

018

К806/

# Культура нервной ткани



АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК СССР

611-0  
К 90

# Культура нервной ткани

Под редакцией

проф. Ю. М. ЖАБОТИНСКОГО



МОСКВА. «МЕДИЦИНА», 1977

М.К.



ИЗДАНИЕ ОДОБРЕНО И РЕКОМЕНДОВАНО К ПЕЧАТИ  
НАУЧНО-ИЗДАТЕЛЬСКИМ СОВЕТОМ  
ПРЕЗИДИУМА АМН СССР

Г. В. КОНОВАЛОВ, С. И. ОЛЕНЕВ, Е. И. ЧУМАСОВ,  
О. А. РОДШТЕЙН

Культура нервной ткани. Под ред. Ю. М. ЖАБОТИНСКОГО. М., «Медицина», 1977, 184 с., илл.

Монография посвящена вопросам морфологии и дифференцировки ткани центральной и периферической нервной системы в органотипических культурах и использованию этих культур для исследования патогенеза и диагностики демиелинизирующих заболеваний человека. В первой главе на примере различных отделов нервной системы рассмотрены особенности роста нейрональных элементов, находящихся на разных стадиях зрелости, медуллобластов, ганглиобластов, нейробластов и нейронов. Во второй главе подробно изложены вопросы последовательности роста и миграции различных клеточных элементов периферической нервной системы (на примере тригеминального ганглия), их дифференцировка в культуре ткани, формирование нервных волокон и процесс миелинизации, образование различных типов нервных окончаний и др. В третьей главе показана важная роль культуры нервной ткани в изучении патогенеза и диагностики демиелинизирующих заболеваний нервной системы человека, как полирадикулоневрит типа Гийена — Барре и рассеянный склероз.

Монография рассчитана на гистологов, эмбриологов и патоморфологов.

Книга содержит 51 рис., 1 табл.; библиография — 289 названий.

For summary see page 183

К  $\frac{50300-306}{039(01)-77}$  65-76

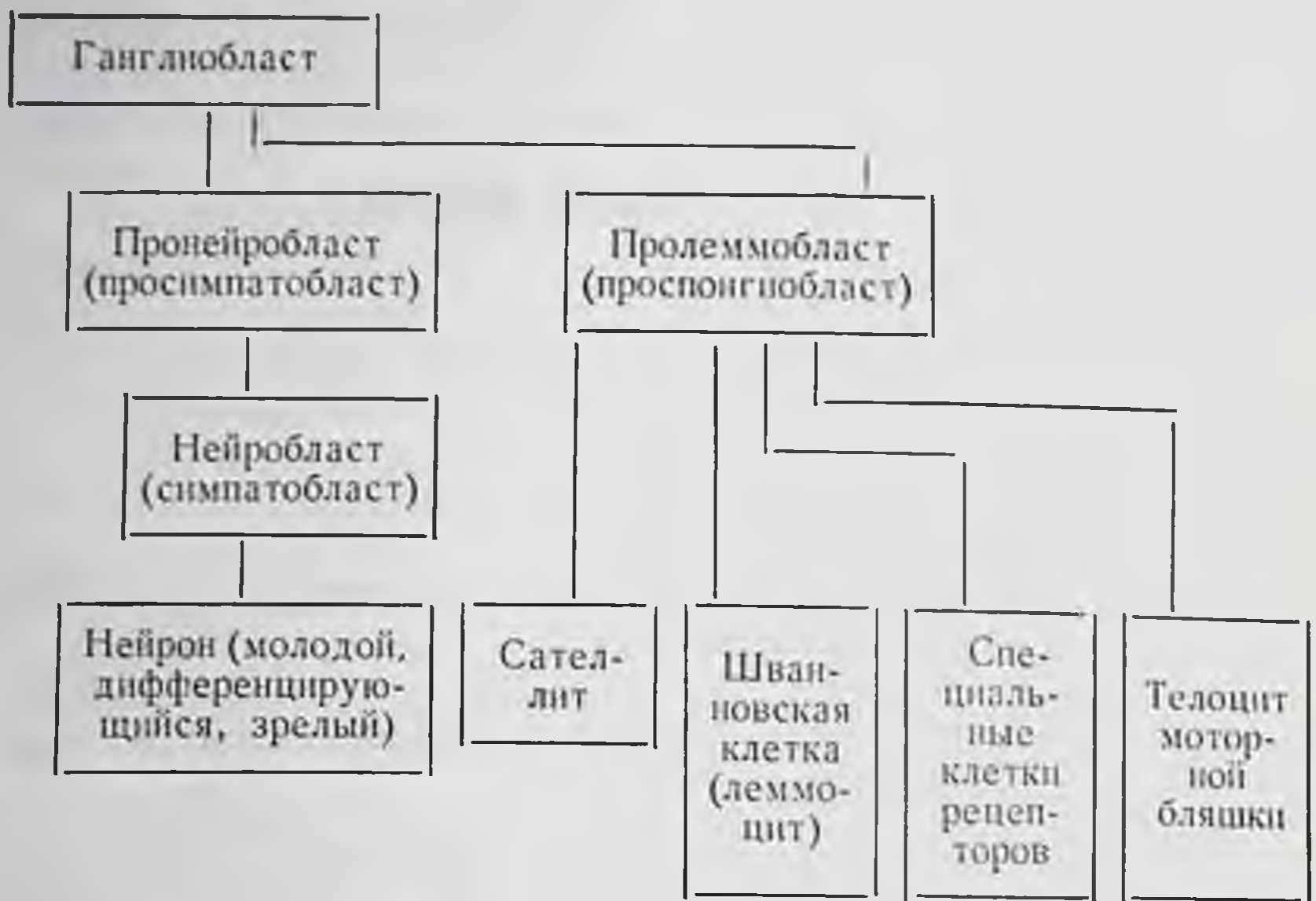
© Издательство «Медицина» Москва 1977

## Предисловие

Достижения в создании длительноживущих органотипических, диссоциированных и агрегированных культур тканей центральной и периферической нервной системы открыли широкие возможности не только для более углубленного прижизненного изучения их развития, но и для происходящих в них физиологических и биохимических изменений, развивающихся в результате патогенных и фармакологических воздействий.

В монографии отражены наиболее важные современные вопросы изучения культур нервной ткани. На основании собственных наблюдений и литературных данных авторы освещают общие вопросы дифференцировки нейронов, медулло-, нейро- и ганглиобластов. Для этой цели использованы эксплантаты из различных отделов нервной системы, происходящих из нервной трубки, ганглиозной пластинки и плакод. При этом установлены как сходства, так и различия в дифференциации указанных структур в разных отделах нервной системы *in vitro* и *in vivo*. При оценке процесса дифференциации учтены не только морфологические, но и биохимические изменения в нейрональных клетках, особенно в отношении некоторых ферментов. Этот принцип оценки дифференциации клеток в культурах, безусловно, заслуживает внимания.

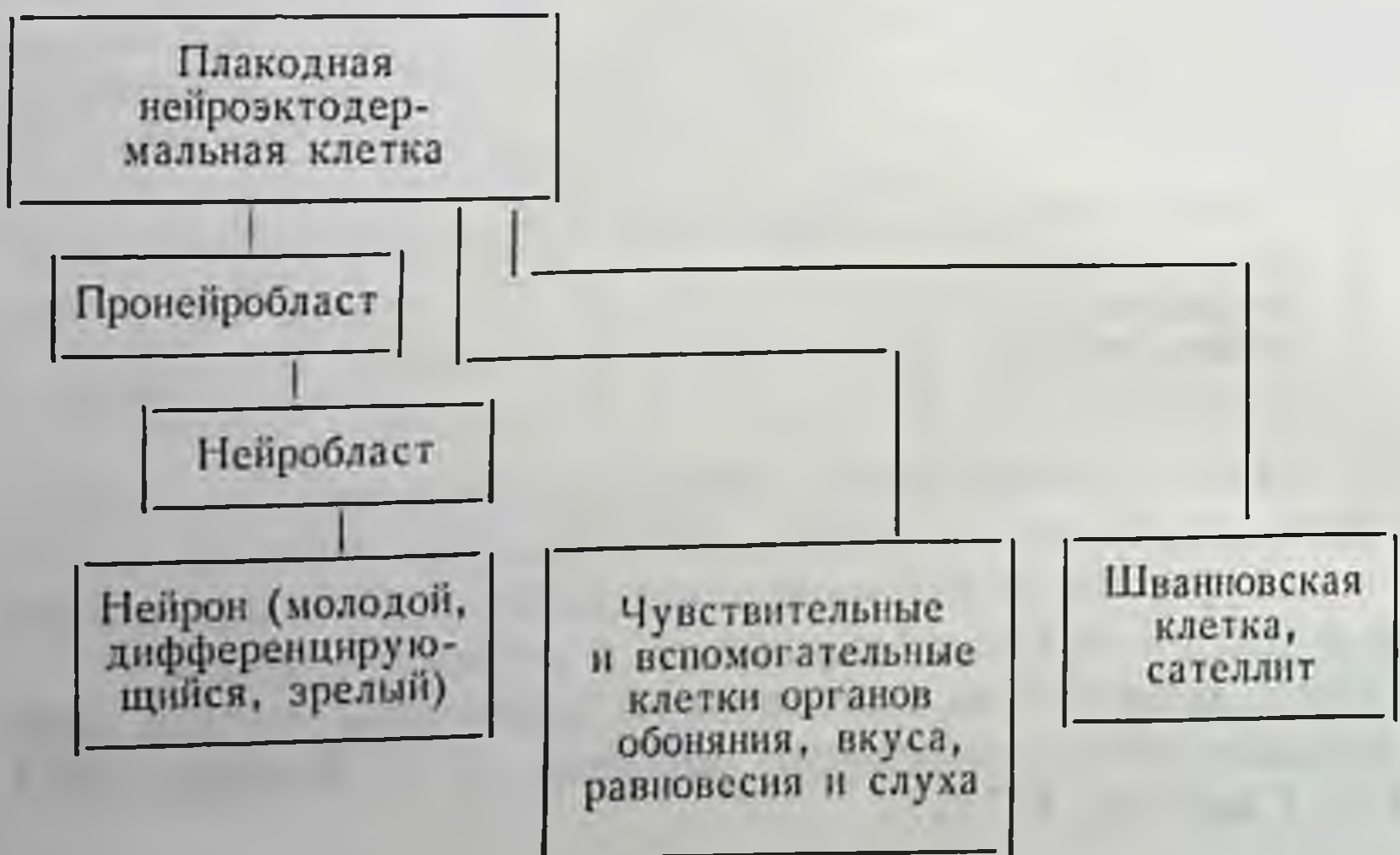
Приведено подробное описание дифференциации всех структур в чувствительном ганглии тройничного нерва, а также представлены результаты изучения последовательности миграции клеточных элементов, начиная с первых дней эксплантации. На всех стадиях развития длительноживущих культур прослежены сложные процессы дифференциации нейробластов в нейроны и взаимоотношения между их растущими отростками (аксонами и дендритами) с шванновскими клетками, а также — образование нервных волокон и их миелинизация, появление различных рецепторных и синаптических окончаний и т. д.



В качестве примеров дифференциации производных ганглиозной пластинки приводятся материалы о культурах спинальных и симпатических ганглиев.

Клетки, производные плакод, проходят следующие стадии развития (А. Г. Киорре, 1971).

Вестибулярный, спиральный и отчасти тригеминальный ганглии рассматриваются в качестве производных плакод. На основании наблюдений, полученных при культи-





вировании различных отделов нервной системы, сделана попытка установить общие закономерности дифференциации матричных клеток (медуллобластов, ганглиобластов, плакодных клеток), пронеуробластов, нейробластов и нейронов. Сведения о дифференциации нейроглии и вспомогательных клеток не выделяются, а включены в описания культур различных отделов нервной системы.

В процессе эмбрионального и постнатального развития нервной ткани ее клетки приобретают все больше признаков, отличающих их друг от друга; эти различия зависят от процесса дифференциации, сопровождающегося появлением ряда морфологических, биохимических и функциональных особенностей клеток. Основное внимание уделено описанию таких признаков дифференциации, как образование нейрофибрилл и нислевского вещества, появление некоторых ферментов, биоэлектрической активности, фармакорцепторов (под фармакорцепторами подразумеваются молекулярные структуры, с которыми реагируют молекулы медиаторов, вызывая характерную ответную реакцию клетки). Когда появление новых признаков дифференциации обусловлено (индуцировано) какими-то внешними воздействиями, говорят о периоде зависимой дифференциации.

В условиях культуры нервная ткань лишена многих необходимых для ее дифференциации влияний, как, например, действия гормонов и других биологических веществ целого организма, а также афферентных и эфферентных нервных импульсов. Поэтому условия для дифференциации клеток *in vivo* и в культуре существенно различаются. Наблюдения в культуре дают возможность легче проследить отдельные стадии дифференциации и представляют удобную модель для изучения различных влияний на нервную ткань в процессе ее развития.

Для выяснения поставленных вопросов некоторые отделы нервной системы взяты от куриных эмбрионов, другие — от плодов и новорожденных крысят. В начале описания культуры каждого из изученных отделов нервной системы выделены узловые вопросы, представляющие особый интерес для понимания происходящей дифференциации, причем они не одни и те же у различных объектов. Поэтому полнота описания культур различных отделов нервной системы не одинакова, тем более, что о некоторых из них сведения весьма ограничены (например, о плакодах).

На основании наблюдений, полученных при культивировании различных отделов нервной системы, сделана попытка установить общие закономерности дифференциации медуллобластов, ганглиобластов, пронеуробластов, нейробластов и нейронов.

## 1.1. Производные нервной трубки

У куриного эмбриона нервная трубка образуется на стадии 22—28 ч инкубации, а у эмбрионов крыс — на 11-й день эмбриогенеза. Все ее отделы построены однотипно и состоят из ложномногорядного нейроэпителия, представляющего радиально ориентированные по отношению к полости желудочков веретенообразные клетки (медуллобласты); эти клетки перивентрикулярно делятся митотически. Основные проявления жизнедеятельности медуллобластов выражаются в размножении и образовании ими сначала пронеуробластов, затем пронеуробластов и глиобластов, а в более поздние периоды эмбриогенеза, когда медуллобласты постепенно трансформируются в эпендимную глию, — в образовании только нейроглии. Генераторные свойства медуллобластов нервной трубки существенно различаются после ее детерминации и подразделения на продольные клеточные столбы, а в головном отделе — дополнительно еще и на нейромеры (см. обзор у С. Н. Оленева, 1972).

### 1.1.1. *Tectum opticum* куриного эмбриона

На основании культивирования *tectum opticum* сделана попытка выяснить потенции нейрональных и глиальных клеток на различных стадиях созревания. Учитывая, что *in vivo* ретинальные нейриты играют важную роль в созревании этого отдела мозга, а *in vitro* эти влияния отсутствуют, можно на примере *tectum opticum* показать влияние деафференциации на созревание нервных клеток.

*Tectum opticum* представляет производное крыловидной пластинки нейромера «с». Дифференциация первых нейробластов (будущих мультиполярных нейронов 3-го слоя) происходит одновременно с подрастанием нейритов ганглиозных клеток сетчатки (на 4—5-е сутки инкубации). Медуллобластический матрикс *tectum opticum* последовательно образует нейробласты, начиная от более



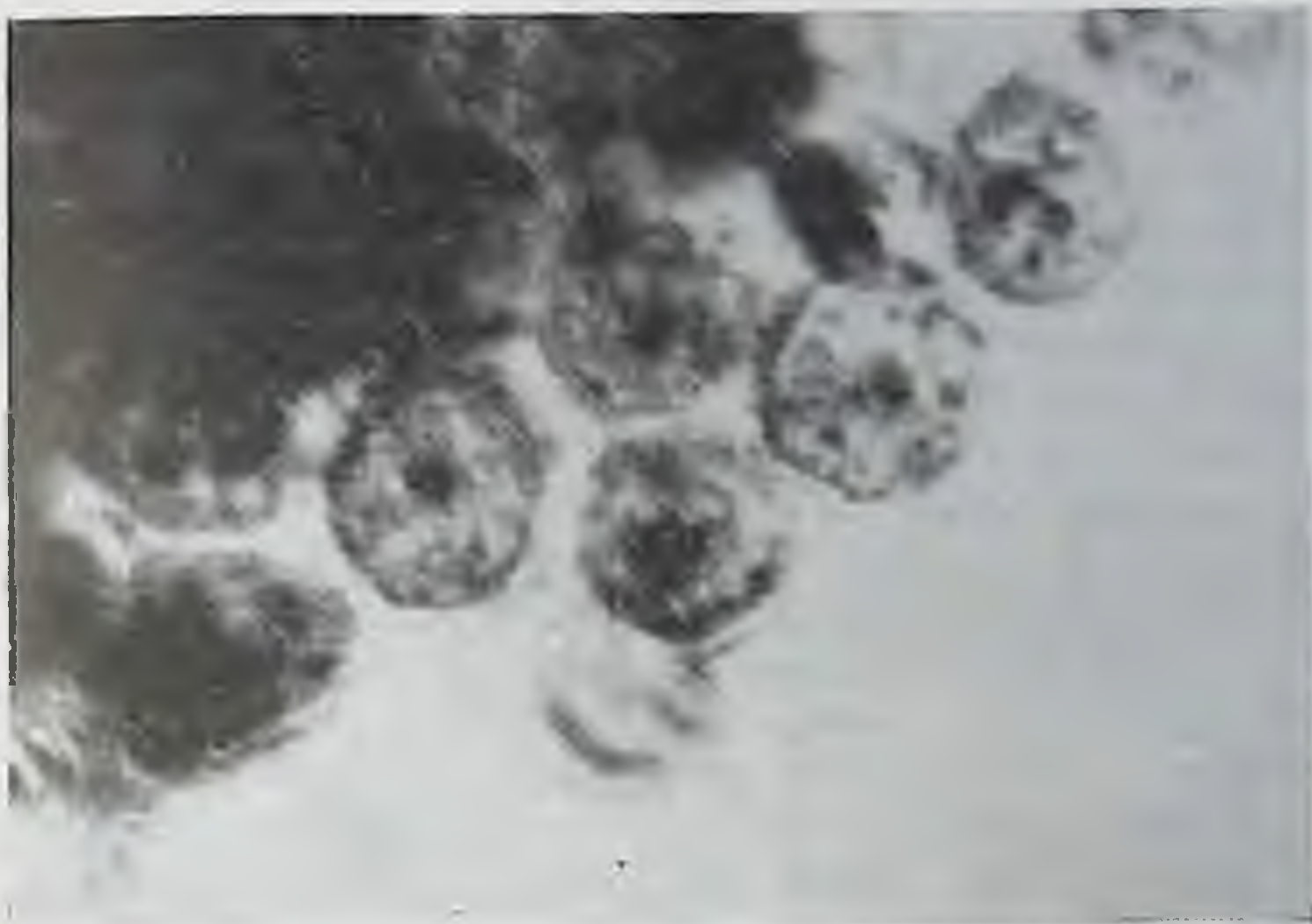


Рис. 1. Медуллобласты в *tectum opticum* 5-дневной культуры 6-дневного куриного эмбриона. Окраска галлоксианином. 90×20.

глубоких слоев и распространяясь на его поверхностные слои. Нейроглия начинает появляться на 8—9-й день, а образование мелких нейробластов заканчивается на 15-й день инкубации. На 15—17-й день процесс разделения *tectum opticum* на 8—9 слоев завершается (см. обзор С. Н. Оленева, 1964а).

В культурах эксплантаты *tectum opticum* 4-дневных куриных эмбрионов не дают отчетливого роста, и в течение 5 дней нельзя отметить сколько-нибудь выраженную клеточную миграцию. При окраске галлоксианином в этих эксплантатах видны лишенные отростков, округлые или биполярные клетки с узким ободком базофильной цитоплазмы и пузыревидным гиперхромным ядром с центрально расположенным ядрышком (рис. 1). Этот вид клеток обычно описывают как медуллобласты (Olivo, 1927; May e. a., 1961; К. И. Пыльдвере, 1971). Значительная часть медуллобластов культуры гибнет с явлениями пикноза их ядер. В части эксплантатов через 5—7 дней культивирования наблюдается вырастание отдельных отростков нейробластов, которые можно обнаружить как прижизненно с помощью фазовоконтрастной микроскопии, так и на препаратах, импрегнированных серебром



по Вейссу. Наши данные (С. Н. Оленев, 1967) подтверждают наблюдения Olivo (1927), согласно которым в эксплантатах *tectum opticum* 3-дневных куриных эмбрионов стадия округлых медуллобластов длится 6—10 дней, а появление у этих клеток отростков, указывающее на дифференциацию клеток в пронеуробласты и нейробласты, происходит в более поздние сроки культивирования.

Эксплантаты *tectum opticum* 6-дневного куриного эмбриона распластываются по стеклу более активно, чем эксплантаты 4-дневных эмбрионов. В части эксплантатов отростки нейробластов начинают появляться в течение первых суток культивирования, в других же культурах рост происходит только на 5-е сутки. Быстрорастущие отростки нейробластов не сопровождаются глией, и за 5 сут культивирования некоторые из них достигают 900 мкм длины; однако преобладающее число их короче (рис. 2). По ходу отростков могут наблюдаться небольшие варикозные вздутия. Кроме отростков нейробластов, в зоне роста изредка встречаются пронеуробласты, быстро дифференцирующиеся в нейробласты. Нейробласты отличаются от клеток глии сильным сродством к солям серебра, более плотной при фазово-контрастном микроскопировании цитоплазмой и тонкими отростками. После 10 дней в культуре большинство отростков нейробластов в зоне роста, не сопровождающихся миграцией нейроглии, дегенерирует: сначала в них появляется зернистость, а затем они распадаются. Кое-где из первичного эксплантата мигрируют крупные астроциты, в цитоплазме которых при фазово-контрастном микроскопировании видно крупное ядро с несколькими мелкими ядрышками. На 15—20-й день культивирования в результате миграции астроцитов распластывание эксплантатов выражено особенно отчетливо.

Эти наблюдения подтверждают данные Olivo (1927), согласно которым «эпителиоидный» рост нейроглии в эксплантатах *tectum opticum* от поздних куриных эмбрионов начинается в более ранние сроки культивирования и происходит интенсивнее.

Из эксплантатов *tectum opticum* 10-дневных куриных эмбрионов в течение первых 5 сут происходит радиальный рост большого числа отростков нейробластов. По сравнению с материалом от более ранних куриных эмбрионов резче выражены рост и миграция астроцитов, а на более поздних сроках культивирования — олигоденд-



Рис. 2. Рост «голых», не сопровождаемых глией, отростков нейро-  
бластов в 5-дневной культуре *tectum opticum* 6-дневного куриного  
эмбриона. Импрегнация по Вейссу. 20×10.



роцитов. Миграция нейроглии происходит интенсивно на 7—10-е сутки, причем исчезает четкая граница между центральным кусочком и зоной роста. Мигрирующие астроциты приобретают веретенообразную форму, в то время как в центральной зоне они имеют типичный звездчатый вид. Эпендимная глия не мигрирует, и ее клетки в первоначальном эксплантате образуют на поверхности стекла плоские поля или выпуклые структуры с мерцающими ресничками. В культурах *tectum opticum* 10-дневных куриных эмбрионов зрелые олигодендроциты, которые можно обнаружить в более позднем материале, еще отсутствуют. Однако на 10—20-й день культивирования появляются мелкие униполярные или биполярные клетки с узким ободком цитоплазмы и темным ядром; нейрофибриллы и активность ацетилхолинэстеразы в них не выявляются. Они располагаются на пласте астроцитов, образуя розетки с радиально отходящими тонкими отростками, или формируют тяжи и плотные клеточные конгломераты в зоне роста. Эти клетки похожи на клетки, описанные Shein (1965) как спонгиобласты, однако сомнительно, чтобы они могли превращаться в астроциты и эпендимные клетки. По нашему мнению, более правильно отнести их к олигодендробластам (С. Н. Оленев, 1967).

Судьба нейробластов в процессе культивирования различна в зависимости от того, мигрируют ли они за пределы первоначального эксплантата или остаются в нем. В течение первых дней культивирования небольшое число округлых клеток (пронейробластов) начинает мигрировать вдоль ранее выросших отростков нейробластов (рис. 3, г). При прижизненном наблюдении этих мигрирующих клеток в их цитоплазме видно быстрое, похожее на броуновское движение митохондрий и перемещение в ядре большого темного ядрышка. Когда миграция клетки заканчивается, из ее цитоплазмы начинает расти длинный ветвящийся отросток (рис. 3, а). Если отросток (вероятно, нейрит) нейробласта тесно соприкасается с другими мигрирующими нейробластами, у него из перикариона вырастает еще 2—3 веточки (рис. 3, д) (С. Н. Оленев, 1967). Под влиянием карбохолина (2 мкг/мл) у нейробластов изредка удается вызвать дополнительное образование отростков, число которых может достигать 30, причем они густой короной окружают их круглое тело. Среди отростков такой клетки легко можно распознать



Рис. 3. Изолированный рост голых отростков нейробластов.

а — мигрирующие нейробласты *tectum opticum* в 3-дневной культуре 10-дневного куриного эмбриона. 20X10; б — псевдоподия конуса роста растущего нервного отростка. 70X20; в — д — нейробласты различного вида в зоне роста 7-дневной культуры 10-дневного куриного эмбриона. 70X20. Фазовоконтрастная микроскопия.



нейрит вследствие его большей длины. Подобный эффект карбохолина лучше проявляется, когда его добавляют к культуральной среде не в первые дни посева, а через 3—4 дня (С. Н. Оленев, 1964б).

Нейробласты, остающиеся в первичном эксплантате взаимосвязанными с нейроглией, могут переживать в культуре до 30 дней и более. Они отличаются от нейроглиальных клеток более оптически плотной цитоплазмой (в фазовом контрасте), сродством к солям серебра; их импрегнируемые отростки образуют сплетения. После 2—3 нед культивирования размеры большинства нейробластов остаются небольшими. Некоторые клетки имеют большую величину (15—20 мкм, ядра 12 мкм), при окраске по Ниссию в их цитоплазме выявляются базофильные гранулы, характерные для молодых нейронов. Возможно, что в исходном материале *in vivo* 10-дневных куриных эмбрионов уже были начавшие дифференцироваться молодые нейроны.

При гистохимическом исследовании хорошо видно, что нейробласты и молодые нейроны существенно различаются в отношении активности ферментов. В нейронах имеет место высокая активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и неспецифической эстеразы; активность же моноаминоксидазы (МАО) в них может отсутствовать. Небольшая часть крупных нейробластов содержит фермент разрушения  $\gamma$ -аминомасляной кислоты. В 7—14-дневных культурах *tectum opticum* 10-дневных куриных эмбрионов обнаружены нейробласты, содержащие АХЭ и ГАМК-Т или только АХЭ. В мелких нейробластах имеется умеренная активность АХЭ и МАО (С. Н. Оленев и др., 1968).

Культуры *tectum opticum* 15-дневных куриных эмбрионов характеризуются активной миграцией в зону роста астроцитов и в меньшей степени олигодендроцитов, в результате чего в первую неделю культивирования наблюдается распластывание эксплантатов по стеклу. Астроциты в 2-недельных культурах имеют различный вид в зависимости от того, находятся ли они в области первичного эксплантата или в зоне роста. В первичном эксплантате они мультиполярны с многочисленными длинными и ветвящимися отростками и ядром, содержащим несколько ядрышек. В зоне роста тела и ядра астроцитов имеют значительно большую величину по сравнению с астроцитами эксплантата; цитоплазма этих клеток часто

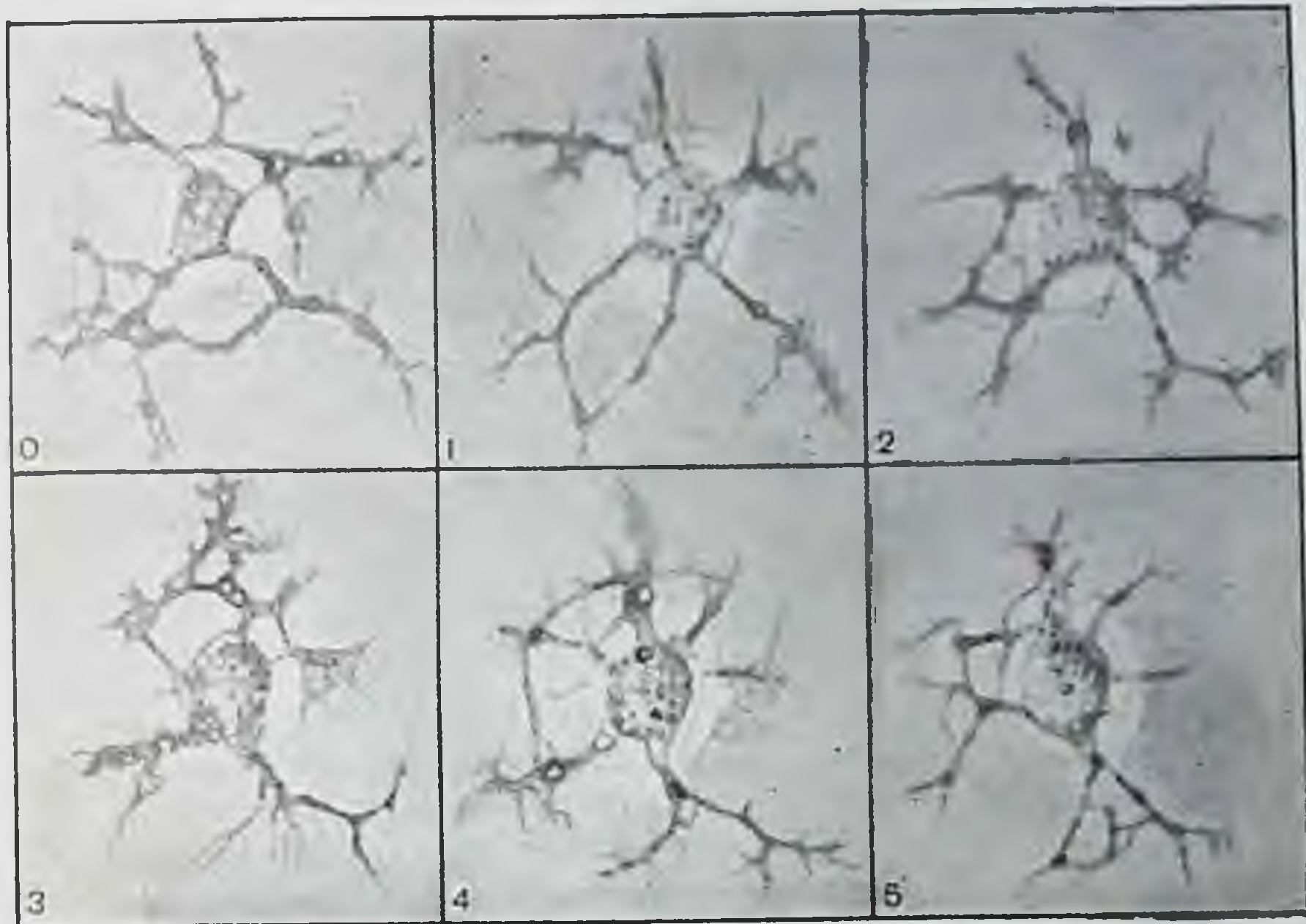
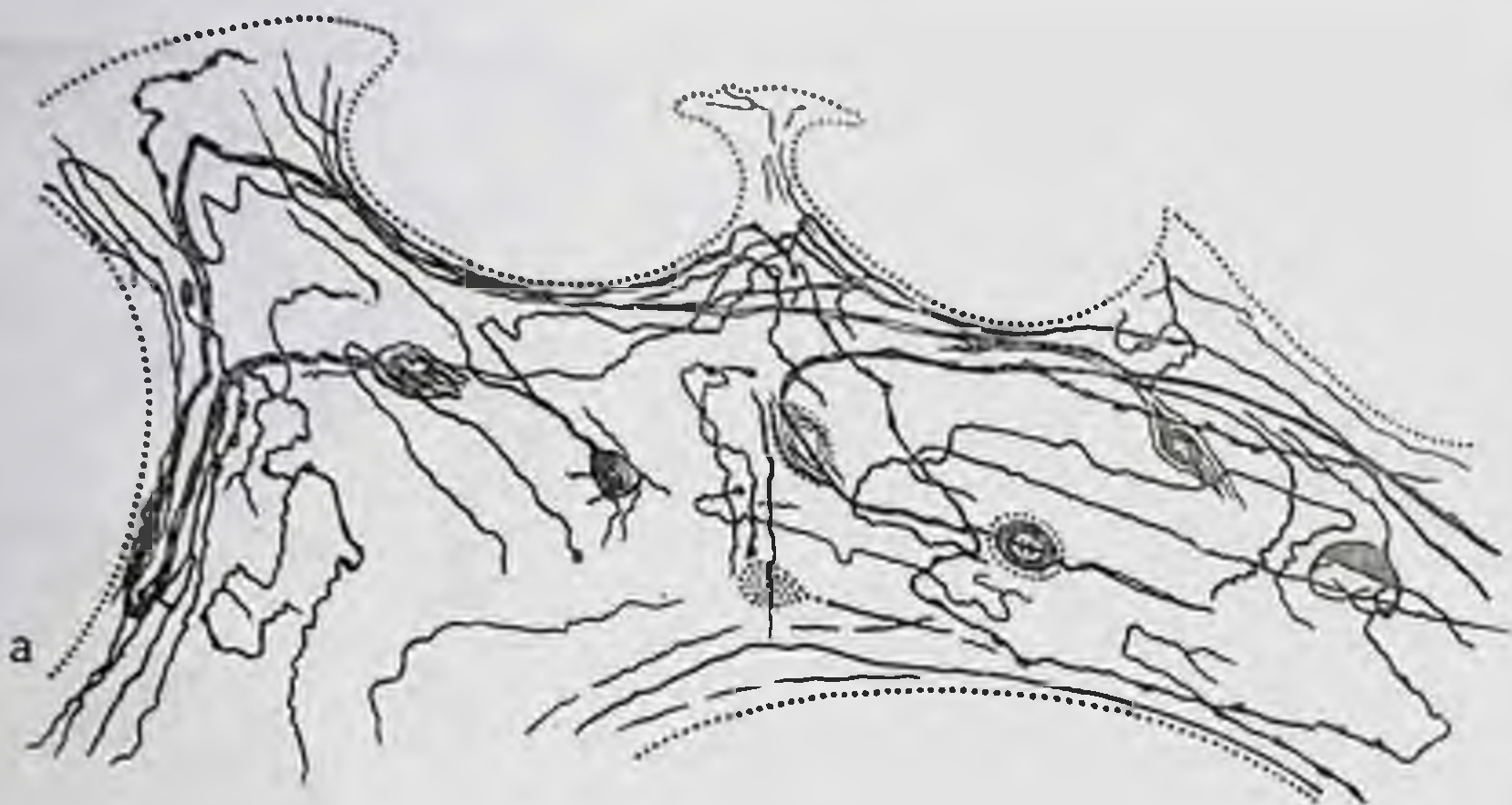


Рис. 4. Олигодендроцит в зоне роста эксплантата *tectum opticum* 17-дневного куриного эмбриона 10-дневной культуры через 0, 1, 2, 3, 4, 5 ч наблюдения. Рисунки с серии микрофотографий, снятых в перфузионной камере. Мультиполярные клетки с меняющейся конфигурацией отростков. 90X20. Фазовоконтрастная микроскопия.

вытянута в радиальном направлении, а разветвления отростков слабо выражены. Олигодендроциты в области первичного эксплантата представляют мелкие отростчатые клетки, цитоплазму которых не удастся импрегнировать солями серебра. В зоне роста у олигодендроцитов видны многочисленные ветвящиеся и анастомозирующие друг с другом отростки (рис. 4). Эпендимная глия, образующая плотно расположенные скопления, снабжена мерцательными ресничками, движения которых видны при прижизненной фазовоконтрастной микроскопии.

Нейроны в первичном эксплантате 10-дневной культуры 15-дневного куриного эмбриона достигают значительных размеров (30 мкм) и имеют отчетливо выраженные нейрофибриллы и нейриты (рис. 5, а, б). По своим размерам они соответствуют самым крупным мультиполярным нейронам 3-го слоя *tectum opticum*, но в отличие от





того, что наблюдается *in vivo*, дендриты у них значительно меньше развиты. *In vivo* образование этих дендритов связано с индуцирующим воздействием нейритов ганглиозных клеток сетчатки, вследствие чего можно предполагать, что отсутствие таких влияний в культуре вызывает их недоразвитие. Нейриты этих крупных нейронов, часто располагающиеся по краю эксплантата, образуют первичные волокна, которые могут достигать 2 мм длины. Эти волокна на большом протяжении переплетаются между собой, и на многих из них видны варикозные утолщения. От нейритов отходят многочисленные ответвления, проникающие в глубь эксплантата или в зону роста, откуда они иногда возвращаются обратно, образуя петли. Клетки 4-го слоя *tectum opticum* в культурах представляют многочисленные мелкие веретенообразные нейроны со слабо выраженными нейрофибриллами и небольшим количеством гранул нислевского вещества в узком ободке цитоплазмы (рис. 5, в, г). Короткие нейриты этих клеток, переплетаясь с отростками других таких же клеток, образуют нервное сплетение в виде плотного «войлока».

В эксплантатах *tectum opticum* 17-дневного куриного эмбриона на 6—15-й день культивирования наблюдается очень интенсивная миграция в зону роста нейроглии преимущественно протоплазматических астроцитов. Астроциты в области первичного эксплантата и в зоне роста существенно различаются между собой. В эксплантате их цитоплазма плотная при фазовоконтрастном микроскопировании, они имеют более длинные отростки и активно

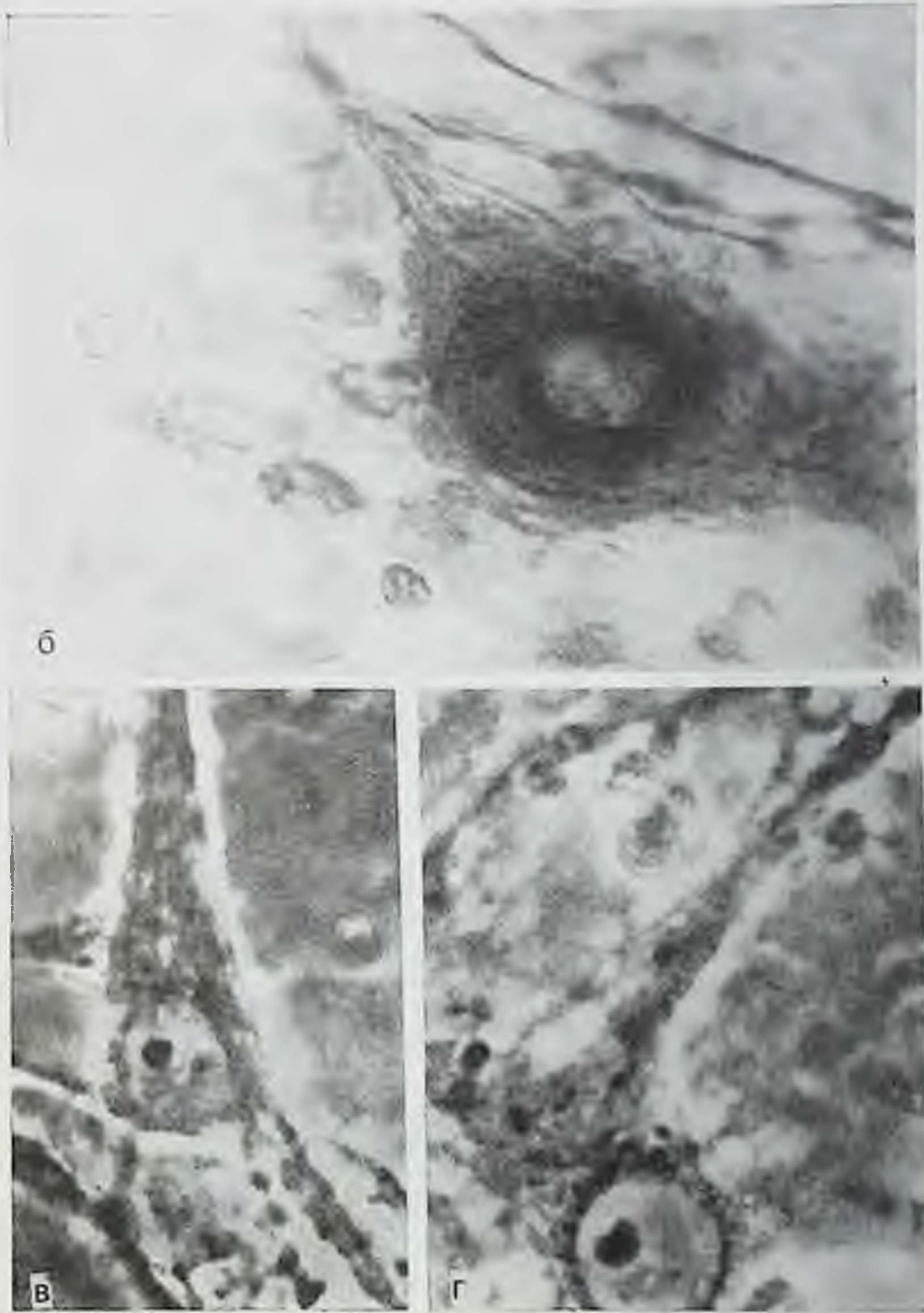


Рис. 5. Организация tectum opticum в культуре 15-дневного куриного эмбриона.

а — распределение нервных волокон в эксплантате 10-дневной культуры; б — нефибриллярная сеть в нейроне. Импрегнация серебром по Бильшовскому — Буке. 60X15; в, г — пирамидная и мультиполярная нервные клетки при прижизненном фазово-контрастном наблюдении в 15-дневной культуре. 40X20.

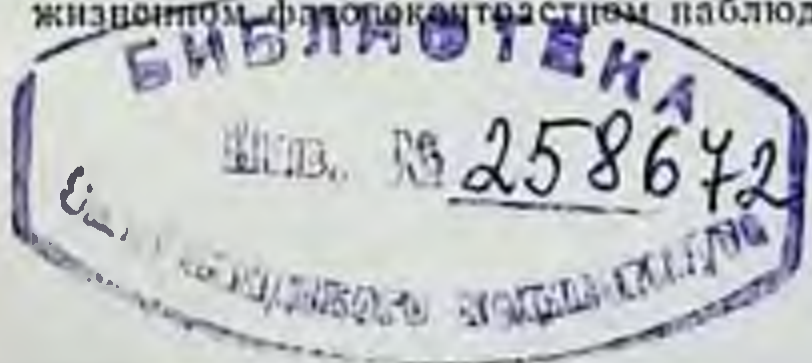






Рис. 6. 16-дневная культура куриного эмбриона перед вылуплением. а — общий вид. 20X10; в, г — синаптоподобные петельки. 90X20; б — нейрофибриллы в веретенообразном нейроне. 40X10. Импрегнация по Вейссу; д — синаптоподобные петельки в 15-дневной культуре 17-дневного куриного эмбриона. Импрегнация по Бильшовскому — Буке. 90X15.

митотически делятся до 10-го дня культивирования. В зоне роста цитоплазма астроцитов менее плотная, их отростки более широкие и короткие. Иногда в астроцитах обнаруживаются PAS-положительные гранулы. Астроциты совместно с олигодендроцитами образуют как бы подкладку, на которой расположены хорошо импрегнируемые нейроны. Олигодендроциты обладают умеренной миграционной активностью и в зоне роста представляют мелкие мультиполярные клетки с ветвящимися, часто анастомозирующими друг с другом короткими отростками. При прижизненном фазовоконтрастном микроскопировании можно видеть изменение конфигурации этих ветвей (см. рис. 4). Округлые или овальной формы ядра олигодендритов видны плохо, а на фиксированных и окрашенных препаратах в этих ядрах обнаруживается от 2 до 6 мелких зерен.

Разнообразные нейроны находятся в центральной части распластавшегося эксплантата, что свидетельствует об отсутствии у них способности мигрировать. Наиболее часто в культурах встречаются мелкие нейроны (рис. 6, а). В крупных нейронах хорошо выражены нейрофибриллы (рис. 6, б), нислевское вещество, однако образования дендрических разветвлений, как у мультиполярных клеток 3-го слоя *tectum opticum*, не наблюдается. При импрегнации серебром по методике Вейсса на отростках нейронов видны мелкие петлевидные или булавовидные структуры, сходные с синапсами (рис. 6, в—д). На отдельных дендритах при импрегнации серебром по Бильшовскому — Буке расположены редкие шипикоподобные образования. *In vivo* в этом отделе головного мозга цыплят шипиковый аппарат дендритов хорошо развит.

Таким образом, на основании исследования культур *tectum opticum* куриных эмбрионов на различных стадиях развития можно было проследить дифференциацию и рост взаимосвязанных нейрональных клеток как в первичном эксплантате, так и в зоне роста.

### 1.1.2. Мозжечок

В опытах с культивированием мозжечка можно хорошо проследить дифференциацию разных типов нейронов и показать, что в условиях культуры происходит цепь взаимосвязанных изменений, приводящая к недоразвитию дендритов клеток Пуркинье.



Мозжечок по сравнению с другими отделами ЦНС формируется в эмбриогенезе довольно поздно. В виде единой закладки он образуется в результате слияния двух ромбовидных губ у куриного эмбриона на 9-й день инкубации, а у крысы — на 15-й день беременности. У куриных эмбрионов на 12—15-й день инкубации и у новорожденных крысят и мышат (т. е. на стадии, которую чаще всего изучают в культурах) борозды мозжечка начинают формироваться и кора имеет слоистую структуру, но эмбриональный наружный зернистый слой еще хорошо выражен. В мозжечке уже существуют все типы нервных клеток, за исключением клеток-зерен во внутреннем зернистом слое, которые при последующем развитии еще мигрируют из редуцирующего эмбрионального наружного зернистого слоя. В мозжечке на этой стадии развития клетки Пуркинье еще не имеют нислевского вещества (оно образуется в ближайшие 5 дней), и их дендриты еще не полностью развиты.

В культуре мозжечка 12—15-дневных куриных эмбрионов или новорожденных крысят и мышат в течение первой недели культивирования нейроглия мигрирует в зону роста; сюда же проникают клетки-зерна эмбрионального наружного зернистого слоя и нейриты нейробластов, которые все вместе образуют зону роста вокруг первоначального эксплантата.

На второй неделе культивирования эксплантат распластывается по стеклу, и в центральной зоне его видны нейроны и их отростки. Вокруг осевых цилиндров образуются миелиновые оболочки, причем в зонах активной миелинизации появляются многочисленные олигодендроциты. Первыми миелинизируются нейриты нейронов собственных ядер мозжечка, а несколько позже — клеток Пуркинье (Allegand, Muggay, 1968; Hild, 1959).

В 3-недельных культурах парасагиттально вырезанных эксплантатов мозжечка новорожденных мышей кора сохраняет 2- или 4-слойную структуру. При 2-слойной структуре в наружной зоне эксплантата находятся клетки-зерна, а под ними расположен слой клеток Пуркинье. В части случаев в эксплантатах мозжечка имеются зачатки 4 слоев: наружного и внутреннего зернистого, молекулярного и клеток Пуркинье (Seil, 1972).

Клетки-зерна в культуре переживают в составе слоя, соответствующего эмбриональному наружному зернистому слою целого организма. В этом слое среди тесно

расположенных клеток с очень тонким ободком цитоплазмы (5—6 мкм) при серебрении по Гольджи или при электронной микроскопии обнаруживаются зрелые клетки-зерна с дендритами в виде «птичьей лапки» и синапсами на их поверхности (Wolf, Dubois-Dalcq, 1970; Seil, 1972).

Клетки Пуркинье в 2—3-недельных культурах имеют овальной формы тела (12—20 мкм), длинные нейриты и 1—4 широких дендрита. Дендриты, как и тело, импрегнируются по методу Холмса хуже, чем нейрит (Wolf, 1964). В культурах дендритические разветвления клеток Пуркинье никогда не достигают значительной степени сложности, которая бывает у взрослых животных, и шипики на них не удастся выявить ни с помощью импрегнации по Гольджи, ни при электронно-микроскопическом исследовании (Wolf, Dubois-Dalcq, 1970; Seil, 1972). Hild (1966) также отметил слабое развитие дендритов клеток Пуркинье и высказал гипотезу, что это зависит от гибели в культуре значительной части клеток-зерен из-за отсутствия моховидных волокон.

Недостаток клеток-зерен, в свою очередь, вызывает редукцию дендритического дерева клеток Пуркинье, вследствие чего их тела иногда приобретают округлую форму. Нейриты клеток Пуркинье, растущие из первоначального эксплантата, не выходят за пределы мигрирующих глиальных клеток (Hild, 1966). Часто они направляются в зону роста, затем поворачивают назад и образуют различного вида петли, которые могут достигать 15 мм длины. Коллатерали возвращающихся нейритов заканчиваются у дендритических веточек других клеток Пуркинье (Seil, 1972). При одновременном посеве рядом двух эксплантатов мозжечка вырастающие нейриты клеток Пуркинье могут связывать нейроны обоих эксплантатов, образуя касательные синапсы (*en passant*) или большие (2 мкм) и маленькие петельки (Allemand, 1969). Как известно, цитоплазма клеток Пуркинье в мозжечке обладает высокой активностью ферментов гликолиза (лактат-ДГ), пентозного цикла (глюкозо-6-фосфат-ДГ), цикла Кребса (изоцитрат-ДГ, малат-ДГ), а также  $\alpha$ -глицерофосфат-ДГ, НАД- и НАДФ-диафараз. Активность этих ферментов в культивируемых клетках очень незначительно отличается от активности в этих клетках *in vivo* (Kim, 1966). В развивающемся организме в процессе дифференциации клеток Пуркинье активность в них ацетилхо-



линэстеразы (АХЭ) сначала нарастает, а затем снижается и полностью исчезает. В культурах мозжечка 17—21-дневных куриных эмбрионов активность этого фермента не снижается, что, возможно, свидетельствует о недостаточной дифференциации этих клеток по сравнению со взрослым организмом (Iergaldi, Cataldi, 1972).

Звездчатые, корзинчатые клетки и нейроны II типа Гольджи трудно идентифицировать в культурах, импрегнированных серебром по методу Холмса и Бодяна. Однако при реакции на АХЭ корзинчатые клетки, как и *in vivo*, обладают высокой активностью ацетилхолинэстеразы (Iergaldi, Cataldi, 1972).

Приведенные наблюдения над культурами мозжечка показывают, что нейроны его могут дифференцироваться, но их дендриты не достигают такой сложности структуры, как *in vivo*. При этом ферментативная активность в клетках Пуркинье в условиях эксплантата заметно не снижается. На этом примере также показана возможность образования синаптических связей между нейронами двух рядом расположенных культур.

### 1.1.3. Спинной и продолговатый мозг и развитие нейро-мышечных синапсов

Культивирование спинного и продолговатого мозга представляет интерес, с одной стороны, как пример дифференциации моторных нейробластов и сохранения органо-типической организации их сегментов в культуре и, с другой стороны,— как пример взаимных влияний моторных нервных волокон и мышечных клеток.

В части нервной трубки, которая в дальнейшем превращается в спинной и продолговатый мозг, нейробласты появляются на очень ранних стадиях эмбриогенеза. У куриного эмбриона первые униполярные нейробласты уже видны на 2—3-й день инкубации, а на 6-е сутки моторные нейробласты начинают дифференцироваться в нейроны. В это время появляются нейро-мышечные синапсы, а к 13-м суткам можно установить их ультраструктурную зрелость. У мыши и крысы моторные нейробласты появляются на 12—13-й день беременности, а на 16—17-е сутки они дифференцируются в молодые нейроны. На 17-й день беременности нейро-мышечные синапсы созревают, что выражается в развитии складчатости постсинаптических мембран и концентрации в мышечном во-

локне АХЭ в области синапса (обзор см.: Л. М. Сорокина и соавт., 1973).

