

1. Автандилов Г. Г., Яблучанский Н. И., Губенко В. Г. Системная стереометрия в изучении патологического процесса.— М.: Медицина, 1981.— 191 с.
2. Коростышевская И. М. Сравнительная характеристика и критерии идентификации эндокринных клеток желудка и двенадцатиперстной кишки: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Новосибирск, 1981.— 18 с.
3. Синявская И. М., Виноградова М. С. Исследование ультраструктуры эндокринных клеток желудка голодных и накормленных неполовозрелых крыс // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1981.— 91, № 2.— С. 238—241.
4. Canese M. G., Bussolati G. Immuno-electron-cytochemical localization of the somatostatin cells in the human antral mucosa // J. Histochem. and Cytochem.— 1977.— 25, N 10.— P. 1111—1118.
5. Chayvialle J. A. Somatostatine: physiologia et pathologia // Acta gastro-enterol. Belg.— 1982.— 45, N 7/8.— P. 311—321.
6. Chiba T., Taminato T., Kadowaki S. et al. Effects of glucagon, secretin and VIP on gastric somatostatin and gastrin release from isolated perfused rat stomach // Gastroenterology.— 1980.— 79, N 11.— P. 67—71.
7. Du Val J. M., Saffouri B., Weir G. C. et al. Release of gastrin and somatostatin by bombesin in the isolated perfused stomach // Ibid. 78, N 5, Part 2.— P. 1161.
8. Farquhar M. G. Membrane recycling in secretory cells: existence of multiple pathways involving Golgi cisternae, secretory granules and lysosomes // Cellular basis of chemical messengers in the digestive system: UCLA forum in medical sciences N 23.— New York: Acad. press, 1981.— P. 43—54.
9. Forssmann W. G., Helmstaedter V., Metz J. et al. Immunohistochemistry and ultrastructure of somatostatin cell with special reference to the gastroenteropancreatic system // Metabolism, 1978.— 27, N 9, Suppl. I.— P. 1179—1191.
10. Fujita T., Kobayashi S. Experimentally induced granule release in the endocrine cells of the dog pyloric antrum // Z. Zellforschung.— 1971.— 116.— P. 52—60.
11. Helmstaedter V., Feurle G. E., Forssmann W. G. Relationship of glucagon — somatostatin and gastrin-somatostatin cells in the stomach of the monkey // Cell and Tissue Res.— 1977.— 177, N 1.— P. 29—46.
12. Horvath E., Kovacs K., Stratmann I. E., Ezrin C. Two distinct types of microfilaments in the cytoplasm of human adenohypophyseal cells // Electron microscopic Concepts of secretion. Ultrastructure of endocrine and reproductive organs.— New York; Toronto, 1975.— P. 271—286.
13. Konturek S. J. Gastrointestinal Hormones and gastric secretion // Gastrointestinal hormones.— New York, 1980.— P. 529—564.
14. Osaka M., Sasagawa T., Fujita T. Emiocytotic granule release in the human antral endocrine cells // Gastro-entero-pancreatic endocrine system.— Stuttgart, 1974.— P. 59—63.
15. Polak J. M., Pearse A. G. E., Grimelius L. et al. Growth hormone release inhibiting hormone in gastrointestinal and pancreatic D-cells // Lancet.— 1975.— 1, N 1.— P. 1220—1222.
16. Rufener C., Amherdt M., Dubois M. P., érci C. Ultrastructural immunocytochemical localization of somatostatin in rat pancreatic monolayer culture // J. Histochem. and Cytochem.— 1975.— 23.— P. 866—869.
17. Schubert M. L., Makhlouf G. M. Regulation of gastrin and somatostatin secretion by intramural neurons. Effect of nicotinic receptor stimulation with dimethyl-phenylpiperazinium // Gastroenterology.— 1982.— 83, N 3.— P. 626—632.
18. Schubert M. L., Bitar K. N., Makhlouf G. M. Regulation of gastrin and somatostatin secretion by cholinergic and non — cholinergic intramural neurons // Ibid.— 82, N 5, Part 2.— P. 1172.
19. Saffouri B., Bitar K. N., Weir G. et al. Cholinergic stimulation of gastrin and inhibition of somatostatin secretion by the stomach in vitro // Ibid.— 1979.— 76. P. 1233.
20. Zaviacic M., Brozman M., Jakubovsky J. Influence of fasting and stimulation of the rat gastric endocrine cells. Histochemical and ultrastructural study // Histochemistry.— 1976.— 49, N 4.— P. 315—325.

