

ВАСЯГИНА НАДЕЖДА ЮРЬЕВНА

**ПРИЖИЗНЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ТРАВМАТИЧЕСКОЙ РЕТРАКЦИИ НЕРВНЫХ ОТРОСТКОВ И ЕЕ
ИНГИБИРОВАНИЕ**

03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2013

Работа выполнена в лаборатории функциональной морфологии и физиологии нейрона Института физиологии им. И.П. Павлова РАН

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
заслуженный деятель науки РФ,
профессор
Сотников Олег Семенович

Официальные оппоненты:

Пушкарев Юрий Петрович, доктор биологических наук, профессор кафедры нормальной физиологии Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета.

Даринский Юрий Анатольевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой анатомии и физиологии человека и животных Российского государственного педагогического университета имени А.И. Герцена

Ведущая организация:

**Санкт-Петербургский
государственный университет**

Защита диссертации состоится "30" сентября 2013 года в _____ часов на заседании Диссертационного Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций (Д 002.020.01) при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН по адресу: 199034, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6).

Автореферат разослан "___" _____ 2013 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор биологических наук

Н.Э. Ордян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Нейрон – высокоспециализированная клетка, основной функцией которой является генерация, передача и обработка нервных импульсов. Поэтому преобладающее большинство исследований нейрофизиологов направлено на изучение количественно регистрируемых электрических нервных процессов, при этом важнейшие неэлектрические функции нейрона остаются изученными недостаточно.

Так в значительной мере происходит и с двигательной активностью нейрона, которая играет важную роль не только на ранних этапах онтогенеза, но и на протяжении всей жизни организма в норме и при патологии. Поэтому исследование двигательной активности структурных элементов нейрона является современной и актуальной научной темой.

Актуальность проблемы морфо-физиологического исследования живых травмированных нейронов состоит также в том, что это реальная возможность дополнить существующие представления о строении нейрона в статике данными, о его структурной кинетике: механизмах сокращения нервных отростков, ретрактивных потенциях нейритов, эффектах различных фармакологических веществ на сократительную активность (Yar, Spenser, Winlow, 1993; Kranenburg, Poland, Gebbink et al., 1997; Wong, Lichtman, 2003).

Мало исследовано поведение отростков нейронов после их травмы, адаптационный период травмированных нейронов, различные формы сократительной активности отростков, зависимость вектора сокращения нейрита от топографии зоны адгезии, латентный период и время протекания реакции сокращения.

Знание структурных деталей поведения живых нейронов в различных неадекватных условиях имеет прямое отношение к раскрытию конкретных патологических механизмов (Sengottuvel, Fischer, 2011). Этим весьма актуальным вопросам и будет посвящена настоящая диссертация.

Цель работы: Исследование механизмов ретракции травмированных нервных отростков живых изолированных нейронов, способов ее блокирования, влияния ингибиторов цитоскелета на электрогенез нервных клеток.

Задачи исследования:

- 1) изучить состояние исходного изолированного препарата: тела нейрона и его отростков после их обработки проназой и диссоциации;
- 2) изучить механизм сократительной активности живых травмированных нервных отростков, формирования двунаправленного тока массы аксоплазмы и его зависимость от зоны адгезии;
- 3) проанализировать действие бескальциевой среды и блокатора Ca^{2+} -каналов (нимодипин) на ретракцию аксонов;
- 4) исследовать роль цитоскелетных белков актина, миозина, тубулина в механизме травматической ретракции волокон с помощью ингибиторов их полимеризации цитохалазина В, блеббистатина, колхицина;
- 5) проанализировать изменение электрофизиологических параметров нейромембраны под воздействием бескальциевой среды, блокатора Ca^{2+} -каналов и ингибиторов полимеризации белков цитоскелета.

Научная новизна исследования. Используя эксперименты на одиночных изолированных волокнах, соединенных с телами нейронов удалось выявить некоторые неизвестные ранее закономерности ретракции волокон: 1) показать зависимость направления движения концов

сокращающегося препарата в сторону его максимальной адгезии, 2) показать, что транслокация аксоплазмы может быть направлена в сторону противоположную движению окончания препарата, 3) найти объяснение известному феномену одновременной двунаправленности тока массы аксоплазмы.

Проведенные исследования впервые обнаружили способность миелиновых нервных волокон позвоночных сокращаться при их перерезке. Это означает, что диастаз, то есть расхождение культей перерезанного нерва осуществляется не только в результате эластических свойств оболочек, которые нейрохирурги в первую очередь стремятся соединить хирургическим швом, а в результате собственного сокращения нервных отростков. Полученные данные позволяют предложить новый подход в лечении этой травмы, то есть попытаться до стимуляции регенерации нерва различными факторами роста блокировать или ингибировать ретракцию волокон. Кроме того была показана возможность ингибирования ретракции с помощью ряда фармакологических агентов, таких как нимодипин, цитохалазин В, блеббистатин и колхицин. Нам также удалось впервые продемонстрировать электрофизиологические свойства исследуемых агентов, допускающих их применимость в экспериментальной практике при этой патологии.

Теоретическая и практическая значимость работы. В связи с недостаточной изученностью механизмов травматической сократительной способности нейритов при перерезке нервов в работе исследована зависимость ретракции от локализации зоны адгезии волокна, вида ретрактивной активности, латентного периода начала сокращения и времени продолжительности процесса.

Теоретическая значимость заключается также в установлении связи механизма травматической ретракции с цитоскелетными структурами аксоплазмы и изменении электрической активности при этом.

Как известно, травматические поражения нервной системы, часто являются причиной инвалидности в связи с отсутствием регенерации нервных волокон. Это связано с затруднением роста волокон при их регенерации через образующийся при перерезке нерва промежуток между центральными и периферическими фрагментами (диастаз), который не удается сократить хирургическими способами и который заполняется рубцовой тканью (Инсежарова, 1994).

Практическая значимость работы состоит в разработке новой возможности облегчения роста регенерируемых волокон после перерезки нерва. Высказано предположение о том, что механизм ретракции поврежденного нервного отростка участвует в формировании диастаза перерезанного нерва и пересеченных проводящих путей мозга. Возможно, диастаз нерва формируется не только за счёт сокращения его соединительнотканых оболочек и эластических свойств глии, но и за счёт ретракции нервных волокон. Следовательно, для уменьшения диастаза и формирования минимального рубца, а также для облегчения регенерации нерва важна не только стимуляция его регенераторных способностей, но и предотвращение или уменьшение степени расхождения периферической и центральной культей повреждённого нерва. Для этого предпринимается поиск химических агентов, позволяющих ингибировать травматическую ретракцию

нервных волокон, выясняется также токсичность ингибиторов сокращения нейритов на электрогенез нейронов.

В изучении этих вопросов состоит предполагаемое теоретическое и практическое значение исследований.

Положения, выносимые на защиту.

1. Живые нервные клетки с отростками обладают рядом свойств: любая травма нейрита вызывает его сократительную активность, сокращение проявляется в виде трех форм (линейная, изометрическая, смешанная), вектор движения зависит от локализации района максимальной адгезии препарата, а движение массы цитоплазмы может быть одновременно двунаправленным.
2. Регулировать процесс сокращения можно с помощью бескальциевой среды и блокаторов Ca^{2+} -каналов.
3. Компоненты цитоскелета (микротрубочки, микрофиламенты, миозин II) играют важную роль в сократительной активности травмированных нейронов и ингибируются под влиянием блокаторов цитоскелета цитохалазина В, блеббистатина и колхицина.
4. Ингибиторы цитоскелета незначительно влияют на электрофизиологическую активность нейрона при непродолжительном воздействии.