В культуре после трипсинизации нервной трубки 50—68-часового куриного эмбриона происходит дифференциация клеток вначале в нейробласты, а затем в моторные нейроны (Kim, Wenger, 1973). Размеры нейрональных клеток значительно увеличиваются в процессе культивирования: в момент посева их поперечник составляет 5—8 мкм, через неделю культивирования — 14—20 мкм, а через 3 нед — 40—50 мкм. После 10 дней *in vitro* в моторных клетках появляются нислевское вещество и фермент синтеза ацетилхолина — холинацетилтрансфераза. В культуре моторные нейроны спинного мозга отличаются от таковых целого организма развитием у них более длинных дендритов.

При культивировании сегмента спинного мозга 14—16-дневных плодов мыши сохраняется органотипическая структура (нейроны дорсальных и вентральных рогов, вентральная комиссура, вентральные корешки) (Sobkowicz e. a., 1968). Если культивировать спинной мозг, взятый на 14-й день беременности, когда в нем еще отсутствуют синапсы, то *in vitro* происходит их новообразование. Через 70 ч после посева первыми появляются аксо-дендритические синапсы (Bunge e. a., 1965). Параллельно с образованием в спинном мозге синапсов появляется электрическая активность: при электростимуляции на 2—3-й день культивирования удается зарегистрировать лишь простой биопотенциал действия, через 3—4 дня наблюдаются медленные волны, а в 3—4-недельных культурах — длительные синхронные и циклические биопотенциалы (Craip, 1970). Синаптические структуры, формирующиеся в культурах, сходны с таковыми *in vivo* как по их действию и электрической активности, так и по включению меченых медиаторов. Так, меченые глутамат и глицин, предположительные медиаторы нейронов дорсальных рогов, активно включаются в эти клетки в условиях культуры. Введение в культуру с помощью микропипеток глутамата вызывает деполяризацию, а глицина — гиперполяризацию нервных клеток (Hosli, 1974).

Согласно данным, полученным совместно С. Н. Оленевым и Л. Д. Шкляевой, в 20-дневной культуре сегмента продолговатого мозга 12-дневного куриного эмбриона сохраняются исходные топографические взаимоотношения (рис. 7, а). Симметрично вентрально расположенные мо-



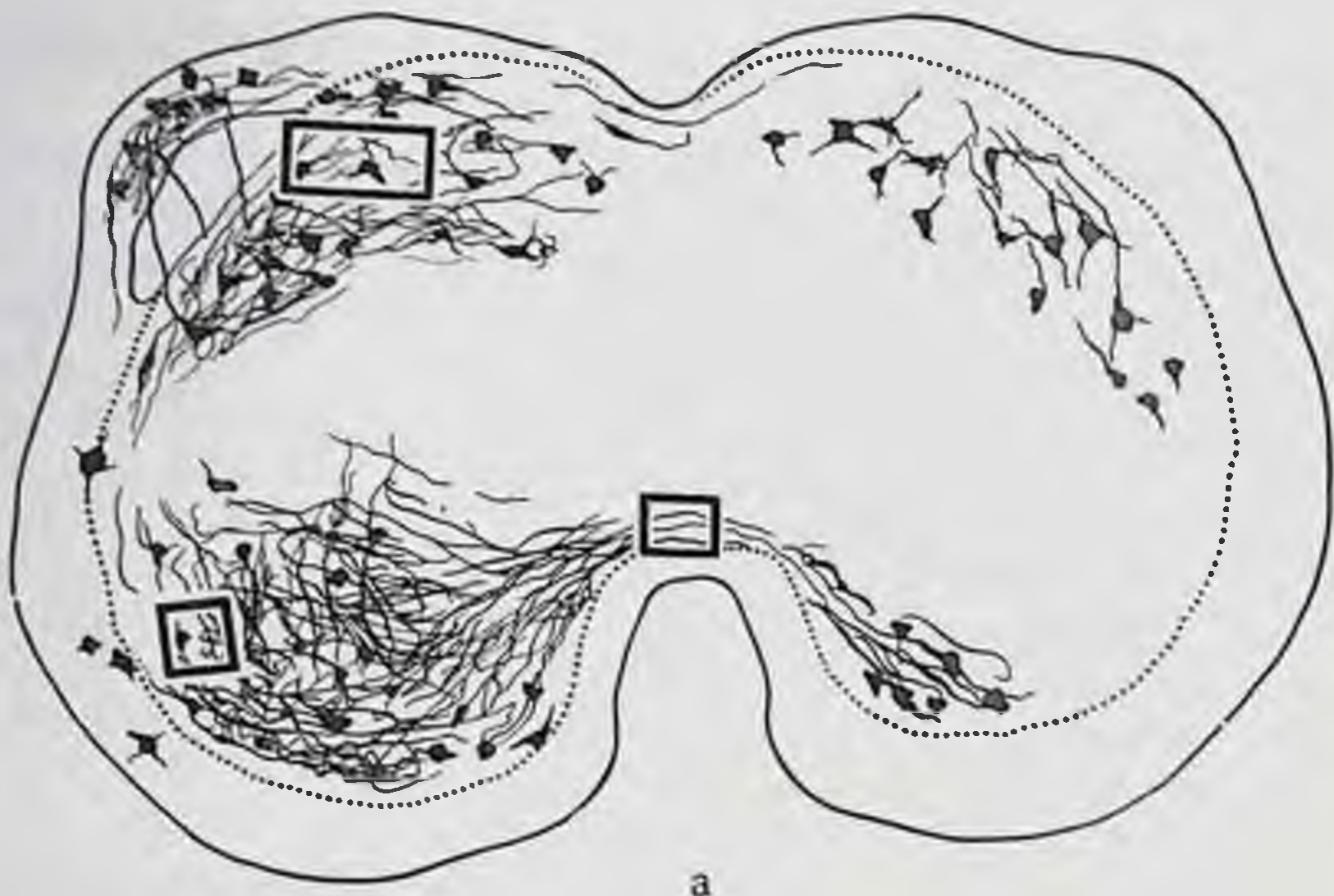


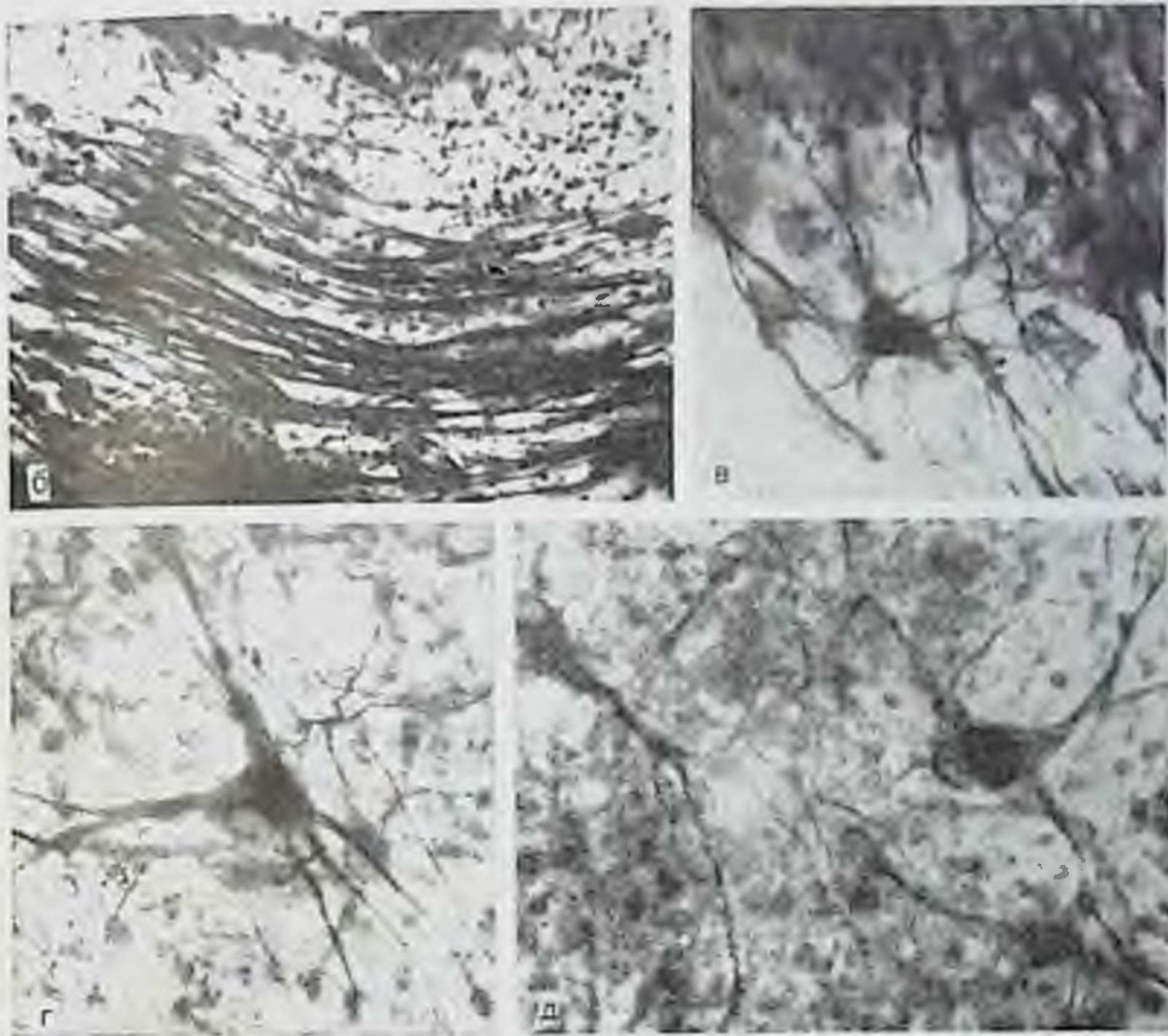
Рис. 7. 20-дневная культура сегмента продолговатого мозга 12-дневного куриного эмбриона.

а — общий вид.  $\times 3,5$ ; б — волокна дорсальной комиссуры.  $20 \times 10$ ; в — нейроны нисходящего ядра тройничного нерва.  $40 \times 7$ ; г, д — моторные нейроны двигательных ядер черепно-мозговых нервов.  $40 \times 7$ . Импрегнация по Холмсу.

торные нейроны двигательных ядер черепных нервов (рис. 7 г, д) и дорсально — нейроны нисходящего ядра тройничного нерва (рис. 7, в) окружают центрально расположенную полость — остаток IV мозгового желудочка и сохранившиеся комиссуральные волокна (рис. 7, б). Таким образом, в культуре сегмента продолговатого мозга, как и спинного, сохраняется в высокой степени органотипическая организация.

Развитие нейро-мышечных синапсов *in vitro* описано в работе Bornstein с соавт. (1973), которые культивировали спинной мозг, спинальные ганглии и сомиты 20—16-дневных зародышей мыши. Через неделю после начала культивирования миобласты превращаются в симпластические мышечные трубочки, и в это же время на них появляются нейро-мышечные синапсы. Их электронно-микроскопическая структура не отличается от наблюдаемой в целом организме. На 2—3-й неделе в explantатах спинного мозга миелинизируются нервные волокна моторных нейронов, но в области нейро-мышечного синапса





они остаются без миелиновой оболочки. Через месяц культивирования число нейро-мышечных синапсов уменьшается, что, вероятно, следует связать с их частичной гибелью. Аналогичное исследование провели Капо и Shimada (1971), которые совместно культивировали спинной мозг 6-дневного и трипсионизированные мышечные клетки 12-дневного куриных эмбрионов. На 3—5-е сутки культивирования мнобласты образовывали многоядерные мышечные трубочки, через неделю уже были видны нейро-мышечные синапсы и в мышечных волокнах появилась поперечная исчерченность. При электростимуляции эксплантата спинного мозга внутриклеточными микроэлектродами были зарегистрированы потенциалы действия мышечных клеток; тубокурарин (1 мкг/мл) обратимо блокировал этот эффект.

При исследовании органотипических культур нервной ткани показано, что врастающие нейриты моторных нейронов индуцируют не только морфологическую дифференциацию мышц (усиливают образование мышечных



трисомеи и развитие поперечной исчерченности), но и вызывают в мышцах биохимические и функциональные изменения. Так, активность АХЭ в мышце в трипсинизированных 10-дневных культурах 10-дневных куриных эмбрионов в 2 раза выше при иннервации их нервными волокнами из культивируемого спинного мозга по сравнению с культурами, в которых их нет (Oh e. a., 1972). Вероятно, развитие активности АХЭ мышц зависит от находящегося в нервном волокне ацетилхолина. Ацетилхолинподобный препарат (ацетил- $\beta$ -метилхолин) увеличивает активность АХЭ в мышцах в те же сроки культивирования (Oh, Johnson, 1972). В культуре также удалось установить другой индуцирующий эффект нервных волокон на мышцы, при котором в процессе дифференциации мышечного волокна уменьшается его поверхность, чувствительная к ацетилхолину. Так, в неиннервируемых мышечных волокнах хеморецепторная чувствительность к ацетилхолину распределяется равномерно по всей их поверхности, а при иннервации их она локализуется только в области концевой моторной пластинки (Капо, Shimada, 1971).

Приведенные данные показывают, что в культурах спинного и продолговатого мозга нейроны могут дифференцироваться и устанавливать функциональные связи с мышечными клетками, индуцируя при этом их дифференциацию.

## 1.2. Производные ганглиозной пластинки

У куриного эмбриона ганглиозная пластинка отделяется от нервной трубки на стадии 45—56 ч инкубации, а у плодов крысы — на 11-й день беременности. Вскоре после этого клетки ганглиозной пластинки (ганглиобласты) мигрируют вентрально, сбоку от нервной трубки. В этот период мигрирующие клетки нельзя отличить от клеток окружающей мезенхимы. Производные ганглиозной пластинки начинают образовывать зачатки спинальных ганглиев на 3-и сутки инкубации куриного эмбриона и на 12—13-й день беременности крысы. Из ганглиозной пластинки, помимо большинства чувствительных ганглиев, развиваются вегетативные ганглии (симпатические и парасимпатические), а также хромаффинная ткань надпо-

чечников, хрящи гортани, пигментные клетки и, возможно, клетки мягкой мозговой оболочки, одонтобласты и энтерохромоаффинные клетки кишечника (см. обзор: А. Г. Кнорре, 1971; С. Н. Оленев, 1972).

В культуре изолированные клетки ганглиозной пластинки (ганглиобласты) полутораднего куриного эмбриона быстро гибнут. При культивировании же материала ганглиозной пластинки на хорионаллантоисной оболочке совместно с другими тканями этого эмбриона ганглиобласты дифференцируются в симпатические нейробласты (симпатобласты). Эти мелкие норадреналинсодержащие клетки с короткими отростками и иногда более длинным нейритом развиваются в недельных культурах из материала ганглиозной пластинки полутораднего эмбриона только после их контакта с клетками сомитов. При искусственном контакте, создаваемом при культивировании эксплантатов ганглиозной пластинки, сердечной мышцы или зачатков конечностей, они не дифференцируются, в то время как при культивировании с вентральной частью спинного мозга симпатобласты созревают (Cohen, 1972). В органной культуре Nott (1973) также получил дифференциацию симпатобластов из клеток ганглиозной пластинки в присутствии сомитов и спинного мозга. Он доказал, что этот эффект спинного мозга не прямой; первично эксплантат спинного мозга вызывает дифференциацию сомитов и вторично сомиты обуславливают созревание симпатобластов.

### 1.2.1. Спинальные ганглии

При культивировании спинальных ганглиев в первую очередь изучены процесс распластывания эксплантатов, морфологическая дифференциация нейронов и гистохимические отличия нервных клеток в культуре от клеток *in vivo*.

В эмбриогенезе в спинальных ганглиях первые нейробласты появляются у куриного эмбриона на 3-и сутки инкубации, у плодов крысы — на 13-й день беременности. У 6—8-дневного куриного эмбриона в вентро-латеральном отделе имеются нейроны более крупных размеров (диаметром 16 мкм), а в дорсо-медиальном отделе — более мелкие нейробласты (диаметром 7 мкм). В эти сроки процесс дифференциации клеток-сателлитов и шванновских клеток только начинается. На 9-е сутки инкуба-



ции куриного эмбриона появляется соединительнотканная капсула ганглия и заметно увеличивается число клеток-сателлитов. Общее число клеток, подсчитанное нами на срезах по числу ядер у 9-дневного куриного эмбриона, составляет в каждом тазовом ганглии от 1000 до 1500 (из них около 500 клеток с нейрофибриллами), в мелких сакральных ганглиях — 300—400 клеток. К 14-му дню инкубации инселевское вещество обнаруживается во всех нейрональных клетках. Инициальный клубочек и миелин начинают образовываться с 16—18-го дня инкубации (У. Х. Умаров, 1969).

Характер роста эксплантатов спинального ганглия, как и *tectum opticum*, зависит от степени зрелости взятой для культивирования нервной ткани. При культивировании спинальных ганглиев 5—6-дневных куриных эмбрионов растут лишь отростки нейробластов, не сопровождаемые шванновскими клетками или фибробластами. В материале от 8-дневных куриных эмбрионов также сначала растут голые отростки нейробластов, а затем происходит миграция: вначале — фибробластов, а затем — шванновских клеток, что приводит к распластыванию эксплантата. При культивировании спинальных ганглиев куриных эмбрионов старше 12—14-го дня инкубации, когда эксплантаты уже содержат нейроны, периферическая зона образуется лишь шванновскими клетками и фибробластами (С. Н. Оленев и соавт., 1970; С. Н. Оленев, 1971; Olivo, 1927; Nakai, Kawasaki, 1959).

При прижизненном наблюдении эксплантатов спинальных ганглиев 8-дневного куриного эмбриона уже через 6—12 ч культивирования отмечаются первые проявления роста отростков нейробластов (рис. 8) и миграция в зону роста единичных фибробластов.

Очень важно установить, можно ли морфологически различать в зоне роста культуры спинальных ганглиев периферическую ветвь его отростка (дендрит) от центральной ветви (нейрита). По-видимому, это возможно, хотя и трудно. Так, Filogato и Barasa (1965) и Barasa и соавт. (1970) указывают на следующие различия. Центральные отростки спинальных ганглиев растут обычно пучками, образуя на концах псевдоподии, и содержат много нейрофиламент и мало нейротубул. Периферические отростки нейробластов спинальных ганглиев растут быстрее, имеют более крупный конус роста с ундулирующими мембранами и обладают активным пиноцито-

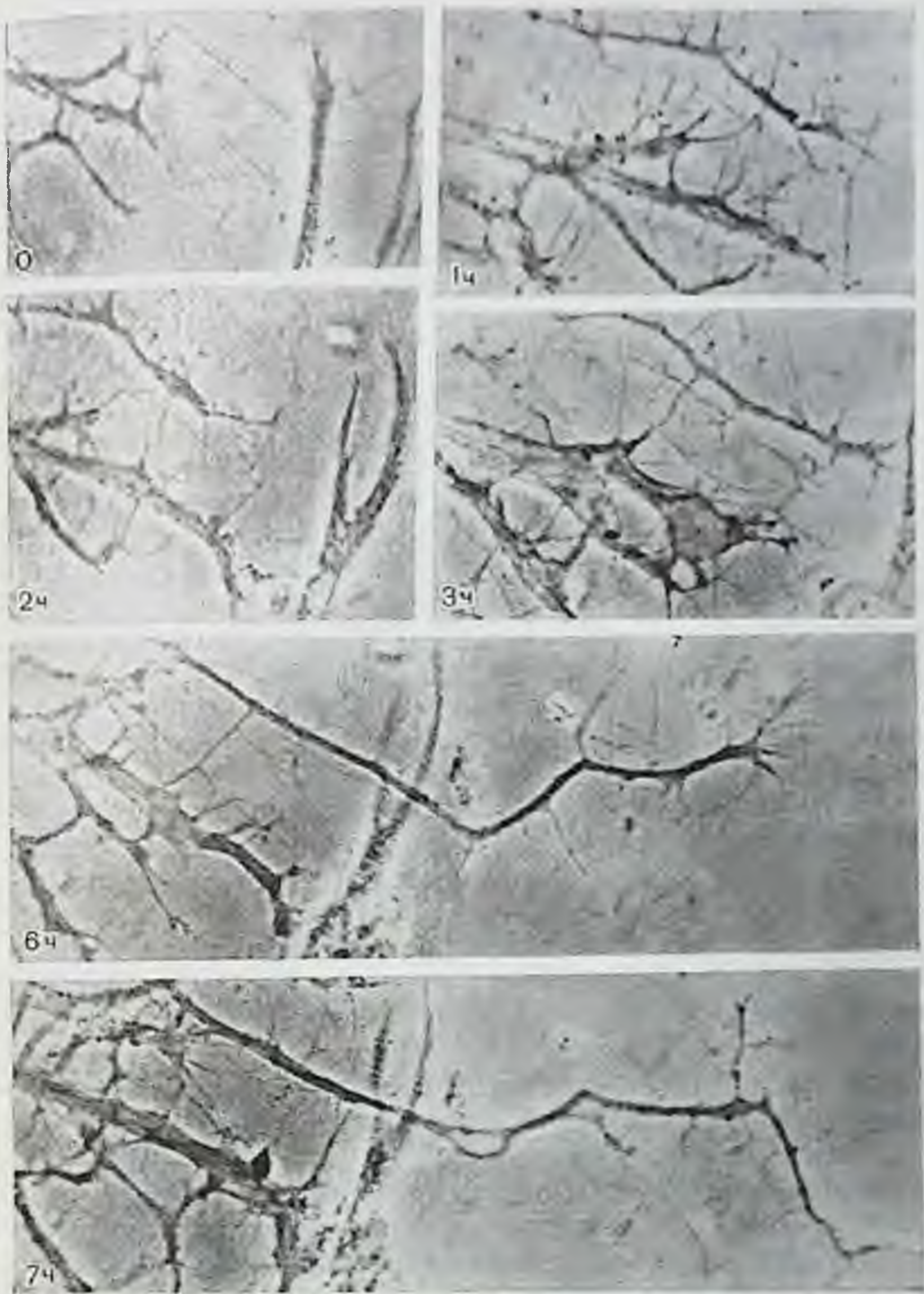


Рис. 8. Рост отростков нейробластов спинальных ганглиев 7-дневного куриного эмбриона на 2-е сутки в культуре. Сфотографировано прижизненно в перфузионной камере с начала наблюдения и через 0; 1; 2; 3; 6; 7 ч. Справа на микрофотографии виден относительно неподвижный фибробласт. 90X7. Фазово-контрастная микроскопия.



зом; они содержат много нейротубул и мало нейрофиламент. Средняя длина отростков нейробластов через 24 ч культивирования — 200 мкм, а через 48 ч — уже около 450 мкм. При стимуляции роста периферической ветви отростков нейробластов нейроростовым фактором (НРФ) средняя длина их соответственно увеличивается до 250—400 и 700 мкм; при этом значительно нарастает и их количество. В течение первых 2—3 дней рост отростков нейробластов опережает миграцию шванновских клеток и фибробластов. В период активного роста отростки нейробластов можно импрегнировать серебром только методом Вейсса, но не Бильшовского или Холмса.

При прижизненном фазово-контрастном наблюдении за одним и тем же отростком нейробласта зоны роста видно, что быстрый рост носит кратковременный характер и не превышает 1—2 сут. По истечении этого срока двигательная активность этого отростка «замирает», он становится малоподвижным, а в некоторых случаях даже укорачивается (ретрагируется) (рис. 9). Расположение первично вырастающих отростков нейробластов в значительной степени определяет направление последующего роста других отростков.

На 2—3-и сутки культивирования усиливается передвижение фибробластов и при микрокиносъемке видна реакция этих клеток на прикосновение к ним конуса роста. Непосредственно после этого фибробласт из распластанной малоподвижной формы становится компактным и плотным, причем его отростки частично втягиваются; через некоторое время он начинает передвигаться более активно. Обычно в зоне роста и при утрате контакта с нервными отростками и другими фибробластами двигательная активность одиночных фибробластов значительно уменьшается.

Через неделю культивирования эксплантат распластывается. В процессе культивирования меняются отношения между растущими нервными отростками, фибробластами и начавшими мигрировать шванновскими клетками. Если в первые сутки культивирования рост отростков нейробластов обгоняет миграцию фибробластов, то в дальнейшем скорость миграции последних и шванновских клеток опережает скорость роста нервных отростков. Через неделю культивирования в зоне роста появляются шванновские клетки, перемещающиеся по ходу отростков нейробластов. Эти клетки удлиненной, веретенообразной фор-



Рис. 9. Ретракция отростка нейробласта в однодневной культуре 8-дневного куриного эмбриона. Микрофотография с интервалом 1 ч. 90X7. Фазово-контрастная микроскопия.



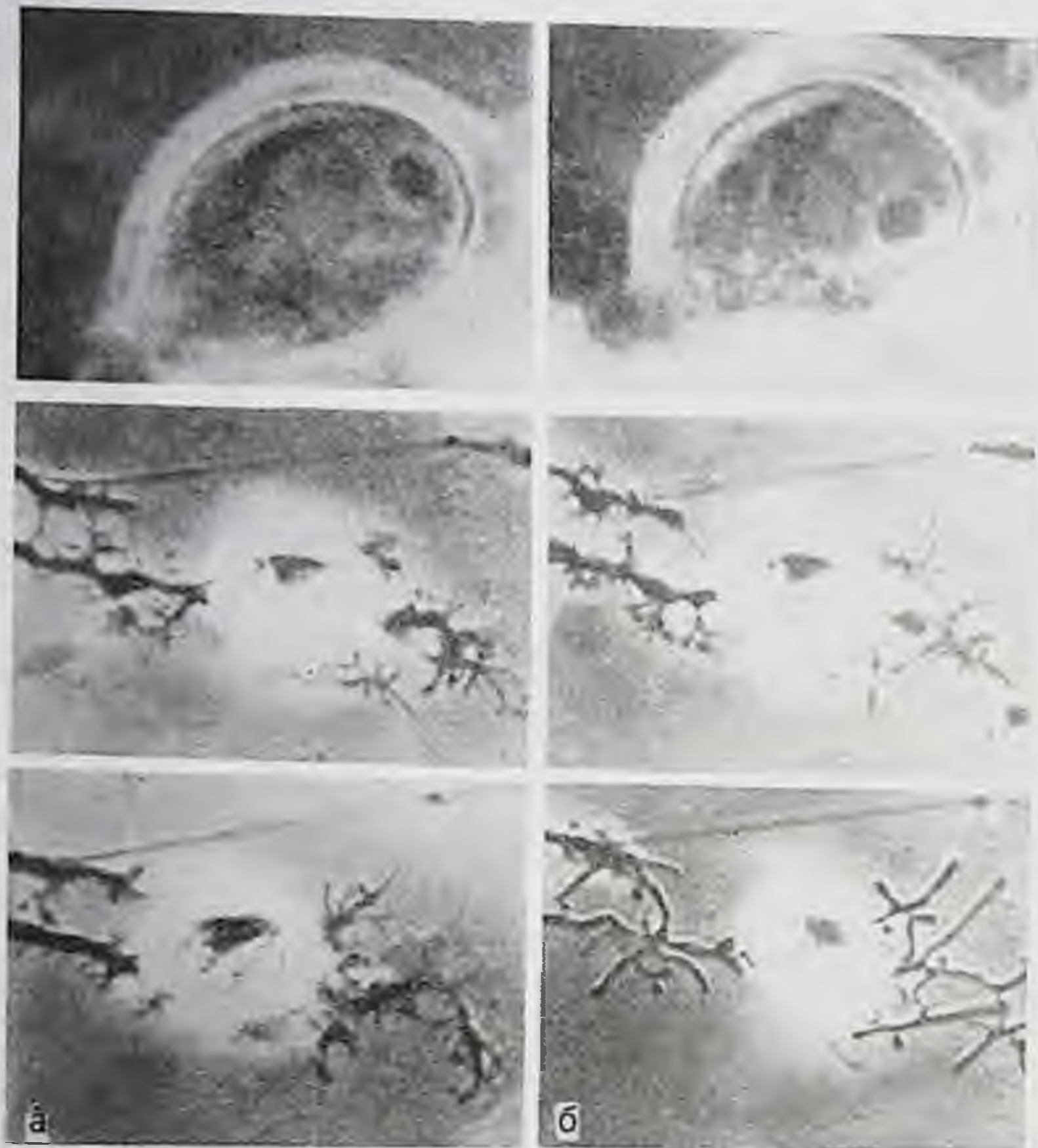


Рис. 10. Нейрон и сателлит при прижизненном наблюдении.

а — перемещение ядрышка в нейроне 15-дневной культуры спинального ганглия 10-дневного куриного эмбриона. Интервал между photographиями 1 ч; б — меняющаяся конфигурация отростков сателлита в 10-дневной культуре спинального ганглия 10-дневного куриного эмбриона. Интервал между микрофотографиями 1 ч. 90×7. Фазовоконтрастная микроскопия.

мы, с узким ободком околядерной цитоплазмы, имеют 2—3 длинных неразветвленных на концах отростка. Шванновские клетки зоны роста могут прилегать к отросткам нейробластов, образовывать друг с другом тяжи или лежать изолированно. Реже в зоне роста встречаются клетки такой же величины, но со значительными разветвлениями на концах отростков; при длительном наблюдении конфигурация этих отростков заметно изме-

няется (рис. 10). По мнению Shimizu (1959), — это клетки-сателлиты.

В двухнедельных и более поздних культурах вследствие истощения клеточного пласта в первоначальном эксплантате видны крупные биполярные нейробласты и псевдоуниполярные нейроны. Дифференциация нейробластов в нейроны спинальных ганглиев наблюдается лишь в эксплантатах куриных эмбрионов старше 5 дней инкубации. По данным Peterson и Muggay (1955), при посеве спинальных ганглиев от 4-дневных эмбрионов нейробласты дегенерируют, а при их посеве от 8-дневных эмбрионов происходит дифференциация нейробластов в нейроны. С удлинением срока культивирования размеры этих клеток увеличиваются; на 5-й день культивирования диаметр нейробласта составляет 7—10 мкм, на 25-й день — 25 мкм (максимальный диаметр достигает 37 мкм). На происходящую дифференциацию клеток спинального ганглия указывает также изменение соотношения количества биполярных нейробластов и псевдоуниполярных нейронов в пользу последних. При прижизненном наблюдении нейронов в фазово-контрастный микроскоп видны движения ядрышка в ядре и митохондрий в цитоплазме (см. рис. 10). Относительно редко в препаратах встречаются крупные мультиполярные неправильной формы нейроны с одним длинным и толстым отростком, а также 3—4 короткими отростками, которые иногда заканчиваются терминалями в виде клубочков. Для этих нейронов характерно наличие на отростках варикозных утолщений.

В 2—3-недельных культурах спинальных ганглиев 8—10-дневных куриных эмбрионов терминали отростков носят довольно разнообразный характер и встречаются следующих видов<sup>1</sup> (рис. 11): а) мелкие петельки со слабо импрегнируемой претерминалью. Большинство окончаний этого вида находится в эксплантате среди фибробластов и шванновских клеток, реже — возле нейронов и их отростков. Предположительно эти мелкие петельки представляют окончание центральной ветви (нейритов) нейронов спинального ганглия. Хотя электронно-микроскопически ни *in vivo*, ни *in vitro* не удалось найти синаптические контакты между нейронами спинальных ганглиев, электрофизиологические исследования Cain

<sup>1</sup> Трактовать природу этих концевых аппаратов, основываясь лишь на изучении препаратов, импрегнированных серебром, следует ориентировочно.



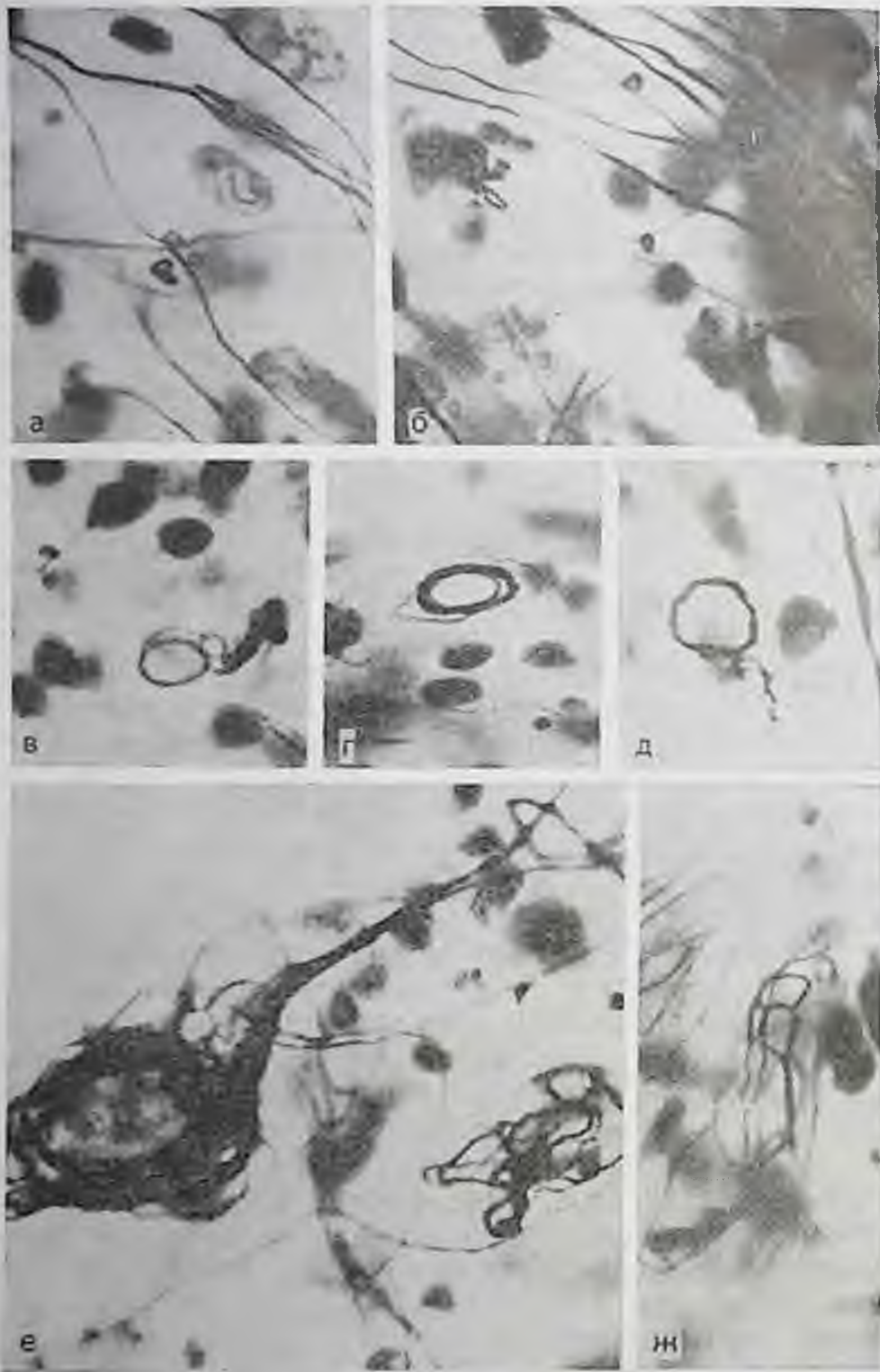


Рис. 11. Виды окончания нервных волокон в двухнедельных культурах спинальных ганглиев 10-дневных куриных эмбрионов. а, б — мелкие петельки; в — д — окончания в виде колечек; е — ж — окончания в виде извитых клубочков. 60X10. Импрегнация серебром по Холмсу.

(1971) указывают на возможность синаптической передачи первого импульса в культуре с одного нейрона на другой; б) крупные кольцеобразные структуры, образованные как тонкими, так и довольно толстыми волокнами, располагающиеся в центральных отделах эксплантата вне связи с телами или отростками нейронов. Такого вида терминали похожи на структуры, описанные А. А. Милохиным (1963) как рецепторы; в) окончания в виде извитых клубочков, которые встречаются в центральных отделах эксплантата; предположительно этот вид окончаний следует отнести к рецепторам (С. Н. Оленев, 1971). «Рецепторы» сходного вида Tischer и Thomas (1973) предложили выявлять комбинированной гистохимической окраской на АХЭ и щелочную фосфатазу; в этом случае в нервных терминалях обнаруживается АХЭ, а в специальных клетках рецептора — щелочная фосфатаза; г) дихотомически делящиеся терминали, которые, вероятно, следует отнести к простым рецепторам. Кроме этих терминалей, в культурах встречаются окончания, принадлежащие, по-видимому, дегенерирующим волокнам: а) набухшие, с варикозными натеками нейроплазмы, сильно аргентофильные терминали толщиной до 5 мкм и б) набухшие, сильно аргентофильные булавовидные терминалы диаметром 2 мкм (С. Н. Оленев, 1971).

При гистохимическом исследовании культур спинальных ганглиев можно выяснить некоторые отличия метаболизма культивируемых нейронов от того, что наблюдается в условиях целого организма. При комбинированном гистохимическом определении активности АХЭ и МАО (моноаминоксидазы) четко видно, что часть нейронных клеток содержит один фермент (АХЭ), а часть — другой (МАО). Хотя соотношения в распределении этих ферментов существенно варьируют в эксплантатах разных ганглиев, в среднем в 10—20% нейронов определяется активность МАО, в то время как в остальных — АХЭ. Распределение активности АХЭ в клетках ганглиев различается в зависимости от зрелости исходного материала. В культурах 5—6-дневных куриных эмбрионов более крупные нейробласты имеют большее количество фермента, чем мелкие. В культурах 12-дневных эмбрионов более крупные нейроны беднее АХЭ по сравнению с более мелкими нейробластами. Распределение активности АХЭ в нервных клетках изменяется и при культивировании, продолжающемся более 20 дней. Ве-



роятно, эти изменения соотношения активности ферментов отражают процесс дифференциации в культуре: мелкие, малодифференцированные нейробласты с бедной активностью АХЭ превращаются в более крупные и более дифференцированные нейробласты, богатые этим ферментом, а последние — в еще более крупные нейроны, у которых активность снижается. Аналогичная динамика изменений активности этого фермента имеет место при созревании нервных клеток спинальных ганглиев *in vivo* (С. Н. Оленев, 1971).

Сравнение активностей ферментов энергетического обмена в нейронах спинальных ганглиев 10-дневных куриных эмбрионов *in vivo* и при культивировании их в течение 2 нед позволило установить, что в условиях культур имеет место менее однородное распределение активностей ряда ферментов по сравнению с целым организмом. Если *in vivo* на криостатных срезах активность дегидрогеназ обнаруживается в 100% нервных клеток, то в культуре во всех клетках выявляется лишь активность НАД-диафоразы и лактатдегидрогеназы (лактат-ДГ). В процессе культивирования значительная часть нейронов утрачивает указанные выше характерные для них ферменты. При оценке ферментативной активности по оптической плотности, определяемой при цитофотометрии гистохимических препаратов С. Н. Оленевым и Л. Д. Шкляевой, установлены различия в изменениях ферментативной активности в культивируемых нейронах и *in vivo*. При этом было установлено повышение активности в культивируемых нейронах НАД-диафоразы и лактат-ДГ и снижение активности ферментов цикла Кребса. Эти данные находятся в соответствии с наблюдениями Кгапска (1969), установившей, что, начиная со 2-й недели культивирования спинальных ганглиев 9-дневного куриного эмбриона, в нервных клетках активность ряда дегидрогеназ снижается.

Сравнение распределения активности ферментов среди нейронов, сателлитов и шванновских клеток культуры спинальных ганглиев свидетельствует о различном ее распределении (см. таблицу). Активность глюкозо-6-фосфат-ДГ обнаруживается в перикарионе части крупных и средних нейронов и в пучках нервных волокон; в шванновских же клетках и сателлитах активность этого фермента отсутствует (рис. 12, а). Активность следующего фермента пентозного цикла — 6-фосфоглюконат-ДГ — наблюдается

Распределение активности ферментов в спинальных ганглиях 10-дневного куриного эмбриона *in vivo* и *in vitro*

Ферменты	Оптическая плотность в нейронах		Относительная активность ферментов среди различных клеток культуры			
	<i>in vivo</i> M±m (100% клеток)	<i>in vitro</i> M±m (% реагирующих нейронов)	нейроны	клетки-сателлиты	шван-новские клетки	фибро-бластные зоны роста
I. Реакции выработки H <sup>+</sup> :						
глюкозо-6-фосфат-ДГ (НАДФ)	0,35 ± 0,010	0,70 ± 0,053 (20—25%)	++	—	+	+
глюкозо-6-фосфат-ДГ (НАД)	0,25 ± 0,013	0,37 ± 0,020 (20%)	++	+	—	+
6-фосфоглюконат-ДГ (НАДФ)	0,35 ± 0,012	0,42 ± 0,15 (1—7%)	++	+	—	+
6-фосфоглюконат-ДГ (НАД)	0,47 ± 0,012	0,47 ± 0,021 (50—75%)	+	+	+	—
α-глицерофосфат-ДГ (НАД)	0,53 ± 0,021	0,36 ± 0,022 (40%)	+	+	+	+
β-оксибутират ДГ (НАД)	0,05 ± 0,005	0,69 ± 0,024 (80—100%)	+	+	+	+
лактат-ДГ (НАД)	0,21 ± 0,011	0,15 ± 0,013 (0,5%)	+	+	+	—
пируват-ДГ (НАД)	0,23 ± 0,009	0,54 ± 0,035 (9—16%)	+	+	+	—
изоцитрат-ДГ (НАД)	0,30 ± 0,008	0,15 ± 0,013 (5—15%)	+	+	+	+
сукцинат-ДГ	0,14 ± 0,010	0,27 ± 0,013 (10—40%)	+	+	+	+
малат-ДГ (НАД)	0,10 ± 0,010	0,12 ± 0,016 (20%)	+	+	+	—
α-кетоглутарат-ДГ (НАД)		0,18 ± 0,011 (5%)	+	+	+	—
глутамат-ДГ (НАД)			+	+	+	—
II. Реакция потребления H <sup>+</sup> :						
НАД-диафорида	1,11 ± 0,040	1,62 ± 0,044 (80—100%)	++	—	—	++
НАДФ-диафорида	0,76 ± 0,030		++	—	—	++

Примечание. Активность ферментов в клетках обозначается плюсами, отсутствие активности—минусом.





Рис. 12. Активность дегидрогеназы (ДГ) в двухнедельных культурах спинальных ганглиев 10-дневных куриных эмбрионов.

а — глюкозо-6-фосфат-ДГ (НАДФ); б, в — 6-фосфоглюконат-ДГ (НАДФ); г, д — сукцинат-ДГ. Локализация активности ферментов в нейронах (а, б, г, д), клетках-сателлитах (б, в, г) и шванновских клетках (а).  $40\times 10$ .

лишь в перикарионах одиночных нейронов среднего размера и в основном выявляется в клетках-сателлитах (рис. 12, б). Активность изоцитрат-ДГ установлена в отростках нейронов. Сукцинат-ДГ и малат-ДГ более активны в шванновских клетках, чем в сателлитах, в то время как в последних относительно активны пируват-ДГ,  $\alpha$ -кетоглутарат-ДГ и щелочная фосфатаза (рис. 12, г, д). Новообразующийся миелин, по данным Tischner и Thomas (1973), обладает активностью арилсульфатазы. Таким образом, в условиях культуры нейроны, сателлиты и шванновские клетки частично сохраняют особенности своей ферментативной активности, но некоторые из них изменяются *in vitro* по сравнению с *in vivo*.

Электрофизиологическое исследование культивируемых нейронов спинальных ганглиев новорожденных крысят показало, что их реакция на введение некоторых медиаторов сходна с реакцией нейронов *in vivo*. Так, ГАМК ( $\gamma$ -аминомасляная кислота в дозе 0,1—0,5 ммоль) снижает мембранный потенциал у нейрона, в то время как на него не оказывают действия ацетилхолин, норадреналин и глутаминовая кислота (Obata, 1974).





Приведенные выше данные о спинальных ганглиях указывают на то, что в условиях культуры протекает процесс морфологической, биохимической и функциональной дифференциации нервных клеток.



### 1.2.2. Симпатические ганглии

Как объект культивирования симпатические ганглии интересны тем, что в их нейронах подробно исследованы медиаторы и большинство клеток содержитнорадреналин. В качестве примеров симпатических ганглиев в настоящей работе разобраны культуры ганглиев пограничного ствола. Для сравнения приведены краткие данные о нейронах парасимпатического ресничного ганглия, в котором основным медиатором является ацетилхолин.

У куриного эмбриона закладки ганглиев пограничного ствола, а также ресничного ганглия определяются на 3-й день инкубации. К 4—6-му дню в этих ганглиях видны дифференцирующиеся нейробласты, а нислевское вещество в симпатических нейронах начинает появляться на 9—14-й день. Процесс дифференциации нейробластов в нейроны симпатических ганглиев осуществляется более асинхронно; он растянут во времени по сравнению с этим процессом в спинальных ганглиях. Так, в спинальных ганглиях куриных эмбрионов старше 13 дней инкубации при действии нейроростового фактора (НРФ) не удается получить роста «голых» отростков нейробластов, что связано с завершением процесса их дифференциации в нейроны; в то же время в симпатических ганглиях они растут без сопровождения шванновских клеток даже у 16-дневных куриных эмбрионов. К 17-му дню инкубации куриного эмбриона в ресничном ганглии число нейронов вследствие «физиологической» гибели уменьшается с 65 000 до 3000 (Landmesser, Pilar, 1974). У крысы закладки симпатических ганглиев появляются на 12-й день беременности, а катехоламины в симпатобластах (симпатических нейробластах) — начиная с 12—13-го дня. Однако даже у новорожденного крысенка размеры нервных клеток еще небольшие; они увеличиваются в течение первого месяца после рождения.

В культуре общие проявления переживания эксплантатов вегетативных ганглиев 8—10-дневного куриного эмбриона в основном сходны с таковыми спинальных ганглиев. Первоначально в зоне роста появляются отростки нейробластов, немного позднее происходит миграция фибробластов и шванновских клеток. В культурах симпатических ганглиев отростки нейробластов тоньше и имеют меньшую длину, чем у нейробластов спинальных ганглиев. Через 24 ч культивирования симпатических ганглиев

пограничного ствола вырастающие из первичного экспланта отростки достигают 50—100 мкм, а через 48 ч — 250 мкм; при добавлении в культуральную среду НРФ длина их соответственно увеличивается до 70—150 и 300—400 мкм. По данным Миггау (1965), первоначально появляющиеся нейриты симпатических нейробластов растут «голыми», и только через несколько дней их начинают окружать шванновские клетки. Последние обычно располагаются цепочками вдоль отростков нейробластов и имеют удлиненное ядро с узким ободком цитоплазмы.

Общая топография цепочки ганглиев пограничного ствола 8—10-дневных куриных эмбрионов, насчитывающей обычно до 10—15 отдельных узлов, в культурах приобретает существенные различия в зависимости от способа культивирования. При культивировании по Максимо-ву исходные топографические взаимоотношения между отдельными ганглиями могут сохраняться длительное время (Benitez e. a., 1973). По нашим данным, при культивировании эксплантатов симпатической цепочки методом «летающих стекол» она укорачивается, и в 2—3-недельных культурах не удастся различать отдельные ганглии вследствие стирания границ между ними, что обусловлено значительными перемещениями клеток.

Через неделю культивирования происходит дифференциация нейробластов в нейроны. В результате расплывания эксплантата по стеклу их возможно наблюдать с помощью фазовоконтрастного микроскопа прижизненно. Размеры симпатических нейронов меньше, чем размеры клеток спинальных ганглиев, они имеют пузыревидное тело, тонкие отростки и крупное ядро с 1—2 ядрышками. Методом Холмса в основном импрегнируются лишь нейриты, а тела нервных клеток выявляются этим методом только при использовании дополнительной фиксации бром-формолом (рис. 13, а, б). Культуры вегетативных ганглиев содержат также тесно связанные с телами нейронов капсульные клетки (сателлиты), шванновские клетки, соединительнотканые клетки (Chamley e. a., 1972). С помощью морфологических и гистохимических методов в культурах симпатических ганглиев, как и *in vivo*, можно выделить несколько типов нейрональных клеток.

1. Основная масса нейробластов и нейронов симпатического ганглия содержит норадреналин. По данным Chamley и соавт. (1972), тела клеток люминесцируют уже в ранние сроки культивирования. В культурах сим-





Рис. 13. Симпатический ганглий пограничного ствола 10-дневного куриного эмбриона в двухнедельной культуре.  
 а, в — симпатические нейроны; б — мелкие импрегнированные петельки. Двойная импрегнация серебром по Киму—Холмсу. 60×10.

патических ганглиев 5—20-дневных крысят Chamley выделила 2 типа норадреналинсодержащих клеток: мелкие мигрирующие нейробласты и более крупные нейроны, остающиеся в первоначальном эксплантате. По данным Сапо и соавт. (1967), специфическая норадреналиновая люминесценция устраняется предварительной инкубацией с 0,25 мкг/мл резерпина. Люминесценция катехоламинов усиливается после введения в культуральную среду кофакторов синтеза — биоптерина ( $10^{-5}$  М), а также норадреналина ( $3 \cdot 10^{-4}$  М), АТФ ( $4 \cdot 10^{-6}$  М) и ингибиторов мо-

моноаминоксидазы (Venitez e. a., 1973). В условиях культуры порадрениергические симпатические нейроны 10-дневных куриных эмбрионов сохраняют способность захватывать меченые катехоламины из культуральной среды (доза 5—10 мкг/мл); метка накапливается в симпатических нейронах и отсутствует в сателлитах, шванновских клетках и фибробластах (Burdman, 1968). Наличие в культуральной среде немеченых катехоламинов, тирамина (1—20 мкг/мл) или кокаина (2—10 мкг/мл) полностью предотвращает связывание меченых катехоламинов. Ацетилхолин не влияет на этот процесс. Порадрениергические симпатические нейроны и нейробласты в культуре, как и *in vivo*, обладают значительной активностью моноаминоксидазы (МАО) и почти лишены или имеют низкую активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) (Giacobini, 1970).

2. Холинергические симпатические нервные клетки, в которых отсутствуют катехоламины и которые богаты АХЭ (Sano e. a., 1967; Giacobini, 1970). При постановке реакции МАО — АХЭ мы изредка наблюдали в культурах ганглиев пограничного ствола 9-дневных куриных эмбрионов более крупные нервные клетки, лишенные МАО и богатые АХЭ, которые, вероятно, относятся к этому типу клеток.

3. SIF-клетки (small intensiv fluogescence). Одни авторы считают их хромаффинными клетками (Н. А. Смиттен, 1972; Е. И. Чумасов, Р. М. Рейдлер, 1973; Celestino de Costa, 1940), другие же причисляют их к интернейронам (Williams, Paley, 1969). Эти клетки обладают интенсивной люминесценцией, содержат дофамин, активно мигрируют в зону роста, что особенно хорошо проявляется при действии на культуру гидрокортизона (Egancko e. a., 1972).

