri N. et al. Dual pathways of carbon monoxidemediated vasoregulation: modulation by redox mechanisms // Circ. Res. – 2009. – Vol. 105. – P. 775-783.

164. Leffler Ch.W. Carbon monoxide as an endogenous vascular modulator / B.D. Lamon, F.F. Zhang, N. Puri // American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology. – 2011. – Vol. 301. – P. 1-11.

165. Leffler Ch.W. Contributions of astrocytes and CO to pial arteriolar dilation to glutamate in newborn pigs / Ch.W. Leffler, H. Parfenova, Sh. Basuroy // American

Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology. – 2011. – Vol. 300, № 3. – P. 440-447.

166. Li L. Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation – a tale of thee gases! / L. Li, A. Hsu, P.K. Moore // Pharmacology, Therapeutics. – 2009. – Vol. 123. – P. 386-400.

167. Lo W.C. Cystein 184 of endothelial nitric oxide synthase is involved in heme coordination and catalytic activity / W.C. Lo, P.J. Lu, W.Y. Ho //. Journal of Pharmacology and Experimental Therapiutics. – 2006. – Vol. 318 (1). – P. 8-16.

168. Lowicka E. Hydrogen sulfide – the third gas of interest for pharmacologists /
E. Lowicka, J. Beltowski // Pharmacology Reports. 2007. – Vol. 59. – P. 4-24.

169. Lundberg J.O. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics / J.O. Lundberg, M.T. Gladwin, A. Ahluwalia, et al // Nature Chemical Biology. -2009. - Vol. 5. $- N_{2} 12. - P. 865-869.$

170. Ma S.X. Cardiovascular regulation and expressions of NO synthase-tyrosine hydroxylase in nucleus tractus solitaries of ovine fetus / S.X. Ma, Q. Fang, B. Morgan, et al. // American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology. – 2003, Vol. 284. – N_{2} 4. P. 1057-1063.

171. Mathai J.C. NO facilitator required for membrane transport of hydrogen sulfide / J.C. Mathai, A. Missner, P. Kugler et al. // PNAS. – 2009. – Vol. 106. – P. 16633-16638.

172. McAllen R.M. Mediation of fastigial pressor response and a somatosympathetic reflex by ventral medullary neurons in the cat / R.M. McAllen // Journal of Physiology. – 1985. – N_{2} . 368. – P. 423-433.

173. Naik I.S. Heme-oxygenase-mediated vasodilation involves vascular smooth muscle cell hyperpolarization / I.S. Naik, B.R. Walker // American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology. – 2003. – Vol. 43. – P. 15-26.

174. Patel K.P. Role of nitric oxide in central sympathetic outflow / K.P. Patel, Y.-F. Li, Y. Hirooka // Experimental Biology and Medicine. – 2001. – Vol. 226. – P. 814-824.

175. Paxinos G. The rat brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, Ch. Watson // New York. Academic Press. – 1998 – 474 p.

176. Peers Ch. Ion channels as effectors in carbon monoxide signaling / Ch. Peers, M.L. Dallas, J.L Scragg // Communicative and Integrative Biology. – 2009. – Vol. 2. – P. 241-242.

177. Pitkanen A. Distribution of parvalbuminimmuno reactive cells and fibers in the monkey temporal lobe: The hippocampal formation / A. Pitkanen, D.G. Amaral // Journal of Comparative Neurology. – 1993. – Vol. 331. – P. 37-74.

178. Pushchina E.V. Cystathionine β-synthase in the CNS of masu salmon Oncorhynchus masou (Salmonidae) and carp Cyprinus carpio (Cyprinidae) / E.V. Pushchina, A.A. Varaksin, D.K. Obukhov // Neurochemistry Journal. – 2011. – Vol. 5. – N_{2} . 1. – P. 24-34.

179. Rahn K.Y. The sympathetic nervous system in the pathogenesis of hypertension / K.Y. Rahn, M. Barenbrock, M. Hausberg // Journal of Hypertension. – 2000. – 17(suppl.3). – P 11-14.

