

До фрактальних механізмів структурно-функціонального стану центрів терморегуляції при гіпотермії й гібернації

В.С. МАРЧЕНКО, Г.О. БАБІЙЧУК, Л.М. МАРЧЕНКО

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

На рубежі тисячоліть нейробіологи остаточно позбавили мозок більшості законів, «табу» і «привілеїв» від імунологічних і нейрогуморальних до електрофізіологічних, нейрохімічних і морфофункціональних. Нейрон як єдиний активний елемент нервової системи зі строго поляризованим проведенням збудження, що синтезує й виділяє на всіх своїх закінченнях лише один медіатор, нейрон повністю ізольований від імунної, ендокринної та інших систем гематоенцефалічним бар'єром, нейрон нездатний до регенерації, гине швидко і незворотно при ушкодженні аксона, аноксії, ішемії або вікових змінах – такий нейрон став надбанням історії [3]. Пішла в минуле концепція жорстко зв'язаної нервової мережі з миттєвим перемиканням хімічних сигналів. Замість цього настає ера біохімічного хаосу [13], для опису якого далеко не завжди прийнятні детерміновані закони Дейла або навіть правила Хебба, а починають працювати принципи так званої нелінійної науки, наприклад, фрактальної геометрії Мандельброта [7]. Зміна фундаментальних парадигм сучасної нейробіології вимагає перегляду й деяких сталих положень кріофізіології, що стосуються, насамперед, загальних механізмів реагування функціональних систем мозку на температурні впливи.

Аналіз робіт про центральні механізми температурної перцепції дозволяє зробити висновок, що в процесах підтримки гоміотермії об'єктом регуляції може служити не температура або тепломісткість, а інший інтегральний показник [5, 9, 11]. У цьому зв'язку серед традиційних бар'єрних функцій на перший план можуть вийти терморегуляторні механізми гематоенцефалічного бар'єра (ГЕБ) як структурно-функціональної основи повільної керуючої системи мозку [2,9]. У питанні вивчення фізіологічної системи забезпечення температурного гомеостазу натуралісти підійшли до певної межі, за якою варто враховувати взаємний вплив безлічі функціональних систем організму. Відомо, що більшість спеціалізованих функціональних систем (нервова, серцево-судинна, дихальна, та ін.) є фізіологічними фракталами й паралельно своїй основній функції беруть участь у

загальній терморегуляції гоміотермів [7,9]. Всі органи й тканини пронизані «ендокринним деревом» судинного ендотелія – загальним морфологічним субстратом гістогематичних бар'єрів, включаючи ГЕБ – фрактальну границю між морфофункціональними фракталами нервової й серцево-судинної систем. Тому доречно поширити до рівня організму застосування нової концепції ГЕБ як регулятора структурно-функціональної геометрії мозку, інтегральним показником якої є спектр фрактальних розмірностей [2, 7, 9].

У цьому випадку, використовуючи різні програми охолодження, тобто проводячи термо-сенсорну стимуляцію, варто очікувати прояву феномена довгострокової потенціації, що дозволить регулювати амплітуду сумарних структурно-динамічних характеристик фонові активності фізіологічних систем. Але таке «розгойдування» настановних точок гомеостазу по суті є відомим нерво-гуморальним механізмом періодичного розширення температурних границь зимосплячих організмів і важливою умовою природної гібернації [6,9], що вказує на можливий шлях моделювання цього стану, який представляє інтерес для кріобіології й кріомедицини.

Мета роботи – порівняти нейродинаміку охолодженого мозку при штучній гіпотермії і зимовій сплячці по фрактальній розмірності (D) біоелектричної активності і структурно-функціонального стану синаптичного апарату гіпоталамусу щурів після гіпотермії і ховрахів при гібернації.