Исследование дегидрогеназ (ДГ) в культивируемых нейробластах симпатических ганглиев показало относительно высокую активность лактат-ДГ и НАД-диафоразы. Активность ферментов аэробного гликолиза (изоцитрат-ДГ, сукцинат-ДГ) очень низкая как в нейробластах, так и в сателлитах и шванновских клетках. Последние в культурах симпатических ганглиев дают интенсивную реакцию пируват-ДГ, но обладают слабой активностью  $\beta$ -оксибутират-ДГ. Активность 6-фосфоглюконат-ДГ изредка наблюдается в более крупных нейрональных клетках симпатического ганглия. При воздействии нейроростового



фактора (НРФ) в 10-дневных культурах симпатических ганглиев 9-дневного куриного эмбриона увеличиваются размеры нейрональных клеток (до 25—40 мкм) и происходит дифференциация нейробластов в нейроны. Эта стимуляция роста размеров перикарионов и отростков сопровождается гистохимическими изменениями. Если при культивировании без НРФ перикарионы и нейриты нейробластов содержат лишь МАО и лишены АХЭ, то при добавлении НРФ в культуральную среду в перикарионах нейронов появляется АХЭ, в то время как активность МАО обнаруживается в их отростках. Вероятно, это отражает процесс дифференциации, происходящий под действием НРФ: нейробласты с МАО, но без АХЭ, дифференцируются в более крупные нейроны с перикарионами, содержащими АХЭ, и отростками, богатыми МАО. В таких культурах при импрегнации серебром видны многочисленные мелкие петельки, располагающиеся среди нервных волокон (см. рис. 13, б).

Функциональные характеристики культивируемых в присутствии НРФ симпатических клеток исследованы с помощью микроэлектродов. При этом установлено, что ацетилхолин и  $\gamma$ -аминомасляная кислота деполяризуют нейроны: эффект ацетилхолина опосредован через Н-холинорецептор (он устраняется тубокурарином, но не атропином). Введение в среду норадреналина, глутаминовой кислоты не влияет на электрофизиологические характеристики симпатических клеток (Obata, 1974). Кроме Н-полинергической передачи от одного нейрона к другому, в культурах симпатических ганглиев в 3% случаев установлено распространение потенциалов, которое не блокируется Н-холинолитиками. В симпатических ганглиях *in vivo* существуют несколько иные соотношения медиаторов и фармакорепторов: норадреналин тормозит ганглионарную передачу и не обнаруживаются Н-холиннергические синапсы, принадлежащие собственным нейронам ганглия (O'Laigue *et al.*, 1974). Эти различия действия медиаторов *in vivo* и в культурах с НРФ подтверждают гистохимические наблюдения, согласно которым НРФ стимулирует жизнедеятельность и дифференциацию лишь одного типа симпатических нейронов.

Для сравнения с симпатическими ганглиями значительный интерес представляют культуры парасимпатических ганглием, данные о культивировании которых в литературе отсутствуют. В наших опытах были исследованы



Рис. 14. Ресничный ганглий 10-дневного куриного эмбриона в двух-недельной культуре.

а, б — нейроны с короткими и широкими дендритами; в, г — окончания в виде клубочка и в виде петельки. 60X10. Импрегнация серебром по Холмсу.

2-недельные культуры ресничного ганглия 10-дневных куриных эмбрионов. При импрегнации серебром по Холмсу в нем видны крупные нейроны (диаметром 15—20 мкм), причем многие из них имеют короткие, широкие, слабо ветвящиеся дендриты (рис. 14, а, б). Нейриты этих клеток сильно разрастаются в эксплантате и образуют терминали в виде мелких петелек (синаптических?) или клубочков, находящихся как среди фибробластов, так и среди нейро-



нов (рис. 14, в, г). Цитоплазма этих нервных клеток более богата АХЭ, чем у нейронов симпатических ганглиев.

Таким образом, нейрональные клетки симпатических ганглиев в культуре по сравнению с такими же клетками спинальных и парасимпатических ганглиев существенно отличаются по морфологическим, биохимическим и функциональным признакам. Эти различия свидетельствуют о разнонаправленной дифференциации нейрональных клеток производных ганглиозной пластинки.

### 1.3. Производные плакод

Плакоды, которые представляют специализированные участки эмбриональной нейроэктодермы, служат источником нейронов и вспомогательных клеток некоторых чувствительных ганглиев, как *g. podosum*, *g. petrosum*, *g. spirale*, *g. vestibulare*, *g. geniculi*, а также крупных нейронов — *g. trigeminale* и чувствительных клеток — *pervus olfactorius* (Hamburger, 1962). Данные о культивировании этих ганглиев весьма ограниченные, но представляют особый интерес, так как, по мнению Hamburger, из плакод образуются нервные клетки одного типа. В настоящем разделе в качестве примеров нейронов плакодного происхождения рассмотрены тригеминальный, вестибулярный и спиральный ганглии.

У куриного эмбриона зачатки указанных выше ганглиев формируются на 2—3-и сутки в результате миграции клеток из нейроэктодермальных плакод. Мигрирующие клетки плакодного происхождения отличаются от клеток окружающей мезенхимы большими размерами и высокой активностью АХЭ. На стадии 50 ч в результате соединения матричных клеток, возникающих из плакод и ганглиозной пластинки, образуется зачаток тригеминального ганглия, а на стадии 52 ч в нем появляются первые нейробласты. В это же время выделяется пока еще не разделившийся зачаток вестибулярного и спирального ганглия, центральные ветви которого врастают в зачаток мозга на стадии 60 ч, а периферические ветви проникают в зачаток лабиринта и улитки на 3-й день инкубации. У 4-дневного куриного эмбриона вестибулярный ганглий отделяется от спирального, а у 7-дневного эмбриона в тригеминальном ганглии обнаруживается 200 более крупных клеток со светлой цитоплазмой (плакодного происхожде-

ния) и 340 более мелких темных (производных ганглиозной пластинки) (Hamburger, 1962; Gaik, Farbman, 1973).

О культурах ганглиев, происходящих из плакод, имеются крайне недостаточные и разрозненные сведения. В течение первых 3 дней культивирования тригеминального ганглия 10-дневных куриных эмбрионов из первоначального эксплантата появляются отростки нейробластов без сопровождения фибробластов и шванновских клеток (Grosse, Lindner, 1968). Двойное происхождение его нейронов в культуре удастся различить благодаря действию НРФ, который стимулирует рост клеток, происходящих из ганглиозной пластинки, и не влияет на клетки плакодного происхождения (Hamburger, 1962). Морфология нейронопальных клеток тригеминального ганглия в культуре изложена в главе 2. При гистохимических исследованиях культур этого ганглия не обнаружены какие-либо особенности нейронов плакодного происхождения. Установлено, что активность НАД- и НАДФ-диафоразы во всех нейронах более высокая при отсутствии вокруг них сателлитов, чем при наличии последних. В сателлитах и шванновских клетках, не находящихся в связи с нейронами и их отростками, активность диафораз выше, чем при нахождении их вокруг нейронов (Meurer e. a., 1973; Meurer, Wenk, 1973).

Вестибулярный ганглий вместе с окружающей мезенхимой и слуховым пузырьком 4-дневного куриного эмбриона исследовал в органотипической культуре Огг (1965). Во время посева слуховой пузырьки представляет собой овальный мешочек, выстланный однослойным кубическим или ложномногорядным эпителием. В однодневной культуре по периферии цитоплазмы нейрональных клеток начинает образовываться нислевское вещество; ядрышки этих молодых нейронов занимают эксцентричное положение. В 2—3-недельных культурах нислевское вещество в виде мелких гранул уже распределяется на всю цитоплазму нейронов, ядрышки располагаются центрально, и начинается миелинизация осевых цилиндров.

Спиральный ганглий новорожденной мыши вместе с сектором улитки удалось культивировать в органотипической культуре до 3 нед. В этих условиях переживает только часть эксплантируемых нейронов, которые остаются связанными с чувствительными клетками улитки (Sobkowitz e. a., 1975).



Из краткого описания исследований дифференциации нервных клеток, происходящих из плакод, видно, что эти работы находятся на самой начальной стадии накопления фактического материала. Полученные данные, касающиеся в основном тригеминального ганглия, показывают, что дифференциация этих нейронов происходит приблизительно так же, как и в чувствительных ганглиях, происходящих из ганглиозной пластинки.

#### 1.4. Медуллобласты и ганглиобласты в культуре

Медуллобласты, ганглиобласты и плакодные клетки представляют производные нейроэктодермы, и из них путем размножения и дифференциации образуются клетки нервной ткани.

В качестве медуллобластов *in vitro* описывают округлые или веретенообразные клетки с узким ободком базофильной цитоплазмы, пузыревидным гиперхромным ядром с центрально расположенным ядрышком. В условиях культуры медуллобласты никогда не расположены в виде ложномногорядного эпителия, который характерен для них в целом организме. При культивировании эти клетки иногда образуют на поверхности стекла мелкие скопления — псевдорозетки, которые в известной степени можно рассматривать как рудиментарные образования ложномногорядной организации, наблюдаемой *in vivo* (К. И. Пыльдвере, 1971; Miyaka e. a., 1962). Образование псевдорозеток в культуре не служит отличительным признаком роста медуллобластов, а встречается также при культивировании незрелой эпендимы (К. И. Пыльдвере, 1971), клеток светочувствительного слоя сетчатки и олигодендробластов.

При культивировании в трехмерном пространстве с использованием губки в качестве поддерживающего материала медуллобласты могут расти в виде вогнутой поверхности и образовывать структуры, похожие на нервную трубку (Miyaka, Fujita, 1962). Медуллобласты в культуре, по данным К. И. Пыльдвере (1971), могут дифференцироваться в нейробласты, глиобласты и эпендимные клетки. Однако они не способны длительно размножаться и образовывать различные клеточные типы нейронального направления развития, как это имеет мес-

to *in vivo*<sup>1</sup>. Поэтому эти эмбриональные клетки в условиях культуры нельзя считать полноценными медуллобластам, идентичными таковым в условиях целого организма. Мау и соавт. (1961) следующим образом описывают превращения медуллобласта в нейробласт при прижизненном наблюдении в эксплантатах головного мозга 7-дневного куриного эмбриона. После часа культивирования у края эксплантата появляются округлые «индифферентные» клетки, тело которых при замедленной киносъёмке пульсирует. Эта пульсация зависит от периодического увеличения и уменьшения объема клетки и сопровождается передвижением в цитоплазме мелких темных гранул. Когда у клетки образуется один, реже несколько конусов роста, дающих начало отросткам, пульсация прекращается. Дифференциация медуллобластов в направлении астроцитов выражается в образовании более распластанной клеточной формы и увеличении ядра, в котором имеется несколько ядрышек. При дифференциации в олигодендроциты объем цитоплазмы уменьшается, исчезает ее базофилия, а также образуется несколько отростков.

По данным Cohen (1972), ганглиобласты (клетки ганглиозной пластинки) полутораднейного куриного эмбриона могут дифференцироваться в симпатические нейробласты только под индуцирующим влиянием сомитов.

## 1.5. Пронейробласты в культуре

Пронейробласты представляют клетки, обладающие определенной нейробластической детерминацией, способные делиться и активно мигрировать; они лишены длинных отростком и нейрофибрилл, имеют иные, чем у нейробластов, ядерно-цитоплазматические отношения

---

<sup>1</sup> Феномен длительного размножения и индуцированной дифференциации клеток в нейробласты под влиянием химических агентов (3,5-циклического аденозинмонофосфата) удается получить в культурах опухолевых клеток нейробластов С-1300 (Prasad, 1975). Хотя эту опухоль называют нейробластомой, способность ее клеток к длительному размножению делает их сходными с медуллобластами. При дифференциации клеток нейробластомы С-1300 под влиянием 3,5-циклического АМФ прекращается деление и появляются нейритоподобные отростки, электровозбудимость и активность ацетилхолинэстеразы, что сближает их с нейробластами и нейронами. Конечно, сравнивать опухолевые клетки с эмбриональными можно лишь с большой осторожностью.



(А. Г. Кнорре, 1971; Н. А. Смиттен, 1972). Из-за их быстрой дифференциации в нейробласты в условиях культуры эксплантатов они встречаются редко, вследствие чего авторы их почти не описывают. По-видимому, к стадии пронеуробласта можно отнести данные исследований в суспензированных культурах головного мозга куриных эмбрионов или плодов мыши (см. обзоры Seeds, 1974; Nelson, 1975). Основанием для этого служат следующие наблюдения, сделанные в таких культурах: на ранних сроках культивирования — это мелкие клетки округлой формы со слабо выраженной цитоплазмой, активно делящиеся; через неделю культивирования в них нарастает активность ферментов медиаторного обмена, а через 2 нед они образуют синапсы. Таким образом, несмотря на то что в самих работах не указана стадия зрелости культивируемых клеток, их, по-видимому, можно считать пронеуробластами. Еще до появления морфологических и большинства биохимических признаков дифференциации пронеуробласты из различных отделов головного мозга различаются между собой. Эти различия удается выявить в суспензированных культурах благодаря агрегации, сегрегации и миграции. Если после трипсинизации различных отделов эмбрионального мозга мышного или куриного эмбриона получена общая клеточная суспензия, то в процессе культивирования отдельно агрегируются между собой незрелые нейрональные клетки конечного мозга, сетчатки, среднего мозга и т. д. Весь этот процесс осуществляется уже в течение 12—48 ч культивирования. Способность этих клеток образовывать агрегации в условиях культуры характерна только для определенных эмбриональных стадий развития: например, наиболее выраженная склонность к агрегации клеток головного мозга плодов мыши установлена на 16-й день беременности, в *tectum opticum* куриного эмбриона — на 4-й день инкубации и т. д. Эти проявления избирательной агрегации клеток были подвергнуты подробному биохимическому исследованию. Из сетчатки головного мозга эмбрионов мыши и курицы удалось выделить агрегирующие факторы — гликопротеидные комплексы (с относительной молекулярной массой в несколько миллионов). Эти вещества синтезируются в период максимальной агрегации; они специфичны как для вида нейрональных клеток, так и для стадии их дифференциации (Seeds, 1974).

На основании полученных данных была сформулирована гипотеза, согласно которой одна клетка «узнает» другую благодаря наличию на наружных клеточных мембранах комплементарных молекул, взаимодействующих по типу «ключа и замка». Роль таких комплементарных молекул, вероятно, выполняют олигосахариды с определенной последовательностью расположения моносахаридов и специфические ферменты — глюкозилтрансферазы с глюкозильными акцепторами (Roth, 1973). По мнению этого автора, если две клеточные поверхности (на одной — олигосахарид, на другой — специфическая глюкозилтрансфераза) образуют фермент-субстратный комплекс, то клетки вступают в тесный контакт (агрегируются). Таким образом, согласно этой гипотезе, наружная поверхность любой клетки содержит как бы определенный «код» олигосахаридов, способных связаться с ферментами другой определенной клетки.

## 1.6. Нейробласты в культуре

Развивающиеся нейрональные клетки самого различного происхождения на стадии нейробласта морфологически в основном сходны. Дифференциация нейробласта выражается в появлении нейрофибрилл, увеличении размера перикариона и ядра, росте отростков и в утрате или резком ограничении способности к делению. В живом нейробласте обнаружить нейрофибрилл не удастся даже при использовании фазовоконтрастного микроскопа с объективом 90. Однако они существуют в виде более мелких частиц нейрофиламентов, и для их выявления на светооптическом уровне необходима фиксация. Биохимические признаки дифференциации нейробластов выражаются в появлении или усилении активности ферментов дыхания, гликолиза и медиаторного обмена.

Очень важен и пока спорен вопрос о том, могут ли нейробласты делиться? На этот вопрос большинство авторов дают отрицательный ответ, тогда как другие с оговорками допускают такую возможность. Levi (1934) и П. И. Серебряков (1935) считают возможным митотическое деление нейробластов в культурах ЦНС; нейробластическую природу делящихся клеток в стадии профазы они предполагают на том основании, что их отростки в противоположность фибробластам при митозе



не втягиваются. Следует отметить, что такая верификация нейробластов недостаточна. При введении в культуральную среду меченого предшественника ДНК (тимидина метил<sup>14</sup>C) часть нейробластов головного мозга 7-дневного куриного эмбриона включала метку; но астроциты и олигодендроциты метились более интенсивно (Jagos e. a., 1974). Подытоживая эти наблюдения, следует отметить, что вопрос о возможности деления нейробластов ЦНС в культурах еще нуждается в дополнительных исследованиях.

Что касается спинальных ганглиев, то здесь деление нейробластов следует считать еще менее вероятным. Гистоавтордиографические исследования спинальных ганглиев 8-дневного куриного эмбриона показали, что менее 3% нейробластов включают тимидин-<sup>3</sup>H, тогда как 27% фибробластов приобретали эту метку (Utakoji, Hsu, 1965).

Однако включение меченого тимидина не является строгим доказательством клеточного деления. Те же нейроциты спинальных ганглиев в культурах при алкилирующих воздействиях, вызываемых ультрафиолетовым облучением или метилметан-сульфонатом, интенсивно включают тимидин-<sup>3</sup>H (Sanes, Okun, 1972). 10—15% всех нейробластов и нейронов спинального ганглия включают эту метку в 16-дневной культуре 8-дневного куриного эмбриона в присутствии оубаина (строфантина,  $5 \cdot 10^{-5}$  M) (Cone, 1974).

Для нейробластов различного происхождения закономерно наличие в культурах определенных фаз роста, отмеченных Olivo (1927), Mihalik (1935, 1940) и Н. Г. Хлопиным (1940). В начальной фазе культивирования эксплантатов у нейробластов наблюдается интенсивное образование отростков, которые проникают в зону роста ранее, чем туда мигрируют астроциты и олигодендроциты в эксплантатах ЦНС или шванновские клетки и фибробласты в эксплантатах периферической нервной системы. Затем следует вторая фаза, когда эти клетки интенсивно выселяются из первоначального эксплантата. В третью фазу, когда миграция клеток заканчивается, в культурах хорошо видна периферическая зона роста и центральная зона первоначального эксплантата. Н. Г. Хлопкин (1940) подчеркивает, что эти фазы резко отграничены друг от друга, и в ряде случаев одновременно видны особенности, характерные для каждой из них.

В культурах различных отделов нервной системы нейробласты образуют большое количество отростков, которые, прошикая в зону роста, тесно прилежат друг к другу и образуют сплетения. Такое тесное взаимное соприкосновение отростков иногда создает ложное впечатление наличия между ними «анастомозов», обнаруживаемых при прижизненном наблюдении через фазово-контрастный микроскоп и на препаратах, импрегнируемых серебром. Микрокинематографический анализ двигательной активности растущих отростков показал, что конус роста одного отростка продвигается вдоль другого отростка как бы скользящими движениями без образования «анастомозов» (Nakai, 1960). С помощью электронной микроскопии также показано, что отросток, который светооптически часто кажется состоящим из одного аксона, фактически содержит несколько аксонов (Grainger e. a., 1968).

Внешние проявления роста отростков примерно одинаковы для нейробластов различных типов. Начиная с работ Ramon-y-Cajal (1908), которому принадлежит термин «конус роста», растущие отростки неоднократно обнаруживались в развивающемся мозге (Weiss, 1955) и в культурах нервной ткани (С. А. Троицкая, 1953; С. Н. Оленев и соавт., 1970; Levi, 1934; Nakai, 1960).

Конусы роста образуют тонкие выросты в виде псевдоподий, количество которых обычно бывает от 2 до 7. Как видно на серии микрофотографий, перемещения псевдоподий конусов роста довольно хаотичны (рис. 15). Они постоянно образуются заново на конце конуса роста и втягиваются при передвижении его вперед в результате удлинения отростка. Длина псевдоподии обычно 10—12 мкм, толщина 0,3—0,4 мкм. Пространство, в котором перемещается одна псевдоподия, приблизительно соответствует полусфере с радиусом, равным ее длине, а скорость вырастания, или втягивания, псевдоподии составляет в среднем 0,5 мкм/с. Nakai (1960) вычислил силу, с которой происходит продвижение псевдоподии: она равна  $3 \cdot 10^{-10}$  дин. Время существования одной псевдоподии при активном росте — около 3 мин, и в течение роста отростка нейробласта на протяжении 100 мкм возникают и исчезают до 70 псевдоподий. Внутри псевдоподии находятся митохондрии, но вакуоли в них отсутствуют. В конусах роста наблюдается активность ацетилхолинэстеразы (May e. a., 1966), а в местах расположения митохондрий — НАД-диафороза и лактат-ДГ. В тонких псевдопо-





Рис. 15. Псевдоподии конуса роста отростка нейробласта спинального ганглия 9-дневного куриного эмбриона на вторые сутки культивирования. Интервал между микрофотографиями 15 мин. 90X20. Фазово-контрастная микроскопия.

дних обнаружена лишь слабая активность последних двух ферментов (Kreuzberg, 1963). Конус роста обладает способностью включать меченые медиаторы и аминокислоты (Tischner, Kott, 1972), однако удлинение конца растущего отростка происходит в основном не за счет местного синтеза белка, а в результате аксоплазматического его перемещения из перикариона, т. е. из места его образования (Weiss, 1955; Utakoji, Hsu, 1965).

Перемещение синтезируемого в перикарионе нейробластов белка по их отросткам было показано в культурах спинальных и симпатических ганглиев. Utakoji и Hsu (1965) с помощью меченых аминокислот определяли в культурах спинальных ганглиев 9-дневного куриного эмбриона скорость перемещения белков; она оказалась равной 10 мм в сутки. В симпатических ганглиях 10-дневного куриного эмбриона, культивируемых в присутствии меченых аминокислот, показано, что синтез белков (включение метки) происходит в перикарионах. Затем метка перемещается в отростки, причем интенсивность метки в них постепенно уменьшается в дистальном направлении (Partlow, Lagrebee, 1971; England e. a., 1973). В последние годы показано, что процесс перемещения белков из перикариона нейробластов и нейронов в отростки осуществляется субмикроскопическими структурами — нейротубулами. Специфическое повреждение нейротубул колхицином ( $3 \cdot 10^{-6}$  М за 18 ч) или винбластином, которые связываются с этими структурами, нарушает транспорт белка и полностью блокирует рост отростков (England e. a., 1973).

Скорость роста отростков нейробластов спинального ганглия 9-дневного куриного эмбриона может достигать 40 мкм/ч; при этом в первые 12 ч они растут наиболее быстро, а через сутки скорость роста значительно уменьшается. Через 2—4 сут количество вырастающих отростков, не сопровождаемых фибробластами и шванновскими клетками, уменьшается. Иногда отросток укорачивается, что сопровождается исчезновением конуса роста, псевдоподий и появлением на нем варикозного вздутия, перемещающегося в проксимальном направлении со скоростью 0,1—0,5 мкм/с. В результате этого отросток ретрагируется (С. Н. Оленев и др., 1970) (см. рис. 7). Обычно двигательная активность отростков нейробластов постепенно уменьшается и по их ходу располагаются мигрирующие шванновские клетки и фибробласты, кото-



рые окружают и разграничивают формирующиеся пучки нервных волокон. В эксплантатах спинальных ганглиев 9-дневного куриного эмбриона в 5-дневной культуре длина отростков может достигать 200 мкм, а в 25-дневной культуре — даже 1600 мкм.

Скорость роста отростков нейробластов (в дальнейшем нейритов) головного мозга 8-дневных куриных эмбрионов при 38°С составляет 23,5 мкм/ч, а при 39°С — 33 мкм/ч; при температуре 48°С клетки не гибнут, но отростки прекращают рост (Levi, 1956). В процессе культивирования рост «голых» отростков нейробластов сменяется ростом нейритов, окруженных олигодендроцитами. Наиболее вероятное объяснение этих изменений характера роста состоит в том, что нейробласты, чьи отростки в ЦНС растут без сопровождения олигодендроцитов, а в периферической нервной системе — шванновских клеток, дифференцируются в нейроны, нейриты которых растут лишь в тесной связи с этими клетками.

In vitro показало, что отростки нейробластов, а в дальнейшем нейриты нейронов растут по направлению к органам, которые они иннервируют в условиях целого организма. Так, в культуре на расстоянии 1—2 мм располагали эксплантаты симпатических ганглиев, мышцы предсердия, *vas deferens* (в основном иннервируемых адренергическими волокнами) и легкие (с иннервацией преимущественно волокнами блуждающего нерва) (Chamley, Dowel, 1975). Число симпатических волокон, вырастающих в мышцу предсердия и *vas deferens*, было статистически достоверно больше, чем их число, вырастающее в легкие.

Для объяснения predeterminedного роста отростков нейробластов выдвинуто несколько гипотез, проверявшихся также в культурах нервной ткани. Согласно гипотезе гальванотропизма Капперса (Marsh, Beams, 1946) нейриты растут по направлению к аноду. Гипотеза «контактного проведения» объясняет направление роста физическими свойствами «подложки», молекулярной ориентацией субстрата, по которому растут отростки нейробластов (Weiss, 1955).

По нашему мнению, наиболее обоснованной является гипотеза «хемотропизма», или «хемотаксиса», сформулированная Ратон-у-Сажа (1908). Он писал: «Вероятно, вещества, выделяемые миотомами, эпителием или нервными клетками, возбуждают амебондное движение конусов роста и ориентируют их к конечному месту расположе-

ния»<sup>1</sup>. Согласно предположению Ramon-y-Cajal, структуры, к которым растут отростки, выделяют химические вещества: их концентрация уменьшается по мере удаления от этих структур. Как показали опыты в культурах, роль таких веществ для направления роста первых отростков могут играть медиаторы. При исследовании НРФ-стимулируемых спинальных ганглиев 9-дневного куриного эмбриона установлено, что скорость роста отростков увеличивается при наличии в среде ацетилхолина, никотина, повышенного содержания калия и уменьшается при действии норадреналина и сниженного содержания калия. Эти наблюдения дают основание предполагать, что вещества, вызывающие деполяризацию клеточных мембран, ускоряют рост отростков, тогда как вещества, обуславливающие гиперполяризацию, — тормозят его. Н-Холинэстеразы подавляют стимулирующий эффект ацетилхолина (С. Н. Оленев, 1973). В опытах, в которых медиаторы с помощью микропипеток подводили к нейробластам нейробластомы, было выявлено, что именно конус роста обладает наиболее высокой по сравнению со всей остальной частью клетки чувствительностью к ацетилхолину (Haggis, Dennis, 1971).

## 1.7. Нейроны в культуре

Обычно считают, что критериями дифференциации нейробластов в нейроны служат образование нислевского вещества, синаптических контактов, миелинизации нейритов, а также появление биоэлектрической активности.

Возможности дифференциации нейробластов в нейроны в условиях культуры, по-видимому, в известной степени зависят от того, к какому типу они принадлежат. В эксплантатах *tectum opticum*, если материал взят до появления в нейронах III и IV слоев нислевского вещества, то оно не появится и в дальнейшем. Наоборот, в нейробластах спинальных ганглиев куриных эмбрионов старше 5 дней инкубации нислевское вещество может образовываться заново (С. Н. Оленев, 1964).

В эксплантатах нервной ткани в результате перерезки нейритов при взятии материала в телах нейронов разви-

<sup>1</sup> Ramon-y-Cajal S. Nouvelles observations sur l'évolution des neuroblastes, avec quelques remarques sur l'hypothèse neurogénétique de Hensen-Held.—«Anat. Anz.», 1908, Bd 23, S. 1—25, 65—87.



вается хроматолиз, а значительная часть их в результате травмы гибнет в течение первой недели. Хроматолиз наблюдается в первые 5 дней культивирования и сопровождается накоплением в цитоплазме нейронов гликогена (Krasnicka, 1969). Через неделю в сохранившихся нейронах, начиная с периферии перикариона, происходит восстановление инселевского вещества (Muggau, 1971). Хотя сведения о сохранности нейронов, по данным различных авторов, существенно варьируют, в общем гибель сильнее выражена в эксплантатах ЦНС. Так, по данным Hild (1966), в культурах мозжечка сохраняется лишь 20—40% нейронов, в то время как в эксплантатах периферической нервной системы (спинальных ганглиях), по данным Muggau (1971), переживают 75% нейронов.

В культурах нервной ткани из различных отделов центральной и периферической нервной системы нейроны в основном сохраняют те же морфологические характеристики, что и соответствующие нервные клетки *in vivo*. При прижизненном наблюдении в цитоплазме нейронов обнаруживаются митохондрии в виде зернистых, палочкообразных или нитевидных структур (см. рис. 5 в, г; рис. 10), которые в отличие от включений имеют высокую двигательную активность. Особенно подвижны нитевидные митохондрии, которые в процессе культивирования могут изменять свою форму, вытягиваться в длину, сгибаться, принимать петлевидную или даже кольцеобразную форму (Hild, 1959).

Нейрофибриллы в нейронах культур выражены различно в зависимости от типа клетки. Например, в нейронах спинальных ганглиев нейрофибриллы можно обнаружить как прижизненно, так и на импрегнированных серебром препаратах (Hild, 1959). В мелких нейронах ЦНС нейрофибриллы прижизненно не видны, а выявляются лишь при импрегнации серебром (см. рис. 5, б; 6, б).

При жизненном наблюдении инселевское вещество в нейронах обнаруживается как нечетко контурируемые «облакоподобные» структуры, которые лишь незначительно отличаются по своей плотности (при наблюдении в фазовоконтрастный микроскоп) от остальной цитоплазмы (Hild, 1959). Deitch и Muggau (1956) сравнили в культурах нервной ткани прижизненные, фазовоконтрастные и ультрафиолетовые микроскопические картины со структурами, наблюдаемые после фиксации и окраски. Оказалось, что глыбки инселевского вещества существуют при-

жизненно в более аморфной форме, и грубая глыбчатая структура его появляется лишь после фиксации. Дендриты нейронов, которые *in vitro* лишены заканчивающихся на них афферентных волокон, не достигают такой степени развития, как *in vivo*. Например, в коре мозжечка наблюдается недоразвитие дендритов клеток Пуркинье, а в 3-м и 6-м слоях *tectum opticum* — дендритических ветвлений у крупных мультиполярных и веретенообразных нейронов.

Ядра культивируемых нейронов содержат одно, реже два ядрышка. При жизненном наблюдении в культурах из различных отделов нервной системы (нейронов спинальных ганглиев, мезенцефалического ядра тройничного нерва, коры головного мозга) обнаружено вращение ядер и перемещение ядрышка, которое быстро реагирует на изменение культуральной среды (Nakai, 1956; Hild, 1957; Geiger, 1963) (см. рис. 10). Hild (1959) считает, что возможны два объяснения этого феномена: выход из ядра в цитоплазму макромолекул создает силу отталкивания («реактивный вид движения») или же в основе вращения могут лежать изменения электрических зарядов в ядерной мембране и цитоплазме. При прижизненной фазово-контрастной микроскопии одной и той же нервной клетки мезенцефалического ядра тройничного нерва установлено, что при замене изоосмотической культуральной среды на гиперосмотическую через несколько секунд видимое при этом методе плотное ядрышко становится невидимым. При восстановлении изоосмотичности среды ядрышко снова становится видимым (Rennels, Hild, 1965). Сходное наблюдение, подтверждающее, что ядрышко реагирует ранее нислевского вещества на изменения окружающей нейрон внешней среды, было сделано также в опытах с добавлением в культуральную среду рибонуклеазы. Через 30 мин ядрышко светлеет, а через 3 ч полностью утрачивает базофилию, тогда как нислевское вещество остается относительно устойчивым. Если снова культуру поместить в среду без рибонуклеазы, то через 3—5 дней базофилия ядрышка восстанавливается (Hild, 1957).

Несмотря на то что в литературе имеются указания на деление нейронов в культуре, эти данные неубедительны. Это мнение обычно основывается на наличии в культурах симпатических ганглиев и коры больших полушарий митозов в клетках, которые недостаточно четко верифицированы как нейроны (Muggay, Stout, 1947; Geiger, 1963).



Важнейшим морфологическим признаком дифференциации нейронов является образование синапсов. Синапс, как известно, состоит из пресинаптической части нейрита и постсинаптической зоны клетки, воспринимающей нервный импульс (нервной, мышечной и др.). При установлении наличия синапсов в культурах необходимо сопоставление прижизненных нейростологических, электронно-микроскопических, электрофизиологических и фармакологических исследований. К сожалению, в большинстве работ синапсы у культивируемых нейронов описаны односторонние. При прижизненном фазовоконтрастном микроскопировании синапсы похожи на расширение терминалей тонких отростков, соприкасающихся с телами и отростками нейронов. Внутри этих терминалей обычно видны только более темные мелкие митохондрии. При прижизненном фазовоконтрастном наблюдении в течение нескольких часов бывает заметен лишь незначительный сдвиг местоположения синапсов на ограниченном участке тела или дендритов нейрона (Hild, 1959; Geiger, 1963; Romgat e. a., 1967). На фиксированных и импрегнированных серебром по методу Холмса препаратах они имеют вид нейрофибрилярной петельки терминального волокна (см. рис. 6, в—д). При электронно-микроскопическом исследовании синапсы культивируемой нервной ткани не отличаются от таковых в целом организме: они также содержат синаптические пузырьки и имеют утолщения пре- и постсинаптической мембран (Bunge e. a., 1967; James, Tresman, 1969).

В условиях культуры в синапсах обнаружены те же медиаторы, что и *in vivo*: так, в культивируемых симпатических нейронах образуется норадреналин, а в моторных нейронах спинного мозга синтезируется ацетилхолин (Kim, Wenger, 1973). Выделяющиеся пресинаптическими нервными волокнами медиаторы взаимодействуют с расположенными на постсинаптических мембранах фармакорцепторами. В культурах симпатических ганглиев удалось обнаружить Н-холинорецепторы (O'Lague e. a., 1974), а в агрегированных культурах головного мозга 17-дневных плодов мыши —  $\beta$ -адренорецепторы (Seeds, 1974).

Новообразование синапсов показано в процессе культивирования спинного мозга 14-дневных плодов крысы. В эксплантатах синапсов еще не было, они впервые образуются после 70 ч культивирования одновременно с появ-

лением биоэлектрической активности. Формированию синапсов предшествует развитие в терминалях «авезикулярных комплексов», которые имеют уплотненные пресинаптические мембраны, содержат лишь единичные пузырьки и лишены митохондрий, в дальнейшем в них появляются синаптические пузырьки. Первоначально обнаруживаются аксо-дендритические, а затем аксо-соматические синапсы (Bunge e. a., 1967; Craig, 1968). На развитие синапсов в указанных выше культурах не влияют воздействия, предотвращающие появление биоэлектрической активности, как, например, наличие в культуральной среде высокой концентрации магния (10 мМ) или кенлокана (Model e. a., 1970). Новообразование  $\beta$ -адренорецепторов было показано в агрегированных культурах головного мозга 16—17-дневных плодов мыши. *In vivo* эти фармакорепторы можно обнаружить, только начиная с 4—10-го дня постнатально; *in vitro* сразу после посева ткани эти рецепторы не функционируют, а появляются лишь через 15 ч культивирования (Seeds, 1974).

При совместном культивировании двух эксплантатов, удаленных друг от друга на расстоянии 1—2 мм, исследован вопрос о том, могут ли устанавливаться между ними синаптические связи. Синаптические связи появлялись при спаренном культивировании двух кусочков мозжечка новорожденных мышей (Allegran, 1969) — между верхним шейным ганглием и спинным мозгом 16—19-дневных плодов крысы (Olson, Bunge, 1973) и даже между первыми клетками брюшного ганглия таракана и спинальными ганглиями куриного эмбриона (J. Chen, M. Chen, 1971). Вместе с тем следует отметить, что вращание нейритов не всегда приводит к образованию синапсов. Например, при совместном культивировании нейриты нейронов спинальных ганглиев могут проникать в спинной мозг, достигая 0,5—1 мм длины, но не образуют синапсы, однако если они врастают в область задних рогов, то здесь синапсы появляются (Craig, Peterson, 1975). В опытах с совместным культивированием кусочков коры головного мозга и верхнего шейного ганглия 19-дневных плодов крысы синапсы не образуются ни адренергическими нейронами на нейронах коры, ни корковыми нейронами на нейронах симпатического ганглия (Olson, Bunge, 1973). Опыты с совместным культивированием представляют удобную модель изучения синаптогенеза.



Важнейшим признаком дифференциации нейронов в культуре служит также миелинизация нервных волокон, которая описана во 2-й главе настоящей монографии и в обзоре Н. А. Смирновой и В. Е. Шунгской (1970). О биоэлектрической активности, сопровождающей развитие нейронов, приведены данные в обзорах В. Е. Шунгской и Б. Н. Вепринцева (1965), Н. Н. Кокиной (1974), Б. Н. Вепринцева (1976).

Разобранные в настоящей главе материалы свидетельствуют о том, что медуллобласты, ганглиобласты и нейробласты, а также нейроны в культурах сохраняют способность дифференцироваться. Поэтому для изучения дифференциации клеток нервной системы нервная ткань в условиях культуры может служить очень удобным объектом для уточнения сведений об этом важнейшем процессе в развивающейся нервной системе человека и животных.

## Морфология чувствительных ганглиев в культуре

О культурах периферической нервной системы в литературе в настоящее время уже имеется большое количество гистологических (Н. Г. Хлопин, 1940, 1946; И. В. Викторов с соавт., 1974; Olivo, 1927; Lumsden, 1951, 1968; Muggay, 1959, 1965, 1971), электронно-микроскопических (Bunge e. a., 1967; Masurovski e. a., 1967; Lodin e. a., 1973), гистохимических (Б. Я. Вильнер с соавт., 1975; Krasnicka, 1969; Hermetet, Treska, 1969; Hauw e. a., 1972) и нейрофизиологических (Crain, 1956, 1971) исследований. Несмотря на это, в культурах ПНС все еще недостаточно изучен ряд вопросов, как, например, рост и дифференциация нервных и шванновских клеток, нейроглиальные и межнейрональные взаимоотношения, а также структура концевых аппаратов нервных волокон. Это зависит не только от сложности строения исходного материала (ганглии, нервные стволы и т. д.), который используется при изучении нервной ткани *in vitro*, но в значительной степени от возникающих при этом технических и методических трудностей. Анализ работ по культивированию нервной ткани показывает, что изучение ее с помощью неадекватных методов послужило причиной ряда ошибочных представлений.

Нервную ткань как ЦНС, так и ПНС в культуре необходимо исследовать адекватными нейрогистологическими методиками. Широкое использование только фазово-контрастной микроскопии и (или) общегистологических методик для изучения живых и фиксированных культур нервной ткани наряду с недостаточным применением специальных нейрогистологических методик привело к тому, что некоторые авторы неправильно трактуют наблюдаемые морфологические картины. Так, например, в ряде работ на основании исследований культур чувствительных



ганглиев с помощью фазово-контрастной микроскопии и цейтраферной киносъемки хорошо видимые в зоне роста эксплантата длинные отростки соединительнотканых и шванновских клеток ошибочно считают аксонами, а пальцевидные терминальные образования последних рассматривают как нервные окончания (Godina, 1956, 1963; Hughes, 1953; Nakai, Kawasaki, 1959; Nakai, 1960; Romgat e. a., 1967); тела шванновских клеток часто принимают за нейроны (Lamont, Verpon, 1967; Vagon, Raiborn, 1972).

Ошибки при изучении периферической нервной ткани в культуре могут также зависеть от недостаточного знания морфологии исходного эмбрионального материала. Для исследования периферической нервной системы в культуре обычно используют чувствительные спинальные и черепно-мозговые ганглии, реже узлы симпатической цепочки. Ганглии, как известно, представляют собой очень сложные морфологические и функциональные образования, содержащие клетки и волокна различного гистогенеза. К ним прежде всего относятся высокоспециализированные нейроны и вспомогательные элементы (сателлиты и шванновские клетки), имеющие с нейронами общее эктодермальное происхождение. Кроме того в ганглиях находятся клетки периневрия, природа которых до сих пор остается спорной, и, наконец, соединительнотканые элементы эпи- и эндоневрия.

Чувствительные узлы обычно берут от 9-дневных куриных эмбрионов или эмбрионов грызунов (мышей или крыс) 17—20-дневного возраста. Такие культуры при определенных условиях (наличие высококачественной питательной среды, коллагенового покрытия, на котором выращивают эксплантат, а также отсутствие микробной флоры) нормально растут и дифференцируются в течение многих месяцев. При этом первоначально толстые, округлой формы эксплантаты ганглиев в процессе роста сильно истончаются, что в значительной степени облегчает их изучение как в живом, так и в фиксированном состоянии.

В настоящей главе будут рассмотрены следующие вопросы:

1) закономерности и последовательность миграции различных клеточных элементов в культуре нервной ткани;

2) особенности дифференциации нейронов и шванновских клеток в условиях культуры;

- 3) регенерация периневрия вне организма;
- 4) участие осевых цилиндров и шванновских клеток в формировании нервных волокон, в том числе в образовании миелиновой оболочки;
- 5) дифференциация аксона и дендрита чувствительных нейронов и их окончаний в культуре.

## 2.1. Структура эмбрионального чувствительного узла крысы, используемого для эксплантации

Поскольку в дальнейшем морфология культур периферической нервной системы будет дана на примере тригеминальных ганглиев, важно знать их строение на той стадии эмбрионального развития, на которой взят материал.

У 19—21-дневного эмбриона крысы анатомически уже хорошо выражены как узел тройничного нерва, так и его центральные и периферические ветви. Длина ганглия от 1,5 до 2 мм, толщина 0,7—1 мм.

В состав ганглия входят различные тканевые элементы, среди которых особенно выделяются крупные нервные клетки, которые, согласно классификации А. Г. Киорре (1949), А. Г. Киорре и Л. В. Суворовой (1959), следует отнести к дифференцирующимся или молодым нейронам. Они хорошо импрегнируются солями серебра (рис. 16, а), окрашиваются по Нисслию и избирательно выявляются метиленовым синим. На препаратах, окрашенных по Нисслию (рис. 16, б), в цитоплазме молодых нейронов отчетливо видно хроматофильное вещество, которое в виде мелких глыбок равномерно располагается по всему перикариону. Крупные ядра обычно с 1—2 базофильными ядрышками занимают либо центральное, либо эксцентричное положение. Наряду с молодыми нейронами в ганглиях имеется небольшое число менее дифференцированных ганглиозных клеток, которые при импрегнации слабо воспринимают соли серебра; их ядро, расположенное на периферии, имеет 2—3 ядрышка, а пылевидное хроматофильное вещество диффузно заполняет всю цитоплазму.

При импрегнации серебром по Бильшовскому — Грос все дифференцирующиеся нервные клетки имеют грушевидную форму тела и одно эксцентрично или центрально расположенное круглое светлое ядро, в котором иногда



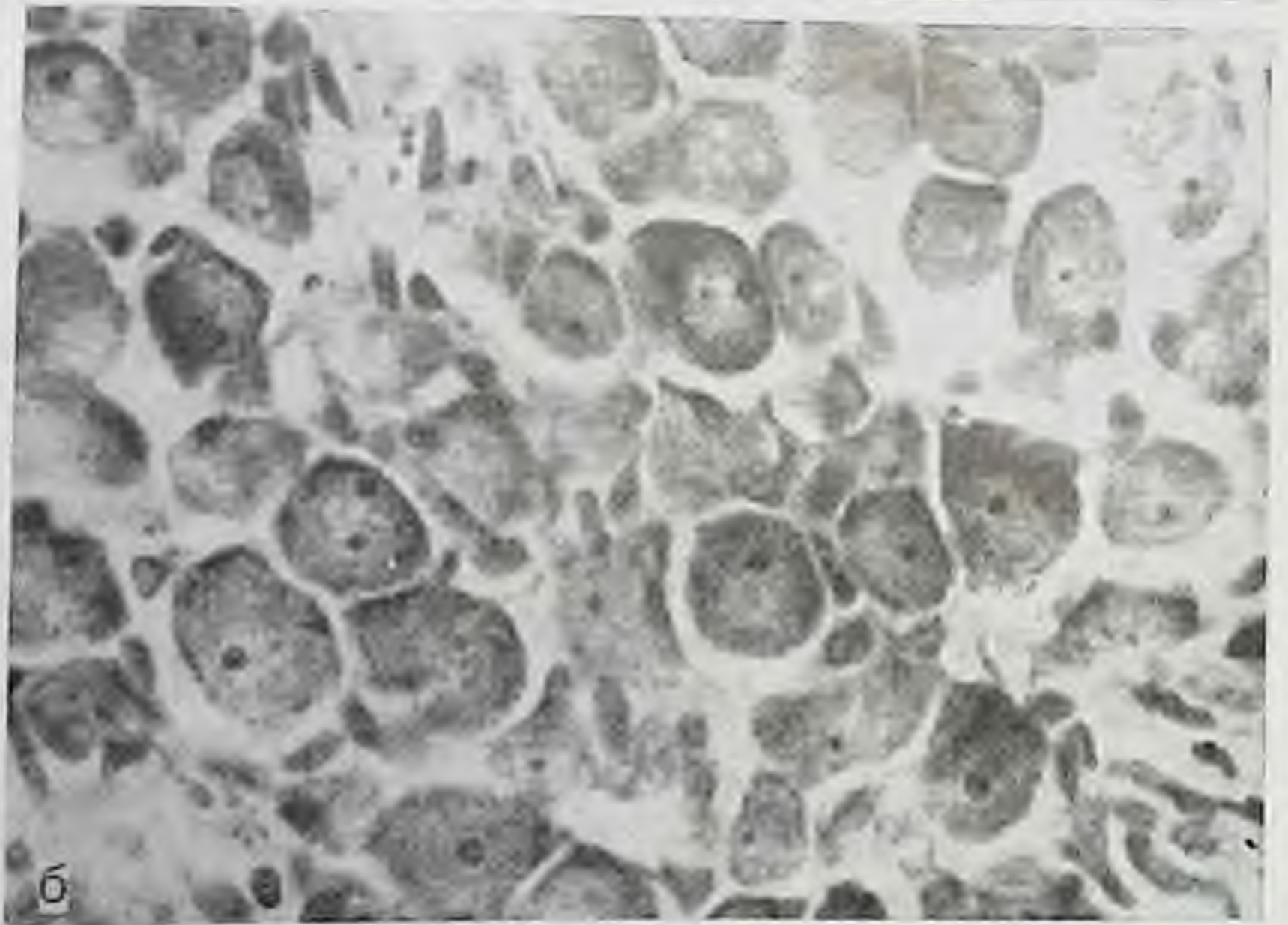
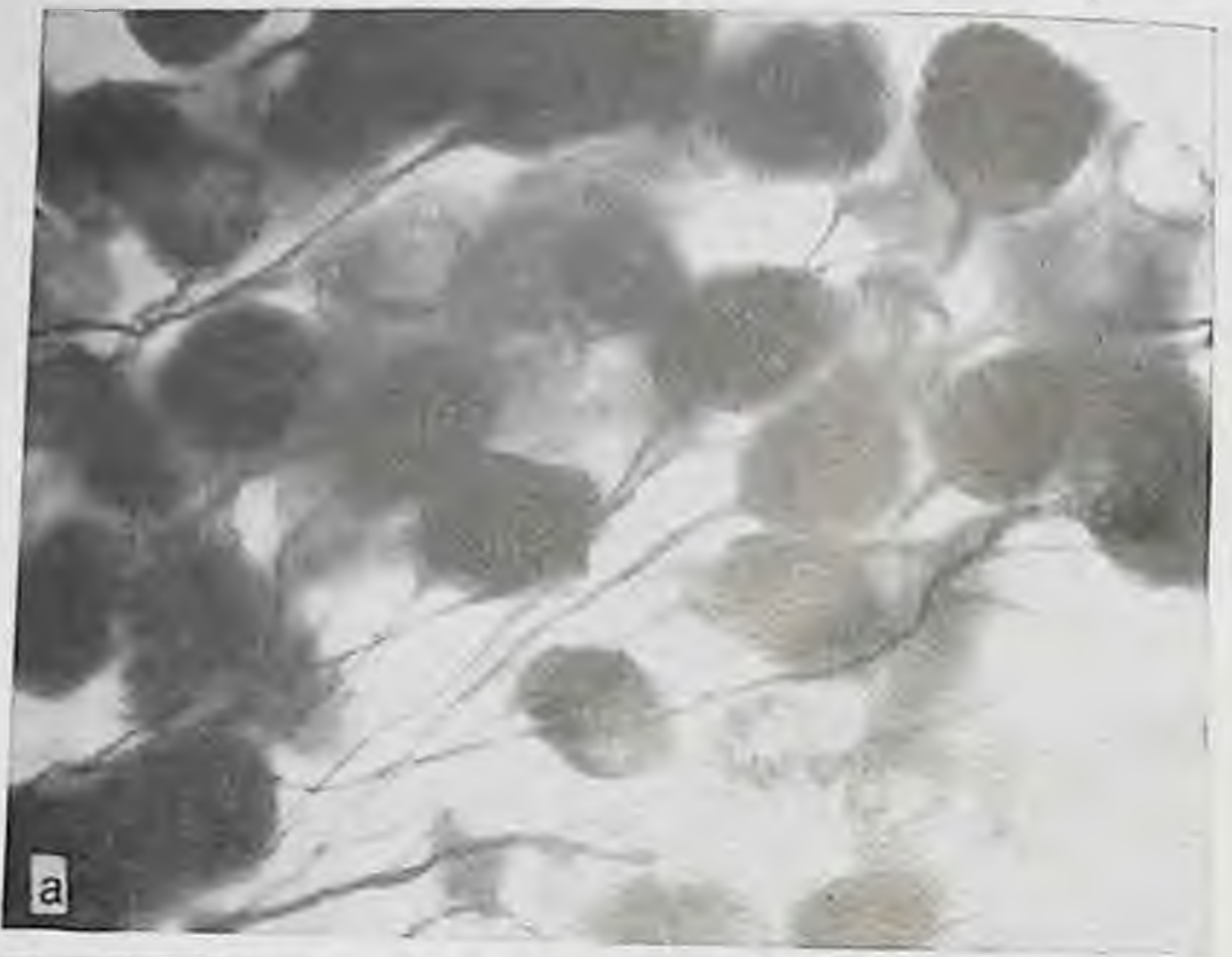


Рис. 16. Дифференцирующиеся нейроны тригеминального ганглия крысы на 20-й день пренатального развития.  
а — импрегнация серебром по Биельшовскому—Грос; б — окраска по Нисслию.  
Х700.

можно различить 1—2 интенсивно импрегнирующихся ядрышка; от тела этих клеток отходит один отросток (см. рис. 16, а). В цитоплазме нейронов уже образовался нейрофибрилярный аппарат, который располагается в виде сети более плотно вблизи ядра и рыхло по периферии перикариона. У аксонального холмика нейрофибриллы собираются в пучки и направляются в отросток, в котором они прослеживаются вплоть до его деления. Отростки дифференцирующихся нервных клеток по мере удаления от тела постепенно истончаются и Т-образно делятся на значительном расстоянии от них на два тонких ответвления, которые формируют пучки нервных волокон центральной и периферических ветвей ганглия.

Вокруг тел нервных клеток и их отростков расположены вспомогательные элементы (сателлиты и шванновские клетки). Возле тела нейрона обычно видно 2—3 сателлита, цитоплазма которых по методу Ниссля плохо выражена, бледно окрашивается, и в ней различается лишь пылевидная зернистость, а при импрегнации серебром она вовсе не выявляется. Ядра сателлитов и шванновских клеток по сравнению с ядрами нейронов имеют значительно меньшие размеры (5—6 мкм), интенсивно окрашиваются по Нисслию и содержат 1—2 базофильные глыбки или зернышка. Непосредственно перед рождением крысенка большинство шванновских клеток, расположенных в центральной и периферических ветвях в отличие от тех же клеток в самом ганглии, характеризуются более крупным, овальной формы ядром с диффузно рассеянным хроматином и сигарообразной формой тела. В их цитоплазме при окраске по Нисслию различается мелкая зернистость, окрашивающаяся в синий цвет. Такой своеобразный вид шванновских клеток указывает на то, что они находятся в гипертрофированном состоянии, что, по-видимому, связано с началом процесса миелинизации (Wender e. a., 1969). При окраске по Беккеру и суданом черным в цитоплазме таких гипертрофированных шванновских клеток, особенно в ветвях ганглиев 19—21-дневных эмбрионов, обнаруживается большое число включений в виде мелких и крупных гранул интенсивно-синего цвета, соответствующих фосфолипидам, которые, как известно, представляют один из основных классов липидов миелина. Эта зернистость в центральной ветви ганглия наблюдается только до границы перехода ее в проксимальную часть корешка, имеющую структуру белого вещества ЦНС; отсутствие





Рис. 17. Формирующиеся миелиновые оболочки первичных волокон в виде тонких трубочек; вокруг них — многочисленные зерна фосфолипидов. Тригеминальный ганглий крысы. 1-й день после рождения. Окраска по Беккеру на фосфолипиды.  $\times 450$ .