Апробация материалов диссертации. Результаты работы были представлены на Межинститутской конференции молодых ученых, посвященной 100-летию академика В.Н. Черниговского, "Механизмы регуляции и взаимодействия физиологических систем организма человека и животных в процессах приспособления к условиям среды" (Санкт-Петербург – Колтуши, 2007); VI Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 50-летию открытия А.М. Уголевым мембранного пищеварения, "Механизмы функционирования висцеральных систем" (Санкт-Петербург, 2008); Научно-практической конференции "Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины" (Санкт-Петербург, 2008); Конференции молодых ученых, посвященной 85-летию со дня основания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН "Механизмы адаптации физиологических систем организма к факторам среды" (Санкт-Петербург – Колтуши, 2010); II Международной научно-практической конференции "Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии, фармакологии и медицине" (Санкт-Петербург, 2011); VIII Всероссийской конференции с международным участием "Механизмы функционирования висцеральных систем" (Санкт-Петербург, 2012); III конференции Общества клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2012); VIII Международном Междисциплинарном Конгрессе (Судак, 2012); X East European Conference of the International Society for Invertebrate Neurobiology "Simple nervous system" (Moscow, 2012).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, из них 6 статей в журналах из списка ВАК, 2 статьи в академических сборниках и 9 тезисов.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 9 глав с изложением экспериментальных результатов, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа содержит 203 страницы. Из них – 135 рисунков. Список литературы включает 361 источник: 30 отечественных и 331 зарубежных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проводилась на нейронах пресноводных моллюсков *Lymnaea stagnalis* и *Planorbis corneus vulgaris*, нейронах Ретциуса медицинской пиявки - *Hirudo medicinalis*, а также на одиночных миелиновых нервных волокнах травяной лягушки *Rana temporaria*.

Методика выделения и микроскопического исследования одиночных живых нейронов моллюска. Одиночные нейроны выделяли из окологлоточного ганглионарного кольца моллюска, которое вначале помещали в 0,4% раствор проназы. Затем проводили пипетирование. Выделенную таким способом суспензию нервных клеток для изучения ретракции нервных отростков переносили в импровизированную камеру с раствором Рингера.

Живые изолированные нейроны исследовали в фазовом контрасте с помощью компьютерной микровидеоустановки. Поведение нейронов регистрировалось с помощью видеокамеры DCM300 ("Shangarao TeleView Optical Instruments Co., Ltd.", Китай), присоединенной к кинотубусу инвертированного микроскопа БИОМЕД-3И ФК (Россия).

Методика исследования выделенных нейронов моллюска с помощью электронной микроскопии. Изолированные нейроны моллюска, после их агрегации центрифугированием фиксировали в течение 1 часа 2,5%-м раствором глутарового альдегида (pH=7,4), разведенным 0,1 М какодилатом натрия. В последующем проводили дофиксацию 1%-м охлажденным раствором четырехокси осмия (OsO_4) в течение 30 мин. Далее материал промывали какодилатным буфером трехкратно. Затем осуществляли дегидратацию спиртами (50° и 70° по 10 мин 3 раза), затем на сутки материал помещали в 3,5% уранилацетат на 70° спирте. Далее объекты держали по 10 мин в 80°, 90°, 96° спиртах 3 раза, в абсолютный спирт помещали 2 раза на 10 мин. Затем материал переносили в смесь ацетона и абсолютного спирта 1:1 на 10 мин, потом – в охлажденную смесь ацетона и спирта 2:1 на 10 мин. Далее смесь ацетона и спирта меняли на смесь аралдитов и ацетона в соотношении 1:3 и держали в течение 1 ч. Смесь аралдитов готовили из аралдита М (5 мл), аралдита Н (5 мл), дибутилфтолата (0,35 мл) и аралдита В (0,25 мл). Далее объект помещали в смесь аралдитов и ацетона в соотношении 1:1 на 2 ч, затем переносили в такую же смесь в соотношении 3:1; потом – в такую же смесь в соотношении 6:1 и оставляли на ночь при комнатной температуре. На следующий день (примерно через 18 ч) смесь аралдитов меняли на смесь без ацетона и оставляли на 4 ч. В тот же день материал переносили в другую порцию смолы в специальные формы. Выдерживали по 24 ч в термостате при 37 °С и 60 °С для полимеризации смеси аралдитов.

Фиксированный материал резали на ультратоме LKB-5 (Швеция) на полутонкие срезы и просматривали их под фазовоконтрастным микроскопом. Ультратонкие срезы контрастировали цитратом свинца в течение 30 мин и изучали под электронным микроскопом JEM 100В (Швеция). Негативы сканировали в просвечивающем режиме с помощью сканера HP Scanjet G4050 (США). Позитивные изображения подвергали морфологическому анализу, пользуясь программой ACDSee 8 Photo Menager.

Методика выделения миелиновых нервных волокон. Исследования проводились на одиночных миелиновых нервных волокнах лягушки (*Rana temporaria*). Живые миелиновые волокна выделяли из седалищных нервов лягушки.

Препаровка одиночных волокон проводилась после одночасовой обработки нервов 0,4% раствором проназы. Вначале нерв отмывали от протеолитического фермента. Препаровальными иглами расщепляли нерв в растворе Рингера и помещали в импровизированную микрокамеру. Длиннофокусные объективы позволяли поместить препарат на предметное стекло. Нервные волокна сверху укреплялись стекловатой и накрывались малым покровным стеклом. Использовалась компьютерная микровидеоустановка.

Методика исследования сокращения нервных отростков под воздействием агентов, влияющих на двигательную активность нейронов

Бескальциевая среда. Для исследования ингибирования сократительной активности нейроны переносили в бескальциевый раствор Рингера, который содержал (мМ): 90 NaCl, 5 KCl, 1,5 MgCl₂. Наблюдения и фоторегистрация проводились в течение 7 часов.

Нимодипин. Для этих же целей использовали нимодипин, который является L-блокатором кальциевых каналов. Раствор нимодипина ($1,4 \times 10^{-4}$ М) довели раствором Рингера до концентрации 10 мкМ (по Caro, Tarabova, Rojo-Ruiz et al., 2011).

Как известно, нимодипин разрушается на свету, в связи с чем травмированные нейроны в растворе данного препарата накрывали темной чашкой Петри и инкубировали в условиях полной темноты в течение 1 часа 30 минут. За этот промежуток времени в контроле в растворе Рингера происходит полное сокращение нейритов. Затем производили подсчет общего количества клеток в препарате, распределяя нейроны по двум группам: с сократившимися и с не сократившимися отростками, полученные данные выражали в процентах.

Цитохалазин В. Для деполимеризации актиновых микрофиламентов изолированные лишённые глии нейроны моллюска помещали в раствор цитохалазина В (Sigma, США). Цитохалазин В растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) (1 мг/мл) и затем разводили в растворе Рингера до концентрации 0,02 мМ и 0,2 мМ, которые обычно используются в этих целях (Зеленин, Куш, Прудовский, 1982). В этой серии исследований изучали участие актиновых филаментов в реакции сократительной активности травмированных отростков живых изолированных нейронов в растворе цитохалазина В (0,02 мМ). Нервные клетки располагали в микрокамере и исследовали в фазовом контрасте с помощью компьютерной цейтраферной микровидеоустановки. Подсчитывали процентное содержание несократившихся (ингибированных) отростков.

В следующей серии экспериментов анализировали сократительную активность нейритов, увеличив концентрацию цитохалазина В в 10 раз. Наблюдение за поведением нейронов происходило в тех же условиях. Число изученных клеток было равно – 91, число использованных моллюсков – 34.