Матеріали і методи

Для експерименту брали довгохвостих ховрахів *Citellus undulatus*, вилонених у Якутії (глибоко сплячих – з температурою не вище 5°C і розбуджених – з температурою не вище 15°C) та щурів-самців лінії Вістар, що містилися в теплому віварії, і після краніоцеребральної гіпотермії (КЦГ) до температури тіла 30°C за стандартним протоколом охолодження [1].

Біоелектричну активність (БЕА) мозку у діапазоні 0,1-15 Гц відводили ніхромовими електродами і реєстрували на енцефалографі фірми «Medicog». Аналоговий сигнал БЕА перетворювали в цифрову форму з частотою дискретизації 100 Гц та вводили в комп'ютер, після чого проводився кореляційно-спектральний і фрактальний аналіз [1, 2, 9].

Адреса для кореспонденції: Марченко В.С., Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.: +38 (057) 373-30-07, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Вивчення вивільнення нейромедіаторів та їх проникність крізь ГЕБ проводили радіоізотопними методиками з використанням скляно-пластикової push-pull канюлі [1]. Рівень вивільнення визначали як відношення радіоактивності досліджуваної фракції до радіоактивності останньої фракції відмивання, яка має стабільний рівень радіоактивності.

Секрецію ^3H -нейромедіаторів також вивчали на переживаючих зрізах (ПЗ) мозку та синаптосомах [1]. Результати виражали в імп/хв/мг білка: K^+ -індукована секреція (імп/хв/мг білка) = імп/хв/мг білка фільтрів контролю мінус імп/хв/мг білка фільтрів K^+ (60 мМ).

Для електронно-мікроскопічного дослідження синаптосоми осаджували центрифугуванням, фіксували 5%-м буферним розчином глутаральдегіду та 1%-м розчином OsO_4 . Зневоднення робили в ацетоні зростаючої концентрації, зразки заливали в епон-аралдит. Ультратонкі зрізи виготовляли на ультрамікромомі УМТП-6 і контрастували водним розчином ураніацетату і цитратом свинцю за Рейнольдсом. Перегляд і фотографування зрізів проводили в електронному мікроскопі ПЕМ-125К при напрузі, що прискорює (75 кВ). Препарування тканини гіпоталамусу і неокортексу для трансмісійної електронної мікроскопії проводили за аналогічною схемою традиційними методами [9]. Кількісний аналіз зображень проводили методом фрактальної морфометрії. При цьому розраховувався складний показник форми або геометрії структур D (дробова фрактальна розмірність) і показник Херста $H=2-D$. Слід підкреслити, що в розрахунках брали до уваги уявлення про узагальнений броунівський рух. Так, якщо скорозмірність об'єкта ($H=2-D$) знаходилась у межах $0,5 < H < 1$, то структурно-функціональний рисунок системи вважали персистентним (таким, що підтримує у майбутньому тенденції минулого). У разі, якщо $0 < H < 0,5$, то динамічний патерн визначали як антиперсистентний [2, 7, 9].

Експерименти проводили згідно з „Загальними принципами експериментів на тваринах”, які схвалені І Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р).

Результати та обговорення

Результати досліджень показали, що біоелектрична активність зрізів головного мозку щурів у стандартних умовах інкубації була відсутня, відновлюючись через 40-60 хв. Зниження температури інкубаційного середовища ($30-20^\circ\text{C}$) приводить до монотонного зменшення амплітуди секундного ритму БЕА й ізолінії при 15°C . Збереження зрізів у боксах з охолодженням (4°C) розчином протягом 24 годин приводить до

необоротних змін їхніх систем електрогенезу. Ці особливості характерні в однаковій мірі як для контрольних, еутермних тварин, так і для щурів після охолодження до температури тіла 30°C . Однак секреція ^3H -норадреналіну ПЗ головного мозку охолоджених щурів перевищувала контроль у 1,5-2 рази, а секреція ^3H -серотоніну була трохи знижена (табл.1).

