

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ
ВОЛГОГРАДСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

А.В. Смирнов, А.А. Спасов, Г.Л. Снигур, М.В. Шмидт, О.Ю. Евсюков

**ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ МОРФОЛОГИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ
АЛИМЕНТАРНОМ ДЕФИЦИТЕ МАГНИЯ**

Монография

Волгоград
Издательство ВолгГМУ
2014

УДК
ББК

Монография печатается по решению Центрального методического совета
Волгоградского государственного медицинского университета.

Рецензенты:

П.А. Галенко-Ярошевский – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Л.Н. Рогова – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Патологическая морфология головного мозга при алиментарном дефиците магния: монография / А.В. Смирнов, А.А. Спасов, Г.Л. Снигур, М.В. Шмидт, О.Ю. Евсюков.- Волгоград: Изд-во ВолгГМУ. - 2015.-153с.

ISBN

А.В. Смирнов – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет», заведующий лабораторией морфологии, иммуногистохимии и канцерогенеза ГБУ Волгоградский медицинский научный центр;

А.А. Спасов – академик РАН, Заслуженный деятель науки, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет», директор ГБУ Волгоградский медицинский научный центр;

Г.Л. Снигур – доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой биологии ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет», заместитель директора ГБУ Волгоградский медицинский научный центр;

М.В. Шмидт – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет», научный сотрудник лаборатории морфологии, иммуногистохимии и канцерогенеза ГБУ Волгоградский медицинский научный центр;

О.Ю. Евсюков – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет».

В монографии отражены вопросы структурной организации головного мозга при экспериментальном моделировании алиментарного дефицита магния. Представлены патоморфологические особенности иммунофенотипа и ультраструктурная характеристика нейронов при дефиците магния и фармакологической коррекции.

Монография может быть рекомендована для специалистов биологических и медицинских отраслей науки, врачей всех специальностей, студентов вузов, обучающихся на медицинских и биологических направлениях подготовки, а также всех тех, кто интересуется вопросами нейробиологии.

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|-----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 4 |
| ВВЕДЕНИЕ..... | 5 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 8 |
| 1.1. Современные представления о гомеостазе ионов магния..... | 8 |
| 1.2. Роль ионов магния в патологии нервной системы..... | 18 |
| 1.3. Дефицит магния: роль в органопатологии и патоморфологические аспекты..... | 26 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 38 |
| 2.1. Методика постановки эксперимента..... | 38 |
| 2.2. Методы исследования..... | 39 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ..... | 45 |
| 3.1. Патоморфологическая характеристика коры полушарий, гиппокампа и базальных ядер конечного мозга животных при моделировании алиментарного дефицита магния..... | 47 |
| 3.2. Патоморфологическая характеристика промежуточного мозга животных при моделировании алиментарного дефицита магния..... | 64 |
| 3.3. Патоморфологическая характеристика среднего мозга животных при моделировании алиментарного дефицита магния..... | 91 |
| 3.4. Патоморфологическая характеристика продолговатого мозга и мозжечка животных с моделируемым магниевым дефицитом..... | 95 |
| 3.5. Количественная характеристика различных отделов головного мозга животных при моделировании алиментарного дефицита магния..... | 104 |
| 3.6. Особенности структурных изменений головного мозга при пероральной коррекции дефицита магния..... | 109 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... | 119 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 135 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Mg^{2+} – ионы магния

Ca^{2+} - ионы кальция

Na^{+} - ионы натрия

АТФ – аденозинтрифосфат

ГЭПС – гранулярная эндоплазматическая сеть

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЛПВП – липопротеины высокой плотности

ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности

ПАП – пероксидазно-антипероксидазный метод

ПВЯ – паравентрикулярное ядро гипоталамуса

СОЯ – супраоптическое ядро

ЦНС – центральная нервная система

GFAP – кислый фибриллярный астроцитарный белок

i-NOS – индуцибельная нитрооксидсинтаза

e-NOS – эндотелиальная нитрооксидсинтаза

NMDA – N-метил-D-аспартат

TRPM6 – transient receptor potential melastatinum 6

TRPM7 – transient receptor potential melastatinum 7

VCAM – vascular cell adhesion molecule 1

ВВЕДЕНИЕ

Проблема всестороннего изучения дефицита магния является актуальной, поскольку магний представляет собой один из важнейших макроэлементов, играющих ключевую роль в физиологических и патологических процессах в нервной системе [Dachtler J. et al., 2011; Torimitsu K. et al., 2012; Palacios-Prado N. et al., 2013; Sah N., Sikdar S.K., 2013; Xiao G. et al., 2013]. Являясь одним из наиболее распространенных внутриклеточных катионов, магний входит в состав множества ферментов и участвует практически во всех видах обмена веществ [Авцын А.П. и др., 1991; Тутельян В.А. и др., 2002; Скальный А.В. и др., 2004; Иежица И.Н. и др., 2010; Спасов А.А. и др., 2011; Rayssiguier Y. et al., 2005; Durlach J. et al., 2007; Maier J.A. et al., 2010], чем объясняется многообразие проявлений нарушения гомеостаза данного макроэлемента в организме.

В последние годы активно изучается роль дефицита магния в процессах повреждения и регенерации нейронов [Trapani V. et al., 2011; Kim H.J. et al., 2013; Taniguchi R. et al., 2013], механизмах нейропластичности и связанных с ними процессов обучения и памяти [Kovasč R. et al., 2009; Billard J.-M. et al., 2010; Dachtler J. et al., 2011], патологии сосудистого тонуса [Maier J.A. et al., 2010; Spasov A.A., Zheltova A.A., Kharitonova M.V., 2012], нервно-мышечной передачи [Tymianski M.M. et al., 2009; Taniguchi R. et al., 2013], синтеза и секреции нейропептидов головного мозга [Спасов А.А. и др., 2008], модуляции рецепторной активности нейронов и их микроокружения [Громова О.А., Гоголева И.В., 2007; Sharopov S. et al., 2012].

Снижение содержания магния в организме человека в различных странах, в том числе, и в России [Шилов А.М., 2008], возникающее вследствие ряда заболеваний (хронический алкоголизм, заболевания сердечно-сосудистой, пищеварительной, выделительной и других систем), как результат воздействия экологических, стрессовых факторов, особенностей питания, действия некоторых лекарственных средств,

свидетельствует об актуальности изучения повреждения органов при дефиците магния [Петров В.И. и др., 2006; Спасов А.А. и др., 2008; Акарачкова Е.С. и др., 2011; Спасов А.А. и др., 2012; Vierling W. et al., 2013].

Недостаток магния создает неблагоприятный преморбидный фон для большого числа нозологий – метаболического синдрома, сахарного диабета, коронарной патологии сердца, дислипидемий, нефролитиаза [Паньшин Н.Г. и соавт., 2011; Rodan A., 2011; Vink R., et al., 2011], а также широкого круга заболеваний нервной системы (эпилептических и судорожных синдромов, бокового амиотрофического склероза, экстрапирамидных расстройств, депрессии, мигрени и других цефалгий, сосудистых и нейродегенеративных поражений и др.) [Kovasč R. et al., 2009; Vink R., Nechifor M., 2011; Palacios-Prado N. et al., 2013].

В настоящее время накоплено немало данных о структурных преобразованиях различных органов и тканей при дефиците магния [Паньшин Н.Г. и соавт., 2011; Смирнов А.В. и соавт., 2012; Bobkowski W., et al., 2005; Maier J.A. et al. 2010]. Большинство ученых рассматривает дефицит магния как пусковой механизм повреждения сосудистого эндотелия, что является ключевым звеном атерогенеза, воспаления и тромбообразования, приводящим к ишемическим и дистрофическим изменениям в органах и тканях [Maier J.A. et al., 2010]. Повреждение сосудов при дефиците магния является одним из возможных путей гипоксической альтерации нейронов [Aarts M.M. et al., 2003; Jiang H. et al., 2008]. Поражение нервной системы при дефиците магния сопровождается нарушением процессов синаптической передачи и нейропластичности, однако структурные и ультраструктурные аспекты этих изменений изучены недостаточно [Torimitsu K. et al., 2012].

В последние годы в литературе активно изучается роль биомаркеров магниевых метаболизма – белков семейства transient receptor potential melastatin (TRPM6 и TRPM7) – в развитии молекулярных механизмов многих заболеваний нервной системы [Bahia P.K. et al., 2012; Asrar S., Aarts M.M., 2013; MacDonald J.F. et al., 2013]. При этом данные о преобразованиях этих

рецепторных каналов, обеспечивающих селективный перенос в клетки двухвалентных катионов (в первую очередь, ионов магния и кальция), в условиях дефицита магния остаются мало изученными.

Несмотря на определенный прогресс в исследовании основных патогенетических механизмов воздействия дефицита магния, многие аспекты структурных изменений в головном мозгу до сих пор остаются мало изученными [Смирнов А.В. и др., 2012; Taniguchi R. et al., 2013].

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные представления о гомеостазе ионов магния.

В биологических системах магний (Mg^{2+}) – один из важнейших макроэлементов, физиологическая роль которого проявляется на различных уровнях организации живой материи – молекулярном, субклеточном, клеточном, тканевом, органном, системном и организменном. Являясь кофактором более 300 ферментов (преимущественно, аденозинтрифосфат-зависимых), магний принимает участие в ката- и анаболизме полипептидов, полинуклеотидов, липидов, обменных реакциях моносахаридов и их производных, активации аминокислот и их производных, окислительном декарбоксилировании пирувата и других компонентов цикла Кребса [Харитонов М.В., 2008; Спасов А.А. и др., 2012; Maier J.A. et al., 2007].

Среди различных макро- и микроэлементозов дефицит магния имеет особое значение для нарушения структуры и функций сердечно-сосудистой, нервной, эндокринной систем [Авцын А.П. и др., 1991]. В настоящее время накоплено большое количество данных о ключевой регуляторной роли ионов Mg^{2+} в функционировании нейронов и их микроокружения, тем не менее, многие аспекты магний-зависимых механизмов повреждения нервных клеток по-прежнему остаются недостаточно изученными [Romani A., Maguire M.E., 2002].

В организме человека менее 1% общего количества ионов магния находится в плазме крови и эритроцитах, большая часть катиона распределяется между костной тканью (53%), и внутриклеточной средой мышечной (27%) и рыхлой волокнистой соединительной (19%) тканей.

Более 90% внутриклеточного магния находится в химических связях с органическими соединениями. Плазменный магний составляет менее 0,3% общего пула ионов Mg^{2+} в организме и представлен тремя компонентами – ионизированным (65%), связанным с плазменными белками, преимущественно, с альбуминами (33%), и находящимся в комплексе с

анионами, например, фосфатом и цитратом (5%) [Saris N.E. et al., 2000]. Концентрация ионов магния в спинномозговой жидкости колеблется в пределах 1-1,2 ммоль/л, из которой 45% составляет ионизированная, 55% – связанная фракция [Morris R.G. et al., 2003]. Более высокая по сравнению с сывороточной (0,7-1,1 ммоль/л) концентрация ионов магния создается за счет его активного транспорта через гематоэнцефалический барьер. Уровень внутриклеточного магния также поддерживается в узких пределах, за исключением изменений при некоторых патологических процессах, например, острой гипоксии или длительном дефиците этого катиона. Ионизированным является 0,5-5% внутриклеточного магния, остальная фракция связана с цитратом, белками (в том числе, в составе рибосом), АТФ, РНК, ДНК или депонирована в митохондриях, эндоплазматической сети. Внутри самой клетки распределение связанного магния также неоднородно, с повышением его содержания от периферических частей цитоплазмы к перинуклеарной области [Konrad M. et al., 2004].

Скорость переноса ионов магния через клеточные мембраны в разных тканях неодинакова: например, в кардиомиоцитах, гепатоцитах и эпителии почечных канальцев она несколько выше, чем в эритроцитах, клетках скелетных мышц, нейронах [Rude R.K., 1998]. Впервые изучение кинетики магния началось в 60-х годах XX века с использованием в качестве метки радиоактивного изотопа Mg^{28} . Avioli L.V. и Bergman M. предложили разделить обмениваемый пул ионов магния на быстрообращаемый (составляет 15% магния организма, в основном, внеклеточный) и медленнообращаемый, внутриклеточный, составляющий около 70%. Трансмембранный перенос ионов магния происходит за счет двух важнейших механизмов: параклеточного, или пассивного, преобладающего в норме, и трансклеточного, или активного, который реализуется во время снижения поступления магния в клетки [Kaune L.H., Lee D.B., 1993].

Относительно медленный транспорт ионов Mg^{2+} через плазматические мембраны гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) в отсутствие гормональных

стимулов, абсолютное преобладание общего и свободного Mg^{2+} внутри высокоспециализированных нервных клеток, и ограниченный диапазон изменений уровня свободной фракции Mg^{2+} , все эти факты способствовали в течение длительного времени предположению, что клеточная концентрация ионов магния существенно не меняется, а является постоянной на уровне, достаточном для выполнения функций этого катиона, как кофактора различных клеточных ферментов и белков. Однако в последнее время накоплено немало данных, указывающих на наличие индуцированных потоков Mg^{2+} через плазматическую мембрану различных клеток млекопитающих, в том числе нейронов, под воздействием различных метаболических или гормональных стимулов [Vink R. et al., 2011].

О возможности переноса ионов Mg^{2+} через ГЭБ путем трансцеллюлярного механизма разумно предположить, исходя из сравнения с другими гистогематическими барьерами. В настоящее время известны и продолжают активно изучаться транспортные системы по переносу двухвалентных катионов через клеточные мембраны: TRPM6, транспортный белок для катионов магния, локализованный в апикальной мембране эпителия дистальных извитых почечных канальцев, места активной реабсорбции магния [Voets T. et al., 2004]; TRPM7, который также играет важную роль в магниевом гомеостазе [Schmitz C. et al., 2003]. Методом количественной ПЦР в головном мозге мышей обнаружены высокие концентрации мРНК TRPM3 и TRPM7, а также выявлены и 19 других изоформ TRPM [Brown R.C. et al., 2008]. Кроме того, в головном мозге человека TRPM1, 2, 3, 6 и 7 были также обнаружены с помощью количественной ПЦР в реальном времени [Fonfria E. et al., 2006]. Присутствие TRPM в эндотелиальных клетках сосудов головного мозга было установлено на эндотелиальных клеточных культурах [Brown R.C. et al., 2008]. TRPM6 и TRPM7, переносчики ионов магния [Schlingmann K.P. et al., 2002], вероятно, играют главную роль в трансцеллюлярном транспорте ионов магния в нейронах и эндотелиальных клетках сосудов головного

мозга. Доказательства этого предположения могут быть получены при измерении внутриклеточного содержания ионов магния в культурах клеток эндотелия, подобные опытам по аналогичному анализу культур клеток молочных желез [Voets T. et al., 2004].

В настоящее время наиболее аргументированными являются результаты генетических исследований случаев семейной гипомагниемии [Schlingmann K.P. et al., 2002; Walder R.Y. et al., 2002; Konrad M. et al., 2004], в которых определены TRPM6 и TRPM7 в качестве факторов трансцеллюлярного транспорта ионов магния и клаудины 16 [Efrati E. et al., 2005] для парацеллюлярного пути переноса катионов в эпителии почечных канальцев. При этом TRPM7 также были обнаружены в гладкомышечных клетках сосудов [Callera G.E. et al., 2009].

О том, что TRPM7 играют ключевую роль в транспорте ионов магния в клетки стало впервые известно благодаря исследованиям, проведенным группой ученых под руководством профессора Nadler M.J.. Nadler M.J., с соавт., [2001], а также Runnels L.W., с соавт. [2001], свидетельствуют о своеобразной структуре TRPM7, сочетающей строение ионного канала с альфа-киназным доменом на С-конце. Хотя изначально предполагалось, что значение TRPM7 состоит в Ca^{2+} -опосредованной передаче внутриклеточных сигналов в лимфоцитах, позже было доказано, что канал транспортирует преимущественно катионы Mg^{2+} и Ca^{2+} [Nadler M.J. et al., 2001], а также следовые количества других двухвалентных катионов, таких как Ni^{2+} и Zn^{2+} [Monteilh-Zöhler M.K. et al., 2003; Bessac B.F., Flieg A., 2007]. Ген TRPM7, расположенный в локусе 15q21 хромосомы человека, кодирует белок, состоящий из 1865 аминокислот с 10 трансмембранными доменами, при этом С- и N- концы располагаются внутри клетки. Белок TRPM7 экспрессируется, хотя и в различной степени, во всех исследованных клетках млекопитающих. Особый интерес представляет тот факт, что TRPM7 является одним из ключевых рецепторных каналов во внутренней мембране митохондрий, регулирующих активность АТФ-синтазы и некоторых протонных ионофоров

(карбонил-цианид *m*-хлорофенилгидразона, ингибитора окислительного фосфорилирования) [Kim B.J. et al., 2007].

В плане пространственной организации TRPM7 представляет собой тетрамер, но существуют разногласия относительно того, что либо белок состоит из 4 идентичных мономеров, либо сочетания TRPM7 и TRPM6, расположенных в различных стехиометрических пропорциях в разных частях клеточной мембраны или в разных типах клеток. Ряд исследователей [Voets T. et al., 2004] утверждают о структурно-функциональной идентичности TRPM7-белков экспрессируемым TRPM6 каналам в HEK-293 клетках с электрофизиологическими свойствами, аналогичными TRPM7. В противоположность этому, Chubakov V. с соавт., [2004], отметили отсутствие ионных токов через TRPM6, когда канал экспрессируется самостоятельно в HEK-293 клетках или ооцитах, и предположили, что TRPM7 ко-экспрессия была необходима для TRPM6, чтобы последний включился в перенос ионов на уровне плазматической мембраны. Schmitz C. с соавт., [2003], впоследствии подтвердили ассоциацию TRPM6 и TRPM7 белков для адекватного функционирования канала. В исследованиях [Li M. et al., 2006], авторы показывают, что TRPM6 и TRPM7 могут действительно формировать химерные гетеротетрамеры, и, что TRPM6, TRPM7 и TRPM6/7 представляют собой три различные ионных канала с различной избирательной проницаемостью для двухвалентных катионов, рН чувствительностью, уникальной для каждого проводимостью. Gwanyanya A. с соавт., [2004], показали, что TRPM6 могут образовывать гомотетрамерные каналы или гетеротетрамерные TRPM6/7 каналы. Следствием этих наблюдений является то, что TRPM6, TRPM7 и TRPM6/7 каналы могут играть разные роли при различных физиологических или патологических состояниях в различных тканях.

Тем не менее, постепенно накапливаются данные о модуляции работы этих переносчиков и, в частности, механизмах TRPM7-опосредованного регулирования. В случае увеличения внутрицитоплазматического тока через

открытые каналы TRPM7 протонов, которые конкурируют с Ca^{2+} и Mg^{2+} за места связывания, отмечается снятие блокады двухвалентных катионов для внутриклеточного поступления моновалентных катионов [Monteilh-Zöller M.K. et al., 2003; Bessac V.F., Fleig A., 2007]. Повышение внеклеточной концентрации протонов значительно увеличивает проницаемость мембраны для одновалентных катионов, также требуется более высокая концентрация протонов, чтобы вызвать максимальное увеличение транс-TRPM7-токов в условиях, когда внеклеточные концентрации Ca^{2+} и Mg^{2+} увеличиваются. После увеличения внеклеточной концентрации ионов H^+ сродство TRPM7-каналов к Ca^{2+} и Mg^{2+} значительно уменьшается. Эти исследования показывают, что при физиологическом pH ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} блокируют транс-TRPM7-потоки моновалентных катионов; при более высокой концентрации протонов связь TRPM7 и ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} снижается, что делает возможным проникновение одновалентных катионов в канал [Jiang J., 2005].

Реализация пострецепторных каскадных механизмов, по данным одних авторов, происходит с участием фосфоинозитолдифосфата (PIP2) [Clapham D.E., Runnels L.W., 2002], а по данным других авторов, центральное место в регуляции рецепторов TRPM7 отводится циклическому аденозинмонофосфату (цАМФ) [Takezawa R., 2004].

Активация транс-TRPM7 переноса ионов осуществляется только при наличии физиологической клеточной концентрации ионов магния, в то время как уменьшение ее ниже физиологического уровня приводит к фосфолипаза-С-опосредованной инактивации TRPM7, скорее всего, за счет уменьшения PIP2 внутри клетки [Langeslag M. et al., 2007]. Взаимодействие между TRPM7 и фосфатидил-инозитольными метаболитами дополнительно подтверждается тем фактом, что TRPM7 требуется для устойчивого фосфатидилинозитол-3-киназного (PI3) пути сигнализации в лимфоцитах [Sahni J., Scharenberg A.M., 2008]. При наличии физиологической концентрации внеклеточного Mg^{2+} , скорость роста TRPM7-дефицитных

клеток быстро снижается в результате инактивации PI3-киназы [Sahni J., Scharenberg A.M., 2008].

Исследование, проведенное Clark K. с соавт., [2006], показало, что аутофосфорилирование играет ключевую роль в активации TRMP7 киназного домена. Визуализация фосфорилированных доменов методом масс-спектрометрии подтверждает аутофосфорилирование TRPM7 домена киназы, которая, в свою очередь, увеличивает скорость субстратного фосфорилирования. Это исследование также отмечает большое число (37 из 46) аутофосфорилированных участков в области рецептора, богатой серин-треониновыми остатками, и непосредственно предшествующей киназному каталитическому домену [Clark K. et al., 2008]. Удаление этой части канала не влияет на внутреннюю каталитическую активность киназы, но предотвращает субстратное фосфорилирование, что подтверждает роль этого домена в субстратном узнавании [Clark K. et al., 2008]. Отмечено, что серин-треониновый домен не совпадает в аминокислотной последовательности в соответствующей области TRPM6, домен киназы этого канала также требует аналогичного аутофосфорилирования его серин-треониновых остатков для адекватного узнавания субстрата и эффективного субстратного фосфорилирования [Clark K. et al., 2008].

В настоящее время доказано, что только аннексин I [Dorovkov M.V., Ryazanov A.G., 2004] и тяжелые цепи миозина [Clark K. et al., 2008], а также кальпаины [Su L-T. et al., 2006] являются субстратами фосфорилирования киназного домена TRPM7. Несмотря на ограниченное количество лигандов, полагают, что значение TRPM7 в клетках заключается не только в регуляции магниевого гомеостаза, но также и механизмов клеточной адгезии, сократимости, условий развития воспаления.

Эту двойную роль TRPM7 внутри клеток, в частности, гладкомышечных волокон, отмечают последние наблюдения Touyz R.M. и его коллеги [Paravicini T.M. et al., 2012]. В этом исследовании авторы сообщают, что миоциты отдельных фрагментов аорты мышей с

моделированием у них низкой внутриклеточной концентрации Mg^{2+} характеризовались увеличением экспрессии TRPM7, но снижением уровня экспрессии аннексина-I. Поскольку аннексин-I является внутриклеточным сосудистым противовоспалительным фактором [Parente L., Solito E., 2004], результаты этого исследования свидетельствуют о потенциально важной роли TRPM7 в регуляции структурно-функциональной сосудистой целостности.

Особый интерес представляют исследования, посвященные роли TRPM7 в функционировании нейронов и их изменений в условиях гипоксии или ишемически-реперфузионного повреждения. Благодаря своей способности транспортировать либо Ca^{2+} , либо Mg^{2+} двойственная роль TRPM7 проявляется и в переносе этих катионов. В условиях активации длительной недостаточности кислорода и глюкозы, TRPM7 способствуют активации внутриклеточных кальциевых потоков, которые приводят к повреждению нейронов [Aarts M.M. et al., 2003]. В противоположность этому, перенос ионов Mg^{2+} через каналы TRPM7 повышает антиапоптотические и другие клеточные механизмы выживания, предотвращая аноксическую гибель нейронов [Clark K. et al., 2006]. Согласно данным Wei W.L. и соавт., [2007], активация TRPM7-канала в условиях низкой внеклеточной концентрации двухвалентных катионов является летальной для клетки. Также, Jiang J. с соавт., [2008], сообщают, что окклюзия средней мозговой артерии в течение 1 часа увеличивает TRPM7 экспрессию в ипсилатеральной области гиппокампа, вызывая необратимые повреждения нейронов. Повышенная экспрессия TRPM7 и ее последствия для нейронов в значительной степени нивелируется предварительной обработкой их фактором роста нервов за счет активации тропомиозин-рецепторной киназы A и ее нейротрофического влияния [Jiang J. et al., 2008]. Применение ингибиторов 5-липоксигеназы может заблокировать уже активированные TRPM7, не изменяя дальнейшую экспрессию белка и его концентрацию в клеточных мембранах, что, по сути, можно представить как

путь предотвращения клеточной гибели [Chen H-S. et al., 2010]. Однако, важное значение активация TRPM7 имеет не только в возможной гипоксической альтерации нейронов, но и преобразованиях синаптической пластичности, так как рядом авторов [Krapivinsky G. et al., 2006] было показано, что изменение функциональной активности TRPM7 может отражать нарушения процессов холинергической нейротрансмиссии в нейронах головного мозга.

Важное место в регуляции магниевого гомеостаза имеет и другой представитель семейства transient receptor potential of melastatin – TRPM6. Уникальная локализация TRPM6 каналов в эпителиоцитах толстой кишки и почечных дистальных извитых канальцев подчеркивает особую их роль в кишечной абсорбции и почечной реабсорбции ионов магния. TRPM6 ген был первоначально идентифицирован как место различных мутаций, ответственных за развитие врожденной гипомагниемии со вторичной гипокальциемией (HSH), редкого аутосомно-рецессивного заболевания, характеризующегося одновременным снижением в плазме концентрации ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} . Проявления этого заболевания могут быть нивелированы путем массивной внутривенной инфузии Mg^{2+} -содержащих солей с последующим их пероральным приемом [Schlingmann K.P. et al., 2002]. Удивительно, но, в то время как гипокальциемия полностью устраняется за счет этого лечения, пациенты продолжают испытывать дефицит ионов Mg^{2+} в плазме на уровне около 0,5-0,6 ммоль/л, то есть около половины физиологического уровня [Schlingmann K.P. et al., 2002]. Поскольку первичный дефект у этих пациентов проявляется в отсутствии экспрессии TRPM6 в кишечнике [Schlingmann K.P. et al., 2002], пероральные Mg^{2+} -содержащие добавки быстро фильтруются на уровне почечных клубочков и увеличивают пассивную почечную реабсорбцию через парацеллин-1. Тем не менее, этот механизм трансклеточного поглощения ионов магния через функционирующие почечные TRPM6 каналы снижается и не в состоянии

восстановить физиологические концентрации ионов в плазме [Schlingmann K.P. et al., 2002].

На структурно-функциональном уровне экспериментальные данные свидетельствуют о том, что канал имеет форму тетрамера с локализацией в плазматической мембране. Несколько мутаций гена TRPM6 были идентифицированы [Walder R.Y. et al., 2002]. Большинство из них приводит к формированию укороченного и нефункционального канала [Walder R.Y. et al., 2002]. Миссенс-мутация S¹⁴¹L происходит на N-конце канала и предотвращает его сборку как гомо-тетрамера или гетеро-тетрамера с TRPM7 [Walder R.Y. et al., 2002].

Особенностью TRPM6 является наличие альфа-киназного домена на C-конце. Как и в случае TRPM7, удаление домена киназы не устраняет полностью активность канала, но модулирует степень, в которой канал регулируется внутриклеточной свободной концентрацией ионов Mg²⁺ или Mg²⁺-АТФ комплекса [Chubanov V. et al., 2004; Schmitz C. et al., 2005; Thebault S. et al., 2008]. TRPM6 киназный домен может фосфорилировать TRPM7 канал внутри структуры гетеротетрамера, в то время как противоположный процесс не происходит [Schmitz C. et al., 2005].

Механизмы экспрессии и/или активации TRPM6 канала модулируются в естественных условиях. Так, эстрогены (17-эстрадиол) регулируют мРНК TRPM6 в эпителии толстой кишки и почек, не оказывая влияния на мРНК TRPM7 [Groenestege W.M. et al., 2006; Cao G. et al., 2009]. В отсутствие эстрогена, репрессор эстроген-рецепторной активности (REA) связывается с 6-й, 7-й и 8-й бета-листами TRPM6 киназного домена и таким образом тормозит TRPM6 активацию [Cao G. et al., 2009]. Краткосрочное увеличение концентрации эстрогенов разрушает связь между REA и TRPM6, что приводит к повышенной активности канала [Cao G. et al., 2009]. Пищевой дефицит Mg²⁺ оказывает тот же эффект, что и отсутствие эстрогенового влияния [Groenestege W.M. et al., 2006; Rondon L.I. et al., 2008]. И напротив, Mg²⁺-обогащенная диета усиливает образование мРНК TRPM6 только в

толстой кишке, что соответствует повышению кишечной абсорбции ионов [Groenestege W.M. et al., 2006].

Генетические факторы контроля TRPM6 экспрессии и активности, а также пищевое ограничение ионов магния увеличивают магниевую резорбцию, и этот процесс коррелирует с повышением TRPM6 экспрессии в толстом кишечнике и почках [Groenestege W.M. et al., 2006; Rondon L.I. et al., 2008].

Таким образом, в настоящее время накоплено большое количество данных о роли специализированных клеточных ионотропных каналов TRPM6 и TRPM7 в обмене ионов магния. Тем не менее, в литературе практически отсутствуют данные об особенностях экспрессии этих рецепторов в нейронах в условиях стойкой магниевой недостаточности, что безусловно необходимо для понимания не только процессов транспорта ионов в нервной системе, но и участия TRPM6 и TRPM7 в процессах повреждения и адаптации, клеточного роста и дифференцировки, синаптической и нейропластичности.

1.2. Роль ионов магния в патологии нервной системы.

Несколько важных аспектов биохимических свойств магния указывают на возможную роль этого катиона в механизмах повреждения нервных клеток. В отличие от быстро обновляющихся лабильных клеточных популяций нейроны функционируют в течение всей жизни организма, что необходимо для выполнения специализированных функций хранения и передачи информации этими клетками. Как и другие клетки, нейроны требуют наличия трофических факторов для сохранения структурно-функциональной целостности. Нейротрофины, которые включают фактор роста нервов (NGF), мозговой нейротрофический фактор (BDNF), и нейротрофины 3 и 4/5 [Lewin G.R., Barde Y.A., 1996], способны взаимодействовать с Trk-рецепторами клеточных мембран, обладающих тирозинкиназной активностью (TrkA, TrkB и TrkC). Фосфорилированные

компоненты рецепторов, в свою очередь, служат активными центрами действия различных ферментов, таких как фосфолипаза C, фосфатидилинозитол-3-киназа, а также адапторных белков, такие как Shc, координирующих выживаемость нейронов посредством Akt- и MAP-киназных сигнальных путей [Hennigan A. et al., 2007].

Отсутствие нейротрофической поддержки, несомненно, есть наиболее изученный фактор, индуцирующий апоптоз в процессе развития нервной системы [Hennigan A. et al., 2007]. Однако большинство нейронов в центральной нервной системе млекопитающих обладают рецепторами для другого триггера апоптоза – глутамата. Глутамат является основным возбуждающим нейромедиатором, играющим важнейшую роль в развитии нервной системы, синаптической пластичности, а также процессах обучения и памяти в физиологических условиях [Riedel G. et al., 2003]. Наибольший интерес для изучения апоптоза нейронов имеют N-метил-D-аспартатные (NMDA) рецепторы, являющиеся тетра-гетеромерными ионотропными каналами, которые открываются при связывании с ними глутамата. В нормальных физиологических условиях мембранного потенциала покоя рецептор NMDA нейронов заблокирован ионами Mg^{2+} . Синаптическое высвобождение глутамата вызывает поступление ионов Na^+ через α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол-пропионатные (AMPA) рецепторные каналы в постсинаптической мембране, что приводит к ее частичной деполяризации, достаточной для ликвидации физиологического магниевого блока и возникновения потенциала действия. Активированные рецепторы AMPA и NMDA проницаемы не только для ионов Na^+ , но также и для Ca^{2+} . Именно внутриклеточный Ca^{2+} приток опосредует большинство эффектов NMDA рецепторов [Hetman M., Kharebava G., 2006].

Физиологические уровни активности синаптических NMDA рецепторов имеют важное значение для сохранения структурно-функциональных свойств нейронов [Hetman M., Kharebava G., 2006]. Однако неадекватное поступление глутамата и глутамат-индуцированная активация

NMDA рецепторов может ухудшить не только их сигнальные свойства, но и привести к гибели клеток. Концепция эксайтотоксичности была впервые предложена John Olney в 1969 году как токсический эффект чрезмерной или длительной активации рецепторов нейронов возбуждающими аминокислотами – глутаминовой и аспарагиновой [Olney J., 1969]. Чрезмерная стимуляция рецепторов глутаматом ведет к неблагоприятным эффектам, включая нарушения внутриклеточного гомеостаза кальция, дисфункцию митохондрий и эндоплазматической сети, увеличение продукции оксида азота (NO) и свободных радикалов, стойкую активацию эндогенных протеаз, увеличение экспрессии проапоптотических транскрипционных факторов и ранних генов клеточной гибели (IEGs), приводя, в конечном итоге, к апоптозу [Wang Y., Qin Z.H., 2010]. Эксайтотоксичность может выступать причиной повреждения нейронов при различных неврологических расстройствах, включая нарушения мозгового кровообращения и черепно-мозговую травму [Arundine M., Tymianski M., 2004], нейродегенеративные заболевания [Rego A.C., Oliveira C.R., 2003], родовую травму головного мозга [Johnston M.V., 2005]. NMDA-рецепторы являются важнейшими элементами глутамат-индуцированной эксайтотоксичности, поскольку ионы кальция, поступающие через патологически активированные NMDA рецепторы чаще ведут к гибели клеток, чем ионы кальция, поступающие через не-NMDA-рецепторные каналы глутамата или высокопороговые потенциал-чувствительные кальциевые каналы [Cristofanilli M., Akopian A., 2006].

Важным триггером повреждения нейронов является оксидативный стресс, в результате которого свободные радикалы (например, супероксид-анион радикал и гидроксильный радикал) вызывают модификацию липидов, белков и нуклеиновых кислот, нарушая химические связи в этих молекулах. Классическими и наиболее изученными механизмами апоптоза, индуцированного окислительным стрессом, являются фосфорилирование белка p53 и транскрипция про-апоптотических факторов, ведущих к

активации митохондриальной каспазы 9 [Nakagawa T., Sheng M., 2000]. Ключевыми компонентами программы апоптоза в нейронах, как и других типах клеток, являются белки Araf-1, Bcl-2, семейства каспаз [Mattson M.P., 2000]. При этом различные типы зрелых нейронов и нейронов на разных стадиях онтогенетического развития экспрессируют различные комбинации Bcl-2 и некоторых каспаз, что является одним из способов обеспечения специфической регуляции процессов программированной нейрональной гибели [Yuan J., Yankner B.A., 2000].

Таким образом, повреждение нейронов реализуется тремя основными механизмами: отсутствием нейротрофических факторов, патологической гиперстимуляцией глутаматных рецепторов и оксидативным стрессом. В каждом из этих сигнальных путей участие магния и его дефицита имеет свои особенности. Во-первых, большинство нейротрофинов специфически взаимодействуют с рецепторами тирозинкиназы (Trk), которая требует в качестве кофактора ионы магния. Фосфатидилинозитол-киназы и антиапоптотическая Akt-киназа, также требуют магния для своей активации. Внеклеточный магний может модулировать эффекты нейротрофинов на ЦНС, или активировать системы их вторичных мессенджеров напрямую, влияя, в конечном счете, на жизнеспособность клеток, механизмы пролиферации и апоптоз [Trapani V., Mastrototaro L., Wolf F.I., 2011].

Во-вторых, в условиях нормальной поляризации клеточной мембраны магний, как известно, блокирует NMDA-рецепторы глутамата и предотвращает потоки ионов Na^+ и Ca^{2+} через эти каналы, защищая нейроны от повреждения, вызванного эксайтотоксичностью. В нормальных физиологических условиях активация NMDA рецепторов способствует также и нейропротекции, направленной против реализации программы апоптоза и эксайтотоксического повреждения, поскольку немагниева блокада NMDA рецепторов может напрямую вызывать гибель нейронов или повышать их чувствительность к вторичному повреждению [Hardingham G.E., 2009]. Действительно, большинство антагонистов NMDA как нейропротекторные

молекулы в клинических испытаниях потерпели неудачу, в значительной мере обусловленную тяжелыми побочными эффектами [Lipton S.A., 2006]. Кроме того, было показано, что различные препараты, подавляющие трансмембранные потоки ионов в нейронах, в том числе NMDA антагонисты, индуцируют апоптоз в развивающемся головном мозгу новорождённых крысят и могут стать причиной долгосрочного поведенческого дефицита у них [Ikonomidou C., Kaindl A.M., 2011]. Таким образом, участие магния в повреждении нейронов может быть опосредовано его действием на NMDA-рецепторы.

В-третьих, магниевая депривация может вызвать или усугубить реакции оксидативного стресса, важного триггера гибели нейронов в патологических условиях. В связи с этим пищевые добавки солей магния могут иметь нейропротекторное значение. Известно, что магний является ключевым модулятором клеточной пролиферации и метаболизма, а эффекты гипомagneзии связаны с развитием воспаления, продукцией цитокинов, активацией фагоцитов с развитием оксидативного стресса [Maier J.A. et al., 2007]. Индукция гибели клеток, опосредованная оксидативным стрессом, была отмечена в различных тканях в условиях гипомagneзии. Так, у магни-дефицитных крыс выявлено ускорение процессов инволюции тимуса как классического примера апоптоза [Malpuech-Brugère C. et al., 1999]. Пищевой дефицит магния также индуцирует повреждение кардиомиоцитов, эндотелия и гладкомышечных клеток сосудов [Паньшин Н.Г., 2011; Altura V.M. et al., 2003; Tejero-Taldo M.I. et al., 2007; Altura V.M. et al., 2009], а также гепатоцитов [Martin H. et al., 2008]. Помимо усиления продукции активных форм кислорода, низкая внеклеточная концентрация ионов магния может быть фактором гибели клеток за счет изменения структуры ДНК. Это происходит не только при свободнорадикальном окислительном повреждении молекул ДНК, но также негативно сказывается и на механизмах репарации нуклеиновых кислот, поскольку магний является кофактором эндонуклеаз, лигаз и топоизомераз.

Среди важнейших биологических функций магния в нервной системе особую роль играет его участие в реализации механизмов нейропластичности и синаптической пластичности. Известно, что обмен нейромедиаторов, возбудимость клеточных мембран и уровень синаптической пластичности зависят от трансмембранных ионных потоков в нейронах [Roberts E.L., 1999]. Среди различных механизмов, которые могут объяснить нарушения синаптической пластичности при ионном дисбалансе в нервных клетках [Rosenzweig E.S., Barnes C.A., 2003; Foster T.C., 2007], активация N-метил-D-аспартат глутаматных рецепторов получила наибольшее признание. Действительно, эти рецепторы являются ключевыми регуляторами нейропластичности за счет их высокой проницаемости для ионов кальция, который, играя роль вторичного посредника в передаче внутриклеточных сигналов, вызывает активацию специфических внутриклеточных киназ и фосфатаз, и способствует установлению временных и постоянных межнейрональных связей [Wang J.H. et al., 1997]. Несмотря на то, гипотеза кальций-зависимой регуляции нейропластичности изначально вызвала наибольший интерес исследователей [Toescu E.C., 2004; Thebault S. et al., 2008], роль ионов Mg^{2+} , находящихся в достаточно большой концентрации в центральной нервной системе [Poenaru S. et al., 1997], в настоящее время, представляется гораздо более аргументированной. Снижение уровня мозгового Mg^{2+} тесно связано с возрастным увеличением риска развития нейродегенеративных заболеваний [Andrasi E. et al., 2005]. Изменения концентрации Mg^{2+} в головном мозге ухудшают функции памяти, что может говорить о ее NMDA-опосредованной магниевой регуляции [Bardgett M.E. et al., 2007].