Блеббистатин. Для оценки степени участия миозина II, нами были проведены опыты с применением специфического ингибитора АТФ-азной активности немышечного миозина II – блеббистатина. Блеббистатин (в порошке) растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) (1 мг/0,34 мл) и затем

разводили в растворе Рингера до концентрации 50 мкМ, которая обычно используется в этих целях (Rösner, Möller, Wassermann, 2007; Zhenan, Leo, Elke, 2010). Поскольку по данным литературы блеббистатин разрушается на свету (Kolega, 2004) эксперименты проводили в камерах при полной темноте. Производили подсчет нейронов с распределением по двум группам (с сократившимися и с не сократившимися отростками). Клетки с частично или слабо сократившимися отростками не учитывались. Определяли процентное отношение клеток с несократившимися отростками.

Колхицин. Для исследования участия микротрубочек в травматической ретракции нейритов использовали колхицин (Sigma, США), который, связываясь с тубулином, приводит к деполимеризации микротрубочек цитоскелета (Hastie, 1991; Lux, Veselovsky, 1994; Bai, Pei, Boyé et al., 1996). Колхицин разводили в растворе Рингера до концентрации 0,5 мМ (по Кислову, Чекуровой, Катаеву, 1999). Живые нервные клетки помещали в микрокамеру с полученным раствором препарата и наблюдали их с помощью компьютерной фазовоконтрастной установки. Определяли процентное содержание не сократившихся отростков.

Методика электрофизиологического исследования нейрона медицинской пиявки. Опыты проводили на одиночных нейронах Ретциуса медицинской пиявки, расположенных во втором ганглии (не считая головного). При помощи игл пиявку укрепляли на препаровальном столике вентральной стороной вверх, кожно-мышечный покров приподнимали пинцетом и разрезали вдоль всего тела ножницами. Выделяли часть брюшной нервной цепочки, состоящую из первых 10-12 ганглиев.

Препарат помещали в специальную камеру (пластиковая емкость) с раствором Рингера. Нервную цепочку расправляли, и 2-ой ганглий раскалывали ежовыми иглами на дне камеры, покрытой прокладкой из нейтральной резины. Препаровальной иглой с ганглия снимали соединительнотканную пигментированную оболочку. После освобождения ганглия от этой оболочки его заливали раствором 0,01% нейтрального красного на три минуты. После тщательного отмывания препарата от нейтрального красного раствором Рингера, на поверхности ганглия выявлялись две крупные клетки Ретциуса (диаметром около 100 мкм), расположенные обычно в центре. Приготовленный препарат позволял под визуальным контролем МБС-10 подводить к поверхности клетки внеклеточный микроэлектрод.

Методика исследования влияния блокатора Ca^{2+} -каналов и ингибиторов цитоскелета на электрическую активность нейрона. Важно было исследовать влияние выбранных нами фармакологических препаратов (нимодипин, цитохалазин В, блеббистатин, колхицин) на электрогенез нейромембраны. Для этого использовали нейроны Ретциуса медицинской пиявки. Часть брюшной нервной цепочки из 5 первых ганглиев извлекали из тела животного. Второй подкрашенный 0,01% раствором нейтрального красного ганглий укрепляли на дне экспериментальной камеры. Остальную часть цепочки приподнимали из 1-й камеры и помещали во 2-ю камеру с биполярными раздражающими электродами. Раздражающие электроды

располагали за вторым ганглием, чтобы получить синаптическое раздражение нейрона Ретциуса.

В контрольной серии опытов фиксировали электрические параметры нейронов, находящихся в камере в растворе Рингера. Затем раствор Рингера заменяли на соответствующий раствор фармакологического агента (нимодипин (10мкМ), цитохалазин В (0,02 мМ и 0,2 мМ), блеббистатин (50 мкМ), колхицин (0,5 мМ)). В растворах нимодипина и блеббистатина ганглий выдерживали 1 час 30 минут в полной темноте, электрические характеристики регистрировали каждые 30 минут. Как было показано ранее, при таком способе размещения препарата, применяемые агенты влияют исключительно на тело и отросток нервной клетки, не затрагивая синапсы через которые происходит раздражение (Сергеева, 1995). Электрическую активность нейрона регистрировали экстраклеточно золотым микроэлектродом в стеклянной изоляции. Все опыты проводили однотипно: сначала регистрировали фоновую импульсную активность нейрона, определяли амплитуду, длительность спайка и порог возбуждения, а затем те же параметры регистрировали при влиянии ингибиторов двигательной активности при тех же условиях, что и в контроле.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Травматическая ретракция миелиновых нервных волокон

Принято считать, что нервные волокна обладают тремя способами естественной подвижности. Наиболее активно исследована ростовая и регенерационная активность. Мы исследовали сократимость расщепленных миелиновых нервных волокон, удаленных из седалищных нервов лягушек.

В этих опытах сократительная активность миелиновых нервных волокон нами была обнаружена впервые. Активное сокращение развивалось у 70% волокон. Скорость ретракции колебалась от 0,007 мкм/мин до 2,7 мкм/мин. По-видимому, сокращение остальных 30% волокон нивелировалось извилистостью миелиновой оболочки препарата, возникающей в результате её эластических свойств. Возможно, у некоторых волокон сокращение происходит по длине всего волокна, поэтому повреждённый конец его перемещается на ограниченном расстоянии. Отсутствие явного уменьшения длины миелинового волокна возможно также связано с его изометрическим сокращением, отмеченным нами на безмиелиновых волокнах.

Таким образом, проведённые исследования впервые убеждают нас в том, что сократительная активность является характерной чертой периферических миелиновых нервных волокон позвоночных. Следовательно, можно утверждать, что расхождение фрагментов перерезанного нерва действительно, видимо, формируется не за счет эластичности соединительной ткани и глии оболочек, а путем ретракции собственно нервных волокон. Возможно, до стимуляции регенерации нервных волокон необходимо с помощью блокаторов ретракции ингибировать расхождение фрагментов нервных отростков.

Ультраструктурная характеристика исходных контрольных препаратов

Поскольку на исследованных нами препаратах изолированных нервных волокон невозможно получить нервные отростки с сохраненными телами

нейронов, так как это существенно осложняет интерпретацию полученных результатов, было решено основную часть экспериментов проводить на изолированных препаратах нейронов моллюсков с сохраненными нервными отростками.

Исследуя поврежденные нервные отростки всегда целесообразно провести ультраструктурный анализ препаратов для того, чтобы определить степень их повреждения, выяснить состояние нервных отростков и структурные показатели тел нервных клеток.

Большинство клеток, сгруппированных при центрифугировании, выглядят как нормальные, нетравмированные нейроны (рис. 1).



Рис. 1. Изолированные нейроны ганглиев моллюска после их диссоциации и центрифугирования.

1 – ядрышко; 2 – митохондрия; 3 – узкий слой нейроплазмы. Эл. микроскопия. Ув. 15000.

Наружные клеточные мембраны тел и отростков нейронов также остаются сохранными. Они не имеют мембранных контактов и синцитиальных связей и естественным образом формируют закономерные, равномерные межклеточные и внутриклеточные межмембранные щели шириной, в 20 нм (рис. 2).