У ПЗ головного мозку ховрахів реєструється виражений секундний ритм біоелектричної активності як у перші хвилини інкубації в середовищі Кребса-Рінгера з температурою $\sim 200^\circ\text{C}$, так і після збереження (24 години, 4°C). Надповільна БЕА зрізів надійно реєструвалася при охолодженні інкубаційного середовища аж до $3-1^\circ\text{C}$. Дані закономірності характерні для несплячих і гібернуючих тварин. На відміну від охолоджених щурів ПЗ гібернуючих ховрахів характеризувалися підвищеною секрецією ^3H -серотоніну (у 1,5 рази у порівнянні з не сплячими) і зниженою секрецією ^3H -норадреналіну.

Фрактальний аналіз БЕА ПЗ головного мозку щурів показав, що як охолодження інкубаційного розчину, так і додавання в нього норадреналіну супроводжується підвищенням персистентності динаміки БЕА (D від 1,45 до 1,25). Нагрівання розчину чи додавання в нього серотоніну веде до антиперсистентності ($D \sim 1,7$). Для ПЗ гібернуючих ховрахів, навпаки, охолодження середовища інкубації чи додавання в нього норадреналіну супроводжується антиперсистентністю динаміки БЕА, а нагрівання чи додавання серотоніну – персистентністю.

Таким чином, при штучній гіпотермії норадреналін забезпечує підтримуючі, а серотонін – перебудовчі тенденції нейродинаміки, що перешкоджають гіперактивності. Тоді як при гібернації серотонін стабілізує функціональний стан мозку, а норадреналін активізує процеси, що перешкоджають позамежному охолодженню.

Дія охолодження залишає тривалий (до 8-9 діб) нейрохімічний і вегетативний «слід» у функціональній активності організму. При КЦГ запускається нейрофізіологічний механізм довгострокової потенціації в мозкових центрах терморегуляції, нейрохімічним проявом якого є тривале підвищення і коливання рівня секреції та проникності ГЕБ для нейромедіаторів. Малюнок слідових коливань проникності ГЕБ після охолодження виявився масштабно-інваріантним у часовій шкалі в межах хвилина-доба (табл. 2).

У цих умовах у тих же масштабах часових величин природним образом відбувалися послідовні зміни вегетативного статусу організму аж до повних симпатопарасимпатичних переключень. Така динаміка вказувала на можливість фрактальної

Таблиця 1. Секреція нейромедiatorів ПЗ головного мозку щурів в умовах гіпотермії та ховрахів при зимовій сплячці

Умови експерименту	Секреція ^3H – НА				Секреція ^3H – СТ			
	ПГТ		ЗГТ		ПГТ		ЗГТ	
	фон	K^+	фон	K^+	фон	K^+	фон	K^+
Щури контроль (-38°C)	0,97±0,08	1,81±0,06	0,87±0,06	1,77±0,08	0,90±0,07	1,70±0,08	0,92±0,05	1,77±0,08
Щури наркоз (-37°C)	0,74±0,05	1,61±0,07	0,65±0,05	1,55±0,07	0,79±0,05	1,55±0,06	0,90±0,08	1,65±0,06
Щури КГЦ (-36°C)	2,27±0,09	–	0,67±0,07	1,47±0,05	0,81±0,07	1,59±0,04	0,89±0,06	1,72±0,07
Щури КГЦ (-35°C)	2,12±0,08	–	0,59±0,06	1,49±0,05	0,78±0,06	1,50±0,07	0,77±0,05	1,65±0,05
Щури КГЦ (-33°C)	1,90±0,07	–	0,59±0,06	1,39±0,06	0,70±0,08	1,41±0,06	0,65±0,07	1,54±0,08
Щури КГЦ (-31°C)	0,90±0,05	1,30±0,05	0,49±0,05	1,13±0,08	0,61±0,06	1,22±0,06	0,60±0,04	1,23±0,07
Ховрахи (-13°C)	0,81±0,06	1,53±0,04	0,77±0,06	1,45±0,06	0,87±0,05	1,10±0,07	0,67±0,08	1,15±0,05
Ховрахи КГЦ (-3°C)	0,78±0,08	0,90±0,07	0,81±0,08	0,81±0,06	0,90±0,08	1,55±0,07	0,79±0,06	1,50±0,08

Примітка. ПГТ – передній відділ гіпоталамусу; ЗГТ – задній відділ гіпоталамусу; фон – фонова (спонтанна) секреція; K^+ – K^+ -індукована секреція.