в телах клеток проксимальной части корешка зерен фосфолипидов указывает на то, что процесс миелинизации в ней к этому времени еще не начался. В связи с этими наблюдениями была поставлена задача выяснить более точно срок начала миелинизации первичных волокон в тригеминальном ганглии крысы.

Согласно литературным данным миелинизация нервных волокон этого ганглия начинается на 7—10-й день постнатального развития (Rose, Pearson, 1963); при электронно-микроскопическом исследовании этого же материала Dixon (1963) обнаружил формирование миелиновой оболочки на 4-й день после рождения.

Гистохимически с помощью окраски суданом черным и по Беккеру первые, примитивные миелиновые оболочки в тройничном узле и его ветвях нам удалось обнаружить на первые — вторые сутки после рождения. В это время они имеют вид тонких трубочек диаметром 2—2,5 мкм

с неровными контурами (рис. 17), окрашивающихся при этом методе в синий цвет.

Узел и его ветви окружены тонкой оболочкой, которая состоит из наружного рыхлого слоя соединительной ткани — эпиневрия и внутреннего более плотного — периневрия. Последний, по данным Н. Г. Хлопина (1946), С. И. Щелкунова (1957), Shanthavsegarra и Bougne (1968) и др., представляет эпителий нейроэктодермального происхождения и окружает в виде футляра ганглии и нервные стволы уже на очень ранних стадиях эмбрионального развития (М. М. Щудло, 1972). Он четко выявляется методом импрегнации серебром клеточных границ и имеет характерное слоистое строение: 1—2 слоя плоских полигональных одноядерных клеток, разделенных пучками коллагеновых волокон, образуют вокруг узла и его ветвей эпителиальный пласт. Эпиневррий ганглия в эти сроки слабо развит, и в нем видны лишь немногочисленные тонкие пучки коллагеновых волокон и отдельные фибробласты.

Таким образом, тригеминальный ганглий крысиных эмбрионов по своей цитоархитектонике к моменту эксплантации уже вполне сформирован. Однако, как видно из изложенного выше, многие клеточные элементы его как соединительнотканного, так и нейронального происхождения не имеют еще определенного дефинитивного вида и находятся на различных стадиях дифференциации.

## **2.2. Особенности роста тригеминального ганглия эмбрионов крысы 17—20-дневного возраста *in vitro***

### **2.2.1. О последовательности роста клеточных элементов и организация эксплантатов чувствительных узлов**

Уже в первых работах о культивировании эмбриональной ткани нервной системы был отмечен интенсивный рост нейробластов и эмбриональных нейронов и их отростков, а также соединительнотканых элементов (Т. Лазаренко, 1931; Л. М. Григорьев, 1931—1932; Olivo, 1927; Levi, 1934; Mossa, 1928—1929; Mihalik, 1935, 1940, и др.). Ранее считали, что первоначально происходит интенсивный рост



отростков нейробластов, эмбриональных нейронов и миграция последних. Затем следует вторая фаза, характеризующаяся выселением из эксплантата «фибробластообразных и макрофагообразных элементов», и, наконец, позже всего начинается рост «эпителиообразных мембран», клетки которых представлены нейроглиальными компонентами (Н. Г. Хлопин, 1940).

Н. Г. Хлопин, однако, отметил, что обычно эти три фазы резко отграничены друг от друга, и в ряде случаев на определенных стадиях культивирования можно одновременно видеть элементы, характерные для каждой из них.

До сих пор продолжается дискуссия по вопросу о фазах роста в культуре нервной ткани. Между тем он имеет принципиальное значение для понимания эмбриогенеза нервной системы в условиях целостного организма.

К изучению последовательности роста клеточных элементов и дифференциации нейронов можно приступать уже в первые часы культивирования, после прикрепления ганглия к коллагеновому покрытию стекла<sup>1</sup>. Через 20—24 ч культивирования эксплантируемый узел имеет вид маленького округлого комочка. При использовании фазовоконтрастного микроскопа в центральной зоне культуры удается обнаружить многочисленные, плотно прилегающие друг к другу клеточные элементы, среди которых различаются тела дифференцирующихся нейронов и сателлиты. У самой поверхности эксплантата видна сеть тонкостенных кровеносных сосудов, заполненных кровью. Начальный рост и миграцию первых клеточных элементов на этой стадии лучше всего можно проследить с помощью суправитальной окраски метиленовым синим. Появляющиеся по краям эксплантата на стекле клетки и их отростки в отличие от клеточных элементов основного кусочка хорошо окрашиваются различными гистологическими методиками и четко выделяются при фазовоконтрастной микроскопии (рис. 18). В этой светлой зоне («зона роста») через 24 ч находятся выселившиеся сюда из ганглия многочисленные, различной формы клетки. Среди них наблюдаются округлые, вытянутые, треугольные, а также неправильной формы клетки размером 15—20 мкм.

---

<sup>1</sup> Техника культивирования нервной ткани подробно описана в кн.: Руководство по культивированию нервной ткани. Под ред. Б. Н. Вепринцева. М., «Наука», 1976.

Длинные отростки у некоторых клеток имеют на концах тонкие пальцевидные разветвления. Часто видно, что тела отдельных клеток находятся еще в эксплантате, а отростки их уже располагаются в зоне роста. Связанные друг с другом отростками выселившиеся клетки кое-где образуют небольшие скопления. Первые мигрирующие клетки имеют круглое или овальной формы богатое хроматином ядро с несколькими ядрышками, хорошо окрашивающееся метакроматически толундиновым и метилениновым синим в розовый или фиолетовый цвет. Их цитоплазма при этом имеет голубоватый или синий цвет и в ней выявляется мелкая зернистость. В этих клетках часто наблюдаются фигуры митозов, причем клетки хорошо распластываются на коллагеновой подстилке. По морфологическим признакам эти клетки очень похожи на фибробласты и происходят из капсулы ганглия. Однако, как будет показано дальше, от обычных фибробластов они отличаются тем, что в процессе роста образуют эпителиоморфный пласт. Поэтому лучше их обозначать как фибробластоподобные клетки.

Непосредственно за первыми выселяющимися из ганглия фибробластоподобными элементами в зоне роста появляются веретенообразной формы шванновские клетки с длинными тонкими отростками, отходящими от обоих полюсов их тела, размером 6—8 мкм; с помощью отростков они соединяются друг с другом. Клетки имеют несколько вытянутое, овальной формы, богатое хроматином ядро с 1—2 ядрышками. Их тела тесно прилежат друг к другу и независимо от того, образуют они тяжи или клеточные пласты, как правило, ориентированы в радиальном направлении от центра эксплантата.

Миграция шванновских клеток характеризуется рядом отличительных особенностей, которые сходны с тем, что наблюдал Н. Г. Хлопин (1940, 1946). Изучая шванновские клетки в культуре, он обратил внимание на их «специфический нейроглиальный тип роста вне организма».

Шванновские клетки обладают интенсивным ростом и высокой пролиферативной активностью. Они выселяются группами и растут в виде тонких и толстых пластов, образуя тяжи и сетевидные структуры. Нервные клетки остаются в первичном эксплантате ганглия.

---

<sup>1</sup> Н. Г. Хлопин. Культура тканей. Л., 1940, с. 122.





Рис. 18. Миграция первых соединительнотканых клеточных элементов в зону роста; 6 ч после эксплантации. Суправитальная окраска метиленовым синим.  $\times 100$ .

На 2—3-и сутки зона роста значительно расширяется как за счет пролиферации фибробластоподобных элементов периневрия, так и в результате появления новой клеточной популяции — шванновских клеток. Уже в этот период наблюдается разница в размерах между центральной зоной (первоначально посаженный эксплантат) и зоной роста. Если в первые сутки последняя представляет узкий ободок, то уже на 2—3-й день она достигает размеров первоначально посаженного кусочка. На 6—10-й день зона роста в несколько раз превышает величину ганглия.

В этот срок культивирования отчетливо видно, что образующие рыхлые сети и тяжи шванновские клетки отстают в своем росте от слоев фибробластоподобных клеток (рис. 19).

Первые осевые цилиндры в зоне роста обнаруживаются через 24 ч после эксплантации только при помощи суправитальной окраски метиленовым синим, когда, помимо



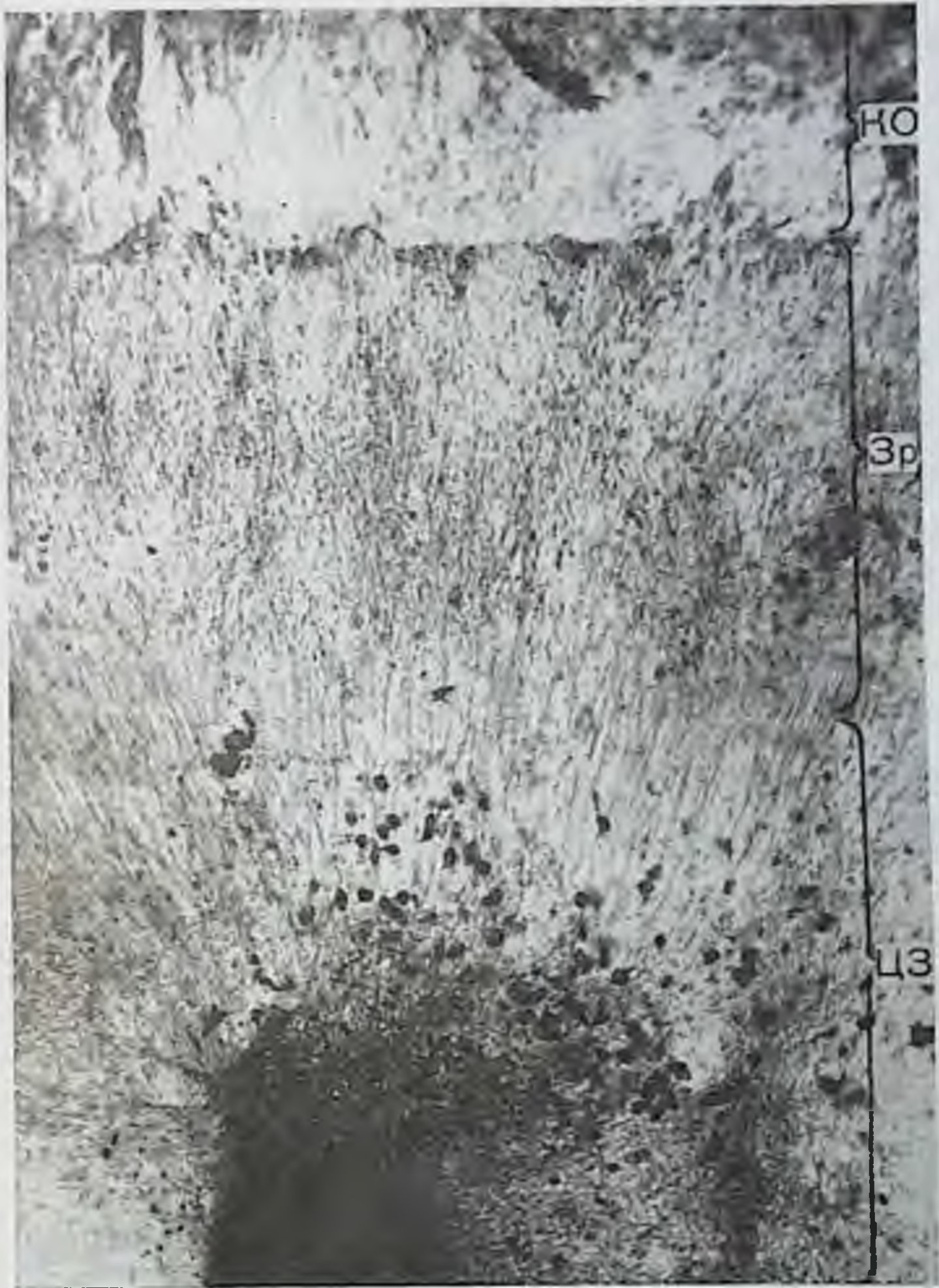


Рис. 19. Тригеминальный ганглий крысы на 6-й день культивирования. ЦЗ — центральная зона; ЗР — зона роста; КО — краевая или периферическая область эксплантата. Суправитальная окраска метиленовым синим. X50.

фибробластоподобных элементов, сюда уже мигрировали также шванновские клетки. Они имеют вид очень тонких нитей с ровными краями и находятся в тесной связи со шванновскими клетками и их отростками, причем за пределы этих клеток осевые цилиндры не выходят. Как показали наши наблюдения, отростки развивающихся нейронов в зоне роста имеют различное происхождение:





Рис. 20. Пласт полигональных фибробластоподобных клеток, выстилающий поверхность эксплантата ганглия, на 5-е сутки культивирования. Импрегнация клеточных границ нитратом серебра; докраска гематоксилином.  $\times 450$ .

часть их образуется в результате регенерации перерезанных при взятии материала отростков псевдоуниполярных нейронов, а часть возникает вновь из перикарионов чувствительных нервных клеток, расположенных преимущественно по краю ганглия. Последние, как правило, более дифференцированы, чем в центре культуры, имеют размеры 20—30 мкм и хорошо окрашиваются метиленовым синим. С одного полюса их по направлению к центру обычно отходит длинный Т-образно разделяющийся аксон, а на противоположной стороне образуются новые вначале короткие, а затем все более удлиняющиеся отростки, направляющиеся в зону роста в составе тяжелой мигрирующих шванновских клеток.

На 6-е сутки в зоне роста культуры с помощью суправитального окрашивания метиленовым синим и импрегнационными методиками серебрения выявляется богатое сплетение нервных волокон. В этот срок хорошо видна

структура чувствительного узла, и в эксплантате выделяются две отчетливо отграниченные друг от друга зоны (см. рис. 19).

Центральная зона состоит из компактно расположенных клеток: дифференцирующихся или молодых нейронов, клеток периферической глии (шванновские клетки и сателлиты), немногочисленных сохранившихся тонкостенных сосудов, в просветах которых еще видны распадающиеся эритроциты и лейкоциты. У поверхности этой зоны часто видно множество макрофагов.

Зона роста. В ней различаются: 1) пласт шванновских клеток, в котором находится густое сплетение осевых цилиндров, образованное отростками нервных клеток, а во внутренней зоне, ближе к центру, — небольшое число дифференцирующихся нейронов с длинными ветвящимися отростками; 2) краевая или периферическая зона, состоящая преимущественно из плоских фибробластоподобных клеток.

На рис. 19 видно, что пласт шванновских клеток с включенным в него сплетением осевых цилиндров имеет четкую границу с фибробластоподобными клетками.

Как показали наши наблюдения, фибробластоподобные клетки, происходящие из капсулы ганглия, образуют не только выстилку, на которой располагаются все нейральные элементы, но и представляют собой покровную ткань, отделяющую последние от питательной среды (см. рис. 20).

К 25—30-му дню культивирования чувствительных узлов зона роста достигает краев покровного стекла. В некоторых случаях растущий пласт клеток может даже огибать его края, продолжая свой рост по противоположной нижней поверхности стекла, лишенного коллагенового покрытия.

В отличие от шванновских и фибробластоподобных клеток, которые, как было отмечено выше, обладают бурным ростом и выраженной миграцией, нервные клетки в основном сохраняют свое первоначальное расположение, и у них отсутствуют пролиферативная активность и способность самостоятельно передвигаться. Появление небольшого числа нейронов в проксимальной части зоны роста, по-видимому, зависит не от их активной миграции, а представляет результат пассивного смещения части их вследствие интенсивного выселения и пролиферации шванновских клеток, образующих мощный пласт.



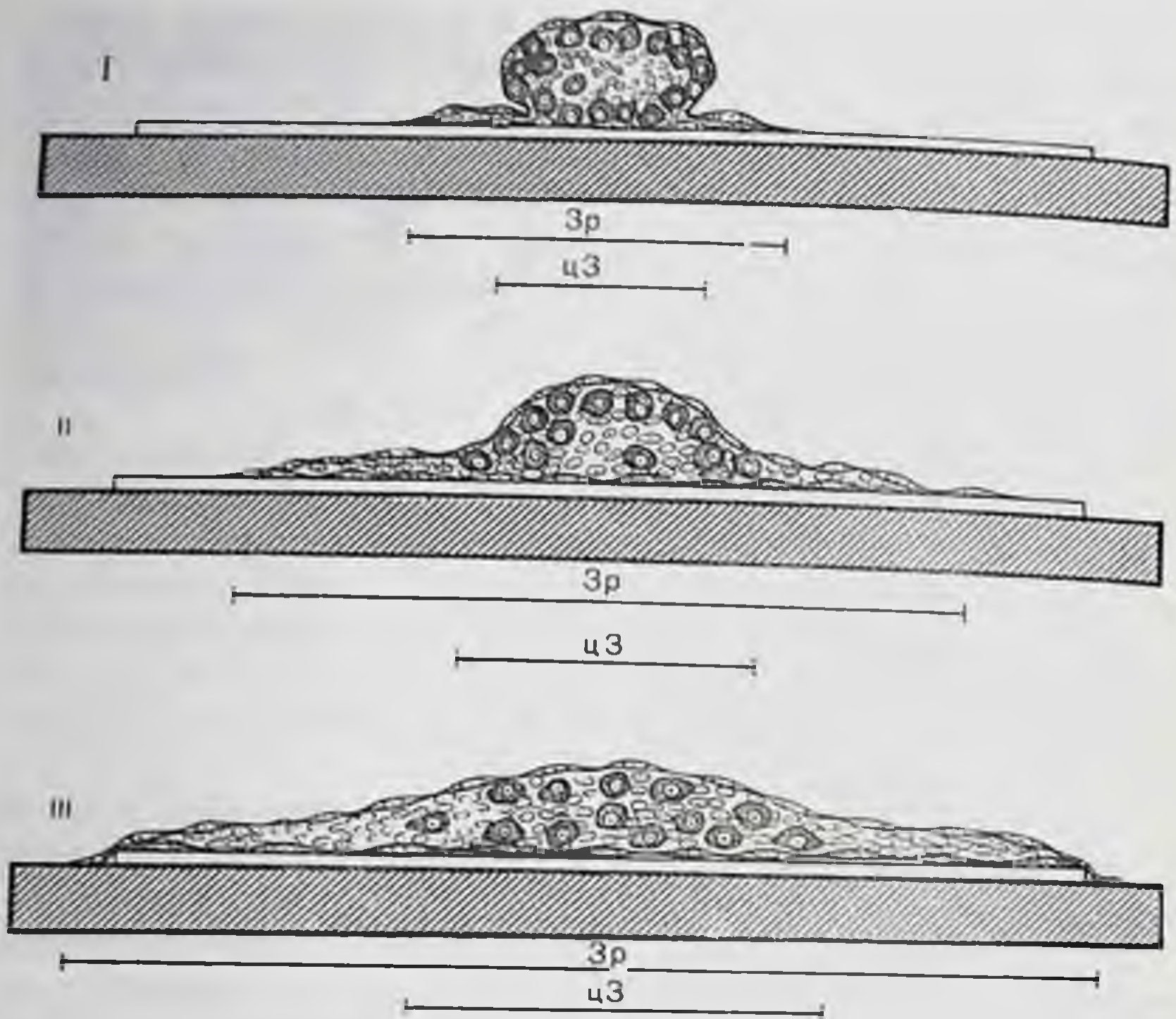


Рис. 21. Схема, показывающая цитоархитектуру клеточных элементов эксплантата и изменение соотношения центральной зоны (ЦЗ) и зоны роста (ЗР) в процессе культивирования.

I — 2-й день; II — 10-й день; III — 20-й день после эксплантации.

Таким образом, рост тканевых компонентов чувствительного узла в условиях культивирования происходит в определенной последовательности и носит фазовый характер. Согласно нашим данным, в зоне роста в первую очередь появляются соединительнотканые элементы капсулы ганглия — фибробластоподобные элементы, затем шванновские клетки, а вслед за ними или, возможно, одновременно с ними — регенерирующие и вновь образующиеся отростки нервных клеток.

Другой особенностью, характеризующей гистотипическую организацию чувствительного узла вне организма, является закономерное топографическое (зональное) расположение его клеточных элементов (рис. 21). В центре эксплантата находятся дифференцирующиеся первичные клетки, которые в процессе роста не мигрируют и остаются на месте. Далее следует зона роста, состоящая глав-

ным образом из пласта шванновских клеток с заключенным в него сплетением нервных волокон, представляющих собой отростки нейронов центральной зоны. Со всех сторон эксплантат выстлан покровной тканью — периневрием.

### 2.2.2. Нейроны чувствительного узла в культуре

В течение всех сроков культивирования развивающиеся нейроны находятся в центре эксплантата. В зависимости от возраста и условий культивирования они могут располагаться либо компактной массой, либо отдельно (рис. 22, а, б). Центральная часть эксплантата с нейронами имеет сначала плотное строение, но затем, в процессе роста, постепенно истончается и разрыхляется; это происходит в результате активной миграции из эксплантата в зону роста большого числа шванновских клеток и фибробластоподобных клеток периневрия и эндоневрия. Так как выселение клеток происходит радиально на периферию, то центральная часть эксплантата разрыхляется. Вследствие этого нейроны оказываются в более благоприятных условиях жизнедеятельности, расстояние между ними увеличивается, улучшается поступление к ним из окружающей среды питательных веществ, что при отсутствии кровоснабжения имеет первостепенное значение, приводя к быстрому росту тел и отростков нервных клеток. Локализация нейронов в длительно живущей (от 20 до 35 дней) культуре тригеминального узла хорошо видна на препаратах, окрашенных по Ниссляю.

Компактные группы или рассеянные мелкие и крупные нейроны размером 20—50 мкм расположены между нервными волокнами и шванновскими клетками: ближе к центру нейроны лежат более плотно (рис. 23). Крупное круглое, светлое ядро в мелких нейронах занимает большую часть тела, а в крупных — приблизительно  $\frac{1}{3}$  его; у части клеток оно находится в центре тела, в других же — на периферии. Средняя величина ядер мелких нейронов составляет 5—8 мкм, а крупных — 13—15,5 мкм. Большие размеры и сферическая форма ядер нервных клеток позволяют легко дифференцировать их от других клеточных элементов ганглия. Ядра мелких нервных клеток содержат от 1 до 3 ядрышек, интенсивно окрашивающихся различными гистологическими методиками, в то же время в крупных клетках в большинстве случаев в ядре вид-





Рис. 22. Компактное (а) и разреженное (б) расположение нейронов тригеминального ганглия в различные сроки культивирования.

а — 9 дней.  $\times 250$ ; б — 31 день после эксплантации.  $\times 30$ . Импрегнация серебром по Бильшовскому — Грос.



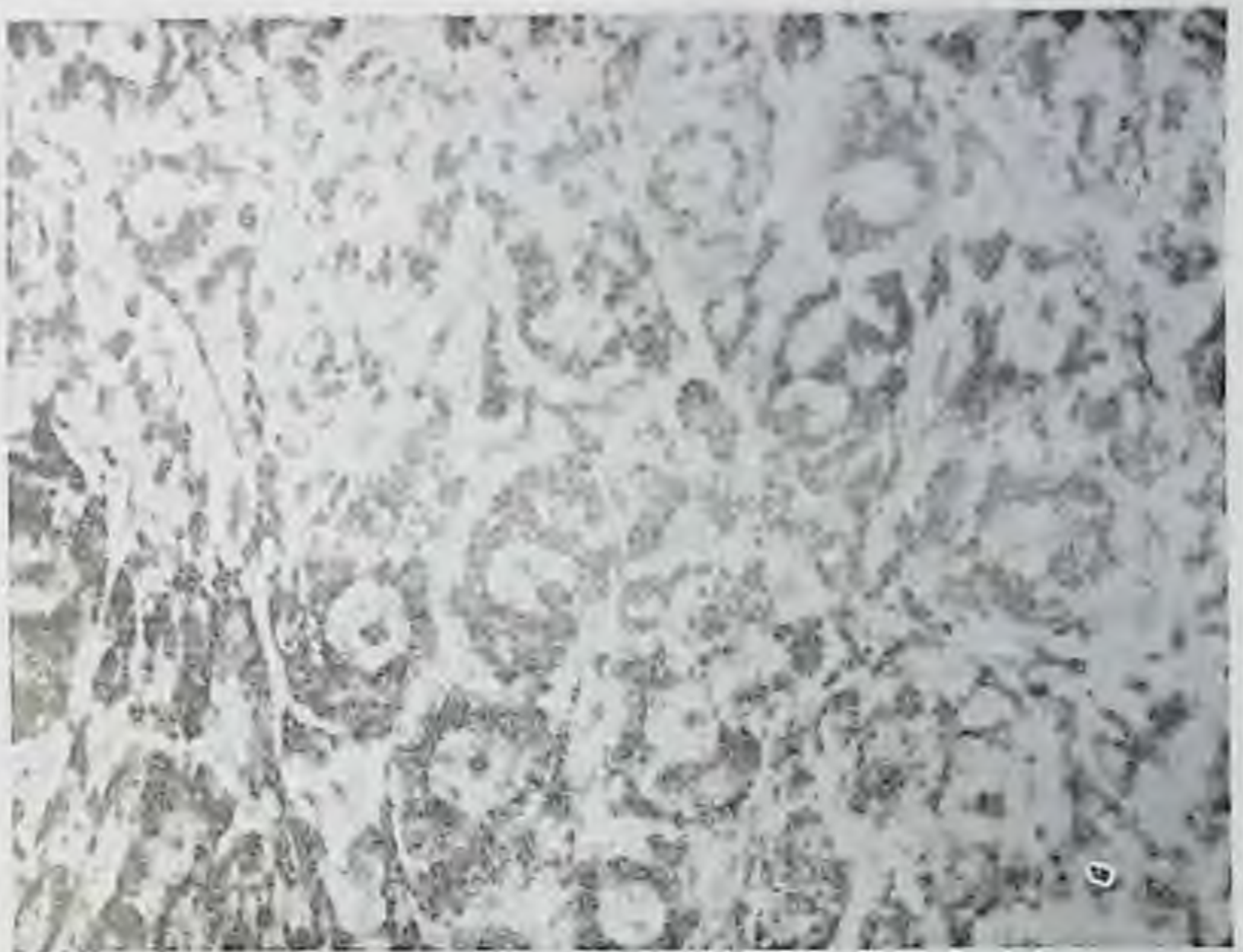


Рис. 23. Чувствительные нейроны на 27-й день культивирования. Прижизненное наблюдение. Фазовоконтрастная микроскопия.  $\times 500$ .

по одно ядрышко, которое значительно больше, чем в мелких нейронах. Круглая, эллиптическая или угловатая форма тела клеток в основном зависит от места их расположения. Плотнo прилежащие друг к другу нейроны имеют угловатую форму, и часто их очертания соответствуют очертаниям соседних клеток (см. рис. 23); рассеянно лежащие клетки, как правило, имеют округлые контуры. В узких промежутках между телами нервных клеток к ним вплотную прилежат отдельные (1—2) сателлиты, ядра которых похожи на ядра находящихся рядом шванновских элементов. На тонких (1—2 мкм) срезах хорошо видно, что цитоплазма сателлитов полностью окружает тело нейрона. При окраске суданом черным в цитоплазме нервных клеток находится нежная суданофильная зернистость. Она обычно рассеяна по всей цитоплазме, но у некоторых крупных нейронов больше концентрируется вокруг ядра. В фиксированных и окрашенных по Нисслию тотальных препаратах в нейронах видны зерна и глыбки хроматофильного вещества, рассеянного по всей цито-



плазме; в крупных клетках они большей частью сосредоточены по периферии.

Область аксоного холмика как на живых, так и на фиксированных препаратах редко удается обнаружить, а отходящий от перикариона отросток, аксоплазма которого, как известно, бедна органеллами и характеризуется слабым лучепреломлением, не определяется вовсе. Тонкую морфологию нейронов и их отростков в культуре следует изучать главным образом с помощью определенных нейростологических методик, как импрегнационные методы серебрения и суправитальная окраска метиленовым синим, которые дают возможность получить наиболее полное представление о структуре культуры чувствительного узла. Кроме того, этими методиками можно исследовать морфологические особенности нервных клеток и их отростков, нейроглиальные и межнейрональные взаимоотношения, а также характер окончания отростков нейронов (конусы роста и первичные окончания).

После 24 ч культивирования размеры нейронов (18—25 мкм) мало отличаются от исходной величины. При суправитальной окраске метиленовым синим многие нейроны имеют тело грушевидной формы и один отходящий Т-образноделяющийся неподалеку от клетки отросток, хорошо выявляемый на светлом фоне препарата. У части малодифференцированных нейронов появляются новообразующиеся тонкие цитоплазматические отростки, направляющиеся в зону роста, в то время как основной Т-образноделяющийся аксон прослеживается до центра эксплантата; такие нейроны имеют биполярную форму. Иногда у клеток видны 3—4 отростка, отходящие с разных сторон перикариона, вследствие чего они приобретают мультиполярную форму. Еще большие вариации среди дифференцирующихся нейронов наблюдаются на 4—6-й день культивирования (рис. 24). В это время размер нервных клеток увеличивается до 25—40 мкм, и они имеют грушевидную, веретенообразную или полигональную форму. Хотя большинство нейронов находится в первоначальном эксплантате, некоторые из них видны в проксимальной части зоны роста, среди пласта шванновских клеток и снабжены длинными отростками, направляющимися как к центру культуры, так и радиально от него к краю стекла. По характеру и расположению инслевского вещества (мелкие пылевидные частицы по периферии



Рис. 24. Различной формы и размеров молодые нейроны тригеминального узла на 6-й день культивирования (часть нейронов расположена в зоне роста эксплантата). Суправитальная окраска метиленовым синим. Фрагмент рис.  $19 \times 100$ .

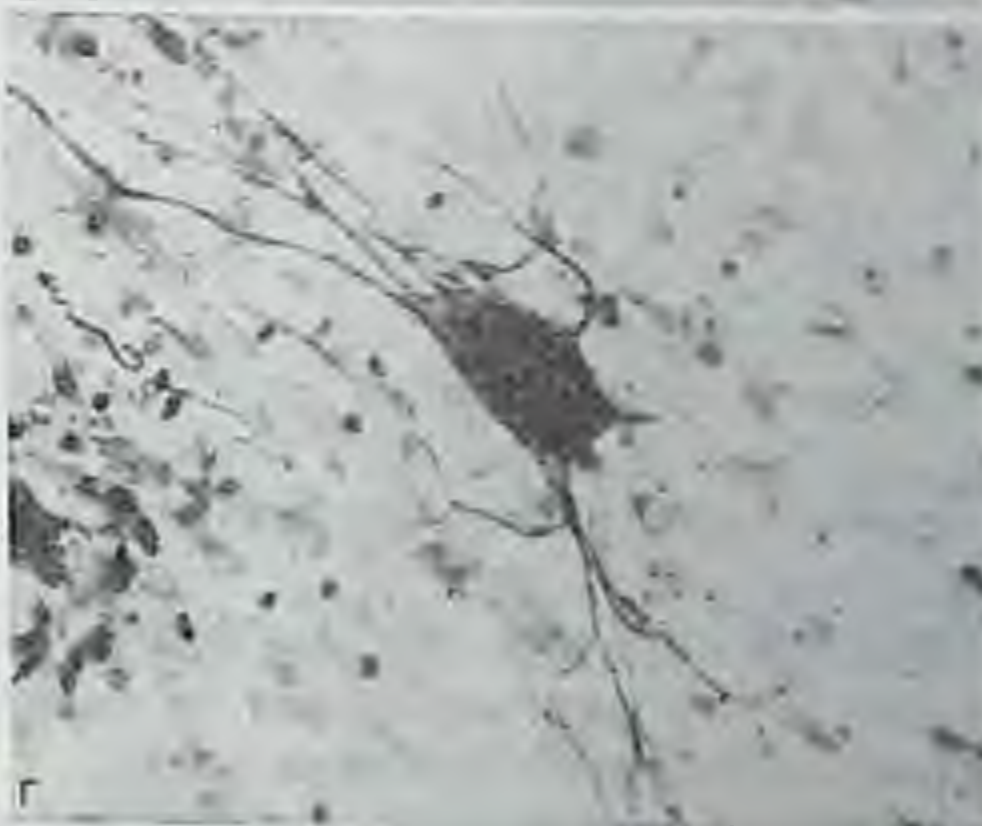
перикариона и глыбки в перинуклеарной области) эти нервные элементы соответствуют стадии молодого нейрона. В некоторых клетках вблизи пузырьковидного ядра обнаруживается иногда зона ацидофильной цитоплазмы, что некоторыми исследователями рассматривается как реакция на повреждение при пересечении аксона (Murray, 1965; Scott e. a., 1969; Krasnicka, 1969). Во многих нейронах с 10-го дня культивирования отчетливо выявляется инслевское вещество. Сначала ядро окружено крупными базофильными глыбками, располагающимися concentрически, а затем они распределяются более или менее равномерно по всему перикариону (Deitch, Murray, 1956). В дальнейшем у нейронов продолжается увеличение тела, которое достигает у части из них 50—70 мкм и более; при этом образующиеся у них отростки интенсивно растут и многократно ветвятся в различных направлениях. В поздние сроки культивирования (25—35 дней)





Рис. 25. Нейроны длительно живущей культуры тригеминального ганглия.  
а — псевдоуниполярные нейроны 34-дневной культуры;

б, в, г — двухъдерные мультиполярные нервные клетки 27-дневной культуры тригеминального узла. Импрегнация серебром по Бильшовскому — Грос (а, б, г) и суправитальная окраска метиленовым синим (в). X1600 (а), X580 (б), X250 (в, г).





структура хромотофильного вещества ничем не отличается от таковой у дефинитивных нейронов *in vivo*.

При импрегнации серебром по Бильшовскому—Грос и Холмсу в эти сроки в цитоплазме зрелых нейронов видны нейрофиламенты, образующие густую сеть. Вблизи ядра они расположены более густо, а по периферии перикариона приобретают более рыхлое ячеистое строение. В аксональном холмике нейрофибриллы собираются в пучки и продолжают в отростки. Несмотря на то что по ряду морфологических признаков нейроны в длительно живущих культурах не отличаются от зрелых, аксоны их не образуют вокруг тела инициального клубочка, столь характерного для данного типа клеток *in vivo*.

В процессе культивирования тригеминального ганглия нервные клетки его имеют разнообразную форму. В то время как все дифференцирующиеся нейроны узла в момент эксплантации бывают только униполярными, во время роста в культуре ткани многие из них становятся полиморфными и, помимо псевдоуниполярных клеток, вследствие появления у них новых отростков приобретают биполярную и мультиполярную форму (рис. 25).

В отличие от того, что имеет место в условиях целого организма, в эксплантатах чувствительных узлов почти в каждом препарате, кроме одноядерных нейронов, видно от 2 до 5 двоядерных, а иногда и трехъядерных клеток (рис. 25, в, б); важно отметить, что двоядерные нейроны в чувствительных ганглиях взрослой крысы не встречаются. В культуре дву- и многоядерные нейроны, как правило, имеют мультиполярную форму вследствие наличия у них нескольких (от 3 до 10) коротких и длинных отростков. Найти объяснение появлению двоядерных нейронов в культуре пока затруднительно, так как в эмбриональных чувствительных ганглиях крысы нейроны, начиная со стадии пронеуробласта и нейробласта, никогда не имеют двух ядер. Следовательно, деление ядер в некоторых дифференцирующихся нейронах происходит только в условиях культивирования.

Возможно, что это обусловлено полиплоидизацией нервных клеток и отражает их реактивное состояние в ответ на необычные условия среды.

Наряду с хорошо сохранившимися нейронами в культуре встречаются отдельные группы их, находящиеся на разных стадиях патологических изменений, вплоть до тяжелого некробиоза (рис. 26). У таких клеток обычно не



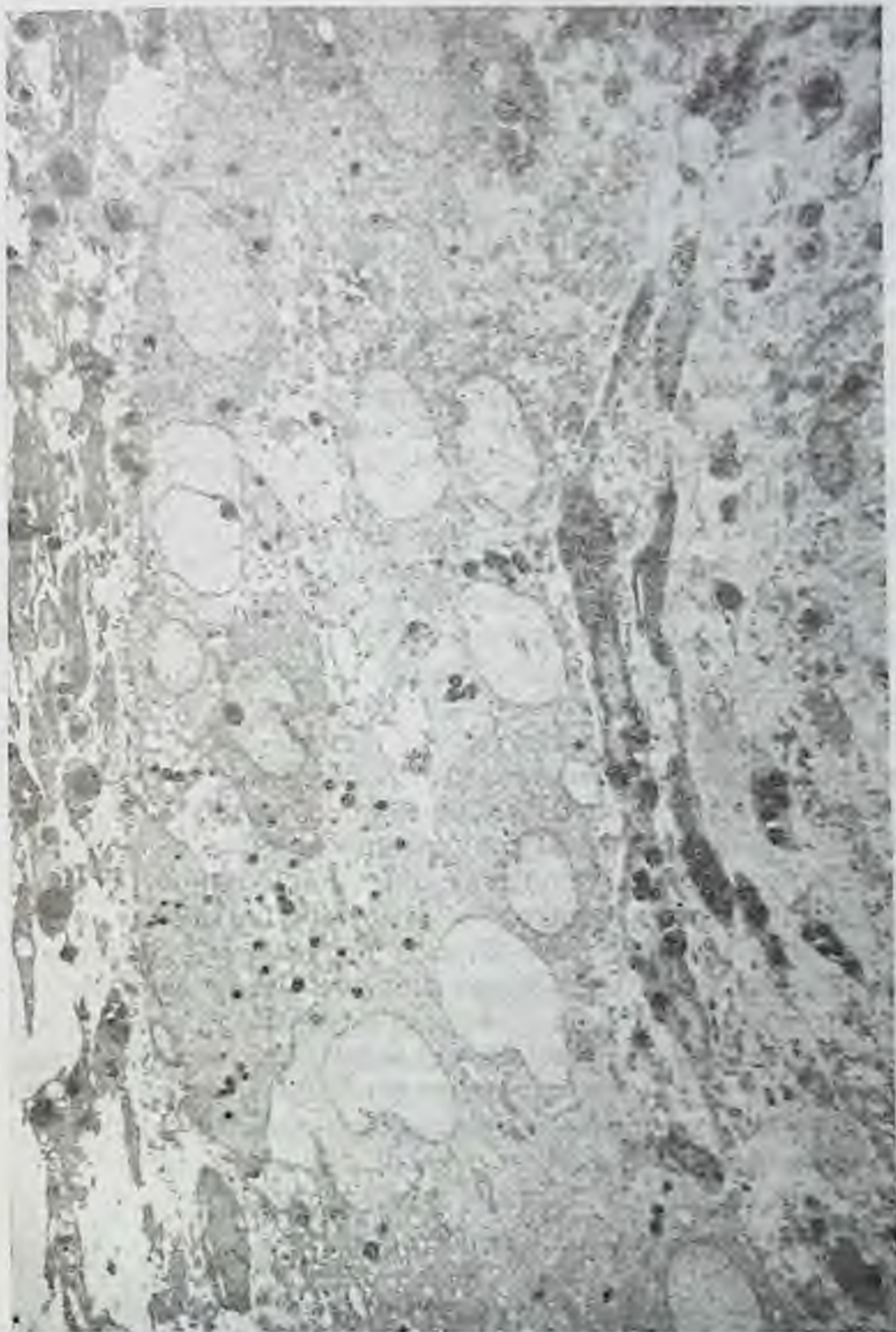


Рис. 26. Патологически измененные первичные клетки в 25-дневной культуре тригеминального ганглия. Бросается в глаза отсутствие капсульных элементов — сателлитов вокруг нейронов, вакуолизация их цитоплазмы и наличие в ней жировых включений. Электронная микрофотография.  $\times 1500$ .



удастся выявить отростки, и их ядро интенсивно импрегнируется серебром. Субмикроскопически в цитоплазме гибнущих нервных клеток невозможно различить каких-либо сохранившихся органелл, так как она часто представляет детрит. Контуры ядер неровные и с трудом определяются, а в кариоплазме видны только пылевидная субстанция и гипертрофированное сетчаткой структуры ядрышко. По данным Миггау (1965), в культуре чувствительных узлов с 9-го по 14-й день гибнущие нейроны составляют около 10—15%. У части переживающих нейронов крупное круглое ядро с большим базофильным ядрышком располагается эксцентрично, а у некоторых находится в центре.

Полученные результаты исследований показывают, что большая часть эмбриональных нейронов тригеминального ганглия от 16—20-дневных зародышей крысы не утрачивает свою жизнеспособность в органотипической культуре и продолжает развиваться от исходной стадии дифференцирующегося нейрона до зрелой дефинитивной нервной клетки. При этом большинство клеток сохраняет морфологические и гистотипические признаки, характерные для псевдоуниполярных нейронов; часть из них (возможно, нейробласты) превращается в процессе культивирования в биполярные и мультиполярные нейроны. Морфологическими критериями дифференциации являются: формирование нислевского вещества от пылевидной субстанции до крупных хроматофильных глыбок; увеличение размеров тела нейронов от 18—25 мкм в исходном эмбриональном материале до 50—70 мкм в длительно живущих культурах; наличие хорошо развитых нервных волокон и, как будет показано дальше, их миелинизация и образование различного типа нервных окончаний. В отличие от *in vivo* в культуре чувствительного ганглия имеются многоядерные нервные клетки.

### 2.2.3. Рост нервных волокон в культуре

Согласно данным Hughes (1953), Nakai (1956, 1960) и др., уже в первые 24 ч в культуре чувствительных ганглиев наблюдается образование новых тонких аксонов, которые растут из эксплантата в зону роста «голыми» и с помощью псевдоподий продвигаются на периферию. Такие наблюдения, проведенные на живых объектах, в основном были сделаны с помощью цейтраферной киносъемки, фа-

зовоконтрастной микроскопии и других методик, неадекватных для решения данного вопроса.

По нашему мнению, хотя описанные выше структуры и напоминают аксоны, вероятнее всего, они представляют собой цитоплазматические отростки шванновских и соединительнотканых клеток. То, что они окрашиваются различными общегистологическими методиками, говорит в пользу этого мнения. Известно, что бедная органоидами аксоплазма обладает настолько низкой светооптической плотностью, что обнаружить ее не только в фазовоконтрастном микроскопе, но и при использовании общегистологических методик бывает крайне трудно. Как справедливо отмечают Bunge и соавт. (1967), даже на окрашенных толудиновым синим ультратонких срезах (1—2 мкм) аксоны не удается выявить. Осевые цилиндры можно обнаружить только специальными нейростологическими методиками. Важным аргументом в пользу того, что речь идет не об аксонах, а о цитоплазматических отростках соединительнотканых и шванновских клеток, служит и образование ими и их тонкими боковыми выростами в виде псевдоподий анастомозов, формирующих густую сеть; это особенно хорошо видно при изучении культур с помощью цейтраферной киносъемки. Как известно, нервные волокна никогда не анастомозируют и не образуют сетей (А. С. Догель, 1896; Б. И. Лаврентьев, 1946; Ю. М. Жаботинский, 1953, 1965; Langley, 1922, и др.). На отсутствие анастомозов между нервными волокнами в культуре ткани спинальных ганглиев также указал Lumsden (1968).

В образованных *in vivo* нервными волокнами сложных сплетениях аксоны обычно изолированы друг от друга; даже в пределах одной шванновской клетки они разделены ее цитоплазмой. В культуре тканей те же самые взаимоотношения сохраняются с самых начальных стадий роста.

В зоне роста чувствительных узлов первые отростки нейронов появляются непосредственно за мигрирующими шванновскими клетками уже в первые сутки после эксплантации; они имеют вид очень тонких нитей, выявляющихся только с помощью суправитальной окраски метиленовым синим (рис. 27, а). Эти тончайшие нервные отростки в зоне роста культуры образуются как в результате регенерации, так и вырастают из тел нейронов вновь; те и другие морфологически сходны. Они еще очень слабо





Рис. 27. Рост нервных отростков в первые дни культивирования.  
 а — тонкие регенерирующие отростки нервных клеток, образующие сплетение в зоне роста (24 ч после экплантации); суправитальная окраска метиленовым синим.  $\times 300$ ; б — нервные волокна, заключенные в тяж шванновских клеток (48 ч после экплантации). Импрегнация серебром по Бильшовскому — Грос.  $\times 640$ .

воспринимают соли серебра и поэтому плохо импрегнируются по Бильшовскому — Грос, Холмсу и другими методами. По своей структуре они резко отличаются от более толстых цитоплазматических отростков соединительнотканых и шванновских клеток, с которыми находятся в тесной связи. Диаметр некоторых из этих отростков менее 1 мкм (0,2—0,5 мкм) и, как показывают электронномикроскопические исследования, часть их находится за пределами разрешающей способности светового микроскопа. Сеть из анастомозирующих цитоплазматических отростков шванновских клеток представляет для них как бы своеобразное ложе, в котором они находятся. Вырастающие из экплантата в зону роста отростки нервных клеток следуют или поодиночке, или образуют топчайшие пучки (рис. 27, б). Последние часто на большом протяжении идут в составе одного цитоплазматического тяжа



шванновских клеток, а при разветвлении его расходятся веером и следуют по анастомозирующим отросткам этих клеток. При этом в боковых ветвях шванновских клеток проходят лишь по 1—2 осевых цилиндра. Часть нервных волокон имеют извилистый ход и под острым углом поворачивают в обратную сторону, к эксплантату, в то время как другие продолжают следовать в прямом направлении к краю зоны роста вслед за мигрирующими клетками. Многие осевые цилиндры по ходу следования дихотомически делятся и посылают свои короткие и длинные веточки к соседним тяжам и группам шванновских клеток.

Эти светооптические наблюдения подтверждаются и электронно-микроскопическими данными. Субмикроскопические исследования еще более убедительно показывают, что вырастающие в зону роста отростки нервных клеток с первых дней культивирования находятся в тесных отношениях только с шванновскими клетками (рис. 28). Однако эта взаимосвязь еще существенно отличается от таковой в зрелых нервных волокнах, так



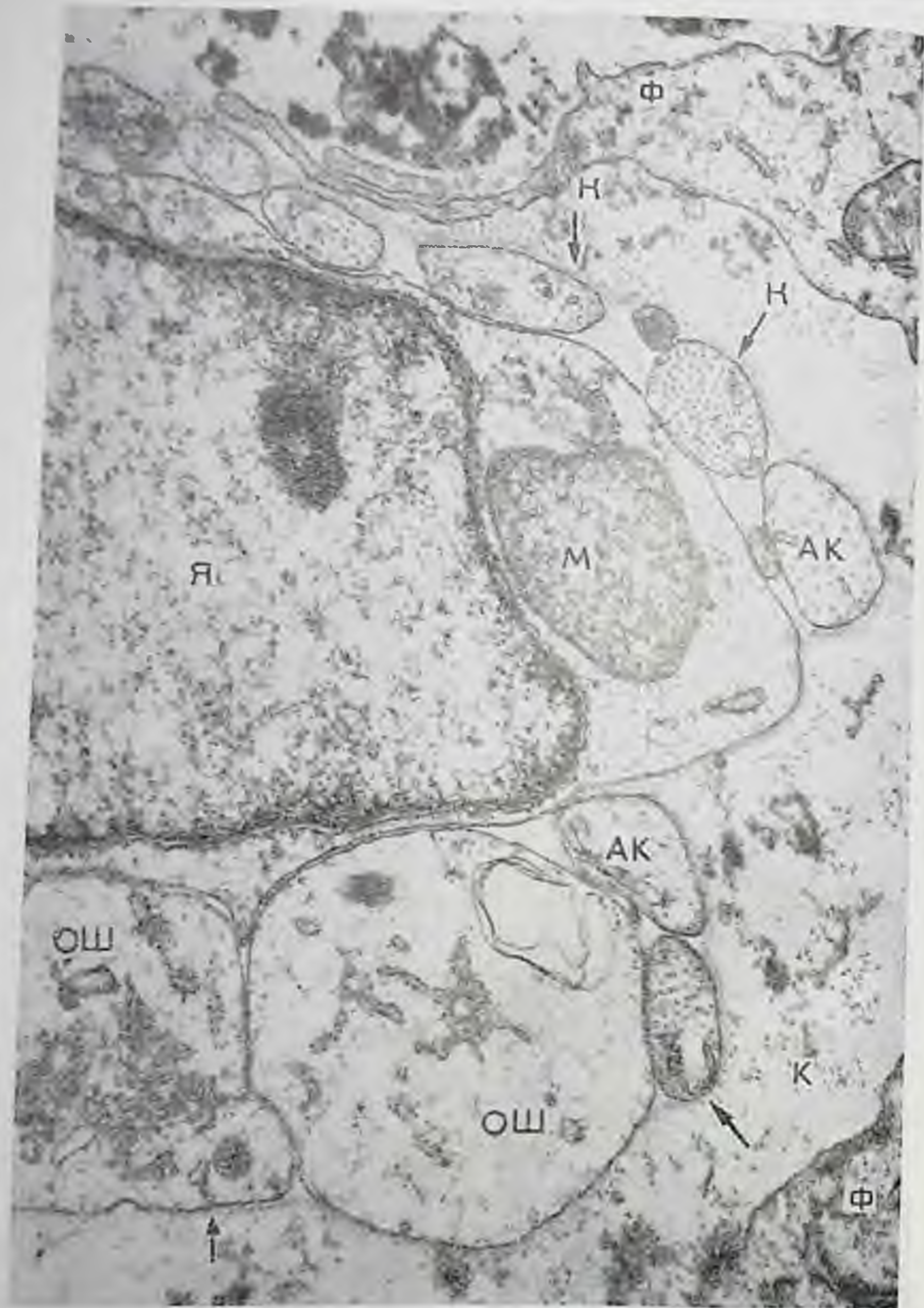


Рис. 28. Ультраструктурные взаимоотношения растущих аксонов со шванновскими клетками в зоне роста через 24 ч после эксплантации тригеминального ганглия.

АК — аксоны; Ф — фибробласты; ОШ — отростки шванновских клеток; Я — ядро шванновской клетки; базальная мембрана шванновской клетки обозначена стрелками; М — митохондрия; К — коллаген. Электронная микрофотография. X25 000.



как многие осевые цилиндры еще не заключены в цитоплазму шванновских клеток, а лишь близко прилежат к их телам и отросткам. Тем не менее уже на этих ранних стадиях культивирования выявляется очень важная специфическая особенность, характерная для аксон-шванновских взаимоотношений. Осевые цилиндры всюду отграничены от соединительнотканых структур тонкой базальной мембраной, которая переходит на них с близлежащих шванновских клеток. Наши наблюдения за начальными стадиями аксон-шванновских взаимоотношений согласуются с данными Tennison (1970), которая электронно-микроскопически изучала формирование задних корешков и дифференциацию нейробластов чувствительного узла 11—12-дневных эмбрионов кролика. Она установила, что отростки нейробластов, врастающие на этой стадии в нервную трубку, уже находятся в тесной связи с малодифференцированными шванновскими клетками. Аксоны, выходящих за пределы пласта шванновских клеток и не связанных с ними, в культуре ткани мы никогда не наблюдали (исключение составляют лишь дегенерирующие осевые цилиндры, которые иногда встречаются в зоне роста в окружении продуктов распада клеточных элементов). Шванновские клетки всегда опережают рост аксонов, определяют направление их роста в эксплантате и дальнейшую дифференциацию.