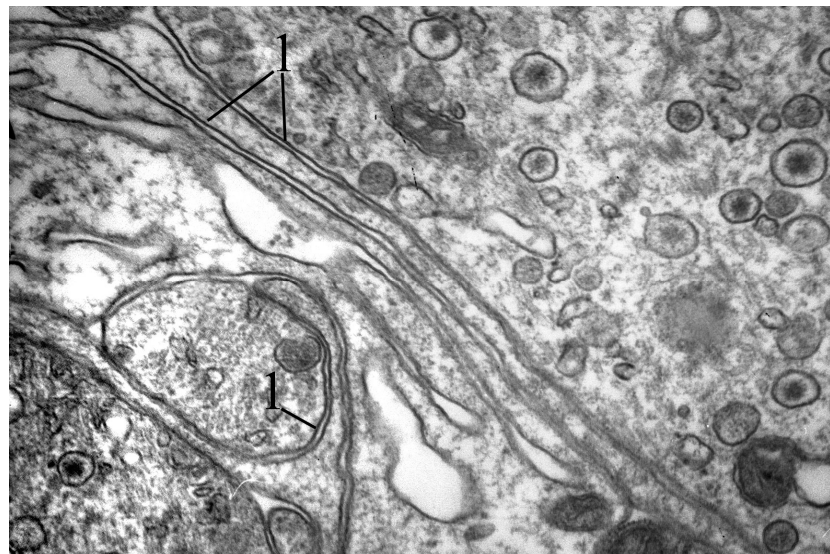


Рис. 2. Сформированные естественным образом 20 нм межклеточные щели наружных клеточных мембран (1) изолированных нейронов после центрифугирования. Эл. микроскопия. Ув. 40000.

Таким образом, электронно-микроскопические исследования изолированных нейронов диссоциированных ганглиев моллюска убеждают нас в том, что получаемые нами клеточные препараты являются жизнеспособными и в большинстве своем сохраняют нормальную структуру сомы и большей части нервного отростка.

Травматическая ретракция безмиелиновых отростков нервных клеток

Исследования на живых изолированных нейронах, прежде всего, демонстрируют сократительную активность нервных отростков (рис. 3).

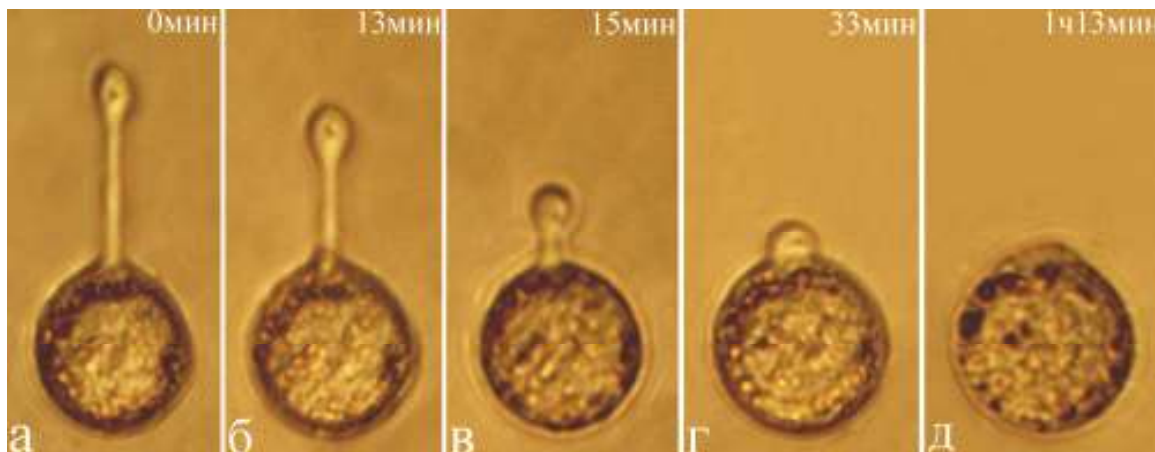


Рис. 3. Выраженная колба ретракции при быстром начальном сокращении нервного отростка.

а-д – стадии процесса. Время – от начала наблюдения. Прижизненная микроскопия. Фазовый контраст. Об. 40ФК, ок. 10.

Скорость их сокращения резко колебалась у разных нейронов от 0,03 мкм/мин до 14 мкм/мин. Иногда длинные отростки сокращались быстрее коротких нейритов.

Наши эксперименты с прерванными нервными волокнами показали некоторые закономерности этого процесса. Оказалось, что направление движения конца отростка при ретракции зависит от расположения его области адгезии. Чаще всего наибольшая адгезия препарата находится в области сомы нейрона. В этих случаях перемещение его свободного неадгезированного отростка будет направлено в сторону тела клетки. Если же точка наибольшей адгезии находится в области дистального (концевого) отдела нейрита, то отмечается движение тела нейрона в противоположную сторону, к концу препарата. Часто повышенная адгезия отростка выявляется наличием по ходу аксона дополнительных клеток. В тех случаях, когда адгезия конца отростка и тела нейрона допускают одновременное сокращение препарата, движутся оба его конца, а масса аксоплазмы смещается в противоположные стороны, двунаправлено. В случае двух зон адгезии, когда и центральный, и периферический отделы препарата хорошо закреплены на субстрате, то сокращение волокна проявляется не изменением его длины, а уменьшением в несколько раз его диаметра (его массы). Такой своеобразный способ сокращения (изометрическое сокращение) нервного волокна удалось показать впервые (рис. 4). В случае изолированного фрагмента нервного отростка (рис. 5) область адгезии отсутствует на обоих его концах. Тогда наиболее устойчивой точкой опоры оказывается средняя точка отростка. Волокно при этом начинает сокращаться с двух

концов в две противоположные стороны, к центру отростка (двунаправленно), о чём свидетельствует образование двух колб ретракции.

На основании исследований характера подвижности нервных отростков, их зависимости от места нахождения области адгезии (точки опоры) и степени адгезии удается установить, что ретракция отростков наступает односторонне и независимо от локализации повреждения. Однако направление ретракции концов препарата строго зависит от расположения локуса адгезии относительно тела клетки. Направление же транслокации массы аксоплазмы часто не совпадает с направлением движения концов препарата. Ток аксоплазмы может иметь противоположное направление. Это наглядно регистрируется как при наличии адгезии на середине препарата, при изометрическом сокращении, так и при ретракции изолированного волокна.

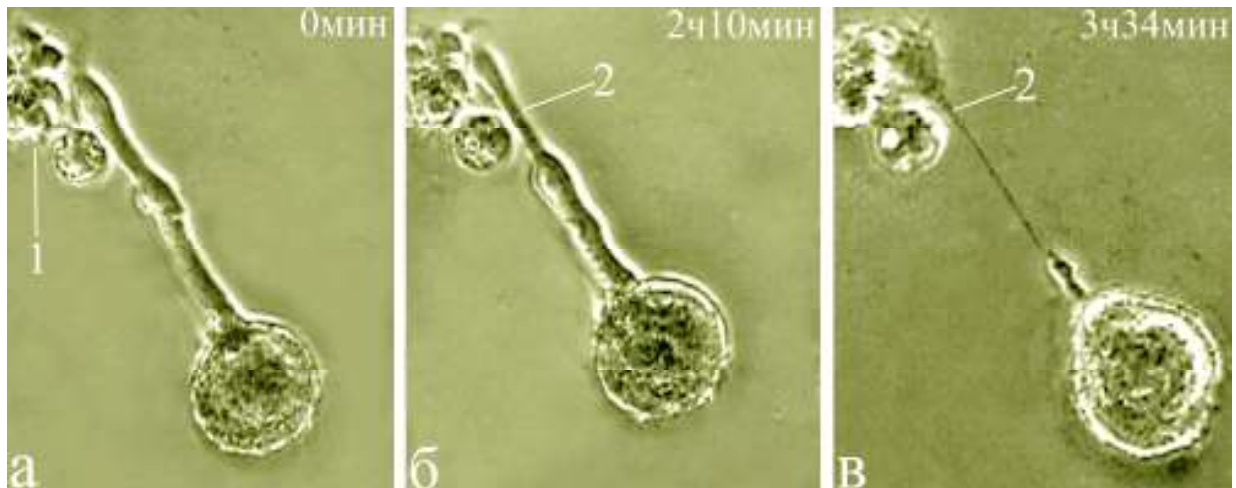


Рис. 4. Изометрическое сокращение отростка нервной клетки с уменьшением его диаметра и без изменения его длины.