Нарушение регуляции трансмембранного переноса ионов Mg^{2+} ведет к увеличению амплитуды локальных мембранных потенциалов концевой пластинки в нервно-мышечных соединениях. Тем не менее, имеет ли место аналогичный эффект в центральных синапсах по-прежнему остается неизученным. При иммуногистохимическом исследовании экспрессии

синаптофизина и синаптобревина в зубчатой извилине у животных с дефицитом магния отмечается уменьшение плотности иммунопозитивных синаптических нейронов, в то время, как подобные изменения в поле СА1 гиппокампа менее выражены [Burke S.N., Barnes C.A., 2006; Geinisman Y. et al., 2004]. Интересно, что при применении магния-треоната у крыс количество функциональных синаптических связей значительно увеличивается в обеих областях гиппокампа по сравнению с животными контрольной группы, что способствует индукции синаптической пластичности [Slutsky I. et al., 2010].

Возможную роль ионов магния в механизмах синаптической пластичности продемонстрировали путем изучения регуляции обмена нейромедиаторов в пресинаптических терминалях [Massieu L., Tapia R., 1997; Quintero J.E. et al., 2007; Abumaria N., Yin B. et al., 2011]. Комплекс холинергических нейронов базального отдела переднего мозга, включающий в себя медиальную продольную перегородку/диагональную полосу Брока, substantia innominata, базальные ядра Мейнерта-Брока, представляет собой одну из основных возбуждающих нейротрансмиттерных систем ЦНС [McKinney M., Jacksonville M.C., 2005]. Выброс ацетилхолина, индуцированный деполяризацией мембран нейронов этого комплекса, вызывает медленный и длительный возбуждающий постсинаптический потенциал, связанный с активацией мускариновых рецепторов. Магний действует на постсинаптические мускариновые рецепторы различными способами. Во-первых, ионы магния могут связываться с аллостерической областью M2 рецепторов, уменьшая ингибирующие эффекты некоторых селективных лигандов-модуляторов передачи внутриклеточного сигнала [Burgmer U. et al., 1998]. Во-вторых, Mg^{2+} уменьшает неселективный перенос катионов через M2-рецепторы при действии их агонистов и является необходимым для активации G-белка, связанного с мускариновыми рецепторами [Cladman W., Chidiac P., 2002; Zhang Q. et al., 2004]. Таким образом, изменения уровня магния в головном мозге, скорее всего, играют

важную роль в преобразованиях холинергических синапсов. Например, гипомагниемия значительно ослабляет ионофоретическую подвижность культур холинергических нейронов коры больших полушарий [el-Beheiry H., Puil E., 1990]; высокое сродство ацетилхолина к мускариновым рецепторам при болезни Альцгеймера также регулируется ионами магния [Ladner C.J., Lee J.M., 1999].

Наконец, о ключевой роли дефицита магния в нарушениях синаптической пластичности в последние годы стало известно также благодаря изучению обмена оксида азота – NO – в нейронах и эндотелиоцитах, гладкомышечных клетках сосудов головного мозга. В исследовании R. Kovasč и др., [2009], отмечено, что NO является важнейшим модулятором синаптической пластичности, и усиление синаптической передачи при эпилептических судорожных синдромах у животных с моделируемым дефицитом магния связано с усилением продукции оксида азота нейрональной нитрооксидсинтазой. NO может оказывать долгосрочные эффекты потенциации при эпилепсии и судорожных эквивалентах, опосредуя ингибирование митохондриальных электронно-транспортных комплексов [Brown R.C. et al., 2008], с нарушением переноса ионов и других соединений через мембраны митохондрий [Yuan X. et al., 2007). В присутствии активных форм кислорода в условиях оксидативного стресса, наблюдаемого при дефиците магния, NO становится источником высокотоксичного для нейронов и других клеток головного мозга пероксинитрида, способствуя тем самым свободнорадикальному повреждению при длительной эпилептической активности [Kovasč R. et al., 2009; Patel A. et al., 2010]. Модулируя функции NMDA рецепторов, окись азота облегчает глутаматергическую передачу [Choi Y.B., Lipton S.A., 2000], особенно в условиях гипомагниемии. Maurois P. и др., [2009], провели экспериментальные и клинические исследования, позволившие установить участие магния в судорожной активности, спровоцированных интенсивной звуковой стимуляцией, эпилепсии. Ими было показано, что при низком уровне магния снижается

порог возбудимости нейронов и повышается скорость распространения потенциала действия. За счет конкурентного угнетения тока Ca^{2+} в пресинаптические терминалы магний влияет на высвобождение нейротрансмиттеров в синаптическую щель [Rude R.K., 1998; Swaminathan R., 2003].

1.3. Дефицит магния: роль в органопатологии и патоморфологические аспекты.

В последние десятилетия поступление магния в организм человека снизилось. Основными причинами этого является как изменение стереотипов питания современного человека, так и ухудшение экологической обстановки, уменьшение содержания магния в экосистеме в целом.

В США гипомagneзиемия встречается в 2,5-15% общей популяции [Ma J. et al., 1995], а в Германии – у 14% населения [Schimatschek H.F. et al., 1994; Schimatschek H.F. et al., 2000; Spatling L. et al., 2000; Rempis R., 2001]. По данным разных авторов, частота встречаемости дефицита магния у больных, поступающих на стационарное лечение, различна. У новорожденных, находящихся в палатах интенсивной терапии, частота гипомagneзиемии составляет от 11% [Verive M.J. et al., 2000] до 22% случаев [Ahsan S.K. et al., 1998]. Оценка уровня магния в плазме показала, что снижение уровня общего магния имеется у 52,5%, а ионизированного – у 9,7% взрослых пациентов реанимационных отделений [Escuela M.P. et al., 2005].

С патогенетических позиций J. Durlach и коллеги, [2007], предложили различать алиментарный, или собственно дефицит магния, возникающий из-за уменьшения поступления магния с пищей и водой (magnesium deficite) и истощение запасов магния в организме, развивающееся вследствие нарушения механизмов регуляции магниевго гомеостаза (magnesium depletion). В Международной статистической классификации болезней и

проблем, связанных со здоровьем, X пересмотра недостаточность магния имеет шифр – Е61.2.

Проявления дефицита магния, как клинического синдрома, не имеющего строго специфических признаков, крайне разнообразны и являются результатом нарушения нормального функционирования всех систем и организма в целом [Шилов А.М. и соавт., 2008]. Особый интерес представляют клинические и функциональные аспекты расстройств нервной системы при дефиците магния.

Ранее всех при дефиците магния выявляются нервно-мышечные и психоневрологические расстройства [Altura В.М., 1991-92], проявляющиеся повышенной раздражительностью и нервно-мышечной гипервозбудимостью, которая выражается в виде тремора, фасцикуляций, симптомов Труссо, Хвостека, тетании. Частыми симптомами гипомagneзиемии являются судороги, гиперкинетические нарушения (атетоз, хореоподобные движения верхних конечностей), нистагм, дисфагия, повышенные сухожильные рефлексy, генерализованная слабость, обратимые изменения психики, анорексия и рвота. При тяжелой гипомagneзиемии Leicher С.Р. и коллеги, [1991], наблюдали у детей афазию, гемипарезы, нарушения когнитивных функций, которые исчезали после применения магниЙ-содержащих соединений. Гипомagneзиемия часто встречается у больных с гипервентиляционным синдромом, сопровождающимся тетанией, а сами приступы гипервентиляции и неприятных ощущений в области сердца могут быть следствием первичного дефицита магния [Fehlinger R., Seidel K., 1985; Hafen G. et al., 1996].

В настоящее время обсуждается вопрос о роли дисбаланса магния в патогенезе головной боли разных типов. Так, в ряде исследований показано, что дефицит магния тесно связан с распространяющейся корковой депрессией Лео [Mody I. et al., 1987], агрегацией тромбоцитов [Baudouin-Legros N., 1986], высвобождением субстанции Р [Weglicki W.B., Phillips T.M., 1992], обменом нейротрансмиттеров и вазоконстрикцией [Altura В.М., Altura

В.Т., 1982], т.е. основными патогенетическими звеньями гемикраний. Магний способен повышать порог распространяющейся кортикальной депрессии Лео при мигрени, индуцированной глутаматной эксайтотоксичностью, а гипомагниемия в свою очередь индуцирует ранние механизмы возникновения этого феномена [Mody I. et al., 1987]. Оксид азота (NO) играет роль синаптического модулятора, участвующего в обработке ноцицептивных сигналов [Kovasč R. et al., 2009], в дополнение к своему участию в регуляции кровотока в интракраниальных и экстракраниальных сосудах.

Согласно литературным данным, дефицит магния сопровождается такие психические заболевания, как синдром дефицита внимания с гиперактивностью, синдром Жилья де ля Туретта, аутизм, синдром навязчивых движений, депрессивно-маниакальный психоз, синдром «беспокойных ног» [Levine J. et al., 1999; Grimaldi B.L., 2002; Murck H., 2013]. Низкий уровень магния и высокий – кальция были зафиксированы в неокортексе больных депрессией [Basarsky T.A. et al., 1998]. Levine J. и соавторы, [1999], показали, что существует взаимосвязь между повышением отношения кальций/магний в спинномозговой жидкости и суицидальным поведением. С другой стороны, у пациентов с синдромом хронической усталости и предменструальным синдромом в результате приема препаратов магния улучшалось настроение [Cox I.M. et al., 1991]. Более того, после терапии магния аспарагинатом наблюдалась стабилизация настроения у пациентов с биполярными расстройствами [Chouinard G. et al., 1990].

Особую роль дефицит магния играет в развитии и прогрессировании нейро-дегенеративных нарушений. Так, в ряде исследований показано, что дефицит магния обуславливает клинические проявления и тяжесть когнитивных нарушений у пациентов с болезнью Альцгеймера, что отражается в нарушении механизмов синаптической пластичности, расстройствах эмоционального фона и долговременной памяти и развитии прогрессирующего слабоумия [Bardgett M.E. et al., 2007]. Снижение

внутриклеточной концентрации ионов магния в нейронах вызывает накопление в них синтезируемого СООН-терминального фрагмента белка APP, являющегося предшественником β -амилоида и усиление выделения A β -амилоида в нейропиль [Yu C. et al., 2010]. В индукции гибели нейронов черной субстанции при болезни Паркинсона в настоящее время основное значение придают дефициту магния и кальция, моделируемому в течение не менее 1 года у экспериментальных животных [Oyanagi K. et al., 2006].

В настоящее время дискутируется вопрос о роли нейромедиаторных обменных расстройств, вызванных стойким дефицитом магния, в патогенезе психических нарушений. Рядом авторов было показано, что снижение уровня магния изменяет чувствительность к действию фенамина [Holl J.E. et al., 1978] и серотонина [Vas P. et al., 1994]. Что касается уровня медиаторов в нервной системе у животных с моделируемым дефицитом магния, то однозначного мнения по этому вопросу нет. Согласно данным группы исследователей под руководством Amyard N., [1995], в головном мозгу у мышей со вторичной гипомagneзиемией содержание норадреналина было достоверно выше, чем у контрольной группы, а также животных, с генетически обусловленной магниевой недостаточностью, а концентрация серотонина и дофамина во всех трех группах достоверно не отличалась. Chutkow J.G. и Tyse G.M., [1979], показали, что при дефиците магния уровень моноаминов (норадреналина, 5-гидрокситриптофана и дофамина) не изменяется по сравнению с контролем.

Стойкий дефицит магния вносит существенный вклад в развитие сосудистой патологии, в частности, атеросклероза вследствие активации свободнорадикального перекисного окисления липидов и других компонентов клеточных мембран, индукции агрегации тромбоцитов и патологических изменений регуляции сосудистого тонуса. В условиях дефицита магния установлено развитие дислипидемии с повышением содержания хиломикрон и аполипопротеина B100, при этом концентрации ЛПВП, аполипопротеинов A1 и E снижаются [Rayssiguier Y. et al., 1981].

Триглицерид-содержащие липопротеины легче проникают через монослой эндотелия и становятся более уязвимыми к перекисной окислительной модификации [Gueux E. et al., 1995]. Увеличение концентрации триглицеридов обусловлено индукцией синтеза ЛПОНП и снижением клиренса триглицеридов [Rayssiguier Y., Mazur A., 2005].

О роли дефицита магния в развитии синдрома эндотелиальной дисфункции накоплено немало данных. Так, при алиментарном дефиците магния происходит увеличение плазменной концентрации важнейших маркеров эндотелиальной дисфункции – эндотелина и VCAM-1 при существенном снижении экспрессии эндотелиальной NO-синтазы, при этом повышается продукция общего NO и метаболитов NO – нитрита и нитрата [Желтова А.А., 2012].

Известно, что развитие эндотелиальной дисфункции тесно связано с индукцией системно-воспалительного ответа. Согласно исследованиям Maier J.A. [2007], системная воспалительная реакция на фоне проатерогенных изменений липидного статуса повышает протромбогенный потенциал сосудистой стенки, усиливает экспрессию молекул межклеточной адгезии и индуцирует пролиферацию гладкомышечных клеток. Согласно данным Libby P., Theroux P. [2005], формирование атеросклеротических изменений в стенках сосудов является результатом взаимодействия между модифицированными липопротеинами, макрофагами, Т-лимфоцитами и компонентами сосудистой стенки. Низкий уровень внеклеточного магния стимулирует синтез молекул адгезии, интегрина VLA-4 (very late activation antigen-4), экспрессируемых мононуклеарами. Адгезия лейкоцитов к стенкам капилляров является одним из ключевых этапов их миграции в ткани при воспалении и реакциях иммунного ответа. При дефиците магния отмечается повышение концентраций факторов роста интерлейкина-1 α и интерлейкина-6, задействованных в формировании реакции острой фазы и воспаления [Bernardini D. et al., 2005]. Наблюдается также увеличение диаметра и проницаемости сосудистой стенки, что облегчает процессы хемотаксиса

лейкоцитов, опсонизации, клеточно-матриксных взаимодействий при воспалении.

Изучение структурных изменений различных органов и тканей, развивающихся в условиях магниевого дефицита, является актуальной задачей, решение которой позволит разъяснить многие аспекты функциональных преобразований при нарушении обмена ионов Mg^{2+} . В настоящее время накоплено немало сведений о патоморфологических изменениях сердца, сосудов, почек и некоторых других органов в условиях стойкой магниевой недостаточности [Смирнов А.В. и др., 2011].

Выраженные изменения в сердечно-сосудистой системе при остром дефиците магния были описаны впервые М. Р. Schulman и D. М. Greenberg, [1949]; ими показано развитие экссудативного воспаления в миокарде, метаболических некрозов, обусловленных тяжелой магниевой недостаточностью.

Исследованию фиброгенеза в миокарде в условиях магниевого дефицита посвящены работы Zhang Y. с соавт., [2010], установившие структурно-функциональные корреляции между уровнем TRPM7-ассоциированного внутриклеточного потока ионов кальция и развитием кардиофиброз-индуцированной фибрилляции предсердий.

В условиях магниевого дефицита повреждение эндотелия интимы грудного отдела аорты и развитие эндотелиальной дисфункции связаны с изменением уровня экспрессии матриксных металлопротеиназ MMP-2 и -9 [Pagès N. et al., 2003].

В исследованиях [Паньшин Н.Г. и др., 2010], посвященных изучению структурных преобразований миокарда крыс в условиях моделируемого 8- и 12-недельного пищевого дефицита магния, детализированы многие аспекты повреждения кардиомиоцитов, эндотелия и сосудистого русла. Показано, что при моделировании алиментарного дефицита магния в миокарде развиваются обратимые, в том числе ультраструктурные, изменения в кардиомиоцитах характеризующиеся повреждениями сократительного и энергетического

аппаратов клетки в сочетании с атрофическими изменениями, которые носят стадийный характер и наиболее выражены на 12 неделе пищевой магниевой недостаточности. Отмечено также, что морфологические изменения интимы сосудов при дефиците магния могут явиться причиной недостаточности NO-синтезирующей функции и, вероятно, привести к ишемии сердечной мышцы в условиях повышенной потребности в кислороде.

При морфологическом исследовании аденогипофиза с алиментарной недостаточностью магния [Смирнов А.В. и др., 2011] показано уменьшение массы гипофиза, выраженное полнокровие синусоидов, уменьшение числа аденоцитов, о чем свидетельствует появление участков, где по данным морфометрического исследования имело место достоверное уменьшение удельной плотности ядер эпителиальных клеток. Вероятно, что выявленные изменения свидетельствуют о хронической дисфункции аденогипофиза с исходом у части животных в истощение аденоцитов гипофиза и нарушением продукции его тропных гормонов [Смирнов А.В. и др., 2011].

При изучении герминативного аппарата семенников в условиях дефицита магния [Смирнов А.В. и др., 2011] отмечены изменения в сперматогенных клетках на стадиях созревания и формирования; выявлено снижение среднего количества сперматогоний в канальце, количества мейозов в сперматогенном эпителии извитых семенных канальцев и индекса сперматогенеза, дистрофические изменения в сперматидах. В гормонпродуцирующем аппарате семенников обнаружено развитие атрофических изменений, проявляющееся в уменьшении относительного количества клеток Лейдига, площади их цитоплазмы.

Исследование структурно-функциональных характеристик нефронов с помощью метода электронной микроскопии [Sabour M.S. et al., 1962; Паньшин Н.Г., 2011] позволило установить развитие нефрокальциноза, связанного с усиленным накоплением в интерстиции ионов Ca^{2+} .

Таким образом, магний участвует в метаболических путях нейронов и их микроокружения, обмене нейромедиаторов, процессах нервно-мышечной

проводимости, ноцицепции, межклеточных кооперациях в процессах роста и дифференцировки клеток, иммунном и воспалительном ответах. Магниевого дисбаланс отрицательно сказывается на функционировании всех систем организма, в особенности, нервной и сердечно-сосудистой. Дефицит магния достаточно широко распространен в популяции и осложняет течение таких заболеваний нервной системы, как нарушения мозгового кровообращения и другие сосудистые поражения, депрессии, деменции, головные боли различного генеза, эпилепсия и судорожные расстройства, нейромышечные нарушения, дегенеративные и демиелинизирующие заболевания нервной системы. Несмотря на то, что в последние годы наметился определенный прогресс в исследовании механизмов магниевого гомеостаза и закономерностей структурно-функциональных преобразований в нервной системе при магниевой недостаточности, многие аспекты структурных преобразований головного мозга при патологии магниевого статуса остаются малоизученными.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Методика постановки эксперимента.

Экспериментальные исследования проводили в условиях лаборатории экспериментальной фармакологии Волгоградского медицинского научного центра (заведующий лабораторией – академик РАМН, Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор А.А. Спасов), в соответствии с принципами биоэтики, правилами лабораторной диагностики (GLP), соответствует этическим нормам, изложенным в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985) и в соответствии с приказами МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» и МЗ СССР №755 от 12.08.1977 г. (заключение этической экспертизы №145-2011 от 11.11.2011 г.).

В исследованиях использовали 60 половозрелых нелинейных белых крыс-самцов массой 220-260 г. Животные содержались в условиях вивария ВолгГМУ, согласно правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ Р 51000.3-96 и 51000.4-96), с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997). На момент проведения экспериментов животные были здоровыми, изменений поведения, аппетита, режима сна и бодрствования обнаружено не было.

Животные в эксперименте были разделены на 3 группы: 1 группа – контрольные животные (n=15); 2 группа – животные, находящиеся на магниев-дефицитной диете фирмы ICN Biomedical Inc. (Aurora, Ohio, США) в течение 8 недель (n=25); 3 группа – животные, находящиеся на магниев-дефицитной диете фирмы ICN Biomedical Inc. (Aurora, Ohio, США) в течение 12 недель (n=20).

Интактные животные (1 группа) получали полноценную магниевсбалансированную диету, содержащую 0,84 г MgO (0,5 г элементарного магния) на 1 кг диеты и отстоянную воду (содержание магния 20 мг/л). Животные, у которых моделировали гипомagneмию, получали

специальную магнидефицитную диету фирмы «ICN Biomedicals Inc.» (Aurora, Ohio, США). 3,5% диеты составляла полиминеральная смесь AIN-76, с малым содержанием магния. Указанный состав диеты соответствовал рекомендациям Специализированного Комитета по Стандартам в исследованиях питания США [Bieri J.G., 1979]. Деионизированная вода использовалась для приготовления рациона и для питья животных, находящихся на диете.

При снижении концентрации магния ниже 0,7 ммоль/л в плазме и ниже 1,4 ммоль/л в эритроцитах у животных развилась гипомagneзиемия средней тяжести, что сочеталось с выраженными функциональными нарушениями и, таким образом, свидетельствовало об адекватности используемой экспериментальной модели. Животным, находящимся на магнидефицитной диете в течение 8 недель, перорально через зонд вводили исследуемые соли магния. Доза солей магния рассчитывалась исходя из 50 мг элементарного магния на 1 кг веса животного. Усредненное время компенсации дефицита магния было около 4 недель.

2.2. Методы исследования.

При моделировании алиментарного дефицита магния у белых нелинейных крыс-самцов оценивали изменение внешнего вида и ряда интегральных физиологических показателей: вид шерстного покрова, цвет и состояние открытых участков тела (ушных раковин, хвоста и лап), двигательную активность, ориентировочно-исследовательское поведение, проявления депрессии и повышенной тревожности, определение длительности фенаминовых и ареколиновых стереотипий, порога коразоловых судорог. Изучение поведенческих расстройств производили в тестах: «открытое поле», «крестообразный лабиринт», Порсольта.

Забой животных проводился путем гильотинной декапитации согласно требованиям, изложенным в «Международных рекомендациях по

проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985).

При проведении патологоанатомического исследования после измерения массы тела животного, макроскопического описания внутренних органов и органометрии образцы головного мозга фиксировали в нейтральном растворе забуференного (на 10% фосфатном буфере) формалина в течение 24 часов или смеси Карнуа в течение 3 часов с дальнейшим обезвоживанием в батарее спиртов и изготовлением парафиновых срезов толщиной 5 мкм, которые окрашивали по стандартным методикам гематоксилином и эозином, тионином по Ниссля [Саркисов Д.С., Перов Ю.Л., 1996].

Для изучения состояния нейронов и отрезков дендритов производили окрашивание тионином по методу Ниссля [Лилли Р., 1969; Меркулов Г.А., 1969]. С этой целью депарафинизированные срезы окрашивали тионином в разведении 1:1000 в термостате при температуре 37°C 12-14 часов. Затем ополаскивали водопроводной водой 1-2 минуты, дифференцировали 96° спиртом, помещали в абсолютный спирт, просветляли в ксилоле и заключали в монтирующие среды (канадский бальзам, «Биомаут»).

Для иммуногистохимического исследования^{*)} с целью определения экспрессии различных антигенов (TRPM6, TRPM7, каспазы 3, кислого глиального фибриллярного белка, эндотелиальной и индуцибельной нитроксидсинтазы) использовали поли- и моноклональные антитела к соответствующим белкам (табл. 1).

Таблица 1

Иммуногистохимические биомаркеры

| Иммуногистохимические маркеры | Клон/разведение | Фирма-производитель | Буфер для «демаскировки антигенов» |
|-------------------------------|-----------------|---------------------|------------------------------------|
|-------------------------------|-----------------|---------------------|------------------------------------|

| | | | |
|---|--------------|-------------------------------|--------------------------------|
| monoclonal mouse anti-rat antibodies to caspase 3 | 3CSP03/1:100 | Thermo Fisher Scientific, USA | 10 мМ цитратный буфер (pH=6,0) |
| polyclonal rabbit anti-rat antibodies to TRPM 6 | 1:1200 | Abcam Inc., UK | 10 мМ EDTA (pH=9,0) |
| polyclonal rabbit anti-rat antibodies to TRPM 7 | 1:1200 | Abcam Inc., UK | 10 мМ EDTA (pH=9,0) |
| polyclonal rabbit anti-rat antibodies to e-NOS | 1:100 | Thermo Fisher Scientific, USA | 10 мМ цитратный буфер (pH=6,0) |
| polyclonal rabbit anti-rat antibodies to i-NOS | 1:100 | Thermo Fisher Scientific, USA | 10 мМ цитратный буфер (pH=6,0) |
| monoclonal rabbit anti-rat GFAP | ASTRO6/1:100 | Thermo Fisher Scientific, USA | — |

После депарафинизации срезы обрабатывали 10% фосфатно-буферным раствором, затем проводили высокотемпературную демаскировку антигенов с помощью кипячения в миниавтоклаве «Pascal» (Canada). В качестве демаскировочного буфера для TRPM6, TRPM7 применяли 10% раствор высокощелочного (pH=9,0) буфера EDTA в соответствии с рекомендациями производителей (Abcam, United Kingdom). Для демаскировки других антигенов использовали 10% цитратный буферный раствор (pH=6,0) (Thermo Fisher Scientific, USA). Последующие этапы окраски препаратов производились по алгоритмам и с использованием официальных реактивов визуализирующей системы «UltraVision» (USA). В качестве хромогена использовали 1% раствор 3,3-диаминобензидина, затем препараты докрашивали гематоксилином и заключали в монтирующую среду (канадский бальзам). Микрофотосъемку гистологических препаратов проводили на микроскопе «Micros» (Austria) цифровой фотокамерой «Olympus» (Japan). Для оценки степени выраженности иммуногистохимической реакции использовали полуколичественную визуально-аналоговую шкалу, предложенную Allred D.C. [Allred D.C. et al., 1998]. С помощью этой шкалы оценивали удельное количество иммунопозитивных нейронов в баллах от 0 до 5 (0 – отсутствие

иммунопозитивных клеток; 1 – удельное количество иммунопозитивных клеток 1-20%; 2 – удельное количество иммунопозитивных клеток 20-40%; 3 – удельное количество иммунопозитивных клеток 40-60%; 4 – удельное количество иммунопозитивных клеток 60-80%; 5 – удельное количество иммунопозитивных клеток 80-100%), а также интенсивность окрашивания в баллах от 0 до 3 (0 – иммунонегативная реакция; 1 – слабо выраженное окрашивание; 2 – умеренно выраженное окрашивание; 3 – максимально выраженное окрашивание). Производили суммирование баллов удельного количества иммунопозитивных клеток и интенсивности окрашивания и, таким образом, определяли следующие показатели иммуногистохимической реакции: степень 0 – 0-1 балл; степень 1 – 2-3 балла; степень 2 – 4-6 баллов; степень 3 – 7-8 баллов.

На фронтальных срезах головного мозга с помощью системы анализа изображений (программы «Видеотест-Морфо-4», Россия) определяли морфометрические показатели: абсолютные – среднюю площадь перикарионов нейронов, среднюю площадь ядер нейронов, среднюю площадь цитоплазмы перикарионов нейронов; относительные – удельную площадь перикарионов нейронов и нейропиля, отношение удельной площади перикарионов нейронов к нейропилю, ядерно-цитоплазматическое отношение. Степень выраженности процессов повреждения нейронов определялась методом подсчета удельного количества нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы по методу А.И. Чубинидзе (1972). При оценке фронтальных срезов в каждой экспериментальной группе изучали не меньше 8 срезов от каждого интересующего отдела головного мозга и исследовали не меньше 120 полей зрения ($0,022 \text{ мм}^2$) на уровне регионов с признаками наибольших изменений. Размеры нейронов оценивали на выборках, включающих не менее 100 клеток.

Вариационно-статистическую обработку данных проводили с использованием программ Statistica 10.0 для Windows 7, Microsoft Word Excel 2010. Выборки проверяли на нормальность распределения с

использованием критерия согласия χ^2 Пирсона, в случаях параметрического распределения в качестве критерия достоверности использовался критерий t Стьюдента. Различия при уровне значимости $p < 0,05$ считали статистически значимыми. Для выборок с отклонением от нормального распределения использовали U-тест Манна-Уитни при попарном сопоставлении каждой двух выборочных совокупностей, статистически значимыми при этом считались различия при условии, что значение критерия U было меньше критического для данных выборочных совокупностей. Сравнение средних значений выборочных совокупностей производилось с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), в качестве показателя достоверности принималось критическое значение критерия Фишера (F). При проведении регрессионного анализа рассчитывали коэффициент r корреляции Пирсона для нормальных распределений и, в случае непараметрических распределений, – коэффициент R корреляции Спирмена [Гланц С., 1999; Автандилов Г.Г., 2002].

Для электронно-микроскопического исследования забор кусочков головного мозга производили из областей, где по данным световой микроскопии наблюдались наибольшие патогистологические изменения. Фиксацию кусочков размером 1 мм^3 производили в течение 12 часов в 4% растворе параформа на 0,1М какодилатном буфере с последующей постфиксацией в течение 2 часов в 1% растворе тетраоксида осмия на 0,1М какодилатном буфере ($\text{pH}=7,4$) при температуре $+4^\circ\text{C}$. После промывки в нескольких порциях раствора какодилатного буфера материал подвергали дегидратации в спиртах возрастающей концентрации возрастающей концентрации, ацетоне и заливали в смесь эпона и аралдита.

Ультратонкие срезы толщиной 50-90 нм получали на ультрамикротоме LKB-8800. Полутонкие эпон-аралдитовые срезы толщиной 1 мкм окрашивали метиленовой синью. Ультратонкие срезы монтировали на медные сетки. После контрастирования в 2,5%-м растворе уранилацетата на 50° этаноле в течение 40 минут и 0,3%-м растворе цитрата свинца в течение

20 минут срезы изучались в электронном микроскопе Tesla BS-500 при ускоряющем напряжении 60 кВ. Фотодокументирование проводили с использованием фотопластинок «Для ядерных исследований». Электронные микрофотограммы изготавливали на черно-белой бумаге «Унибром 160 БП», сканировались и переносились в систему графического редактора Microsoft Office 2010.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

При моделировании алиментарного дефицита магния у белых нелинейных крыс-самцов отмечались изменение внешнего вида и ряда интегральных физиологических показателей. Так, в группе животных, получавших диету, наблюдалось потускнение шерстного покрова, гиперемия

открытых участков тела (ушных раковин, хвоста и лап), что соответствует типичным внешним изменениям при гипомagneзиемии [Maier A. et al., 2007]; в единичных случаях отмечалась гибель животных. При анализе динамики массы тела животных, получавших диету, не содержащую магний, было показано статистически значимое снижение данного параметра. При этом к 8 неделе наблюдалось максимальное снижение веса в среднем с $225,8 \pm 11,4$ граммов в контрольной группе до $185,2 \pm 6,9$ граммов в группе магний-дефицитных животных.

К концу восьмой недели моделируемого дефицита магния у животных наблюдались ранние проявления депрессивно-подобного и тревожного поведения [Харитонов М.В., 2008]. В тесте «открытое поле» отмечалось достоверное ($p < 0,05$) снижение горизонтальной и вертикальной активности, частоты актов груминга и количества выходов в центральную зону установки на 18,9% по сравнению с животными контрольной группы. В тесте «крестообразный лабиринт» у животных с дефицитом магния достоверно ($p < 0,05$) уменьшалось число посещений темных и светлых отсеков на 24,3% по сравнению с контролем. В тесте Порсольты достоверно ($p < 0,05$) увеличилась на 19,5% по сравнению с контрольной группой общая продолжительность периодов пассивной иммобилизации, которая характеризует степень депрессивности животных. У животных с дефицитом магния к 8 неделе эксперимента увеличивалась длительность фенаминовой стереотипии на 26,46% ($p = 0,0077$), к 12 неделе – на 21,62% ($p = 0,037$), по сравнению с животными контрольной группы. При введении ареколина в группах с моделируемым дефицитом магния 8 и 12 недель наблюдалось увеличение длительности тремора на 27,12% и 33,47% ($p < 0,05$) соответственно по отношению к животным из группы контроля. Кроме того, в ходе экспериментов было показано, что дефицит магния приводит к снижению порога коразоловых судорог на 30% ($p < 0,05$) [Харитонов М.В., 2008].

Таким образом, к концу восьмой недели моделируемой магниевой недостаточности у крыс выявлялись снижение спонтанной двигательной активности, ориентировочно-исследовательского поведения, депрессивно-подобные реакции, снижение порога судорожной готовности и увеличение длительности экспериментально индуцированного гиперкинеза.

У крыс, находящихся на магний-дефицитной диете, к концу 8 недели наблюдалось достоверное снижение концентрации ионов магния в эритроцитах в среднем на 57% (с $2,07 \pm 0,02$ до $0,89 \pm 0,03$ ммоль/л, $p < 0,05$) и в плазме – в среднем на 47% (с $1,27 \pm 0,03$ до $0,67 \pm 0,03$ ммоль/л, $p < 0,05$), по отношению к группе интактных крыс, что свидетельствует о достижении уровня гипомagneзиемии средней степени тяжести.

У животных с моделируемым в течение 8 недель дефицитом магния масса головного мозга составила в среднем $1,83 \pm 0,04$ граммов, у животных с моделируемым в течение 12 недель дефицитом магния масса головного мозга составила в среднем $1,8 \pm 0,05$ граммов, у животных контрольной группы масса головного мозга составила в среднем $1,90 \pm 0,05$ граммов. При макроскопическом исследовании головного мозга животных в группе с моделируемым магниевым дефицитом, отмечались отек и полнокровие мозговых оболочек, вещество мозга после извлечения из полости черепа правильной анатомической формы, на разрезе – ткань серо-розового цвета, липнет к полотну ножа.

При микроскопическом исследовании фронтальных серийных срезов головного мозга контрольных и опытных животных критерием выбора отделов для детального морфологического исследования явились наиболее выраженные светооптические структурные изменения, в частности, увеличение удельного количества нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы (по Чубинидзе А.И., 1972). Исходя из этого положения, исследовались следующие отделы:

- а) кора полушарий головного мозга: моторная, соматосенсорная, энторинальная, предцентральная, постцентральная, инсулярная, височная, теменная;
- б) базальные ядра конечного мозга и связанные с ним структуры: миндалевидное тело, полосатое тело;
- в) промежуточный мозг: паравентрикулярное и супраоптическое ядра гипоталамуса; паравентрикулярные ядра таламуса, латеральная гипоталамическая область, медиальные таламические ядра;
- г) гиппокамп и зубчатая извилина;
- д) средний мозг и мост: центральное серое вещество, красные ядра, ядра шва;
- е) продолговатый мозг и мозжечок: вентролатеральные отделы продолговатого мозга (ретикулярное гигантоклеточное ядро), кора полушарий мозжечка.

3.1. Патоморфологическая характеристика коры полушарий и базальных ядер конечного мозга животных при моделировании алиментарного дефицита магния.

При исследовании головного мозга животных в контрольной группе отмечалось типичное модульное строение коры полушарий конечного мозга. При окраске гематоксилином и эозином в каждом модуле определялись слои плотно расположенных нейронов. В молекулярном слое присутствовали в небольшом количестве мелкие нейроны с веретеновидной формой цитоплазмы перикарионов, расположенные среди отростков нейроцитов подлежащих слоев. Наружный зернистый слой образован мелкими нейронами диаметром около 10 мкм, имеющими округлую, угловатую и пирамидальную форму цитоплазмы перикарионов, а также звёздчатыми нейронами диаметром около 20 мкм. Отростки этих клеток формировали сплетения, располагаясь параллельно или тангенциально плоскости фронтального среза. В слое пирамидальных нейронов величина клеток

последовательно увеличивалась в пределах 10-40 мкм от наружной зоны слоя к внутренней. В нейропиле отмечались разнонаправленно ветвящиеся волокна и мелкие капилляры микроциркуляторного русла. Внутренний зернистый слой развит слабо, представлен преимущественно мелкими нейронами со звездчатой формой цитоплазмы перикарионов и округлым базофильным ядром. Крупные и гигантские пирамидные нейроны (клетки Беца, диаметр в контроле около 100 мкм) внутреннего пирамидального слоя имели на фронтальных срезах треугольную форму цитоплазмы перикарионов с наличием характерной глыбчатой зернистости, округлое базофильное ядро со слабо выраженной перинуклеарной зоной просветления. В нейропиле преобладали отростки нейронов, формирующие густую сеть, а также капилляры с явлениями эритростаза. Слой мультиформных клеток содержал нейроны с веретенообразной или полигональной формой цитоплазмы перикарионов, овальной или округлой формы центрально расположенным ядром, в слое хорошо выражены структуры нейропиля. При окраске фронтальных срезов коры полушарий головного мозга тионином по Нисслю у животных контрольной группы отмечалось умеренно выраженное накопление хроматофильной субстанции преимущественно в пирамидальных слоях и слое мультиформных нейронов. Встречались единичные клетки с гиперхроматозом цитоплазмы.

При исследовании фронтальных срезов головного мозга, окрашенных гематоксилином и эозином, у животных с моделируемым дефицитом магния в оболочках головного мозга отмечалось нарушение кровообращения в капиллярах и венах в виде полнокровия, эритростазов, имели место отек и набухание эндотелиоцитов капилляров.

При исследовании нейронов различных отделов коры полушарий головного мозга к 8-12 неделе моделируемой магниевой недостаточности

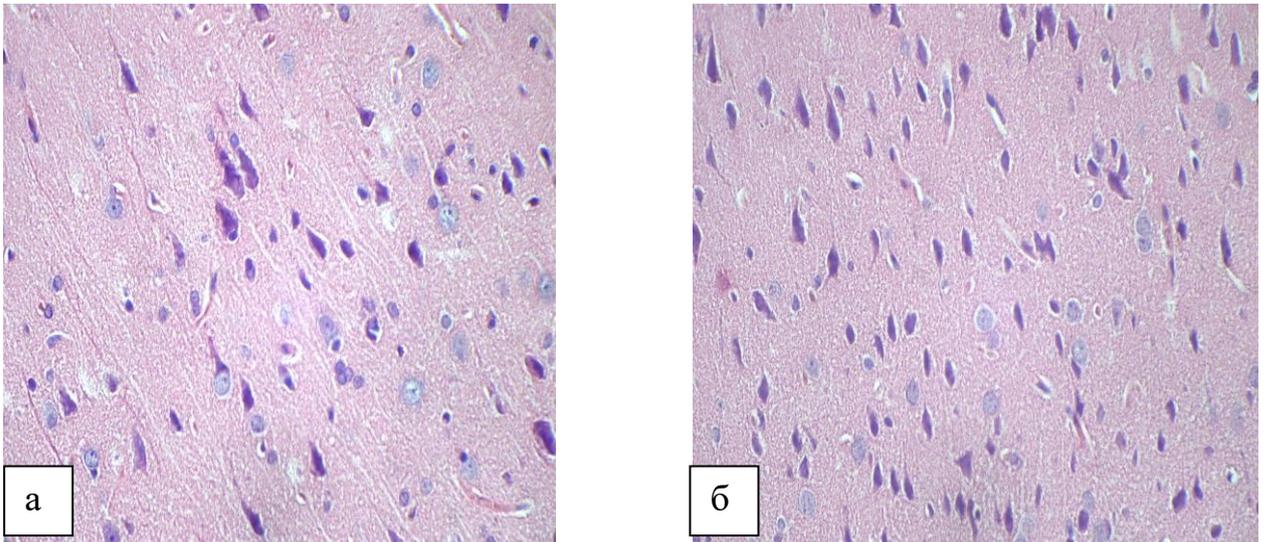


Рис. 1. Увеличение количества поврежденных («темных») нейронов в III-V слоях теменной коры полушарий большого мозга при дефиците магния 8 недель (а) и 12 недель (б). Прогрессивная динамика повреждения нейронов: очаговый кариопикноз на 12 неделе эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 100$.