По мере роста культуры, особенно пласта шванновских клеток, наблюдается очень интенсивное разрастание отростков нервных клеток. По данным Mossa (1927, 1928—1929), Winkler, Wolf (1966), средняя скорость их роста различна и колеблется в широких пределах — от 23 до 46 мкм/ч. К концу 3—4-й недели многочисленные отростки чувствительных нейронов образуют сложные сплетения. Наиболее густое трехмерное переплетение их наблюдается в центральной зоне эксплантата, где между нервными волокнами находятся нейроны; рыхлое, широкопетлистое сплетение имеется в зоне роста (см. рис. 22, а, б). Все нервное сплетение эксплантата, так же как и нервные клетки, находится внутри пласта шванновских клеток и за его пределы не выходит. В длительно живущих культурах многие осевые цилиндры достигают диаметра 1,5—3 мкм и интенсивно импрегнируются серебром; в их претерминальных и терминальных отделах часто встречаются варикозные расширения. Сложный ход отдельных толстых аксонов удается проследить на всем их протяже-





Рис. 29. «Микрокультура» из 7 нейронов тригеминального ганглия (25 дней культивирования). Импрегнация серебром по Бишьшовскому — Грос.  $\times 200$ .

нии, начиная от тела нейрона, вплоть до концевых разветвлений (рис. 29). Длина некоторых первых волокон достигает 10—17 мм. Дихотомическое деление отростков может происходить как в непосредственной близости от ганглиозной клетки, так и на значительном расстоянии от нее (см. рис. 25, а; 29). Каждая из ветвей, направляясь то в зону роста эксплантата, то возвращаясь в центр его, образует петли; при этом тонкие первые волокна неоднократно делятся и посылают в разные стороны тонкие коллатерали, заканчивающиеся в виде колбообразных утолщений и колечек.

#### 2.2.4. Конусы роста

Растущие отростки нейронов часто заканчиваются шаровидными или грушевидными утолщениями, реже копьевидными образованиями и цилиндрами, представляющими, как известно, конусы роста регенерирующих первых

волокон (Sajal, 1909). Многочисленные конусы роста можно наблюдать на концах растущих отростков нервных клеток и в культуре ткани. Структура этих окончаний в культуре отличается от выростов терминальных отделов цитоплазматических отростков шванновских и соединительнотканых клеток и электроивно выявляется только нейрористологическими методиками (рис. 30). При импрегнации серебром колбы, или конусы, роста обнаружены в культуре ткани ЦНС многими авторами (Л. М. Григорьев, 1931; Т. Лазаренко, 1931; Wolf, 1964; Kim, 1965; Guillery, Sobkowicz e. a., 1968), а в чувствительных ганглиях — Mossa (1928—1929), Lumsden (1951, 1968), Lindner и Grosse (1970). Тем не менее морфология их остается недостаточно изученной.

Колбы роста наблюдаются на концах регенерирующих и новообразующихся отростков нервных клеток уже через 24 ч культивирования и в дальнейшем на всем протяжении жизнедеятельности эксплантата тригеминального ганглия, причем те и другие имеют одинаковый вид и структуру. На 2—4-е сутки они имеют еще небольшие размеры (от 0,5 до 1 мкм), представляют круглые или слегка вытянутые вздутия на концах очень тонких отростков чувствительных нейронов и находятся в зоне роста в окружении мигрирующих шванновских клеток. К 6—9-му дню эксплантации их количество значительно увеличивается и они обнаруживаются как в центре эксплантированного узла, так и в зоне роста. В этот период колбы роста имеют различные размеры (от 1 до 7 мкм), но неизменно сохраняют грушевидную или округлую форму (рис. 30, а, б). Для конусов роста также характерно, что они, как и образующий их осевой цилиндр, интенсивно импрегнируются серебром. Наибольшей аргентофилией обладает центральная часть колбы вместе с образующим волокном и меньше периферическая зона ее (см. рис. 30, а). Уже при исследовании в световом микроскопе наблюдается значительное сходство структуры колбы роста с цитоплазмой перикариона нейрона. При суправитальном окрашивании метиленовым синим в больших колбах видна как мелкая, так и крупная зернистость, а при импрегнации серебром наряду с зернистостью, особенно по периферии, хорошо различимы также и нейрофибриллы. Как видно на рис. 30, а, последние плотно расположены в центре колбы и более рыхло — на ее периферии.





a



b



Рис. 30. «Конусы», или «колбы», роста вновь образующихся (а) и регенерирующих (б) нервных волокон и концевой аппарат соединительной клетки (в). Импрегнация серебром по Бильшовскому — Грос.  $\times 900$  (а);  $\times 1250$  (б);  $\times 580$  (в).

На препаратах, импрегнированных по Бильшовскому—Грос, в культуре тригеминального ганглия можно проследить динамику формирования колб или конусов роста нервного волокна (рис. 31). Иногда видно, что от ганглиозной клетки отходит короткий отросток, на конце которого расположено большое аксоплазматическое образование шаровидной формы (рис. 31, а). Структура последнего напоминает структуру перикариона нейрона, так как при серебрении в нем отчетливо выявляется густая сеть нейрофибрилл. По мере роста аксона колбы оказываются на значительном расстоянии от тела клетки и имеют меньшие размеры (рис. 31, б). Образование колб роста представляет закономерное явление в развитии нервного волокна. Нередко из сформированной колбы вырастают новые (от 1 до 3) тонкие длинные веточки (рис. 31, в), которые, как правило, очень слабо импрегнируются серебром; следуя в различных направлениях, они, в свою очередь, образуют терминальные колбовидные об-







Рис. 31. Колбы роста на концах отростков нервных клеток в эксплантате чувствительного узла.

а — шаровидное утолщение на конце короткого отростка нервной клетки с отчетливо выраженными нейрофибриллами по периферии; б, в — новообразующиеся выросты из колб роста. Импрегнация серебром по Бильшовскому — Грос.  $\times 2000$  (а);  $\times 700$  (б, в).

разования, но значительно меньших размеров. Некоторые такие отростки заканчиваются специализированными окончаниями — колечками и петельками, которые прилежат к окружающим их шванновским клеткам.

Светооптические данные о конусах роста согласуются с нашими электронно-микроскопическими наблюдениями: они представляют массивные колбообразные утолщения, достигающие в ширину от 1 до 5 мкм и в длину от 3 до 13 мкм; от темных профилей осевых цилиндров и отростков шванновских клеток они отличаются более светлым характером цитоплазмы и ультраструктурой (рис. 32, а). Внутри них содержатся узкие канальцы и цистерны агранулярного эндоплазматического ретикулума, которые в поперечном сечении имеют вид пузырьков и вакуолей; редкая нежная сеть нейрофиламентов, более или менее равномерно заполняющая все пространство колбы, микротрубочки, продолжающиеся из осевого цилиндра, отдельные гетерогенные плотные тельца, а также небольшие



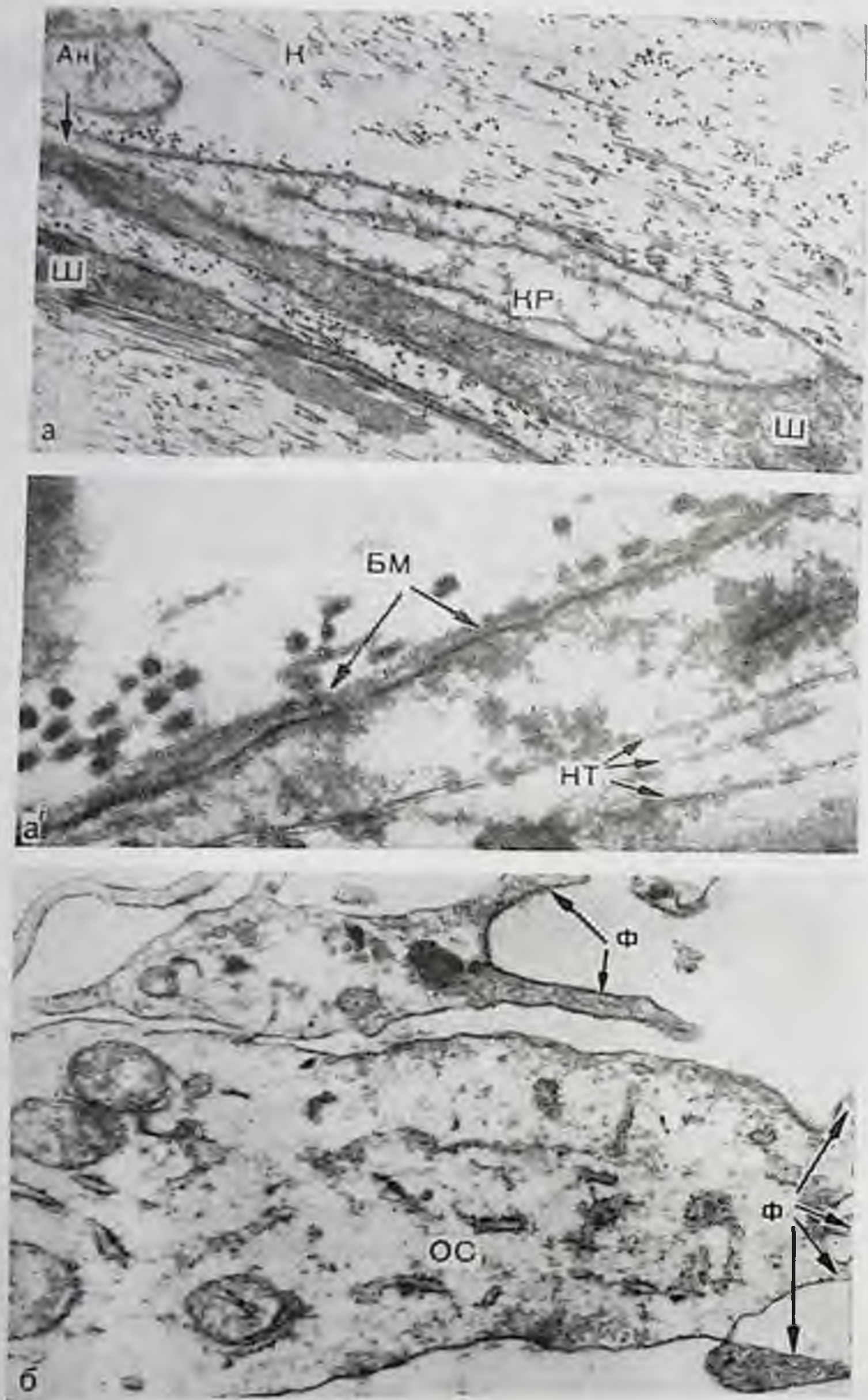


Рис. 32. Колба роста первичного волокна (а, а') и концевые образования отростков соединительнотканых клеток (б) в культуре чувствительного узла.

КР — конус роста первичного волокна; Ан — аксон; Ш — отростки шванновской клетки; НТ — нейротубулы; БМ — базальная мембрана; К — коллагеновые волокна; ОС — отросток соединительнотканной клетки; Ф — филоподии. Электронная микрофотография.  $\times 20\ 000$  (а, б); фрагмент а ( $\times 70\ 000$ ).

группы свободных рибосом: последние чаще встречаются в колбах крупного размера. Под цитоплазматической мембраной колбы виден электронноплотный филаментозный материал в виде узкого ободка. Колбы или конусы роста, как и сами аксоны, находятся в тесных отношениях со шванновскими клетками и часто окружены полностью или только частично их цитоплазмой; при этом базальная мембрана последних продолжается непосредственно на колбы роста (см. фрагмент рис. 32, а).

Эти характерные особенности позволяют различать конусы роста в культуре тригеминального узла от концевых структур, образованных отростками соединительнотканых клеток эндо- и периневрия; последние часто находятся в большом количестве в наружной части зоны роста эксплантата. В отличие от отростков нейронов тонкие длинные цитоплазматические отростки соединительнотканых клеток заполнены большим количеством микрофиламентов, от которых зависит их большая электронная плотность (рис. 32, б). Эти отростки заканчиваются на концах утолщениями, от которых отходят многочисленные длинные и короткие выросты — филоподии, состоящие только из филаментозного материала; другие органеллы в филоподиях отсутствуют. В утолщенной части находятся гранулярный эндоплазматический ретикулум, отдельные канальцы гладкого ретикулума и митохондрии. Концевые образования соединительнотканых клеток в отличие от конусов роста нервных волокон чаще всего располагаются свободно в тканевой жидкости или среди коллагеновых волокон, и вокруг них отсутствует базальная мембрана.

Результаты наших субмикроскопических исследований подтверждают имеющиеся в литературе наблюдения других авторов (Bodian, 1968; Del Cerro, Snider, 1968; Tenyson, 1970), изучавших тонкую структуру конусов роста в различных отделах ЦНС и ПНС у эмбрионов обезьяны, крысы, кролика и в развивающемся седалищном нерве новорожденных крыс (Webster e. a., 1973), но расходятся с данными Yamada, Spooner, Wessells (1971). Эти авторы, по нашему мнению, принимают в эксплантатах чувствительного узла крысы за конусы роста «аксонов» концевые образования отростков соединительнотканых или шванновских клеток, которые действительно иногда напоминают колбы роста, снабженные на периферии пальцевидными выростами.



Таким образом, для растущих аксонов нервных клеток в культуре ткани характерно наличие на концах конусов, или колб, роста, образование которых представляет закономерное явление в развитии нервного волокна: конусы роста дают начало новым тонким веточкам, которые, удлиняясь и разветвляясь, заканчиваются, в свою очередь, более мелкими конусами роста. Этот процесс завершается формированием нервных окончаний. Как светооптически, так и ультраструктурно конусы роста нервных волокон отличаются от концевых образований шванновских и соединительнотканых клеток и избирательно выявляются только с помощью импрегнации серебром и суправитальной окраски метиленовым синим.

### 2.2.5. Рост шванновских клеток в культуре ткани

Наши исследования и данные литературы (Lumsden, 1951, 1968; Muggay, 1965, 1971; Bunge e. a., 1965, 1967; Winkler, Wolf, 1966) о взаимоотношениях отростков чувствительных нейронов со шванновскими клетками в культуре показали тесную и неразрывную связь между ними с самого начала роста регенерирующих аксонов вплоть до образования миелиновой оболочки.

Шванновские клетки, как уже отмечалось выше, обладают *in vitro* очень бурным ростом и уже в первые часы, почти одновременно с фибробластоподобными элементами, выселяются в зону роста. С помощью цейтраферной киносъемки можно наблюдать, что наряду с интенсивной пролиферативной активностью для них характерно быстрое передвижение посредством длинных цитоплазматических выростов и пальцевидных псевдоподий. Эти клетки обладают большим разнообразием формы тела, которая в значительной степени определяется их функциональным состоянием и местом нахождения в эксплантате. Выселяющиеся в радиальном направлении из ганглия в первые дни культивирования шванновские клетки имеют веретенообразную форму и снабжены длинными и короткими отростками (Cravioto, Lockwood, 1968).

В зоне роста, где нервные волокна формируют густое сплетение, шванновские клетки образуют трехмерную анастомозирующую сеть; они имеют треугольную, звездчатую или неправильную форму, что зависит от разветвлений нервных волокон. Располагающиеся вдоль пучков осевых цилиндров шванновские клетки имеют веретено-

образую форму, а аксоны, находящиеся в тесной связи с их цитоплазмой, следуют от одной клетки к другой по их анастомозирующим цитоплазматическим отросткам. В местах деления тонких нервных пучков шванновские клетки приобретают треугольную форму, и в каждом их отростке проходит один или несколько осевых цилиндров. При импрегнации серебром в зоне роста часто удается видеть одновременно как осевые цилиндры, так и сопровождающие их шванновские клетки (рис. 33). Цитоплазма последних хорошо импрегнируется серебром, и в ней различается аргентофильная зернистость и интенсивно импрегнирующееся темное крупное ядро овальной формы. Как видно на рис. 33, а, осевые цилиндры не выходят за пределы тяжа шванновских клеток.

Описанные картины на импрегнированных серебром препаратах культур обнаруживаются главным образом в периферической части зоны роста, где шванновские клетки находятся в активном состоянии, продолжая мигрировать и пролиферировать. В этой области с помощью прижизненного наблюдения — цейтраферной кино съемкой — можно установить наибольшую подвижность и интенсивный рост шванновских клеток. В остальной части культуры, где образовалось густое нервное сплетение, видны только ядра шванновских клеток (рис. 33, б); цитоплазму последних, как и *in vivo*, нейрогистологическими методиками выявить не удастся. Это, по-видимому, связано с тем, что процесс формирования нервных волокон уже заканчивается, вследствие чего подвижность шванновских клеток почти полностью прекращается, а их цитоплазма становится бедной органеллами.

Кроме шванновских клеток, непосредственно контактирующих с осевыми цилиндрами и принимающих участие в формировании нервного сплетения, в культуре находится также большое количество «свободных», не связанных с отростками нервных клеток, малодифференцированных шванновских элементов. Они имеют резко удлиненную веретенообразную форму, палочковидное ядро и хорошо выявляются общегистологическими и нейрогистологическими методиками: на ранних стадиях культивирования они растут в виде пласта. Эти малодифференцированные клетки в процессе культивирования и образования нервных волокон превращаются в дифференцированные шванновские клетки. Об этом свидетельствует тот факт, что по мере удлинения сроков культиви-







рования наряду с увеличением числа нервных волокон количество свободных шванновских клеток заметно уменьшается.

Для шванновских клеток в культуре характерен ряд ультраструктурных особенностей, которые позволяют дифференцировать их от остальных клеток эксплантата. На субмикроскопических срезах, так же как при световой микроскопии, они чаще всего встречаются в виде компактных скоплений, тяжей и реже поодиночке. Тела и отростки шванновских клеток в таких тяжах плотно прилегают друг к другу, и расстояние между их цитоплазматическими мембранами во многих участках составляет всего лишь 20—30 нм (рис. 34, а, б). По сравнению с эндоневральными фибробластами и покровными клетками они имеют светлую цитоплазму и овальное или вытянутой формы ядро с узким ободком ядерного хроматина по периферии. Светлый вид цитоплазмы недифференцированных шванновских клеток обусловлен тем, что она содержит более выраженную сеть гладкого эндоплазматического ретикулума и менее выраженную — гранулярного эндоплазматического ретикулума, а также рыхло расположенные микрофиламенты. Немногочисленные митохондрии этих клеток имеют плотный матрикс и слабо развитые, в виде овальных пузырьков, кристы (см. рис. 28), что характерно для дифференцирующихся клеток. В отростках шванновских клеток видны различной формы цистерны гладкого эндоплазматического ретикулума, свободные рибосомы и расположенные параллельно друг другу микротрубочки и филаменты диаметром 7—10 нм (см. рис. 34, в). Наиболее важным отличительным признаком шванновских клеток от других клеточных типов является наличие вокруг их тел и отростков базальной мембраны толщиной 15—40 нм, которая состоит из средней электронной плотности гомогенного материала, прилежащего непосредственно к цитоплазматической мембране.



Рис. 33. Опережающий рост шванновских клеток в процессе формирования нервного волокна.

а — сеть анастомозирующих шванновских клеток и находящееся с ней в тесной связи сплетение нервных волокон.  $\times 2000$ ; б — участок длительно живущей культуры тригеминального ганглия (31-й день культивирования). В центре эксплантата видно густое нервное сплетение, а на периферии наблюдается активная пролиферация шванновских клеток и продолжается рост отростков нервных клеток. Импрегнация серебром по Бильшовскому — Грос.  $\times 70$ .



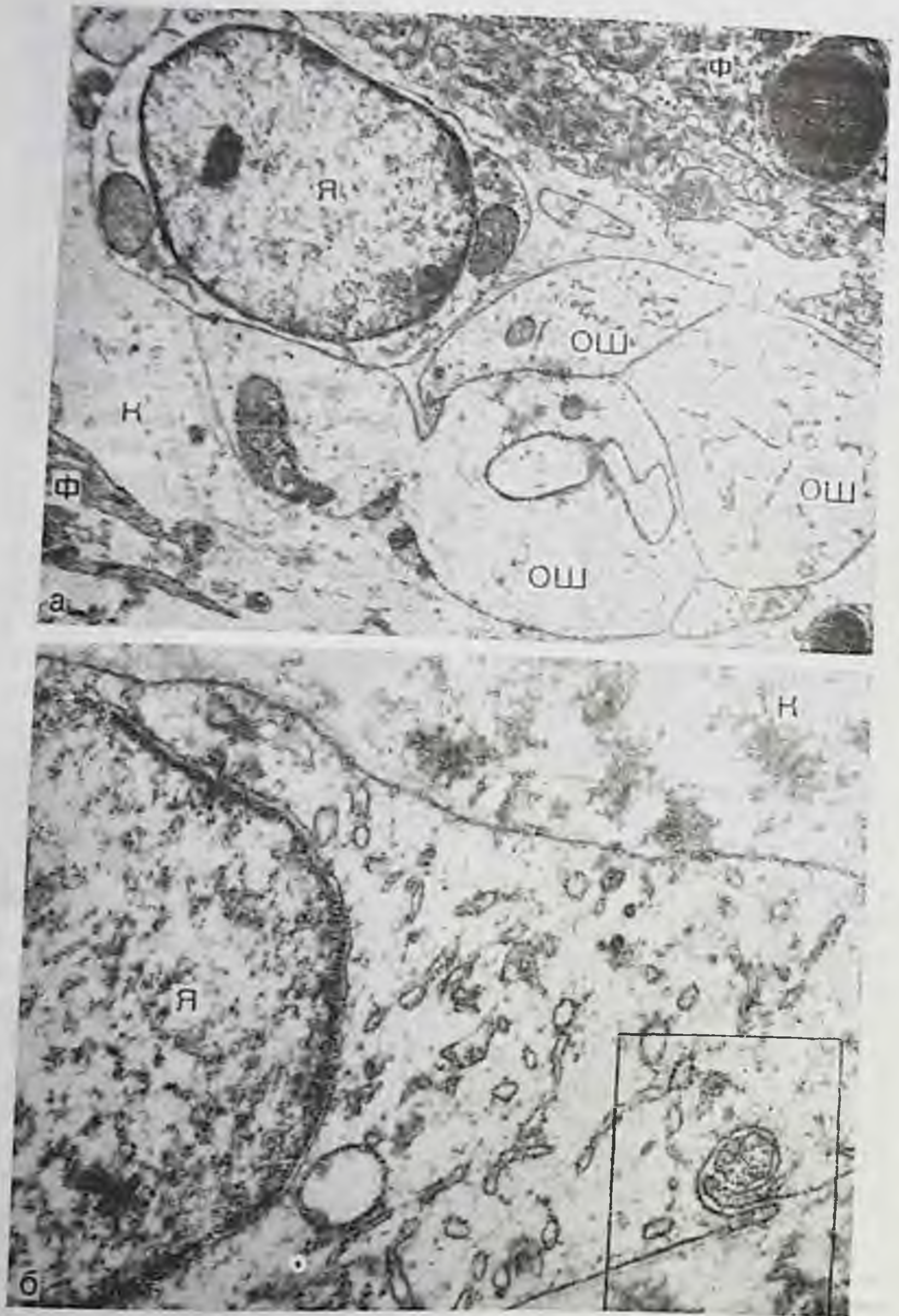
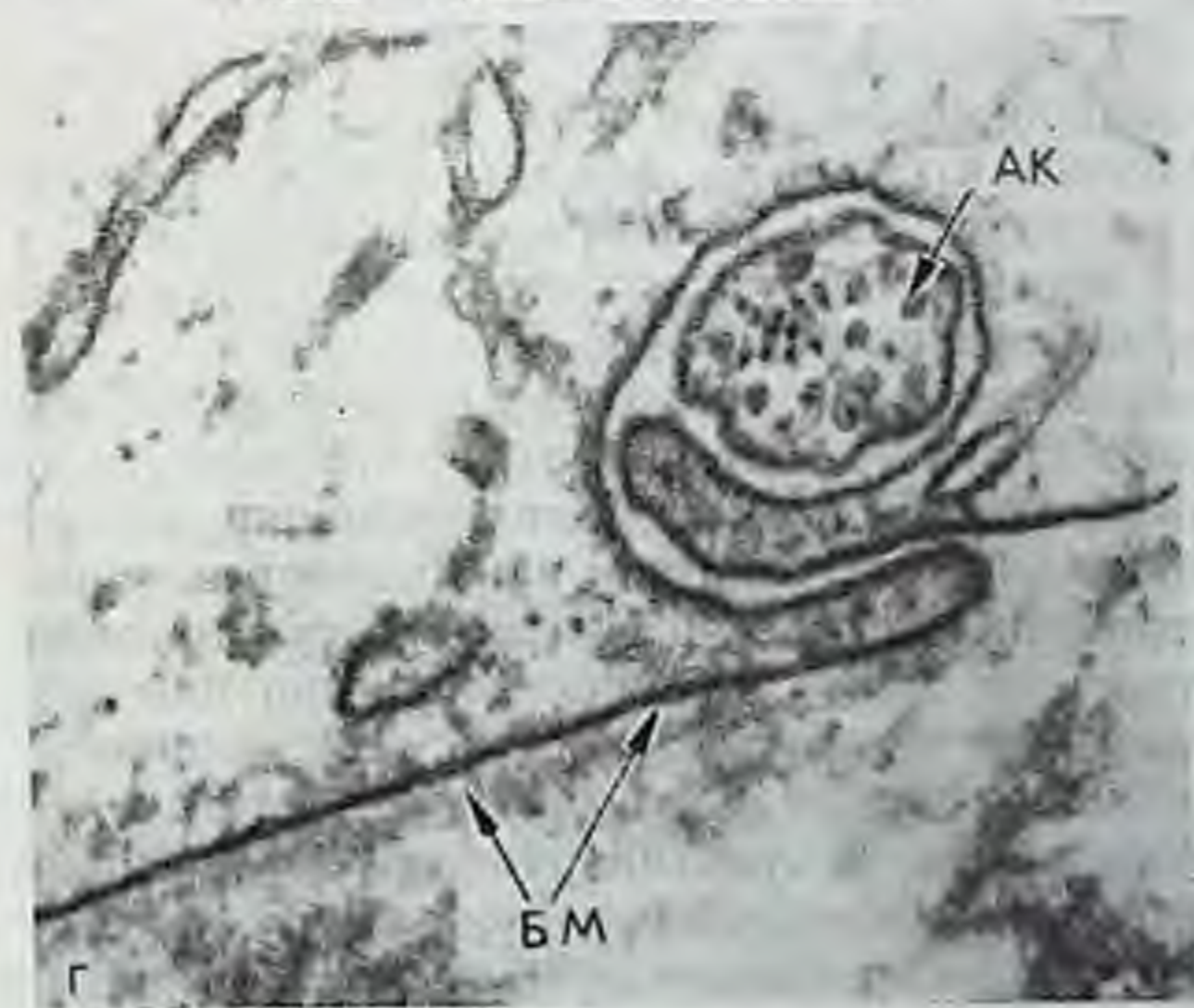


Рис. 34. Ультраструктурное строение шванновских клеток культуры чувствительного узла.

а — поперечный срез через тяж шванновских клеток  $\times 10\ 000$ ; б — одиночная шванновская клетка с инвагинирующим в ее тело аксоном,  $\times 13\ 000$ ; в — отросток шванновской клетки,  $\times 15\ 000$ ; г — фрагмент,  $\times 50\ 000$ . Я — ядро шванновской клетки; ОШ — отростки шванновских клеток; БМ — базальная мембрана; ГФ — глиофиламенты; МТ — микротрубочки; АК — аксон; Ф — фибробласты; К — коллаген. Электронная микрофотография.







Базальная мембрана продолжается и на осевые цилиндры, находящиеся в тесных отношениях с шванновскими клетками (см. рис. 28), а также окружает тяжи этих клеток вместе с аксонами снаружи, отграничивая их тем самым от соединительной ткани. Учитывая, что растущие осевые цилиндры находятся в тесной связи только с шванновскими клетками и окружены частично или полностью их базальной мембраной, можно предположить, что они обладают определенным тропизмом по отношению к этим клеткам.

Согласно данным Nakai (1960), Nakajima (1965), Lumsden (1968), Weiss (1967) и Giroud (1968), главенствующая роль в образовании нервных пучков принадлежит осевым цилиндрам и обусловлена их хемотаксисом по отношению друг к другу. Однако, по нашему мнению, существенную роль в этом процессе играют шванновские клетки, которые, по-видимому, являются направляющими элементами для аксонов. В условиях длительного культивирования, даже после образования густого нервного сплетения, рост осевых цилиндров не заканчивается, так как продолжается пролиферация шванновских клеток. Этот процесс, как уже указывалось выше, может развиваться неравномерно. Как только из общего пласта шванновских клеток, в котором уже образовалось первое сплетение, выселяются новые клетки, образующие тонкие и толстые тяжи, в них сразу же устремляются из сплетения многочисленные осевые цилиндры (рис. 35). Учитывая, что в цитоплазме одной шванновской клетки при электронной микроскопии обнаруживается до 10—15 тонких аксонов, то в одном сравнительно тонком тяже, состоящем из группы шванновских клеток, проходит до 40—50 компактно расположенных аксонов, которые и формируют нервный пучок.

В концевых отделах нервных пучков волокна нередко образуют структуры в виде клубков с многочисленными колбами роста. Эти образования тесно окружены скоплениями шванновских клеток и напоминают невромы.

К периферической глии в культуре чувствительных узлов относятся также капсульные клетки или сателлиты нейронов. Они тесно прилежат к телам нервных клеток, причем их цитоплазма со всех сторон окружает перикарион этих клеток. В культивируемом ганглии вокруг нейронов располагается лишь небольшое число (от 1 до 3) сателлитов, в то время как *in vivo* этих клеток значитель-



Рис. 35. Пучки нервных волокон в 17-дневной культуре тригеминального узла. Импрегнация серебром по Бильшовскому — Грос.  $\times 100$ .

но больше (от 5 до 10); в целом капсула бывает развита слабо, даже на поздних сроках культивирования чувствительных узлов.

#### 2.2.6. О миелинизации нервных волокон чувствительного узла

В длительно живущих культурах чувствительных ганглиев шванновские клетки принимают активное участие в процессе образования вокруг осевых цилиндров миелиновой оболочки. В хорошо растущих культурах миелинизация нервных волокон начинается на 12—14-й день.

Миелинизация аксонов в культуре чувствительного узла происходит в проксимальной части зоны роста и в центре эксплантата во время образования значительного числа пучков нервных волокон. Миелиновые оболочки хорошо выявляются как с помощью гистохимических методов по Беккеру или суданом черным в модификации Миггау (1965), так и при поляризационной микроскопии.







Рис. 36. Миелинизированные нервные волокна в культуре тригеминального ганглия.

а — 24 дня после эксплантации; окраска суданом черным в модификации Муррей.  $\times 400$ ; б — пучки мякотных и безмякотных волокон в 30-дневной культуре тригеминального ганглия.  $\times 400$ ; в — одиночное мякотное нервное волокно вблизи пучка тонких безмякотных волокон.  $\times 1800$ . Импрегнация серебром по Бильшовскому — Грос.

Последний метод дает возможность изучать миелиновые оболочки в живом состоянии благодаря двойному лучепреломлению миелина в поляризованном свете; при этом миелиновые оболочки отчетливо выступают на темном фоне в виде ярких двухконтурных линий. На ранних стадиях миелинизации при окраске по Беккеру и суданом черным они представляют тонкие (1,7—2,5 мкм), длинные, окрашивающиеся в синий цвет с ровными контурами трубочки, на которых лишь кое-где различаются вздутия (рис. 35, а). Такой же вид они имеют на самых ранних стадиях миелинизации волокон *in vivo*.

Первоначально в пучках нервных волокон миелинизация наблюдается только в отдельных из них. В течение 3—4-й недели в этот процесс постепенно вовлекается все большее и большее количество нервных волокон. К концу 1-го месяца в эксплантате миелинизация нервных волокон приобретает массовый характер (Г. В. Коновалов, О. А. Родштейн, 1972; Б. Я. Вильнер с соавт., 1973; Peterson, Murray, 1955, 1965; Peterson e. a., 1958; Murray, 1964; Winkler, 1965).



Сначала миелинизация происходит сегментарно в пределах одной шванновской клетки, а затем этот процесс распространяется на соседние интернодальные сегменты нервного волокна. Непосредственно перед миелинизацией среди массы тонких осевых цилиндров начинают выделяться отдельные толстые, хорошо импрегнирующиеся серебром аксоны. Они отличаются от других аксонов тем, что вскоре каждый из них включается в отдельный футляр, образованный цепочкой шванновских клеток (рис. 36, в). Такую стадию формирования мягкотного волокна Lumsden и Bradbury в 1970 г. назвали «сталней предмиелинизации». Морфологические различия между этими и безмякотными (ремаковскими) волокнами хорошо видны на препаратах, импрегнированных серебром (рис. 36, б, в). Шванновские клетки миелинизирующегося волокна приобретают своеобразную сигарообразную форму, сильно увеличиваются в размерах и располагаются цепочкой: в местах их контакта образуются перехваты Ранвье, и длина каждого сегмента составляет 120—200 мкм (см. рис. 36, в). На 30-й день роста культуры у части миелинизированных волокон появляются шмидт-лантермановские насечки. Хотя в длительно живущих культурах происходит миелинизация многочисленных нервных волокон, но толщина их миелиновых оболочек меньше, чем *in vivo*.

Как видно из изложенного выше, шванновские клетки в культуре обладают характерными особенностями: наряду с высокой пролиферативной активностью и способностью к энергичному росту и миграции эти клетки, анастомозируя друг с другом, участвуют в образовании безмякотных и мягкотных нервных волокон, нервных пучков, а также формируют в зоне роста пласт, в который заключено густое нервное сплетение эксплантата.

### 2.2.7. О нервных окончаниях в культуре чувствительного узла

Начиная с 6—7-го дня эксплантации, когда в культуре тригеминального ганглия уже имеется значительное число зрелых нейронов и их ветвящиеся отростки образуют в центре и в зоне роста густое нервное сплетение, заключенное в пласт шванновских клеток, появляются многочисленные концевые нервные структуры, имеющие вид колечек и петелек. Образование этих окончаний *in vitro*

предшествует миелинизации нервных волокон. Количество концевых структур в культуре резко увеличивается, начиная со 2-й недели, и в дальнейшем продолжает нарастать по мере длительности существования эксплантата. По своему строению они сходны с хорошо изученными аналогичными чувствительными и синаптическими окончаниями взрослых животных (А. С. Догель, 1908; Б. И. Лаврентьев, 1948; Ю. М. Жаботинский, 1953; Н. Г. Колосов, 1954, 1968; В. В. Куприянов, 1959; В. Н. Майоров, 1969, и др.). В культурах ткани чувствительных узлов они описаны Lumsden (1951), Grosse, Lindner (1968), Lindner, Grosse (1970), С. Н. Оленевым (1971), Е. И. Чумасовым и Г. В. Коноваловым (1974). Колечки и петельки в длительно живущих культурах чувствительного узла имеют различные размеры (от 0,5 до 2,5 мкм); особенно большое их количество наблюдается в центре и в зоне роста эксплантата, т. е. в тех участках, где находятся многочисленные нервные волокна, образующие густые нервные сплетения. Эти структуры отличаются от конусов, или колб, роста, и в них при импрегнации серебром можно различить три составных компонента: аргентофильное колечко, или интенсивно импрегнирующийся нейрофибрилярный остов, светлую зону перифибриллярного вещества, расположенную по периферии колечка, и, наконец, очень тонкое претерминальное волоконце (рис. 37, а). Последнее в отличие от приводящего волокна колбы роста сравнительно слабо импрегнируется серебром и нередко вообще не выявляется. Поэтому колечки часто видны среди окружающих нервных элементов без приводящего волоконца. Обилие таких концевых структур как в центре эксплантата, так и в зоне роста свидетельствует о том, что они образуются *de novo*.

Несмотря на морфологическое сходство концевых структур в культуре ткани, среди них можно выделить два основных типа нервных окончаний. Первые имеют вид древовидных разветвлений на концах толстых отростков псевдоуниполярных нейронов, которые следуют из центра эксплантата в зону роста. Тончайшие веточки их многократно ветвятся и заканчиваются мелкими колечками, петельками и пуговчатыми утолщениями. Претерминальные и терминальные ветвления таких нервных волокон часто распространяются на большой площади в зоне роста и располагаются у поверхности и внутри пласта шванновских клеток. При больших иммерсионных увеличениях





Рис. 37. Нервные окончания в виде колечек и петелек, заканчивающиеся среди клеток пласта периферической глии в зоне роста эксплантата.

а, б — простые концевые аппараты.  $\times 2000$ ; в — сложные концевые аппараты.  $\times 300$ . Импрегнация серебром по Бильшовскому — Грос.

микроскопа на докрашенных гематоксилином или кармином препаратах видно, что концевые структуры этих древовидных разветвлений непосредственно прилежат к телам и отросткам «свободных» шванновских клеток (рис. 37, а—в). В тех местах, где древообразные разветвления нескольких нервных волокон перекрывают друг друга, в одном поле зрения можно наблюдать многочисленные колечки и петельки, иногда до двух десятков.

Кроме нервных окончаний в виде древовидных разветвлений, в зоне роста эксплантата чувствительного узла иногда видны более сложные концевые аппараты, имеющие вид компактных кустиков. Их короткие и тонкие разветвления образованы несколькими (двумя-тремя) нервными волокнами (рис. 37, в) и находятся в окружении большого числа плотно расположенных «свободных» шванновских клеток. Последние имеют небольших размеров круглые овальные ядра, и их цитоплазма не выявляется обычными гистологическими методами. Эти клетки отличаются от окружающих соединительнотканых элементов с крупными плоскими ядрами и зернистой цитоплазмой. По своему морфологическому строению описанные концевые аппараты — диффузные древовидные разветвления и компактные кустики — напоминают рецепторы несвободного типа, которые, как известно, имеются во многих органах и тканях у животных и человека. Клетки, находящиеся в тесной связи с их терминальными отделами, очень сходны со «специальными или обкладочными» клетками рецепторных окончаний, которые, по мнению многих авторов, выполняют трансформаторную функцию, являясь посредниками в передаче раздражения к чувствительному нервному окончанию (Б. И. Лаврентьев, 1946, 1948; В. В. Португалов, 1955; Б. А. Долго-Сабуров, 1958; В. В. Куприянов, 1959; С. П. Семенов, 1965, и др.). Нервные окончания на фибробластоподобных или соединительнотканых клетках нами не обнаружены.

Нервные окончания другого типа, также представляющие колечки и петельки различного диаметра (от 1 до 3 мкм), обнаруживаются в большом количестве в центре эксплантата и отчасти в зоне роста. Они, как правило, находятся в тесной связи с отростками и телами нейронов и образованы очень тонкими претерминальными волокнами, начинающимися от более толстых ветвящихся нервных волокон, ход которых иногда трудно просле-





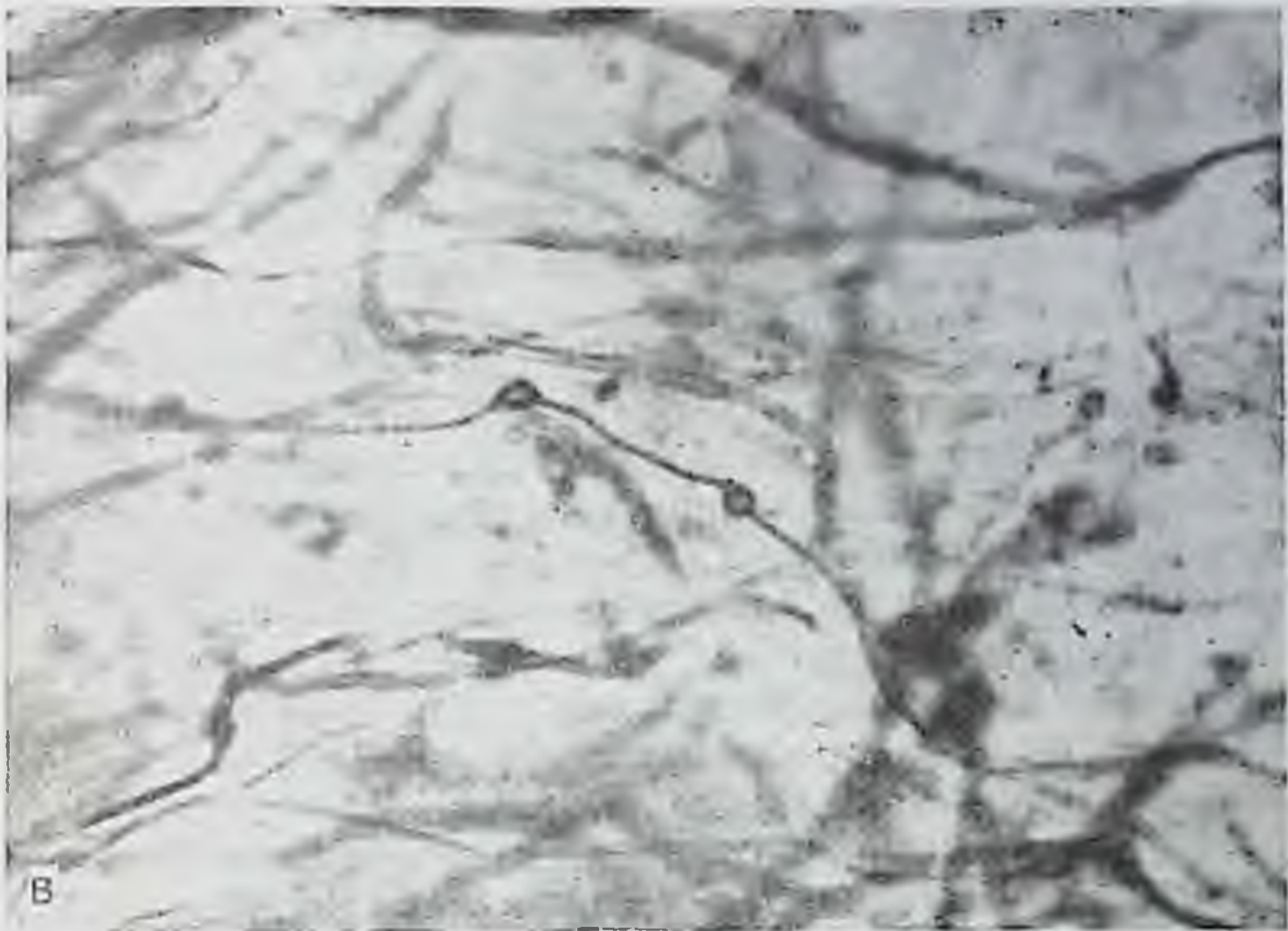


Рис. 38. Нервные окончания в виде колечек, локализующиеся вблизи отростков и тел нервных клеток в центральной зоне эксплантата.

а — нервно окончание, непосредственно прилежащее к нервному волокну.  $\times 2000$ ; б — окончание в виде колечка у аксонного холмика нейрона.  $\times 1600$ ; в — цепочковидные или касательные синапсы в густом сплетении нервных волокон  $\times 2000$ . б — окончание в виде колечка у аксонного холмика нейрона.  $\times 1600$ ; в — шия.

дить на всем протяжении. Эти окончания наблюдаются в густых сплетениях нервных волокон и очень близко прилегают к осевым цилиндрам (рис. 38, а), причем чаще всего к тем участкам последних, где имеются варикозные расширения или утолщения аксоплазмы. Нередко видно, что нейрофибрилярное колечко отделено от осевого цилиндра очень узкой светлой зоной перифибриллярного вещества. В таких же взаимоотношениях находятся обнаруженные нами концевые структуры и с нейронами. Они часто локализируются возле аксонального холмика нервной клетки, реже — непосредственно на ее теле (рис. 38, б). В густых сплетениях нервных волокон в центре эксплантата, помимо терминальных концевых структур, встречаются также «цепочкообразные» нервные окончания, сходные с описанными в литературе касательными синапсами (рис. 38, в). Как видно на рисунке, они представляют мелкие колечки, располагающиеся друг за другом по 2—3



вдоль тонкого претерминального отдела нервного волокна.

Несмотря на сообщения в литературе о наличии нервных окончаний в культуре чувствительных узлов, морфология и функциональная принадлежность их до сих пор мало изучены. Это в значительной степени связано с трудностями исследования этих структур, так как последние не всегда выявляются даже с помощью специальных нейростологических методик (импрегнация серебром и суправитальная окраска метиленовым синим).

Относительно локализации концевых структур в культуре чувствительных ганглиев имеются противоречивые сведения. Согласно наблюдениям одних авторов (Godina, 1958, 1963; Romgat e. a., 1967), окончания отростков чувствительных нейронов располагаются на «эпителиоидных клетках», по мнению же других (Mossa, 1928—1929; Nakai, 1956, 1960; Nakai, Kawasaki, 1959), — на мезенхимных.

Полученные нами результаты не подтверждают эти наблюдения и согласуются с данными Lumsden (1951, 1968), который обнаруживал нервные окончания наиболее часто вблизи шванновских клеток и нервных волокон.

При исследовании культур тригеминального ганглия куриных эмбрионов Lindner и Grosse (1970) обнаружили различные типы концевых структур и произвели их количественную оценку. Эти авторы установили, что на 7-й день культивирования значительно нарастает число «колечкообразных» окончаний в отличие от «колбовидных»; однако в дальнейшем, на 2—3-й неделе, такое увеличение уже не наблюдается. По мнению авторов, прекращение нарастания числа этих структур в культурах указывает на созревание нейронов. По нашим данным, образование нервных окончаний и увеличение их числа продолжаются и после созревания нейронов. Это, по-видимому, связано с тем, что в условиях культуры рост отростков нейронов и активная пролиферация шванновских клеток представляют нерегулируемый процесс, вследствие чего установление аксон-шванновских взаимоотношений продолжается непрерывно в течение всего периода культивирования.

Большой интерес представляет вопрос о функциональной принадлежности нервных окончаний в культуре тригеминального ганглия. Как известно, многие дифференцирующиеся нейроны эксплантата остаются псевдоуниполярными, и их перерезанные центральные и периферические ветви в процессе роста регенерируют. Естественно,

возникает вопрос об их различии. Если функциональные различия между ними (нейрит и дендрит) существуют *in vivo*, то можно предположить существование в таких культурах двух типов окончаний: афферентных и эфферентных. Попытки морфологически различить центральную и периферическую ветви чувствительных нейронов в культуре (Nakai, 1960; Filogamo, Bagasa, 1965; Bagasa e. a., 1971), по нашему мнению, недостаточно убедительны, так как эти исследования производились неадекватными методами — в основном с помощью фазово-контрастной микроскопии.

Электронно-микроскопически, как известно, в целостном организме ультраструктура аксона чувствительного нейрона и его центральной и периферической ветвей одинакова (Peters, Palay, Webster, 1970, и др.).

По нашему мнению, дифференцировать у псевдоуниполярных чувствительных нейронов в культуре ветви отростка на дендрит и нейрит, по-видимому, не представляется возможным, так как они морфологически сходны: обычно имеют одинаковую толщину и многократно ветвятся, принимая участие в формировании нервного сплетения; их претерминальные веточки, истончаясь, заканчиваются в различных участках эксплантата описанными выше специализированными структурами — колечками и петельками (рис. 39). Однако, несмотря на морфологическое сходство последних, в культуре тригеминального ганглия с помощью импрегнационных методов по локализации можно различить два типа нервных окончаний.

1. Древообразные разветвления нервных волокон, заканчивающиеся в виде колечек, прилегающих к телам и отросткам шванновских клеток, по-видимому, представляют в эксплантате чувствительные (афферентные) рецепторные аппараты. Они существенно отличаются от сложных и высокоспециализированных окончаний, которые встречаются в живом организме, и больше напоминают «диффузные разветвления» или древовидные рецепторы.

2. Нервные окончания, находящиеся в тесной связи с отростками и телами чувствительных нейронов, предположительно представляют межнейрональные синаптические окончания, что согласуется с электронно-микроскопическими (Miller e. a., 1970; Lodin e. a., 1973) и электрофизиологическими (Crain, 1971) исследованиями культур чувствительных ганглиев.





Рис. 39. Псевдоуниполярные чувствительные нейроны тригеминального узла в культуре.

а, б — участки дихотомического деления отростков. В месте соприкосновения отростка с телом нейрона видны варикозные расширения (BP). Импрегнация серебром по Бильшовскому — Грос. X640 (а), X500 (б).

Наличие в эксплантате тригемминального ганглия двух типов окончаний говорит в пользу того, что в длительно живущих культурах чувствительных узлов возможно образование простейших рефлекторных дуг.

### 2.2.8. Регенерация и дифференциация периневрия в культуре нервной ткани

Эпителиальный характер роста клеток в культуре нервной ткани известен уже давно, о чем сообщали Л. М. Григорьев (1931), Т. Лазаренко (1931), Н. Г. Хлопина (1940, 1946), Olivo (1927), Karel (1929). Указанные авторы установили, что «эпителиальные» или «индифферентные» мембраны, вырастающие как из центральной, так и из периферической нервной ткани, по своим биологическим и морфологическим свойствам отличаются от культур других видов эпителия; их можно выделить в виде «чистой культуры» и неограниченное время поддерживать в состоянии энергичного роста и пролиферации вне организма. Для них характерен рост в виде непрерывного слоя сильно уплощенных многоугольной формы клеток, внешне очень сходных с эпителиальными. По мнению Н. Г. Хлопина, Л. М. Григорьева и Т. Лазаренко, эти эпителиальные мембраны имеют нейроэктодермальное происхождение.

Спустя несколько десятилетий интерес к этим «эпителиальным» мембранам в культуре нервной ткани вновь привлек внимание исследователей. Guillery, Sobkowicz, Scott (1968) при изучении культур спинного мозга мышных эмбрионов в световом и электронном микроскопе обнаружили более или менее непрерывную, отделяющую нейрональные элементы эксплантата от питательной среды эпителиальную выстилку, которая образуется из глиальных клеток (по предположению авторов, — астроцитов); контакты и ультраструктуру этих клеточных элементов они подробно описали.