а-в – стадии процесса; 1 – дополнительные клетки, обеспечивающие адгезию конца нервного отростка; 2 – истонченный нервный отросток. Время – от начала наблюдения.

Прижизненная микроскопия. Фазовый контраст. Об. 40ФК, ок. 10.

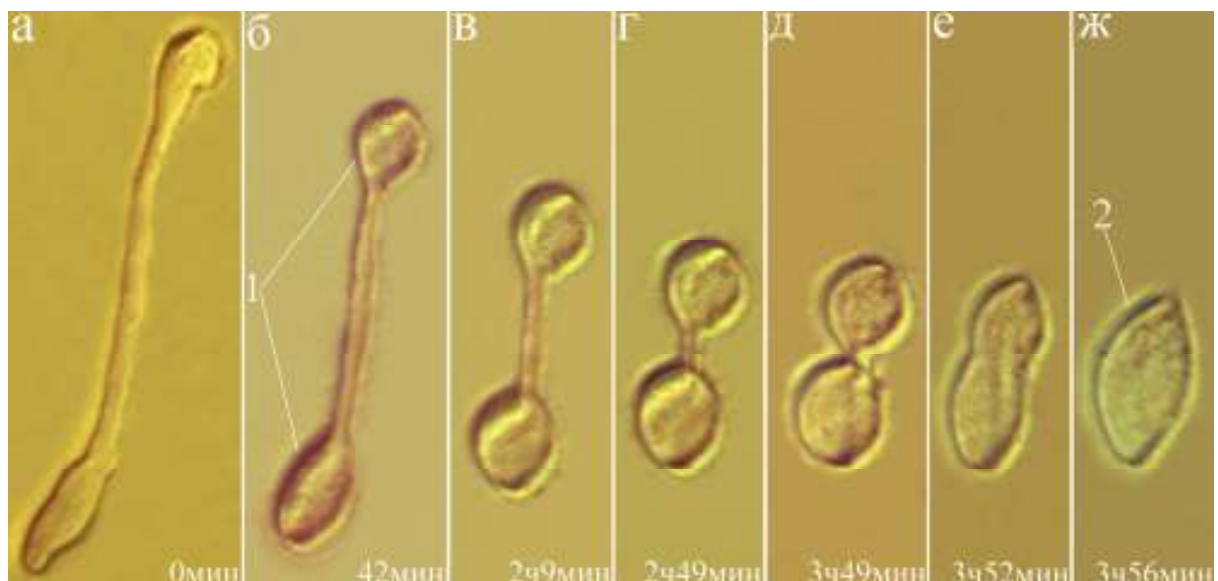


Рис. 5. Двунаправленная ретракция изолированного нервного волокна при отсутствии точек адгезии на его концах.

а-ж – стадии процесса; 1 – колбы ретракции; 2 – слияние аксоплазмы в единую массу сферической формы. Время – от начала наблюдения. Прижизненная микроскопия. Фазовый контраст. Об. 40ФК, ок. 10.

Следовательно, удастся установить 3 закономерности (рис. 6): 1) при любой травме волокна оно реагирует ретракцией; 2) масса аксоплазмы травмированного нейрона закономерно перемещается в двух противоположных направлениях, демонстрируя возможность двунаправленного тока аксоплазмы; 3) в области отсутствия точки опоры отмечается значительное движение аксона, а у закрепленной точки – только слабое смещение аксоплазмы, в противоположном направлении.

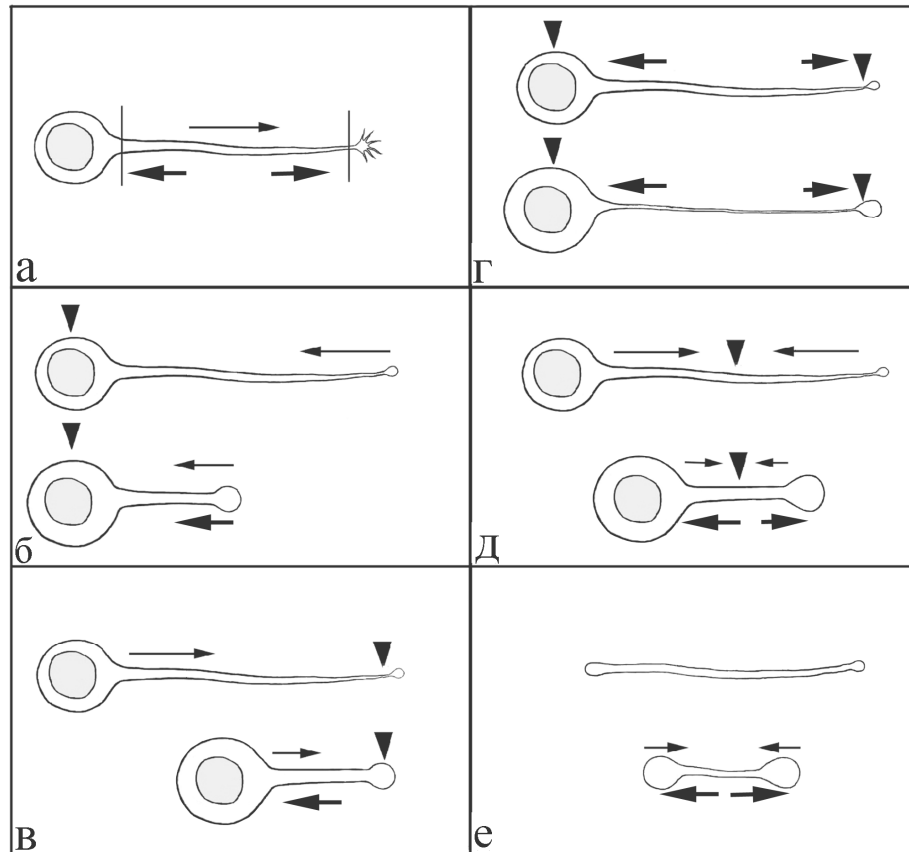


Рис. 6. а – общий вид нормального растущего и мигрирующего нейрона; б – однонаправленная ретракция аксона и перемещение массы его аксоплазмы при точке адгезии в области тела нейрона; в – передвижение тела нейрона и массы аксоплазмы в противоположных направлениях при точке адгезии в области терминали поврежденного нейрита; г – изометрическое сокращение препарата при векторе перемещения аксоплазмы в противоположные стороны при двух точках опоры на разных концах препарата; д – движение двух концов препарата в разные стороны (навстречу друг другу) и транслокация массы аксоплазмы травмированного волокна в противоположных направлениях одновременно при точке адгезии посередине препарата; е – перемещение концов изолированного волокна навстречу друг другу и двунаправленное смещение массы аксоплазмы в отсутствии точек адгезии; тонкие стрелки – направление движения разных частей нейрона; толстые стрелки – направление массы аксоплазмы; наконечники стрелок – точки адгезии; верхний нейрон в рамках – исходное состояние препарата; нижний нейрон в рамках – результат сокращения препарата.

Влияние бескальциевой среды на сокращение травмированных нервных отростков. У клеток, помещённых в среду, лишённую Ca^{2+} , абсолютное блокирование сокращения отростков наблюдалось в 68% случаев, а подвижные отростки составляли только 12% (рис. 7). У 20% волокон ретракция прекращалась не сразу, а через 45 мин и позднее. В бескальциевой

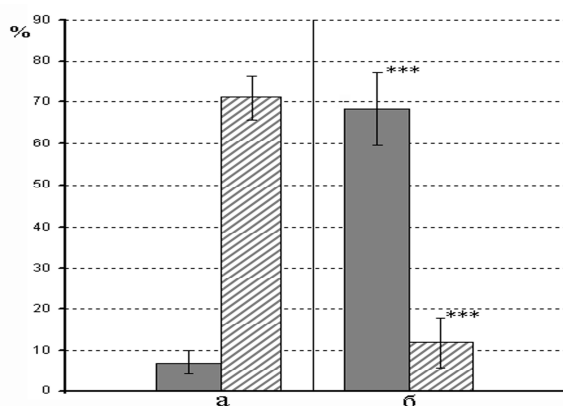


Рис. 7. Количество несократившихся и сократившихся нервных отростков в контроле и в бескальциевой среде.