Ин-т питания АМН СССР, Москва

Поступила 23.12.85

УДК 612.824.1:612.388—064

Проницаемость гематоэнцефалического барьера и гематонейронального барьера седалищного нерва для сывороточных белков у морских свинок

В. А. Горбань

Из многочисленных работ, посвященных исследованию проницаемости гематоэнцефалического барьера для различных веществ, только ограниченное их число посвящено изучению проникновения белков. Одна-

ко именно сведения о проникновении белков важны для установления локализации гематоэнцефалического барьера [1, 6, 7, 12]. Проведенные исследования выполнены в основном с помощью гетерологичных белков в качестве макромолекулярных маркеров. Целью настоящей работы явилось изучение проникновения нативных аутологичных сывороточных белков в различные отделы центральной нервной системы и в периферический нерв, а также сравнение проницаемости барьеров этих органов для аутологичных белков с проницаемостью для гетерологичных белков.

Методика

В первой серии опытов (12 здоровых морских свинок) исследовали проникновение в ткань центральной нервной системы и седалищного нерва собственных нативных сывороточных белков животных прямым и непрямым методами Кунса [4] с помощью таких сывороток: 1) против альбуминов морских свинок; 2) против глобулинов морских свинок; 3) против белков нативной сыворотки морских свинок. Антисыворотки были получены иммунизацией кроликов препаратами альбуминов, гамма-глобулинов и сыворотки морских свинок. Содержали антитела титра 1:20 000, определяемые в реакции кольцепреципитации. В прямом методе использовали также люминесцирующую сыворотку¹ кролика против глобулинов морской свинки серий 606 (контроль 5208) и 841 (контроль 6516), а в непрямом методе — люминесцирующую сыворотку барана против глобулинов кролика серии 532 (контроль 5126). Из полученных нами методом высаливания иммунных сывороток использовали иммуноглобулины, которые обессоливали на сефадексе Г-25 и истощали порошком печени крыс [9], как и препараты флюоресцирующих антител. Иммунофлюоресцентные исследования проведены на фоне необходимых контролей. Фиксация, проводка тканей и приготовление срезов (толщина 5—7 мкм) для обработки флюоресцирующими антителами проведены по Sainte-Marie [13].

Во второй серии опытов (10 здоровых морских свинок) вводили внутривенно меченую² изотиоцианатом флюоресцеина (ФИТЦ) сыворотку лошади (по 1 мл 3 %-ного раствора белков на 100 г массы животного). Ткани для исследования брали через 1 и 10 ч после введения сыворотки для наблюдения за проникновением белков из крови в ткани в ранний срок и период их максимального выхождения. Ткани замораживали в жидком азоте, и на криостате готовили срезы толщиной 5—7 мкм.

Флюоресцентную микроскопию срезов проводили в микроскопе МЛ-2 методом темного поля с применением возбуждающих светофильтров УФС-6-3 и СЗС-14-4 и запирающего ЖС-3-2 (светофильтр № 3 в тубусе микроскопа МЛ-2). Для идентификации структур проводили окраску параллельных срезов и срезов после флюоресцентного исследования гематоксилин-эозином.

Результаты и их обсуждение

Нативные аутологичные сывороточные альбумины, глобулины и другие сывороточные белки, выявленные с помощью специфических флюоресцирующих антител, обнаружены в просветах сосудов головного и спинного мозга, сосудов мягкой мозговой оболочки и ворсинчатых сплетений (рис. 1—3). У одной части сосудов сывороточные белки определяются в сорбированном виде на поверхности эндотелия, что идентифицируется по феномену ободка. В этих сосудах флюоресценция ярче по краю эндотелиальных клеток, где наблюдается узкая полоса свечения боковых проекций мембран клеток. У другой части сосудов сывороточные белки определяются диффузно в цитоплазме эндотелиоцитов. В ткани головного и спинного мозга мы не обнаружили сывороточные белки за пределами микроциркуляторных сосудов.