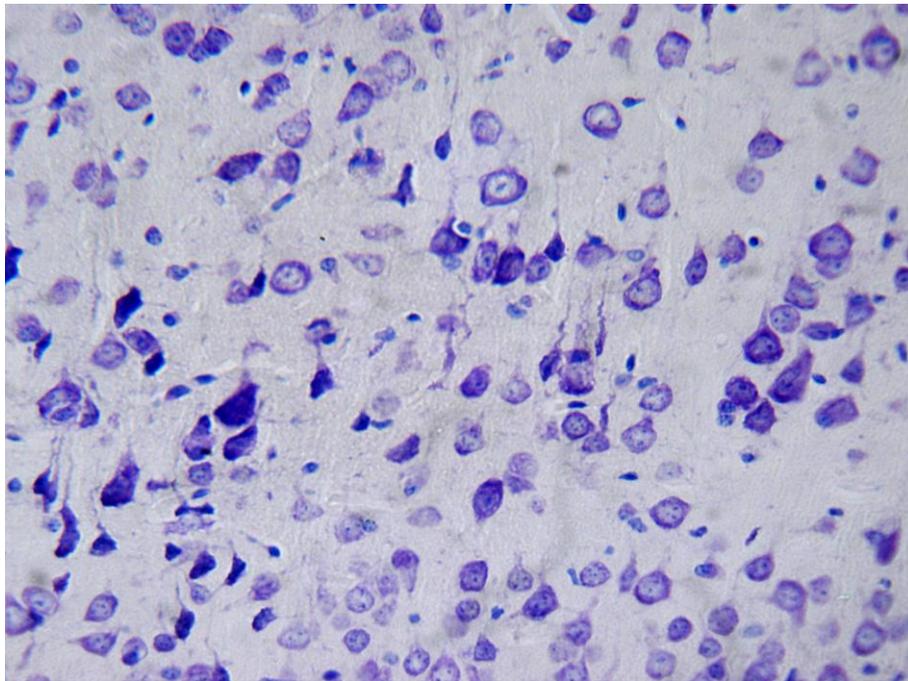


Рис. 2. Явления хроматолиза и очагового гиперхроматоза в цитоплазме перикарионов пирамидных нейронов V слоя лобной коры полушарий большого мозга при дефиците магния 8 недель. Окраска тионином по Нисслю. Ув. $\times 400$.

морфологические изменения носили очаговый характер и проявлялись в виде уменьшения размеров перикарионов нейронов по сравнению с контрольной

группой и явлений мозаичного гиперхроматоза (рис. 1) и очагового хроматолиза цитоплазмы при окраске тионином по Нисслию (рис. 2), при этом наблюдались признаки внутриклеточного и перицеллюлярного отёка.

Наиболее выраженные изменения обнаруживались преимущественно в нейронах III и V слоев первичной и вторичной моторной и соматосенсорной областей лобной, височной и теменной коры полушарий головного мозга.

При иммуногистохимическом исследовании моторной и соматосенсорной коры полушарий головного мозга с использованием антител к TRPM6 (рис. 3, а) в контрольной группе отмечалась умеренно выраженное (степени 1-2 по полуколичественной шкале Allred's immunohistochemistry score, [Allred D.C. et al., 1998]) диффузное неравномерное накопление иммунореактивного материала в цитоплазме перикарионов нейронов наружного зернистого, внутреннего зернистого, ганглионарного слоев. В слое пирамидных клеток отмечалось отсутствие накопления иммунореактивного материала в отдельных нейронах. Ядра нейронов всех слоев были иммунонегативными, в некоторых нейронах пирамидного слоя отмечается усиленное накопление иммунореактивного материала в виде глыбок в непосредственной близости от наружного контура ядерной мембраны и в самой ядерной оболочке. Глиальные клетки этих областей слабо иммунопозитивны или иммунонегативны (степень 0-1).

В группе с моделируемой магниевой недостаточностью при иммуногистохимическом исследовании с использованием антител к белку TRPM6 (рис. 3, б) отмечалась выраженная (степень 3) мозаичная экспрессия в виде глыбчатого накопления иммунореактивного материала в цитоплазме перикарионов и ядерных оболочках большинства пирамидных нейронов моторной коры, в то время как в глиальных клетках экспрессия минимальна или отсутствовала (степень 0-1). В области агранулярной и гранулярной инсулярной коры, энторинальной коры и коры зубчатой извилины встречались единичные иммунонегативные нейроны в I, II, III и V слоях.

Эндотелий капилляров имел умеренно выраженную (степень 2) экспрессию изучаемых антигенов в цитоплазме.

При иммуногистохимическом исследовании моторной и соматосенсорной коры полушарий головного мозга с использованием антител к TRPM7 (рис. 3, в) в контрольной группе преобладали нейроны, которые имели слабо выраженную иммунопозитивную реакцию цитоплазмы перикарионов, при этом встречалось не менее 30% нейроцитов с иммунонегативной реакцией. Ядра большинства нейроцитов были слабо иммунопозитивными или негативными. Глиальные клетки этих областей были иммунонегативны. Эндотелиоциты капилляров характеризовались слабой иммунопозитивной цитоплазматической реакцией (степень 0-1). При иммуногистохимическом исследовании моторной и соматосенсорной коры полушарий головного мозга с использованием антител к TRPM7 (рис. 3, г) в опытной группе отмечалось умеренно и слабо выраженное (степени 1-2) мозаичное иммунопозитивное окрашивание цитоплазмы перикарионов нейронов, при этом встречалось не менее 30% нейроцитов с иммунонегативной реакцией. Ядра большинства нейроцитов были слабо иммунопозитивными или негативными. Глиальные клетки этих областей были слабо иммунопозитивными (степень 1). Эндотелиоциты капилляров имели слабо выраженную экспрессию (степень 0-1).

При иммуногистохимическом исследовании моторной и соматосенсорной коры полушарий головного мозга с использованием антител к GFAP в опытной группе отмечалось усиленное по сравнению с контролем иммунопозитивное окрашивание цитоплазмы фибриллярных и протоплазматических астроцитов, при этом увеличилось по сравнению с контролем количество иммунореактивных периваскулярно расположенных астроцитов и их отростков с выраженным усилением экспрессии GFAP (степень 2-3).

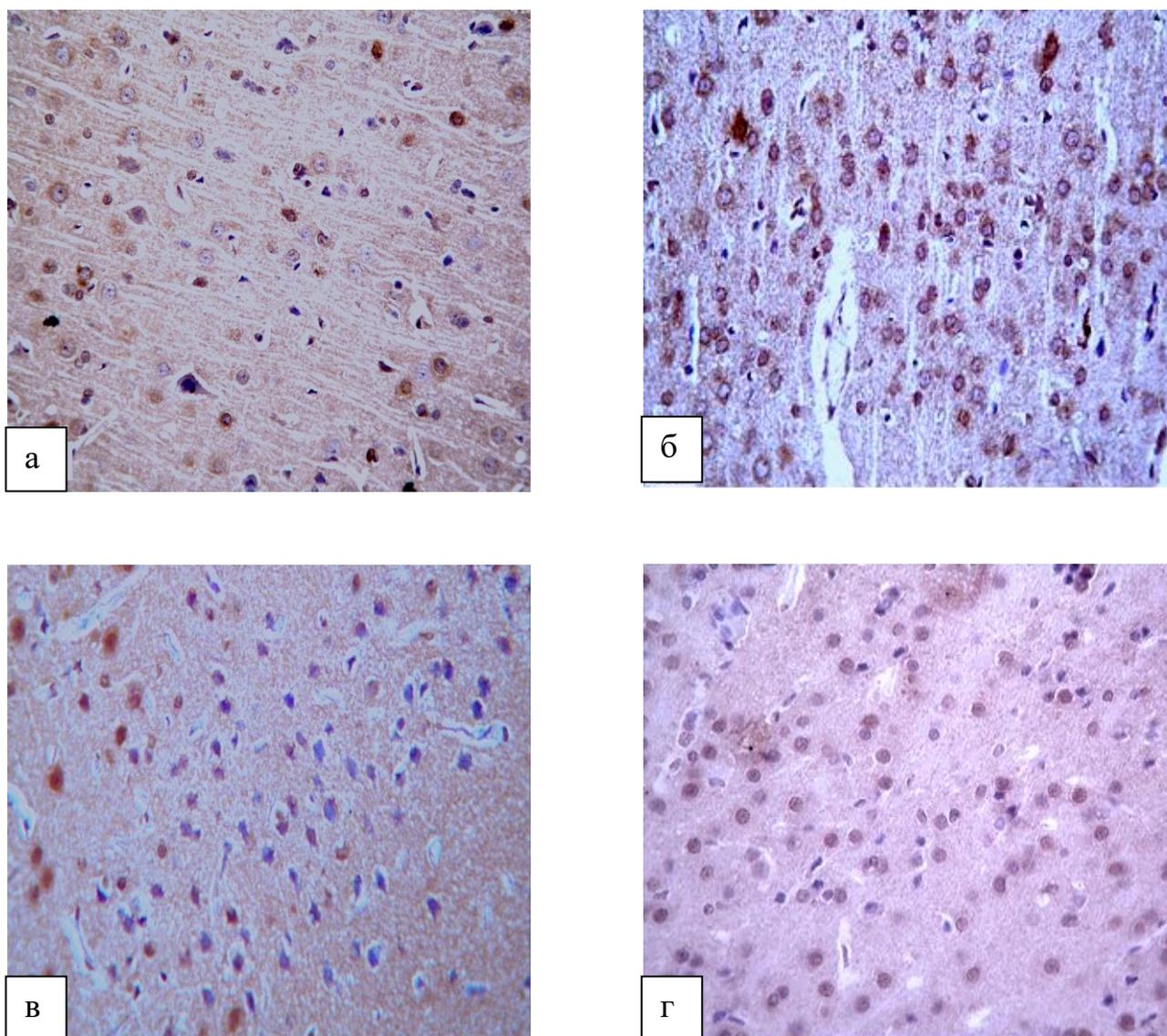


Рис. 3. Усиление экспрессии белков TRPM6 и мозаичный характер экспрессии TRPM7 в моторной коре полушарий большого мозга при моделировании дефицита магния 8 недель. Контрольная группа животных – а, в; опытная группа – б, г. ПАП метод с использованием поликлональных антител к TRPM6 (а, б) и TRPM7 (в, г) в разведении 1:600. Ув. $\times 200$.

При иммуногистохимическом исследовании моторной и соматосенсорной коры полушарий головного мозга с использованием антител к e-NOS (рис. 4, а) в контрольной группе отмечалось равномерное умеренно выраженное (степень 1-2) иммунопозитивное окрашивание цитоплазмы перикарионов нейронов, эндотелиоцитов капилляров и артериол. Глиocyты были слабо позитивными или иммунонегативными (степень 0-1). При иммуногистохимическом исследовании моторной и соматосенсорной

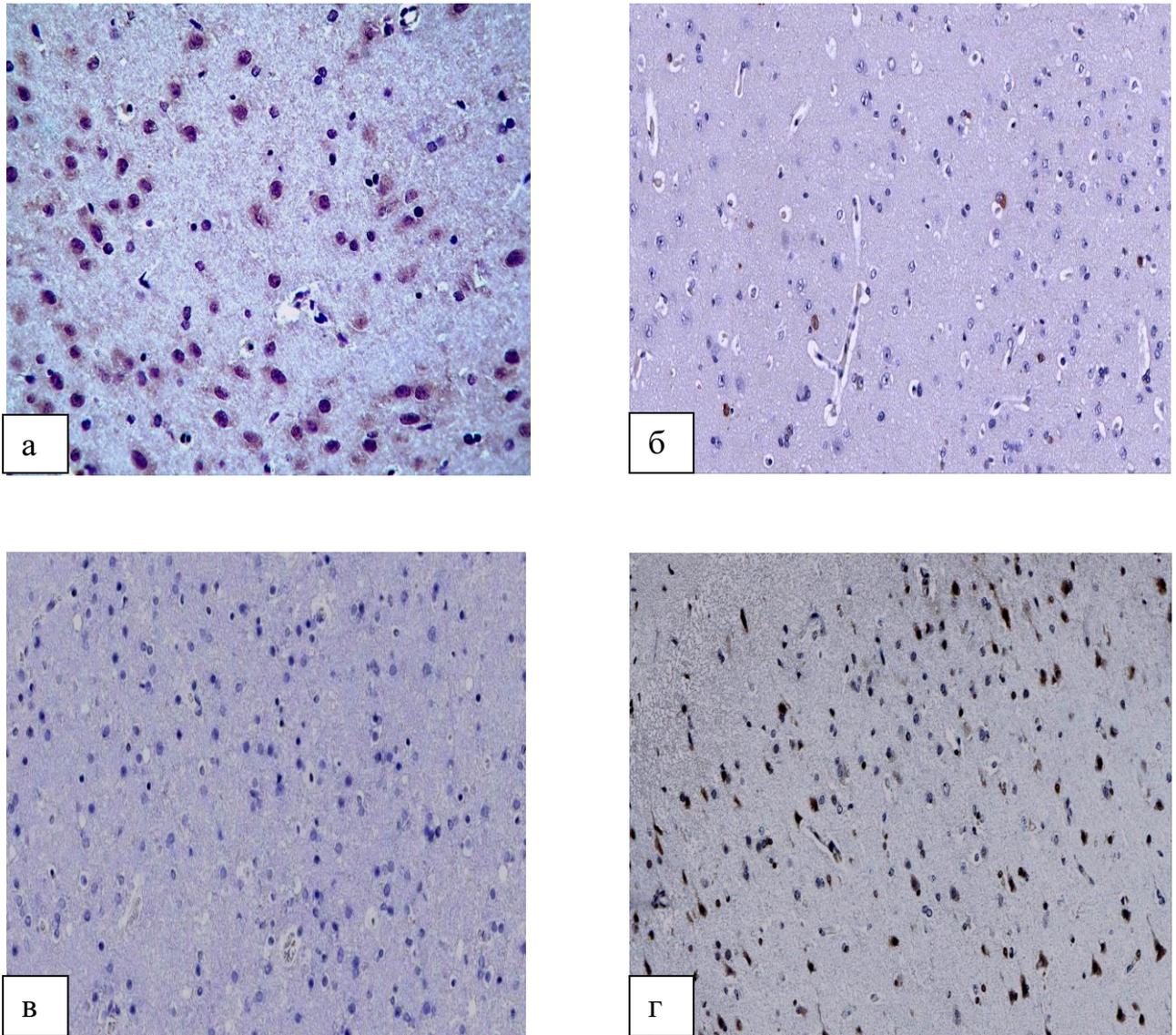


Рис. 4. Усиление экспрессии белка i-NOS и снижение экспрессии белка e-NOS в коре полушарий головного мозга при моделировании дефицита магния 8 недель. Контрольная группа – а, в; опытная – б, г. ПАП метод с использованием поликлональных антител к e-NOS (а, б) и i-NOS (в, г) в разведении 1:100. Ув. $\times 100$.

коры полушарий головного мозга с использованием антител к e-NOS (рис. 4, б) в опытной группе отмечалось уменьшение степени выраженности (степень 0-1) иммунопозитивного окрашивания цитоплазмы перикарионов нейронов, эндотелиоцитов капилляров, а также эндотелиоцитов и гладких миоцитов стенок артериол по сравнению с контролем. Глиocyты в большинстве случаев были иммунонегативными (степень 0), при этом встречались единичные клетки с усиленным накоплением иммунореактивного материала.

При иммуногистохимическом исследовании моторной и соматосенсорной коры полушарий головного мозга с использованием антител к i-NOS (рис. 4, в) в контрольной группе отмечалась иммунонегативная реакция цитоплазмы перикарионов нейронов, эндотелиоцитов капилляров и артериол. Глиоциты были иммунонегативными (степень 0). При иммуногистохимическом исследовании моторной и соматосенсорной коры полушарий головного мозга с использованием антител к i-NOS (рис. 4, г) в опытной группе отмечалось выраженное усиление (степень 2) иммунопозитивного окрашивания цитоплазмы перикарионов нейронов, эндотелиоцитов капилляров по сравнению с контролем. Глиоциты были иммунонегативными или слабо иммунопозитивными (степень 0-1).

При иммуногистохимическом исследовании лобной, височной и теменной моторной и соматосенсорной коры полушарий головного мозга с использованием антител к каспазе-3 в контрольной группе отмечалась иммунонегативная реакция как со стороны нейронов, так и нейропиля. При иммуногистохимическом исследовании лобной, височной и теменной моторной и соматосенсорной коры полушарий головного мозга с использованием антител к каспазе-3 в опытной группе в целом отмечалась иммунонегативная реакция как со стороны нейронов, так и нейропиля, при этом встречались единичные нейроны в слоях II, III, V с усиленной экспрессией антигена в цитоплазме (степени 1-2).

Таким образом, при исследовании различных областей коры больших полушарий в группе животных с моделируемым дефицитом магния отмечается разнонаправленный характер экспрессии иммунореактивного материала при использовании поликлональных антител к белкам TRPM6 и TRPM7, а также эндотелиальной и индуцибельной нитрооксидсинтазам в цитоплазме перикарионов нейронов (и ядерной оболочке – для TRPM6), глиоцитах, эндотелиоцитах капилляров (табл. 2). При исследовании уровня экспрессии каспазы 3 в изученных группах достоверных отличий не было выявлено.

Таблица 2

Результаты иммуногистохимического исследования коры полушарий головного мозга при моделировании дефицита магния ($Mo \pm \delta$)^{*)}

| Маркеры | Группа 1 (контроль), баллы | Группа 2 (дефицит магния 8 недель), баллы | Группа 3 (дефицит магния 12 недель), баллы |
|---------|----------------------------|---|--|
| TRPM6 | 4±0,55 | 7±0,89* | 7±0,52* |
| TRPM7 | 3±0,63 | 6±0,82* | 6±0,55* |
| e-NOS | 6±0,63 | 2±0,82* | 2±0,55* |
| i-NOS | 1±0,067 | 5±0,98** | 5±1,17** |

^{*)} Обозначения (здесь и далее): количество баллов указано в соответствии со шкалой Allred D.C., [1998]; оценка достоверности: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$ (критерий U Манна-Уитни); Mo – мода; δ – среднее квадратическое отклонение.

При исследовании структур лимбической системы головного мозга крыс с моделируемым в течение 8 недель дефицитом магния наиболее выраженные структурные изменения обнаруживались в гиппокампе.

У животных контрольной группы структуры гиппокампальной формации располагались в медиальных (собственно гиппокамп) и латеральных отделах (зубчатая извилина, энториальная кора) височных долей обоих полушарий головного мозга. В составе собственно гиппокампа определялись в зависимости от плотности расположения нервных клеток, их размеров и ветвления аксонов и дендритов 4 поля (CA1-CA4). Каждый из этих полей также состоял из трех слоев: пирамидного, молекулярного и слоя полиморфных клеток.

При окраске гематоксилином и эозином у животных с моделируемым дефицитом магния в составе пирамидного слоя CA1 и CA3 встречались многочисленные нейроны с треугольной формой цитоплазмы перикарионов, с выраженной базофилией цитоплазмы, ядра этих клеток также отличались умеренно выраженной гиперхромией, содержали центрально расположенное или эктопированное ядрышко в кариоплазме. При окраске соответствующих

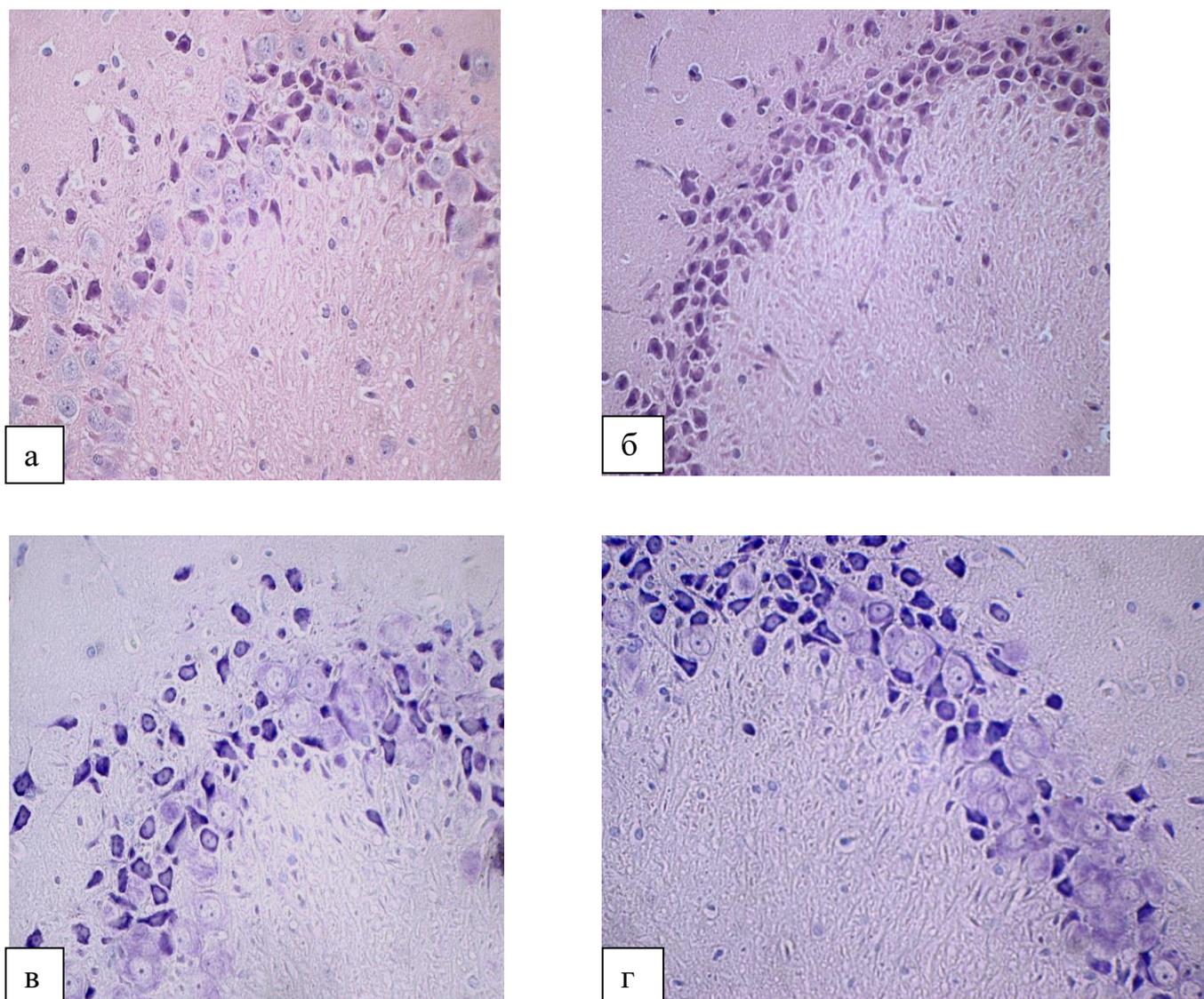


Рис. 5. Увеличение количества гиперхромных нейронов в гиппокампе крыс при дефиците магния 8 недель. Поле СА1 – б, г; поле СА3 – а, в. Окраска гематоксилином и эозином (а, б), тионином по Нисслю (в, г). Ув. $\times 200$.

областей тионином по Нисслю отмечался диффузный гиперхроматоз и очаговый хроматолиз цитоплазмы перикарионов и дендритов некоторых нейронов пирамидного слоя и слоя полиморфных клеток (рис. 5).

При иммуногистохимическом исследовании экспрессии TRPM6 в нейронах гиппокампа и зубчатой извилины в контрольной группе (рис. 6, а) отмечалось равномерное умеренное накопление иммунореактивного материала в цитоплазме перикарионов пирамидных нейронов, ядра клеток иммунонегативны или слабо позитивны, ядрышко иммунонегативно. При

моделируемом дефиците магния в перикарионах нейронов пирамидного слоя наблюдалось (рис. 6, б) просветление перинуклеарной области, умеренная или локально усиленная TRPM6-иммунопозитивная реакция в цитоплазме, при этом характерная для контрольной группы равномерность пылевидного накопления иммунореактивного материала исчезала, отдельные нейроны характеризовались мозаичной резко выраженной иммуноэкспрессией изучаемых антигенов в цитоплазме, в том числе, в перинуклеарной области, а также в плазматической мембране. Во всех клетках гиперхромия иммунонегативных ядер сочеталась с усиленным накоплением иммунореактивного материала в цитоплазме перикарионов. При иммуногистохимическом исследовании экспрессии TRPM7 в нейронах гиппокампа и зубчатой извилины в контрольной группе (рис. 6, в) отмечалось равномерное слабо или умеренно выраженное накопление иммунореактивного материала в цитоплазме перикарионов пирамидных и гранулярных нейронов, ядра клеток иммунонегативны или слабо позитивны, ядрышко иммунонегативно. При этом среди нейронов пирамидного слоя CA1-2 гиппокампа и зубчатой извилины встречались немногочисленные единичные нервные клетки с усиленной иммунопозитивной реакцией (степень 1).

При иммуногистохимическом исследовании с использованием антител к TRPM7 в нейронах гиппокампа и зубчатой извилины в опытной группе (рис. 6, г) отмечалось неравномерное мозаичное накопление иммунореактивного материала в виде усиления экспрессии белка (степень 2) в цитоплазме перикарионов не менее 25% пирамидных нейронов, ядра этих клеток позитивны, ядрышко иммунонегативно. При этом среди как пирамидных, так и гранулярных нейронов CA1 и CA3 гиппокампа встречалось большое количество (не менее 1/3) нейроцитов со слабой иммунопозитивной реакцией или иммунонегативные (степень 0-1).

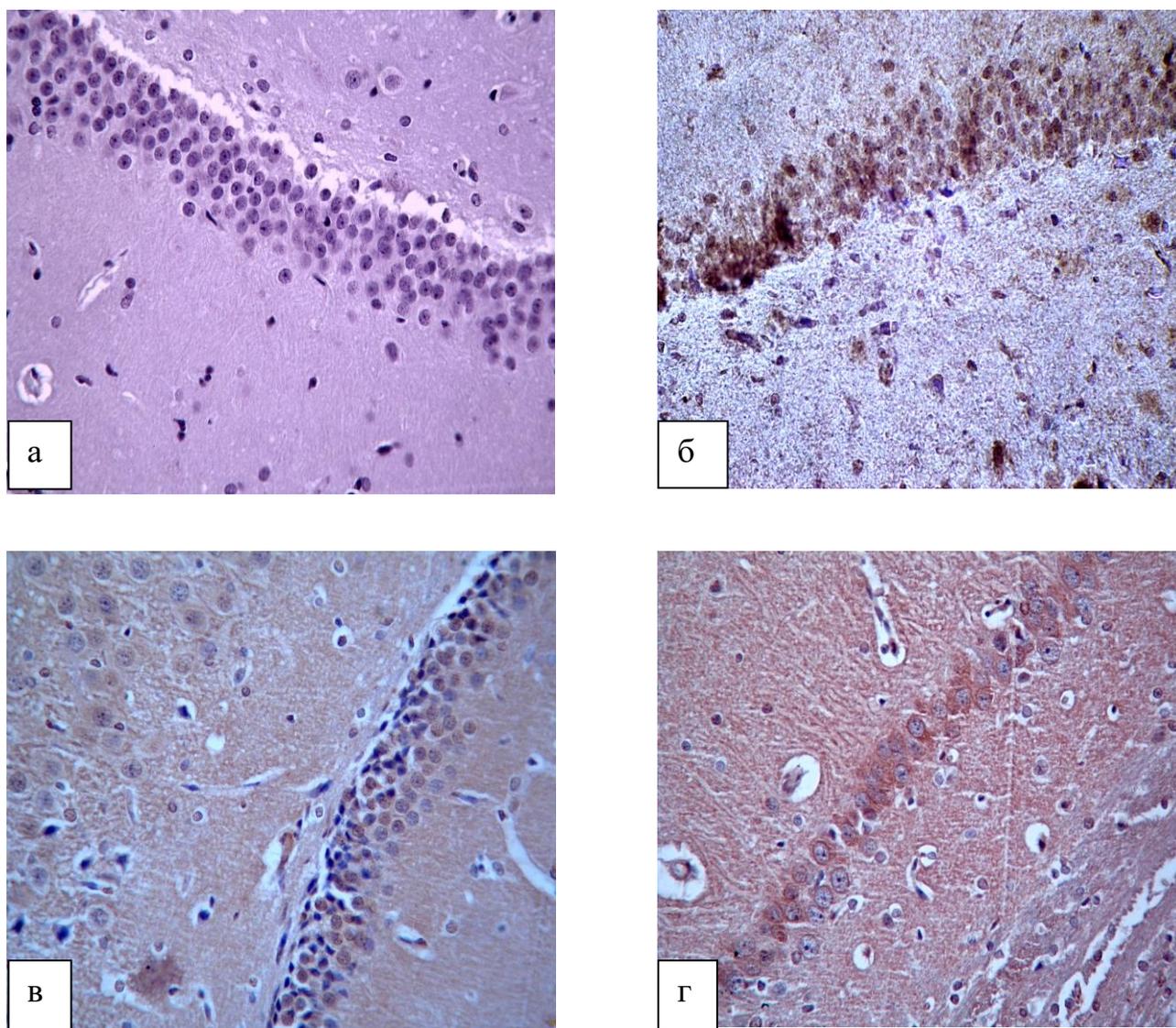


Рис. 6. Мозаичный характер преобразования экспрессии TRPM7 и диффузное усиление экспрессии TRPM6 в гиппокампе при моделировании дефицита магния 8 недель. Контрольная группа – а, в; опытная – б, г. ПАП метод с использованием поликлональных антител к TRPM6 (а, б) и TRPM7 (в, г) в разведении 1:600. Ув. $\times 200$.

При иммуногистохимическом исследовании экспрессии каспазы 3 в гиппокампе и зубчатой извилине достоверных изменений в опытной группе по сравнению с контрольной не обнаружено.

При иммуногистохимическом исследовании экспрессии e-NOS (рис. 7, а) в нейронах гиппокампа и зубчатой извилины в контрольной группе отмечалось равномерное умеренное накопление иммунореактивного материала в цитоплазме перикарионов пирамидных нейронов, ядра клеток иммунонегативны или слабо позитивны, ядрышко иммунонегативно.

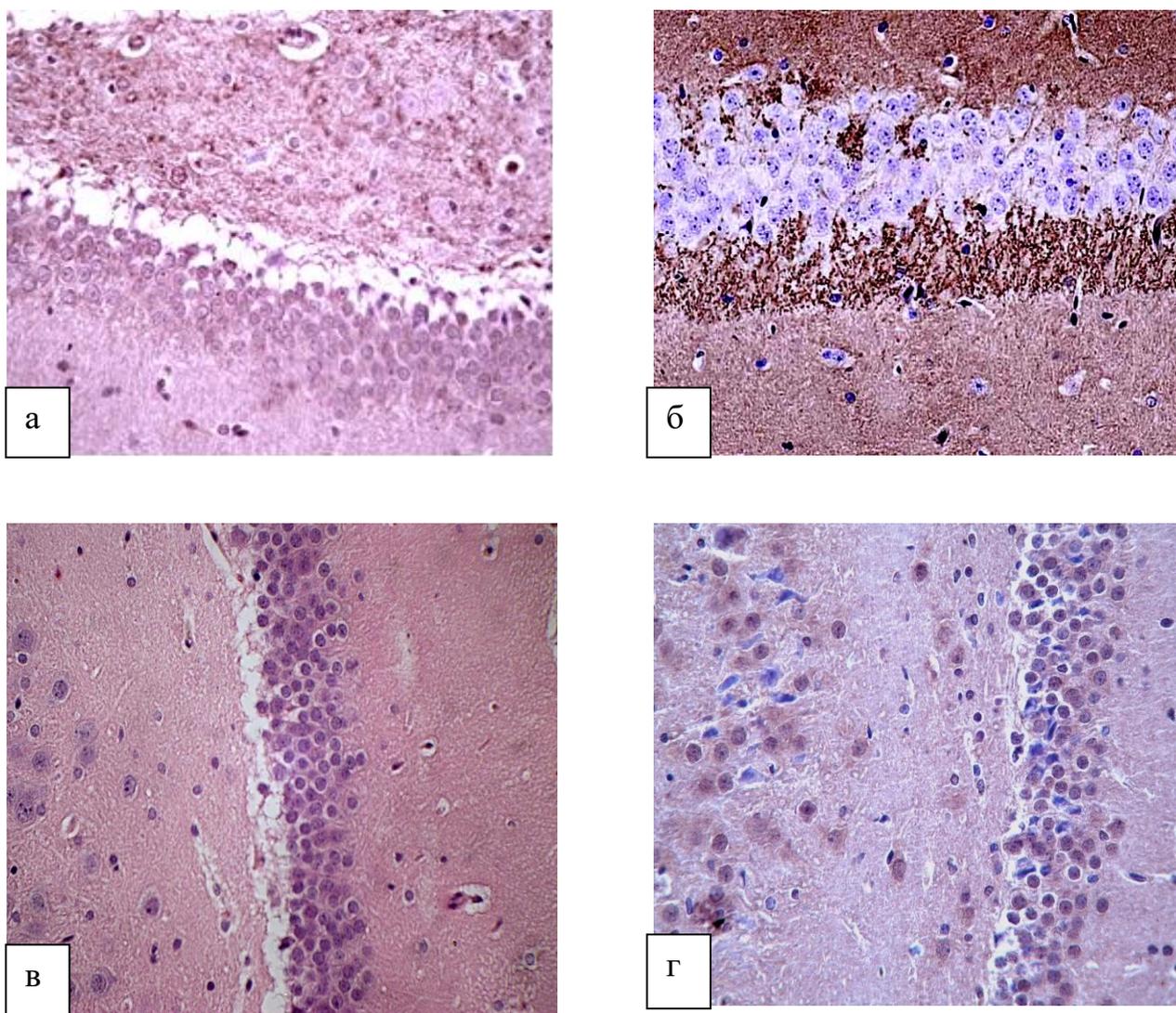


Рис. 7. Увеличение экспрессии i-NOS и уменьшение экспрессии e-NOS в нейронах пирамидного слоя CA1 поля гиппокампа при моделировании дефицита магния 8 недель. Контрольная группа – а, в; опытная – б, г. ПАП метод с использованием поликлональных антител к e-NOS (а, б) и i-NOS (в, г) в разведении 1:100. Ув. $\times 200$ (в, г); $\times 400$ (а, б).

Глиальные клетки и эндотелиоциты капилляров были умеренно иммунопозитивными (степень 1-2). При иммуногистохимическом исследовании экспрессии e-NOS в нейронах гиппокампа и зубчатой извилины в опытной группе (рис. 7, б) отмечалось слабо выраженное (степень 0-1) накопление иммунореактивного материала в цитоплазме перикарионов пирамидных нейронов, ядра клеток иммунонегативны или слабо позитивны, ядрышко иммунонегативно. Глиальные клетки и эндотелиоциты капилляров были слабо иммунонегативными (степень 0).

При иммуногистохимическом исследовании с использованием антител i-NOS в нейронах гиппокампа и зубчатой извилины в контрольной группе (рис. 7, в) отмечалось слабо выраженное накопление иммунореактивного материала в цитоплазме перикарионов лишь небольшого числа пирамидных нейронов (не более 10%), ядра клеток иммунонегативны, ядрышко иммунонегативно. Эндотелиоциты капилляров и глиоциты были иммунонегативными или слабо позитивными.

При иммуногистохимическом исследовании экспрессии i-NOS в нейронах гиппокампа и зубчатой извилины в опытной группе (рис. 7, г) отмечалась умеренно выраженная иммунопозитивная реакция в цитоплазме перикарионов не менее 1/3 пирамидных нейронов, а также около 20% клеток гранулярного слоя, ядра клеток иммунонегативны, ядрышко иммунонегативно. Отмечалось выраженное усиление иммунопозитивной реакции эндотелиоцитов капилляров (степень 2), а также глиоцитов (степень 1-2) по сравнению с контролем.

При иммуногистохимическом исследовании экспрессии GFAP (рис. 8) в структурах гиппокампальной формации в опытной группе отмечалось увеличение плотности иммунопозитивных астроцитов, преимущественно в периваскулярных отделах, по сравнению с контролем.

Таким образом, при моделировании алиментарного дефицита магния наблюдается очаговое усиление экспрессии TRPM7 в пирамидных нейронах гиппокампа, диффузное усиление TRPM6-иммунопозитивной реакции в нейронах и эндотелиоцитах капилляров гиппокампа, разнонаправленные изменения экспрессии белков e-NOS и i-NOS в нейронах и эндотелиоцитах сосудов микроциркуляторного русла (табл. 3).

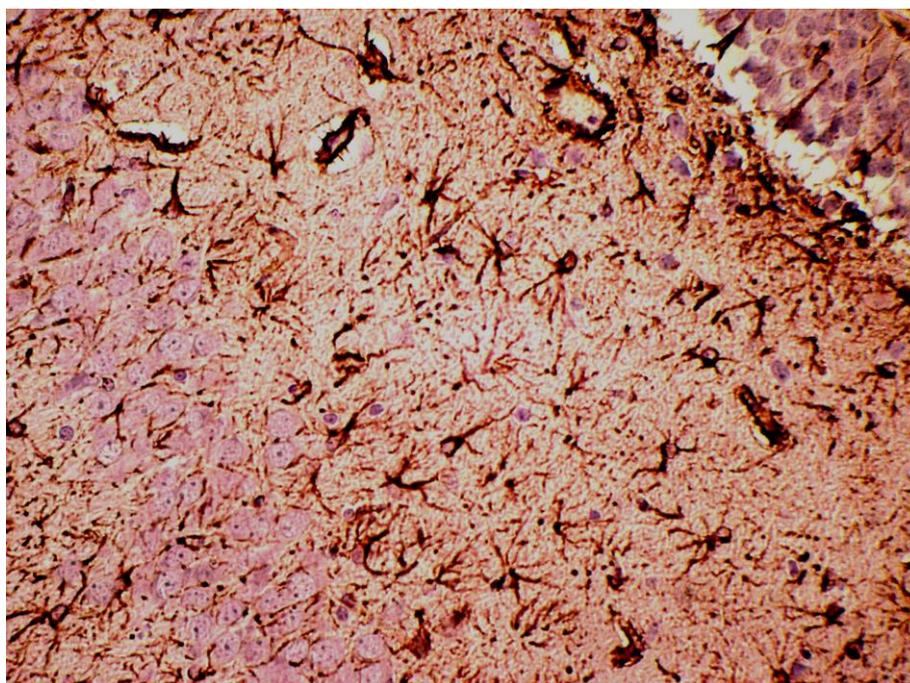


Рис. 8. Увеличение плотности иммунореактивных астроцитов в гиппокампе при дефиците магния 8 недель, периваскулярная астроглиальная реакция. ПАП метод с использованием антител к GFAP. Ув. $\times 400$.

Таблица 3

Результаты иммуногистохимического исследования гиппокампа при дефиците магния ($M \pm \delta$)

| Маркеры | Группа 1 (контроль), баллы | Группа 2 (дефицит магния 8 недель), баллы | Группа 3 (дефицит магния 12 недель), баллы |
|---------|----------------------------|---|--|
| TRPM6 | $3 \pm 0,75$ | $7 \pm 0,63^*$ | $7 \pm 0,52^*$ |
| TRPM7 | $2 \pm 0,55$ | $5 \pm 0,82^*$ | $6 \pm 0,75^*$ |
| e-NOS | $6 \pm 0,82$ | $1 \pm 0,12^{**}$ | $2 \pm 1,75^*$ |
| i-NOS | $2 \pm 0,01$ | $4 \pm 0,38^{**}$ | $6 \pm 0,89^{**}$ |

При патоморфологическом исследовании структур и ядерных образований базальной части конечного мозга у животных с дефицитом магния наиболее выраженные изменения наблюдались в нейронах и нейропиле полосатого тела, миндалевидного тела. В этих областях были обнаружены умеренно выраженные дистрофические изменения нервных клеток, которые проявлялись набуханием некоторых нейронов, частичной

вакуолизацией ядер и цитоплазмы. Были отмечены единичные крупные нейроны с признаками повышенной функциональной активности, что проявлялось гипертрофией ядрышкового аппарата, четкой структурой вещества Ниссля, мозаично распределенного в клетках.

Результаты иммуногистохимического исследования стриатума и миндалевидного тела (табл. 4) с использованием антител к белкам TPRM6 у животных опытной группы, как и в контрольной, характеризуются равномерным слабо и умеренно выраженным иммунопозитивным окрашиванием цитоплазмы перикарионов и отростков нейронов при иммунонегативной реакции глиоцитов и эндотелиоцитов.