Наиболее детальное исследование эпителиев ЦНС в культуре тканей изложено в работах К. И. Пыльдвере (1971, 1973). В этих исследованиях показано, что менингеальной оболочек спинного и головного мозга, а также зрительного нерва растет в виде фибробластоподобных или эпителиоподобных клеток. Последние обладают высокой пролиферативной активностью и в процессе дифференцировки превращаются друг в друга. В длительно жи-

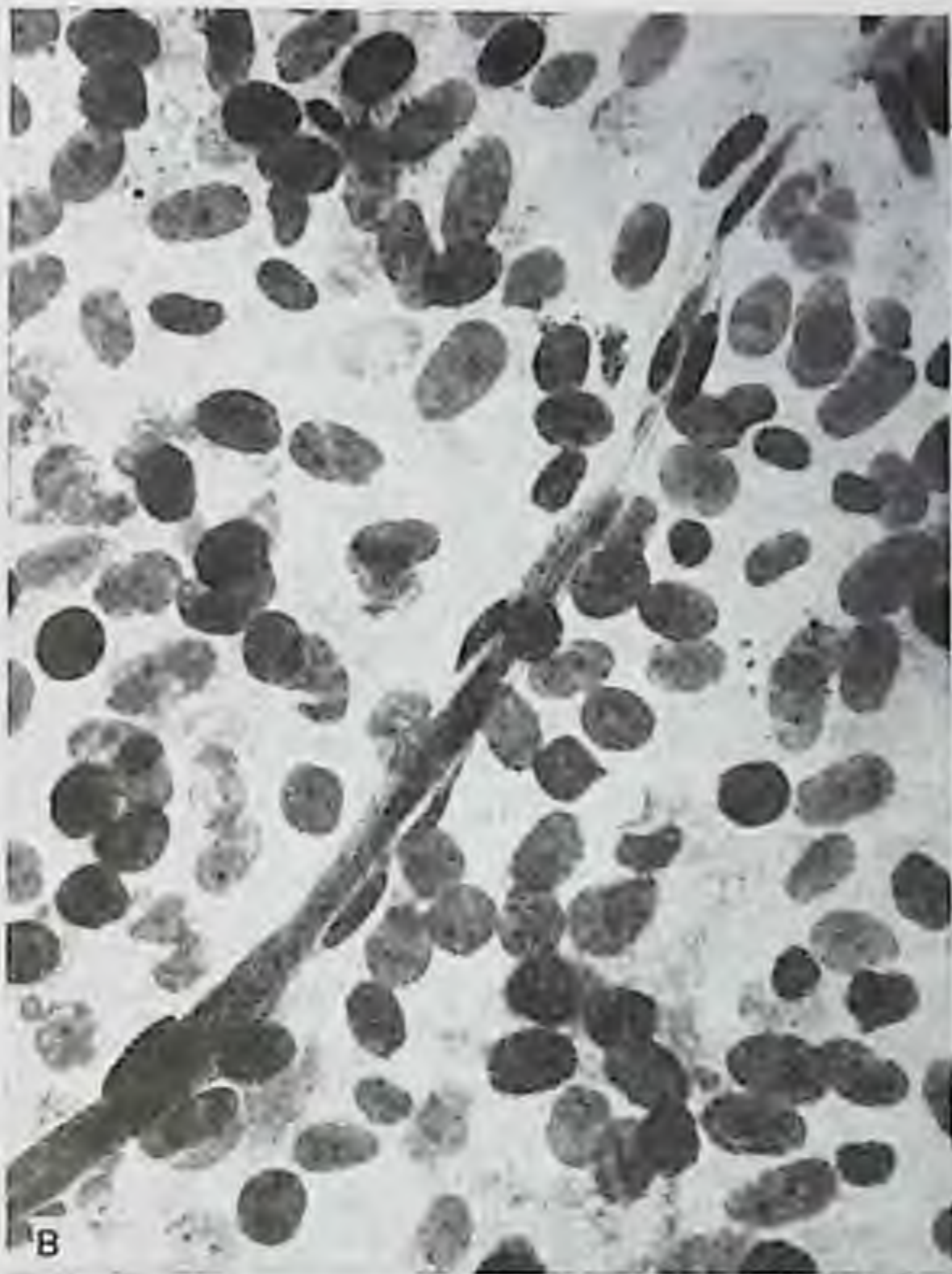




Рис. 40. Периневрий в культуре ткани.

а — миграция фибробластоподобных клеток в зону роста. 24 ч после эксплантации ганглия. Окраска тионином.  $\times 50$ ; б — сформированный пласт покровных клеток эпителиального характера в зоне роста эксплантата (20 дней культивирования). Импрегнация клеточных границ серебром.  $\times 500$ ; в — покровные клетки в 34-дневной культуре тригеминального ганглия. Импрегнация серебром по Бильшовскому — Грос.  $\times 450$ .





вущих культурах в зоне роста они образуют эпителиоморфный пласт. Важно, что особенности роста в культуре клеток мозговых оболочек, а также их способность образовывать соединительнотканые аргирофильные волокна отличает их от эпендимы, глии и эпителия сосудистого сплетения мозга и говорит в пользу эктомезенхимального происхождения менинготелия.

В отличие от культур ЦНС рост эпителиоморфных клеточных компонентов ПНС морфологически мало изучен; имеется лишь несколько работ, посвященных этому вопросу.

Vinpe и соавт. (1967) одними из первых указали, что в длительно культивируемых спинальных ганглиях крысиных эмбрионов как весь эксплантат, так и отдельные большие группы нейронов и нервных стволиков окружены оболочкой из уплощенных клеток, относящихся, по предположению авторов, к периневральным элементам.



Дифференциацию «эпителиоидных» клеток в культуре седалищного и диафрагмального нервов изучала недавно С. А. Бероман (1973). На основании ряда морфологических признаков автор пришла к выводу, что эти клетки соответствуют периневральному эпителию.

В диссоциированных культурах спинальных ганглиев куриных эмбрионов Scott и соавт. (1969) наблюдали формирование на коллагеновом покрытии многослойной выстилки из соединительнотканых элементов, сверху которой располагались нервные клетки.

Проведенные нами исследования фибробластоподобных покровных клеток в культуре чувствительных узлов показали, что они несомненно представляют производное периневрия, который, как уже было отмечено, к моменту эксплантации достаточно хорошо развит и обладает высокой репаративной регенерацией. Его клетки первыми выселяются из эксплантированного ганглия и активно пролиферируют. В зоне роста уже на 2—4-е сутки такие клетки видны в большом количестве (рис. 40, а). Вокруг эксплантированного ганглия они обычно располагаются равномерно, но иногда рост их может происходить преимущественно с какой-нибудь одной стороны. Миграция в зону роста клеток периневральной оболочки ганглия сопровождается их разобщением и дедифференциацией. Обособившиеся элементы приобретают типичный фибробластоподобный вид: их тела имеют веретенообразную, треугольную или звездчатую форму и снабжены короткими и длинными цитоплазматическими отростками. Выселившиеся в зону роста клетки быстро увеличиваются в размерах и уплощаются, отростки их укорачиваются и, так же как тело, распластываются на коллагеновой подстилке. В этот период наблюдается высокая митотическая активность этих клеток. После деления они приобретают вначале фибробластоподобный вид, распластываются, а затем превращаются в эпителиоподобные клетки, которые, вступая в тесный контакт между собой, формируют эпителиоморфный покровный пласт. Последний, как правило, образуется в непосредственной близости от эксплантированного кусочка и к концу первой недели представляет единое целое с периневрием ганглия.

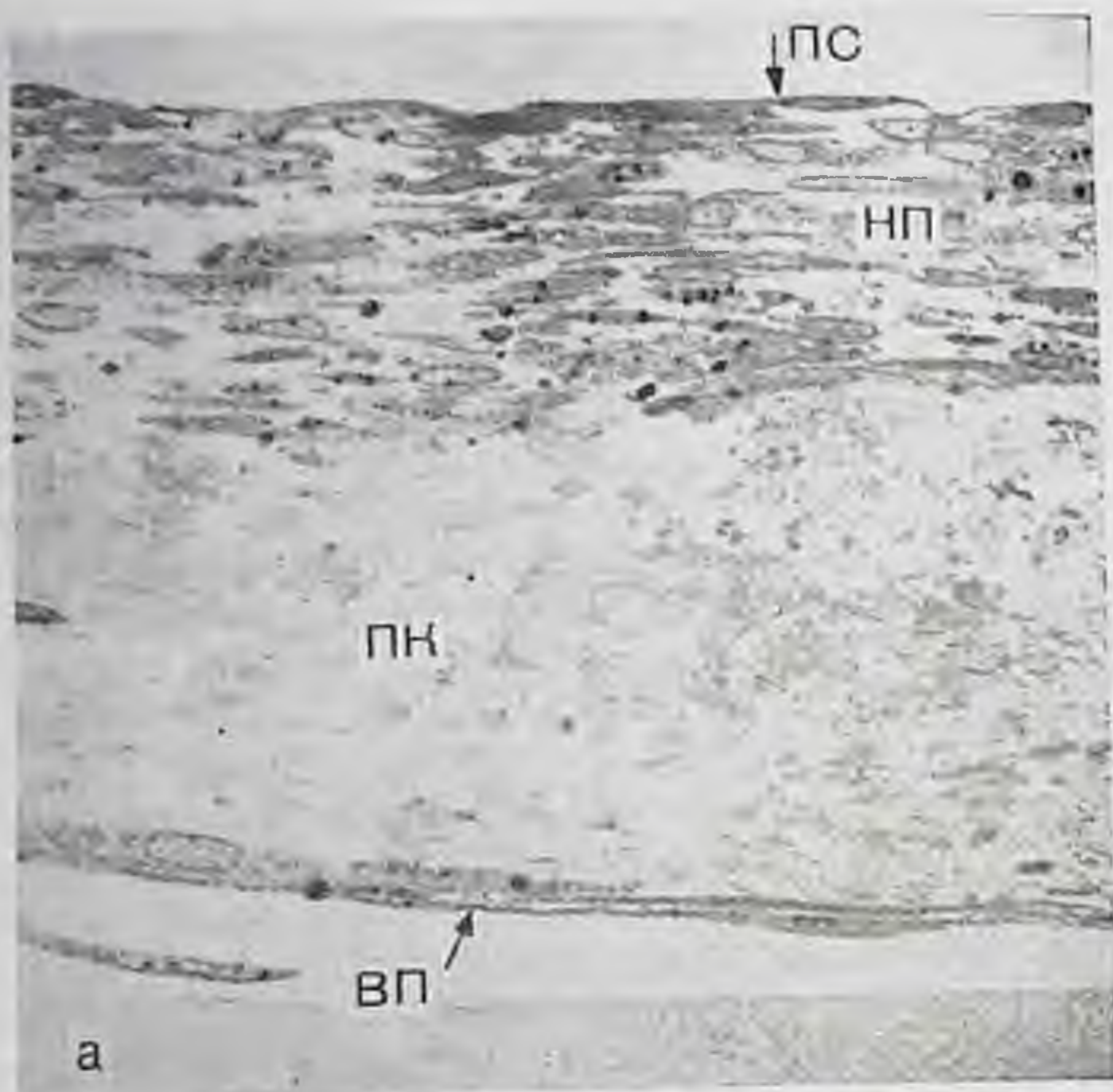
Периневрий в культуре можно легко идентифицировать с помощью метода выявления клеточных границ серебром (рис. 40, б). На таких препаратах видно, что фибробластоподобные или эпителиоидные клетки образу-

ют в эксплантате непрерывный покровный пласт. Клетки его размером от 30 до 100 мкм чаще всего имеют полигональную форму с ровными контурами, однако в некоторых участках эксплантата, например в зоне роста, они могут приобретать сильно вытянутый вид и иметь более или менее извилистые клеточные границы. Цитоплазма этих клеток содержит одно крупное (8—15 мкм) округлое ядро с 1—5, а иногда и большим количеством плотных базофильных ядрышек различных размеров (см. рис. 20). Покровные клетки полностью окружают как с поверхности, так и со стороны стекла все находящиеся в эксплантате нейральные элементы. В некоторых случаях целостность пласта в зоне роста и в центре эксплантата бывает нарушена, и в таких участках образуются пространства — «окна», через которые видны тяжи шванновских клеток и нейроны.

В длительноживущих (20—35 дней) культурах периневрий хорошо развит и, разрастаясь, достигает края покровного стекла. На протяжении всего периода культивирования он характеризуется чрезвычайно активным ростом, но в уже сформировавшемся пласте покровных клеток как в центре, так и в зоне роста эксплантата наблюдаются только отдельные немногочисленные фигуры митоза. От края периневрального пласта в зоне роста обособляются отдельные клеточные группы, которые также довольно плотно связаны между собой и сохраняют вид эпителиоморфных клеток; между ними обычно хорошо видны импрегнирующиеся серебром клеточные границы. При окраске культур азур-эозином, толуидиновым синим или тионином видно, что эти фибробластоподобные клетки (см. рис. 40, а, б) имеют довольно крупные размеры (некоторые из них достигают величины 350 мкм) и снабжены уплощенными отростками, напоминающими «гусиные лапки», которыми связаны между собой. Некоторые отростки имеют значительную длину (до 500 мкм) и по их ходу образуются боковые выросты с расширениями, имеющими сетчатую структуру. В цитоплазме клеток и частично в их отростках даже при малых увеличениях микроскопа отчетливо прослеживается характерная исчерченность в виде прямых тонких нитей; в участках, свободных от этих структур, как правило, по краю цитоплазмы видны мелкая зернистость и вакуоли.

В зоне активной пролиферации фибробластоподобных клеток наряду с митозами часто встречаются клетки, раз-





множающиеся amitотическим путем; нередко у ядер таких клеток видны глубокие перетяжки, а у части их обнаруживается картина почкования карноплазмы. Вероятно, в связи с этим в зоне роста иногда образуется большое число многоядерных клеток.

Цитоплазма и ядро фибробластоподобных клеток хорошо выявляются различными гистологическими методами только в самой периферической части зоны роста; в остальной части ее, а также в центре эксплантата, где они дифференцируются в клетки покровного характера, хорошо окрашиваются только ядра, в то время как их цитоплазма с трудом различима. При импрегнации культур по Бильшовскому — Грос или Холмсу на поверхности эксплантата также видны лишь округлые, плоские ядра этих клеток, расположенные в нескольких слоев, в то время как цитоплазма едва определяется (рис. 40, в). Последняя настолько слабо выражена, что сквозь нее в глубине под клеточным пластом различимы тонкие пучки нервных волокон, заключенные в тяжех шванновских клеток.

Более детальные данные о покровных клетках были получены нами при субмикроскопическом изучении культур чувствительных узлов. На тонких (0,5—1 мкм) поперечных срезах видно, что на поверхности культуры клеточные элементы располагаются в несколько слоев, образуя мощный наружный пласт, в то время как у основания эксплантата, со стороны покровного стекла, они представляют одно- или двуслойную внутреннюю выстилку (рис. 41, а). Промежуток между наружным и внутренним слоями покровных клеток соответствует эндоневрию *in vivo*; он заполнен основным веществом соединительной ткани и многочисленными пучками коллагеновых волокон, окружающих в центре эксплантата нейроны, а в зоне роста — нервные волокна и тяжех шванновских клеток.

В наружном покровном пласте непрерывный эпителиоморфный слой формируют только те клетки, которые ле-

---

Рис. 41. Периневрий в 20-дневной культуре тригеминального ганглия. а — тонкий поперечный срез через эксплантат в зоне роста; НП — массивный наружный пласт покровных клеток; ПС — поверхностный слой эпителиального характера; ВП — внутренний слой покровных клеток, выстилающих эксплантат со стороны покровного стекла; ПК — пучки коллагеновых волокон. Электронная микрофотография.  $\times 400$ ; б — ультраструктура покровных клеток наружного пласта. Электронная микрофотография.  $\times 13\ 000$ .



жат непосредственно на границе с питательной средой. Они сильно уплощены, плотно соединены между собой и имеют характерную электронноплотную цитоплазму с круглым плоским ядром; у части клеток на стороне, обращенной к питательной среде, отходят короткие микроворсинки. Остальные клетки наружного пласта имеют более светлую цитоплазму и ядро, и от слоя к слою, по направлению к эндоневрию, можно наблюдать изменения формы их тела от удлиненной до округлой. Эти клетки располагаются не плотно друг возле друга, и во многих местах между ними видны пучки коллагеновых волокон. По мере удаления от поверхности культуры появляются клетки неправильной формы, снабженные короткими и (или) длинными цитоплазматическими выростами. Перечисленные виды клеток имеют типичную для фибробластов ультраструктуру, которая отличает их от шванновских клеток и нейронов (рис. 41, б). В их цитоплазме видны многочисленные узкие цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума, свободные рибосомы, большое число митохондрий, мелких и крупных пузырьков и вакуолей, а также мелких ламеллярных телец и микрофиламентов; пластинчатый комплекс располагается вокруг ядра и занимает часто большую площадь цитоплазмы. Кроме того, в цитоплазме многих из этих клеток нередко находятся многочисленные жировые включения, лизосомы, аутофагические вакуоли и дигестивные камеры, заполненные детритом, что указывает на их макрофагальную функцию.

Превращение покровных фибробластоподобных клеток в макрофаги наблюдалось нами с помощью цейтраферной киносъемки (Г. В. Коновалов, Е. И. Чумасов, 1972). Подвижные макрофаги часто встречаются на поверхности и внутри эксплантата и принимают участие в уборке продуктов распада гибнущих клеток и нервных волокон. Покровные клетки, по всей вероятности, способны, как и обычные фибробласты, продуцировать в больших количествах коллаген, так как при отсутствии вблизи них каких-либо клеточных элементов они со всех сторон окружены многочисленными пучками коллагеновых фибрилл, диаметр и количество которых увеличиваются с возрастом культуры. Отличительной особенностью покровных клеток и фибробластов от клеток периферической глии (шванновских и сателлитов) является также отсутствие вокруг них «базальной мембраны».

Сравнивая ультраструктуру периневрия, подробно описанную *in vivo* рядом авторов (Е. И. Чумасов, 1975; Röhlich, Кпоор, 1961; Wilson, Silva, 1965; Shantha, Bourne, 1968) с периневрием *in vitro* следует отметить некоторую разницу в его строении. Нам удалось убедиться в том, что периневральные клетки в условиях культуры утрачивают такие специфические особенности, как непрерывность чередующихся с коллагеновыми прослойками эпителиоморфных слоев, наличие большого числа пиноцитозных пузырьков, открывающихся в межклеточные пространства, плотные контакты между соседними клетками одного и того же слоя и, наконец, базальные мембраны, характерные для них *in vivo*. Утрата периневральными клетками в культуре этих специфических особенностей и проявление определенного сходства признаков, характерных для фибробластов, с большей вероятностью указывают на их сродство с мезенхимными производными, чем с глией. Клетки периферической глии в отличие от периневральных постоянно сохраняют присущие им гистотипические и гистогенетические особенности как в организме, так и в культуре.

Учитывая такие морфологические признаки, как ультраструктурное сходство покровных клеток чувствительного узла в культуре с фибробластами, способность превращаться в макрофаги, продуцировать коллаген, отсутствие базальной мембраны, а также сходство роста и дифференцировки этих клеток с менинготелием мозговых оболочек (К. И. Пыльдвере, 1971; С. А. Вероман, 1973), можно предположить их мезенхимную природу.



## Применение культур нервной ткани для изучения демиелинизирующих заболеваний нервной системы

В настоящее время многочисленные работы посвящены исследованию различных заболеваний и патологических процессов нервной системы в культуре нервной ткани. Пионером в этой области был Levaditi (1913), который попытался проанализировать действие вируса полиомиелита на культуру спинного мозга обезьяны.

Культуры нервной ткани были использованы при изучении самых различных заболеваний и патологических процессов — таких, как вирусные инфекции (Pergl e. a., 1972; Dubois—Dalcq e. a., 1972; Raine e. a., 1973a; Santoli e. a., 1975; Wroblewska e. a., 1975), опухоли нервной системы (Л. Я. Яблоновская, 1967; Т. П. Верхоглядова, Ю. С. Бродский, 1969; Liss, 1962; Lumsden, 1968; Cravio-to e. a., 1972; Fornatto, Schiffer, 1972), влияние на нервную ткань различных фармакологических воздействий (С. Н. Оленев, 1964, 1969, 1973; Privat, Drian, 1970; Vernadakis, 1970; Hösli e. a., 1971; Stern, 1972 1973; Roizin e. a., 1974).

В культуре нервной ткани исследовались некоторые стороны патогенеза ряда заболеваний: шизофрении (А. Е. Гошева, В. М. Буравлев, 1972), генетически обусловленных амиелинизаций у мутантных мышей «Jimpy» и «Quoking» (Wolf, Holden, 1969; Hamburgh, Bornstein, 1970). Этот метод служит также для моделирования патоморфологических изменений при таких тяжелых органических заболеваниях нервной системы, как гепатолен-тикулярная дегенерация (Silberger, Schutta, 1967), мета-хроматическая лейкодистрофия (Sourander e. a., 1966; Mossakowski e. a., 1971, 1972). В этих исследованиях экс-плантаты подвергали воздействию различных химически

веществ, которые вызывали изменения, характерные для патоморфологической картины перечисленных заболеваний.

Воздействие физических факторов (особенно ионизирующего облучения) также исследовалось в культуре нервной ткани (Masugovsky e. a., 1967; Tanable, 1969; Deneffe, 1972). В последние годы появились сообщения о действии гипоксии на нервную ткань *in vitro* (Kim, 1971; Krasnicka, Renkawek, 1972; Privat e. a., 1972; Krasnicka e. a., 1974).

Использование культур нервной ткани в самых различных областях биологии и медицины свидетельствует об их огромном научном значении, и интерес к этому столь широко распространенному методу исследования быстро нарастает (Lumsden, 1968; Bornstein, 1973; Nelson, 1975).

Особенно ценно изучение в культуре нервной ткани экспериментальных демиелинизирующих процессов и демиелинизирующих заболеваний человека. Как известно, к демиелинизирующим заболеваниям нервной системы относятся патологические процессы в нервной системе, при которых происходит распад миелиновых оболочек наряду с относительной сохранностью в нервных волокнах осевых цилиндров.

Среди демиелинизирующих заболеваний человека наиболее важны рассеянный склероз, полиневрит типа Гийена—Барре, параличи типа Ландри и некоторые другие. Приблизительной экспериментальной моделью рассеянного склероза считается экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ); однако экспериментальный патологический процесс воспроизводит только некоторые черты широко распространенной болезни человека. Значительно большее сходство существует между синдромом Гийена—Барре и соответствующей ему моделью демиелинизирующего заболевания периферической нервной системы — экспериментальным аллергическим полиневритом (ЭАП).

Изучение экспериментальных демиелинизирующих заболеваний нервной системы проводится уже более 30 лет, и в работах отечественных и зарубежных авторов выяснены многие важные вопросы этих патологических процессов. Так, разработана техника воспроизведения ЭАЭ и ЭАП, выяснены их неврологическая симптоматика и морфологические изменения в нервной системе у различных видов подопытных животных (Ю. М. Жаботин-



ский с соавт., 1963; Г. В. Коновалов с соавт., 1969; В. М. Плесков и Г. В. Коновалов, 1975, Kabat e. a., 1951 и др.).

Bornstein и Appel (1961a), используя длительно растущие культуры мозжечка с миелинизированными нервными волокнами, впервые показали, что сыворотки, полученные от больных ЭАЭ животных, обладают *in vitro* миелинотоксическим (демиелинизирующим) действием, что открыло новые широкие возможности в изучении демиелинизирующих процессов не только в эксперименте, но и у человека. Значение различных этиологических и патогенетических факторов и развития этих экспериментальных заболеваний подробно разобрано в монографии Ю. М. Жаботинского и В. И. Иоффе (1975) на основании комплексных экспериментально-морфологических и иммунологических исследований с использованием также метода культуры нервной ткани.

### 3.1. Факторы миелинотоксического действия сывороток

В настоящее время имеются убедительные доказательства того, что миелинотоксическое действие сывороток при демиелинизирующих заболеваниях нервной системы вызывается фактором, имеющим свойства антитела. Об этом, в частности, говорит необходимость обязательного присутствия комплемента. Обычно в качестве комплемента в культуру добавляют сыворотку морской свинки (Bornstein, Appel, 1965), но иногда достаточно и комплемента, содержащегося в свежей испытуемой сыворотке. Различные способы инактивации комплемента — нагревание сыворотки до 56°C в течение 20—30 мин, обработка ее 0,15N NH<sub>4</sub>OH с последующей нейтрализацией 0,15N HCl, добавление гепарина — снимают ее миелинотоксическую активность (Bornstein, Appel, 1964; Kim e. a., 1970). При добавлении комплемента миелинотоксические свойства восстанавливаются. Миелинотоксическая активность сыворотки связана с глобулиновой фракцией, которая, по данным Appel, Bornstein (1964), с константой седиментации 7S вызывает характерную демиелинизацию тканевой культуры мозжечка, так же как и исходная сыворотка больных ЭАЭ животных. Dowling и соавт. (1968) обнаружили демиелинизирующие антитела при этом заболевании как во фракции 19S (IgM), так и во фракции 7S (IgG).

У больных рассеянным склерозом основной миелинотоксической активностью в сыворотке обладают макроглобулины (Kim e. a., 1970).

Опыты истощения миелинотоксических сывороток тканями центральной и периферической нервной системы служат доказательством специфичности миелинотоксического действия. Так, инкубация фракций миелинотоксических сывороток с гомогенатами ткани головного мозга снимает их активность (Appel, Bognstein, 1964). То же обнаружено при обработке сывороток больных с синдромом Гийена—Барре тканью седалищного нерва морской свинки (Cook e. a., 1971). Вместе с тем, обработка миелинотоксической сыворотки тканями других органов (легких, почек) не устраняет ее действие на культуру нервной ткани (Appel, Bognstein, 1964; Bognstein, Iwanami, 1971), а сыворотки от животных с ЭАЭ не обладают цитотоксическим действием в отношении культур не нервных тканей — почки, мышцы, фибробластов. Наконец, сыворотки нормальных животных или сыворотки, содержащие антитела в высоких титрах против других тканей, например нефротоксические сыворотки, не оказывают повреждающего действия на культуру мозжечка. Насыщение миелинотоксических сывороток людей при полиневрите типа Гийена — Барре гомогенатом ткани почки не отражается на их миелинотоксическом действии (Cook e. a., 1971).

При иммунолюминесцентном исследовании тканевых культур, подвергнутых действию миелинотоксических сывороток, установлена фиксация иммуноглобулина сывороток на миелиновой оболочке нервных волокон (Appel, Bognstein, 1964; Lamougeux e. a., 1966; Yonezawa e. a., 1968; Cook e. a., 1970).

Культуры чувствительных ганглиев или мозжечка после контакта с кроличьей миелинотоксической сывороткой обрабатывали антикроличьим глобулином, конъюгированным с изотиоцианатом флюоресцеина. Уже после короткой инкубации (1—2 ч), до начала распада миелина, на мягкотных волокнах и на поверхности отдельных глиальных клеток обнаруживалась фиксация глобулина (Appel, Bognstein, 1964). Только после этого меченый белок выявляется диффузно в цитоплазме глиальных клеток, что, возможно, связано с явлением пиноцитоза (Klatzo, Maxwell, 1960). Сходные изменения получены в культуре чувствительных узлов при испытании на них сывороток от животных с ЭАП.



В период веретенообразного набухания и фрагментации миелина свечение антикроличьего глобулина наблюдается в участках демиелинизации как на поверхности нервных волокон, так и в цитоплазме глиальных клеток (Appel, Bornstein, 1964). Предварительный прогрев сывороток, ведущий к инактивированию комплемента, как уже указывалось, снимает миелинотоксическую активность, но не оказывает влияния на фиксацию меченого глобулина (Bornstein, Appel, 1965). Таким образом, фиксация иммуноглобулинов на поверхности миелиновых оболочек также говорит в пользу того, что сывороточные антитела обладают специфическим миелинотоксическим действием *in vitro*.

### 3.2. Постановка опытов при испытании миелинотоксического действия сывороток

В настоящем разделе изложены условия постановки опытов для выяснения миелинотоксического действия сывороток от животных, болеющих ЭАП. Однако использованные методические приемы применимы и для изучения миелинотоксического действия сывороток от животных и людей с демиелинизирующими заболеваниями ЦНС.

Стерильно полученные сыворотки до испытания в тканевой культуре содержат при  $-20^{\circ}\text{C}$  для сохранения активности находящегося в них комплемента. Можно также прогреть сыворотки при  $56^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин; в таком случае в момент испытания к ним прибавляют в качестве источника комплемента свежую сыворотку морской свинки.

При ЭАП миелинотоксическое действие сыворотки испытывали, начиная с продромального периода заболевания (3—6-го дня после введения животным невритогенной смеси), с небольшими интервалами на протяжении месяца, когда большинство животных выздоравливало. Для этих опытов специально отбирали (путем предварительной микроскопии в асептических условиях) хорошо миелинизированные культуры тригеминальных ганглиев 19—21-дневных эмбрионов крысы по истечении 4—6 нед культивирования, когда процесс образования миелина носит распространенный характер, а дегенеративные изменения в культуре отсутствуют. Для контроля использовали так-

же миелинизированные культуры мозжечка. При фазово-контрастном микроскопировании в центре эксплантата ПНС видны тела нейронов и возле них, а также в пределах пласта шванновских клеток — массовое образование миелиновых оболочек от единичных сегментов до группы волокон или даже пучков (см. рис. 35). В основном миелинизация происходит в центре эксплантата, а на периферии в зоне роста видны только отдельные миелинизированные волокна. На поздних сроках культивирования основная масса нервных волокон располагается в пучках.

В наших опытах применяли прогретые сыворотки от кроликов с ЭАП, которые добавляли в питательную среду в концентрации 25—30%; одновременно вносили свежую сыворотку морской свинки как источник комплемента в концентрации 10—15% к общему объему культуральной жидкости. В каждый опыт обязательно включали следующие контроли: 1) инактивированные нагреванием при 56°C в течение 30 мин испытуемые сыворотки с инактивированным комплементом в той же концентрации, что и в опыте; 2) нативные сыворотки нормальных кроликов и свежий комплемент (О. А. Родштейн и Г. В. Коновалов, 1971). Результаты опыта оценивали через 9, 12, 24, 48 и 72 ч по микроскопической картине с применением нейрористологических методов, которые описаны в разделе 3.3.1. Сыворотку каждого животного испытывали на нескольких культурах (не менее двух) и в случае сомнительных результатов опыты повторяли.

Изучение миелинотоксической активности сывороток в различных концентрациях показывает, что их содержание не менее 25—30% к объему питательной среды оказывает сильное демиелинизирующее действие.

### **3.3. Миелинотоксическое действие сывороток от животных с ЭАП в культуре**

Метод культуры нервной ткани не только позволяет изучать природу и свойства миелинотоксических антител, но и представляет хорошую модель для изучения процесса демиелинизации. Этот метод обеспечивает на протяжении всего эксперимента возможность прямого наблюдения воздействия антител на миелин. Параллельное изучение



процесса демиелинизации в условиях *in vivo* и *in vitro* дает возможность наиболее полно выявить особенности течения демиелинизирующего процесса в разных экспериментальных условиях.

Выяснение роли клеточных и гуморальных факторов в патогенезе демиелинизирующих заболеваний нервной системы остается наиболее важным вопросом, и метод тканевой культуры позволяет проследить отдельно процесс демиелинизации под влиянием только сыворотки или только лимфоцитов, что невозможно в условиях *in vivo*. Изучение морфологических изменений, вызываемых каждым из названных факторов *in vitro*, позволяет поставить вопрос о том, какие из них являются наиболее адекватными изменениями, наблюдаемыми у животных с демиелинизирующими заболеваниями нервной системы.

### 3.3.1. Процесс демиелинизации

Для наиболее полного изучения демиелинизации как в периферической, так и в центральной нервной системе в культуре необходимо использовать разнообразные общегистологические, гистохимические и нейрогистологические методики, поляризационную, фазовоконтрастную и электронную микроскопию, а также исследование в светлом поле и цейтраферную киносъемку (Luse, 1968; Миггау, 1971). Микроскопия в поляризованном свете и в светлом поле дает возможность прижизненно проследить динамику изменений мягкотных оболочек, находящихся не только в поверхностных слоях эксплантата, но и в глубине его, что при использовании фазовоконтрастного микроскопа сделать невозможно. С помощью указанных выше методик можно изучить в динамике последовательные картины поражения мягкотных оболочек и постепенного распада их при исследовании одних и тех же полей эксплантата до и после действия сыворотки от больных ЭАП животных. При изучении демиелинизации в культуре весьма ценны окраска суданом черным, на фосфолипиды по Беккеру, импрегнация серебром и суправитальная окраска метиленовым синим.

Тяжесть и распространенность распада миелина в культуре варьируют от случая к случаю и зависят от интенсивности миелинотоксического действия сыворотки, ее концентрации и сроков экспозиции. Почти всегда можно наблюдать, что изменения миелина сильнее всего выра-



Рис. 42. Неравномерное ослабление свечения миелиновых оболочек через 36 ч после действия сыворотки от больного ЭАП кролика. Поляризационная микроскопия живой культуры.  $\times 450$ .

жены в волокнах, расположенных вблизи поверхности эксплантата, и слабее — в глубине его, где количество мягкотных волокон постоянно больше.

Миелинотоксические антитела в крови кроликов при ЭАП появляются уже за несколько дней до развития неврологических симптомов, и их действие можно установить через 4—6 дней после инокуляции кроликам невритогенной смеси, содержащей нативный периферический миелин; к 7—8 дням они обнаруживаются значительно чаще и наблюдаются почти у всех животных в сроки от 10 до 21 дня, после чего резко падают; к концу 4-й недели антитела обнаруживаются крайне редко.

Миелинотоксическое действие сывороток от больных ЭАП кроликов достигает максимума на 2—3-е сутки, хотя начинается уже через 24 ч (значительно реже через 12—18 ч). При исследовании в более ранние сроки (9 ч) демиелинизация в наших опытах ни разу не была обнаружена.

Первые признаки начинающейся демиелинизации проявляются в изменении контуров миелиновых нервных во-





Рис. 43. Демиелинизация в культуре тригеминального узла при действии сыворотки от больных ЭАП животных.  
а — распад отдельных миелиновых волокон на глыбки и оvoidы через сутки. Окраска по Беккеру.  $\times 1000$ ; б — различные стадии распада миелиновых оболочек на 2-е сутки. Судан черный.  $\times 900$ .



Рис. 44. Холестеринэстеры в виде «мальтийских крестов» на месте распада миелина (экспозиция миелинотоксической сыворотки 2 сут). Поляризационная микроскопия живой культуры.  $\times 300$ .

локон, которые кое-где делаются нечеткими и бледно окрашиваются черным суданом и на фосфолипиды по Беккеру. Отдельные сегменты мякотных нервных волокон приобретают неправильную овоидную или грушевидную форму; появляются колбовидные вздутия, образующиеся, вероятно, в результате отека миелиновой оболочки. При прижизненном просмотре одних и тех же участков культур в поляризационном микроскопе и светлом поле сначала наблюдается только ослабление свечения миелиновых оболочек без изменений их контуров (рис. 42), затем появляются варикозные утолщения.

При дальнейшем развитии патологического процесса нарушается целостность миелина с образованием глыбок и зерен различных размеров, преимущественно округлой или овальной формы, обычно расположенных по ходу пучков нервных волокон в виде цепочек (рис. 43); нередко они видны вблизи аксонов, у которых мякотные оболочки уже отсутствуют. При исследовании культур на этой стадии демиелинизации в поляризованном свете видно, что двухконтурные линии миелина становятся прерывистыми, а глыбки, зерна и овоиды разрушенных мие-



линовых оболочек теряют двойное лучепреломление. В местах выраженного распада мякотных оболочек после соответствующей обработки (нагревание культур до 60°C в течение 5 мин) появляется характерное свечение холестеринэстеров в виде «мальтийских крестов», располагающихся или отдельными скоплениями по ходу нервных волокон, или диффузно в эксплантате (рис. 44). Мелкие суданофильные глыбки и зерна распадающегося миелина интенсивно импрегнируются серебром в черный цвет. Иногда происходит только ослабление, а затем полное исчезновение анизотропного свечения миелиновых волокон без изменения их контуров и распада на глыбки и зерна (О. А. Родштейн, Г. В. Коновалов, 1971; Б. Я. Вильнер и соавт., 1973; Bornstein, Appel, 1961 b; Yonezawa e. a., 1968). Изменения миелина начинаются вблизи перехватов Ранвье, где появляются единичные кристаллы холестеринэстеров или характерные их группы («мальтийские кресты»).

В одном и том же пучке мякотных нервных волокон процесс распада миелина происходит неравномерно и наряду с интактными волокнами нередко видны резко измененные. Демиелинизация может захватывать, как и *in vivo*, один или несколько соседних интернодальных сегментов, причем рядом с ними могут находиться нормальные участки миелиновой оболочки. Почти всегда периаксональные изменения сильнее всего выражены в волокнах, расположенных у поверхности эксплантата, и слабее — в глубине его.

Изучение демиелинизирующего процесса *in vitro* в электронном микроскопе показало, что он происходит в основном сходно с таковым в условиях целого организма. При исследовании культур чувствительных ганглиев крысы, обработанных сыворотками больных ЭАП кроликов, закономерно наблюдаются отщепление части ламелл миелиновой оболочки, образование щелевидных пространств между отдельными слоями миелина, его внутренним слоем и аксоном и вакуолизация цитоплазмы гипертрофированных шванновских клеток.

Аналогичная картина распада миелина в культурах периферической нервной системы наблюдается при действии сывороток от больных с синдромом Гийена—Барре, экспериментальной моделью которого является ЭАП. Сыворотки таких больных при помещении их в питательную среду эксплантатов чувствительных узлов (в кон-

центрации 50%) через 3—4 дня вызывают образование колбовидных вздутий на мягкотных оболочках, а затем их распад. Продукты распада миелина подвергаются расщеплению до нейтральных жиров (Cook e. a., 1971). Электронно-микроскопическое исследование культур закономерно показывает отщепление ламелл миелиновой оболочки, которое начинается от наружного мезаксона и, распространяясь внутрь, вдоль интрапериодической линии, образует щели между отдельными слоями миелина; при этом происходят расширение периаксонального пространства, гипертрофия и вакуолизация цитоплазмы шванновских клеток, в которых отмечается распад миелиновых оболочек (Higano e. a., 1971). Большинство осевых цилиндров нервных волокон, полностью лишенных миелиновых оболочек, сохраняют нормальную структуру. Higano с соавт. (1971), Dubois-Dalcq с соавт. (1971) считают, что распад миелиновых оболочек развивается первично и не зависит от повреждения шванновских клеток.

Сходные изменения наблюдаются в культуре мозжечка под влиянием сывороток от животных с ЭАЭ. В результате отека миелиновых оболочек образуются веретенообразные вздутия, после чего миелин распадается на мелкие липидные капли (Bornstein, Appel, 1961a; Bornstein, Iwanami, 1971; Bornstein, 1973).

При действии миелинотоксических антител на длительно растущие культуры центральной и периферической нервной системы не было отмечено существенных изменений нервных клеток и осевых цилиндров. В редких случаях возникает набухание осевых цилиндров без нарушения их непрерывности (Winkler, 1965; Yonezawa e. a., 1968; Agrason e. a., 1969). Только Pettit и Kiernan (1974) считают, что сыворотки от крыс с ЭАЭ вызывают повреждение аксонов.

В культурах спинного мозга и коры больших полушарий эмбрионов мыши, подвергнутых действию сывороток от кроликов с ЭАЭ, изучали также и состояние синапсов. Уже через час после экспериментального воздействия в них при наблюдении в электронном микроскопе выявляются изменения в виде слияния везикул (Ross, Bornstein, 1969). Через 20—24 ч синапсы с трудом могут быть отличимы от других субклеточных структур. После перенесения эксплантата в нормальную питательную среду пораженные синапсы восстанавливают свою структу-



ру уже через сутки. Возможно, что эти изменения оказывают влияние на биоэлектрическую активность миелинизированных культур, приводя к нарушению проведения нервных импульсов (Bognstein, Grain, 1965).

Сыворотки от животных, больных ЭАП, оказывают миелинотоксическое действие только на мягкотные волокна периферической нервной системы (Winkler, 1965; О. А. Родштейн, Г. В. Коновалов, 1971), а сыворотки от животных с ЭАЭ — только на центральный миелин (Bognstein, Appel, 1961в). Наиболее убедительно это показал Bognstein (1966) на совмещенных миелинизированных культурах ЦНС и ПНС (спинной мозг — спинальные ганглии).

Сыворотки от животных с ЭАП вызывали повреждения миелина только в чувствительных ганглиях, а от животных с ЭАЭ — в спинном мозге.

После удаления миелинотоксической сыворотки из питательной среды, в которой находится эксплантат, в соответствующих культурах наблюдается ремиелинизация как периферических, так и центральных мягкотных волокон (Bognstein, Raine, 1970; Dubois-Dalcq e. a., 1971). Концентрация миелинотоксической сыворотки в питательной среде не ниже 1% препятствует ремиелинизации. В культурах, состоящих из совмещенных тканей ЦНС и ПНС эмбрионов мыши (спинной мозг — спинальные узлы), после обработки сывороткой, полученной от кроликов в ЭАЭ и взятой в концентрации 1% и выше (в присутствии комплемента), полностью прекращается образование центрального миелина; в то же время такая обработка не сказывается на миелинизации периферических нервных волокон. Инактивирование комплемента нагреванием устраняет торможение миелинизации (Bognstein, Raine, 1970).

Длительное воздействие миелинотоксических сывороток на миелинизированную культуру ЦНС приводит к резкому глиозу (разрастание астроцитарной глии). После перенесения препаратов в нормальную питательную среду способность к ремиелинизации оказывается резко заторможена; этот процесс находится в обратной зависимости от продолжительности действия миелинотоксической сыворотки. Культуры, подвергнутые непрерывному воздействию сыворотки в течение 3 нед, полностью теряют способность к ремиелинизации (Raine, Bognstein, 1971).

При изучении миелинотоксического действия сывороток нужно учитывать «спонтанные» изменения, наблюдающиеся в культурах нервной ткани как ЦНС, так ПНС. Единичные «баллонизирующие» вздутия миелиновых оболочек иногда встречаются в контрольных эксплантатах. При таких изменениях осевые цилиндры обычно также бывают разрушены, а повреждение миелина носит вторичный характер и проявляется в распаде его на липидные гранулы, которые быстро захватываются подвижными макрофагами. Такие изменения чаще всего бывают при смене питательной среды через 5—6 дней или еще реже (Mige e. a., 1970). Однако даже после таких дегенеративных изменений помещение эксплантата в нормальные условия культивирования приводит через 2—3 нед к формированию новых мякотных нервных волокон (Winkler, Wolf, 1966).

Дефекты в созревании миелина могут зависеть от нарушений коллагенового покрытия в результате образования в нем полостей или отслоения от покровного стекла (Winkler, Wolf, 1966). Нужно помнить, что в начальные стадии формирования мякотных нервных волокон в их миелинизирующихся сегментах могут наблюдаться изменения контуров, особенно снаружи. При импрегнации таких культур серебром осевые цилиндры всегда сохранены и образуют варикозные утолщения в местах формирования миелина (Г. В. Коновалов, О. А. Родштейн, 1972; Winkler, Wolf, 1966).

При исследовании на культурах ПНС 183 сывороток от кроликов, инокулированных невритогенными материалами от разных видов животных с неодинаковой степенью очистки периферических нервных стволов и различной степенью невритогенной активности, миелинотоксические антитела обнаружены в половине случаев (О. А. Родштейн; Г. В. Коновалов, 1975). Частота появления этих антител зависит от частоты заболеваемости и выраженности неврологических симптомов ЭАП. Чаще всего (в 75% случаев) миелинотоксическое действие наблюдалось в сыворотках кроликов, инокулированных бычьим миелином, который вызывает и наиболее высокую заболеваемость этих животных. У кроликов, привитых гомогенатом гомологичных нервов, было 42% таких сывороток, а у животных, инокулированных неочищенными нервами быка, — 14%; воспроизведение ЭАП посредством этого невритогена также наблюдалось сравнительно



редко. Сыворотки от незаболевших кроликов, как правило, не обладали миелинотоксическим действием, а, напротив, сыворотки больных животных в 86% случаев дают миелинотоксический эффект. Необходимо учитывать, что миелинотоксическое действие сыворотки от больных животных *in vitro* дает положительный эффект только в довольно высоких концентрациях (не менее 20—30% к объему среды), в противном случае могут быть получены отрицательные результаты.

Миелинотоксическая активность сывороток экспериментальных животных в культуре нервной ткани начинает проявляться до развития у них симптомов заболевания, а именно на 4—7 дни после введения невритогенных препаратов. Это действие нарастает по мере развития болезни, выражено сильнее всего на второй неделе (7—14-й день) и исчезает по истечении 3—4 нед (О. А. Родштейн, Г. В. Коновалов, 1971, 1975; О. А. Родштейн с соавт., 1974; Lamougeux e. a., 1966; Bornstein, Iwanami, 1971).

Миелинотоксические антитела хорошо дифференцируются от антител, определяемых в реакции связывания комплемента (РСК). В части экспериментов миелинотоксические антитела образуются при отсутствии антител или очень низких титрах антител, выявляемых в РСК; например, это бывает в сыворотках животных с центральным нарушением образования комплементсвязывающих антител путем разрушения заднего поля гипоталамуса (Г. В. Коновалов с соавт., 1971). У таких животных наблюдается наиболее тяжелое течение заболевания, и миелинотоксические антитела появляются в более ранние сроки, чем у неоперированных животных.

### 3.3.2. Изменения шванновских и глиальных клеток в культуре ПНС и ЦНС

При воздействии миелинотоксических сывороток от больных ЭАП кроликов на культуры чувствительных узлов в местах выраженного распада миелина наблюдаются реактивные изменения шванновских клеток, которые, как и у животных при ЭАП *in vivo*, проявляются в резкой гипертрофии их цитоплазмы; последняя хорошо видна при фазовоконтрастном микроскопировании и не всегда различима на препаратах, импрегнированных серебром. В цитоплазме таких клеток при исследовании в светлом





Рис. 45. Мелкозернистый распад миелина в цитоплазме гипертрофированных шванновских клеток (экспозиция сыворотки 2 сут).  
а, б — импрегнация серебром по Бильшовскому — Грос. X560 (а); X1000 (б).



поле, при фазовоконтрастном микроскопировании, при окраске культур суданом черным и импрегнации серебряном отчетливо выступают вакуоли и диффузно рассеянная мелкая зернистость (рис. 45). Она образуется в результате распада миелина и в дальнейшем превращается в капельки нейтрального жира, окрашивающиеся суданом III, IV, 3, 4-бензпиреном и др.; в этих же клетках появляется мелкая аргентофильная зернистость. Особенно в большом количестве продукты распада миелина накапливаются возле ядер шванновских клеток. Субмикроскопически в цитоплазме шванновских клеток видно накопление спиралевидно закрученных ламеллярных структур различной формы и величины; увеличивается также количество цитоплазматических органелл (митохондрий, пластинчатый комплекс и др.). Ядра шванновских клеток расположены центрально и имеют размеры 5—8 мкм, содержат 2—3 базофильных ядрышка: иногда они приобретают бобовидную или дольчатую форму.

Так же как и при периаксональном процессе *in vivo*, в культуре ткани шванновские клетки не только не погибают, но, напротив, активно фагоцитируют (аутофагоцитоз) продукты распада миелина. Несмотря на аутофагоцитарную функцию этих клеток, они не превращаются в подвижные макрофаги и не захватывают извне частицы введенного меченого эвансом синим альбумина.

Через 24—28 ч после воздействия миелинотоксической сыворотки на телах и отростках шванновских клеток часто появляются обнаруживаемые прижизненно своеобразные изменения в виде крупных светлых «вздутий» (от 5 до 20 мкм), которые содержат мелкие плотные зернышки (рис. 46). Наибольшее число таких «вздутий» находится по периферии эксплантата, а число и размеры их нарастают по мере увеличения срока действия сыворотки. Первоначально они выбухают из цитоплазмы шванновских клеток, а затем могут отрываться от нее и лежать свободно в питательной среде. При окраске культур 3, 4-бензпиреном или суданом черным в этих образованиях обнаружены нейтральные жиры. Из-за легкой массы они скапливаются преимущественно в верхних слоях питательной среды. У некоторых таких свободно лежащих структур видны идущие в различных направлениях складки, которые, вероятно, возникают в результате сморщивания или нарушения их целостности и выхода части содержимого наружу. На гистологически



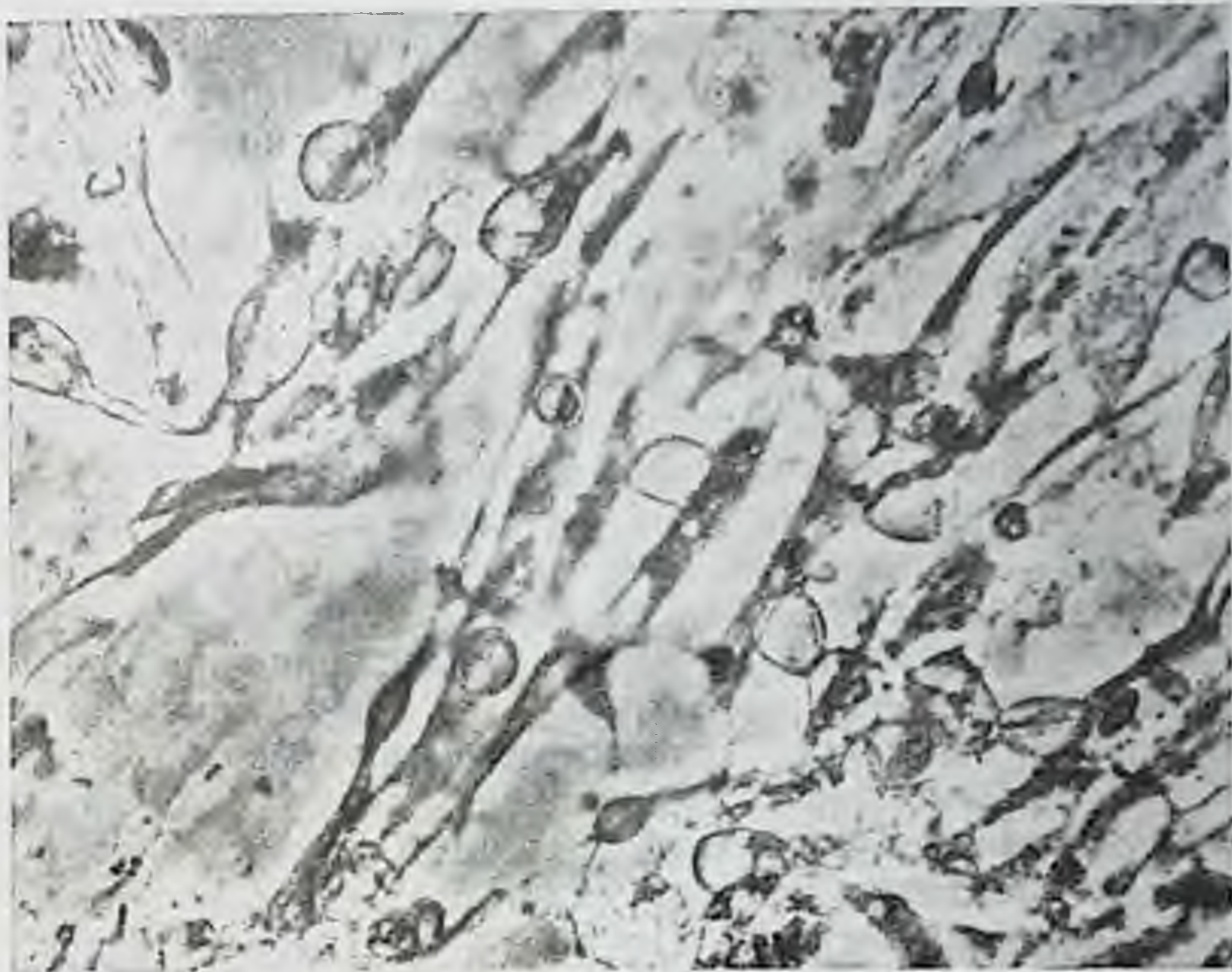


Рис. 46. Своеобразные «вздутия» на телах и отростках шванновских клеток через 2 сут после экспозиции миелинотоксической сыворотки. Живой препарат. Фазовоконтрастная микроскопия.  $\times 600$ .

препаратах, прошедших обезвоживание (методики Ниссля, Бильшовского—Грос и др.) эти структуры обнаружить не удастся, что также косвенно указывает на их липидную природу. Причина образования «вздутий» цитоплазмы шванновских клеток остается неясной. Определенная зависимость существует между изменением шванновских клеток культуры и миелинотоксическим действием сывороток. Из 34 случаев с демиелинизацией, установленной с помощью специальных нейрогистологических методик, в 27 наблюдениях были отмечены изменения шванновских клеток, в 4 случаях они были сомнительными и только в 3 эксплантатах отсутствовали. Сходные изменения имеют место и в культурах ЦНС. Л. И. Равкина с соавт. (1973) наблюдали глиотоксический эффект сыворотки при остром и хроническом ЭАЭ у обезьян в органной культуре мозга и отметили определенную корреляцию между остротой неврологических проявлений заболевания и наличием глиотоксического действия.