організації досліджуваного процесу. Дійсно, фрактальний аналіз ЕКГ і ЕЕГ при КЦГ виявив перехід розмірності БЕА від близької до евклідової (у межах флікер шуму: $0,8 < 2-D < 1,4$) до поперемінного чергування персистентності ($0,5 < 2-D < 1$) і антиперсистентності ($0 < 2-D < 0,5$) у відповідності до симпато-парасимпатичних переключень (рис. 1).

Показані нами зміни секреції нейромедiatorів і БЕА при гіпотермічних впливах мають не тільки функціонально-динамічну, але й структурну основу. Цей висновок випливає з того факту, що підвищений рівень секреції ^3H -НА при КЦГ виявляється (табл. 1, 3) як у дослідях *in vivo* (з використанням push-pull канюлі) і *ex vivo* (на ПЗ структур мозку), так і *in vitro* (на синапсосомах).

Умови методики виділення синапсом із тканини мозку унеможливають прояви будь-яких динамічних змін (фазові переходи мембранних ліпідів, конформаційні перебудови в молекулах переносників і т.п.) [1].

Припускають, що в основі формування індивідуальної адаптації лежать «сліди» попередніх подразнень рецепторних систем, а їхнє збереження здійснюється в ЦНС. Сліди температурних впливів можуть служити елементами формування терморегуляторного умовного рефлексу, в основі якого лежить утворення зв'язків не тільки між центрами дистантних аналізаторів і центрами ефекторів, але й між окремими елементами ефекторних систем: тканинними процесами, судинними реакціями, змінами гормо-нальної ситуації і т.п. [1]. Така постановка питання приводить до поняття вегетативної, «холодової» чи терморегуляторної пам'яті.

Пошуки морфологічних механізмів пам'яті залучають багатьох вчених. За даними [8-10] у формуванні енграми пам'яті виняткове значення надається синапсам із шипиками на дендритах пірамідних клітин кори головного мозку. Тривалі зміни повільних постсинаптичних потенціалів біоелектричної активності шипиків у процесі навчання зв'язують з гіпертрофією і розгалуженням шипиків, утворенням вторинних шипикових синапсів, що розвиваються при навчанні в процесі запам'ятовування. Автори вважають, що унікальні просторово-часові патерни можуть гіпертрофуватися послідовним включенням у циркуляцію нейронів мозку. Слідові процеси фіксуються у виді таких множинних енграм, вони є копіями патернів вихідного досвіду і використовуються для зчитування. Указується, що при одержанні інтенсивного трагічного чи збудливого переживання гіпертрофуються і стабілізуються нейрональні шляхи, що приводить до потенційної стабільності енграми, тому що складові її (шипикові синапси) росли більше і краще. Однак, на думку інших авторів гіпертрофія чи розподіл шипиків у процесі навчання могли б привести лише до патології мозку. Отримані факти про роль (шипикового апарата в механізмах пам'яті показують [8], що мозок може вирішувати цю проблему по-іншому, значно економічніше. У постсинаптичній терміналі відбуваються активація і розвиток шипикового апарата у виді ускладнення мембранних комплексів. Кількість мембран у цих апаратах може досягти декількох десятків, при цьому розміри самих шипиків не збільшуються і їхній розподіл не