Нативные аутологичные иммуноглобулины и другие сывороточные белки выявлены в волокнах мягкой мозговой оболочки. Эти волокна

¹ Сыворотка производится Институтом эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АН СССР.

² Мечение сыворотки осуществляли на кафедре патологической физиологии Киевского медицинского института им. А. А. Богомольца, Министерства здравоохранения УССР.

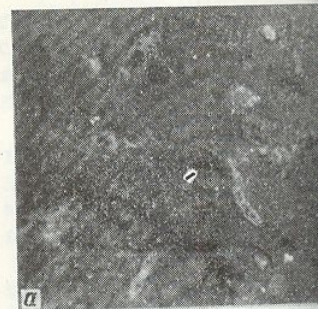


Рис. 1. Аутологичные глобулины (краям эндотелиоцитов): а — метод флюоресцирующих анти после докраски гематоксилин-эозином.

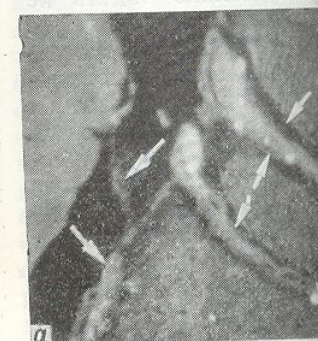


Рис. 2. Аутологичные глобулины полушарий и окутыва (стрелками): а — метод флюоресцирующих анти краски гематоксилин-эозином. Об.

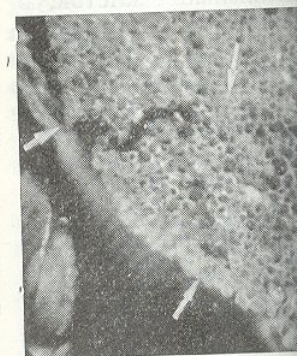


Рис. 3. Аутологичные глобулы респенции, соответствующей и окруженных ими нервных (Метод флюоресцирующих анти характеристика та же, что на р).

Рис. 4. Меченные флюорес периневрии и эндоневрии (е внутривенного введения пре Метод темнопольной флюорес стрелками).

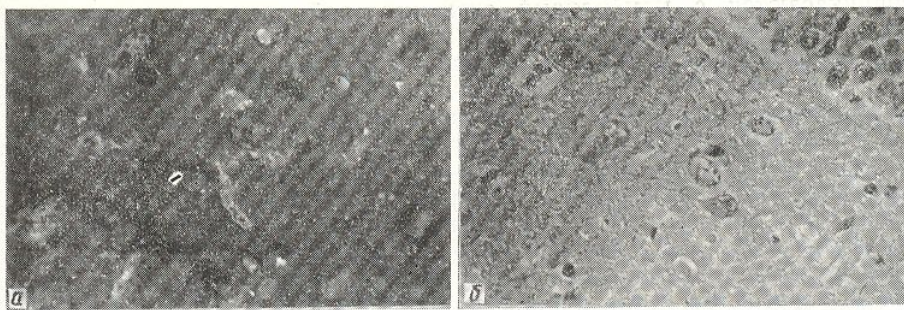


Рис. 1. Аутологичные глобулины на мембранах эндотелия мозговых капилляров (по краям эндотелиоцитов):

a — метод флуоресцирующих антител, темнопольная микроскопия; *б* — участок того же эндотелия после докраски гематоксилин-эозином. Об. $\times 40$, гомаль $\times 3$, фотоув. $\times 3$, общ. ув. $\times 360$.

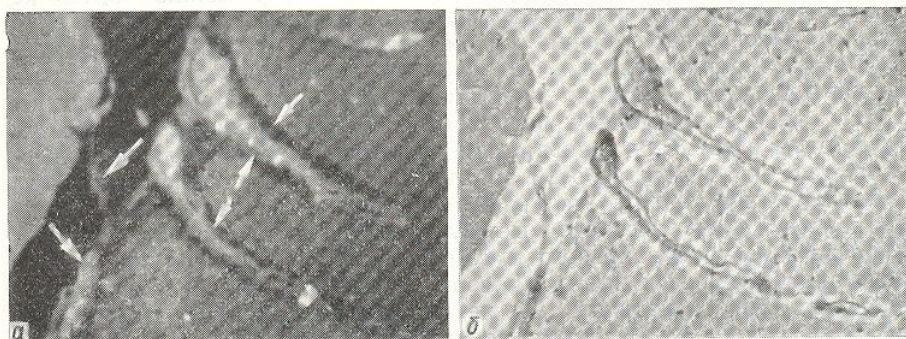


Рис. 2. Аутологичные глобулины в мягкой мозговой оболочке, находящейся на поверхности полушарий и окутывающей сосуды при вхождении в нервную ткань (отмечены стрелками):