■ - несократившиеся отростки; ▨ - сократившиеся отростки.
а - контроль, б - бескальциевая среда.

среде отчетливо проявилось уменьшение адгезии препарата к подложке. Таким образом, на основании полученных результатов можно утверждать, что бескальциевая среда способна ингибировать травматическую ретракцию волокна. Следовательно, можно предположить, что бескальциевая среда способна и уменьшать расхождение культей перерезанных нервов.

Ингибирование сократительной активности нейритов с помощью блокатора кальциевых каналов нимодипина. В наших экспериментах нейроны с отростками, помещались в раствор Рингера с добавлением нимодипина на 1,5 часа. Все это время препараты находились в полной темноте для исключения инактивации нимодипина. Затем определялось количество сократимых и несократимых волокон. В дальнейшем, в течение 4-5,5 часов, сократительной активности не было у 72% волокон. Также отмечалось уменьшение интенсивности адгезии препарата к субстрату.

Ингибирование сократительной активности нейритов с помощью воздействия на актиновый цитоскелет. При действии цитохалазина В отмечалась полная остановка сокращения нервных отростков (рис. 8) как при концентрации раствора 0,2мМ, так и 0,02мМ. У некоторых отростков отмечено частичное ингибирование сокращения нейритов.



Рис. 8. Полная остановка сокращения отростков нейрона под действием цитохалазина В (0,02 мМ) в течение 4ч 30мин (а-в).

Время – от начала наблюдения. Прижизненная микроскопия. Фазовый контраст. Об. 40ФК, ок. 10.

Эксперименты с цитохалазином *B* (0,02мМ) показали, что половина отростков исследованных нейронов не сокращалась вообще, а сократившихся отростков было в 2 раза меньше, чем в контроле (35% вместо 71%). При действии цитохалазина *B* на порядок увеличенной концентрации (0,2мМ) количество несократившихся препаратов при наблюдении от 5 до 13 часов увеличилось в 10 раз, от 7% в контроле до 70%. Количество аксонов, сохранивших сократительную активность уменьшилось с 71% до 13%.

Таким образом, эксперименты показали, что цитохалазин *B* способен диссоциировать F-актиновые микрофиламенты аксоплазмы и ингибировать травматическую ретракцию нервных волокон. Следовательно, это вещество может быть испытано в экспериментах по уменьшению промежутка между ампутированными культями перерезанного отростка.

Влияние блеббистатина на сократительную активность нейритов. При воздействии блеббистатина на миозин аксона в обычных условиях освещенности сократительная активность нервных волокон не изменялась (92%) волокон в опыте и 93% - в контроле. Количество несократившихся препаратов равнялось 8%. После экспозиции в темноте сокращение большинства препаратов (70%) отсутствовало. Сократившихся клеток в растворе блеббистатина было 30%. Опыты показывают, что блеббистатин в условиях темноты способен предотвращать сокращение нервных отростков и, следовательно, быть использованным в опытах по уменьшению диастаза пересеченных нервов.

Механизм участия микротрубочек в травматической ретракции нервного отростка. Полученные данные об участии двигательных белков цитоскелета в механизме травматической ретракции представляются естественными. Однако роль тубулина микротрубочек в механизме сокращения волокон при их травме требует дополнительных исследований. Поэтому мы считали необходимым определить возможное участие тубулина микротрубочек и в травматической ретракции. Для этого мы использовали раствор колхицина, обычно применяемого для диссоциации микротрубочек.

В опытах колхицин ингибировал движение отростков. Однако только в 45% случаев наступала полная остановка сокращения отростков. Кроме того, у необычно большого количества клеток (41%) аксоны сокращались только частично. Таким образом, удается показать, что колхицин, диссоциирующий микротрубочки аксоплазмы, также способен участвовать в ингибировании сокращения нервных отростков. Он является фармакопейным препаратом и его можно было бы применять для уменьшения диастаза, однако эффект колхицина на сокращение нейритов выражен гораздо слабее, чем при действии других блокаторов цитоскелета (цитохалазина *B* и блеббистатина).

В связи с возможностью использования исследованных препаратов в клинических экспериментах на животных, казалось необходимым определить функциональное состояние нейронов, установив электрофизиологические параметры их нейромембраны при использованных нами блокаторах сократительной активности нейритов.

Электрические характеристики нейромембраны под влиянием агентов, ингибирующих ретракцию

Бескальциевая среда. Инкубация нервных ганглиев в бескальциевой среде приводила к достоверному понижению амплитуды спонтанного спайка с $49,2 \pm 1,01$ мкВ в контроле до $38,3 \pm 1,44$ мкВ. Частота спонтанной импульсной активности достоверно увеличивалась с $0,17 \pm 0,03$ имп/с в контроле до $0,33 \pm 0,06$ имп/с. Порог возбуждения нервной клетки при синаптическом раздражении достоверно снижался с $78,7 \pm 6,3$ мВ в норме до $62,4 \pm 5,9$ мВ в опыте. Величина латентного периода ответа на раздражающий стимул не изменялась.

Таким образом, электрофизиологические параметры мембраны клетки Ретциуса при воздействии бескальциевой среды в течение эксперимента (около трех часов) изменялись в пределах нормальной электрофизиологической реакции на слабый возбуждающий стимул.

Нимодипин. В опытах было выявлено, что использование блокатора кальциевых каналов нимодипина также изменяет электрогенез нейрона Ретциуса. Амплитуда спонтанного спайка достоверно уменьшалась с $47,5 \pm 2,8$ мкВ до $34,0 \pm 4,5$ мкВ. Достоверно уменьшается и частота фоновой импульсной активности с ($0,20 \pm 0,05$ имп/с до $0,12 \pm 0,03$ имп/с). Порог клетки на синаптическое раздражение достоверно возрастает с $69,3 \pm 2,06$ мВ до $89,6 \pm 2,36$ мВ. Происходит достоверное увеличение времени латентного периода ответа на раздражающий стимул с $18,2 \pm 1,2$ мс до $20,1 \pm 0,6$ мс. Следовательно, нимодипин оказывает слабое тормозное влияние на мембрану нейрона Ретциуса. Изменения касались небольших колебаний параметров, так что нимодипин, по-видимому, вполне может применяться в опытах для блокирования травматической ретракции.

Цитохалазин В. Действие низкой концентрации цитохалазина В ($0,02$ мМ), достоверных изменений в электрогенезе нейрона не вызывало. Действие $0,2$ мМ цитохалазина В показало, что амплитуда спонтанного потенциала действия в растворе претерпевает сложные изменения. У одиночных импульсов наблюдается достоверное увеличение амплитуды спонтанного спайка с $46,8 \pm 0,84$ мкВ, до $51,8 \pm 2,17$ мкВ. Наряду с одиночными спайками в этих же условиях возникали двойные спайки. Амплитуды каждого из этих потенциалов ниже, чем у одиночных спайков, хотя при сложении суммарная величина их амплитуд была примерно равна амплитуде одиночного спайка. У первого из двойных импульсов она равнялась $18,5 \pm 0,99$ мкВ, а у второго – $36,9 \pm 1,72$ мкВ.

Частота фоновой импульсной активности при воздействии цитохалазина В увеличивалась с $0,30 \pm 0,05$ имп/с до $0,56 \pm 0,14$ имп/с. Порог клетки на синаптическое раздражение возрастал с $56,5 \pm 3,8$ мВ до $83 \pm 4,3$ мВ. Латентный период ответа на раздражающий стимул увеличивался с $24,2 \pm 0,7$ мс до $37,6 \pm 1,9$ мс.