Таблиця 2. Максимальний рівень проникності ГЕБ під час та після дії охолодження

Умови	Час	³ H – ацетилхолін			³ H – норадреналін			³ H – серотонін		
		Кора	ПГТ	ЗГТ	Кора	ПГТ	ЗГТ	Кора	ПГТ	ЗГТ
КЦГ	60 хв	150±15	170±18	155±15	290±15	320±13	287±14	98±6	96±5	96±5
	90 хв	250±12	350±15	250±13	150±15	250±20	150±14	99±5	96±5	95±7
	120 хв	135±16	150±15	130±20	115±12	125±18	120±16	95±6	97±5	100±8
Час післядії	4 год	150±14	165±16	150±11	280±13	310±16	280±14	98±4	99±7	96±5
	6 год	115±12	125±15	115±17	105±15	107±17	103±11	100±8	98±6	100±9
	24 год	225±12	250±14	225±11	250±12	300±16	250±13	97±5	98±7	97±6
	2 доби	98±18	103±15	100±13	100±11	100±13	90±11	100±9	97±5	99±6
	5 діб	150±13	215±17	200±14	200±20	250±19	215±19	96±4	99±5	97±7
	7 діб	98±12	105±16	100±15	115±14	115±11	105±12	95±4	98±6	97±7

Примітка: дані наведені у відсотках. За 100% прийняті контрольні значення, які лежать в межах 0,1-0,01.

спостерігається. Великий експериментальний матеріал, отриманий на різних тваринах, представляє дивний за виразністю і переконливий доказ специфічної ультраструктурної реакції постсинаптичних апаратів у процесі збереження активації і стабілізації структурно-функціональної активності мозку при навчанні [8]. Менш переконливе твердження цих авторів про те, що генез мембранних комплексів шипикового апарата відбувається тільки від постсинаптичної мембрани чи плазмолемі. Конструктивна критика цих уявлень на основі електрофізіологічних і електронно-мікроскопічних досліджень ПЗ головного мозку при довгостроковій потенціації [10] виняткове значення надається синапсам із шипиками на дендритах пірамідних клітин кори головного мозку. Тривалі зміни повільних постсинаптичних потенціалів біоелектричної активності шипиків у процесі навчання зв'язують з гіпертрофією і розгалуженням добре погоджується з результатами наших морфофункціональних експериментів.

Установлено, що в динаміці КЦГ синаптичний апарат знаходиться в стані підвищеної функціональної напруги: синаптичні пухирці в багатьох синапсах аглютинують між собою і зливаються з синаптичною мембраною (рис. 2), зростають довжина й електронна щільність зон синаптичних контактів, збільшується довжина активної зони. Необхідно відзначити, що

виявлені зміни ультраструктури нейронів найбільш виражені в медіо-преоптичній області переднього гіпоталамуса (у порівнянні з заднім), в області якої, як відомо, розташовуються нервові клітини, які активуються при температурних впливах.

Дані фрактальної морфометрії ультратонких зрізів переднього відділу гіпоталамуса демонструють принципові розходження розмірності розподілу синаптичних пухирців активних і неактивних синапсів. Так, геометрія везикул пресинаптичного бутона активних синапсів – персистентна ($D \sim 1,3$), тоді як неактивних – близька до евклідової ($D \sim 1$). При охолодженні спостерігаються специфічні ультраструктурні зміни, характерні для явища довгострокової потенціації. Поблизу активної зони синапса локальна геометрія розподілу везикул виявляє чергування пер-