При иммуногистохимическом исследовании стриатума и миндалевидного тела с использованием антител к рецепторам TPRM7 у животных опытной группы в отличие от контрольной (равномерное слабо выраженное позитивное окрашивание цитоплазмы перикарионов и отростков нейронов, а также глиоцитов, волокон нейропиля и эндотелиоцитов капилляров) при дефиците магния отмечалось усиление иммунопозитивной реакции (степень 2) в некоторых нейронах миндалевидного тела, эндотелиоцитах капилляров стриатума, при этом глиальные клетки оставались иммунонегативными. В целом, при дефиците магния преобладали нейроны с иммунонегативной цитоплазматической реакцией, однако в некоторых случаях отмечалось усиление иммунопозитивного окрашивания кариоплазмы и перинуклеарной области. При иммуногистохимическом исследовании стриатного и миндалевидного тела с использованием антител к i-NOS и e-NOS у животных контрольной и опытной групп значимых изменений экспрессии этих белков не наблюдалось.

При иммуногистохимическом исследовании стриатума и миндалевидного тела с использованием антител к каспазе-3 достоверных отличий в контрольной и опытной группах животных не обнаружено. При иммуногистохимическом исследовании стриатума и миндалевидного тела с

использованием антител к GFAP отмечалось увеличение плотности иммунопозитивных астроцитов в опытной группе по сравнению с контролем.

Таблица 4

Результаты иммуногистохимического исследования полосатого и миндалевидного тела при дефиците магния ($M \pm \delta$)

| Маркеры | Группа 1 (контроль), баллы | Группа 2 (дефицит магния 8 недель), баллы | Группа 3 (дефицит магния 12 недель), баллы |
|---------|----------------------------|---|--|
| TRPM6 | 1±0,24 | 2±0,33 | 1±0,42 |
| TRPM7 | 1±0,32 | 2±0,22 | 2±0,45 |
| e-NOS | 1±0,29 | 1±0,42 | 1±0,45 |
| i-NOS | 1±0,15 | 1±0,38 | 1±0,21 |

3.2. Патоморфологическая характеристика промежуточного мозга животных при моделировании алиментарного дефицита магния.

При исследовании промежуточного мозга крыс с моделируемым в течение 8 недель дефицитом магния наиболее выраженные структурные изменения обнаруживались в паравентрикулярном и супраоптическом ядрах гипоталамуса, латеральной гипоталамической области.

Паравентрикулярные гипоталамические ядра в контрольной группе были представлены скоплениями крупных и мелких нейронов с полигональной формой перикарионов; на фронтальных срезах головного мозга ядра имели клиновидную форму, располагаясь с обеих сторон от верхнего отдела третьего желудочка. Крупные мультиполярные нейроны в контрольной группе животных имели полигональную форму цитоплазмы перикарионов с равномерным слабо выраженным базофильным окрашиванием, множественными мелкими диффузно рассеянными вакуолями. В центре цитоплазмы перикарионов располагалось большое везикулярное ядро с хорошо выраженным ядрышком. При окраске тионином по Нисслю отмечалось относительно равномерное накопление глыбчатой субстанции в цитоплазме перикарионов и отрезках отходящих дендритов, при этом встречались единичные нейроны с очаговым гиперхроматозом в цитоплазме перикарионов.

Мелкоклеточная часть паравентрикулярного гипоталамического ядра в контрольной группе представлена нейронами небольшого размера с преимущественно округлой формой цитоплазмы перикарионов. Ядра клеток крупные, занимали почти всю площадь цитоплазмы, округлой формы, содержали одно хорошо выраженное центральной расположенное ядрышко. Вещество Ниссля в цитоплазме перикарионов и начальных отрезках дендритов распределено равномерно, в латеральных отделах мелкоклеточной части паравентрикулярного ядра встречались единичные нейроны с очаговым гиперхроматозом в цитоплазме перикарионов. В условиях

дефицита магния в крупноклеточной части паравентрикулярного ядра гипоталамуса отмечалось увеличение количества нейронов с выраженным гиперхроматозом цитоплазмы перикарионов и ядер (рис. 9, 10). Некоторые нейроны уменьшались в размерах, имели треугольную форму перикарионов с диффузным гиперхроматозом в цитоплазме, исчезновением характерной вакуолизации, перицеллюлярным отеком. Аналогичные изменения происходили и в нейронах мелкоклеточной части. Ядра отдельных нейронов крупноклеточной части паравентрикулярного ядра при дефиците магния сморщены, резко базофильны, с трудно различимым эктопированным и гипертрофированным ядрышком.



Рис. 9. Увеличение количества гиперхромных нейронов в паравентрикулярных ядрах гипоталамуса при дефиците магния 8 недель; явления перицеллюлярного отека. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 100$.

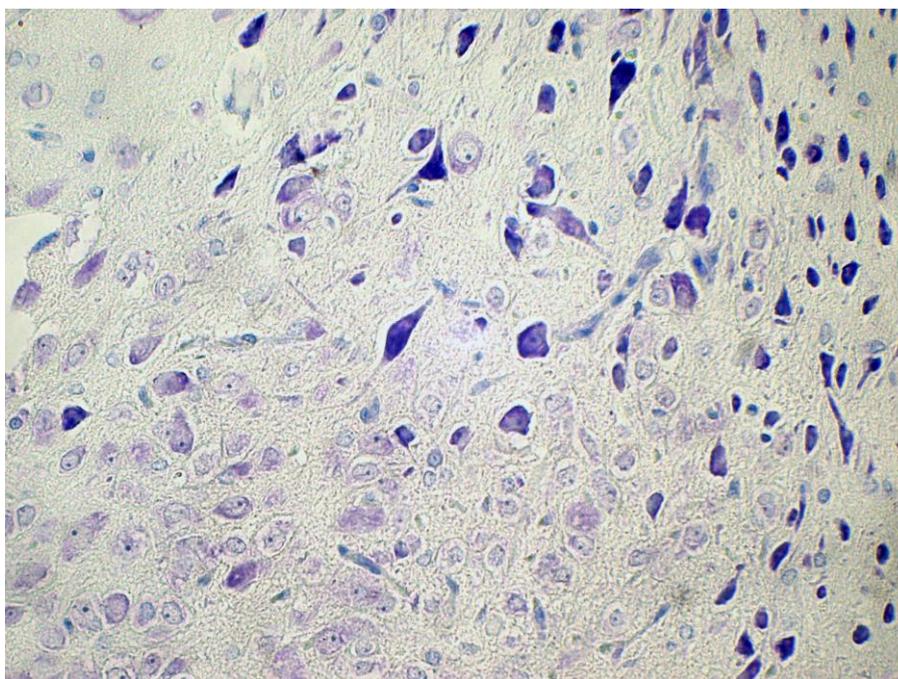


Рис. 10. Строение паравентрикулярного ядра гипоталамуса крысы при дефиците магния 8 недель: явления гиперхроматоза и хроматолиза нейронов. Окраска тионином по Нислю. Ув. $\times 400$.

Как в цитоплазме перикарионов, так и в кариоплазме отмечалась диффузная зернистость с накоплением мелких вакуолей вблизи внутренних контуров мембран. На полутонких срезах (толщиной 1 мкм), окрашенных метиленовым синим, среди нейронов паравентрикулярных ядер при моделируемом дефиците магния отмечались два типа – «темные» с усилением базофилии цитоплазмы, и «светлые» - с оптически прозрачной цитоплазмой (рис. 11). В нейропиле гипоталамических ядер при дефиците магния выявлялись набухшие глиоциты с дистрофическими изменениями, явления нейронофагии, апоптозные тельца и расположенные рядом с ними микроглиальные клетки. Наблюдались периваскулярный отек, стазы эритроцитов в капиллярах, отек и набухание эндотелиоцитов капилляров и мелких артериол, в некоторых случаях – адгезия единичных нейтрофильных лейкоцитов к эндотелию.

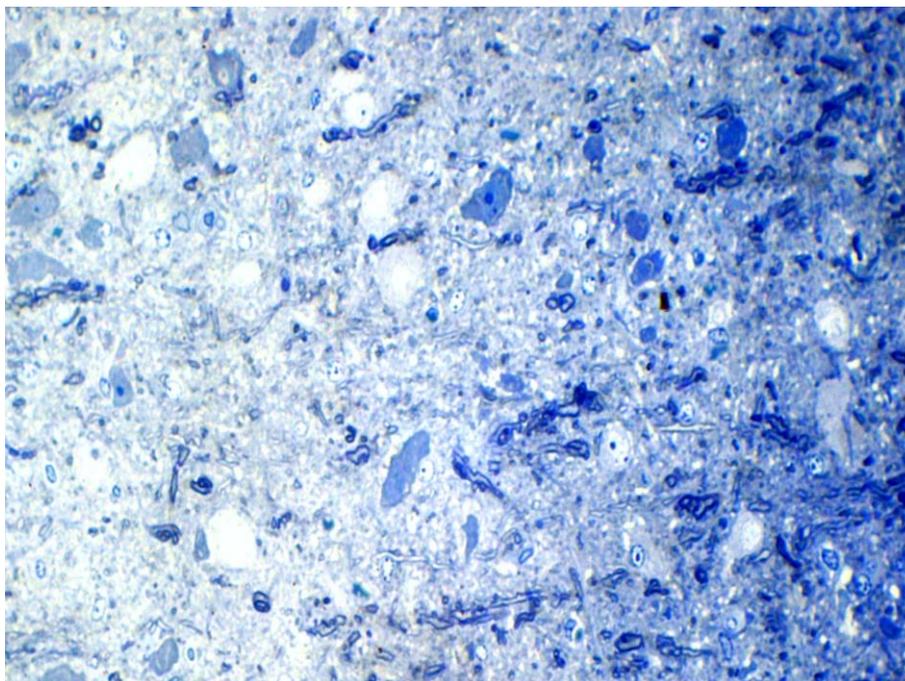


Рис. 11. Субпопуляции «темных» и «светлых» нейронов в паравентрикулярном ядре гипоталамуса при дефиците магния 8 недель, полутонкий срез. Окраска метиленовым синим. Ув. $\times 400$.

При иммуногистохимическом исследовании с использованием антител к TRPM6 в паравентрикулярных ядрах гипоталамуса у животных с моделируемой магниевой недостаточностью в отличие от контроля (рис. 12, а) отмечалась умеренно выраженная экспрессия (степени 1-2) в виде неравномерного глыбчатого накопления иммунореактивного материала в цитоплазме перикарионов и ядерных оболочках нейронов крупноклеточной части паравентрикулярных ядер гипоталамуса (рис. 12, б). Глиоциты и эндотелиоциты капилляров крупноклеточной части паравентрикулярного ядра гипоталамуса при дефиците магния характеризовались умеренно выраженной экспрессией TRPM6 в цитоплазме клеток (степень 1-2), в отличие от контроля, где реакция была преимущественно иммунонегативной. При исследовании мелкоклеточной части паравентрикулярных ядер гипоталамуса в условиях дефицита магния отмечалось абсолютное преобладание нейронов с выраженной иммунопозитивной реакцией цитоплазмы перикарионов (степень 2-3) при использовании антител к TRPM6, а в контроле встречались лишь единичные клетки с усиленной

цитоплазматической экспрессией изучаемого антигена. Глиоциты и эндотелиоциты капилляров мелкоклеточной части паравентрикулярного ядра гипоталамуса при дефиците магния характеризовались слабо выраженной экспрессией TRPM6 в цитоплазме клеток (степень 0-1), аналогичной таковой в контрольной группе.

При иммуногистохимическом исследовании с использованием антител к белку TRPM7 в паравентрикулярных ядрах гипоталамуса животных в отличие от контроля (равномерная, умеренно выраженная цитоплазматическая экспрессия в нейронах и глиоцитах, степень 1-2, (рис. 12, в) с моделируемой магниевой недостаточностью отмечалась усиленная (степень 3) экспрессия в виде мозаичного глыбчатого накопления иммунореактивного материала в цитоплазме перикарионов большей части нейронов крупноклеточной части паравентрикулярных ядер гипоталамуса (рис. 12, г). При этом встречались иммунонегативные нейроны, которые располагались среди интенсивно окрашенных клеток с четкой перинуклеарной зоной просветления, что создавало своеобразную мозаичную картину. В нейропиле отмечалось диффузное равномерное слабо выраженное накопление иммунореактивного материала. В эндотелии капилляров и артериол наблюдалось выраженное усиление иммунопозитивной реакции при использовании поликлональных антител к TRPM7 в виде глыбчатого накопления иммунопозитивных гранул в цитоплазме клеток. При исследовании плотности иммунореактивного материала в группе с дефицитом магния имело место увеличение данного показателя по сравнению с контрольными животными.

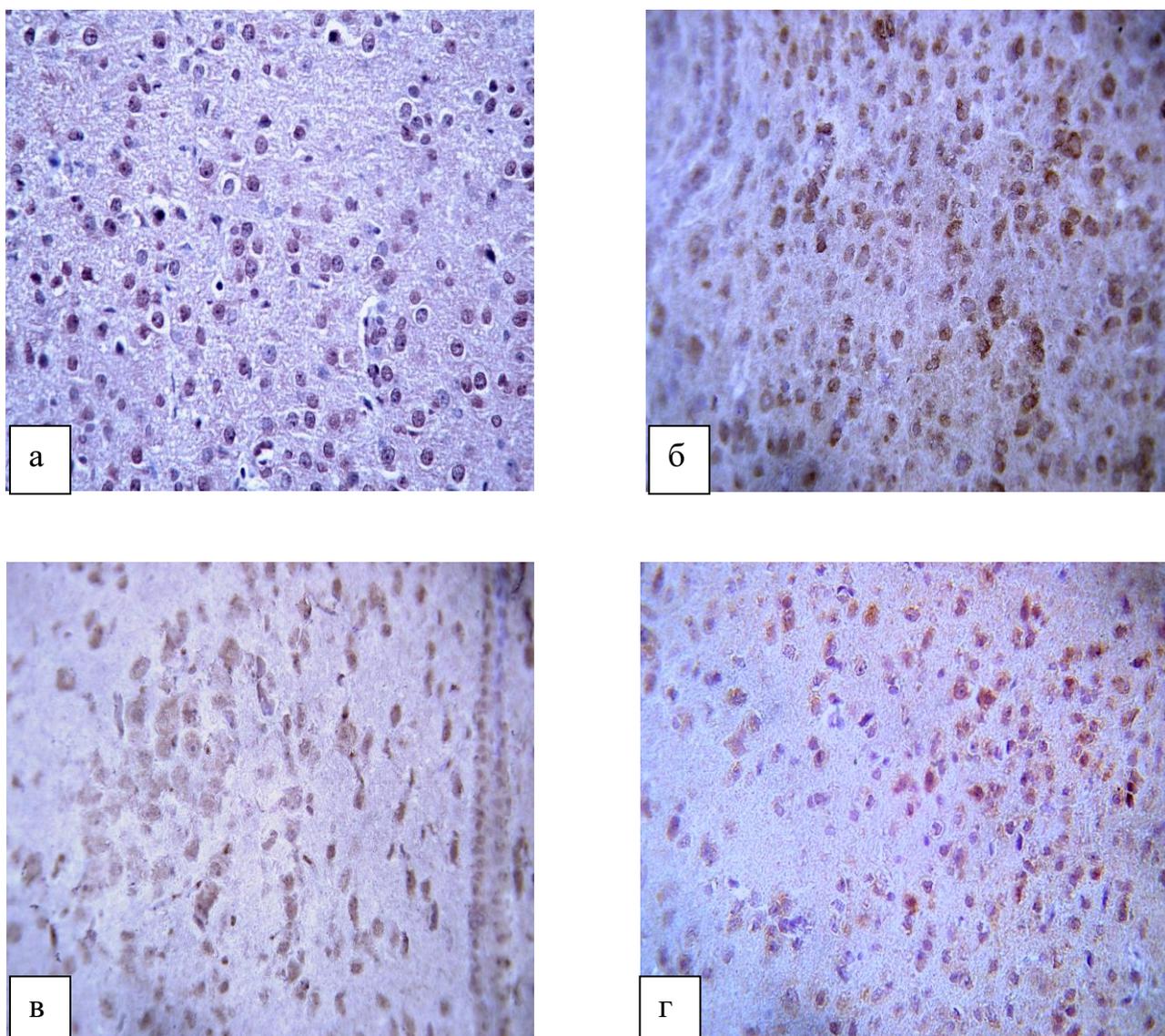


Рис. 12. Усиление экспрессии белка TRPM6 и мозаичный характер экспрессии белка TRPM7 в паравентрикулярных ядрах гипоталамуса при моделировании дефицита магния (8 недель). Контрольная группа – а, б; опытная – в, г. ПАП метод с использованием поликлональных антител к TRPM6 (а, б) и TRPM7 (в, г) в разведении 1:600. Ув. $\times 200$.

При исследовании уровня экспрессии GFAP (рис. 13) иммуногистохимическим методом в паравентрикулярных ядрах гипоталамуса животных с моделируемой магниевой недостаточностью отмечалось усиление плотности накопления иммунореактивного материала в астроцитах и их отростках. При этом у части животных имела место пролиферация астроглиальных элементов с усиленной иммунопозитивной реакцией (степень 3) в непосредственной близости от капилляров и артериол.

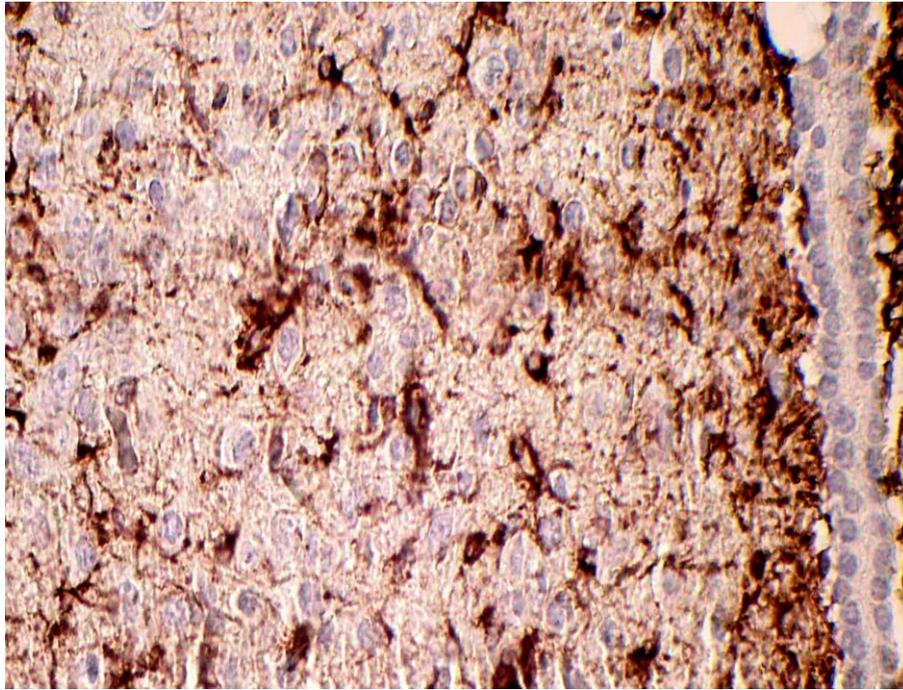


Рис. 13. Увеличение экспрессии иммунореактивного материала в астроцитах паравентрикулярного ядра гипоталамуса при дефиците магния 12 недель. ПАП метод с использованием антител к GFAP. Ув. $\times 400$.

При исследовании уровня экспрессии эндотелиальной нитрооксидсинтазы (e-NOS) иммуногистохимическим методом (рис. 14, а, б) в паравентрикулярных ядрах гипоталамуса животных с моделируемой магниевой недостаточностью отмечалось мозаичное ее усиление (степень 3) с неравномерным глыбчатым распределением иммунопозитивного материала в цитоплазме перикарионов нейронов, эндотелиальных клеток. Глиocyты были иммунонегативными или слабо позитивными (степени 0-1). Эндотелиоциты капилляров в контрольной группе были иммунонегативными, в опытной – слабо или умеренно иммунопозитивными.

При исследовании уровня экспрессии индуцибельной нитрооксидсинтазы (i-NOS) иммуногистохимическим методом (рис. 14, в, г) в паравентрикулярных ядрах гипоталамуса животных с моделируемой магниевой недостаточностью отмечалось мозаичное ее усиление (степень 3) с неравномерным глыбчатым распределением иммунопозитивного материала в цитоплазме перикарионов нейронов, эндотелиальных клеток по сравнению

с контрольной группой (рис. 14, в). Глиоциты были иммунонегативными или слабо позитивными (степени 0-1).

При исследовании одного из интегральных маркеров внутреннего и внешнего путей апоптоза – каспазы 3 – иммуногистохимическим методом в паравентрикулярных ядрах гипоталамуса животных с моделируемой магниевой недостаточностью и в контрольной группе достоверных различий не обнаружено. У части животных опытной группы отмечалось незначительное увеличение количества каспаза-3-иммунопозитивных нейронов в мелкоклеточной части паравентрикулярного ядра гипоталамуса на фоне слабо позитивного окрашивания ядрышек и кариоплазмы нейронов, нейропиля и эндотелия капилляров.

Супраоптические ядра гипоталамуса в контрольной группе были представлены плотными скоплениями крупных нейросекреторных клеток с мультиполярной формой перикарионов. На фронтальных срезах головного мозга ядра имели клиновидную форму, располагаясь в основании головного мозга несколько вентральнее латеральной гипоталамической области. Крупные мультиполярные нейроны в контрольной группе животных имели полигональную форму цитоплазмы перикарионов с равномерным слабо выраженным базофильным окрашиванием. В центре цитоплазмы перикарионов располагалось большое везикулярное ядро с хорошо выраженным ядрышком. При окраске тионином по Нисслю отмечалось относительно равномерное накопление глыбчатой субстанции в цитоплазме перикарионов и отрезках отходящих дендритов, при этом встречались нейроны с очаговым гиперхроматозом в цитоплазме перикарионов.

В условиях моделируемого дефицита магния отмечались структурные признаки повреждения крупных нейронов супраоптических ядер. Многие нейроны теряли характерную полигональную форму перикарионов, напоминая пирамидальные клетки.

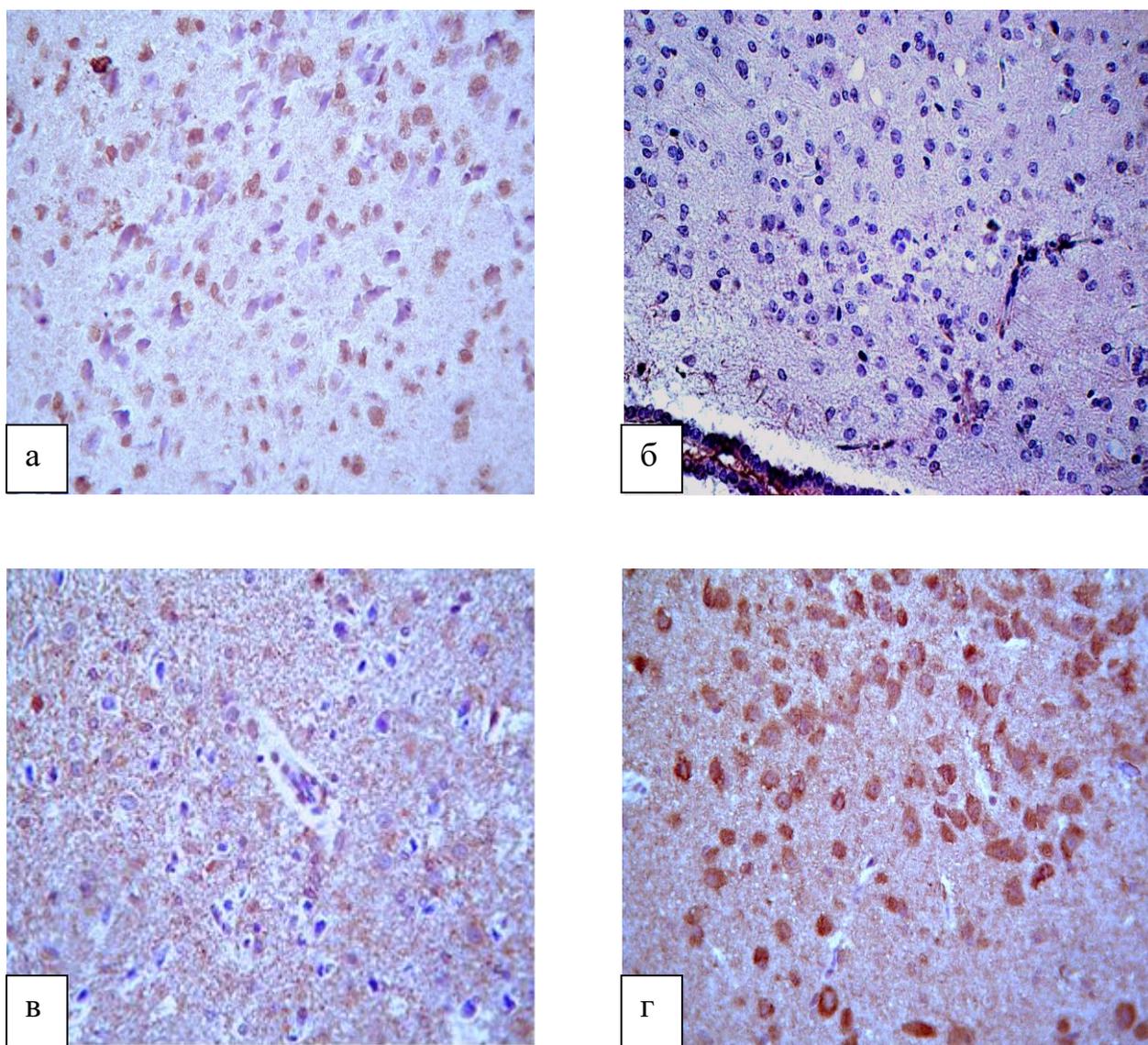


Рис. 14. Усиление экспрессии i-NOS и преобладание e-NOS-иммунонегативной реакции в паравентрикулярных ядрах гипоталамуса при моделировании дефицита магния 8 недель. Контрольная группа – а, в; опытная – б, г. ПАП метод с использованием поликлональных антител к e-NOS (а, б) и i-NOS (в, г) в разведении 1:100. Ув. $\times 200$.

Большинство крупных нейроцитов уменьшались в размерах за счет уменьшения объема цитоплазмы перикарионов. При окраске тионином по Нисслю наблюдался диффузный гиперхроматоз и очаговый хроматолиз большинства нейронов (рис. 15), у некоторых из них при этом отмечалась ярко выраженная зона перинуклеарного просветления.

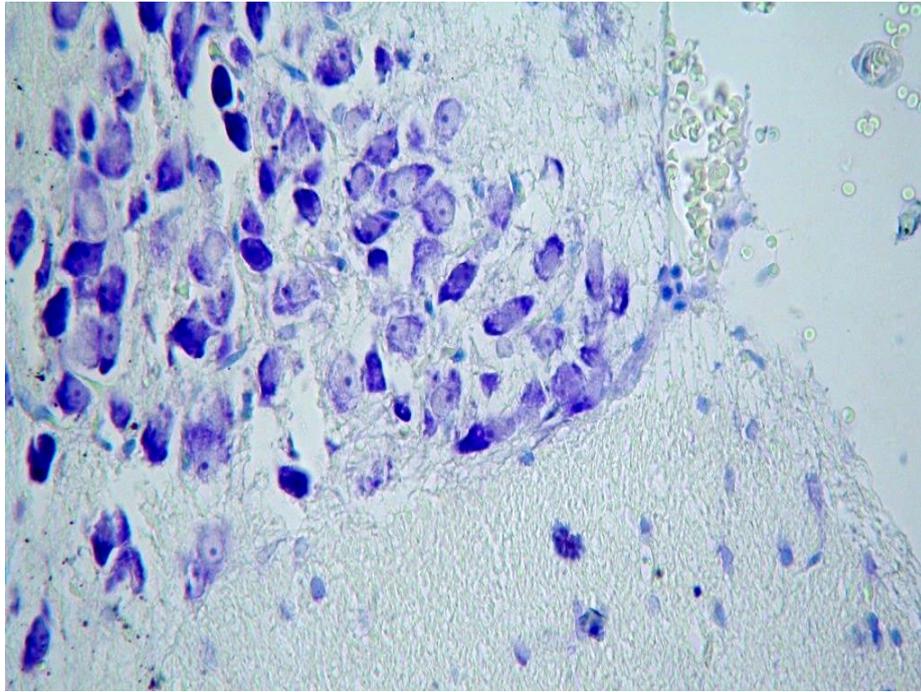


Рис. 15. Строение супраоптического ядра гипоталамуса при дефиците магния 8 недель: увеличение количества нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы перикарионов и признаками центрального хроматолиза. Окраска тионином по Нисслю. Ув. $\times 400$.

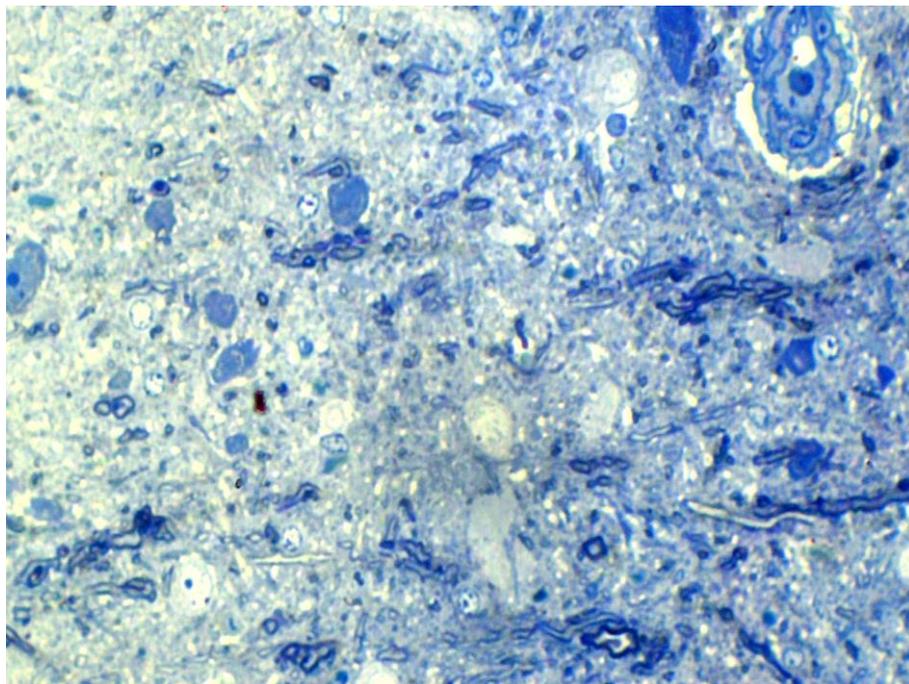


Рис. 16. «Темные» и «светлые» нейроны в латеральной гипоталамической области при дефиците магния 8 недель, полутонкий срез. Окраска метиленовым синим. Ув. $\times 400$.

Ядра нейронов имели округлую форму с четко выраженным центрально расположенным или эктопированным ядрышком. На полутонких срезах

(толщиной 1 мкм), окрашенных метиленовым синим, среди нейронов супраоптических ядер и латеральной гипоталамической области при моделируемом дефиците магния отмечались два типа – «темные» с усилением базофилии цитоплазмы, и «светлые» - с оптически прозрачной цитоплазмой (рис. 16).

При иммуногистохимическом исследовании нейронов супраоптических ядер в контрольной группе в большинстве клеток наблюдался мозаичный характер экспрессии TRPM6 (рис. 17, а) в перикарионах: количество иммунонегативных нейронов составляло около 33,8% ($p < 0,001$), распределение иммунореактивного материала в цитоплазме перикарионов иммунопозитивных нейронов варьировало от равномерного пылевидного накопления по всему объему с просветлением перинуклеарной зоны (постоянный признак) до очаговой гранулярной вакуолизации с признаками гиперэкспрессии изучаемого антигена вдоль контура цитоплазматической мембраны. В отдельных нейронах отмечалось интенсивное окрашивание волокон нейроцитов, при этом сами клетки были иммунонегативными.

При иммуногистохимическом исследовании нейронов супраоптических ядер с использованием антител к TRPM6 (рис. 17, б) в опытной группе в большинстве клеток наблюдалось усиление накопления иммунореактивного материала в перикарионах: количество иммунонегативных нейронов составляло не более 11,6% ($p < 0,05$), иммунореактивный материал в цитоплазме перикарионов иммунопозитивных нейронов распределен в виде глыбок по всей площади цитоплазмы перикарионов и отростков, также имело место усиление гранулярной вакуолизации с признаками гиперэкспрессии изучаемого антигена вдоль контура ядерной мембраны.

При иммуногистохимическом исследовании с использованием антител к TRPM7 (рис. 17, в) в нейронах супраоптических ядер гипоталамуса в

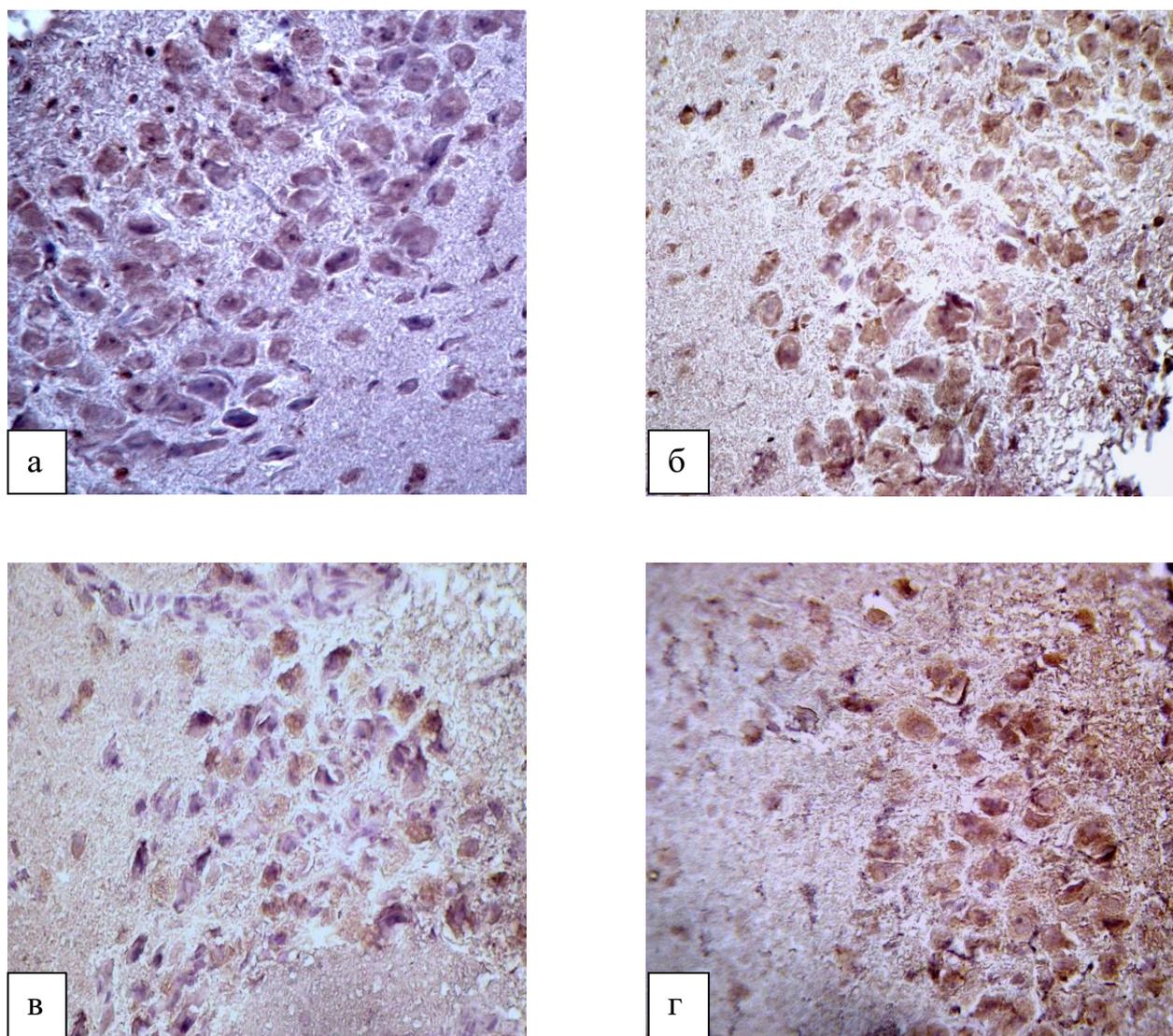


Рис. 17. Мозаичный характер экспрессии TRPM6 и TRPM7 в супраоптических ядрах гипоталамуса у животных контрольной группы (а, в) и усиление иммунопозитивной реакции при моделировании дефицита магния 8 недель (б, г). ПАП метод с использованием поликлональных антител к TRPM6 (а, б) и TRPM7 (в, г) в разведении 1:600. Ув. $\times 400$.

контрольной группе отмечалось равномерное умеренно выраженное иммунопозитивное окрашивание цитоплазмы перикарионов, ядерной оболочки нейронов, нейропиля и капилляров; ядра нейроцитов, глиальных клеток были иммунонегативными. При иммуногистохимическом исследовании с использованием антител к TRPM7 в нейронах супраоптических ядер гипоталамуса в опытной группе (рис. 17, г) наблюдалась неравномерно усиленная экспрессия изучаемого антигена в цитоплазме перикарионов и ядерной оболочке, при этом часть нейронов

(около 20%) были иммунонегативными. В нейропиле супраоптических ядер гипоталамуса опытной группы имела место диффузная слабо позитивная реакция, отмечалось усиление цитоплазматической экспрессии в эндотелиоцитах капилляров. При исследовании плотности иммунореактивного материала в группе с дефицитом магния имело место увеличение этого показателя по сравнению с контролем. При исследовании уровня экспрессии GFAP иммуногистохимическим методом в супраоптических ядрах гипоталамуса животных с моделируемой магниевой недостаточностью отмечалось увеличение плотности накопления иммунореактивного материала в фибриллярных астроцитах.

При исследовании уровня экспрессии эндотелиальной нитроксидсинтазы (e-NOS) иммуногистохимическим методом (рис. 18, б) в супраоптических ядрах гипоталамуса животных с моделируемой магниевой недостаточностью наблюдалось преобладание иммунонегативных нейронов и глиоцитов (степень 0). Эндотелиоциты были иммунонегативны или слабо иммунопозитивны (степень 0-1). При этом в контроле (рис. 18, а) наблюдалось большое количество иммунопозитивных нейронов и глиоцитов с умеренно и сильно выраженной цитоплазматической экспрессией эндотелиальной нитроксидсинтазы (степени 2-3); в сосудах микроциркуляторного русла эндотелиоциты были иммунопозитивными (степень 2).