Светооптические исследования эксплантатов мозжечка при действии сывороток больных ЭАЭ животных показали очень раннюю гипертрофию олигодендроцитов и астроцитов (Bognstein, Appel, 1961; Bognstein, Iwanami, 1971). При субмикроскопических наблюдениях в таких культурах установлено, что сыворотки от животных с ЭАЭ и от больных рассеянным склерозом вызывают характерные изменения олигодендроглии: набухание и увеличение числа и размеров осмиофильных гранул в цитоплазме, а также поражение некоторых ее органелл (митохондрий, пластинчатый комплекс и др.) (Aragicio e. a., 1968). Эти изменения можно обнаружить уже через 15 мин после действия сыворотки, а через 1—2 ч они достигают значительной степени. Демиелинизация начинается с появления крупных вакуолей между ламеллами миелиновой оболочки и отторжения ее фрагментов. Этот процесс сопровождается образованием вокруг оголенных осевых цилиндров скоплений большого количества отростков астроцитов, в которых видны фагосомы, содержащие продукты распада. По мнению Aragicio с соавт. (1968), фагоцитирующими элементами являются астроциты, а олигодендроциты оказываются поврежденными (уплотнение хроматина ядра, вакуолизация цитоплазмы, округление клеток при сохранении внутриклеточных структур).

Ряд авторов считают, что главной причиной разрушения миелина в культурах как чувствительных ганглиев, так и мозжечка являются изменения шванновских клеток или олигодендроцитов (Yonezawa e. a., 1968; Bognstein, Iwanami, 1971). По их данным, часть этих клеток гибнет, что не находит подтверждения в наших материалах, а также в работах Higano и соавт. (1971), Dubois-Dalcq с соавт. (1971), Raine, Bognstein (1970).

Хотя миелинизированные культуры периферической и центральной нервной ткани представляют довольно адекватные модели для изучения процессов демиелинизации *in vitro*, для изучения миелинотоксического действия оказались пригодными также культуры шванновских и глиальных клеток. Сыворотки от кроликов и обезьян с неврологическими симптомами ЭАП обладают цитотоксическим действием на культуры шванновских клеток с повреждением их клеточных мембран и с последующей их гибелью (Palacios, Pette, 1964). Такое действие оказывают только свежие нативные сыворотки,

в то время как нагревание до 56°C уничтожает эту активность. Добавление свежего компонента к инактивированным сывороткам восстанавливает их цитотоксичность. Berg и Källen (1962), Berg и Bergstrand (1974) к суспензии диссоциированной глины добавляли сыворотку животных с ЭАЭ, что приводило к дегенеративным изменениям этих клеток, многие из которых были лизированы. Взаимосвязь между миелинотоксическим действием, описанным Bognstein, и глиотоксическим действием в суспензиях диссоциированных глиальных клеток пока не ясна. Известно только, что присутствие компонента не обязательно для глиотоксического действия в диссоциированных культурах. Изменения клеток периневрального покровного пласта, которые подробно изложены в предыдущей главе (см. с. 119), под действием сыворотки кроликов с ЭАП мы не наблюдали, а данные литературы по этому вопросу отсутствуют.

### 3.3.3. Подвижные макрофаги

Клетки с характерными признаками макрофагов можно обнаружить в культуре чувствительных ганглиев при применении ряда методик (окраска по Нисслию, суданом черным, по Беккеру, суправитальная окраска метиленовым синим, при фазовоконтрастной микроскопии и т. д.). Они обычно имеют неправильную или удлинённую форму с массой коротких цитоплазматических отростков. Размеры их поперечника колеблются от 5 до 10 мкм (рис. 47). Овальное темное ядро этих клеток содержит 1—2 крупных ядрышка, а в цитоплазме находится большое количество как мелких, так и крупных суданофильных гранул, обладающих сильным лучепреломлением при фазовоконтрастном микроскопировании и интенсивно окрашивающихся метиленовым синим. При цейтраферной киносъемке хорошо можно проследить подвижность этих клеток, а также колебательные движения оптически-плотных включений в их цитоплазме.

Находясь в непосредственном контакте с распадающимися мякотными оболочками, макрофаги располагаются цепочками, тесно прилегая друг к другу.

При прижизненном исследовании культур в динамике удастся наблюдать образование макрофагов из клеток неправильной или овальной формы, имеющих темное, центрально расположенное ядро с крупными глыбками



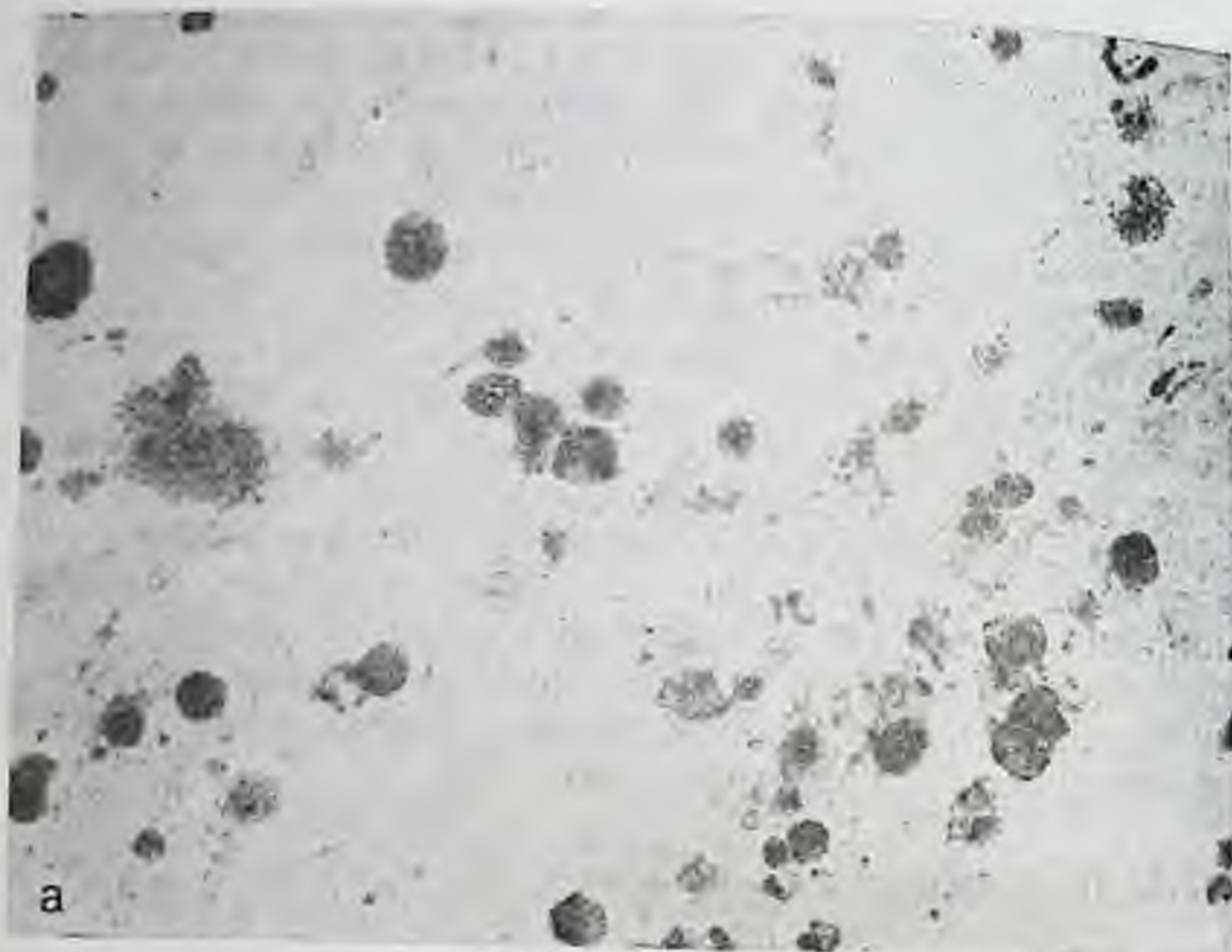


Рис. 47. Скопление макрофагов на месте распада миелина в культуре; 3 сут после действия сыворотки. Суправитальная окраска метиленовым синим.  $\times 250$  (а);  $\times 630$  (б).

хроматина и несколько более светлый ободок цитоплазмы с короткими, постоянно меняющими свою форму и размеры отростками (гистиоциты?). Уже в ранние стадии разрушения миелина они приобретают округлую или грушевидную форму, а вскоре у них нарастает количество псевдоподий, появляются амебоидные движения и эти клетки скапливаются в участках с разрушенным миелином; при этом цитоплазма их заполняется плотным зернистым содержимым. В этот период у подвижных макрофагов видны многочисленные тонкие цитоплазматические выросты, которые непрерывно изменяют свою форму. По мере развития периаксонального процесса количество таких элементов нарастает. В этот период они хорошо отличимы от фибробластов, имеющих более крупные размеры (от 30 до 300 мкм), большое светлое ядро, содержащее от 2 до 10 плотных базофильных зернышек, и хорошо выраженную полиморфную цитоплазму с плотными гранулами, расположенными главным образом в перинуклеарной зоне.

Чтобы отдифференцировать макрофаги от различных дегенерирующих клеток (шванновских, фибробластов), иногда встречающихся в норме и также содержащих в цитоплазме липидные включения, мы добавляли в питательную среду за 30—40 мин до фиксации культур формалином небольшие количества альбумина, меченного эвансом синим. При этом подвижные макрофаги в противоположность дегенерирующим клеткам в люминесцентном микроскопе приобретают характерное свечение — от бледно-оранжевого до ярко-красного в зависимости от количества поглощенного белка.

Дегенерирующие клетки в зоне роста в противоположность макрофагам располагаются рассеянно, а по краю эксплантата образуют очаговые скопления.

### **3.4. Демиелинизирующий процесс, вызванный клетками лимфатических узлов**

Для выяснения миелинотоксической активности клеток регионарных (подколенных) лимфатических узлов кроликов в культуре центральной и периферической нервной ткани лимфоциты исследовали в разные сроки после введения животным эффективной дозы центрального или периферического миелина быка со стимулятором Фрейнда. Взятые клетки проверяли на жизнеспособность по ме-



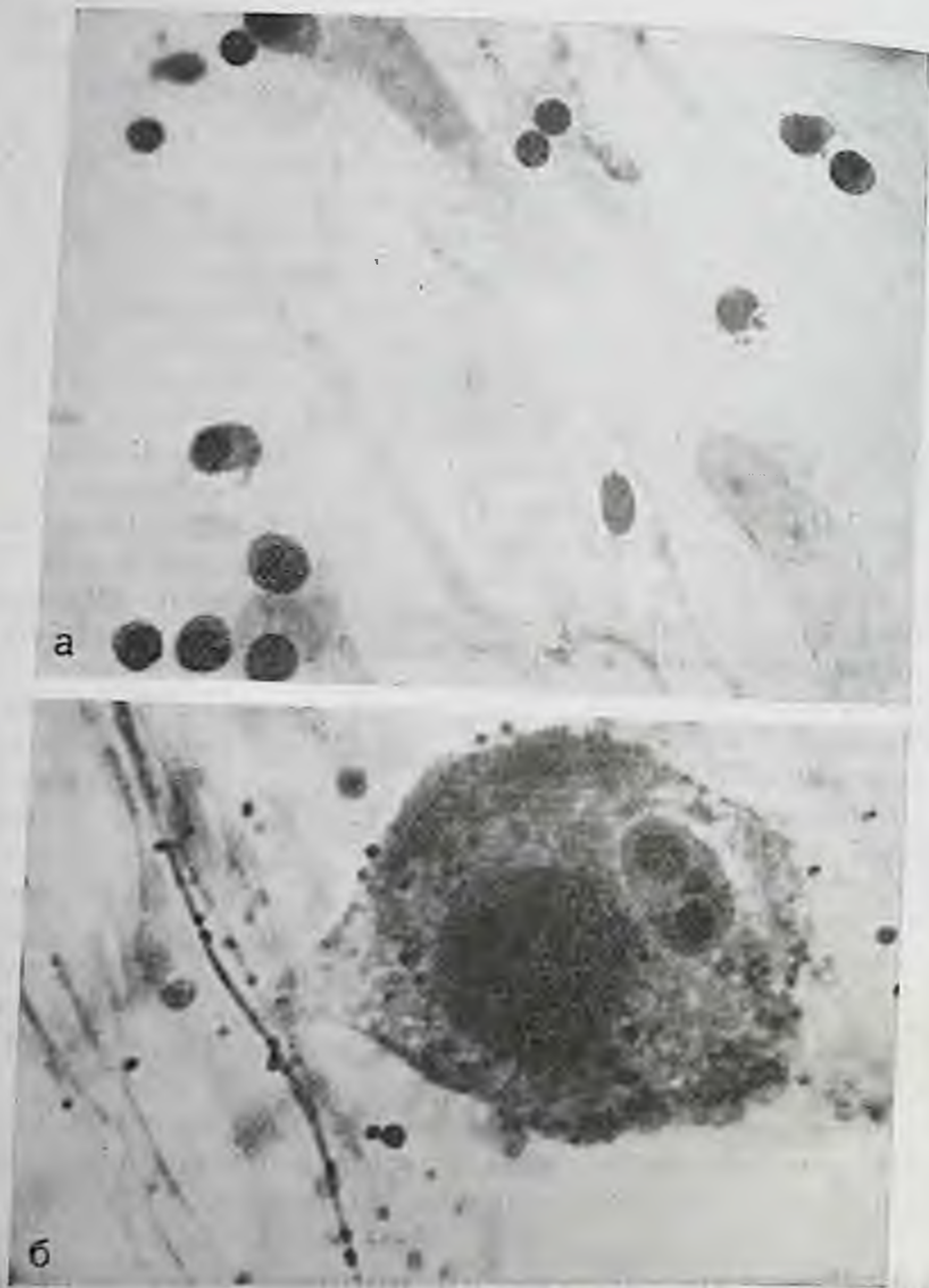


Рис. 48. Действие клеток лимфатических узлов больного ЭАП кролика на культуру тригеминального ганглия крысы.  
а — образование плазмобластов в краевой зоне культуры через 72 ч. Окраска тинином.  $\times 700$ ; б — проникание лейкоцита в цитоплазму гибнущего нейрона через 3 сут после экспериментального воздействия.  $\times 1200$ ;



в — фрагментация осевых цилиндров нервных волокон в зоне роста культуры в те же сроки. X450; г — относительная сохранность терминальных структур (окончаний) при распространенном распаде осевых цилиндров. X70. Импрегнация серебром по Бильшовскому — Грос (б—г).



тодике, предложенной Bloom (1974). Время экспозиции в культуре — обычно 3—4 дня. У части животных действие клеток лимфатических узлов изучали в динамике в два срока: до заболевания (на 7—8-й день) и после появления симптомов ЭАП (14—15-й день).

После введения клеток (3—4 млн. в 1 мл) в культуральную среду они более или менее равномерно распределяются по поверхности эксплантата. Некоторые из них уже в первые сутки прикрепляются к культуре, в то время как другие остаются свободными в капле среды; часть их поглощается макрофагами. При инкубации в течение 2—3 сут значительное количество клеток лимфатических узлов проникает в эксплантат, причем основная масса локализуется в зоне роста. В меньшем количестве такие клетки диффузно рассеяны в глубоких слоях центральной части эксплантата. Клетки лимфатических узлов интенсивно делятся митотическим путем, и часть их превращается в базофильные лимфоциты и плазмобласты (рис. 48, а); первые имеют бобовидное или удлиненно-овальное ядро, окруженное широким ободком цитоплазмы, у вторых — большое светлое ядро располагается эксцентрично и в их базофильном теле иногда видна светлая зона.

Сенсибилизированные клетки лимфатических узлов от больных ЭАП кроликов оказывают повреждающее действие на все виды клеток культуры чувствительных ганглиев крысы, в том числе и нейроны. У последних уже на второй день после воздействия сенсибилизированными клетками псевдоуниполярный отросток начинает бледно импрегнироваться серебром и вскоре не определяется вовсе. В дальнейшем в нервных клетках развиваются тяжелые изменения с пикнозом ядра и хроматолизом, который распространяется на все тело, приводя к образованию клеток-теней. Нередко цитоплазма нейронов расплавляется с образованием неправильной формы вакуолей. На отдельных препаратах в измененных нейронах с гиперхромным и (или) пикнотичным ядром видны внедрившиеся в них мелкие клеточные элементы (вероятно, лимфоциты), отделенные от окружающей цитоплазмы узким светлым ободком в виде ореола (рис. 48, б). Такие изменения в первую очередь наблюдаются в крупных нейронах (40—60 мкм), которые через 3—4 сут после действия сенсибилизированных лимфоцитов полностью разрушаются.

Выраженные дегенеративные изменения наблюдаются не только в перикарионе этих клеток, но и в их отростках, образующих густые сплетения как в центре культуры, так и в зоне роста (рис. 48, в). На высоте развития патологического процесса осевые цилиндры подвергаются глыбчатому и мелкозернистому распаду, который в различных участках эксплантата выражен неодинаково. В то время как в части пучков аксоны полностью разрушены, в других — наряду с распадающимися нервными волокнами — видны сохранившиеся волокна, но у них нередко имеются наплывы аксоплазмы.

В связи с дегенерацией осевых цилиндров резкие изменения наблюдаются также в нервных окончаниях. При импрегнации серебром видны гипертрофированные «колечки» и «петельки» вместе с небольшим отрезком приводящего волокна, располагающиеся свободно среди многочисленных распадающихся нервных волокон (рис. 48, г).

Значительные изменения претерпевают шванновские клетки, как расположенные вдоль аксонов, так и свободные, не связанные с ними, а также сателлиты. Эти клетки на 3—4-е сутки опыта находятся в состоянии зернистого распада (рис. 49, а). При импрегнации серебром на месте тяжелой шванновских клеток видны многочисленные различной величины аргентофильные зерна.

Клетки лимфатических узлов кроликов при ЭАП действуют повреждающе также на фибробластоподобные клетки, покрывающие эксплантат со всех сторон (рис. 49, б). Целостность покровного пласта, состоящего из этих элементов, нарушается. Фибробластоподобные клетки деформируются и утрачивают связь между собой. Контакты между клетками с помощью коротких цитоплазматических отростков сохраняются только в отдельных местах. Вокруг таких измененных элементов скапливается значительное число лимфоцитов, часть которых проникает в них; при этом цитоплазма покровных клеток вакуолизируется и в ней появляется аргентофильная и суданофильная зернистость. В дальнейшем эти клетки распадаются на зерна различных размеров, которые интенсивно окрашиваются суданом черным.

Вовлечение нейронов в патологический процесс описано Halpern и соавт. (1969) при добавлении в культуру головного мозга крыс лимфоцитов от больных рассеянным склерозом как в острой стадии заболевания, так и при



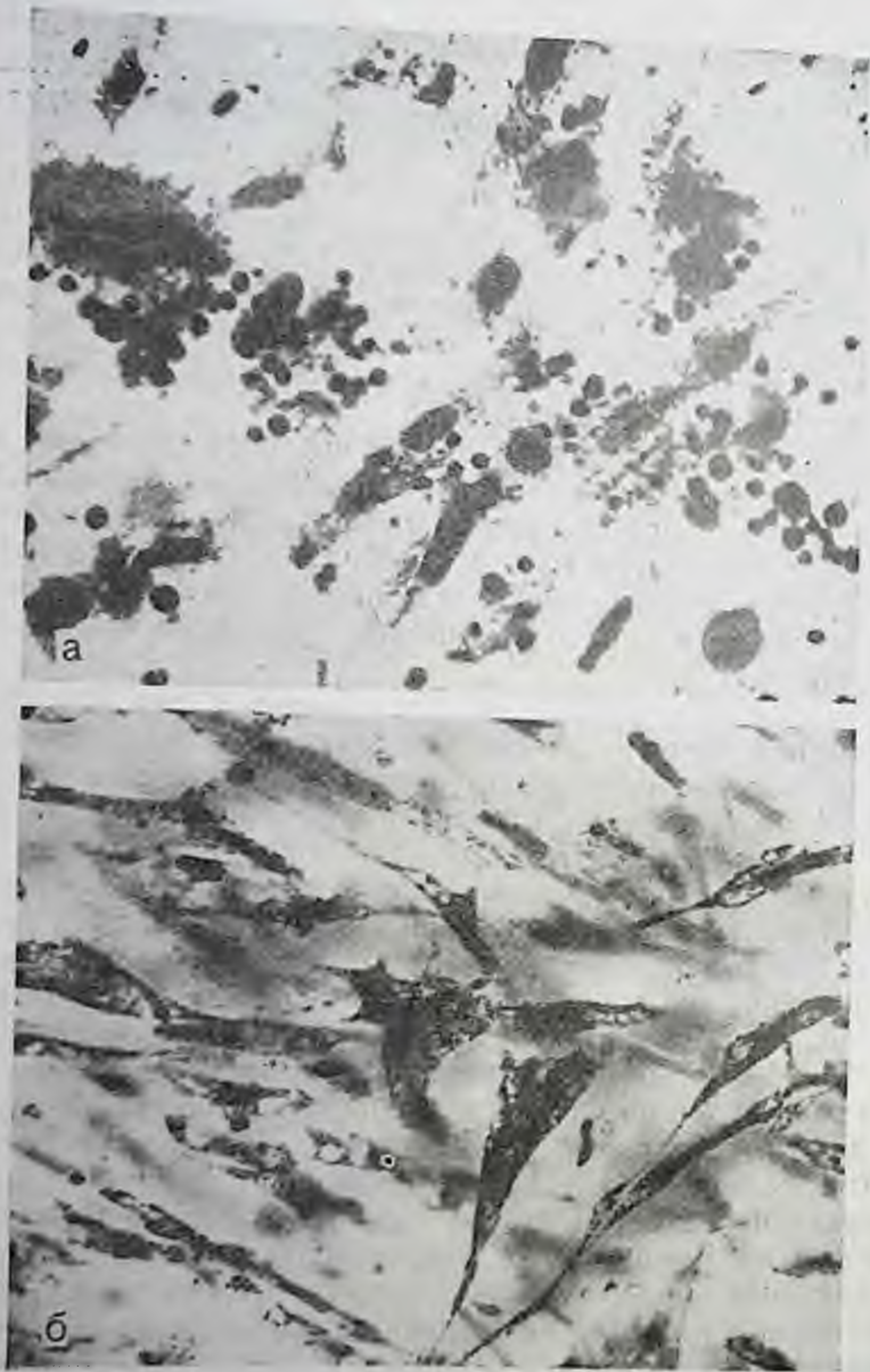


Рис. 49. Повреждающее действие лимфоцитов от больных ЭАП кроликов на культуру тригеминального ганглия крысиных эмбрионов.

а — зернистый распад шванновских клеток.  $\times 830$ ; б — дистрофические изменения покровных фибробластоподобных клеток через 72 ч после начала опыта.  $\times 530$ . Импрегнация серебром по Бильшовскому — Грос.

ремиссии. Для сравнения этими авторами изучены лимфоциты от больных с другими нервными заболеваниями, а также от здоровых людей: лимфоциты при этом не оказывали цитотоксического действия на нервные клетки в культуре ЦНС. При добавлении в культуру лимфоцитов от больных рассеянным склерозом они скапливаются вокруг нервных клеток, в цитоплазме которых появляются увеличивающиеся в размерах и сливающиеся друг с другом вакуоли, занимающие большую часть цитоплазмы, и оттесняющие ядро в сторону; в дальнейшем эти клетки гибнут.

Как видно из приведенных выше данных, при действии клеток лимфатических узлов от кроликов с ЭАП, а также от людей с рассеянным склерозом установлен общетоксический повреждающий эффект на все тканевые структуры эксплантата (нейроны, включая аксоны, шванновские клетки и фибробласты). Разумеется, при таком тяжелом и распространенном токсическом действии сенсibilизированных лимфоцитов не приходится говорить об их избирательных миелинотоксических свойствах, и такие препараты не представляют подходящий объект для изучения периаксонального процесса.

Значительно менее выраженные изменения токсического характера получены нами при воздействии на культуры тригеминального узла крыс «Август» клеток лимфатических узлов от тех же животных с ЭАП. Нервные клетки в таких эксплантатах подвергаются только реактивным изменениям с четкообразными расширениями на их телах. Распространенность токсического действия и его интенсивность значительно слабее, чем в опытах с клетками лимфатических узлов от кроликов с ЭАП. В то время как в интактных культурах калибр осевых цилиндров нервных волокон весьма различен и варьирует в диаметре от 0,5 до 2 мкм (рис. 50, а), толщина волокон в культурах данной серии опытов оказалась примерно одного и того же размера — 0,4—0,7 мкм (рис. 50, б); осевые цилиндры обычно сохраняют непрерывность, но импрегнируются серебром неравномерно. Нервные окончания нередко гипертрофируются, что дает возможность их обнаруживать без особого труда. В шванновских клетках в таких культурах при импрегнации серебром по Бильшовскому—Грос выявляются только палочковидные ядра с мелкозернистым хроматином и отсутствует характерная для демиелинизирующего процесса гипертрофия



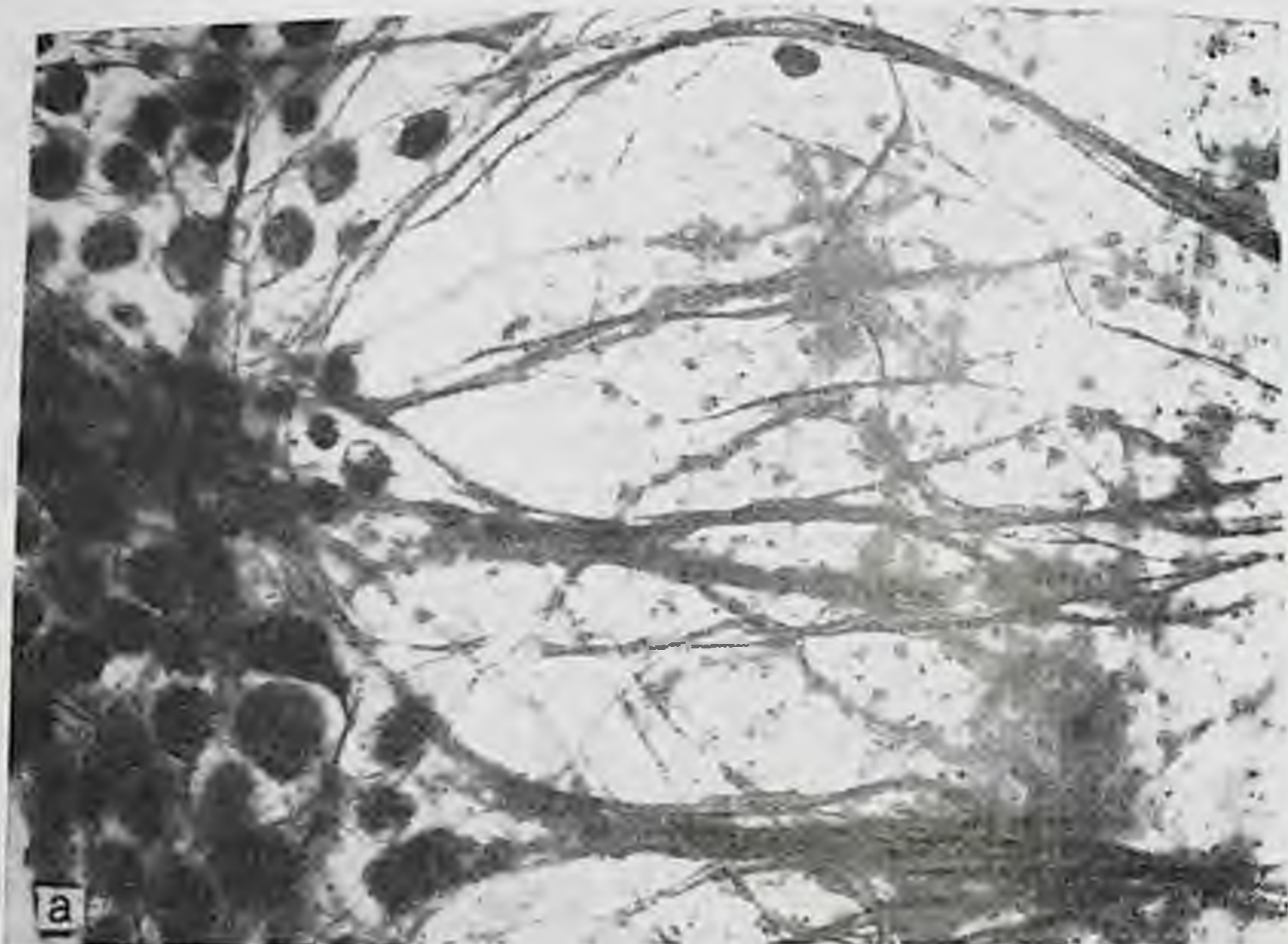


Рис. 50. Изменения в культуре тригеминального узла под воздействием гомологичных sensibilizированных лимфоцитов.  
 а — первичные клетки и волокна в интактной культуре. X380; б — осевые цилиндры одинакового мелкого калибра с фрагментацией их под действием патогенного агента в течение 56 ч. X380. Импрегнация серебром по Бильшовскому — Грос.

этих клеток. Цитотоксическое действие на фибробласты в световом микроскопе не установлено.

В серии опытов, проведенной на 15 заболевших ЭАП кроликах, одновременно изучены миелинотоксическая активность сывороток этих животных и токсическое действие клеток лимфатических узлов; исследования проведены в одни и те же сроки, начиная с 4-го до 16-го дня после инокуляции животных невритогенным материалом. Оказалось, что сыворотки всех животных способны вызывать демиелинизацию *in vitro*, в то время как клетки лимфатических узлов проявляли неспецифическое повреждающее действие.

Особый интерес представляют данные о действии сенсibilизированных лимфоцитов на сингенные культуры. К сожалению, мы не располагаем собственными данными по этому вопросу. Согласно наблюдениям Winkler (1965), Agnason с соавт. (1969) в культуре ганглия тройничного нерва новорожденной крысы инбредной линии Lewis после добавления клеток лимфатических узлов, взятых от больных ЭАП животных той же линии, наблюдается избирательное разрушение миелина. Клетки иммунизированных, но не заболевших полиневритом животных такими свойствами не обладают. Демиелинизирующая активность лимфоцитов появляется не раньше чем через 4 дня после сенсibilизации. Процесс демиелинизации *in vitro* начинается через 24—28 ч после добавления сенсibilизированных клеток в культуру и проявляется распадом миелиновой оболочки на гранулы, которые фагоцитируются макрофагами. Распад миелина обычно завершается в течение суток, но осевые цилиндры поврежденных нервных волокон остаются без изменений. Сенсibilизированные клетки лимфатических узлов, вводимые в культуры, не подвергаются агглютинации и в 60—90% остаются жизнеспособными.

Сходные изменения развиваются в культуре мозжечка под действием клеток лимфатических узлов от крыс с ЭАЭ (В. Б. Гервазиева, 1973).

Winkler (1965) и Agnason и соавт. (1969) показали специфичность миелинотоксического действия лимфоцитов: клетки интактных крыс, которым был введен только адыовант, а также от животных с экспериментальным поражением центральной нервной системы (ЭАЭ) не вызывали разрушения в культурах чувствительных ганглиев.



Однако Agnason полагает, что органная специфичность демиелинизации не является абсолютной; лимфоциты крыс, иммунизированных почкой, в  $\frac{1}{3}$  случаев обладали способностью разрушать миелин. Авторы склонны связать это с возможной антигенной общностью между тканью почки и нерва.

Приведенные выше эксперименты показывают, что при испытании в культуре чувствительного ганглия действия сенсibilизированных лимфоцитов следует учитывать, совпадают ли вид и линия подопытного животного и животного-донора, от которого получали эксплантат. Характер изменений, наступающих под действием гетерологичных, гомологичных и сингенных лимфоцитов, различен: наиболее специфичное и избирательное разрушение миелина наблюдается при исследованиях на животных одной инбредной линии. Выяснение этого вопроса требует специального исследования.

Ряд авторов одновременно изучали миелинотоксическую активность клеток лимфатических узлов и сывороток от одних и тех же крыс с ЭАП и ЭАЭ (Winkler, 1965; Bornstein, Iwanami, 1971). Такие исследования проведены с частыми интервалами, начиная от 3-го до 16-го дня после инокуляции животных невритогенным или энцефалитогенным материалом. Оба фактора (сыворотка и клетки лимфатических узлов) обладают способностью вызывать демиелинизацию *in vitro*. Лимфоциты начинают проявлять миелинотоксическую активность с 4-го дня после инокуляции им энцефалитогенов, а сыворотки этих животных — на день позже. Их миелинотоксическое действие сохраняется с одинаковой частотой около 2 нед, а затем клетки лимфатических узлов теряют миелинотоксическую активность. Действие сывороток может продолжаться значительно более длительное время, иногда до 27 дней (Winkler, 1965; Agnason e. a., 1969; Bornstein, Iwanami, 1971).

После инкубирования клеток лимфатических узлов болеющих ЭАЭ крыс в течение 3 дней в питательной среде надосадочная жидкость приобретает способность вызывать демиелинизацию в культуре. Эти данные показывают, что миелинотоксическое действие клеток лимфатических узлов в культуре мозжечка осуществляется гуморальным путем. Замораживание клеток лимфатических узлов и оттаивание уничтожают эту активность (Bornstein, 1973).



Параллельное изучение миелинотоксических свойств клеток лимфоузлов в культуре и их способности к переносу заболевания от доноров с ЭАЭ к реципиентам проведено Paterson (1966); он показал, что лимфоциты, взятые от крыс-доноров Lewis через 6 дней после сенсibilизации, не переносят ЭАЭ изолированным реципиентам и не обладают миелинотоксическим действием в культуре. Клетки лимфоузлов, собранные от доноров через 9 дней после их сенсibilизации, перенесли ЭАЭ у 3 из 5 реципиентов. Сыворотки от 3 заболевших реципиентов обладали демиелинизирующей активностью в культуре, в то время как сыворотки от 2 других крыс Lewis с отрицательным результатом переноса не вызывали в культуре повреждающего действия на миелин.

Winkler и Arnason (1966) пытались определить активные центры лимфоцитов, за счет которых осуществляется миелинотоксическое действие лимфоцитов крыс с ЭАП. Оказалось, что суспендирование лимфоцитов с кроличьей антисывороткой к крысиному иммуноглобулину А (IgA) предупреждает процесс разрушения миелина. В то же время кроличьи сыворотки против крысиных иммуноглобулинов G, M или  $\alpha_2M$  были в этом отношении неэффективны. Авторы предполагают, что ингибирующее действие антисыворотки зависит от соединения антител к крысиному IgA с активными центрами (молекулами IgA) на поверхности лимфоцитов, предупреждая их взаимодействие с тканевыми антигенами.

Особую систему для изучения действия клеточных факторов при демиелинизирующих процессах в нервной системе предложили Корговски и Fernandes (1962), используя культуру глии. Авторы обнаружили, что лимфоциты от больных ЭАЭ животных находятся в тесной связи с глиальными клетками (олигодендроцитами), вызывая «контактную агглютинацию». Через несколько часов происходят дегенерация и гибель большинства глиальных клеток. Наибольший повреждающий эффект на глиальные клетки отмечен при использовании сенсibilизированных клеток, взятых от доноров на 9-й день после иммунизации крыс энцефалитогенами, тогда как после появления параличей они утрачивают глиотоксические свойства. Эти данные согласуются с наблюдениями Paterson (1966) о наибольшей способности лимфоцитов в этот период переносить ЭАЭ. Сыворотки от больных животных, включая сыворотки от тех же доноров, от



которых испытывали сенсibilизированные клетки, не оказывают цитотоксического действия в культуре глиальных клеток. Клетки лимфатических узлов от крыс, сенсibilизированных только стимулятором Фрейнда после того как они были суспендированы в сыворотке от кроликов с ЭАЭ, начинают вызывать «контактную агглютинацию», в культуре. Эти данные показывают, что сывороточные антитела, по-видимому, ответственны за «контактную агглютинацию» сенсibilизированных клеток. Автор предполагает, что действие стимулятора на лимфоидные клетки способствует адсорбции на их поверхности больших количеств антител.

По данным Berg и Källen (1962), лимфоциты грудного протока и лейкоциты периферической крови кроликов с ЭАЭ обладают глиотоксическим действием на суспензию диссоциированных глиальных клеток. Это наблюдается в период, непосредственно предшествующий появлению первых симптомов ЭАЭ; после начала заболевания испытываемые клетки не активны, в то время как сыворотка больных животных в этот период начинает проявлять глиотоксическое действие. Winkler (1965) наблюдал аналогичные соотношения между действием сыворотки и сенсibilизированных клеток лимфатических узлов.

Лимфоциты и моноциты от больных с рассеянным склерозом также оказывают повреждающее действие на культуры глиальных клеток новорожденных крыс аналогично тому, что имеет место при ЭАЭ (Berg, Källen, 1964); это наблюдалось в 11 из 33 случаев множественного склероза. В контрольных экспериментах эти же клетки от 16 здоровых людей и от 10 — с травмой головного мозга дали отрицательные результаты. Положительные результаты, как правило, получены в острой стадии рассеянного склероза или при его обострении, в то время как при стационарном течении пробы обычно отрицательны.

### **3.5. Диагностическое значение миелинотоксических антител**

Данные о том, что сыворотки людей в остром периоде полиневрита типа Гийена—Барре или рассеянного склероза оказывают миелинотоксическое, а по некоторым данным и глиотоксическое действие, аналогичны наблюдениям над сыворотками животных с ЭАП или ЭАЭ. Эти

сопоставления еще раз говорят о том, что разработанные экспериментальные модели во многом адекватны демиелинизирующим заболеваниям человека.

Cook e. a. (1971) показали, что сыворотки 26 из 31 больных с синдромом Гийена—Барре вызывают первичную демиелинизацию в культурах ПНС. В качестве контроля они исследовали сыворотку от 11 здоровых людей и 41 человека с различными другими неврологическими нарушениями. Миелинотоксическое действие обнаружено только у одного здорового человека и в 14 случаях с различными заболеваниями нервной системы — в основном с острыми и быстро развивающимися патологическими процессами (вирусные энцефалиты, карциномы с метастазами в ЦНС, острые сосудистые заболевания головного мозга). Сыворотки от лиц с хроническими заболеваниями (диабет, алкоголизм и др.) только в единичных случаях обладали миелинотоксическими свойствами. Сходные результаты были получены Dubois-Dalcq с соавт. (1971), которые обнаружили миелинповреждающее действие сывороток у 5 из 6 больных с синдромом Гийена—Барре. Лимфоциты крови от таких больных также вызывают демиелинизацию в культурах тригеминального ганглия (Arnason e. a., 1969).

В культурах периферической нервной ткани О. А. Родштейн и соавт. (1974) также исследовали миелинотоксическое действие сыворотки больных с острым полирадикулоневритом типа Гийена—Барре (11 человек) и больных энцефалополирадикулоневритом (2 человека). Миелинотоксический эффект был обнаружен у 9 из 11 больных первой группы и у обоих — из второй. В то же время в группе больных с сомнительными заболеваниями (5 человек) у четырех были получены отрицательные результаты, а у одного — сомнительные. Эти данные свидетельствуют о диагностическом значении указанного метода исследования.

Обсуждая диагностическое значение обнаруживаемого *in vitro* миелинотоксического действия сыворотки при рассеянном склерозе, некоторые авторы (Kim e. a., 1970) ставят его под сомнение, поскольку в ряде случаев такое же действие имеет место при боковом амиотрофическом склерозе, при некоторых острых вирусных инфекциях и у отдельных здоровых людей.

Для изучения природы демиелинизирующего фактора были подвергнуты исследованию в миелинизированных



культурах мозжечка новорожденных мышей сывороточные глобулины больных рассеянным склерозом. Миелинотоксическая активность была обнаружена как во фракции с константой седиментации 7S, так и во фракции 19S глобулинов (Dowling e. a., 1968). Это позволило предположить, что класс антител, ответственный за демиелинизацию, может меняться в процессе развития заболевания.

По мнению некоторых авторов (Bornstein, 1966; Kim, 1970; Bornstein, 1973), так же как и в экспериментальных условиях, наблюдается избирательное миелинотоксическое действие сывороток людей с демиелинизирующими заболеваниями центральной или периферической нервной системы на соответствующие культуры. Вместе с тем другие исследователи (Cook e. a., 1971; Lumsden, 1971) считают, что сыворотки людей с демиелинизирующими процессами в нервной системе не проявляют такой избирательности действия, какая имеет место в эксперименте. Так, по данным Cook с соавт. (1971), сыворотки от больных полиневритами Ландри—Гийена—Барре вызывают изменения не только в периферической, но и в центральной нервной системе.

В наших исследованиях миелинотоксический эффект найден в 7 из 12 исследованных сывороток больных рассеянным склерозом в культуре чувствительных узлов (О. А. Родштейн и соавт., 1974). Полученные данные указывают, что сыворотки больных с демиелинизирующими заболеваниями центральной нервной системы обладают повреждающим действием на миелин, не только в культуре мозжечка, но и в чувствительных ганглиях; это заслуживает специального изучения. Однако эти наблюдения расходятся с результатами экспериментальных исследований, согласно которым миелинотоксические свойства сывороток животных с поражениями центральной или периферической нервной системы проявляют свое действие *in vitro* строго специфично: в первом случае — только в отношении культур центральной, во втором — периферической нервной системы (Winkler, 1965; Bornstein, 1966; Arpason e. a., 1969).

Hughes и Field (1967) добавляли к миелинизированным культурам мозжечка новорожденных крыс, помимо сывороток больных с рассеянным склерозом, сыворотки от больных параличами центрального происхождения, а также от здоровых людей. Эти исследования показали, что 84% сывороток от больных рассеянным склерозом,

62% — от больных с двигательными расстройствами и 24% — от здоровых людей дали миелинотоксический эффект *in vitro*. Помимо демиелинизации, в культурах были обнаружены также значительные изменения олигодендроцитов. Спинальная жидкость от этих же людей не обладала таким действием. Авторы предполагают, что изменения нейроглиальных клеток в таких культурах являются следствием демиелинизации, а не ее причиной.

Детальное микроскопическое и субмикроскопическое исследование действия сыворотки от больных рассеянным склерозом на культуру спинного мозга эмбрионов мыши показало, что характер развивающихся изменений очень сходен с процессом, возникающим при действии на эксплантаты ЦНС сывороток от животных с ЭАЭ (Raine *et al.*, 1973).



### 3.6. Заключение

Литературные данные о действии сывороток от животных с экспериментальными демиелинизирующими заболеваниями нервной системы и от больных людей, результаты собственных исследований позволяют прийти к выводу, что такие сыворотки вызывают в культурах центральной и периферической нервной ткани характерный процесс демиелинизации, аналогичный тому, который развивается у больных людей и животных и установлен при гистологическом исследовании. Распад миелина происходит первично и не связан с гибелью глиальных клеток.

Изучение действия сывороток от животных и от людей с демиелинизирующими заболеваниями нервной системы дает основание полагать, что речь идет о специфических антителах (иммуноглобулинах), содержащихся в глобулиновой фракции и требующих для своего проявления присутствия комплемента. Миелинотоксическое действие сывороток от животных с экспериментальными демиелинизирующими заболеваниями нервной системы (ЭАЭ и ЭАП) коррелирует с тяжестью заболевания. Сыворотки сенсibilизированных, но не заболевших животных такой активностью не обладают (Bornstein, Appel, 1961 b; Appel, Bornstein, 1964; Agnason e. a., 1969; О. А. Родштейн, Г. В. Коновалов, 1971).

Полученные в эксперименте данные подкреплены аналогичным наблюдением в отношении миелинотоксического действия сывороток больных с первично демиелинизирующими заболеваниями нервной системы. Демиелинизирующее действие сывороток находится в прямой зависимости от выраженности клинической симптоматики и обострения заболевания.

Bornstein (1966), Cook и соавт. (1971), Lumsden (1971) при изучении действия сывороток больных рассеянным склерозом на культуры мозжечка крыс установили высокую степень корреляции между выраженностью этой

болезни и демиелинизирующей активностью сывороток. Миелинотоксические антитела имеют определенное значение при постановке диагноза заболевания.

Динамика выявления миелинотоксических антител при ЭАП (их обнаружение до развития болезни) свидетельствует о возможной причинно-следственной связи их с развитием неврологических симптомов, а корреляция их выявления с тяжестью течения заболевания позволяет предположить их участие в патологическом процессе (усиление заболевания). Вопрос о патогенетическом значении миелинотоксических антител заслуживает серьезного внимания и требует дальнейшего изучения.

В настоящее время остается нерешенным вопрос о том, возникают ли миелинотоксические антитела под влиянием тех же невритогенных антигенов, что и неврологическая симптоматика заболевания, или образование рассматриваемых факторов связано с другими компонентами миелина.

Сыворотки животных, инокулированных тканью белого вещества ЦНС или периферическими нервными волокнами, обладают миелинотоксическим действием, в то время как, по данным отдельных авторов, сыворотки от животных с ЭАЭ, которым введен очищенный основной белок миелина, таким действием не обладают (Seil e. a., 1968, 1973). Вместе с тем до сих пор остается нерешенным вопрос, насколько основные белки миелина, вызывающие ЭАП (Uemura e. a., 1972; Brostoff, Eylar, 1972; Greenfield e. a., 1973) или ЭАЭ (Eylar, 1972), воспроизводят весь симптомокомплекс демиелинизирующих заболеваний, получаемых при введении неочищенных невритогенов и энцефалитогенов, содержащихся в нативных нервах или белом веществе ЦНС. При сравнительном изучении патологического процесса при ЭАЭ частота демиелинизации после введения животным белого вещества спинного мозга, основного белка центрального миелина или энцефалитогенного синтетического полипептида находится в тесной зависимости от вида используемого препарата и развивается соответственно в 90%, 40% и 6% случаев (Hoffman, Gasten, 1973). Следовательно, демиелинизирующее действие очищенных препаратов находится в зависимости от характера биохимической процедуры получения невритогенов и энцефалитогенов (Brostoff e. a., 1973) и по своей активности далеко не всегда соответствует исходным материалам. Поэтому дальнейшее изучение миели-



нотоксического действия сывороток и лимфоцитов от животных с ЭАП и ЭАЭ должно основываться на воспроизведении этих заболеваний с помощью как препаратов миелина, так и его белков и полипептидов, обладающих достаточной демиелинизирующей активностью.

Опыты в культурах нервной ткани показали, что миелинотоксическим действием обладают как клетки лимфатических узлов от больных животных, так и их сыворотки. В экспериментах при изучении действия лимфоцитов следует иметь в виду, что избирательный миелинотоксический эффект наблюдается только в том случае, когда культура нервной ткани и испытуемые лимфоциты получены от сингенных животных. Хотя выяснение роли клеточных и гуморальных факторов при изучении демиелинизирующего процесса вполне обосновано (Venesegeat e. a., 1969; Horst, 1970), важно не забывать, что между гуморальным и клеточным ответом имеется определенная связь (Craddock e. a., 1971; Mills, Cooperbrand, 1971).

## Литература

- Вероман С. А. Изменения шванновских клеток и соединительнотканых элементов нерва в тканевой культуре.— В кн.: Доклады Научной конференции анатомов, гистологов и эмбриологов Эстонии, Латвии и Литвы. Тарту, 1973, с. 305—309.
- Верхоглядова Т. П., Бродский Ю. С. Характеристика степени злокачественности макроглиальных опухолей по данным тканевых культур.— В кн.: Проблемы нейрохирургии. Киев, 1969, с. 214—222.
- Викторов И. В., Перелыгина Т. Л., Хаспеков Л. Г. Исследование развития и дифференцировки чувствительных ганглиев мышечной ткани в условиях органотипической культуры ткани.— В кн.: Функционально-структурные основы систематической деятельности и механизмы пластичности мозга. Вып. 3. М., 1974, с. 156—160.
- Вильнер Б. Я., Пашковская М. И., Лушицкая Н. И. Да параунальной оцэнки мiелiнаутварэня у гасеравых ганглиях нацукоу *in vivo* у культуры ткани *in vitro*.— «Изв. АН Белорусск. ССР. Серия биол.», 1972, № 6, с. 72—81.
- Вильнер Б. Я., Пашковская М. И., Лушицкая Н. И. Исследование процесса демиелинизации в культуре ткани гассерова ганглия крыс.— «Изв. АН Белорусск. ССР. Серия биол.», 1973, № 1, с. 118—122.
- Вильнер Б. Я., Захарова Н. Г., Лушицкая Н. И. и др. Динамика активности сукцинат- и лактатдегидрогеназ в развивающейся *in vitro* культуре ткани тригеминального ганглия крыс.— В кн.: Демиелинизирующие заболевания нервной системы в эксперименте и клинике. Минск, 1975, с. 256—263.
- Гервазиева В. Б. Демиелинизирующее действие иммунных лимфоцитов в культуре нервной ткани.— «Бюлл. exper. биол.», 1973, № 2, с. 55—58.
- Гошева А. Е., Буравлев В. М. Культивирование нервной ткани человека и животных и использование ее при изучении некоторых заболеваний нервной системы.— «Ж. невропатол. и психиатр.», 1972, № 7, с. 1091—1097.
- (Григорьев Л. М.) Grigorjeff L. M. Differenzierung des Nervengewebes auferhalb des Organismus.— «Arch. exp. Zellforsch.», 1931, Bd 11, S. 483—519; 1932, Bd 13, S. 195—220.
- (Догель А. С.) Dogiel A. S. Der Bau der Spinalganglien bei den Säugtieren.— «Anat. Anz.», 1896, Bd 12, S. 140—152.
- (Догель А. С.) Dogiel A. S. Der Bau der Spinalganglien des Menschen und der Säugtieren. Jena, 1908.
- Долго-Сабуров Б. А. Иннервация вен. М.—Л., Медгиз, 1958, 307 с.
- Жаботинский Ю. М. Нормальная и патологическая морфология вегетативных ганглиев. М., Изд-во АМН СССР, 1953, 292 с.