Эксперименты свидетельствуют о том, что действие цитохалазин В оказывает сложное, возможно, специфическое влияние на мембрану нервной клетки. Однако он не вызывает повреждающего воздействия на мембрану нейрона.

Блебистатин. При действии блебистатина на электрические свойства нейронов достоверно увеличивалась амплитуда спонтанного спайка с $49,5 \pm 1,08$ мкВ до $68 \pm 3,1$ мкВ. Частота фоновой импульсной активности недостоверно уменьшалась от $0,24 \pm 0,04$ имп/с в норме до $0,18 \pm 0,04$ имп/с.

Порог клетки на синаптическое раздражение достоверно увеличивался с $70,4 \pm 4,9$ мВ до $95,3 \pm 6,4$ мВ. Латентный период ответа на раздражающий стимул достоверно увеличивался с $22,1 \pm 0,7$ мс до $45,9 \pm 2,9$ мс.

Таким образом, на электрофизиологические параметры (амплитуду ПД, частоту, порог и латентный период) блеббистатин оказывал тормозное, по-видимому, гиперполяризующее влияние.

Колхицин. Влияние колхицина на мембрану нейрона вызывало достоверное понижение амплитуды спонтанных потенциалов с $46,9 \pm 0,8$ мкВ до $37,4 \pm 1,3$ мкВ. Частота спонтанной импульсной активности достоверно возрастала с $0,2 \pm 0,04$ имп/с до $0,75 \pm 0,12$ имп/с. Достоверных изменений порога раздражения не выявлено. Латентный период достоверно увеличивался с $25 \pm 0,7$ мс до $37,9 \pm 1,7$ мс.

Опыты демонстрируют, что колхицин оказывает некоторое возбуждающее, раздражающее воздействие на нейромембрану. Проведенные исследования не вызывают сомнений в возможности применения колхицина в дальнейших опытах по ингибированию отрицательного влияния расхождения перерезанных нервных отростков нерва.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о низкой токсичности в указанных концентрациях всех использованных ингибиторов при краткосрочном и раннем их применении. Это свидетельствует о возможности использования исследованных ингибиторов в опытах на животных по уменьшению ретракции отрезков пересеченного нерва.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Работа была выполнена на живых изолированных одиночных нейронах моллюска с отростками. Проверка состояния нейронов с помощью электронной микроскопии показала достаточную их сохранность для экспериментов. Хорошее состояние препаратов подтверждено также тем, что такие нейроны растут и образуют нормальные нервные сплетения в культуре ткани (Sotnikov, 2012).

Основное внимание в работе было посвящено одной из неэлектрических функций нейрона, подвижности нервного отростка. Всего было выделено три формы подвижности нейрита: 1) рост и регенерация; 2) естественное сокращение ветвлений во время дифференцировки и арборизации нейрона; 3) ретракция отростка при травматическом перерыве его единства.

Если росту и регенерации нервных отростков в литературе посвящено основное внимание исследователей, то травматическая ретракция аксона, ее свойства, механизмы и способы остановки остаются малоизученными. Мы считали возможным в нашей работе обратить внимание практикующих специалистов на присутствие ретракции травмированных нервных волокон и на целесообразность ее остановки у ампутированных нейритов еще до стимуляции регенерации аксонов. Наше внимание привлек тот факт, что между культей пересеченного нерва обязательно образуется промежуток (диастаз). Причиной расхождения культей считается эластичность соединительнотканых оболочек нерва и глии. Однако известно, что как бы тщательно не сшивались оболочки нерва или его пучков, промежуток между перерезанными волокнами центральной и периферической культей нерва все равно образуется (Radtke, Allmeling, Waldmann et al., 2011). Это предполагает,

что ретрагируют не соединительнотканые оболочки, а сами перерезанные нервные волокна. Необходимо было воспроизвести в эксперименте травматическую ретракцию, изучить основные механизмы и найти вещества, предотвращающие или ингибирующие ее.

Опыты с живыми диссоциированными нейронами моллюсков, выявили, во-первых, то, что концы препаратов способны сокращаться как в сторону тела клетки, так и в сторону периферических отростков. Ретрагируя к телу нейрона, отростки способны полностью в него втягиваться. Во-вторых, важную роль в направлении вектора сокращения играет расположение места максимальной адгезии препарата, то есть точка опоры, а само перемещение всегда есть подтягивание массы нейроплазмы к "якорю". Прямая связь между адгезионным матриксом и внутрицитоплазматическими актиновыми структурами хорошо известна (Vasiliev, Gelfand, 1973; Enomoto, 1996).

Показано, что сокращение травмированного аксона всегда происходит с натяжением на обоих его концах и что смещение аксоплазмы всегда осуществляется в двух направлениях, но с разной силой и интенсивностью. По нашему мнению, проведенные эксперименты позволяют предположить, что и неповрежденное, нормальное нервное волокно представляет собой напряженное, сократимое образование, обладающее определенным тонусом и ведущее себя всегда подобно мышечному волокну. При этом движение (ток аксоплазмы) не может не быть двунаправленным. На живых нейронах это продемонстрировано нами при наличии адгезии на середине препарата, при двух точках адгезии на его концах и при отсутствии точек адгезии у изолированного нервного волокна.

В связи с этим предположением следует сопоставить нашу рабочую гипотезу с уже известными гипотезами перемещения аксоплазмы.

Прежде всего, следует отметить первые представления об аксональном токе, гипотезу П. Вейсса. Основанная на передавливании нервных стволов (Weiss, Hiscoe, 1948), она убедительно продемонстрировала представления о целлюлофугальном "токе аксоплазмы", то есть о наличии постоянного целлюлофугального перемещения аксоплазмы нервного волокна (Weiss, 1959; 1970; 1972). Ток аксоплазмы приписывался всей длине волокна. Однако механизмы двигательной активности аксоплазмы оставались неизвестными. Роль конуса роста не обсуждалась. Прижизненная кинетика аксоплазмы показана не была.

Важное значение в объяснении механизмов движения аксона придается субстратно-цитоскелетной гипотезе (Mitchison, Kirschner, 1988; Suter, Miller, 2011). Отмечена ключевая роль адгезии, конуса роста нейрона к субстрату, ее принципиальное значение в перемещении аксоплазмы.

Невозможным казалось существование одновременного встречного, тока аксоплазмы, "двунаправленного тока" (Lubinska, 1964; Lasek, 1967). Эти данные также впервые получены на травмированных нервных стволах с помощью световой микроскопии и подтверждены путем аутоиммунных исследований. Принципиальным достижением этой концепции было утверждение положения о двунаправленности перемещения элементов аксоплазмы волокна. Несмотря на невероятную сложность понимания положений об одновременных противотоках и категорического возражения П. Вейсса о реальности обратного тока, это представление было доказано и

утвердилось в науке (Hasaka, Myers, Baas, 2004; Mann, Rougon, 2007). Стало ясно, что ретроградная информация о повреждении периферического волокна передается к телу нейрона путем ретроградного транспорта (Ben-Yaakov, Dagan, Segal-Ruder et al., 2012).

При исследовании молекулярных механизмов ретрактивной активности нейритов во время их повреждения перед нами стояла задача не только выявить участие Ca^{2+} и структур цитоскелета в этом процессе, но также выяснить возможности ингибирования этой реакции.