При исследовании уровня экспрессии индуцибельной нитроксидсинтазы (i-NOS) иммуногистохимическим методом (рис. 18, г) в супраоптических ядрах гипоталамуса животных с моделируемой магниевой недостаточностью наблюдалось неравномерное усиление иммунопозитивной реакции в цитоплазме перикарионов нейронов, их отростков по сравнению с контролем (рис. 18, в). Эндотелиоциты и глиоциты были слабо иммунопозитивны (степень 1). При исследовании одного из интегральных маркеров внутреннего и внешнего путей апоптоза – каспазы 3 – в паравентрикулярных ядрах гипоталамуса животных с моделируемой

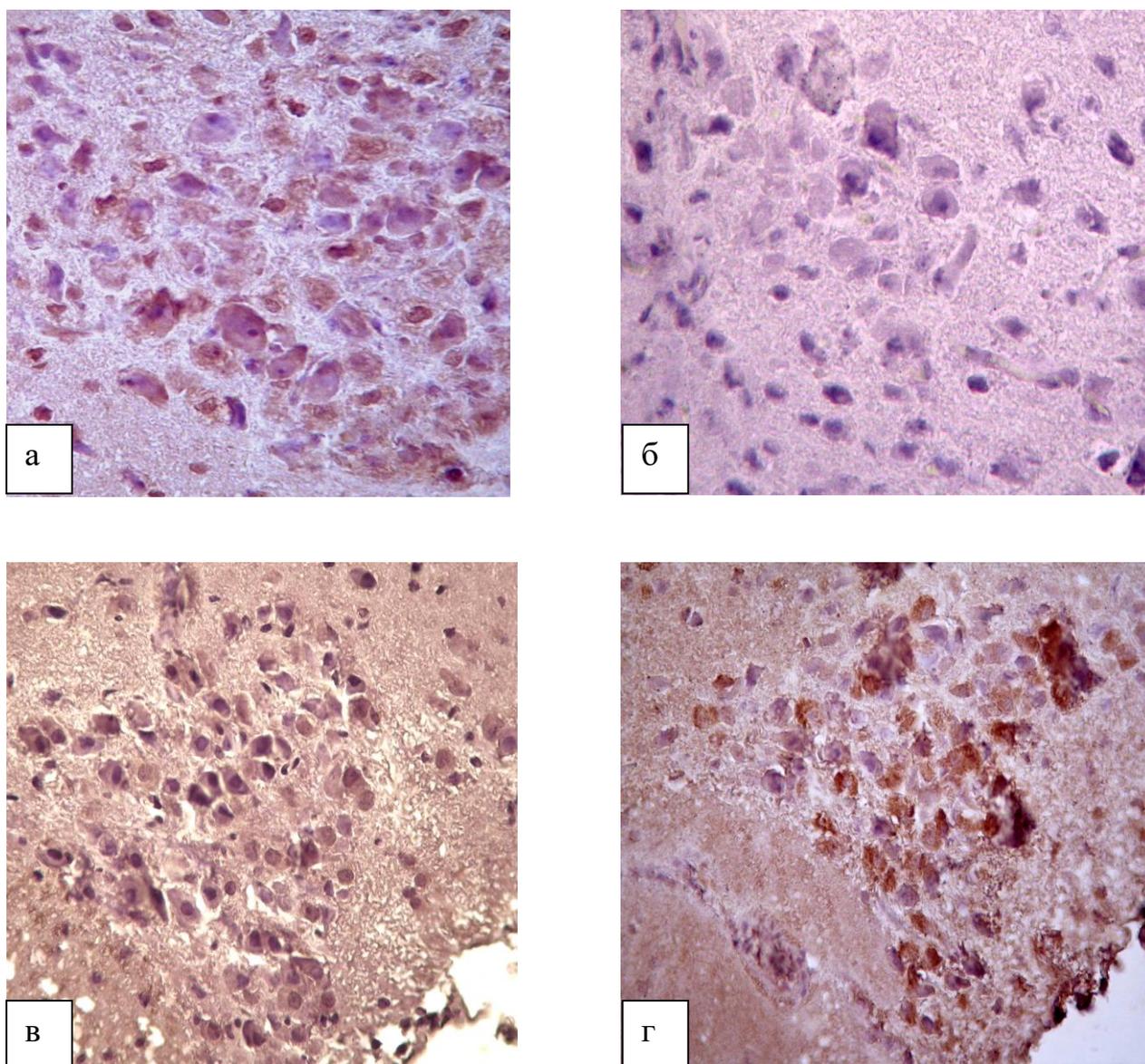


Рис. 18. Диффузные изменения экспрессии i-NOS и уменьшение экспрессии e-NOS в супраоптических ядрах гипоталамуса при моделировании дефицита магния 8 недель. Контрольная группа – а, в; опытная – в, г. ПАП метод с использованием поликлональных антител к e-NOS (а, б) и i-NOS (в, г) в разведении 1:600. Ув. $\times 200$ (в, г); $\times 400$ (а, б).

магниевого недостаточностью и в контрольной группе достоверных различий не обнаружено. У части животных опытной группы отмечалось незначительное увеличение количества каспаза-3-иммунопозитивных нейронов в мелкоклеточной части паравентрикулярного ядра гипоталамуса на фоне слабо позитивного окрашивания ядрышек и карิโอплазмы нейронов, нейропиля и эндотелия капилляров.

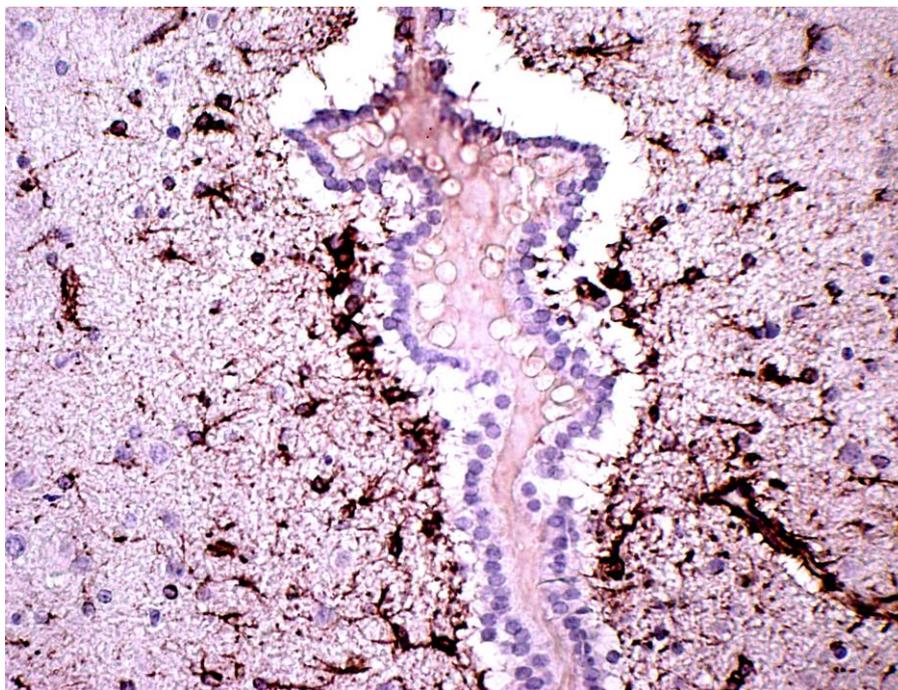


Рис. 19. Увеличение плотности иммунореактивных астроцитов в области III желудочка при дефиците магния 8 недель. ПАП метод с использованием антител к GFAP. Ув. $\times 400$.

При исследовании уровня экспрессии GFAP (рис. 19) иммуногистохимическим методом в области III желудочка животных с моделируемой магниевой недостаточностью отмечалось усиление плотности накопления иммунореактивного материала в астроцитах и их отростках.

Обнаруженные изменения экспрессии TRPM6, TRPM7, i-NOS, e-NOS при дефиците магния путем полуколичественной оценке по визуально-аналоговой шкале Allred D.C., (1998), представлены в таблице 5.

Результаты иммуногистохимического исследования крупноклеточных ядер гипоталамуса ($M \pm \delta$)

| Маркеры | Группа 1 (контроль), баллы | Группа 2 (дефицит магния 8 недель), баллы | Группа 3 (дефицит магния 12 недель), баллы |
|---------|----------------------------|---|--|
| TRPM6 | 4±0,41 | 7±0,55* | 7±0,41* |
| TRPM7 | 3±0,55 | 6±0,55* | 7±0,52* |
| e-NOS | 5±0,82 | 2±1,6* | 3±0,98* |
| i-NOS | 1±0,98 | 4±1,38* | 6±0,89** |

При электронно-микроскопическом исследовании паравентрикулярного и супраоптического ядер гипоталамуса у контрольных животных (рис. 20, 21) в подавляющем большинстве ядер крупных нейросекреторных клеток отмечалось преобладание эухроматина. В ядрах некоторых нейронов наблюдались небольшие скопления свободного гетерохроматина в периферических отделах карิโอплазмы, а также гетерохроматина, локализованного в виде глыбок у внутренней мембраны ядерной оболочки. Ядерная оболочка всех нейроцитов представлена наружной и внутренними ядерными мембранами с узким перинуклеарным пространством. В цитоплазме нейронов цистерны гранулярной эндоплазматической сети (ГЭПС) выражены хорошо, располагались в непосредственной близости от перинуклеарной зоны. Отмечалось большое количество свободных полисом и рибосом. Встречались мелкие цитоплазматические вакуоли с содержимым низкой электронной плотности.

Ультраструктурные элементы комплекса Гольджи хорошо развиты, расположены в перинуклеарной зоне. В цитоплазме перикарионов нейронов и астроцитов наблюдалось обилие митохондрий округлой и несколько вытянутой овальной формы. Их количество увеличивалось в периферических

отделах перикариона. В нейропиле преобладали безмиелиновые нервные волокна, представленные поперечно срезанными профилями дендритов и

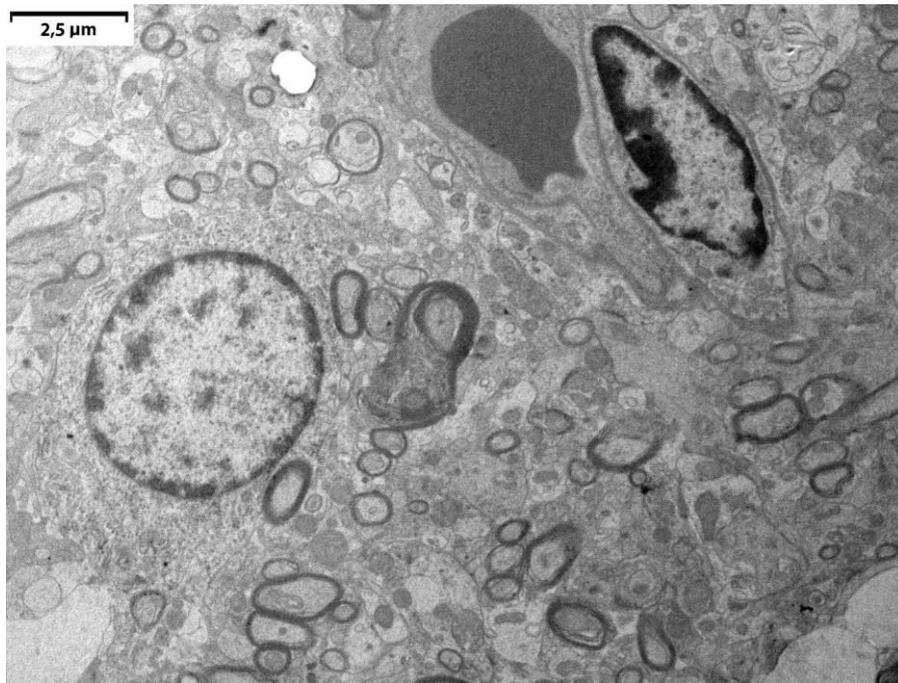


Рис. 20. Ультраструктура нейрона супраоптического ядра в контрольной группе. Ув. $\times 4200$.

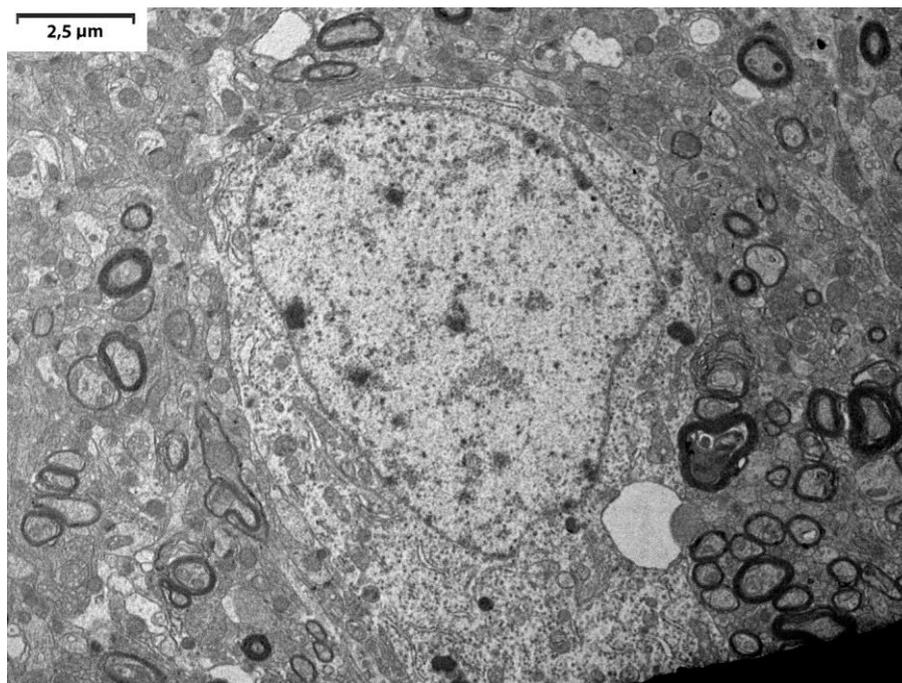


Рис. 21. Ультраструктура нейросекреторной клетки паравентрикулярного ядра гипоталамуса в контрольной группе. Ув. $\times 4200$.

безмиелиновых аксонов, при этом определялось не менее 30% миелинизированных нервных волокон с хорошо выраженной оболочкой.

В нейропиле визуализировалось значительное количество аксодендритических синапсов в непосредственной близости от перикарионов нейронов, а также аксосоматических синапсов, представленных синапсами асимметричного типа по Грью, содержащих множество мембранных везикул с содержимым

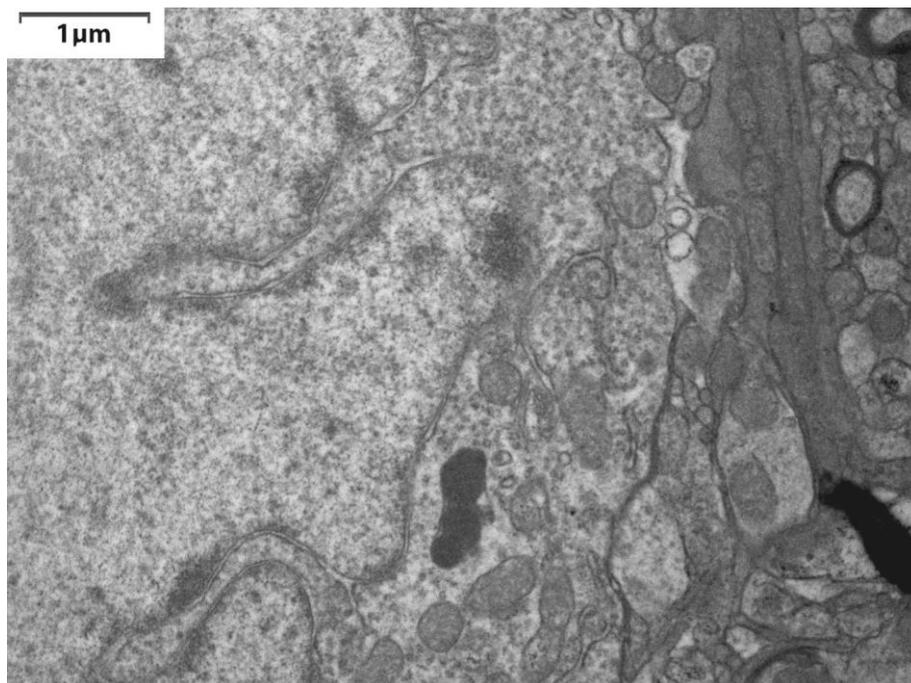


Рис. 22. Ультраструктурные признаки гиперфункции «светлого» нейрона супраоптического ядра при 8-недельном дефиците магния: конденсацией гранул рибонуклеопротеинов рибосомного типа на ядерной мембране, в окружности которой отмечалось скопление митохондрий и вакуоль с высокой электронной плотностью. Ув. $\times 11500$.

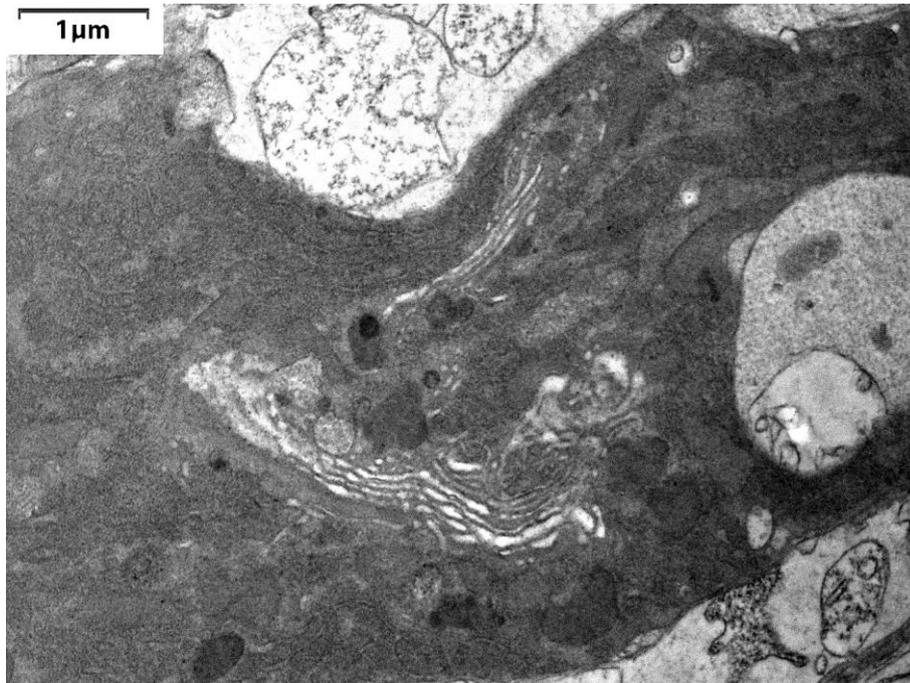


Рис. 23. Ультраструктура «темного» нейрона супраоптического ядра при 8-недельном дефиците магния: скопления лизосом, выраженная осмиофилия цитоплазмы. Ув. $\times 11500$.

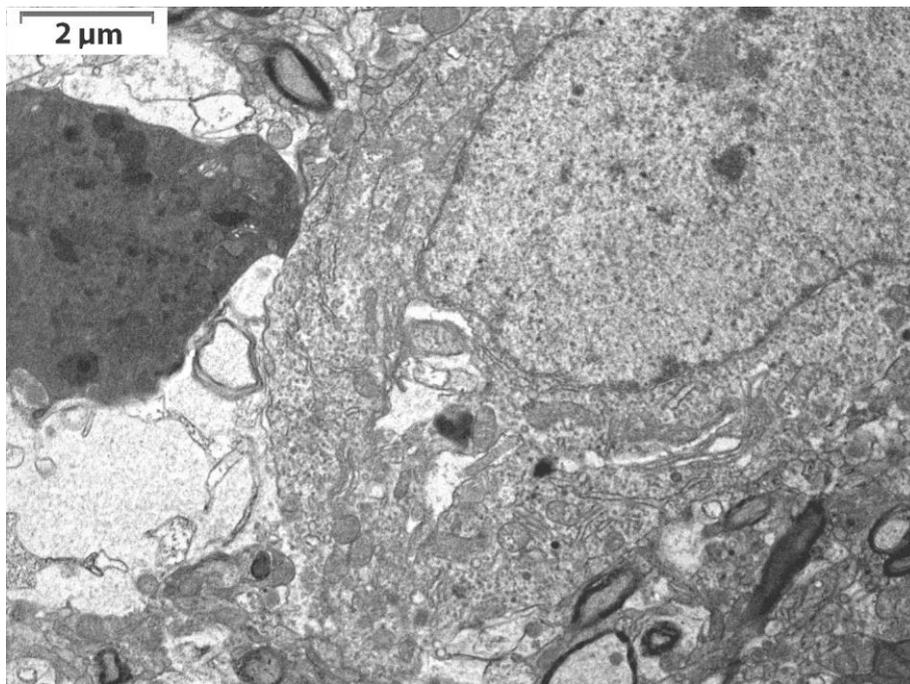


Рис. 24. Ультраструктура двух типов нейронов в паравентрикулярном ядре гипоталамуса при дефиците магния 8 недель, явления перичеселлюлярного отека вокруг «темного» нейрона. Ув. $\times 6000$

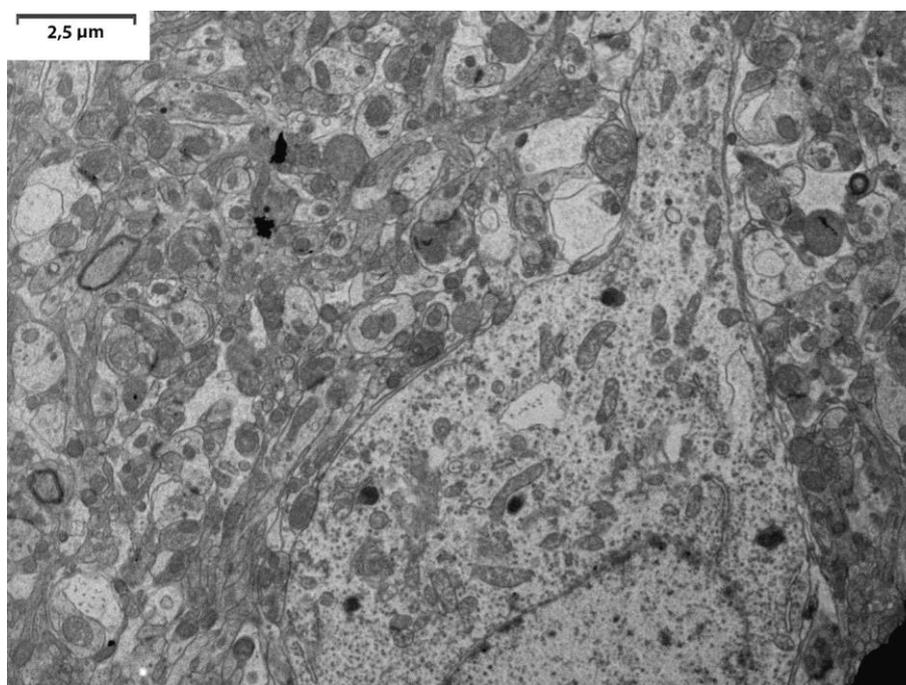


Рис. 25. Снижение количества полисом и элементов гранулярной ЭПС в цитоплазме, полиморфизм митохондрий с очаговым разрушением крист при дефиците магния 8 нед. Ув. $\times 4200$.

низкой и умеренной электронной плотности диаметром около 100 нм в пресинаптических частях.

При электронно-микроскопическом исследовании паравентрикулярного и супраоптического ядер гипоталамуса у животных с моделируемым дефицитом магния встречались два типа нейронов: «светлые» (рис. 22, 24), которые характеризовались низкой электронной плотностью цитоплазмы, конденсацией рибосом на наружной мембране ядерной оболочки, в окружности которой отмечалось скопление митохондрий с разрежением матрикса; «темные» (рис. 23, 24), для которых была характерна выраженная осмиофилия цитоплазмы, снижение количества и размеров внутриклеточных органелл с признаками их повреждения (вакуолизация, лизис крист митохондрий, деформация ядер и очаги разрушения ядерной оболочки). В отдельных «светлых» нейронах в ядрах обнаруживались очаговые расширения перинуклеарного пространства, небольшие очаги разрушения наружной ядерной мембраны. В цитоплазме перикарионов таких нейронов отмечено снижение электронной плотности гиалоплазмы за счет

внутриклеточного отека, накоплением вакуолей неправильной округлой формы с электронно-прозрачным содержимым в перинуклеарной зоне, а также уменьшение количества митохондрий, элементов ГЭПС, свободных рибосом и полисом (рис. 25). В непосредственной близости от мембран клеток в цитоплазме перикарионов увеличивалось количество электронно-плотных вакуолей, отшнурованных от комплекса Гольджи. Митохондрии в цитоплазме перикарионов отличались полиморфизмом, встречались мегамитохондрии округлой формы диаметром до 300 нм, наблюдался очаговый лизис крист и очаговое накопление электронно-плотных депозитов в матриксе (рис 26, 27).

В некоторых нейронах отмечалось разрушение мембран митохондрий с выходом содержимого матрикса в цитоплазму, перифокальными скоплениями вакуолей с электронно-плотным содержимым (фаголизосом). В цитоплазме перикарионов «светлых» нейронов отмечалось

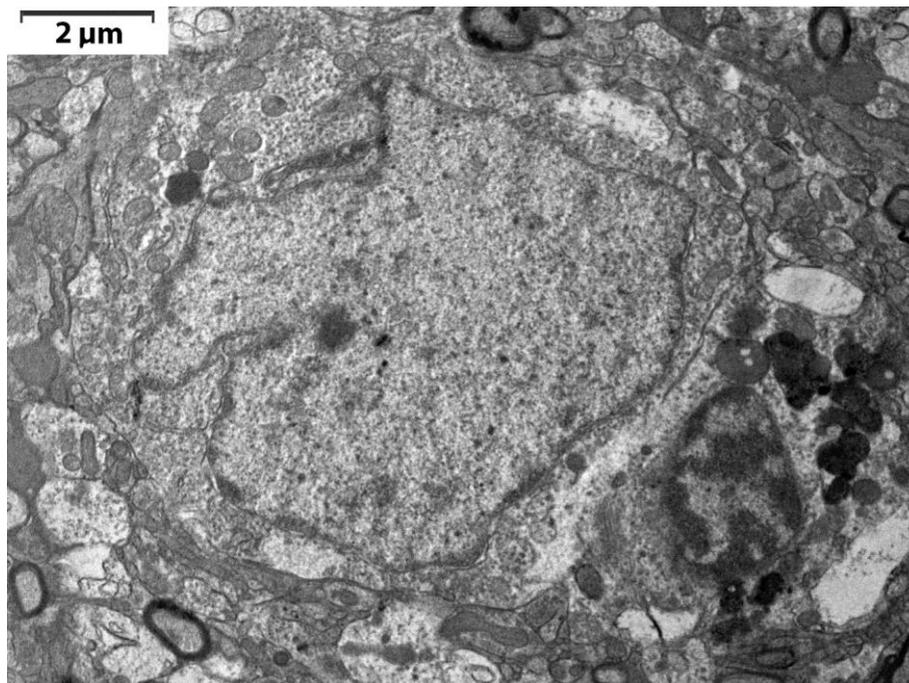


Рис. 26. Ультраструктура нейрона в супраоптическом ядре гипоталамуса при дефиците магния 8 недель: деформация ядра, вакуолизация цитоплазмы и кариоплазмы, признаки повреждения митохондрий. Ув. $\times 6000$.

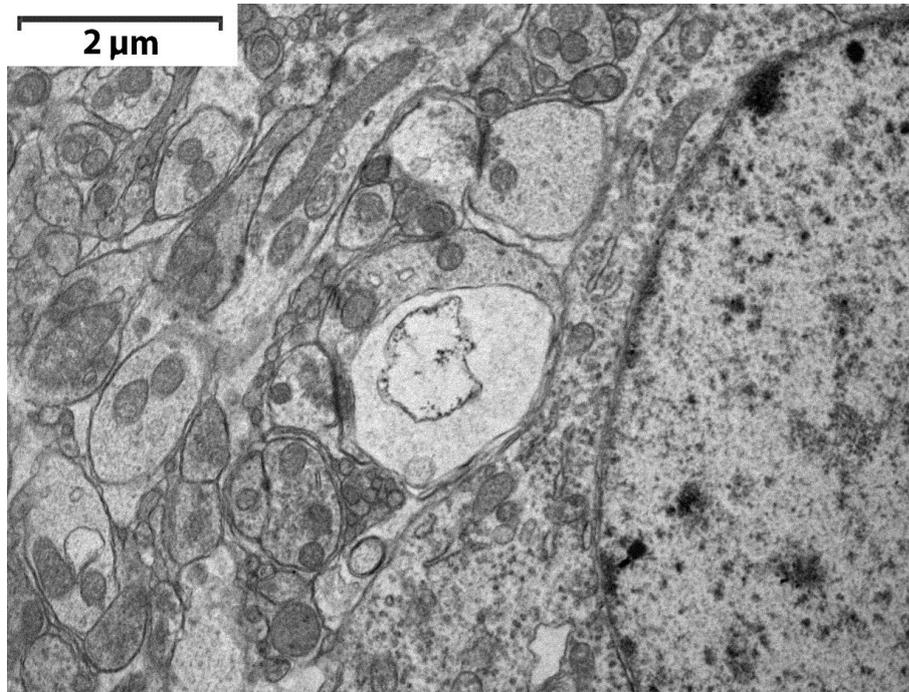


Рис. 27. Ультраструктура нейросекреторной клетки паравентрикулярного ядра гипоталамуса при дефиците магния 8 недель: явления внутрицитоплазматического отека в отростках нейроцитов, полиморфизм митохондрий с признаками повреждения мембран и крист. Ув. $\times 8200$.

скопление нейросекреторных гранул, количество которых достоверно не изменялось по сравнению с контролем. Наблюдалось относительное уменьшение количества аксодендритических синапсов в непосредственной близости от перикарионов нейронов. Эти синапсы имели асимметричный тип по Грью, с нечетко выраженной синаптической щелью, участками слияния пре- и постсинаптической мембран, неравномерным накоплением синаптических пузырьков с умеренным и слабо выраженным электронно-плотным содержимым. В нейропиле отмечалось относительное увеличение числа аксосоматических и аксоаксональных синапсов (рис. 28), представленных синапсами асимметричного типа по Грью, содержащих множество мембранных везикул с содержимым умеренной и высокой электронной плотности диаметром около 80-100 нм в пресинаптических и постсинаптической частях.

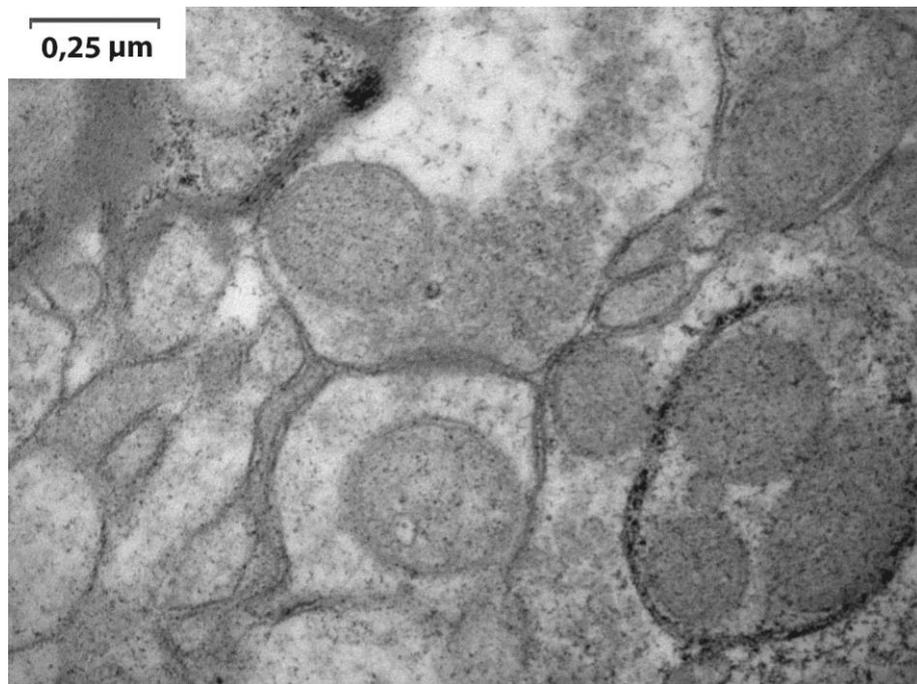


Рис. 28. Асимметрия и увеличение осмиофилии синаптических щелей в аксо-аксональных синапсах при дефиците магния 8 недель. Ув. $\times 43000$.

Отмечалось увеличение осмиофилии синаптической щели и синаптических мембран. Многие аксоны имели небольшой диаметр, были покрыты истонченной миелиновой оболочкой с участками разрыхления, очаговым расслоением ламелл. Обнаруживались очаговые просветления аксоплазмы, внутриаксоплазматический отек, скопления везикул с содержимым умеренной электронной плотности, а также признаки повреждения митохондрий, аналогичные тем, что наблюдались в цитоплазме перикарионов нейронов. В некоторых отделах нейропиля отмечался выраженный периаксональный отек, разрушение мембран отростков нейронов с накоплением лизосом и фаголизосом. Миелиновая оболочка в большей части волокон была разрыхлена, отмечалось увеличение расстояния между ламеллами (рис. 29). В безмиелиновых волокнах также отмечались явления вакуолизации аксоплазмы.

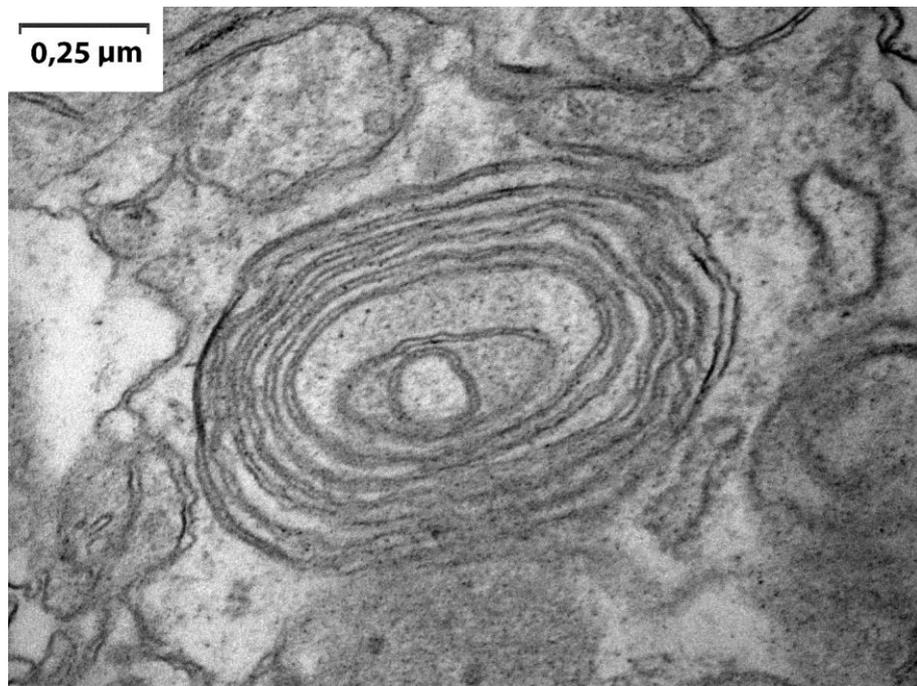


Рис. 29. Ультраструктура миелина в паравентрикулярном ядре гипоталамуса при дефиците магния 8 недель: увеличение расстояния между ламеллами, очаги разрыхления, неравномерная толщина и осмиофилия миелиновой оболочки. Ув. $\times 43000$.

Капилляры в контрольной группе (рис. 30) были выстланы эндотелиальными клетками толщиной около 0,4-0,6 мкм, связанными плотными контактами. В цитоплазме эндотелиоцитов у животных контрольной группы определялось большое количество митохондрий, единичные везикулы с содержимым низкой электронной плотности. Перициты толщиной около 50 нм располагались на базальной мембране, были связаны с эндотелиоцитами плотными контактами. Астроциты имели полигональную форму, их отростки плотно связаны с базальной мембраной, формируя небольшие инвагинации. При исследовании сосудов микроциркуляторного русла в условиях 8 недельного дефицита магния (рис. 31, 32) отмечались явления эритростаза, перицеллюлярный и периваскулярный отек. В эндотелии кровеносных капилляров обнаруживалось увеличение количества пиноцитозных везикул с содержимым высокой электронной плотности, при этом имело место значительное уменьшение количества митохондрий.



Рис. 30. Ультраструктура капилляра паравентрикулярного ядра гипоталамуса в контрольной группе. Ув. $\times 9900$.

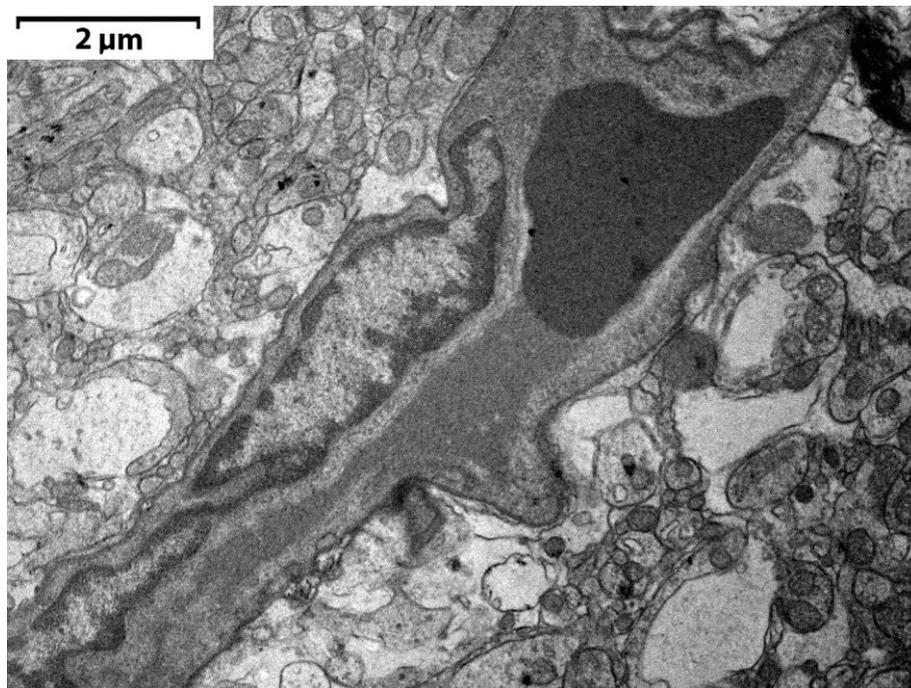


Рис. 31. Капилляр паравентрикулярного ядра гипоталамуса в опытной группе: отек отростков астроцитов; увеличение количества пиноцитозных везикул с содержимым высокой электронной плотности и уменьшение количества митохондрий в эндотелиоците; неравномерная толщина базальной мембраны по ходу сосудов с участками резкого истончения до 30-50 нм. Ув. $\times 8200$.

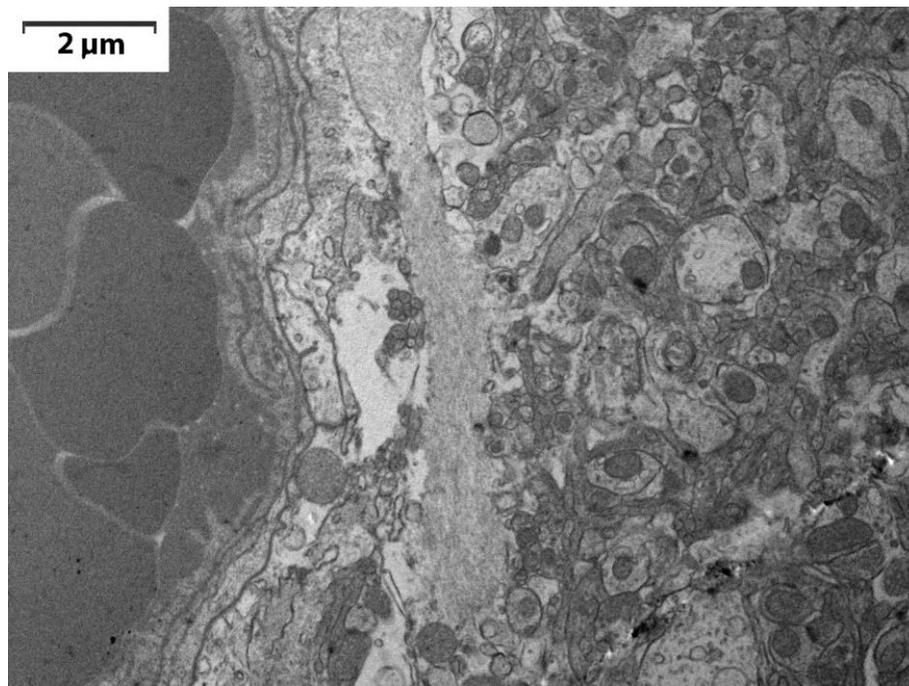


Рис. 32. Ультраструктура венулы супраоптического ядра гипоталамуса (опыт): увеличение количества пиноцитозных везикул с содержимым высокой электронной плотности в эндотелии, участки разволокнения базальной мембраны с очаговыми надрывами, более выраженная осмиофилия базальной мембраны по сравнению с контролем. Ув. $\times 6000$.