- Жаботинский Ю. М.* Нормальная и патологическая морфология нейрона. Л., «Медицина», 1965, 322 с.
- Жаботинский Ю. М., Иоффе В. И.* Экспериментальные аллергические демиелинизирующие заболевания нервной системы. Л., «Медицина», 1975, 264 с.
- Жаботинский Ю. М., Хай Л. М., Коновалов Г. В.* Экспериментальный аллергический полирадикулоганглионеврит.— Труды I Всесоюзного съезда невропатологов и психиатров. Т. 2. М., 1963, с. 415—426.
- Кнорре А. Г.* Дифференцировка клеточного материала эмбриональных зачатков. Дис. докт. Л., 1949.
- Кнорре А. Г.* Эмбриональный гистогенез. Л., «Медицина», 1971, 268 с.
- Кнорре А. Г., Суворова Л. В.* Основные этапы дифференцировки нейрона.— «Арх. анат.», 1959, № 7, с. 3—18.
- Кокина Н. Н.* Систематогенетическое поведение и созревание нервных элементов в условиях культур *in vitro* — «Успехи физиол. наук», 1974, № 2, с. 93—127.
- Колосов Н. Г.* Иннервация внутренних органов и сердечно-сосудистой системы. М.— Л., Изд. АН СССР, 1954, 266 с.
- Колосов Н. Г.* Нервная система пищеварительного тракта позвоночных и человека. Л., 1968, 171 с.
- Коновалов Г. В., Чумасов Е. И.* Морфология клеток культуры чувствительного узла тройничного нерва.— В кн.: Материалы Научной конференции, посвящ. 50-летию образования СССР. Л., 1972, с. 121—122.
- Коновалов Г. В., Родштейн О. А.* Особенности роста нейронов и шванновских клеток в культуре чувствительного узла тройничного нерва.— «Арх. анат.», 1972, № 11, с. 92—110.
- Коновалов Г. В., Аннанесов Х. Н., Красильникова В. И.* Воспроизведение экспериментального аллергического полиневрита очищенной фракцией миелина.— «Бюлл. exper. биол.», 1969, № 5, с. 110—113.
- Коновалов Г. В., Оленев С. Н., Плесков В. М.* Выделение нейроростового фактора и определение его биологической активности.— «Цитология», 1974, № 10, с. 1268—1273.
- Коновалов Г. В., Хай Л. М., Корнева Е. А.* Влияние разрушения заднего поля гипоталамуса на развитие экспериментального аллергического полиневрита.— «Вестн. АМН СССР», 1971, № 1, с. 60—65.
- Куприянов В. В.* Нервный аппарат сосудов малого круга кровообращения. Л., Медгиз, 1959, 191 с.
- Лаврентьев Б. И.* К вопросу о строении безмякотных нервных волокон и периферических нервных сплетений.— В кн.: Морфология автономной нервной системы. М., 1946, с. 84—95.
- Лаврентьев Б. И.* Чувствительная иннервация внутренних органов.— В кн.: Морфология чувствительной иннервации внутренних органов. М., 1948, с. 5—21.
- (Лазаренко Ф. М.) Lasarenko F. M.* Ein Beitrag zur Morphologie des Wachstums von embryonalen Nervengewebe *in vitro*.— «Arch. exp. Zellforsch.», 1931, Bd 11, S. 550—590.
- Майоров В. Н.* Морфология реактивных состояний вегетативного межнейронного синапса. Л., «Наука», 1969, 152 с.
- Милохин А. А.* Интерорецепторы пищеварительного тракта некоторых низших позвоночных (сравнительно-гистологическое исследование). М.— Л., Изд. АН СССР, 1963, 100 с.

- Михайлов В. П. Рост и превращение *in vitro* покровных клеток сосудистого сплетения мозга.— «Докл. АН СССР», 1938, т. 18, № 2, с. 121—122.
- Оленев С. Н. Дифференцировка нейронов зрительной коры среднего мозга (*tectum opticum*) куриного зародыша.— «Арх. анат.», 1964, № 9, с. 99—109.
- Оленев С. Н. Некоторые нейротропные факторы, влияющие на рост отростков нейробластов в культуре.— «Докл. АН СССР», 1964, т. 158, № 4, с. 953—955.
- Оленев С. Н. (*Olenev S. N.*) Differentiation of nerve elements of chick embryo *tectum opticum* in tissue culture.— *Acta anat. Basel*, 1967, v. 68, p. 68—82.
- Оленев С. В. Дозы и действие ряда фармакологических агентов на рост нейробластов в культуре.— «Арх. анат.», 1969, № 9, с. 19—29.
- Оленев С. Н. Клетки спинального ганглия куриного эмбриона в культуре:— «Труды I Ленинградск. мед. ин-та и Ленинградск. о-ва анатомов, гистологов и эмбриологов, 1971, вып. 3, с. 106—111.
- Оленев С. Н. Типизация и источники развития нервных клеток.— «Арх. анат.», 1972, № 11, с. 59—71.
- Оленев С. Н. Влияние фармакологических препаратов на рост отростков нервных клеток спинального ганглия в культуре.— «Онтогенез», 1973, № 6, с. 603—611.
- Оленев С. Н., Кузнецов А. В., Маркина Е. А. К изучению роли хемотаксиса в нейрогенезе.— «Арх. анат.», 1969, № 1, с. 20—28.
- Оленев С. Н., Быстров В. Д., Воскресенская Л. В. и др. Изучение роста нервных волокон спинального ганглия в культуре с применением перфузионной камеры и микрокино съемки.— «Цитология», 1970, № 6, с. 810—812.
- Плесков В. М., Коновалов Г. В. Выделение, очистка и характеристика белка, вызывающего развитие экспериментального аллергического полиневрита у кроликов.— «Вопр. мед. химии», 1975, № 6, с. 371—374.
- Португалов В. В. Очерки гистофизиологии нервных окончаний. М., Медгиз, 1955, 224 с.
- Пыльдвере К. И. Рост и дифференциация эмбриональных эпендимоглиальных тканей и мозговых оболочек в тканевой культуре. Автореф. дис. докт. Тарту, 1971.
- Пыльдвере К. И. Гистогенез и тканевая специфичность элементов центральной системы по данным тканевых культур.— В кн.: Доклады Научной конференции анатомов, гистологов и эмбриологов Эстонии, Латвии и Литвы, 1969. Тарту, 1973, с. 328—331.
- Равкина Л. И., Горюнова А. Г., Тюфанов А. В. Глиотоксический эффект сыворотки при остром и хроническом экспериментальном аллергическом энцефаломиелите обезьян в органной культуре мозга.— Тезисы докл. 4-й Всесоюзн. конференции по иммунопатологии. Л., 1973, с. 182.
- Родштейн О. А., Коновалов Г. В. Применение метода культур нервной ткани в изучении миелинотоксических антител при экспериментальном аллергическом полиневрите.— «Вестн. АМН СССР», 1971, № 1, с. 55—60.
- Родштейн О. А., Коновалов Г. В. Миелинотоксическое действие сывороток от больных ЭАП животных (исследования в культуре нервной ткани).— В кн.: Экспериментальные аллергические демиелини-



- зирующие заболевания нервной системы. Под ред. Ю. М. Жаботинского, В. И. Иоффе. Л., 1975, с. 61—79.
- Родштейн О. А., Коновалов Г. В., Хай Л. М.* и др. Миелинотоксические антитела в сыворотке кроликов, больных экспериментальным аллергическим полиневритом. — «Вестн. АМН СССР», 1974, № 11, с. 46—49.
- Родштейн О. А., Коновалов Г. В., Черниговская Н. В.* и др. Об обнаружении миелинотоксических антител при поражениях нервной системы в эксперименте и клинике. — В кн.: Иммунология нервных и психических заболеваний. М., 1974, с. 286—288.
- Руководство по культивированию нервных тканей.* Под ред. Б. Н. Вепринцева. М., «Наука», 1976, с. 260.
- Семенов С. П.* Морфология вегетативной системы и интерорецепторов. Л., Изд. ЛГУ, 1965, 158 с.
- Смирнова Н. А., Шунгская В. Е.* Электрофизиологические свойства и метаболические показатели нейронов в условиях культуры ткани. — «Успехи физиол. наук», 1970, № 3, с. 3—29.
- Смиттен Н. А.* Симпато-адреналовая система в филогенезе и онтогенезе позвоночных. М., «Наука», 1972, 347 с.
- Сорокина Л. М., Фишер Р. С., Оленев С. Н.* Развитие холинэстеразной активности мионеврального синапса диафрагмы крысы. — «Цитология», 1973, № 8, с. 1001—1004.
- Троицкая С. А.* Возрастные особенности развития клеток коры кролика в условиях культивирования вне организма. — «Арх. анат.», 1953, № 2, с. 19—26.
- Умаров У. Х.* Дифференцировка чувствительных нейронов спинальных ганглиев у куриных зародышей. — «Арх. анат.», 1969, № 10, с. 77—84.
- Хлопин Н. Г.* Культура тканей. Л., Медгиз, 1940, 241 с.
- Хлопин Н. Г.* Общебиологические и экспериментальные основы гистологии. Л., Изд-во АН СССР, 1946, 491 с.
- Чумасов Е. И.* О структуре периневрия периферической нервной системы. — «Арх. анат.», 1975, № 4, с. 29—34.
- Чумасов Е. И., Коновалов Г. В.* О нервных окончаниях в культурах тригеминального ганглия. — «Докл. АН СССР», 1974, т. 217, № 4, с. 979—981.
- Чумасов Е. И., Рейдлер Я. И.* Хромаффинные клетки околосоердечных параганглиев. — «Арх. анат.», 1973, № 2, с. 68—74.
- Шудло М. М.* Развитие и репаративная регенерация периневрального эпителия. Автореф. дис. канд. Одесса, 1972.
- Шунгская В. Е., Вепринцев Б. Н.* Нервные клетки в культуре ткани (Обзор). — В кн.: Биофизика клетки. М., 1965, с. 239—254.
- Щелкунов С. И.* Об эпителии оболочек центральной и периферической нервной системы. — Тезисы докл. 1-й Белорусск. конференции анатомов, гистологов, эмбриологов и топографоанатомов. Минск, 1957, с. 360—361.
- Яблоновская Л. Я.* Экспериментальные опухоли головного мозга. М., «Медицина», 1967, 175 с.
- Allerand C. D.* Regeneration of synapses on vitro. — «Exp. Neurol.» 1969, v. 25, p. 482—493.
- Allerand C. D., Murray M. R.* Myelin formation in vitro. — «Arch. Neurol. (Chic.)», 1968, v. 19, p. 293—301.

- Allt G.* Ultrastructural features of the immature peripheral nerve.—*«J. Anat (London)»*, 1969, v. 105, p. 283—293.
- Aparicio S., Lumsden C. E., Jennings M.* Electron microscopy of glial reactions observed in CNS cultures.—*«Brain. Res.»*, 1968, v. 7, p. 268—285.
- Appel S. H., Bornstein M. B.* The application of tissue cultures to the study of experimental allergic encephalomyelitis.—*«J. exp. Med.»*, 1964, v. 119, p. 303—312.
- Arnason B. G., Winkler G. F., Hadler N. M.* Cell-mediated demyelination of peripheral nerve in tissue culture.—*«Lab. Invest.»*, 1969, v. 21, p. 1—9.
- Barasa A., Maccotta B., Fillogamo G.* Etude au microscope électronique des prolongements périphériques et centraux des cellules de ganglion péneaux d'embryons de poulet cultivés in vitro.—*«Bull. Ass. Anat. (Nancy)»*, 1970, v. 147, p. 115—122.
- Barasa A., Maccotta B., Fillogamo G., Canavese B.* Azione della vincaleucoblastina sui prolungamenti centrale e periferico dei neuroni del ganglio spinale coltivati.—*«Boll. Soc. Ital. Biol. sper.»*, 1971, v. 48, p. 860—864.
- Benecerraf B., Blochl B., Bloom R. R., Brunner T., David I. R.* Cell-mediated immune responses.—*«WHO techn. report.»*, 1969, N 423.
- Benitez H. H., Murray M. R., Cote L. Y.* Responses of sympathetic chain-ganglia isolated in organotypic culture to agents affecting adrenergic neurons.—*«Exp. Neurol.»*, 1973, v. 39, p. 242—448.
- Berg O., Bergstrand H.* Antibodies with glitoxic effect in sera from rabbits injected with peptide 1—43 of the bovine encephalitogenic protein.—*«Neurobiology»*, 1974, v. 4, p. 191—196.
- Berg O., Källen B.* An in vitro glitoxic effect of serum from animals with experimental allergic encephalomyelitis.—*«Acta path. microbiol. scand.»*, 1962, v. 54, p. 425—453.
- Berg O., Kallen B.* Effect mononuclear block cells from multiple sclerosis patients in neuroglia in tissue culture.—*«J. Neuropath. Exp. Neurol.»*, 1964, v. 23, p. 550—559.
- (Bloom B., Glade P.) Блум Б., Глейд Ф.* Методы изучения in vitro клеточного иммунитета. М. «Медицина», 1974, 303 с.
- Bodlan D.* Development of fine structure of spinal cord in monkey fetuses.—*«J. comp. Neurol.»*, 1968, v. 133, p. 113—166.
- Bornstein M. B.* Immunopathology of the demyelinating disorders: tissue cultures studies.—In: *Immunopathology*. Basel, 1966, p. 374—390.
- Bornstein M. B.* Patterns of development and response of cultured mammalian nerve tissue.—In: *Metabolic compartmentation in the brain*. R. Balazs, J. E. Cremer. (Ed.) London, 1973, p. 267—283.
- Bornstein M. B., Appel S. H.* The application of tissue culture to the study of experimental allergic encephalomyelitis.—*«J. Neuropath. exp. Neurol.»*, 1961a, v. 20, p. 141—147.
- Bornstein M. B., Appel S. H.* Tissue culture studies of experimental «allergic encephalomyelitis» demyelination and remyelination.—*«J. Neuropath. exp. Neurol.»*, 1961b, v. 20, p. 291—292.
- Bornstein M. B., Appel S. H.* The application of tissue culture to the study of experimental allergic encephalomyelitis.—*«J. exp. Med.»*, 1964, v. 119, p. 127—142.
- Bornstein M. B., Appel S. H.* Tissue culture studies of demyelination.—*«Ann. N. Y. Acad. Sci.»*, 1965, v. 122, Art. I, p. 280—286.



- Bornstein M. B., Crain S. M.* Functional studies of cultured brain tissues as related to «demyelinative disorders».—«Science», 1965, v. 148, p. 1242—1244.
- Bornstein M., Iwanami H.* Experimental allergic encephalomyelitis: demyelination activity of serum and sensitized lymph node cells on cultured nerve tissue.—«J. Neuropath. exp. Neurol.», 1971, v. 30, p. 240—248.
- Bornstein M. B., Raine C. S.* Experimental allergic encephalomyelitis: antiserum inhibition of myelination in vitro.—«Lab. Invest», 1970, v. 32, p. 536—542.
- Bornstein M. B., Iwanami H., Lehrer G. M., Breitbart L.* Observations on the appearance of neuromuscular relationships in cultured mouse tissue.—«Z. Zellforsch.», 1968, Bd 92, S. 197—206.
- Brostoff S. W., Eylar E. H.* The proposed amino acid sequence of the T1 protein of rabbit sciatic nerve myelin.—«Arch. Biochem.», 1972, v. 153, p. 2590—2595.
- Brostoff S. M., Wlśniewski H. M., Eylar E. H.* Immunopathologic response in guinea pigs sensitized with peripheral nervous system myelin.—«Brain. Res.», 1973, v. 58, p. 500—505.
- Bunge M. B., Bunge R. P., Peterson E. R.* The onset of synapse formation in spinal cord cultures as studied by electron microscope.—«Brain Res.», 1967, v. 6, p. 728—749.
- Bunge R. P., Bunge M. B., Peterson E. R.* An electron microscope study of culture rat spinal cord.—«J. Cell. Biol.», 1965, v. 24, p. 162—191.
- Bunge M. B., Bunge R. P., Peterson E. R., Murray M. R.* A light and electron microscope study of long-term organized cultures of rat dorsal root ganglia.—«J. Cell. Biol.», 1967, v. 32, p. 439—466.
- Burdman J. A.* Uptake of H<sup>3</sup>-catecholamines by chick embryo sympathetic ganglia in tissue culture.—«J. Neurochem.», 1968, v. 15, p. 1321—1325.
- Cajal R. y.* Histologie du systeme nerveus de l'homme et des vertebres. Vol. 1 and 2. Paris, Maloine, reprinted Madrid, 1909.
- Cajal R. y.* Nouvelles observations dur l'evolution des neuroblastes, avec quelbues remarques sir l'hypothese neurogenetique de Hensen.—«Held. Anat. Anz.», 1908, Bd. 23, s. 1—25; 65—87.
- Celestino da Costa A.* Paraganglions et sympathique.—«Ann. Endocr. (Paris)», 1940, v. 1, p. 337—357, 449—464.
- Cerro del M. P., Snider R. S.* Studies on the developing a cerebellum. Ultrastructure of the growth cones.—«J. Comp. Neurol.», 1968, v. 133, p. 341—362.
- Chamley J. H., Dowel J. J.* Specificity of nerve fibre «attraction» to autonomic effector organs in tissue culture.—«Exp. Cell. Res.», 1975, v. 90, p. 1—7.
- Chamley J. H., Mark G., Campbell G. R., Burnstock G.* Sympathetic ganglia in culture.—«Z. Zellforsch.». 1972, Bd 135, S. 287—314.
- Chen J. S., Chen M. G.* Combined cultures of avian and insect embryonic nervous system.—«Arch Ital. biol.», 1975, v. 109, p. 218—235.
- Cohen A. M.* Factors directing the expression of sympathetic nerve traits in cells of neural crest origin.—«J. exp. Zool.», 1972, v. 179, p. 167—182.

- Cone D. C.* The role of the surface electrical transmembrane potential in normal and malignant mitogenesis. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1974, v. 238, p. 420—435.
- Cook S. D., Dowling F. C., Murray M. R., Whittaker J. N.* Circulating demyelinating factors in acute idiopathic polyneuropathy (Guillain—Barre).—Arch. Neurol. (Chic.)», 1971, v. 24, p. 136—144.
- Courtesy B., Bassler R.* Etude histoautoradiographique de l'incorporation de thymidine, d'uridine et de leucine tritiales dans des cellules nerveuses d'embryon de poulet isolées et cultivées in vitro.—«C. R. Acad. Sci. (Paris)», 1967, v. 264, p. 497—499.
- Craddock C. G., Longmire R., McMillan R.* Lymphocytes and the immune response. Part I. — «New Engl. J. Med.», 1971, v. 285, p. 324—331.
- Crain S. M.* Resting and action potentials of cultured chick embryo spinal ganglion cells.—«J. comp Neurol.», 1956, v. 104, p. 285—330.
- Crain S. M.* Development of organotypic bioelectric activities in CNS tissue during maturation in culture.—«Int. Rev. Neurobiol.», 1966, v. 3, p. 1—45.
- Crain S. M.* Intracellular recording suggesting synaptic function in chick embryo spinal sensory ganglion cells isolated in vitro.—«Brain Res.», 1971, v. 26, p. 188—191.
- Crain S. M., Peterson E. R.* Onset and development and functional connections in explants of rat spinal cord-ganglia during maturation in culture.—«Brain Res.», 1967, v. 7, p. 750—762.
- Crain S. M., Peterson E. R.* Development of specific sensory-evoked synaptic networks in fetal mouse cord-brain stem cultures.—«Science», 1975, v. 188, p. 275—278.
- Cravioto H., Lockwood R.* The behavior of normal peripheral nerve in tissue culture.—«Z. Zellforsch.», 1968, Bd 90, S. 185—201.
- Cravioto H., Palekar L., Weiss E., Bennett K.* Experimental neurofibroma in tissue culture.—«Acta neuropath. (Berl.)», 1972, Bd 121, S. 154—164.
- Deltch A. D., Murray M. R.* The nissl substances of living and fixed spinal ganglion cells.—«J. biophys. biochem. Cytol.», 1956, v. 2, p. 433—444.
- Denefle Y. P.* Interactions en culture de fragments de moelles épinières irradiées et non irradiées par les rayons X—chez le poulet de 7 jours.—«Ann. embryol. morph. gen.», 1972, v. 5, p. 305—313.
- Dixon A. D.* The ultrastructure of nerve fibers in the trigeminal ganglion of the rat.—«J. Ultrastruct. Res.», 1963, v. 8, p. 107—121.
- Dowling P. C., Kim S. U., Murray M. R., Cook S. D.* Serum 19S and 7S demyelinating antibodies in multiple sclerosis.—«Immunology», 1968, v. 101, p. 1101—1104.
- Dubois-Dalcq M., Buyse M., Gorge F.* The action of Guillain—Barre syndrome serum on myelin a tissue culture; an electron microscopic analysis.—«J. neurol. Sci.», 1971, v. 13, p. 67—85.
- Dubois-Dalcq M., Buyse M., Lefebvre N., Sprecher-Goldberger S.* Herpes virus hominis type 2 and intranuclear tubular structures on organized nervous tissue cultures.—«Acta neuropath. (Berl.)», 1972, Bd 22, S. 170—179.



- England J. M., Kadln M. E., Goldstein M. N.* The effect of vincristine sulfate on the axoplasmic flow of proteins in cultured sympathetic neurons.—«*J. Cell Sci.*», 193, v. 12, p. 549—565.
- Eranko O., Eranko L., Hill C. E., Burnstock G.* Hydrocortisone-induced increase in the number of small intensely fluorescent catecholamine content in cultures of sympathetic ganglia of the newborn rat.—«*Histochem. J.*», 1972, v. 4, p. 49—58.
- Eylar E.* The structure and immunologic proteins of myelin (discussion).—«*Ann. N. Y. Acad. Sci.*», 1972, v. 195, p. 491.
- Fillogamo G., Barasa A.* Accrescimento in vitro del prolungamenti periferico e centrale, dei neuroni dei gangli spinali.—«*Boll. Soc. Ital. Biol., sper.*», 1965, v. 41, p. 1112—1114.
- Fornatto L., Schiffer D.* In vitro culture observations on neurinoma induced experimentally in the rat by nitrosourea.—«*Acta neuropath. (Berl.)*», 1972, Bd 20, S. 199—206.
- Galk G. C., Farbman A. I.* The chicken trigeminal ganglion.—«*J. Morphol.*», 1973, v. 141, p. 43—56.
- Gelger R. S.* The behavior of adult mammalian brain cells culture.—«*Int. Rev. Neurobiol.*», 1963, v. 5, p. 1—52.
- Giacobini E.* Biochemistry of synaptic plasticity studies in single neurons.—In: *Advances in biochemical psychopharmacol.* E. Costy, E. Giacobini (Eds.) New York, 1970, v. 2. p. 9—65.
- Ground A.* Misration des fibres nerveuses.—«*Arch. anat. (Strasbourg)*», 1968, v. 51, p. 255—265.
- Godina G.* I rapporti di interdipendenza tra assoni che crescono in vitro studiati in microcinematografia a contrasto di fase.—«*Boll. Soc. Ital. Biol. sper.*», 1956, v. 32, p. 108—111.
- Godina G.* Wachstum und gegenseitige Beziehung der Neuriten bei Explantaten von Spinalganglien.—«*Verh. Anat. Ges.*», 1958, Bd 55, S. 352—353.
- Godina G.* The morphological and structural features of neurons in vitro studied by phase-contrast and time-lapse movies.—In: *Cinematography in cell biology.* G. Rose (ed.). New York, 1963, p. 313—337.
- Grainger F., James D. W.* Association of glial cells with the terminal parts of neurite bundles extending from chick spinal cord in vitro.—«*Z. Zellforsch.*», 1970, Bd 108, S. 93—104.
- Grainger F., James D. W., Tresman R. L.* An electron microscopic study of the early outgrowth form chick spinal cord in vitro.—«*Z. Zellforsch.*», 1968, Bd 90, S. 53—67.
- Greenfield S., Brostoff S., Eylar E. H., Murrell P.* Protein composition of myelin of the peripheral nervous system.—«*J. Neurochem.*», 1973, v. 20, p. 1207—1216.
- Grosse G., Lindner G.* Zur Morphologie der Nervenendigungen des Ganglion Trigeminale vom Huhnerembryo in vitro.—«*Z. mikr.-anat. Forsch.*», 1968, Bd 79, S. 402—410.
- Gullery R. W., Sobkowicz H. M., Scott G. L.* Light and electron microscopical observations of the ventral horn and ventral root in long term cultures of the spinal cord of the fetal mouse.—«*J. comp. Neurol.*», 1968, v. 134, p. 433—476.
- Halpern B., Bakonche P., Martial-Lasfargues C.* Destruction des cellules nerveuses cultivees «in vitro» par les lymphocytes de malades atteints de sclerose en plaques. A propos de la pathoge-

- nie auto-immune de la sclerose en plaque.—«*Press. med.*», 1969, v. 77, p. 2103—2106.
- Hamburger V.* Specificity in neurogenesis. — «*J. cell. comp. Physiol.*», 1962, v. 60, Suppl. 1, p. 81—92.
- Hamburger M., Bornstein M. R.* Myelin synthesis in two demyelinating mutations in mice.—«*Exp. Neurol.*», 1970, v. 28, p. 461—476.
- Harris A. J., Dennis M., J.* Acetylcholine sensitivity and distribution on mouse neuroblastoma cells. — «*Science*», 1970, v. 167, p. 1253—1255.
- Hauw J.-J., Novikoff A. B., Novikoff Ph. M. e. a.* Culture of nervous tissue on collagen in leighton tubes.—«*Brain Res.*», 1972, v. 37, p. 301—309.
- Hermetet S. C., Treska J.* Culture de neurones esoles.—«*J. physiol. (Paris)*», 1969, v. 61, p. 313—314.
- Hild W.* Observations on neurons and neuroglia from the area of the mesencephalic fifth nucleus of the cat in vitro.—«*Z. Zellforsch.*», 1957, Bd 47, S. 127—146.
- Hild W.* Das Neuron. Mollendorff Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen.—In: Nervensystem. Berlin, 1959, Bd 4, Teil 4, S. 1—184.
- Hirano A., Cook S. D., Whitaker J. W. e. a.* Fine structural aspects demyelination in vitro: the effects of Guillain—Barre serum.—«*J. Neuropath. exp. Neurol.*», 1971, v. 30, p. 243—265.
- Hösli L.* Die Nervengewebekultur—eine Modell zur Untersuchung synaptischer Mechanismen in Zentralnervensystem.—«*Bull. schweiz. Akad. med. Wiss.*», 1974, Bd 30, S. 21—38.
- Hösli L., Andres T. F., Hösli E.* Effects of glycine on spinal neurones grown in tissue culture.—«*Brain Res.*», 1971, v. 34, p. 399—402.
- Horst A.* Differentiation of cells involved in immune reactions.—«*Ann. Immunol.*», 1970, v. 2, p. 91—103.
- Hughes A.* The growth of embryonic neurites. A study on cultures of chick neural tissues.—«*J. Anat. (London)*», 1953, v. 78, p. 150—162.
- Hughes D., Field E. J.* Myelotoxicity of serum and spinal fluid in multiple sclerosis: a critical assesement.—«*Clin. exp. Immunol.*», 1967 v. 2, p. 295—309.
- Ieraldi L. A., Cataldi E.* Attivata dell acetilcolinesterasi nel cervello di pollo coltivato in vitro.—«*Atti Acad. Nazionale Lincei. Rendiconti Serg. Classe sci. fis. mat e natur.*», 1972, v. 53, p. 214—216.
- James D. M., Tresman R. L.* Synaptic profiles in the outgrowth from chick spinal cord in vitro.—«*Z. Zellforsch.*», 1969, Bd 101, S. 598—606.
- Jaros G., Sepsenbrenner M., Wittendorp E. e. a.* Etude trace-autoradiographique de la proliferation des cellules nerveuses en culture.—«*C. R. Acad. Sci (Paris)*», 1974, v. 279, p. 1101—1104.
- Kabat E. A., Wolf A., Bezer A. E.* The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants.—«*J. exp. Med.*», 1947, v. 85, p. 117—130.
- Kano M., Shimada Y.* Innervation and acetylcholine sensitivity of skeletal muscle cells differentiated in vitro from chick embryo.—«*J. cell Physiol.*», 1971, v. 78, p. 233—242.



- Kapel O.* Einige Untersuchungen über das Verhalten des Epithels in vitro.—«Arch. exp. Zellforsch.», 1929, Bd 8, S. 35—129.
- Kim S. U.* Neurons in tissue culture. Observations on terminal boutons in cultures of mammalian central nervous tissue.—«Arch. Histol. Jap.», 1965, v. 25, p. 371—386.
- Kim S. U., Wenger E. L.* Morphological and enzyme histochemical studies of dissociated chick neural tube cultured in vitro.—«J. Neurobiol.», 1973, v. 4, p. 515—523.
- Kim S. U., Murray M. R., Tourtellotte W. W., Parker J. A.* Demonstration in tissue culture of myelinotoxicity in cerebrospinal fluid and brain extracts from multiple sclerosis patients.—«J. Neuropath. exp. Neurol.», 1970, v. 29, p. 420—431.
- Klatzo I., Maxwell M.* Observations on pinocytosis in nervous tissue.—«J. Neuropath. exp. Neurol.», 1960, v. 19, p. 475—487.
- Krasnicka Z.* Morfologia i histochemia neuronów zwojów międzykręgowych w warunkach hodowli trankowej w rozwoju zarodkowym.—«Neuropath. pol.», 1969, v. 7, p. 395—434.
- Krasnicka Z., Renkawk K.* Wpływ krótkotrwałej anoksji na obraz morfologiczny i histochemiczny tkanki klejowej hodowanej in vitro.—«Neuropat. pol.», 1972, v. 10, p. 507—518.
- Krasnicka Z., Konowalow H., Cyjkowska B.* Wpływ krótkotrwałego niedotlenienia na zwoje kręgowce hodowane in vitro.—«Neuropat. pol.», 1974, v. 12, p. 357—370.
- Krasnicka Z., Mossakowski M. J., Renkawk K.* Morphologie et histochimie de neurones de ganglions spinaux cultivés in vitro dans les conditions d'anoxie.—«Neuropat. pol.», 1962, v. 9, p. 93—100.
- Kreusberg G.* Growth of nerve from embryonic ganglia cells. Histochemical studies on tissue culture.—«Folia histochem. cytochem.», 1963, v. 1, Suppl. 1, p. 20—21.
- Lamont M. D., Vernon C. A.* The migration of nervous from chick embryonic dorsal root ganglia in tissue culture.—«Exp. Cell. Res.», 1967, v. 47, p. 661—662.
- Lamoureux G., Boulay G., Borduas A. G.* A cytotoxic antibody for cultured nervous tissue in serum and cerebrospinal fluid from rhesus monkeys with allergic encephalomyelitis.—«Clin. exp. Immunol.», 1966, v. 1, p. 307—321.
- Landmesser L., Pilar G.* Synapse formation during embryogenesis on ganglion cells lacking a periphery.—«J. Physiol. (Lond.)», 1974, v. 241, p. 715—736.
- Langley J. N.* Das autonome Nervensystem. Berlin, 1922.
- Levi G.* Explantation, besonders die Struktur und die biologischen Eigenschaften der in vitro gezüchteten Zellen und Gewebe.—«Z. Anat. Entwickl.-Gesch.», 1934, Bd 31, S. 125—707.
- Levi G.* Il compartimento dei componenti elementari del tessuto nervoso coltivati fuori dell'organismo.—«Ricerca Sci.», 1956, v. 26, p. 1668—1677.
- Levi-Montalcini R., Angeletti P. U.* Nerve growth factor.—«Physiol. Rev.», 1968, v. 48, p. 534—569.
- Lindner G., Grosse G.* Untersuchungen zur Variabilität der strukturbildenden Elemente der Struktur Elemente des in vitro kultivierten Ganglion trigeminale von Hühnerembryo.—«Z. mikr-anat. Forsch.», 1970, Bd 82, S. 537—556.
- Lumsden C. E.* Aspects of neurite outgrowth in tissue culture.—«Anat. Rec.», 1951, v. 110, p. 145—180.



- Lumsden C. E.* Tissue culture in neuropathology.—In: Pathology of the nervous system. J. Minckler. (Ed.). New York, 1968, v. 1, p. 240—263.
- Lumsden C. E.* The immunogenesis of the multiple sclerosis plaque.—«Brain Res.», 1971, v. 28, p. 365—390.
- Luse S. A.* Phase contrast microscopy.—In: Pathology of the nervous system. J. Minckler (Ed.). New York, 1968, v. 1, p. 130—140.
- Marsh J., Beams W.* In vitro control of growth chick nerve fibres by applied electric currents.—«J. cell. Comp. Physiol.», 1946, v. 27, p. 139—157.
- Masurovsky E. B., Bunge M. B., Bunge R.* Cytological studies of organotypic cultures of rat dorsal root ganglia following F-irradiation in vitro.—«J. Cell Biol.», 1967, v. 32, p. 497—513.
- May R. M., Courtey B., Deneffe J. P.* Observations in vivo de la transformation des medulloblastes en neurocytes chez l'embryon de poulet.—«C. R. Acad. Sci. (Paris)», 1961, v. 252, p. 4043—4045.
- May R. M., Deneffe J. P., Courtey B.* Distribution differentielle des acetylcholinesterases dans les fibres nerveuses d'embryons de poulet cultivees in vitro.—«Ann. Histochem.», 1966, v. 11, p. 19—26.
- Meyer U., Wendk H.* Zum Verhalten von Oxydoreduktasen in Langzeitkulturen dissociierter Trigeminalganglienzellen von Hungerembryo.—«Z. mikr.-anat. Forsch.», 1973, Bd 87, S. 308—324.
- Meyer U., Grosse G., Wenk H.* Zur Chemodifferenzierung des in vitro kultivierten Ganglion trigeminale.—«Acta histochem.», 1973, Bd 47, S. 132—147.
- Mihalik P. V.* Über die Nervengewebekulturen mit besonderer Berücksichtigung der Neuronenlehre und der Mikrogliafrage.—«Arch. exp. Zellforsch.», 1935, Bd 17, S. 119—176.
- Mihalik P. V.* Untersuchungen über die Entwicklung des sympathischen Nervensystem.—«Anat. Anz.», 1940, Bd 89, S. 241—296.
- Miller R., Varon S., Kruger L. e. a.* Formation of synaptic contacts on dissociated chick embryo sensory ganglion cells in vitro.—«Brain Res.», 1970, v. 24, p. 356—358.
- Mills J. A., Cooperbrand S. R.* Lymphocyte physiology.—«Ann. Rev. Med.», 1971, v. 22, p. 185—220.
- Mire Y. Y., Hendelman W. Y., Bunge R. P.* Observations on a transient phase of focal swelling in degenerating unmyelinated nerve fibers.—«J. Cell Biol.», 1970, v. 45, p. 9—22.
- Miyake A., Fujita S.* Growth pattern of «matrix cells» of the central nervous system and formation of tubular structures simulating neural tubes in cultures of human brain.—«Arch. Histol. Jap.», 1962, v. 22, p. 117—121.
- Model P. G., Bornstein M. B., Crain C. M., Pappas G. D.* An electron microscopic study of the development of synapses in cultured fetal mouse cerebrum continuously exposed to xylocaine.—«J. Cell. Biol.», 1971, v. 49, p. 362—371.
- Mossa S.* Ulteriori studi sulla velocità di accrescimento dei neuriti coltivati «in vitro».—«Arch. exp. Zellforsch.», 1927, Bd 4, S. 188—205.
- Mossa S.* Ulteriori studi sulla rigenerazione dei neuroblasti, dei ganglii spinali di embrioni di pollo coltivate «in vitro».—«Arch. exp. Zellforsch.», 1929, Bd 7, S. 413—443.



- Mossakowski M., Borowicz S. W., Krasnicka Z., Gajkowska B.* Ultrastructure of Opalski cells cultured in vitro.—«Acta neuropath. (Berl.)», 1971, Bd 19, S. 301—306.
- Mossakowski M., Krasnicka Z., Renkawek K.* Contribution des études des cellules d'Opalski à la connaissance de la pathogenèse de lésions du système nerveux central dans les maladies hépatocérébrales.—«Neuropat. pol.», 1972, v. 10, p. 385—394.
- Murray M. R.* Factors bearing on myelin formation in vitro.—In: *Biology of Myelin*, ed. Korcy L., 1959, p. 201—220.
- Murray M. R.* Nervous tissue in vitro.—In: *Cells and Tissues in Culture*. E. N. Willmer, ed. Acad. Press. Inc. N. Y., 1965, p. 313.
- Murray M. R.* Nervous tissues isolated in culture. *Acta Neurochem.*, 1971, v. 5, p. 375—438.
- Murray M. R.* Myelin formation and neuron histogenesis in tissue culture.—In: *Comparative neurochemistry*. D. Richter (Ed.), London, 1964, p. 49—58.
- Murray M. R., Stout A. P.* Adult human sympathetic ganglion cells cultivated in vitro.—«Am. J. Anat.», 1947, v. 80, p. 225—279.
- Nakal J.* Dissociated dorsal root ganglia in tissue culture.—«Am. J. Anat.», 1956, v. 99, p. 81—131.
- Nakal J.* Studies on the mechanism determining the course of nerve fibers in tissue culture.—«Z. Zellforsch.», 1960, Bd 52, S. 427—449.
- Nakal J., Kawasaki Y.* Studies on the mechanism determining the course of nerve fibers in tissue culture.—«Z. Zellforsch.», 1959, Bd 51, S. 108—122.
- Nakajama S.* Selectivity in fasciculation of nerve fibers in vitro.—«J. comp. Neurol.», 1965, v. 125, p. 193—204.
- Nelson P. G.* Nerve and muscle cells in culture.—«Physiol. Rev.», 1975, v. 55, p. 1—61.
- Obata K.* Transmitter sensitivities of some nerve and muscle cells in culture.—«Brain Res.», 1974, v. 73, p. 71—88.
- Oh T. H., Johnson D. D.* Effects of acetyl- $\beta$ -methylcholine on development of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in cultured chick embryonic skeletal muscle.—«Exp. Neurol.» 1972, v. 37, p. 360—370.
- Oh T. H., Johnson D. D., Kim S. U.* Neurotrophic effect on isolated chick embryo muscle in culture.—«Science», 1972, v. 178, p. 1298—1300.
- O'Lague P. H., Obata K., Claude P. e. a.* Evidence for cholinergic synapses between dissociated rat sympathetic neurons in cell culture.—«Proc. nat. Acad. Sci. USA», 1974, v. 71, p. 3602—3606.
- Olivo O.* Migrazione di elementi nervosi coltivati in vitro.—«Arch. exp. Zellforsch.», 1927, Bd 4, S. 43—63.
- Olson M. I., Bunge R. P.* Anatomical observations on the specificity of synapse formation in tissue culture.—«Brain Res.», 1973, v. 59, p. 19—33.
- Orr M. F.* Development of acoustic ganglia in tissue cultures of embryonic chick otocysts.—«Exp. Cell Res.», 1965, v. 40, p. 68—77.
- Palacios O., Pette E.* Zur Frage der Erzeugung einer Allergischen Polyneuritis in Kaninchen mit Schwannschen Zellgewebe—kultur Antigen.—«Z. Immun.-Forsch.», 1964, Bd 122—124.

- Partlow L. M., Larrabee M. G.* Effects of a nerve—growth factor, embryo age and metabolic inhibitors on growth of fibres and on synthesis of ribonucleic acid and protein in embryo sympathetic ganglia.—«*J. Neurochem.*», 1971, v. 18, p. 2101—2118.
- Paterson P.* Experimental allergic encephalomyelitis and autoimmune disease.—«*Adv. Immunol.*», 1966, v. 5, p. 131—206.
- Perl D. P., Callaway C. S., Hicklin M. D.* An ultrastructural study of Negri bodies in experimental rabies following prolonged incubation period.—«*J. Neuropath. exp. Neurol.*», 1972, v. 31, p. 172—173.
- Peters A., Palay S. L., Webster H. F.* The cells and their processes.—In: *The fine structure of the nervous system*. New York, 1970, p.70—88.
- Peterson E. R., Murray M. R.* Myelin sheath formation in cultures of avian spinal ganglia.—«*Am. J. Anat.*», 1955, v. 96, p. 319—356.
- Peterson E. R., Murray M. R.* Patterns of peripheral demyelination in vitro.—«*Ann. N. Y. Acad. Sci.*», 1965, v. 122, p. 39—50.
- Peterson E. R., Crain S. M., Murray M. R.* Activities of schwann cells during myelin formation in vitro.—«*Anat. Rec.*», 1958, v. 130, p. 357.
- Pettit D. R., Kiernan J. A.* Experimental allergic encephalomyelitis in the rat: histopathological studies and the effects of sera on adult cerebellar organ culture.—«*Acta neuropath. (Berl.)*», 1974, v. 27, p. 83—91.
- Pomeroy C. M., Hendelman C. W., Ralborn J., Massey J. F.* Dynamic activities of nervous tissue in vitro.—In: *The neuron*. Hyden H. (Ed.) London, 1967, p. 119—178.
- Prasad K. N.* Differentiation of neuroblastoma cells in culture.—«*Biol. Rev.*», 1975, v. 50, p. 129—167.
- Privat A., Drian M. Y.* A propos d'un effet allegue du veronal sur le tissue nerveux en culture organotypique.—«*C. R. Soc. Biol. (Paris)*», 1970, v. 164, p. 14—16.
- Privat A., Drian M. Y., Gruner Y. E.* Retardation in the outgrowth of dysmature rat cerebellum, cultivated in vitro.—«*Biol. Neonat. (Basel)*», 1972, v. 20, p. 414—424.
- Raine C. S., Bornstein M. B.* Experimental allergic encephalomyelitis: an ultrastructural study of experimental demyelination in vitro.—«*J. Neuropath. exp. Neurol.*», 1970, v. 29, p. 177—191.
- Raine C. S., Bornstein M. B.* Experimental allergic encephalomyelitis: a light and electron microscopic study of remyelination and «sclerosis» in vitro.—«*J. Neuropath. exp. Neurol.*», 1970, v. 29, p. 552—574.
- Raine C. S., Feldman L. A., Sheppard R. D., Bornstein M. B.* Subacute sclerosing panencephalitis virus in cultures of organized central nervous tissue.—«*Lab. Invest.*», 1973, v. 28, p. 627—640.
- Raine C. R., Hummerland A., Swanson E., Bornstein M. B.* Multiple sclerosis: serum induced demyelination in vitro. A light and electron microscopic study.—«*J. Neurol. Sci.*», 1973, v. 20, p. 127—148.
- Rennels M. L., Hild W.* Morphological alterations in mammalian neurons in vitro in response to hypertonic solutions.—«*Z. Zellforsch.*», 1965, Bd 67, S. 620—635.
- Röhlisch P., Knoop A.* Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Hüllen des N. ischiadicus der Ratte.—«*Z. Zellforsch.*», 1961, Bd 53, S. 299—312.



- Roizin L., Schneider J., Willson N. e. a.* Effects of prolonged LSD-25 administration upon neurons of spinal cord ganglia tissue cultures.—«*J. Neuropath. exp. Neurol.*», 1974, v. 33, p. 212—225.
- Rose A. S., Pearson D. M. (Ed.)* Mechanisms of demyelination. New York—Toronto—London, 1963.
- Ross L. L., Bornstein M. B.* An electron microscopic study of synaptic alterations in cultured mammalian central nervous tissues, exposed to serum from animals with experimental allergic encephalomyelitis.—«*Lab. Invest.*», 1969, v. 20, p. 26—55.
- Sanes J. R., Okun L. M.* Induction of DNA synthesis in cultured neurons by ultraviolet light or methyl methane sulfonate.—«*J. Cell. Biol.*», 1972, v. 53, p. 587—590.
- Sano Y., Odake G., Yonezawa R.* Fluorescence microscopic observation of catecholamines in cultures of the sympathetic chains.—«*Z. Zellforsch.*», 1967, Bd 8, S. 345—352.
- Santoli D., Wroblewska Z., Gilden D. H. e. a.* Human brain in tissue culture. III. PML-SV-40 induced transformation of brain cells and establishment of permanent lines.—«*J. comp. Neurol.*», 1975, v. 161, p. 317—328.
- Scott B. S., Engelbert V. E., Fischer K. C.* Morphological and electrophysiological characteristics of dissociated chick embryonic spinal ganglion cells in cultures.—«*Exp. Neurol.*», 1969, v. 25, p. 230—248.
- Seeds N. W.* Differentiation of aggregating brain cell culture.—In: Tissue culture of nervous system. S. Sato (Ed.). New York., 1974, p. 35—53.
- Seil F. J.* Neuronal groups and fibres pattern in cerebellar tissue culture.—«*Brain Res.*», 1972, v. 42, p. 33—51.
- Seil F. J., Lampert P. W., Klatzo J.* The in vitro demyelinating activity of sera from guinea pigs sensitized with whole CNS and with purified encephalitogen.—«*Exp. Neurol.*», 1968, v. 22, p. 545—555.
- Seil F. J., Rauch H. C., Einstein E. R., Hamilton A. E.* Myelination inhibition factor: its absence in sera from subhuman primates sensitized with myelin basic protein.—«*J. Immunol.*», 1973, v. 111, 96—100.
- Shantha T. R., Bourne G. H.* The perineural epithelium—a new concept. The Structure and Function of Nervous Tissue. Acad. press. N. Y.—London, 1968, p. 380—459.
- Shein H. M.* Propagation of human fetal cultures.—«*Exp. Cell. Res.*», 1965, v. 40, p. 554—569.
- Shimada Y., Piddington R., Moscona A.* Experimentally induced increases in glutamine synthetase in the optic tectum in the embryo, and in culture.—«*Exp. Cell Res.*», 1967, v. 48, p. 240—243.
- Silberger D. H., Schutta H. S.* The effects of unconjugated bilirubin and related pigments on cultures of rat cerebellum.—«*J. Neuropath. exp. Neurol.*», 1967, v. 26, p. 572—583.
- Sobkowitz H. M., Bereman B., Rose J. E.* Organotypic development of the organ of Corti in culture.—«*J. Neurocytol.*», 1975, v. 4, p. 543—572.
- Sobkowitz H. M., Gullery R. W., Bornstein M. B.* Neuronal organization in long term cultures of the spinal cord of the fetal mouse.—«*J. comp. Neurol.*», 1968, v. 132, p. 365—396.

- Stern Y.* The induction of ganglioside storage in nervous system cultures.—«Lab. Invest», 1972, v. 26, p. 508—514.
- Stern Y.* The formation of sulfatide inclusions in organized nervous tissue culture.—«Lab Invest.», 1973, v. 28, p. 87—95.
- Tanabe M.* Effects of ionizing radiations on central nervous system in tissue culture.—«Nippon Acta Radiolbiol.», 1969, v. 29, p. 633—646.
- Tennison V. M.* The fine structure of the axon and growth cone the dorsal root neuroblast of the rabbit embryo.—«J. Cell. Biol.», 1970, v. 44, p. 62—79.
- Tischner K., Korr H.* Inkorporation von  $^3\text{H}$ -Leucin in Wachstumspitzen von Spinalganglien in vitro.—«Naturwissenschaften», 1972, Bd 59, S. 172—174.
- Tischner K., Thomas E.* Development and differentiation of fetal rat sensory ganglia and spinal cord segments in vitro. An enzyme histochemical study.—«Z. Zellforsch.», 1973, Bd 144, S. 339—351.
- Uemura K., Tobari C., Hurano S., Tsukada Y.* Comparative studies on the myelin proteins of bovine peripheral nerve and spinal cord.—«J. Neurochem.», 1972, v. 19, p. 2607—2614.
- Utakoji T., Hsu T. C.* Nucleic acid and protein synthesis of isolated cells from chick embryonic spinal ganglia in culture.—«J. exp. Zool.», 1965, v. 158, p. 181—202.
- Varon S., Raiborn C.* Dissociation of chick embryo spinal ganglia and the effects on cell yields by the mouse nerve growth factor protein.—«Neurobiology», 1972, v. 2, p. 106—122.
- Vernadakis A.* Effects of chlorpromazine on nerve tissue in culture.—«Experientia», 1970, v. 26, p. 171—172.
- Webster H., Martin J., R., O'Connell M.* The relationships between interphase Schwann cells and axons before myelination a quantitative electron microscopic study.—«Develop. Biol.», 1973, v. 32, p. 401—416.
- Weiss P.* Neurogenesis.—In: Analysis of development. New York, 1955, p. 346—401.
- Weiss P.* «Neuronal dynamics.—Neurosci Res. Progr. Bull.», 1967, v. 5, p. 371—400.
- Wender M., Kozik M., Wojciszewski T.* Enzyme histochemistry of the myelination gliosis.—«Neuropat. pol.», 1969, v. 7 p. 245—250.
- Williams T. H., Palay S. L.* Ultrastructure of the small neurons in the superior cervical ganglion.—«Brain Res.», 1969, v. 15, p. 17—34.
- Wilson A. S., Silva D. G.* Ultrastructure of the phrenic nerve.—«Nature», 1965, v. 208, p. 707—708.
- Winkler G. F.* In vitro demyelination of peripheral nerve induced with sensitized cells.—«Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1965, v. 122, Art. 1, p. 287—296.
- Winkler G. F., Arnason B. G.* Antiserum to immunoglobulin A: inhibition of cell-mediated demyelination in tissue culture.—«Science», 1966, v. 155, p. 75—76.
- Winkler G. F., Wolf M. K.* The development and maintenance of myelinated tissue cultures of rat trigeminal ganglion.—«Am. J. Anat.», 1966, v. 119, p. 179—198.
- Wolf M. K.* Differentiation of neuronal types and synapses in myelinating cultures of mouse cerebellum.—«J. Cell. Biol.», 1964, v. 22, p. 259—279.



- Wolf M. K.* Anatomy of cultured mouse cerebellum.—«*J. comp. Neurol.*», 1970, v. 140, p. 281—298.
- Wolf M. K., Dubois-Dalcq M.* Anatomy of cultured mouse cerebellum. Golgi and electron microscopic demonstrations of granule cells, their afferent and efferent synapses.—«*J. comp. Neurol.*», 1970, v. 140, p. 261—280.
- Wolf M. K., Holden A. B.* Tissue culture analysis of the inherited defect of central nervous system myelination in jimpy mice.—«*J. Neuropath. exp. Neurol.*», 1969, v. 28, p. 195—213.
- Wroblewska Z., Delvin M., Gildea D. H. et al.* Human brain in tissue culture. II. Studies of long-term cultures.—«*J. comp. Neurol.*», 1975, v. 161, p. 307—316.
- Yamada K. M., Spooner B. S., Wessels N. K.* Ultrastructure and function of growth cones and axons of cultured nerve cells.—«*J. Cell Biol.*», 1971, v. 49, p. 614—635.
- Yonezawa I., Ishihara J., Matsuyama H.* Studies on experimental allergic peripheral neuritis.—«*J. Neuropath. exp. Neurol.*», 1968, p. 453—463.

**Culture of the sieve — tissue.** Edited by prof. Yu. M. ZHABOTINSKY. Moscow, Publishing House «Meditsina», 1977, pp. 183, illustrated.

The monograph is devoted to problems of morphology and differentiation of central and peripheral nervous system tissue in organotypical cultures and the utilization of these cultures for studying the pathogenesis and diagnostics of human demyelination diseases. The first chapter is devoted to growth peculiarities (on the example of different divisions of the nervous system) of neuronal elements in different stages of maturity, medulloblasts, ganglioblasts, neuroblasts and neurons. The second chapter is a detailed treatment of the questions of growth and migration sequence of different cellular elements of the peripheral nervous system (on the example of trigeminal ganglion), their differentiation in tissue culture, the formation of nerve fibers and the process of myelination, the formation of different nerve endings, and others. The third chapter deals with the important role of nerve—tissue culture in the study of pathogenesis and diagnostics of human nervous system demyelination diseases, such as polyradiculoneuritis of the Guillain—Barre type and multiple sclerosis.

The monograph is intended for histologists, embryologists and pathomorphologists (fig.—51, tables—1, reference works—289).



15

8

## Оглавление

Предисловие . . . . .	3
Глава 1. Дифференциация нервной ткани в культуре. С. И. Оленев . . . . .	5
Глава 2. Морфология чувствительных ганглиев в культуре. Е. И. Чумасов, Г. В. Коновалов . . . . .	63
Глава 3. Применение культур нервной ткани для изучения демиелинизирующих заболеваний нервной системы. Г. В. Коновалов, О. А. Родштейн . . . . .	128
Литература . . . . .	167

ИБ № 405

### КУЛЬТУРА НЕРВНОЙ ТКАНИ

Редактор издательства Л. В. Левушкина  
Художественный редактор В. А. Григорьевская  
Корректор Л. В. Стырова  
Техн. редактор З. А. Савельева  
Обложка художника Е. Самойлова

Сдано в набор 28/XII 1976 г. Подписано к печати 20/VI 1977 г. Формат бумаги 84×108<sup>1/32</sup> 5,75 печ. л. (условных 9,66 л.) 10,26 уч.-изд. л. Бум. тип. № 1. Тираж 3900 экз. Т-09525. МН-71. Заказ № 5300. Цена 1 р. 40 к.

Издательство «Медицина». Москва, Петроверигский пер., 6/8  
Типография издательства «Горьковская правда», г. Горький, ул. Фигнер, 32.

1 р. 40 к.

Медицина 1977