Обсуждая собственные данные, необходимо, прежде всего, отметить, что они по механизму травматической ретракции и действию на нее ингибирующих веществ, сокращающих диастаз, вполне соответствуют данным других авторов на иных экспериментальных моделях. Так, нами было показано, что при травматической сократительной деятельности нейронов ионы Ca и цитоскелетные белки играют важную роль. Необходимо было проверить роль Ca^{+2} , актина, миозина и тубулина в механизме травматической ретракции нервного отростка. Для этого мы соответственно испытали влияние таких ингибиторов, как бескальциевая среда, нимодипин, цитохалазин, блеббистатин и колхицин. Опыты показывают, что все испытанные структуры цитоскелета участвуют в травматической ретракции нейронов и могут быть заблокированы соответствующими блокаторами. Показано, что молекулярные механизмы подвижности в разной степени осуществляют цитоскелетные белки: актины, миозины и тубулины с их ассоциированными белками.

Полученные нами данные свидетельствуют о слабом изменении электрофизиологических параметров мембраны нейрона, при краткосрочном воздействии ингибиторов ретроградного сокращения. Поэтому не удивительно, что все они были опробованы для различных целей в клинической практике. Цитохалазин вместе с нокадазолом применялся при лечении посттравматического остеоартрита (Sauter, Buckwalter, Mckinley et al., 2012). Блеббистатин использован для подавления чрезмерной активности миозина (Gallo, 2004; Brown, Wysolmerski, Bridgmann, 2009). При многих видах нервных заболеваний опробован нимодипин (Choi, Lee, Choi et al., 2011; Musahl, Henkes, Vajda et al., 2011). При воспалительных процессах и опухолях употреблялся колхицин, разрушающий цитоскелетные микротрубочки (Perico, Ostermann, Bontempeil et al., 1996) и снижающий плотность фиброзных пучков в области травмы (Hellal, Hurdato, Rushel et al., 2011).

Однако при использовании примененных веществ следует иметь в виду, что увеличение времени воздействия ингибиторов может существенно изменять их эффект. Сформулировано практически важное предположение о возможности применения ингибиторов на ранних стадиях ампутации нервов для уменьшения или ликвидации расхождения их культей с целью уменьшения диастаза, развития фиброзных рубцов и ускорения регенерации нервных волокон.

Специальными опытами на одиночных живых нервных волокнах решен еще один важный вопрос. Было доказано существование травматической ретракции миелиновых волокон нервов позвоночных. Тем самым доказана перспективность реальных клинических экспериментов с перерезками и регенерацией нервов на целых животных.

ВЫВОДЫ

1. Опыты на живых изолированных нейронах выявили наличие трех существенных свойств нервных волокон: во-первых, постоянного двунаправленного сократительного тонуса волокна, который проявляется в форме травматической ретракции, во-вторых, возможность при ретракции перемещения аксоплазмы в противоположных направлениях одновременно и в-третьих, зависимость направления движения концов препарата от топографии зоны максимальной адгезии.

2. Необходимым компонентом механизма травматической ретракции нервных волокон являются ионы кальция. Бескальциевая среда и воздействие блокатора кальциевых каналов нимодипина на изолированные нервные клетки ингибирует ретракцию.

3. Для осуществления ретракции пересеченного нервного волокна необходимо наличие актина и миозина II. При ингибировании их полимеризации с помощью цитохалазина В и блеббистатина сократительная способность нервных волокон блокируется.

4. Микротрубочки цитоскелета участвуют в механизме ретракции нервных волокон, о чем свидетельствует влияние колхицина, который частично ингибирует их травматическую ретракцию. Однако степень торможения процесса сокращения нейритов с помощью колхицина ниже, чем у других, применяемых блокаторов.

5. Электрофизиологические исследования показывают, что бескальциевая среда, нимодипин, цитохалазин В, блеббистатин и колхицин не вызывают выраженных патологических изменений нейромембраны в использованном временном интервале и могут быть использованы в экспериментах по остановке ретракции поврежденных нервных волокон.

СПИСОК НАИБОЛЕЕ ВАЖНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) Васягина Н.Ю. Сократительная активность живых травмированных нейронов. // Межинститутская конференция молодых ученых, посвященная 100-летию академика В.Н. Черниговского "Механизмы регуляции и взаимодействия физиологических систем организма человека и животных в процессах приспособления к условиям среды". - СПб. - 2007. - С. 23.
- 2) Луковникова М.В., Васягина Н.Ю., Краснова Т.В., Лактионова А.А., Чихман В.Н., Солнушкин С.Д. Действие протеолитических ферментов на нейроны при их изоляции для культивирования. // VI Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 50-летию открытия А.М. Уголевым мембранного пищеварения "Механизмы функционирования висцеральных систем". - СПб. - 2008. - С. 115-116.
- 3) Васягина Н.Ю. Особенности двигательной функции живых травмированных нейронов медицинской пиявки. // Научно-практическая конференция "Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины". - СПб. - 2008. - С. 50-51.
- 4) Сотников О.С., Луковникова М.В., Васягина Н.Ю., Лактионова А.А. и Парамонова Н.М. Изменение нейронов моллюска при действии протеолитических ферментов. // Морфология. - 2009. - Т. 136, № 5. - С. 36-41.
(O.S. Sotnikov, M.V. Lukovnikova, N.Yu. Vasyagina, A.A. Laktionova and N.M. Paramonova Neuron Changes in a Mollusk in Response to Proteolytic Enzymes. // Neuroscience and Behavioral Physiology. - 2010. - V.40, №. 7. - P. 773-778).

- 5) Сотников О.С., Васягина Н.Ю., Рыбакова Г.И., Чепур С.В. Попытка ингибирования сокращения нервных отростков в среде, лишенной ионов кальция. // Бюлл. exper. биол. и мед. - 2010. - Т. 149, № 2. - С. 232-235.
- 6) Сотников О.С., Васягина Н.Ю., Кокурина Т.Н. Аксиальный цитоскелетный тяж – динамическая структура осевого цилиндра. Альманах, выпуск 32. М.: ЗАО "Ретиноиды". - 2011. - С. 88-98.
- 7) Васягина Н.Ю., Рашевская Ю.В. Изучение сократительной активности живых изолированных нейронов и попытка остановить их ретракцию с помощью цитохалазина В. // Сб. науч. статей II Международной научно-практической конференции "Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии, фармакологии и медицине". - СПб. - 2011. - Т. 2. - С. 138-139.
- 8) Васягина Н.Ю., Сотников О.С., Гендина Е.А. Сокращение травмированных отростков нервных клеток. // Морфология. - 2011. - Т. 139, №2. - С. 31-35.
- 9) Сергеева С.С., Васягина Н.Ю., Сотников О.С., Краснова Т.В. и Гендина Е.А. Сократительная и электрическая активность нейрона при действии колхицина. // Морфология. - 2012. - Т. 142, № 6. - С. 25-29.
- 10) Васягина Н.Ю., Сергеева С.С. Влияние нимодипина на электрическую активность нейрона. // VII Всероссийская конференция с международным участием "Механизмы функционирования висцеральных систем". - СПб. - 2012. - С. 51-52.
- 11) Васягина Н.Ю., Сергеева С.С., Сотников О.С., Арчакова Л.И., Новаковская С.А. Влияние цитохалазина В на сократительную активность поврежденного нейрона. // III конференция Общества клеточной биологии. - 2012. - Т 54, № 9. - С. 671-672.
- 12) Васягина Н.Ю., Сергеева С.С. Действие колхицина на сократительную и электрическую функции нейрона. // VIII Международный междисциплинарный конгресс "Нейронаука для медицины и психологии". - Судак. - 2012. - С. 107-108.
- 13) Васягина Н.Ю., Сотников О.С., Кокурина Т.Н., Краснова Т.В. Сократительная активность живых изолированных нейронов и попытка ее ингибирования с помощью цитохалазина В. // Бюлл. exper. биол. и мед. - 2013. - Т. 155, № 2. - С. 251-254.