Наблюдалось расширение пространств между соседними эндотелиоцитами с сохранением зон плотных контактов. В некоторых эндотелиоцитах отмечались глубокие инвагинации ядра с формированием отдельных отшнуровавшихся ядерных сегментов. Отмечались значительные изменения базальной мембраны: она имела неравномерную толщину по ходу сосудов с участками резкого истончения до 30-50 нм, в отличие от контрольной группы, где ее толщина составляла 100-120 нм. На ограниченных участках базальная мембрана имела четкие контуры и относительно равномерную фибриллярную структуру; на большем протяжении происходило ее разволокнение с очаговыми надрывами, при этом наблюдалась более выраженная осмиофилия базальной мембраны по сравнению с контролем.

Снаружи от базальной мембраны среди прилежащих периваскулярных отростков астроцитов преобладали безмиелиновые нервные волокна разного

калибра. Толщина миелиновой оболочки снижалась по сравнению с контролем на 40-50%. Отмечалось увеличение размеров астроцитов, деформация и эктопия ядер и ядрышек. В части астроцитов отмечалось выраженное расширение цистерн гранулярной эндоплазматической сети, вакуолизация цитоплазмы. В ядрах отмечалась маргинация гетерохроматина, появление деформированных и гиперхромных ядер. Подобные изменения носили очаговый характер. В периваскулярных отростках астроцитов обнаруживались резко выраженные изменения по типу внутриклеточного отека с образованием вакуолей с низкой электронной плотностью. В митохондриях периваскулярных отростков астроцитов отмечались явления набухания и лизиса крист. В миелиновых нервных волокнах обнаруживались участки разволокнения ламелл с очаговой деструкцией. Электронная плотность аксоплазмы была снижена, в отдельных осевых цилиндрах отмечалось образование мелких вакуолей с содержимым низкой и умеренной электронной плотности.

3.3. Патоморфологическая характеристика среднего мозга животных при моделировании алиментарного дефицита магния.

При микроскопическом исследовании различных отделов среднего мозга наиболее выраженные изменения при моделируемом дефиците магния отмечались в центральном сером веществе, в верхнем центральном и дорсальном ядрах шва.

У животных контрольной группы среди нейронов центрального серого вещества и ядер шва встречались в небольшом количестве (менее 1/3) крупные (средняя площадь цитоплазмы перикарионов $192,1 \pm 6,2$ мкм²) мультиполярные клетки с треугольной и веретеновидной формой перикарионов. Также наблюдались мелкие (средняя площадь цитоплазмы перикарионов $93,2 \pm 3,2$ мкм²) и средние нейроны (средняя площадь цитоплазмы перикарионов $119,1 \pm 5,4$ мкм²) с округлой и полигональной формой цитоплазмы перикарионов. Ядра нейронов имели округлую форму, располагались в центральной части цитоплазмы перикарионов, в большинстве ядер четко визуализировалось центрально расположенное ядрышко. При окраске тионином по Нисслю у животных контрольной группы в названных отделах отмечалось равномерное накопление тигроида в цитоплазме перикарионов и дендритов, при этом встречались единичные клетки с явлениями гиперхроматоза. У некоторых животных контрольной группы отмечались явления перичеселлюлярного и периваскулярного отека и стазы эритроцитов в капиллярах названных областей.

В условиях моделируемого дефицита магния отмечалось изменение формы и размеров цитоплазмы перикарионов нейронов центрального серого вещества и ядер шва. Многие нейроны имели неправильную округлую или треугольную форму цитоплазмы перикарионов, с вакуолизацией и выраженным просветлением перинуклеарной зоны. Ядра многих нейронов при дефиците магния сморщены, резко базофильны, с мозаичной конденсацией гетерохроматина. В кариоплазме отдельных нейронов становились трудно различимыми эктопированные ядрышки, отмечалось

появление глыбчатых пикнотически измененных гомогенных ядерных фрагментов, напоминающих апоптозные тельца, наблюдалась очаговая вакуолизация ядер и цитоплазмы перикарионов нейронов. При окраске тионином по Нисслию в большинстве нейронов обнаруживался мозаичный гиперхроматоз цитоплазмы, в некоторых — очаговый хроматолиз, просветление перинуклеарной области цитоплазмы перикариона. В нейропиле ядер центрального серого вещества, ядер шва при дефиците магния выявлялись набухшие глиоциты, явления периваскулярной нейрофагии. В указанных регионах выявлены выраженное полнокровие сосудов микроциркуляторного русла, стаз эритроцитов в капиллярах, отек и набухание эндотелиоцитов капилляров и артериол, ядра эндотелиоцитов артериол иногда располагались перпендикулярно базальной мембране, что является одним из признаков вазоспазма.

Результаты иммуногистохимического метода исследования с использованием антител к рецепторам TRPM6 и TRPM7 в контрольной группе обнаружили умеренное количество (степени 1-2) равномерно распределенного иммунопозитивного материала в цитоплазме нейронов, в нейропиле, а также в эндотелии сосудов микроциркуляторного русла.

В условиях моделируемого дефицита магния при применении иммуногистохимического метода исследования с использованием антител к рецепторам TRPM6 отмечалось увеличение накопления иммунореактивного материала (степень 2) в цитоплазме и ядерных оболочках большинства нейроцитов центрального серого вещества и ядер шва, при этом глиоциты имели мозаичный характер усиления экспрессии TRPM6 с преобладанием иммунопозитивных клеток (около 2/3). В эндотелиоцитах сосудов микроциркуляторного русла отмечалось выраженное усиление (степень 2-3) накопления иммунореактивного материала в цитоплазме при дефиците магния.

При иммуногистохимическом исследовании центрального серого вещества и ядер шва в условиях дефицита магния с использованием антител

к рецепторам TPRM7 отмечалось выраженное увеличение накопления иммунореактивного материала (степень 2-3) в цитоплазме перикарионов большинства нейроцитов центрального серого вещества и ядер шва, при этом глиоциты были иммунонегативными. В эндотелиоцитах сосудов микроциркуляторного русла отмечалось выраженное усиление (степень 2-3) накопления иммунореактивного материала в цитоплазме при дефиците магния.

При иммуногистохимическом методе исследования центрального серого вещества и ядер шва с использованием антител к GFAP в опытной группе отмечалось усиленное иммунопозитивное окрашивание цитоплазмы фибриллярных и протоплазматических астроцитов, при этом встречались в большем количестве по сравнению с контролем периваскулярно расположенные фибриллярные астроциты с выраженным усилением экспрессии GFAP.

При иммуногистохимическом методе исследования центрального серого вещества и ядер шва с использованием антител к e-NOS в контрольной группе отмечалось равномерное умеренно и слабо выраженное (степень 1) иммунопозитивное окрашивание цитоплазмы перикарионов нейронов и эндотелиоцитов капилляров. Глиоциты были слабо иммунопозитивными.

При иммуногистохимическом методе исследования центрального серого вещества и ядер шва с использованием антител к e-NOS в опытной группе отмечалось уменьшение степени выраженности иммунопозитивного окрашивания цитоплазмы перикарионов нейронов и эндотелиоцитов капилляров. Глиоциты были иммунонегативными.

При иммуногистохимическом методе исследования центрального серого вещества и ядер шва с использованием антител к i-NOS в контрольной группе отмечалось слабо выраженное (степень 0-1) иммунопозитивное окрашивание цитоплазмы перикарионов нейронов и эндотелиоцитов капилляров. Глиоциты были слабо иммунопозитивными.

При иммуногистохимическом исследовании центрального серого вещества и ядер шва с использованием антител к i-NOS в опытной группе отмечалось увеличение степени выраженности иммунопозитивного окрашивания цитоплазмы перикарионов нейронов (степень 1-2) и эндотелиоцитов капилляров (степень 2), а также глиоцитов (степень 1-2).

При иммуногистохимическом методе исследования центрального серого вещества и ядер шва с использованием антител к каспазе-3 в опытной группе в целом отмечалась иммунонегативная реакция как со стороны нейронов, так и нейропиля, при этом встречались единичные нейроны с усиленной экспрессией антигена в цитоплазме (степени 1-2).

3.4. Патоморфологическая характеристика продолговатого мозга и мозжечка животных при моделировании алиментарного дефицита магния.

При исследовании продолговатого мозга у животных с моделируемым дефицитом магния наиболее выраженные изменения наблюдались в крупных нейронах ростральной ретикулярной формации вентральных отделов. В контрольной группе животных эти нейроны имели полигональную и треугольную форму цитоплазмы перикарионов, слабо выраженную зернистость в цитоплазме, округлой формы ядро с центрально расположенным ядрышком. При окраске тионином по Ниссию в цитоплазме перикарионов и начальных отрезках дендритов определялись гранулы хроматофильной субстанции, которые концентрировались в виде плотных скоплений преимущественно в периферических отделах цитоплазмы и, в меньшей степени, – в непосредственной близости от ядер клеток.

У животных с моделируемой магниевой недостаточностью наблюдались структурные изменения крупных нейронов гигантоклеточного ретикулярного ядра продолговатого мозга в виде изменения формы (появления нейроцитов с треугольной формой) и размеров, вакуолизации цитоплазмы перикарионов, очагового хроматолиза субстанции Ниссля, просветления перинуклеарной зоны в цитоплазме клеток, усиления базофилии кариоплазмы и эктопии ядрышек в некоторых нейроцитах.

При применении иммуногистохимического метода исследования у животных контрольной группы с использованием антител к TRPM6 отмечалось умеренно выраженное диффузное накопление иммунопозитивного материала в цитоплазме перикарионов крупных нейронов ретикулярного гигантоклеточного ядра продолговатого мозга (степень 1).

При применении иммуногистохимического метода исследования у животных опытной группы с использованием антител к TRPM6 отмечалось выраженное диффузное накопление иммунопозитивного материала в

цитоплазме перикарионов крупных нейронов ретикулярного гигантоклеточного ядра продолговатого мозга (степень 1-2).

При применении иммуногистохимического метода исследования у животных контрольной группы с использованием антител к TRPM7 отмечалось преобладание иммунонегативных нейронов (степень 0-1).

При применении иммуногистохимического метода исследования у животных опытной группы с использованием антител к TRPM7 отмечалось мозаичное накопление иммунопозитивного материала (степень 0-1) в цитоплазме перикарионов и ядерных оболочках, кариоплазме крупных нейронов ретикулярного гигантоклеточного ядра продолговатого мозга, при этом около 1/3 нейронов были иммунонегативными.

При применении иммуногистохимического метода исследования у животных контрольной группы с использованием антител к e-NOS отмечалось слабо выраженное диффузное накопление иммунопозитивного материала в цитоплазме перикарионов крупных нейронов ретикулярного гигантоклеточного ядра продолговатого мозга (степень 1).

При применении иммуногистохимического метода исследования у животных опытной группы с использованием антител к e-NOS отмечалось преобладание иммунонегативных клеток ретикулярного гигантоклеточного ядра продолговатого мозга, при этом встречались единичные нейроны со слабо выраженной иммунопозитивной реакцией в цитоплазме перикарионов (степень 1).

При применении иммуногистохимического метода исследования у животных контрольной группы с использованием антител к i-NOS отмечалась иммунонегативная реакция со стороны нейронов ретикулярного гигантоклеточного ядра продолговатого мозга (степень 0).

При применении иммуногистохимического метода исследования у животных опытной группы с использованием антител к i-NOS отмечалось мозаичное накопление иммунореактивного материала в цитоплазме перикарионов и отростков нейронов, кариоплазме, при этом отмечалось не

менее $\frac{1}{2}$ нейронов с умеренно выраженной (степень 1-2) иммунопозитивной реакцией.

При применении иммуногистохимического метода исследования с использованием антител к каспазе 3 достоверных отличий между контрольной и опытной группой не отмечалось; встречались единичные нейроны с иммунопозитивным окрашиванием (степень 1) цитоплазмы перикарионов и кариоплазмы нейроцитов.

Кора полушарий мозжечка в контрольной группе животных содержала три слоя – молекулярный, представленный крупными и мелкими нейронами с округлой и полигональной формой перикарионов, округлым ядром с центрально расположенным ядрышком; зернистый слой, представленный мелкими нейронами с округлой формой перикарионов, слабо выраженной цитоплазмой и крупным округлым ядром; ганглионарный слой, представленный крупными сферической формы нейронами Пуркинье с большими округлыми ядрами и четким центрально расположенным ядрышком. При окраске по Ниссию в контрольной группе выявлялись нейроны с выраженной базофилией цитоплазмы во всех трех слоях, при этом удельное количество нейронов с темной базофильной цитоплазмой составило не более $10,2 \pm 2,3\%$ ($p < 0,05$) от общего количества нейроцитов в каждом из рассматриваемых слоев.

В группе с моделируемой магниевой недостаточностью (рис. 33-34) отмечалось увеличение количества нейронов с темной гиперхромной цитоплазмой, вакуолизированными ядрами с центрально расположенным или эктопированным ядрышком в молекулярном слое; удельное их количество составило 35-40% ($p < 0,05$). В большинстве нейронов зернистого слоя в периферических участках цитоплазмы перикарионов нейронов обнаруживались скопления гранулярного интенсивно базофильного материала. Ядра сохраняли везикулярный вид, наблюдалась эктопия ядрышка. В цитоплазме перикарионов отдельных нейроцитов наблюдались явления хроматолиза различной степени выраженности. При применении

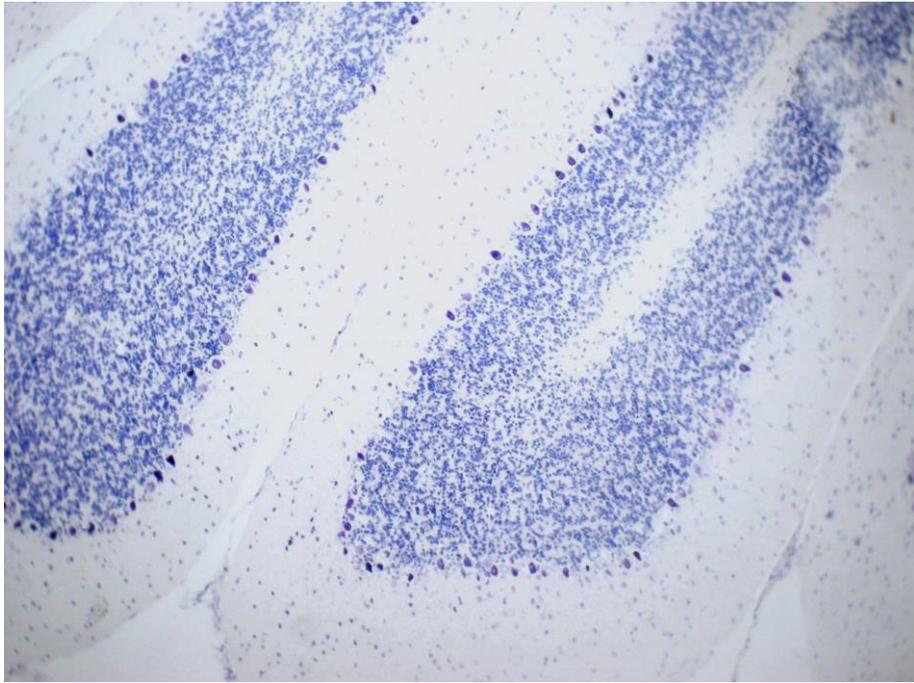


Рис. 33. Множество гиперхромных нейронов Пуркинье в коре полушарий мозжечка у животных с моделируемым дефицитом магния 8 недель. Окраска тионином по Нисслю. Ув. $\times 100$.

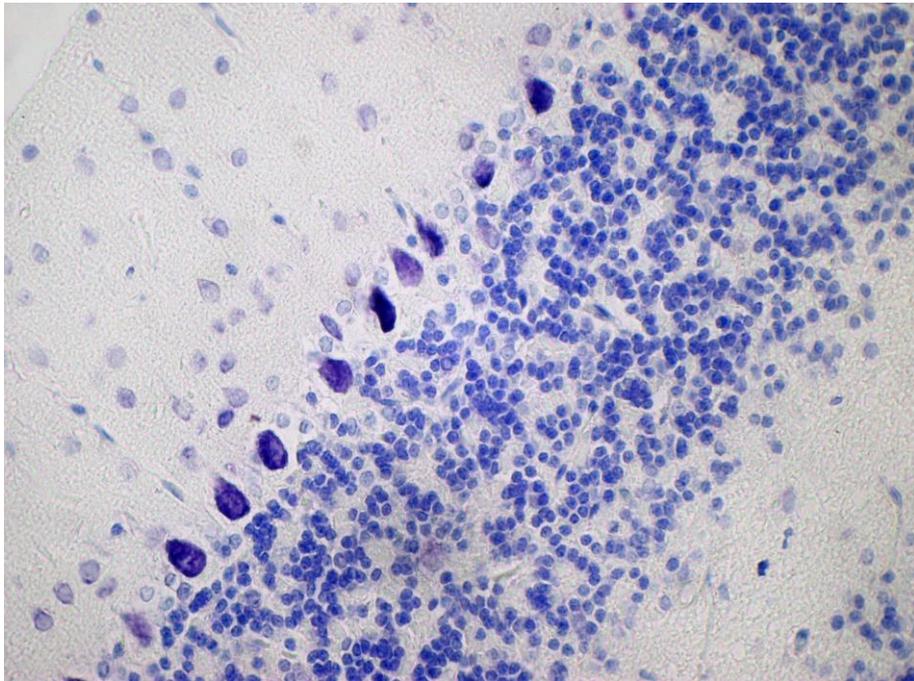


Рис. 34. Явления гиперхроматоза и хроматолиза в цитоплазме грушевидных нейронов коры полушарий мозжечка у животных с моделируемым дефицитом магния 12 недель. Окраска тионином по Нисслю. Ув. $\times 400$.

иммуногистохимического метода исследования с использованием антител к TRPM6 в контрольной группе (рис. 35, а) отмечалось равномерное диффузное накопление иммунореактивного материала в цитоплазме грушевидных и зернистых нейронов (степень 1).

При применении иммуногистохимического метода исследования с использованием антител к TRPM6 в опытной группе (рис. 35, б) отмечалось увеличение количества нейронов с усиленной (степень 2-3) цитоплазматической экспрессией этого белка среди нейронов преимущественно зернистого слоя, в то время как, среди нейронов Пуркинье присутствовали клетки с иммунонегативной реакцией (около 1/3), а в иммунопозитивных нейронах отмечалось более выраженное по сравнению с контролем накопление гранул иммунореактивного материала по периферии цитоплазмы перикарионов. При применении иммуногистохимического метода исследования с использованием антител к TRPM7 (рис. 35, в) в контрольной группе отмечалось умеренно выраженное диффузное накопление иммунореактивного материала в цитоплазме перикарионов нейронов зернистого и ганглионарного слоев, при этом нейроны молекулярного слоя были иммунонегативны. Ядра нейронов всех слоев иммунонегативны. В нейронах Пуркинье отмечалось формирование четкой перинуклеарной зоны просветления, а накопление иммунореактивного материала имело вид гранул и микровезикул, расположенных в непосредственной близости от плазматической мембраны перикарионов.

При иммуногистохимическом исследовании с использованием антител к TRPM7 (рис. 35, г) в опытной группе отмечалась выраженная экспрессия изучаемых антигенов в виде неравномерного глыбчатого накопления иммунореактивного материала в цитоплазме перикарионов и ядерных оболочках отдельных нейронов ганглионарного слоя. При этом в зернистом и молекулярном слоях преобладали иммунонегативные нейроны, создавая своеобразную мозаичную картину. Кроме того, в цитоплазме перикарионов грушевидных нейронов исчезало характерное для контрольной группы

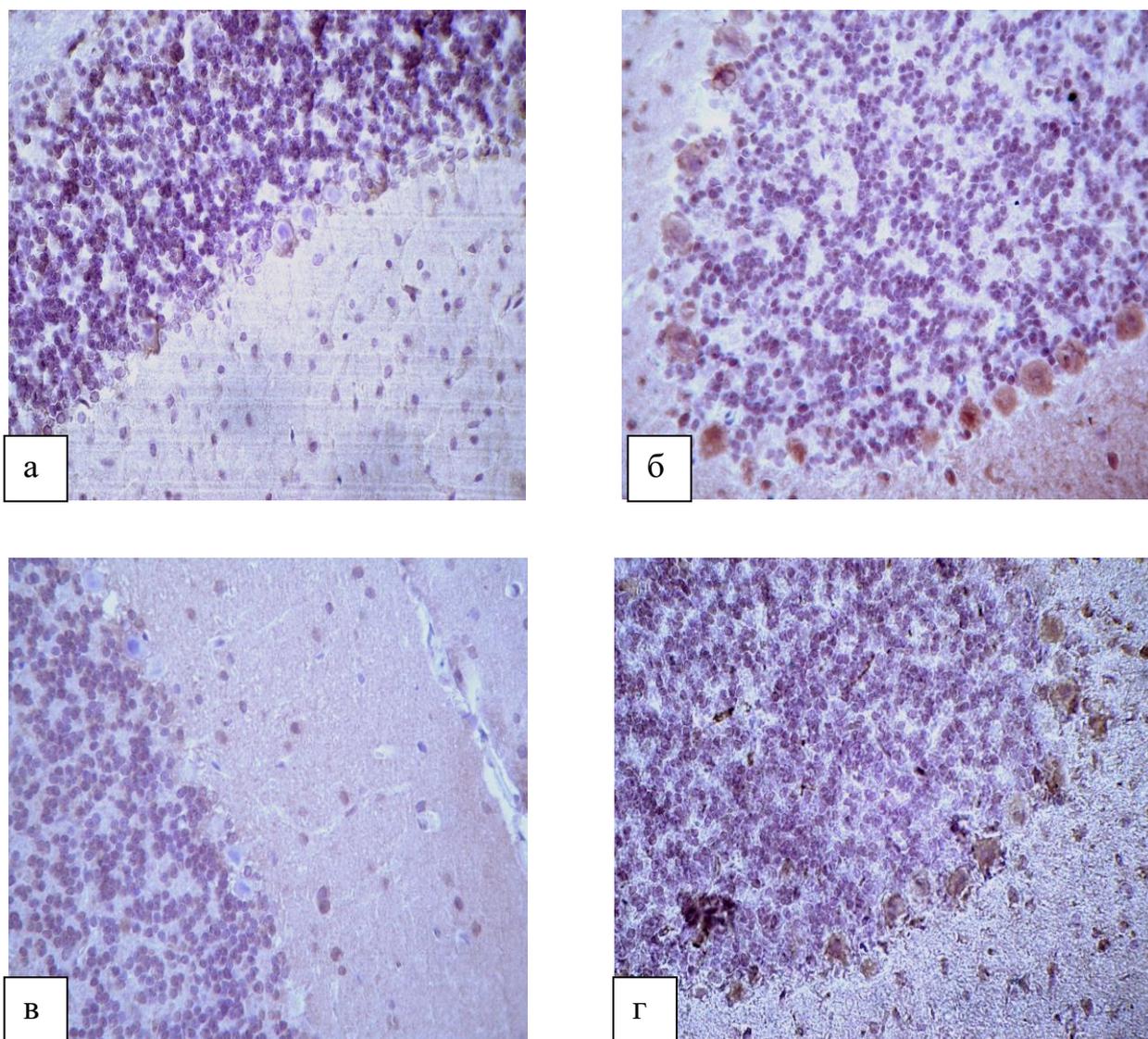


Рис. 35. Усиление экспрессии белков TRPM6 и TRPM7 в коре полушарий мозжечка при моделировании дефицита магния 8 недель. Контрольная группа – а, в; опытная – б, г. ПАП метод с использованием поликлональных антител к TRPM6 (а, б) и TRPM7 (в, г) в разведении 1:600. Ув. $\times 400$.

гранулярное мембранное накопление иммунопозитивного материала, появлялись иммунонегативные нейроны в удельном количестве 15-20% ($p < 0,05$).

При применении иммуногистохимического метода исследования с использованием антител к каспазе 3 достоверных отличий между контрольной и опытной группой не отмечалось; встречались единичные нейроны с иммунопозитивным окрашиванием (степень 1) цитоплазмы перикарионов и кариоплазмы нейроцитов. При применении

иммуногистохимического метода исследования у животных контрольной группы с использованием антител к e-NOS (рис. 36, а) отмечалось слабо выраженное диффузное накопление иммунопозитивного материала в цитоплазме перикарионов грушевидных нейронов и клеток зернистого слоя (степень 1).

При применении иммуногистохимического метода исследования у животных опытной группы с использованием антител к e-NOS (рис. 36, б) отмечалось преобладание иммунонегативных клеток Пуркинье, при этом среди нейронов зернистого слоя преобладали нейроны со умеренно выраженной иммунопозитивной реакцией в цитоплазме перикарионов (степень 1-2).

При применении иммуногистохимического метода исследования у животных контрольной группы с использованием антител к i-NOS (рис. 36, в) отмечалась иммунонегативная реакция со стороны нейронов всех слоев коры мозжечка (степень 0).

При применении иммуногистохимического метода исследования у животных опытной группы с использованием антител к i-NOS (рис. 36, г) отмечалось равномерное усиленное (степень 2) диффузное накопление иммунореактивного материала в цитоплазме перикарионов и отростков нейронов, кариоплазме грушевидных нейронов, в то время как среди нейронов зернистого слоя преобладали иммунонегативные клетки.

Таким образом, при исследовании грушевидных нейронов и нейронов зернистого слоя коры полушарий мозжечка в группе животных с моделируемым дефицитом магния отмечалось разнонаправленные изменения характера и степени выраженности экспрессии TRPM6, TRPM7, i-NOS, e-NOS. Результаты иммуногистохимического анализа соответствующих областей в изучаемых группах указывают на преобладание мозаичного характера распределения и неравномерную выраженность экспрессии иммунореактивного материала в цитоплазме перикарионов нейронов ганглионарного слоя (табл. 6).

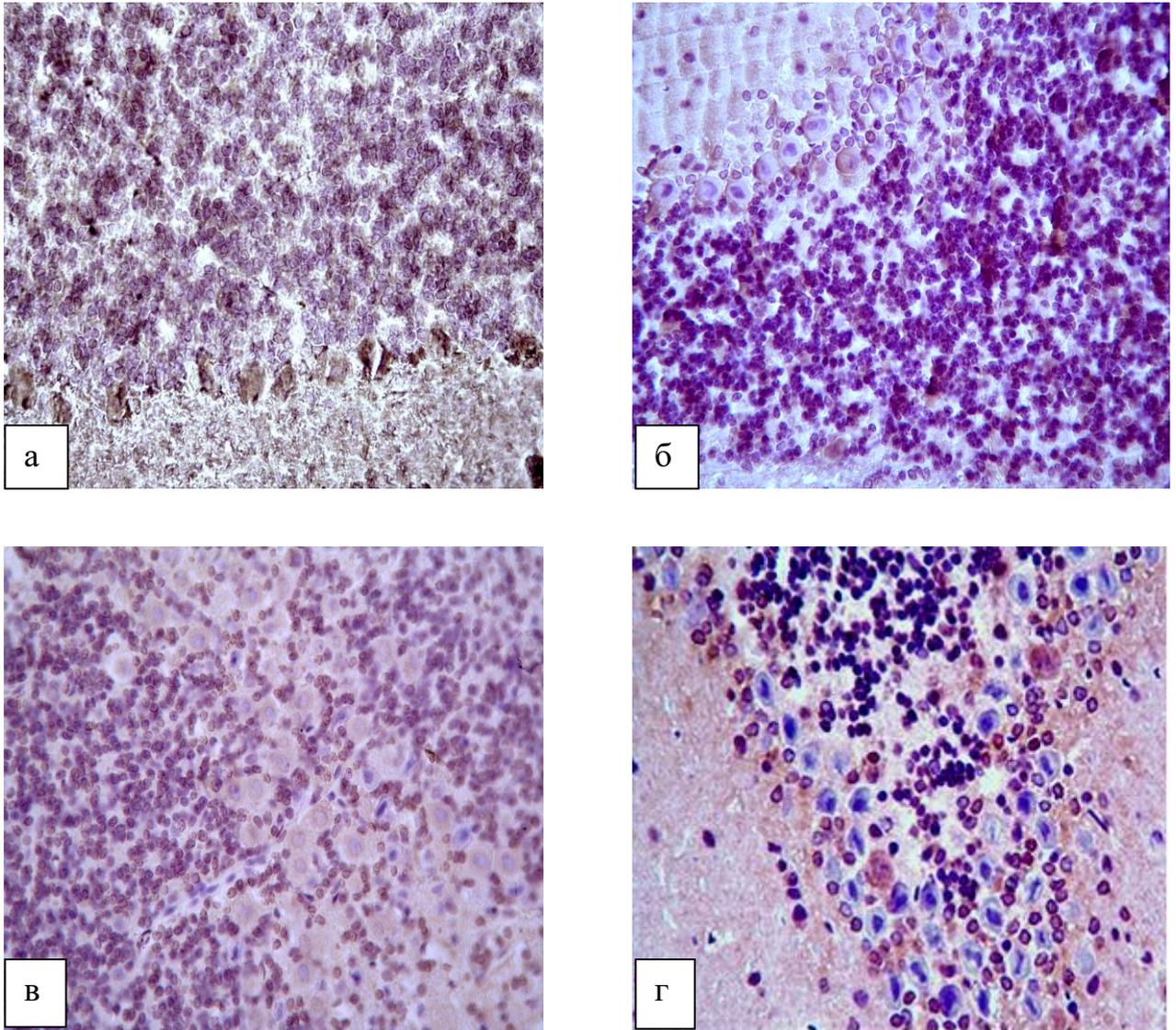


Рис. 36. Мозаичный характер экспрессии i-NOS и снижение экспрессии белка e-NOS в коре полушарий мозжечка при моделировании дефицита магния 8 недель. Контрольная группа – а, в; опытная – б, г. ПАП метод с использованием поликлональных антител к e-NOS (а, б) и i-NOS (в, г) в разведении 1:100. Ув. $\times 400$.

Таблица 6

Результаты иммуногистохимического исследования грушевидных нейронов коры мозжечка при дефиците магния ($Mo \pm \delta$)

| Маркеры | Группа 1 (контроль), баллы | Группа 2 (дефицит магния 8 недель), баллы | Группа 3 (дефицит магния 12 недель), баллы |
|---------|----------------------------|---|--|
| TRPM6 | 2±0,75 | 6±0,41* | 7±0,52** |
| TRPM7 | 3±0,41 | 6±0,82* | 7±0,41* |
| e-NOS | 6±0,82 | 3±0,74* | 3±0,82* |
| i-NOS | 2±0,82 | 5±1,21** | 7±0,75** |

3.5. Количественная характеристика различных отделов головного мозга животных при моделировании алиментарного дефицита магния.

При морфометрическом исследовании головного мозга наиболее выраженные изменения выявлены в моторной и соматосенсорной зонах лобной, теменной и височной коры полушарий большого мозга, супраоптических и паравентрикулярных ядрах гипоталамуса, нейронах СА1 и СА3 полей гиппокампа, грушевидных нейронах коры мозжечка.

При морфометрическом исследовании моторной и соматосенсорной коры полушарий большого мозга у животных с моделируемым в течение 8 недель дефицитом магния отмечалось увеличение средней площади перикарионов нейронов на 7,8% по сравнению с контролем (при $p < 0,05$), на 8,3% по сравнению с контролем (при $p < 0,05$) у животных с моделируемым в течение 12 недель дефицитом магния.

Таблица 7

Изменение морфометрических параметров нейронов коры полушарий большого мозга при дефиците магния ($M \pm m$)

| Морфометрические параметры | Группа 1 (контрольные животные) | Группа 2 (дефицит магния в течение 8 недель) | Группа 3 (дефицит магния в течение 12 недель) |
|--|---------------------------------|--|---|
| Средняя площадь перикарионов нейрона (S1), мкм^2 | 145,3 \pm 4,1 | 156,6 \pm 4,8* | 157,3 \pm 3,9* |
| Средняя площадь ядра нейрона (S3), мкм^2 | 61,5 \pm 3,7 | 63,1 \pm 4,2 | 64,2 \pm 5,1 |
| Средняя площадь цитоплазмы перикарионов нейрона (S2), мкм^2 | 83,7 \pm 3,6 | 93,5 \pm 4,9* | 93,1 \pm 4,4* |
| Ядерно-цитоплазматическое отношение, число | 0,42 \pm 0,04 | 0,41 \pm 0,02 | 0,40 \pm 0,02 |

Здесь и далее: *- $p < 0,05$, ** - $p < 0,001$ по сравнению с контролем (ANOVA, критерий Фишера); M – средняя величина, m – стандартная ошибка средней величины.

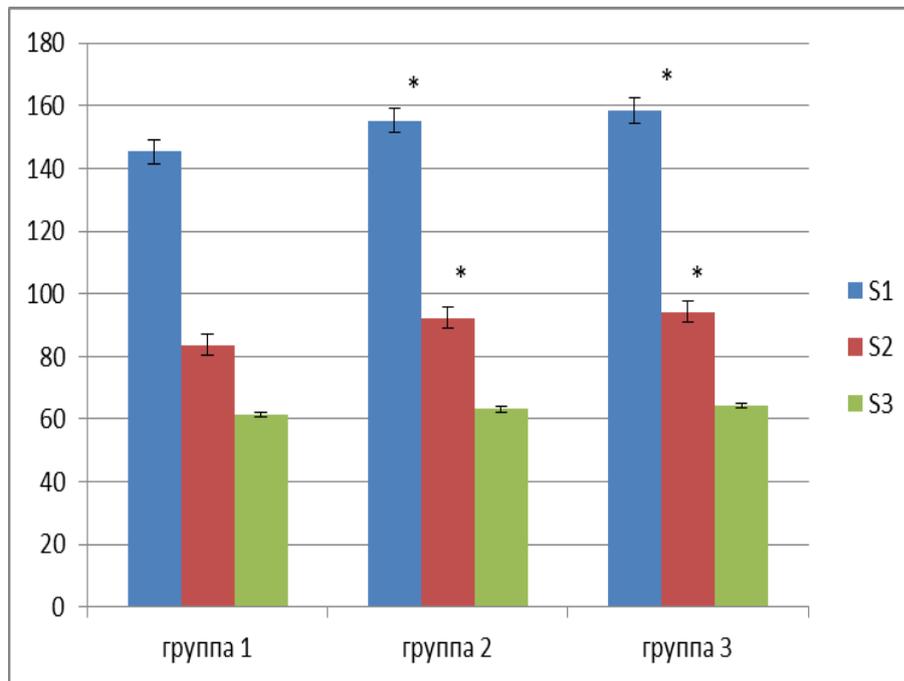


Рис. 37. Изменение морфометрических параметров нейронов V слоя коры большого мозга при дефиците магния.

Средняя площадь ядер нейронов, ядерно-цитоплазматическое отношение достоверно не изменялись по сравнению с контролем. Средняя площадь цитоплазмы перикарионов нейронов в группе 2 увеличивалась на 11,7% (при $p < 0,05$), в группе 3 – увеличивалась на 11,2% (при $p < 0,05$) (табл. 7, рис. 37).

При стереометрическом исследовании коры полушарий большого мозга отмечалось уменьшение удельной площади перикарионов нейронов на 12,8% (при $p < 0,05$) в группе 2 и на 16,8% (при $p < 0,05$) в группе 3 по сравнению с контрольной группой. Наблюдалось увеличение удельной площади нейропиля на 10,2% (при $p < 0,05$) в группе 2 и на 13,9% (при $p < 0,05$) в группе 3 по сравнению с контролем (табл. 8, рис. 38). Отмечалось прогрессивное увеличение удельного количества нейронов с «темной» цитоплазмой.

При морфометрическом исследовании гипоталамуса отмечалось уменьшение площади перикарионов крупных нейронов (с площадью цитоплазмы перикарионов более 120 мкм^2) паравентрикулярных ядер на 11,4% ($p < 0,05$) при 8-недельном дефиците магния и на 9,8% ($p < 0,05$) при 12-

недельном дефиците магния по сравнению с контрольной группой (табл. 9, рис. 39).

Таблица 8

Изменения стереометрических параметров коры полушарий большого мозга при дефиците магния ($M \pm m$)

| Стереометрические параметры | Группа 1 (контрольные животные) | Группа 2 (дефицит магния в течение 8 недель) | Группа 3 (дефицит магния в течение 12 недель) |
|--|------------------------------------|---|--|
| Удельная площадь перикарионов нейронов (Sr1), % | 45,2±2,8 | 39,7±2,5* | 37,6±3,3* |
| Удельная площадь нейропиля (Sr2), % | 54,6±3,1 | 60,2±3,5* | 62,2±3,7* |
| Sr1/ Sr2, число | 0,83±0,1 | 0,64±0,1* | 0,62±0,09* |
| Удельное количество нейронов с «темной» цитоплазмой (D), % | 8,4±1,3 | 15,6±1,9* | 17,9±2,1* |

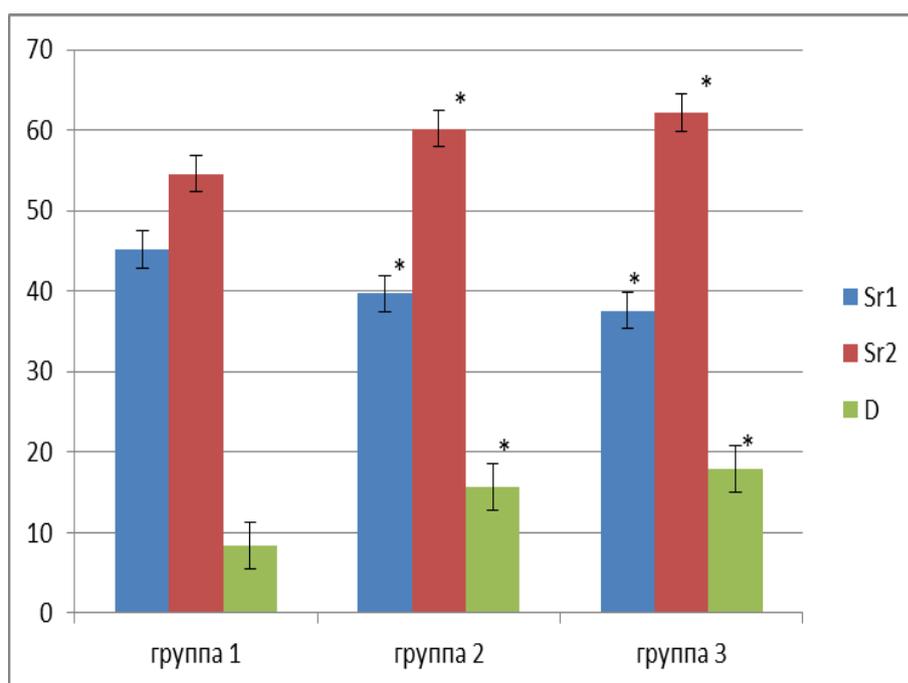


Рис. 38. Изменения стереометрических параметров нейронов моторной и соматосенсорной областей коры большого мозга при дефиците магния.

Средняя площадь ядер крупных нейросекреторных клеток паравентрикулярных ядер гипоталамуса в группе с моделируемым магниевым дефицитом незначительно увеличивалась (на 2,4% к 8 неделе эксперимента ($p < 0,01$)). Средняя площадь цитоплазмы перикарионов крупных нейросекреторных клеток паравентрикулярных ядер гипоталамуса в группе с моделируемым магниевым дефицитом уменьшалась на 14,8% ($p < 0,05$) при 8-недельном дефиците магния и на 17,1% ($p < 0,05$) при 12-недельном дефиците магния. Ядерно-цитоплазматическое отношение достоверно не изменялось.

В мелкоклеточной части паравентрикулярных ядер наблюдалось увеличение средней площади перикарионов нейронов у магниевых дефицитных крыс на 13,4% ($p < 0,05$) при 8-недельном дефиците магния и на 15,6% ($p < 0,05$) при 12-недельном дефиците магния по сравнению с контролем (табл. 9, рис. 40), при этом средняя площадь ядер мелких нейронов при дефиците магния увеличивалась на 4,3% (при $p < 0,01$). Средняя площадь цитоплазмы перикарионов мелких нейронов увеличивалась на 11,7% ($p < 0,05$) при 8-недельном дефиците магния и на 16,9% ($p < 0,05$) при 12-недельном дефиците магния.