a — метод флуоресцирующих антител, темнопольная микроскопия; *б* — тот же участок после докраски гематоксилин-эозином. Об. $\times 20$, гомаль $\times 3$, фотоув. $\times 3$ общ. ув. $\times 180$.

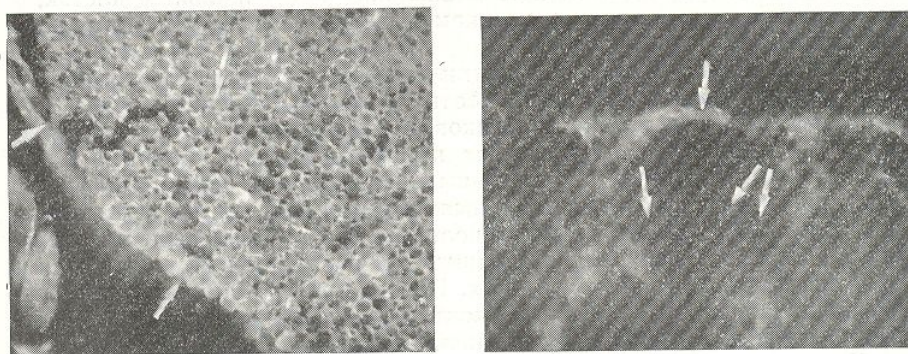


Рис. 3. Аутологичные глобулины в периневрии и эндоневрии седалищного нерва. Флуоресценции, соответствующей расположению глобулинов, нет в миелиновых оболочках и окруженных ими нервных отростках.

Метод флуоресцирующих антител, темнопольная микроскопия. Здесь и на рис. 4 оптическая характеристика та же, что на рис. 2.

Рис. 4. Меченные флуоресцеинизотиоцианатом гетерологичные сывороточные белки в периневрии и эндоневрии (его отдельных участках) седалищного нерва через 1 ч после внутривенного введения препарата.

Метод темнопольной флуоресцентной микроскопии. Места флуоресценции белков отмечены стрелками.

соприкасаются с мембранами эпендимальной глии, но сывороточные белки отсутствуют глубже, в слое эпендимы, и не обнаруживаются в подлежащей нервной ткани. В некоторых случаях на поверхности мембран эпендимоцитов, обращенной в просвет желудочков и силвиевого водопровода, идентифицируется слой сорбированных иммуноглобулинов. При вхождении сосудов в нервную ткань на значительном протяжении вплоть до разветвления на микрососуды их сопровождает наружная оболочка, являющаяся продолжением мягкой мозговой оболочки. В волокнах этой околососудистой оболочки определяются аутологичные глобулины. Данная оболочка, в которую проникают сывороточные белки, располагается между сосудом и окружающей его глией. Сывороточные белки проникают через сосуды ворсинчатых сплетений и определяются в волокнах и клетках стромы, распространяются до основания эпителия ворсинок, но не обнаруживаются на поверхности эпителия, обращенной в просвет желудочков. В цитоплазме многих эндотелиоцитов сосудов сплетений наблюдается диффузное свечение сывороточных белков. Транспорт белков в строму можно видеть не во всех ворсинках; в некоторых препаратах преобладают ворсинки, в которых сывороточные белки содержатся только в просвете сосудов.