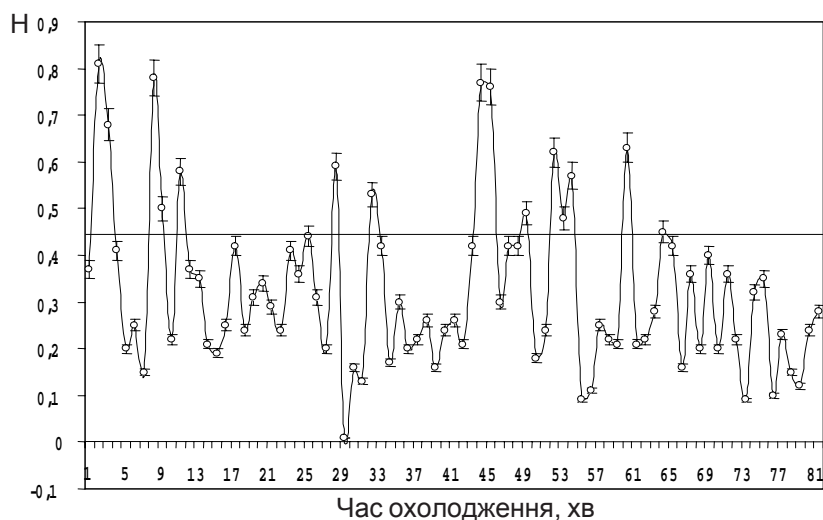


Рис. 1. Дія охолодження на показник Херста (H) ЕЕГ

Таблиця 3. Секреція норадреналіну при КЦГ

Умови експерименту	<i>In vivo</i> (Кв)				<i>In vitro</i> (імпл./хвхмг білка)	
	Кора		Гіпоталамус		Кора	Гіпоталамус
	фон	K ⁺	фон	K ⁺		
Контроль (~38°C)	0,89±0,05	1,96±0,08	0,94±0,05	2,10±0,07	31041±4–149	33978±828
Наркоз (~37°C)	0,80±0,07	1,67±0,08	0,80±0,06	1,72±0,06	22072±2–023	24620±2498
КЦГ (~36°C)	1,90±0,06	–	2,31±0,08	–	58757±3–745	81530±4938
КЦГ (~35°C)	1,92±0,05	–	2,15±0,07	–	41234±3–324	135617±13–254
КЦГ (~33°C)	1,78±0,07	–	1,89±0,08	–	23265±2–389	125424±11–197
КЦГ (~31°C)	0,92±0,06	1,23±0,05	0,95±0,09	1,30±0,06	15819±2807	48910±3856

систентних і антиперсистентних областей, з'являються упорядковані мембранні утворення, можливо, сформовані в результаті злиття синаптичних пухирців, що нагадують здвоєні цистерни, одна з яких має фрактальну розмірність $D \sim 1,3$, а друга – $D \sim 1,7$. Для зручності викладу будемо називати їх синаптичними струнами. Такі утворення часто розташовуються трансинаптично, поєднуючи пре- і постсинаптичні бутони, вони виявляються в постсинаптичних бутонах, а також у парасинаптичних областях, групуючись в пачки, утворюють парасинаптичний інструмент (подібний шипиковому апарату), де кожна струна “настроєна” по-своєму, маючи різну фрактальну розмірність. На нашу думку, ці утворення можуть мати відношення до ультраструктурних елементів вегетативної пам'яті. Багато авторів висловлюють обґрунтовані припущення про істотний вплив геометрії синап-

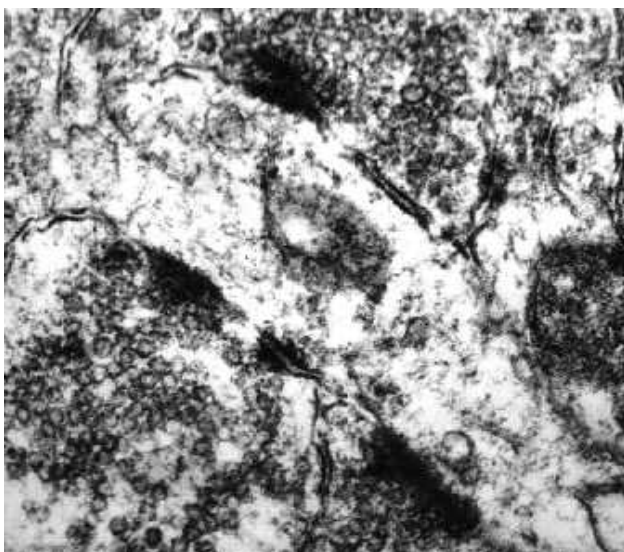


Рис.2. Ультраструктура синапсів гіпоталамуса щура при охолодженні. $\times 35000$

кільки регуляторну місію виконує постсинаптичний нейрон.