При морфометрическом анализе (табл. 10, рис. 41) средняя площадь перикарионов нейронов супраоптического ядра в контрольной группе составила $189,4 \pm 3,2$ мкм², при моделировании дефицита магния 8 недель – $173,2 \pm 4,6$ мкм², т.е. уменьшалась на 8,6% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, при моделировании дефицита магния 12 недель – $176,4 \pm 5,1$ мкм², т.е. уменьшалась на 7,4% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем; при этом средняя площадь ядер нейронов достоверно не изменялась по сравнению с контролем. Средняя площадь цитоплазмы перикарионов мелких нейронов и ядерно-цитоплазматическое отношение достоверно изменялись к 12 неделе моделируемого дефицита магния.

При изучении стереометрических параметров крупноклеточных гипоталамических ядер удельное количество нейроцитов с «темной»

базофильной цитоплазмой прогрессивно увеличивалось к 12 неделе эксперимента (табл. 11, рис. 42). Также отмечалось прогрессивное увеличение удельной площади нейропиля к 12 неделе. Следовательно, в крупноклеточных ядрах гипоталамуса наблюдалась прогрессивная динамика в виде уменьшения средней площади перикарионов и цитоплазмы перикарионов крупных нейронов, увеличения площади

Таблица 9

Изменения некоторых морфометрических параметров паравентрикулярных ядер гипоталамуса крыс при алиментарном дефиците магния ($M \pm m$)

| Морфометрические параметры | Группа 1 (контрольные животные) | Группа 2 (дефицит магния 8 недель) | Группа 3 (дефицит магния 12 недель) |
|--|------------------------------------|---------------------------------------|--|
| Средняя площадь перикарионов крупных нейронов (S_{m1}), мкм ² | 201,1±3,2 | 178,2±6,6* | 181,3±8,5* |
| Средняя площадь перикарионов мелких нейронов (S_{s1}), мкм ² | 97,2±3,1 | 110,3±4,5* | 112,4±4,8* |
| Средняя площадь ядер крупных нейронов (S_{m2}), мкм ² | 93,1±5,8 | 86,5±4,1 | 91,8±5,2 |
| Средняя площадь ядер мелких нейронов (S_{s2}), мкм ² | 59,2±3,3 | 62,4±3,4 | 61,5±4,6 |
| Средняя площадь цитоплазмы крупных нейронов (S_{m3}), мкм ² | 107,9±4,1 | 91,9±5,2* | 89,4±6,9* |
| Средняя площадь цитоплазмы мелких нейронов (S_{s3}), мкм ² | 38,4±3,2 | 42,9±4,4* | 44,9±4,8* |
| Ядерно-цитоплазматическое отношение крупных нейронов, число | 0,86±0,08 | 0,91±0,09 | 0,99±0,1 |
| Ядерно-цитоплазматическое отношение мелких нейронов, число | 1,54±0,23 | 1,42±0,45* | 1,45±0,3* |

Таблица 10

Изменения некоторых морфометрических параметров супраоптических ядер гипоталамуса крыс при алиментарном дефиците магния ($M \pm m$)

| Морфометрические параметры | Группа 1 (контрольные животные) | Группа 2 (дефицит магния 8 недель) | Группа 3 (дефицит магния 12 недель) |
|---|------------------------------------|---------------------------------------|--|
| Средняя площадь перикарионов нейронов ($So1$), мкм^2 | 189,4 \pm 3,2 | 173,2 \pm 4,6 | 176,4 \pm 5,1* |
| Средняя площадь ядер нейронов ($So2$), мкм^2 | 87,2 \pm 4,8 | 86,4 \pm 4,2 | 87,9 \pm 3,9 |
| Средняя площадь цитоплазмы нейронов ($So3$), мкм^2 | 102,2 \pm 4,1 | 87,0 \pm 4,3 | 89,1 \pm 4,5* |
| Ядерно-цитоплазматическое отношение, число | 0,86 \pm 0,04 | 0,91 \pm 0,09 | 0,98 \pm 0,05* |

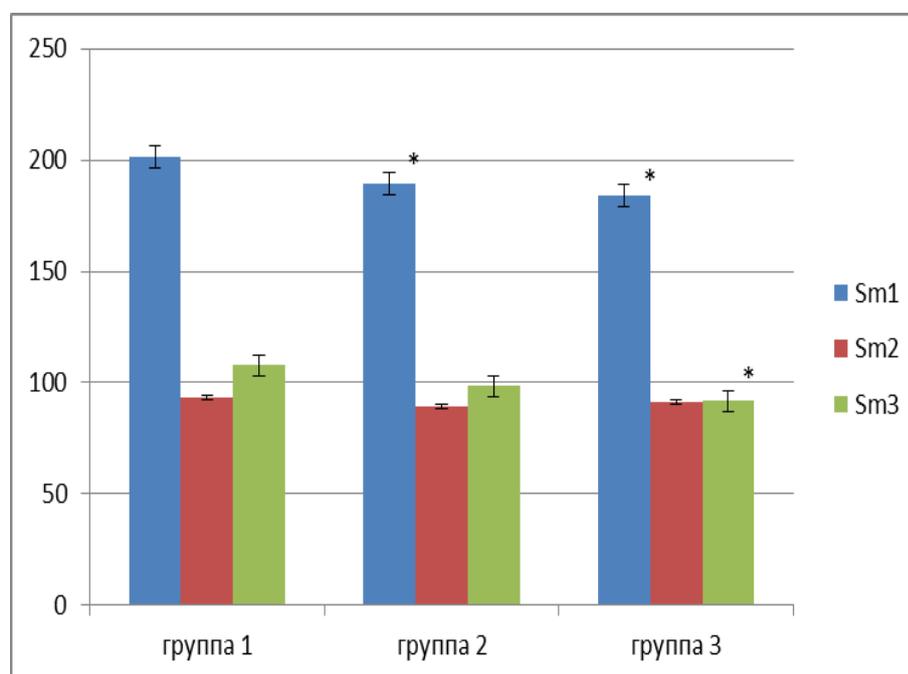


Рис. 39. Изменение морфометрических параметров крупных нейронов паравентрикулярных ядер гипоталамуса при дефиците магния

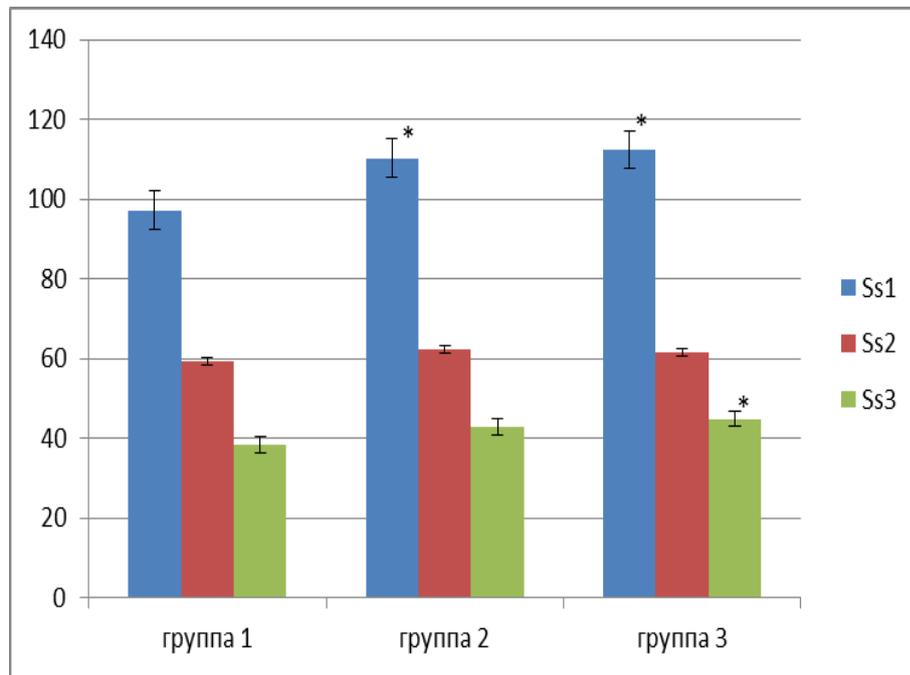


Рис. 40. Изменение морфометрических параметров мелких нейронов паравентрикулярных ядер гипоталамуса при дефиците магния

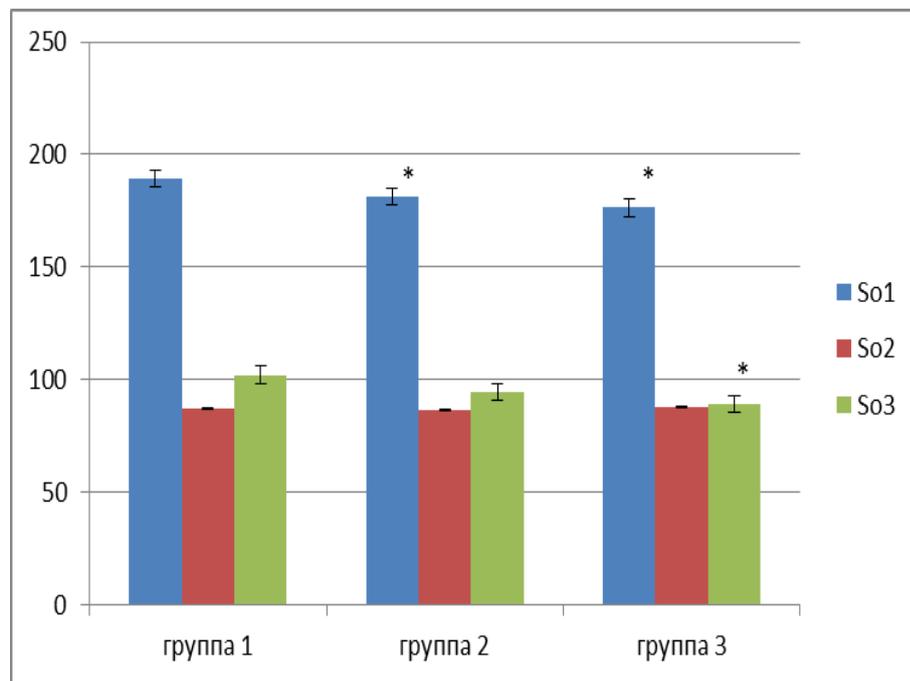


Рис. 41. Изменение морфометрических параметров нейронов супраоптических ядер гипоталамуса при дефиците магния

Изменения стереометрических параметров нейронов гипоталамуса при дефиците магния ($M \pm m$)

| Стереометрические параметры | Группа 1 (контрольные животные) | Группа 2 (дефицит магния в течение 8 недель) | Группа 3 (дефицит магния в течение 12 недель) |
|---|------------------------------------|---|--|
| Удельная площадь перикарионов нейронов (Srhl), % | 31,4 \pm 1,9 | 27,3 \pm 2,4 | 24,8 \pm 2,5* |
| Удельная площадь нейропиля (Srhl2), % | 67,5 \pm 2,1 | 72,7 \pm 2,3* | 75,1 \pm 2,5* |
| Srhl1/Srhl2, число | 0,46 \pm 0,08 | 0,38 \pm 0,09 | 0,33 \pm 0,07 |
| Удельное количество нейронов с «темной» цитоплазмой (Dh), % | 9,8 \pm 1,5 | 18,3 \pm 2,1** | 19,6 \pm 3,8** |

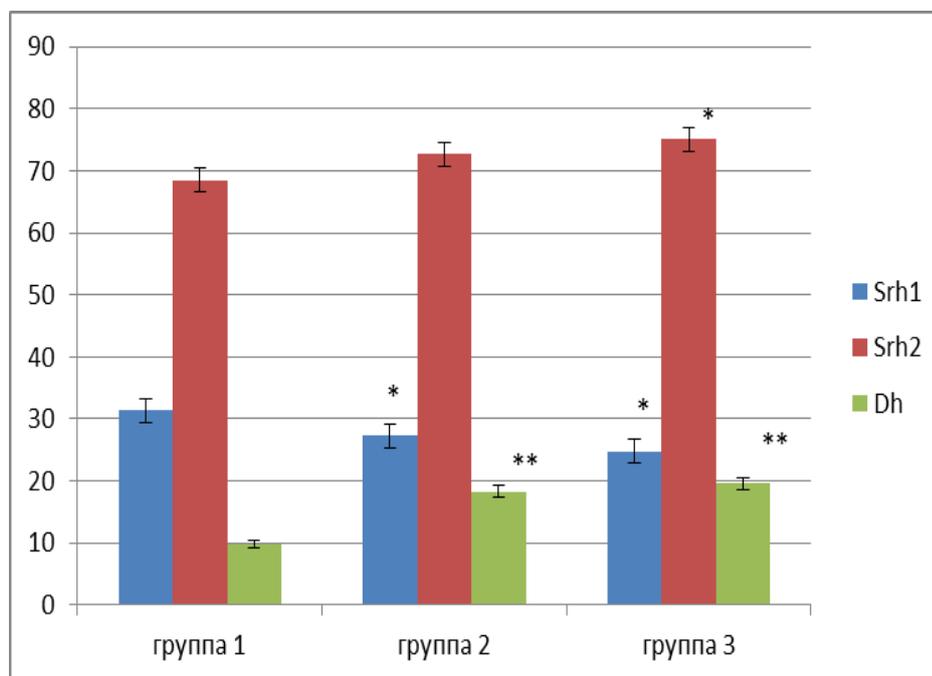


Рис. 42. Изменения стереометрических параметров нейронов гипоталамуса при дефиците магния

перикарионов и цитоплазмы перикарионов мелких нейронов, увеличения количества нейрцитов с «темной» базофильной цитоплазмой.

При морфометрическом исследовании гиппокампа выявлено, что средняя площадь перикарионов пирамидных нейронов полей CA1 и CA3 составила в опытной группе 2 – $108,3 \pm 5,7$ мкм², что на 16% ($p < 0,001$) меньше, чем в контрольной группе. Аналогичное уменьшение в группе 3 составило 21,4% ($p < 0,001$) (табл. 12, рис. 43-44). Средняя площадь цитоплазмы перикарионов пирамидных нейронов CA1 и CA3 полей гиппокампа прогрессивно уменьшалась в динамике эксперимента. Удельная площадь перикарионов пирамидных нейронов полей CA1 и CA3 гиппокампа в опытной группе также уменьшилась на 16,2% ($p < 0,05$) и на 24,2% ($p < 0,05$) соответственно (табл. 13, рис. 45-46).

Таблица 12

Изменения некоторых морфометрических параметров гиппокампа при дефиците магния

| Параметры | Пирамидные нейроны CA1 и CA3 полей гиппокампа | | |
|---|---|---------------------------------------|---|
| | Группа 1 (контроль) | Группа 2 (дефицит магния 8 недель) | Группа 3 (дефицит магния 12 недель) |
| Средняя площадь перикарионов нейронов (Sa1), мкм ² | 129±4,8 | 108,3±5,7** | 101,3±4,9** |
| Средняя площадь ядер нейронов (Sa2), мкм ² | 80,2±6,4 | 77,3±5,5 | 73,2±4,7 |
| Средняя площадь цитоплазмы перикарионов нейронов (Sa3), мкм ² | 49,3±3,3 | 39,1±2,3* | 38,2±3,5* |
| Ядерно- цитоплазматиче ское отношение, число | 1,64±2,9 | 1,72±3,4* | 1,53±3,8* |

Изменение стереометрических параметров гиппокампа при дефиците магния (M±m)

| Параметры | CA1 и CA3 поля гиппокампа | | |
|---|---------------------------|---------------------------------------|--|
| | Группа 1 (контроль) | Группа 2 (дефицит магния 8 недель) | Группа 3 (дефицит магния 12 недель) |
| Удельная площадь перикарионов нейронов (Sa1), % | 46,3±4,1 | 38,7±3,1* | 35,1±3,6* |
| Удельная площадь нейропилия (Sa2), % | 53,7±2,9 | 61,2±3,0* | 64,9±3,1* |
| Sa1/ Sa2, число | 0,86±0,07 | 0,64±0,08* | 0,54±0,09** |
| Удельное количество нейронов с «темной» цитоплазмой (Da), % | 8,5±1,3 | 16,3±2,4** | 15,9±2,2** |

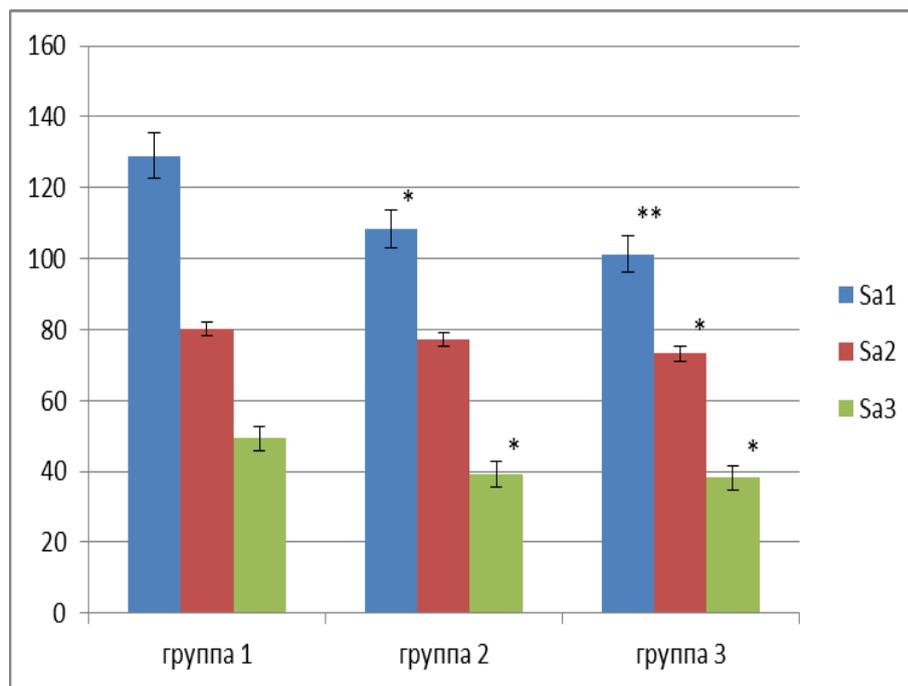


Рис. 43. Изменение морфометрических параметров нейронов гиппокампа при дефиците магния

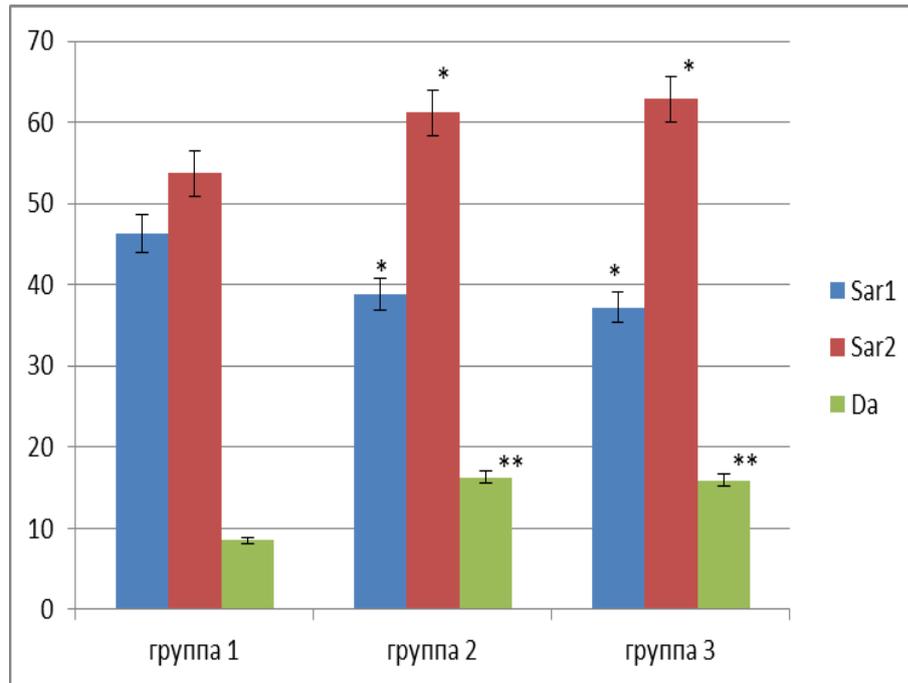


Рис. 46. Изменение стереометрических параметров гиппокампа при дефиците магния

В условиях моделируемого алиментарного дефицита магния отмечалось прогрессивное увеличение количества гиперхромных нейронов в гиппокампе (табл. 13).

В грушевидных нейронах коры мозжечка наблюдалось увеличение средней площади перикарионов нейронов — на 7,5% ($p < 0,05$) при 8 недельном дефиците магния, в случае 12-недельного дефицита магния — на 7,9% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (табл. 14, рис. 47). Отмечается увеличение средней площади цитоплазмы перикарионов нейронов у животных опытной группы — на 17,3% ($p < 0,05$) при сроке дефицита магния 8 недель и на 18,6% ($p < 0,05$) при сроке дефицита магния 12 недель по сравнению с контролем. Средняя площадь ядер грушевидных нейронов коры мозжечка при дефиците магния достоверно не изменяется. При исследовании коры мозжечка, ретикулярной формации ствола головного мозга в группах 2 и 3 с моделируемой магниевой недостаточностью отмечалось увеличение удельного количества нейронов с темной гиперхромной цитоплазмой,

вакуолизированными ядрами по сравнению с контролем; удельное их количество составило 23,2% ($p < 0,05$) в группе 2 и 28,4% ($p < 0,05$) в группе 3.

Таблица 14

Изменение некоторых морфометрических параметров грушевидных нейронов коры мозжечка при алиментарном дефиците магния ($M \pm m$)

| Показатель | Группа 1 (контроль) | Группа 2 (дефицит магния 8 недель) | Группа 3 (дефицит магния 12 недель) |
|---|------------------------|--|---|
| Средняя площадь перикарионов нейронов (Sp1), $\mu\text{м}^2$ | 202,6 \pm 4,2 | 217,5 \pm 3,26* | 218,2 \pm 4,14* |
| Средняя площадь ядра нейрона (Sp2), $\mu\text{м}^2$ | 109,2 \pm 5,08 | 108,4 \pm 4,11 | 108,6 \pm 3,15 |
| Средняя площадь цитоплазмы перикарионов нейронов (Sp3), $\mu\text{м}^2$ | 93,4 \pm 5,12 | 109,7 \pm 4,39* | 110,8 \pm 4,12* |
| Ядерно-цитоплазматическое отношение, число | 1,17 \pm 0,13 | 0,98 \pm 0,2 | 0,99 \pm 0,18 |

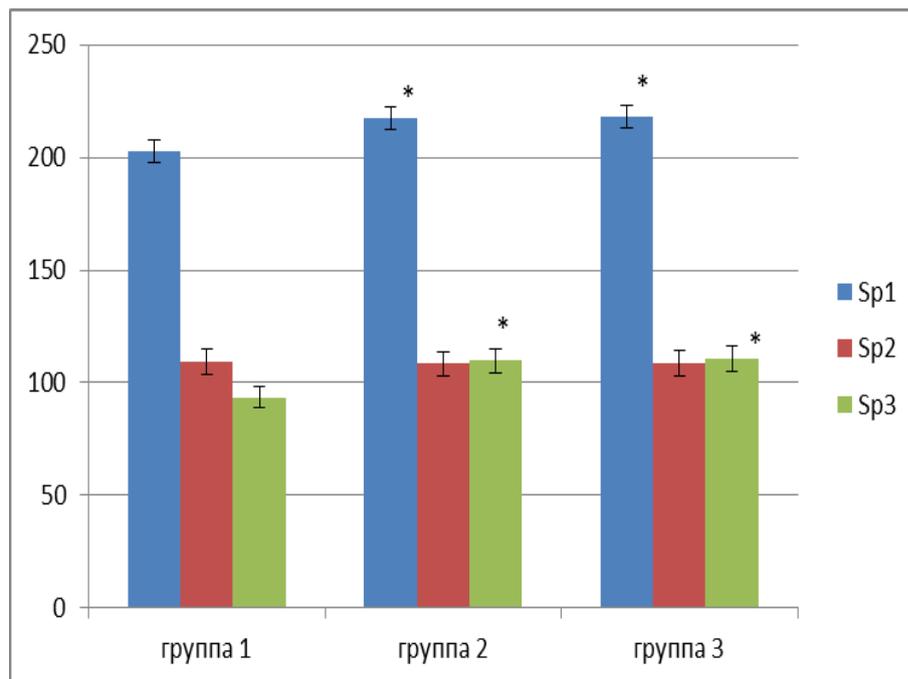


Рис. 47. Изменение морфометрических параметров грушевидных нейронов коры мозжечка при дефиците магния

Результаты регрессионного анализа динамики морфометрических параметров головного мозга и концентрации ионов магния в эритроцитах и плазме крови экспериментальных животных при моделировании алиментарного дефицита магния представлены в таблице 15. Из таблицы видно, что уменьшение площади цитоплазмы перикарионов крупных нейросекреторных клеток супраоптического и паравентрикулярного ядер гипоталамуса прямо и достоверно ($p < 0,05$) коррелирует ($r = 0,99$ и $r = 0,98$ соответственно) с уменьшением площади цитоплазмы перикарионов пирамидных нейронов СА1 и СА3 полей гиппокампа, что свидетельствует о динамическом прогрессировании процессов атрофического характера в функционально взаимосвязанных отделах головного мозга в условиях моделируемого алиментарного дефицита магния. Прогрессивное увеличение площади цитоплазмы перикарионов нейронов мелкоклеточной части паравентрикулярных ядер гипоталамуса обратно и достоверно ($p < 0,05$) коррелирует ($r = -0,99$ при $p < 0,05$) со снижением площади цитоплазмы перикарионов нейронов крупноклеточной части этого ядра, что в сочетании с признаками внутриклеточного отека и вакуолизации по данным светооптического и ультраструктурного исследований свидетельствует о преобладании процессов атрофического и альтеративного характера в нейронах крупноклеточных частей паравентрикулярных ядер гипоталамуса при дефиците магния, с прогрессивной динамикой к 12 неделе эксперимента.

Таблица 15

Результаты регрессионного анализа морфометрических параметров головного мозга и содержания ионов магния в плазме и эритроцитах при моделировании алиментарного дефицита магния^{*)}

| | Mg1 | Mg2 | S1 | S2 | D | Sr1 | Sr2 | Sm3 | Ss1 | Ss3 | So1 | So3 | Srh1 | Srh2 | Dh | Sa1 | Sa3 | Sar1 | Sar2 | Da | Sp1 | Sp3 |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|-------|--------------|-------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Mg1 | | 0,99 | | | | | | | -0,97 | | | | | | -0,99 | | 0,98 | | | | -0,98 | -1,0 |
| Mg2 | 0,99 | | | | | | | | | | | | | | | | 0,98 | | | -0,99 | -0,98 | -0,99 |
| S1 | | | | 0,99 | 1,0 | -0,99 | 0,99 | -0,99 | | 0,98 | | | | | | -0,99 | -0,99 | -0,99 | 0,98 | | | |
| S2 | | | 0,99 | | 0,99 | | 0,96 | | 0,98 | | | | | | 0,99 | -0,98 | -0,99 | 0,99 | 0,96 | | | |
| D | | | 1,0 | 0,99 | | -0,99 | 0,99 | -0,98 | | 0,99 | | | | | | -0,99 | 0,91 | -0,97 | 0,99 | | | |
| Sr1 | | | -0,99 | | -0,99 | | -0,99 | 0,99 | | -0,99 | | | | -0,99 | | 0,96 | -0,99 | | | | | |
| Sr2 | | | 0,99 | 0,96 | 0,99 | -0,99 | | -0,98 | | 0,99 | | | | 0,99 | | -0,97 | 0,99 | | | | | |
| Sm3 | | | -0,99 | | -0,98 | 0,99 | -0,98 | | | -0,99 | | | | -0,98 | | 0,99 | 0,98 | | | | | |
| Ss1 | -0,97 | | | 0,98 | | | | | | 0,99 | | | | | 0,99 | | -0,99 | -0,96 | 0,99 | | | 0,97 |
| Ss3 | | | 0,98 | | 0,99 | -0,99 | 0,99 | -0,99 | 0,99 | | -0,99 | | | 0,99 | | -0,99 | 0,97 | | | | | |
| So1 | | | | | | | | | | -0,99 | | 0,99 | 0,99 | -0,99 | | | 0,96 | | | | -0,93 | |
| So3 | | | | | | | | | | | 0,99 | | 0,99 | | | | 0,99 | | | | -0,94 | |
| Srh1 | | | | | | | | | | | 0,99 | 0,99 | | -0,99 | | | -0,99 | | | | | |
| Srh2 | | | | | | -0,99 | 0,99 | -0,98 | | 0,99 | -0,99 | | | -0,99 | | -0,99 | -0,99 | | | | | |
| Dh | -0,99 | | | | | | | | 0,99 | | | | | | | | -0,99 | -0,99 | 0,99 | | | 0,97 |
| Sa1 | | | -0,99 | -0,98 | -0,99 | 0,96 | -0,97 | 0,99 | | -0,99 | | | | -0,99 | | | 0,99 | | -0,99 | | -0,99 | |
| Sa3 | 0,98 | 0,98 | -0,99 | -0,99 | 0,91 | -0,99 | 0,99 | 0,98 | -0,99 | -0,97 | 0,96 | 0,99 | -0,99 | -0,99 | 0,99 | 0,99 | | | | | -0,99 | -0,99 |
| Sar1 | | | -0,99 | 0,99 | -0,97 | | | | -0,96 | | | | | | | | | | -0,99 | | | |
| Sar2 | | | 0,98 | 0,96 | 0,99 | | | | 0,99 | | | | | | | -0,99 | | -0,99 | | | | |
| Sp1 | -0,98 | -0,98 | | | | | | | | | -0,93 | -0,94 | | | | -0,99 | -0,99 | | | 0,99 | | |
| Da | | -0,99 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0,99 | |
| Sp3 | -1,0 | -0,99 | | | | | | | 0,97 | | | | | | 0,97 | | -0,99 | | | | | |

*) В таблице указаны значения коэффициентов корреляции (r) Пирсона и (R) Спирмена для случаев параметрического и непараметрического распределения соответственно; достоверные значения коэффициентов корреляции (p<0,05) выделены жирным шрифтом. Обозначения к таблице см. на следующей странице.

Обозначения к таблице 15: Mg1 – концентрация ионов магния в плазме крови; Mg2 – концентрация ионов магния в эритроцитах; S1 – средняя площадь перикарионов нейронов коры полушарий большого мозга; S2 – средняя площадь цитоплазмы перикарионов нейронов коры полушарий большого мозга; D – удельное количество нейронов с «темной» цитоплазмой в коре полушарий большого мозга; Sr1 – удельная площадь перикарионов нейронов коры полушарий большого мозга; Sr2 – удельная площадь нейропиля коры полушарий большого мозга; Sm3 – средняя площадь цитоплазмы перикарионов крупных нейронов ПВЯ; Ss1 – средняя площадь перикарионов мелких нейронов ПВЯ; Ss3 – средняя площадь цитоплазмы перикарионов мелких нейронов ПВЯ; So1 – средняя площадь перикарионов нейронов СОЯ; So3 – средняя площадь цитоплазмы перикарионов нейронов СОЯ; Srh1 – удельная площадь перикарионов нейронов крупноклеточных ядер гипоталамуса; Srh2 – удельная площадь нейропиля крупноклеточных ядер гипоталамуса; Dh – удельное количество нейронов с «темной» цитоплазмой в крупноклеточных ядрах гипоталамуса; Sa1 – средняя площадь перикарионов пирамидных нейронов CA1 и CA3 полей гиппокампа; Sa3 – средняя площадь цитоплазмы перикарионов пирамидных нейронов CA1 и CA3 полей гиппокампа; Sar1 – удельная площадь перикарионов нейронов пирамидного слоя CA1 и CA3 полей гиппокампа; Sar2 – удельная площадь нейропиля CA1 и CA3 полей гиппокампа; Da – удельное количество пирамидных нейронов с «темной» цитоплазмой в CA1 и CA3 полях гиппокампа; Sp1 – средняя площадь перикарионов грушевидных нейронов коры мозжечка; Sp3 – средняя площадь цитоплазмы перикарионов грушевидных нейронов коры мозжечка.

3.6. Особенности структурных изменений головного мозга при пероральной коррекции дефицита магния.

При исследовании структурных изменений головного мозга в условиях пероральной коррекции алиментарного дефицита магния с использованием солей магния хлорида, магния L-аспарагината, магния таурината и магния сульфата установлены некоторые особенности. При исследовании коры полушарий большого мозга, крупноклеточных ядер гипоталамуса и гиппокампа изменения в виде мозаичного гиперхроматоза и очагового хроматолиза цитоплазмы перикарионов и отростков нейронов при окраске тионином по Нисслю наблюдались как в условиях моделируемого дефицита магния, так и при его алиментарной коррекции указанными солями (рис. 48).

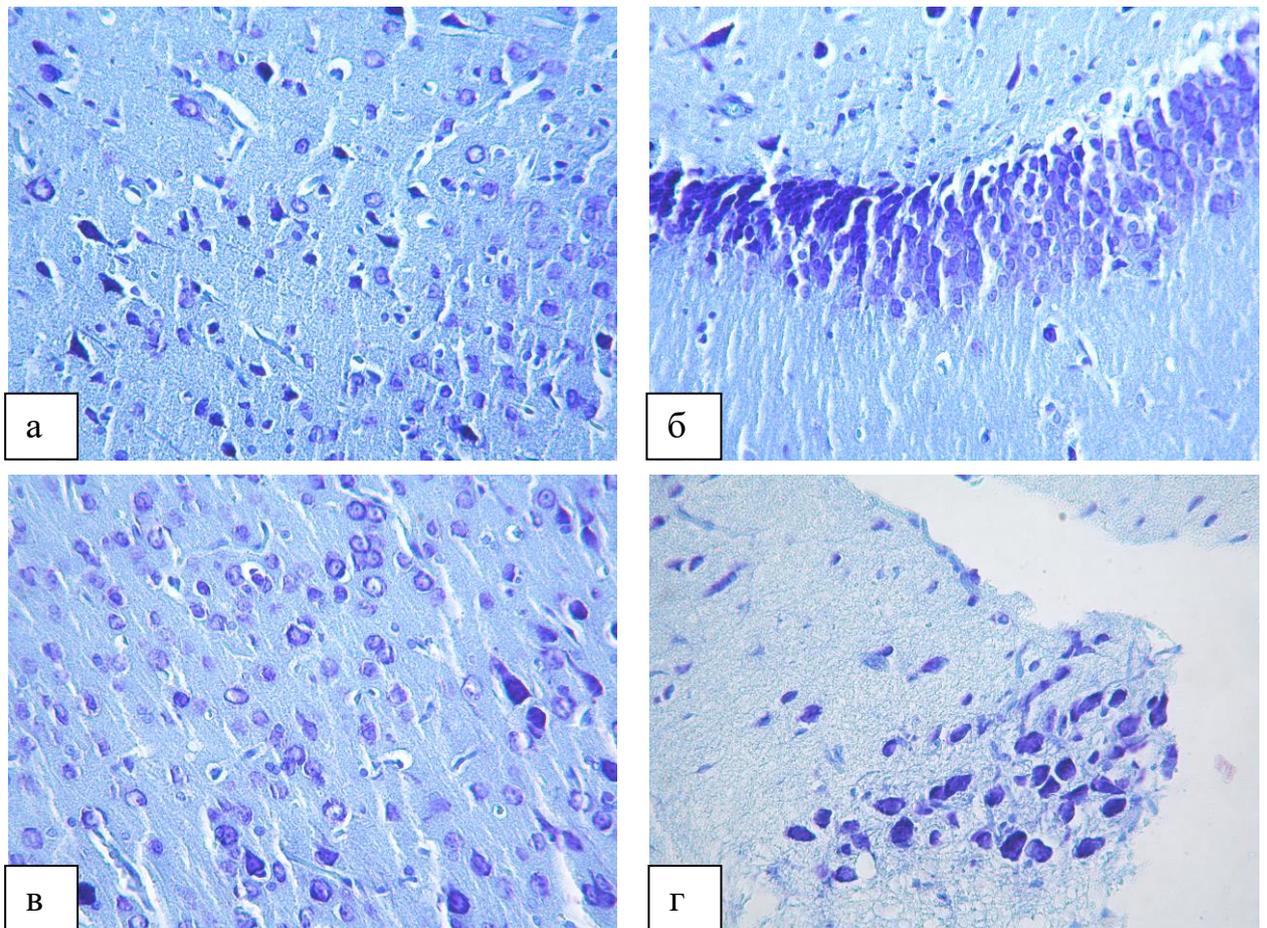


Рис.48. Структурные особенности некоторых отделов головного мозга при пищевой коррекции дефицита магния: а) моторные отделы коры полушарий большого мозга, коррекция магния таурином; б) СА1 поле гиппокампа, коррекция магния хлоридом; в) моторные отделы коры полушарий большого мозга, коррекция магния L-аспарагинатом; г) супраоптическое ядро гипоталамуса, коррекция магния сульфатом.

Удельное количество нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы в коре полушарий большого мозга в контрольной группе составило $8,4 \pm 1,3\%$, при моделировании дефицита магния 8 недель – $15,6 \pm 1,9\%$, при моделировании дефицита магния 12 недель – $17,9 \pm 2,1\%$; в условиях коррекции 8-недельного дефицита магния с использованием магния хлорида – $15,7 \pm 4,5\%$, при коррекции 8-недельного дефицита магния с использованием магния L-аспарагината – $14,4 \pm 4,1\%$; при коррекции 8-недельного дефицита магния с использованием магния сульфатом – $15,2 \pm 6,1\%$, при коррекции 8-недельного дефицита магния с использованием магния таурином – $11,4 \pm 3,8\%$. Таким образом, удельное количество гиперхромных нейронов в коре полушарий

большого мозга в условиях алиментарной коррекции дефицита магния можно представить как: магния хлорид > магния сульфат > магния L-аспарагинат > магния тауринат.

Удельное количество нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы в крупноклеточных ядрах гипоталамуса в контрольной группе составило $8,4 \pm 1,3\%$, при моделировании дефицита магния 8 недель – $18,3 \pm 2,1\%$ ($p < 0,001$), при моделировании дефицита магния 12 недель – $19,6 \pm 3,8\%$ ($p < 0,001$); в условиях коррекции 8-недельного дефицита магния с использованием магния хлорида – $17,6 \pm 5,3\%$ ($p < 0,001$), при коррекции 8-недельного дефицита магния с использованием магния L-аспарагината – $16,4 \pm 5,1\%$; при коррекции 8-недельного дефицита магния с использованием магния сульфата – $18,3 \pm 5,8\%$; при коррекции 8-недельного дефицита магния с использованием магния таурината – $18,7 \pm 4,7\%$. Таким образом, удельное количество гиперхромных нейронов в крупноклеточных ядрах гипоталамуса в условиях алиментарной коррекции дефицита магния можно представить как: магния тауринат > магния хлорид > магния сульфат > магния L-аспарагинат.

Удельное количество нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы в гиппокампе (поля CA1 и CA3) в контрольной группе составило $8,5 \pm 1,3\%$, при моделировании дефицита магния 8 недель – $16,3 \pm 2,4\%$ ($p < 0,001$), при моделировании дефицита магния 12 недель – $15,9 \pm 2,2\%$ ($p < 0,001$); в условиях коррекции 8-недельного дефицита магния с использованием магния хлорида – $16,6 \pm 6,4\%$ ($p < 0,001$), при коррекции 8-недельного дефицита магния с использованием магния L-аспарагината – $16,4 \pm 7,1\%$; при коррекции 8-недельного дефицита магния с использованием магния сульфата – $15,9 \pm 6,8\%$; при коррекции 8-недельного дефицита магния с использованием магния таурината – $15,4 \pm 7,7\%$. Таким образом, удельное количество гиперхромных нейронов в гиппокампе (поля CA1 и CA3) в условиях алиментарной коррекции дефицита магния можно представить как: магния хлорид > магния L-аспарагинат > магния сульфат > магния тауринат.