Картина распределения гетерологичных сывороточных белков после внутривенного введения существенно отличается от распределения аутологичных сывороточных белков (рис. 4). Это различие выражается отсутствием введенных белков как в мягкой мозговой оболочке вне сосудов, так и в дериватах этой оболочки, сопровождающих сосуды при их вхождении в нервную ткань. В то же время гетерологичные белки, как и собственные сывороточные белки морских свинок, определяются в просвете сосудов головного и спинного мозга, иногда — на поверхности эндотелиальных клеток (в сорбированном виде) и в цитоплазме отдельных эндотелиоцитов, но не определяются непосредственно в нервной ткани. В ворсинках сосудистых сплетений гетерологичные белки обнаружены у части сосудов в их просветах, в цитоплазме эндотелиальных клеток. Они проникают в сторону ворсинок и распространяются до клеток эпителия, но не проникают в эти клетки и на их поверхность, обращенную в просвет желудочков. Только в одном случае в ворсинке сосудистого сплетения введенные белки сыворотки лошади выявлены в цитоплазме нескольких эпителиальных клеток, в промежутках между этими клетками и на поверхности эпителия в желудочке.

Распределение белков сыворотки лошади в ткани ЦНС через 10 ч после внутривенного введения соответствовало таковому через 1 ч. Проникновение сывороточных белков в седалищный нерв у морских свинок существенно отличается от проникновения их в ткань ЦНС. Аутологичные нативные сывороточные белки, в том числе альбумины и глобулины, при их раздельном выявлении определяются в компонентах наружной оболочки нерва, в волокнах и основном веществе периневрия. Сывороточные белки проникают в эндоневрий и содержатся в нем, как правило, во всех участках. По эндоневрию сывороточные белки окружают нервное волокно, контактируя с его миелиновой оболочкой, но не проникают в эту оболочку и аксон.

Через 1 ч после внутривенного введения гетерологичные белки сыворотки лошади обнаруживаются в волокнах наружных оболочек седалищного нерва. На поперечном срезе нерва меченые белки определяются в нескольких местах, проникая из каждого такого участка в поперечном направлении в пространство между прилежащими нервными волокнами. Эти зоны нерва, содержащие меченые белки, видны как округлые центры, от которых отходят и распространяются между близлежащими нервными стволиками источающиеся ответвления путей транспорта сывороточных белков в виде многолучевых звездочек. На продольном срезе спинно-мозговых корешков и седалищного нерва зоны распространения введенных сывороточных белков определяются в виде узких продольных полосок нервных волокон в нескольких уча-

стках среза. Таким образом сывороточные белки проникают в эндоневральные тканевые по нервному стволу в п

Через 10 ч после введения точных белков лошади зоны поперечного проникновения волокнами шире, хотя поперечнику нерва.

Результаты настоящего цефалического барьерного эксперимента по белкам находятся на уровне синчатых сплетений, о чем было показано для перемеченного ФИТЦ [3], гетерологичных сывороточных аутологичных нативных глобулины, обнаруживая забарьерное пространство на мембранах эпендимы, свидетельствует в пользу собственных сывороточных мунофлюоресцентное и в их нативном состоянии белков в условиях, по которым этот метод отличается от однократного введения нативными сывороточными кулами имеются различия, отмечено Л. С. мость на физиологичная ситуация складывается жидкость — эпендима, клетками поверхности нервные контакты. Эпихрена, введенную в I-гических условиях меченых сывороточных белков через оболочки и ЦСЖ. В цией сывороточных также с тем, что изток жидкости [1, 11].

На основании полученных нами ранее классификации барьеры различаются в ткани мозга) элементов (эпителиальных структурах (барьерный характер гистогематического барьера эпителиальных тканей имеет однообразие точных белков, но с дальнейшим в желудочек находится только в целом барьер сплетения изолирующие периферического нерва белков, изолированных элементов мие-

Полученные на основании исследований проникновения

стках среза. Таким образом, в периферическом нерве морских свинок сывороточные белки проникают в продольно идущие своеобразные эндоневральные тканевые каналы, из которых затем распространяются по нервному стволу в поперечном направлении.

Через 10 ч после внутривенного введения распределение сывороточных белков лошади имеет такой же характер, как и через 1 ч, но зоны поперечного проникновения сывороточных белков между нервными волокнами шире, хотя белки все еще не распространяются по всему поперечнику нерва.