Спільність механізмів адаптації нейронів до сенсорної у тому числі холодової, стимуляції (довгострокова потенціація) і механізмів навчання і пам'яті ставить цю проблему в ряд найбільш цікавих напрямків загальної нейробиології та кріобіології зокрема.

Висновки

Стан гіпотермії при штучному охолодженні і природній гібернації супроводжується фрактальною динамікою функціональної морфології синаптичного апарату центрів терморегуляції.

Біоелектрична активність мозку при гіпотермії і зимовій сплячці характеризується фрактальною розмірністю, яка може служити інтегральним показником вегетативного статусу організму.

При охолодженні спостерігаються специфічні зміни ультраструктурних елементів синапсів, характерні для довгострокової потенціації, формується парасинаптичний інструмент, що імовірно має відношення до вегетативної пам'яті.

Література

1. Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Ломакин И.И., Белостоцкий А.В. Нейрофизиологические процессы охлажденного мозга. – Киев: Наук. думка, 1992. – 207 с.
2. Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Грищенко В.И., Бабийчук В.Г. К концепции экзистоэнцефалической системы охлажденного мозга. Часть 4 // Пробл. кріобіології. – 2002. – №4. – С.30-40.
3. Виноградова О.С. Нейронаука конца второго тысячелетия: смена парадигм // Материалы IV рабочего совещания Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. – Пущино, 1999. – С.3-38.
4. Голошейкин С.А. Линейные и нелинейные характеристики ЭЭГ человека в условиях измененного сознания //

- Тез.докл. IV съезда физиологов Сибири.– Новосибирск, 2002.– С. 58.
5. *Диверт В.Э.* О механочувствительности периферических термосенсоров // Тез.докл. IV съезда физиологов Сибири.– Новосибирск, 2002.– С.78.
 6. *Емец О.Н., Воронков В.Н., Пашовкин Т.Н., Пахотин П.И.* Срезы гиппокампа бодрствующих и глубокоспящих сусликов *Citellus undulatus* одинаково способны восстанавливать нейронную активность после травматического шока в условиях околонулевой гипотермии // Пробл. криобиологии.– 1998.– №1.– С.24-29.
 7. *Мандельброт Б.* Фрактальная геометрия природы. М.: Эдиториал УРСС, 2002.– 656 с.
 8. *Манина А.А.* Ультраструктурные основы деятельности мозга.– Л.: Медицина, 1976.– 183 с.
 9. *Марченко В.С., Грищенко В.И., Бабийчук В.Г., Бабийчук Г.А., Марченко Л.Н.* К концепции экзистозцефалической системы охлажденного мозга. Часть 6. Фрактальная геометрия функциональной архитектуры ультраструктурных элементов синаптического аппарата центральной терморегуляции при гипотермии и гибернации // Пробл. криобиологии.– 2003.– №3.– С. 6-20.
 10. *Мошков Д.А.* Адаптация и ультраструктура нейрона.– М.: Наука, 1985.– 200 с.
 11. *Розин В.Г.* К чему пришло математическое моделирование в физиологии (на примере терморегуляции)// Тез.докл. IV съезда физиологов Сибири.– Новосибирск, 2002.– С.239-240.
 12. *Fifkova E., van Harrevelde A.* Long-lasting morphological changes in dendritic spines of dentate granular cells following stimulation of enthorinal area // J. Neurocytol.– 1977.– Vol. 6. – P. 211-230.
 13. *Iversen L.L.* Chemical signalling in the nervous system //Progr. Brain Res.– 1986.– Vol.68.– P.15-21.