180. Reis D.J. Sympatho-excitatory neurons of the rostral ventrolateral medulla are oxygen sensors and essential elements in the tonic and reflex control of the systemic and cerebral circulations / E.V Golanov, D.A Ruggiero, M.K Sun // Journal of Hypertension. – 1994. – 12 (10): S159–80.

181. Ryter St.W. Heme-oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications / St.W. Ryter., J. Alam., A. Choi // Physiological Reviews. – 2008. – Vol. 86. – P. 583-650.

182. Scherer-Singler U. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase hisstochemistry / U. Scherer-Singler, S.R. Vincent, H. Kimura, E.G. McGeer // Journal of Neuroscience. Methods. – 1983. – Vol. 9, № 3. – P. 229-234.

183. Skovgaard N. The Role of Endogenous H₂S in Cardiovascular Physiology /
N. Skovgaard, A. Gouliaev, M. Aalling // Current. Pharmaceutical Biotechnology. –
2011. – Vol. 12. – P. 1385-1393.

184. Stec D.E., Drummond H.A., Vera T. Role of carbon monoxide in blood pressure regulation / D.E. Stec, H.A. Drummond, T. Vera // Hypertension. – 2008. – Vol. 51. – P. 597-604.

185. Tan B.H. Hydrogen sulphide: A novel signaling molecule in the central nervous system / B.H. Tan, P.T. Wong H., J.S. Bian // Neurochemistry International. – 2010.-56, No 1. - P. 3-10.

186. Ugrumov M.V. Non-dopaminergic neurons partly expressing dopaminergic phenotype: distribution in the brain, development and functional significance / M.V. Ugrumov // Journal of Chemical Neuroanatomy. – 2009. – Vol. 38. – P. 241-256.

187. Vincent S.R. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system / S.R. Vincent // Progress in Neurobiology. – 1994. – V. 42. – P. 129-160.

188. Wagner C.A. Hydrogen sulfide: a new gaseous signal molecula and blood pressure regulator / C.A. Wagner // Journal of Nephrology. – 2009. – V. 22(2). – P. 173-176.

189. Wang R. Signal Transduction and the Gasotransmitters. NO, CO and H_2S in Biology and Medicine / R. Wang // Humana Press. Saskatoon. Canada. – 2004.–378 p.

190. Wang R. Signaling pathways for the vascular effects of hydrogen sulfide / R. Wang // Current Opinion. Nephrology Hypertension. – 2011. – Vol. 20(2). –P. 107-112.

191. Wilkinson W.J. Carbon monoxide: an emerging regulator of ion channels /
W.J. Wilkinson, P.G Kemp // Journal of Physiology. – 2011. – Vol. 589. – № 13. – P.
3055-3062.

192. Wu L. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions and pharmacological applications / L. Wu, R. Wang // Pharmacological Reviews. – 2005. – Vol. 57. – P. 585-630.

193. Xu Y. Adrenomedullin in the rostral ventrolateral medulla increases arterial pressure and heart rate: roles of glutamate and nitric oxide / Y. Xu, T.L. Krukoff // American Journal of Physiology. Regulatory Integrative and Comparative Physiology. – 2004. – V.287, N_{2} 4. – P. 729-734.

194. Yun K.Ch. Correlative changes of endothelial nitric oxide synthase and choline acetyltransferase in the hippocampus after exercise / K.Ch. Yun, Z. Jinji, C. Gyu-seong // The Korean Journal of Anatomy. – 2008. – Vol. 41, No. 3. – P. 185-192.

195. Zhao Y. Hydrogen sulfide (H_2S) releasing agents: chemistry and biological applications / Y. Zhao, T.D. Biggsa, M. Xian // Chemical Communications. – 2014. – Vol. 50. – P. 11788-11805.

196. Zuidema M.Y. Antecedent hydrogen sulfide elicits an anti-inflammatory phenotype in postischemic murine small intestine:role of BK channels / M.Y. Zuidema, Y. Yang, M. Wang, et al. // American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology. – 2010. – Vol. 299(5). – P. 1554-1567.