Результаты настоящего исследования подтверждают, что гематоэнцефалический барьер по отношению к аутологичным и гетерологичным белкам находится на уровне эндотелия мозговых капилляров. В ворсинчатых сплетениях он образован эпителием сплетений [9], что ранее было показано для пероксидазы хрена [12], сывороточного альбумина, меченного ФИТЦ [3], альбумина, меченного ^{131}I [10]. В отличие от гетерологичных сывороточных белков и других чужеродных трассеров, аутологичные нативные сывороточные белки морских свинок, включая глобулины, обнаруживаются, как показало настоящее исследование, в забарьерном пространстве в структурах мягкой мозговой оболочки и на мембранах эпендимальной глии, но не в самой нервной ткани. Это свидетельствует в пользу того, что в ЦНС происходит проникновение собственных сывороточных белков в спинномозговую жидкость. Иммунофлуоресцентное исследование позволило кроме выявления белков в их нативном состоянии изучать проницаемость барьера для этих белков в условиях постоянного равновесия между кровью и тканью, чем этот метод отличается от метода макромолекулярных меток при однократном введении трассера. Известно также, что между собственными нативными сывороточными белками и чужеродными макромолекулами имеются различия, которые влияют на их проникновение, что было отмечено Л. С. Штерн и ее учениками, разделившими проницаемость на физиологически адекватную и неадекватную [5]. Своеобразная ситуация складывается на границе раздела цереброспинальная жидкость — эпендима. Установлено [7], что между эпендимальными клетками поверхности полушарий мозга имеются только точечные уплотненные контакты. Эпендима пропускает в нервную ткань пероксидазу хрена, введенную в ЦСЖ [6]. В то же время у животных в физиологических условиях мы не обнаружили проникновения аутологичных сывороточных белков через эпендиму в нервную ткань из мягкой мозговой оболочки и ЦСЖ. Возможно, это связано с очень низкой концентрацией сывороточных белков в ЦСЖ в физиологических условиях, а также с тем, что из нервной ткани через эпендиму в ЦСЖ направлен ток жидкости [1, 11], способный переносить белки [8].

На основании полученных данных и в соответствии с разработанной нами ранее классификацией [2] следует отметить, что в ЦНС имеются барьеры различных типов: изолирующий барьер на уровне сосудов (в ткани мозга); изолирующий барьер на уровне вспомогательных элементов (эпителии в сосудистых сплетениях) по отношению к нервным структурам (барьер между кровью и ЦСЖ). Можно рассмотреть характер гистогематического барьера в сосудистом сплетении по отношению к эпителию сплетения. То обстоятельство, что эпителий сплетений имеет односторонний контакт с зоной распространения сывороточных белков, но сам препятствует их проникновению в свой слой и далее в желудочек мозга, позволяет считать, что эпителий сплетений находится только в частичной изоляции от сывороточных белков, а в целом барьер сплетений по отношению к его эпителию является частично изолирующим. В отличие от сосудов головного мозга сосуды периферического нерва у морских свинок проницаемы для сывороточных белков, изолирующий барьер образуется на уровне вспомогательных элементов миелиновых оболочек аксонов периферических нервов.

Полученные нами данные могут послужить основой дальнейших исследований проницаемости гематоэнцефалического барьера в физио-

логических условиях и при патологии. В частности, обнаружение аутологических глобулинов в волокнах мягкой мозговой оболочки ставит вопрос о путях транспорта аутологических сывороточных белков в пространство, в котором содержится ЦСЖ, а также роли этих белков как в защите мозга от микробных и других агентов, так и в развитии патологии в нем, в частности аутоиммунного повреждения мозга. Требуется также дальнейшее изучение обнаруженных особенностей проницаемости барьеров разных типов в различных отделах ЦНС, а также в периферическом нерве в физиологических условиях и в патогенезе заболеваний центральной и периферической нервной систем.

PERMEABILITY OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER AND BLOOD-NEURONAL BARRIER OF THE SCIATIC NERVE FOR SERUM PROTEINS IN GUINEA PIGS

V. A. Gorban

Autogenous serum proteins in contrast to heterogeneous ones are evaluated in the pia mater elements and those adsorbed on the surface of ependymal cells. From the side of the pia mater serum proteins reach the surface of hemispheres, but they are not observed in nervous tissues, possibly, because the convection of humor from the tissue dominates over diffusion of serum proteins into tissue, and, consequently, there is a dynamic barrier for serum proteins. Autogenous and heterogenous serum proteins are transported from blood vessels into endoneurium, where there are longitudinal channels of fast filling, from which proteins spread in transversal directions. According to the character of permeability for serum proteins it is quite possible to distinguish the following types of barriers in the central nervous system: the barrier isolated on the level of auxiliary elements of organs in plexus chorioideus; partially isolating barrier in plexus chorioideus with respect to their epithelium; peripheral nervous barrier isolated on the level of auxiliary elements of organs.

A. A. Bogomoletz Medical Institute,
Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Kiev

1. Бредбери М. Концепция гематоэнцефалического барьера.— М.: Медицина, 1983.— 479 с.
2. Горбань В. А. Проницаемость гистогематических барьеров у морских свинок для сывороточных белков / Изв. АН СССР. Сер. биология.— 1981, № 3.— С. 432—442.
3. Казеннова И. И. Проницаемость гематоэнцефалического барьера для рибонуклеазы и состояние высшей нервной деятельности: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— М., 1973.— 16 с.
4. Кубица Ю. Ф. Иммунофлюоресценция.— М.; Варшава: Медицина СССР, 1963.— 255 с.
5. Росин Я. А. Физиология гистогематических барьеров: Руководство по физиологии.— М.: Наука, 1977.— 591 с.
6. Brightman M. W. Intracerebral movement of proteins injected into the blood and CSF // Anat. Rec.— 1967.— 157, N 2.— P. 219.
7. Brightman M. W., Klatzo J., Olsson J., Reese T. S. The blood-brain barrier to proteins under normal and pathological conditions // J. Neurol. Sci.— 1970.— 10, N 3.— P. 215—240.
8. Gore R. W., McDonagh P. F. Fluid exchange across single capillaries // Ann. Rev. Physiol.— 1980.— 42.— P. 337—357.
9. Lefauconnier J. M., Hauw J. J. La barriere hemo-encephalique. II. Données physiologiques // Rev. Neurol. (Paris).— 1984.— 140, N 1.— P. 3—13.
10. Matakas F., Stechele V., Keller F. Microcirculation within the cerebral extracellular space // Adv. Neurol. Mol. 20.— New York, 1978.— P. 125—131.
11. Milhorat T. H. Choroid plexus and cerebrospinal fluid production // Science.— 1969.— 166, N 3912.— P. 1514—1516.
12. Reese T. S., Karnovsky M. G. Fine structural localization of a blood—brain barrier to exogenous peroxidase // J. Cell. Biol.— 1967.— 34, N 1.— P. 207—217.
13. Sainte-Marie G. A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence // J. Histochem. and Cytochem.— 1962.— 10, N 3.— P. 250—257.

Киев. мед. ин-т им. акад. А. А. Богомольца
М-ва здравоохранения УССР

Поступила 29.01.86

Ионный механизм в на гладкие мышцы

А. В. Гурковская, Н. И. Гол

В последние 5—10 лет
зинсодержащих веществ
пуринергической нервной
личных органов, в том
зано, что АТФ вызывает
судов, сменяющееся в
16]. Механизм возбуж
поскольку исследование
и сократительной акти
водились.

Целью настоящей
электрогенез и сокра
легочной артерии и ос
возбуждающем действе

Методика

Электрофизиологические
вены и кольцевых полоска
как основной артерии кру
временной регистрацией с
близком к изометрическому
Рингера—Локка, способ р
реакций описаны ранее [4]

Результаты

Воротная вена. Возбу
ки (ГМК) воротной
10⁻³ моль/л. В этом с
ных потенциалов дей
и суммация фазных с
ского сокращения м
ние спонтанных ПД
(ПП), угнетением
нию мышечной по
ГМК, измеренное во
уменьшалось и неск
ПП и угнетения спон
анодразмыкательный
ротоническом потен
щения были также ч

Введение блока
марганца, а также у
дило к угнетению с
вены. В этих усл
10⁻³ моль/л) значите
верапамила (10⁻⁵ мо
второй минуте дейст
лась, а анодразмык
ческой деполяризац
действия верапамил
ГМК, на которой не
этом существенно не