Таким образом, влияние различных солей магния на структурные изменения головного мозга при алиментарной коррекции различается и требует более детального изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время накоплено немало данных о структурно-функциональных преобразованиях различных органов и тканей при дефиците магния [Паньшин Н.Г., 2011; Ebel H., Juttner T., 1998; Bobkowski W., Nowak A., Durlach J., 2005; Maier J.A., 2007]. Известно, что магниевая недостаточность в центральной нервной системе приводит к возникновению депрессивно-подобных и потенцированию лекарственных экстрапирамидных нарушений, судорожным и эпилептиформным расстройствам, отражая функциональные нарушения в промежуточном мозгу, лимбической системе и отделах головного мозга, контролирующих стереотипные и произвольные моторные реакции [Иежица И.Н. и др., 2007; Sartori S.B. et al., 2012; Torimitsu K. et al., 2012]. Дефицит магния приводит к достоверному снижению горизонтальной, вертикальной и поисковой активности в тесте «открытое поле», уменьшению числа посещений и времени пребывания в открытых рукавах крестообразного лабиринта, увеличению времени пассивного плавания в тесте Порсольта [Спасов А.А., Иежица И.Н., Зиновьева В.Н., 2007; Харитоновна М.В., 2008]. Singewald N. с соавт., [2004], на модели дефицита магния у мышей выявили увеличение периода иммобилизации в тесте вынужденного плавания, что отражает степень выраженности депрессии у животных с моделируемым дефицитом магния. Указанные поведенческие расстройства рассматриваются как следствие процессов повреждения нейронов, участвующих в метаболизме различных нейромедиаторов (катехоламинов, серотонина, ацетилхолина) [Харитоновна М.В., 2008; el-Beheiry H., Puil E., 1990; Ladner C.J., Lee J.M., 1999]. Известно, что при снижении уровня внеклеточного магния усиливается активация NMDA-рецепторов [Mayer M.L. et al., 1984], что ведет к повышению возбудимости нейронов в области гиппокампа и голубого пятна [Grunze H., Walden J., 1997]. NMDA-опосредованная гиперактивность, как полагают Shiekhattar R. и Aston-Jones G., [1992], является одной из важных составляющих патогенеза депрессий. Дефицит магния, влияя на

баланс моноаминов в головном мозге, таких, как катехоламины и серотонин [Kantak К.М., 1988], способствует нарушению механизмов нейротрансмиссии, создавая условия для манифестации болезни Паркинсона, при которой с помощью иммуногистохимического метода исследования в черной субстанции показано уменьшение количества и размеров дофаминергических нейронов [Hashimoto T. et al., 2008]. McCoy M.A. с соавт., [2000], сообщают, что при дефиците магния наблюдается изменение содержания 3,4-дигидроксифенилаланина и дигидроксифенилаланиновой кислоты в полосатом теле и дофамина в коре и мозжечке. Учитывая разнообразные данные, согласно которым снижение уровня магния изменяет чувствительность к действию фенамина и других катехоламинов [Харитонов М.В., 2008; Holl J.E. et al., 1978], серотонина [Bac P. et al., 1994], норадреналина [Amyard N. et al., 1995], дофамина [Chutkow J.G., 1979], можно предположить, что структурные изменения в головном мозгу при дефиците магния прежде всего заключаются в изменениях нейронов, участвующих в обмене названных медиаторов. Кроме того, обнаруженные нами изменения нейронов ретикулярных гигантоклеточных ядер при моделировании дефицита магния могут свидетельствовать о функциональных преобразованиях мотосенсорных релейных связей ретикулярной формации с другими отделами головного мозга (в первую очередь, с гипоталамусом и мозжечком), отражая, по-видимому, магниезависимые механизмы модуляции порога болевой чувствительности, нейромедиаторного обмена и контроля моторных функций.

Результаты проведенного нами исследования показали, что патоморфологические преобразования различных отделов головного мозга при моделировании алиментарного дефицита магния заключаются в стереотипном сочетании как преимущественно обратимого повреждения нейронов и глиоцитов, так и процессов компенсаторно-приспособительного характера (в виде атрофии перикарионов, диффузного или очагового гиперхроматоза в цитоплазме перикарионов и отростков нейронов,

периваскулярного астроцитарного глиоза). Проведенный нами регрессионный анализ позволил установить, что прогрессирующее в динамике (к 12 неделе эксперимента) увеличение площади цитоплазмы перикарионов нейронов мелкоклеточной части паравентрикулярного ядра гипоталамуса сопровождалось снижением площади перикарионов нейронов крупноклеточной части паравентрикулярного ядра ($r = -0,99$ при $p < 0,05$) и площади перикарионов нейронов супраоптического ядра ($r = -0,97$ при $p < 0,05$), а также площади перикарионов нейронов пирамидного слоя гиппокампа ($r = -1,0$ при $p < 0,05$), отражая обратные корреляции между этими параметрами. Уменьшение площади цитоплазмы перикарионов нейронов СА1 и СА3 гиппокампа прямо коррелировало со снижением содержания ионов магния в эритроцитах ($r=0,99$ при $p < 0,05$); с уменьшением площади цитоплазмы нейронов супраоптического ядра гипоталамуса ($r=0,99$ при $p < 0,05$); с уменьшением площади перикарионов крупных нейронов параентрикулярного ядра гипоталамуса ($r=0,98$ при $p < 0,05$).

Особенности структурных преобразований нейронов и их окружения в головном мозгу при моделировании алиментарного дефицита магния невозможно анализировать без современного понимания роли магния в функционировании клеток. Согласно современным представлениям, регуляция магниевого баланса в клетках обеспечивается уникальным механизмом, в основе работы которого ведущую роль играют белки из семейства transient receptor potential melastatin – TRPM6 и TRPM7, которые представляют собой сложно организованные рецепторные каналы плазматических мембран и мембран внутриклеточных органелл (преимущественно, митохондрий), обладающие α -киназной активностью [Nadler M.J. et al., 2001; Schligmann K.P. et al., 2002]. Это позволяет названным каналам за счет энергии макроэргических связей АТФ транспортировать двухвалентные катионы в цитозоль клеток и матрикс митохондрий.

На основании анализа наиболее общих структурных механизмов преобразования нейронов и нейропиля в условиях дефицита магния нами отмечено, что изменение уровней экспрессии белков TRPM6 и TRPM7 сопровождается усилением процессов повреждения нейроцитов как на клеточном, так и субклеточном уровнях. Увеличение удельного количества нейронов с признаками гиперхроматоза (как проявления процессов повреждения цистерн гранулярной эндоплазматической сети) и хроматолиза (как отражения нарушения синтетических процессов со снижением количества рибосом и полисом) при окраске тионином по Нисслю сопровождается мозаичным усилением цитоплазматической экспрессии иммунореактивного материала с использованием поликлональных антител TRPM6 и TRPM7 в нейроцитах при дефиците магния. Выявленные в нашем исследовании ультраструктурные преобразования нейронов и нейропиля гипоталамических ядер при моделируемом дефиците магния в виде увеличения количества вакуолей с содержимым высокой электронной плотности может свидетельствовать о включении механизмов аутофагии, которые, как известно, могут быть фактором, способствующим выживанию нейронов даже при инициированной программе гибели, например, апоптозе [Манских В.Н., 2007]. При исследовании одного из важнейших интегральных маркеров апоптоза – каспазы 3 – достоверных различий в опытной и контрольной группах нами не обнаружено, следовательно, можно предположить, что гипомагниемия инициирует каспаза-3-независимые пути повреждения нейронов. Связь известных механизмов повреждения нейроцитов с функционированием TRPM6 и TRPM7 при дефиците магния – апоптоза, старения, нейронофагии, глутаматергической эксайтотоксичности, «митотической катастрофы» [Крыжановский Г.Н., 2009] требует дальнейшего детального изучения.

Преобладание обратимого повреждения нейронов в гипоталамусе обнаружено нами в мелкоклеточной части ПВЯ наряду с увеличением плотности активированных (GFAP-позитивных) астроцитов на фоне

прогрессивного увеличения удельной площади нейропиля (на 7,7% к 8 неделе и на 11,2% к 12 неделе моделируемого алиментарного дефицита магния, $p < 0,05$), что свидетельствует о развитии репаративной регенерации и, возможно, отражает нарушения общих нейро-эндокринных регуляторных путей, в частности, механизмов обратной связи. Это подтверждается уменьшением массы гипофиза у животных с 12-недельным дефицитом магния более чем на 40% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой [Смирнов А.В. и др., 2011]. Кроме того, дефицит магния приводит к уменьшению ночной секреции кортиколиберина в мелкоклеточной части ПВЯ и, соответственно, кортизола в надпочечниках, а, значит, и к снижению активности гипоталамо-аденогипофизарной системы [Murck H., Steiger A., 1998; Held K. et al., 2002]. Выявленное нами стереотипные атрофические изменения перикарионов крупных нейронов ПВЯ и СОЯ сочетались с явлениями гиперхроматоза и хроматолиза в цитоплазме клеток, диффузно усиленной цитоплазматической и ядерной экспрессией TRPM6, отражая сочетание альтеративных и компенсаторно-приспособительных процессов, направленных на восстановление ионного дисбаланса. Ультраструктурно в крупноклеточных ядрах гипоталамуса обнаруживались два типа нейронов – «светлые», характеризующиеся признаками гиперфункции (в виде усиления конденсации рибосом на наружной ядерной мембране и увеличения количества митохондрий там же), а также «темные», имеющие признаки повреждения митохондрий и других органелл, что также свидетельствует о комбинации процессов повреждения и адаптации при дефиците магния. При этом обнаруженные на ультраструктурном уровне признаки перестройки синаптического аппарата нейронов, которые, по нашему мнению, являются проявлениями нарушений синаптической пластичности, сопровождалось мозаичным усилением цитоплазматической экспрессии TRPM7 и i-NOS при выраженном снижении экспрессии e-NOS. Известно, что нонапептидергические нейроны крупноклеточных ядер гипоталамуса, продуцирующие вазопрессин, играют важную роль в регуляции водно-

электролитного обмена [Ткаченко Б.И., 2005], в формировании механизмов краткосрочной и долгосрочной памяти [Kjaer A., 1993], в регуляции сосудистого тонуса, модулируют секрецию кортикостероидов в ответ на острый стресс [Jørgensen H. et al., 2003; Inoue K. et al., 2010]. Изменение функциональной активности TRPM7 вносит весомый вклад в нарушения процессов нейротрансмиссии (преимущественно, холинергической) и перестройку синаптического аппарата [Krapivinsky G. et al., 2006]. Согласно данным литературы, рецепторные комплексы TRPM7, экспрессирующиеся в цитоплазме перикарионов и отростков нейронов, играют ключевую роль в механизмах адаптации нейронов, определяя их способность к образованию межклеточных связей и взаимодействию с микроокружением [Nadler M.J. et al. 2001; Aarts M.M. et al., 2003; Su L.-T. et al., 2006; Penner R., Fleig A., 2007; Hanano T. et al., 2004; Clark K. et al., 2008; Dorovkov M.V. et al., 2008]. Известно, что усиление активности нейрональной нитрооксидсинтазы с увеличением продукции оксида азота (NO), важнейшего модулятора синаптической пластичности и одного из предикторов ранней постдеполяризации мембран нейронов головного мозга, является ведущим фактором, облегчающим проведение импульсов вплоть до индукции судорожных эквивалентов и эпилептиформных атак [Kovasč R. et al., 2009; Torimitsu K. et al., 2012; Palacios-Prado N. et al., 2013; Sah N., Sikdar S.K., 2013; Xiao G. et al., 2013]. В то же время, сравнительное изучение свойств нейрональной и индуцибельной нитрооксидсинтазы в нейронах показало, что вклад последней в синтез NO превышает данный показатель второго фермента более чем в 200 раз [Murakami A. et al., 2009]. Таким образом, смысл компенсаторно-приспособительных изменений в крупноклеточных популяциях нейронов гипоталамических ядер заключается в превалировании атрофических изменений на фоне мозаичного увеличения экспрессии белка TRPM7, что, по-видимому, усугубляет существующий водно-электролитный дисбаланс и приводит к функциональным последствиям в виде нарушения продукции нонапептидов и процессов синаптической пластичности.

Вазопрессинергические нейроны крупноклеточной части паравентрикулярных ядер гипоталамуса формируют проекционные связи с нейронами гиппокампа (полей CA2, CA3) и энторинальной коры, играющей роль релейного звена в обмене информацией между ассоциативными областями неокортекса и гиппокампом [Madsen K.S., Frokjaer V.G., Jernigan T.L., 2012]. Патоморфологическими особенностями гиппокампа при моделируемом алиментарном дефиците магния можно считать преобладание атрофии нейронов пирамидного слоя полей CA1 и CA3 при уменьшении удельной площади перикарионов нейронов и увеличении удельной площади нейропиля на фоне стереотипных изменений экспрессии маркеров TRPM6, TRPM7, e-NOS, i-NOS, прямо коррелирующими с аналогичными изменениями в гипоталамусе. Учитывая тесные структурно-функциональные взаимосвязи гипоталамуса и гиппокампа [Chen Y. et al., 2006], можно предположить, что нейроны крупноклеточных ядер гипоталамуса и пирамидные нейроны полей CA1 и CA3 гиппокампа при дефиците магния характеризуются сходными уникальными TRPM7-зависимыми механизмами нарушений синаптической пластичности [Krapivinsky G. et al., 2006], что в свою очередь выражается в изменении лимбико-гипоталамической регуляции гомеостаза.

Известно, что дефицит магния ухудшает формирование условно-рефлекторных и ассоциативных связей в когнитивной деятельности [Bardgett M.E. et al., 2007], в то время как введение магнией-содержащих солей с развитием нормомагниемии улучшает синаптическую передачу в нейронах гиппокампа, отвечающих за выполнение теста в Т-образном лабиринте [Landfield P.W., Morgan G.A., 1984]. В исследовании изменений синаптической пластичности при магниевой депривации путем применения иммуногистохимического метода оценки содержания синаптофизина и синаптобревина в нейронах CA1 поля гиппокампа и зубчатой извилины наблюдалось уменьшение количества иммунопозитивных клеток [Geinisman

У., 2004; Burke C.A., Barnes C.A., 2006]. Следовательно, дефицит магния является важнейшим фактором нарушения синаптической пластичности в гиппокампе, и обнаруженное нами уменьшение экспрессии e-NOS и увеличение экспрессии i-NOS в нейронах пирамидного слоя CA1 и CA3 полей гиппокампа подтверждает ключевую роль NO-зависимых путей реализации судорожных эквивалентов при дефиците магния.

В проведенном исследовании выявлены различия структурных преобразований гиппокампа, крупных нейронов ПВЯ и СОЯ гипоталамуса в виде преобладания адаптивных изменений и коры полушарий головного мозга, мелких нейронов ПВЯ, нейронов ганглионарного слоя коры мозжечка в виде преобладания процессов повреждения отражают их морфофункциональную неоднородность и, по-видимому, свидетельствуют о проявлении структурной гетерогенности рецепторных и ионо-опосредованных регуляторных механизмов функционирования головного мозга [Ткаченко Б.И., 2005], в том числе, в условиях магниевой недостаточности. Согласно данным литературы, избыточная активация рецепторных комплексов TRPM6/TRPM7 [Clark K. et al., 2008] с учетом их локализации во внутренней мембране митохондрий и наличием специфической α -киназной активности цитоплазматического домена может свидетельствовать о вовлечении этих каналов в процессы аноксической дегенерации нейронов, вызванные кальциевой перегрузкой цитоплазмы и разобщением окислительного фосфорилирования и тканевого дыхания в условиях кислородной или глюкозной депривации [Aarts M.M. et al., 2003; Jiang H. et al., 2008]. Магниевая недостаточность индуцирует развитие оксидативного стресса [Спасов А.А. и др., 2011; Maier J.A. et al., 2007], в результате которого свободные радикалы (например, супероксид-анион радикал и гидроксильный радикал) вызывают модификацию и повреждение липидов, белков и нуклеиновых кислот, нарушая химические связи в этих молекулах. При этом ведущую роль в развитии энергетического дисбаланса в клетках играет повреждение митохондрий [Nakagawa T., 2000]. Известно, что

локализованная во внутренней мембране митохондрий F₁/F₀-АТФ-зависимая синтаза является важнейшим регулятором TRPM7 опосредованного транспорта двухвалентных катионов [Kim B.J. et al., 2007], обнаруженное в нашем исследовании усиление уровня экспрессии этих рецепторов в цитоплазме нейроцитов при дефиците магния может свидетельствовать о повреждении митохондрий. Это согласуется с результатами изучения ультраструктурных изменений в крупноклеточных ядрах гипоталамуса, в которых было обнаружено существенное уменьшение количества митохондрий в цитоплазме нейросекреторных клеток, изменение их формы и размеров, повреждения мембран и крист. Кроме того, усиление экспрессии i-NOS в нейронах гипоталамуса, грушевидных нейронах коры полушарий мозжечка, пирамидных и гранулярных клетках гиппокампа и зубчатой извилины, выявленное в проведенном нами исследовании, также свидетельствует об индукции повреждения при дефиците магния, опосредованного реакциями оксидативного стресса. Следовательно, в отделах головного мозга с преобладанием альтеративных процессов усиление экспрессии TRPM7 отражает кальциевые механизмы повреждения энергетического аппарата нейронов и глиоцитов в условиях моделируемого алиментарного дефицита магния.

Обнаруженные при иммуногистохимическом исследовании различия в характере экспрессии TRPM6 и TRPM7 в нейронах и глиальных клетках промежуточного мозга, коры полушарий конечного мозга при моделировании алиментарного дефицита магния представляют различный функциональный вклад этих рецепторов в регуляцию магниевого гомеостаза [Gwanyanya A. et al., 2004; Li M. et al., 2006]. Увеличение удельного количества нейронов гипоталамуса, гиппокампа, коры головного мозга и мозжечка с признаками гиперхроматоза (как проявления процессов компенсации, отражающих усиление процессов синтеза белка в виде увеличения количества цистерн гранулярной эндоплазматической сети) и хроматолиза (как отражения нарушения синтетических процессов) при

окраске тионином по Нисслию сопровождается стереотипным мозаичным усилением цитоплазматической экспрессии TRPM6 в нейронах при дефиците магния. Усиление иммуноэкспрессии TRPM6 в цитоплазме и ядерных оболочках нейронов и астроцитов при дефиците магния может отражать морфологические особенности адаптивных механизмов, направленных на восстановление магниевого внутриклеточного метаболизма и нейропластичности в целом. По-видимому, усиление экспрессии иммунореактивного материала при использовании антител к TRPM6 ассоциировано с активацией трансцеллюлярного активного транспорта катионов магния в нейронах и астроцитах так же, как это обнаружено в канальцевой системе почек при индукции синтеза белков семейства клаудинов на люминальной поверхности плазматических мембран эпителиоцитов [Simon D.V. et al., 1999; Efrati E. et al., 2005], а также эпидермального фактора роста, обеспечивающего перенос ионов магния через базальные мембраны клеток в дистальных почечных канальцах [Groenestege W.M., 2006]. При этом мозаичный характер экспрессии TRPM6 и TRPM7 в нейронах и глиоцитах при моделируемой магниевой недостаточности свидетельствуют не только об их различных функциональных свойствах при регуляции магниевого гомеостаза, но и отражают структурно-функциональную неоднородность различных отделов головного мозга.

В настоящее время дефицит магния рассматривается как пусковой механизм повреждения сосудистого эндотелия, что является ключевым звеном атерогенеза, воспаления и тромбообразования, приводящим к ишемическим и дистрофическим изменениям в органах и тканях [Паньшин Н.Г., 2011; Bobkowski W. et al., 2005; Maier A.M. et al., 2007]. Повреждение сосудов при дефиците магния является одним из возможных путей гипоксической альтерации нейронов [Aarts M.M., 2003; Maier A.M. et al., 2010]. Кроме того, выявленные при дефиците магния изменения сосудов микроциркуляторного русла, ведущие к нарушениям кровообращения в

миокарде, почках, семенниках, матке [Смирнов А.В. и др., 2012], также могут инициировать гипоксическое повреждение высокоактивных в функциональном отношении элементов этих органов. Структурные признаки обратимой альтерации, отмеченной нами в эндотелии и гладких миоцитах артериол и эндотелиоцитах капилляров различных регионов головного мозга, в виде отека, дистрофических изменений, усиления цитоплазматической экспрессии TRPM7, по-видимому, свидетельствуют об изменениях функциональной активности и метаболизма эндотелиоцитов, что находит отражение в развитии синдрома эндотелиальной дисфункции, продемонстрированном в ряде экспериментальных исследований [Wolf F.I., Cittadini A., 2003; Bobkowski W. et al., 2005; Ueshima K., 2005; Maier J. A. et al., 2010]. Полученные данные согласуются с результатами аналогичных исследований Paravicini B., [2012], где показано, что гладкие миоциты отдельных фрагментов аорты мышей с моделированием у них низкой внутриклеточной концентрации Mg^{2+} характеризовались увеличением TRPM7 экспрессии, но снижением уровня экспрессии аннексина-I, отражая, по-видимому, магний-зависимые механизмы повреждения клеток и межклеточных коопераций. Изучение ультраструктурных преобразований капилляров гипоталамуса при дефиците магния также позволило выявить признаки обратимого повреждения эндотелиоцитов в виде внутриклеточного отека и вакуолизации цитоплазмы, очагового разволокнения и уменьшения толщины базальной мембраны. В исследованных сосудах при экспериментальном моделировании алиментарного дефицита магния найдено преобладание признаков повреждения эндотелия и гладкомышечных клеток, в отличие от результатов подобного исследования мелких артерий и артериол миокарда [Смирнов А.В. и др., 2009], где наряду с альтерацией эндотелия обнаружены явления продуктивного васкулита, ведущего к склерозу сосудистой стенки.

При изучении экспрессии TRPM6 в эндотелиоцитах капилляров и артериол при моделируемом дефиците магния выявлено усиление

цитоплазматической экспрессии этого белка, что мы рассматриваем как компенсаторно-приспособительную реакцию, направленную на восстановление магниевого баланса. Следует отметить, что согласно данным [Chubonov V. et al., 2004; Schmitz C. et al., 2005] перенос ионов в HEK-293 клетках или ооцитах через канал TRPM6 возможен только в условиях TRPM7 ко-экспрессии, так как только при их взаимодействии возможна активация энергозависимых (киназных) путей транспорта катионов.

При исследовании уровней экспрессии e-NOS у животных с дефицитом магния установлено уменьшение экспрессии этого маркера в эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудов коры полушарий конечного мозга, гиппокампа и гипоталамуса по сравнению с контролем, что согласуется с данными о снижении концентрации эндотелиальной нитрооксидсинтазы в плазме при дефиците магния [Желтова А.А., 2012] и может свидетельствовать о снижении функциональной активности этого фермента.

Выявленные нами признаки повреждения эндотелиоцитов и гладких миоцитов артериол и капилляров изученных отделов головного мозга сопровождались усилением в них экспрессии i-NOS, что согласуется с гипотезой о развитии эндотелиальной дисфункции [Wolf F.I., Cittadini A., 2003; Bobkowski W. et al., 2005; Ueshima K., 2005; Maier J.A. et al., 2010] и характеризует повреждение клеток при оксидативном стрессе, который вызван i-NOS-опосредованным синтезом пероксинитрита, индуцирующего перекисную модификацию компонентов клеточных мембран [Желтова А.А., 2012; Bobkowski W. et al., 2005; Maier J.A. et al., 2010]. Обнаруженные нами ультраструктурные изменения сосудов микроциркуляторного русла в крупноклеточных ядрах гипоталамуса, коре полушарий головного мозга, гиппокампе указывают на преобладание процессов обратимого повреждения эндотелиоцитов и базальной мембраны в условиях моделируемой магниевой недостаточности. В капиллярах и артериолах выявлено увеличение количества пиноцитозных везикул в эндотелии, которое сопровождалось резкими нарушениями со стороны энергетического аппарата клетки и

ультраструктуры её ядра на фоне уменьшения уровня экспрессии эндотелиальной нитрооксидсинтазы и усиления экспрессии белков-транспортеров магния (TRPM6 и TRPM7), индуцибельной нитрооксидсинтазы в эндотелии и гладких миоцитах артериол. Отмеченные преобразования сочетались с разволокнением и локальным истончением базальной мембраны капилляров, периваскулярным отеком, увеличением удельной плотности GFAP-позитивных отростков астроцитов в периваскулярных областях. Выявленные изменения представляют собой комбинацию процессов альтерации и репаративной регенерации на уровне тканевого микрорегиона в крупноклеточных ядрах гипоталамуса и других отделах головного мозга в условиях моделируемого алиментарного дефицита магния. В проведенном нами исследовании отмечались явления эритростаза в капиллярах гипоталамуса и явления перицеллюлярного и периваскулярного отека, у некоторых животных – периваскулярные очаговые кровоизлияния. Согласно литературным данным, снижение концентрации ионов магния в корковых структурах головного мозга вызывает быстрое и прогрессивное повреждение микрососудов, что приводит к очаговым кровоизлияниям и отеку головного мозга [Liu X. et al., 2010].

О роли солей магния в структурных и функциональных преобразованиях нервной системы накоплено немало данных. Согласно данным исследований Спасова А.А., Иежицы И.Н. и др., (2008), в условиях дефицита магния такие препараты, как магния хлорид и магния L-аспарагинат эффективно устраняют депрессивно-подобное поведение и повышенную тревожность у магнидефицитных животных, способствуют нормализации *m*-холинергической, норадренергической, серотонинергической нейротрансмиссии в ЦНС, повышают порог коразоловых судорог [Спасов А.А., Иежица И.Н. и др., 2008]. Согласно данным Иежицы И.Н. и др., (2008), при введении солей магния у магнидефицитных животных в тесте «открытое поле» происходило восстановление поисковой активности и снижение тревожности, что

проявлялось в более частом посещении центральной части установки, увеличении частоты актов груминга. В тесте «крестообразный лабиринт» под действием солей магния уменьшалась продолжительность латентного периода до выглядывания из темного отсека, увеличивалось число посещений темных и светлых рукавов лабиринта. В тесте вынужденного плавания увеличивался латентный период до первого эпизода пассивного плавания, уменьшалось время пассивной иммобилизации, что также говорит о антидепрессантоподобном эффекте солей магния. При этом лидерами по большинству показателей оказались магния L-аспарагинат и магния хлорид в комбинациях с витамином В₆, которые по эффективности оказались сопоставимы с препаратом сравнения магне В₆ и значительно превосходили магния сульфат.

Известно, что магний важен для регуляции обмена нейромедиаторов и модулирования функции рецепторов в ЦНС, в том числе ответственных за формирование депрессивно-подобного и тревожного поведения у животных [Singewald N. et al., 2004]. В условиях компенсации уровня магния в организме магнийдефицитных животных наблюдалось восстановление ряда показателей нейрофармакологических тестов. Отмечалось уменьшение длительности фенаминовой стереотипии в группе животных, получавших магне В₆, в среднем на 39,78% ($p < 0,05$), магния L-аспарагинат и магния хлорид в комбинациях с витамином В₆ – на 30,84% ($p < 0,05$) и 26,46% ($p < 0,05$) соответственно, магния хлорид – на 21,62% ($p < 0,05$) и магния L-аспарагинат – на 20,17% ($p < 0,05$), по сравнению с магнийдефицитными животными. При этом отличия от группы магне В₆ были достоверны для большинства солей, кроме магния хлорида, а комбинация магния L-аспарагината с витамином В₆ достоверно превосходила по активности магния L-аспарагинат.

При оценке влияния на гиперкинез, вызванный введением 5-гидрокситриптофана, отмечено увеличение выраженности его проявления в группах магния L-аспарагината и магния хлорида в комбинациях с

витамином В₆ в среднем в 2,5 ($p < 0,05$) и 2 раза ($p < 0,05$) соответственно, в группах магния L-аспарагината и магния хлорида – в среднем в 1,5 раза, магне В₆ – в 0,8 раза, по сравнению с группой магниевое дефицита. Статистически значимых различий между группами, получавшими соли магния, обнаружено не было.

Что касается структурных преобразований различных отделов головного мозга при пищевой коррекции дефицита магния, то полученные данные не выявили статистически достоверных отличий между сравниваемыми группами. В то же время, наблюдался неоднородный характер изменений при использовании различных солей: так, при применении магния таурината отмечалось наибольшее уменьшение количества гиперхромных нейронов в моторных отделах коры полушарий большого мозга и CA1, CA3 полях гиппокампа. При применении магния L-аспарагината отмечалось наибольшее уменьшение количества гиперхромных нейронов в крупноклеточных ядрах гипоталамуса.

С учетом полученных данных о структурных изменениях нейронов и нейропилия можно заключить, что мозаичный характер экспрессии TRPM6, TRPM7 со снижением уровня e-NOS отражает как адаптационные изменения иммунофенотипа определенных клеточных популяций, направленные на увеличение магниевое транспорта из внеклеточной среды, так и процессы повреждения (с усилением экспрессии i-NOS) и репаративной регенерации (с увеличением плотности активированных астроцитов), что на фоне изменений в эндотелии и гладких миоцитах артериол и капилляров характеризует различия в васкуляризации и особенностях метаболизма на уровне тканевого микроокружения в различных отделах головного мозга при моделировании алиментарного дефицита магния, определяя закономерности морфогенеза последнего.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии. – М.: Медицина, 2002. – 240 с.
2. Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С. Микроэлементозы человека. – М.: Медицина, 1991. – 496 с.
3. Акарачкова Е.С. Дефицит магния у неврологических пациентов: миф или реальность? / Е.С. Акарачкова, С.В. Вершинина // РМЖ. – 2012. – №15. – С. 943-947.
4. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. — М., Практика, 1999. — 459 с.
5. Громова О.А., Гоголева И.В. Применение магния в зеркале доказательной медицины и фундаментальных исследований в терапии. Дефицит магния и концепция стресса // Трудный пациент. – 2007. – №11. – С. 29-38.
6. Желтова А.А. Фармакологическая коррекция дисфункции эндотелия и ишемии миокарда в условиях экспериментального дефицита магния: Автореф. ... канд. мед. наук. – Волгоград, 2012. – 24 с.
7. Иежица И.Н., Харитонов М.В., Кравченко М.С., Озеров А.А. Сравнительная биодоступность некоторых органических солей магния и магнийсодержащих препаратов в условиях алиментарной гипомagneзиемии // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета – 2007. – №4(24). – С. 39-41.
8. Иежица И.Н., Харитонов М.В., Спасов А.А., Кравченко М.С. Фармакологическая коррекция порога болевой чувствительности в условиях дефицита магния // Патологическая физиология и экспериментальная терапия – 2010. – №1. – С.6-10.
9. Крыжановский Г.Н. Дизрегуляторная патология нервной системы. – М.: Медицина, 2009. – 230 с.
10. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. – М., Мир. – 1969. – С. 541-543.
11. Манских В.Н. Пути гибели клеток и их биологическое значение // Цитология – 2007. – Том 49, №11. – С. 909-915.
12. Меркулов Г. А. Курс патологистологической техники. – Л.: Медгиз, 1969. – 424 с.

13. Паньшин Н.Г., Харитонов М.В. Изучение влияния дефицита магния на структуру эндотелия сосудов сердца у крыс // Материалы XIII региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области. – Волгоград, 2008. – С. 80-82.
14. Паньшин Н.Г. Особенности морфологии сердца крыс при экспериментальном дефиците магния // Вестник РГМУ. – 2010. - № 2. - С. 529-530.
15. Паньшин Н.Г. Морфологический анализ изменений сосудов миокарда левого желудочка крыс при алиментарном дефиците магния // Морфология. – 2010. –Т.137, №4 - С.151.
16. Паньшин Н.Г. Структурные преобразования сердца и почек при экспериментальном моделировании дефицита магния: Автореф. ... канд. мед. наук. – Волгоград, 2011. – 22 с.
17. Паньшин Н.Г., Смирнов А.В., Спасов А.А., Харитонов М.В. Морфологические преобразования почек крыс при экспериментальном моделировании алиментарного дефицита магния // Бюллетень Волгоградского медицинского научного центра – 2011. – №1. – С.12-14.
18. Петров В.И. Бакумов П.А., Глинская А.В., Воронин С.П. Динамика состояния больных острым инфарктом миокарда при лечении аспаркамом-L, панангином и калия, магния аспарагинатом // Вестник ВолгГМУ. – 2006. - №4. – С. 28-31.
19. Петров Р.В., Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. – Казань, 2004. – 452 с.
20. Потанин М.В., Туманов В.П., Писарев В.Б. Особенности ультраструктуры нейронов супрахиазматического ядра гипоталамуса у крыс с различной стресс-реактивностью // Бюл. exper. биол. и медицины. – 2007. – №11. – С. 495-500.
21. Саркисов Д.С., Пальцев М.А., Хитров Н.К. Общая патология человека. М.: Медицина, 1997. – 608 с.
22. Скальный А.В., Рудаков И.А. Биоэлементы в медицине. – М.: ОНИКС 21 век, 2004. – 271 с.
23. Смирнов А.В., Снигур Г.Л., Спасов А.А., Иежица И.Н., Паньшин Н.Г. Морфологические изменения артерий сердца крыс в условиях

- экспериментального дефицита магния // Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН и Администрации волгоградской области. – 2009. – №1. – С. 25-27.
24. Смирнов А.В., Панышин Н.Г., Спасов А.А., Иежица И.Н., Харитоновна М.В. Морфологические особенности миокарда крыс при экспериментальном моделировании дефицита магния // Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН и Администрации волгоградской области. – 2010. – №3. – С. 14-16.
25. Смирнов А.В., Шмидт М.В., Панышин Н.Г., Смирнова Т.Ф., Спасов А.А., Харитоновна М.В., Желтова А.А., Черников М.В. Морфологические изменения некоторых органов крыс при дефиците магния // Вестник новых медицинских технологий – 2011. – Т.ХVIII, №2. – С. 63-65.
26. Спасов А.А., Иежица И.Н. Калий-магниевый гомеостаз: физиология, патофизиология, клинические последствия дефицита и особенности фармакологической коррекции // Успехи физиологических наук – 2008 – Том 39, № 1. – С. 23-41.
27. Спасов А.А., Иежица И.Н., Зиновьева В.Н. Гомеостаз магния: механизмы и наследственные нарушения. // Биомедицинская химия – 2007. – Том. 53, № 6. – С. 683-704.
28. Спасов А.А., Харитоновна М.В., Желтова А.А., Иежица И.Н., Озеров А.А. Фармакологическая коррекция дисфункции эндотелия и системного воспаления при экспериментальном дефиците магния // IV Съезд фармакологов России «Инновации в современной фармакологии». Мат. съезда. 18-21 сентября 2012 года. – Казань. М.: Фолиум, 2012. – С.190.
29. Ткаченко Б.И. Нормальная физиология человека. 2-е изд. - М.: Медицина, 2005. – 928 с.
30. Тутельян В.А., Спиричев В.Б., Суханов Б.П., Кудашева В.А. Микронутриенты в питании здорового и больного человека. М.: Колос, 2002. – 423 с.
31. Харитоновна М.В. Фармакологическая активность некоторых неорганических солей магния: Автореф. ... канд. мед. наук. – Волгоград, 2008. – 24 с.

32. Шилов А.М., Авшалумов А.Ш., Синицина Е.Н. и др. Метаболический синдром и «дефицит магния»: особенности течения и лечения. – 2008. – www.vrach.ru.
33. Aarts M.M., Iihara K., Wei W. L., Xiong Z. G., Arundine M., Cerwinski W., MacDonald J. F. and Tymianski M. A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death // *Cell*. – 2003. – Vol. 115. – P. 863-877.
34. Aarts M.M. and Tymianski M. TRPM7 and ischemic CNS injury // *Neurosci*. – 2005. – Vol.11. – P. 116-123.
35. Abumaria N., Yin B. et al. Effects of elevation of brain magnesium on fear conditioning, fear extinction, and synaptic plasticity in the infralimbic prefrontal cortex and lateral amygdala // *J. Neurosci* – 2011. – Vol. 31(42). – P. 14871-81.
36. Ahsan S.K., al-Swoyan S., Hanif M., Ahmad M. Hypomagnesemia and clinical implications in children and neonates // *Indian J. Med Sci*. – 1998. – Vol. 52(12). – P. 541-7.
37. Allred D.C., Harvey J.M., Berardo M., Clark G.M. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis // *Mod. Pathol*. – 1998. – Vol. 11(2). – P. 155-68
38. Altura B.M. Basic biochemistry and physiology of magnesium: a brief review // *Magnes. Trace Elem*. – 1991-1992. – Vol. 10(2-4). – P. 167-71.
39. Altura B.M., Altura B.T. Microvascular and vascular smooth muscle actions of ethanol, acetaldehyde, and acetate // *Fed. Proc*. – 1982. – Vol. 41(8). – P. 2447-51.
40. Altura B.M., Kostellow A.B., Zhang A., Li W., Morrill G.A., Gupta R.K., Altura B.T. Expression of the nuclear factor-kappaB and proto-oncogenes c-fos and c-jun are induced by low extracellular Mg²⁺ in aortic and cerebral vascular smooth muscle cells: possible links to hypertension, atherogenesis, and stroke // *Am. J. Hypertens*. – 2003. – Vol. 16(9). – P. 701-7.
41. Altura B.M., Shah N.C., Jiang X.C., Li Z., Perez-Albela J.L., Sica A.C., Altura B.T. Short-term magnesium deficiency results in decreased levels of serum sphingomyelin, lipid peroxidation, and apoptosis in cardiovascular tissues // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. – 2009. – Vol. 297(1). – P. 86-92.
42. Amyard N., Leyris A., Monier C., Francès H., Boulu R.G., Henrotte J.G. Brain catecholamines, serotonin and their metabolites in mice selected for low (MGL)

- and high (MGH) blood magnesium levels // *Magnes Res.* – 1995. – Vol. 8(1). – P. 5-9.
43. Andrási E., Páli N., Molnár Z., Kösel S. Brain aluminum, magnesium and phosphorus contents of control and Alzheimer-diseased patients // *J. Alzheimers Dis.* – 2005. – Vol. 7(4). – P. 273-84.
44. Arundine M., Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury // *Cell Mol. Life Sci.* – 2004. – Vol. 61(6). – P. 657-68.
45. Asrar S., Aarts M.M. TRPM7, the cytoskeleton and neuronal death // *Channels (Austin)*. – 2013. – Vol. 7(1). – P. 6-16.
46. Avioli L.V., Bizzarri C., Civitelli R. Activation of the Ca²⁺ message system by parathyroid hormone is dependent on the cell cycle // *Miner. Electrolyte Metab.* – 1995. – Vol. 21(1-3). – P. 29-34.
47. Bac P., Pages N., Herrenknecht C., Dewulf C., Binet P., Durlach J. Effect of various serotonergically induced manipulations on audiogenic seizures in magnesium-deficient mice // *Magnes. Res.* – 1994. – Vol. 7(2). – P. 107-15.
48. Baudouin-Legros M., Dard B., Guicheney P. Hyperreactivity of platelets from spontaneously hypertensive rats. Role of external magnesium // *Hypertension.* – 1986. – Vol. 8(8). – P. 694-9.
49. Bahia P.K., Bennett E.S., Taylor-Clark T.E. Reductions in external divalent cations evoke novel voltage-gated currents in sensory neurons // *PLoS One.* – 2012 – Vol. 7(2). – e31585.
50. Bardgett M.E., Schultheis P.J., Muzny A., Riddle M.D., Wagge J.R. Magnesium deficiency reduces fear-induced conditional lick suppression in mice // *Magnes. Res.* – 2007. – Vol. 20(1). – P. 58-65.
51. Basarsky T.A., Duffy S.N., Andrew R.D., MacVicar B.A. Imaging spreading depression and associated intracellular calcium waves in brain slices // *J. Neurosci.* – 1998. – Vol. 18(18). – P. 7189-99.
52. Bernardini D., Nasulewic A., Mazur A., Maier J.A. Magnesium and microvascular endothelial cells: a role in inflammation and angiogenesis // *Front Biosci.* – 2005. – Vol. 10. – P. 1177-82.
53. Bessac B.F., Fleig A. TRPM7 channel is sensitive to osmotic gradients in human kidney cells // *J. Physiol.* – 2007. – Vol. 582(Pt. 3). – P. 1073-86.

54. Bieri J.G. AIN-76 diet // *J. Nutr.* – 1979. – Vol. 109(5). – P. 925-6.
55. Billard J.-M. Long-term depression in the hippocampal CA1 area of aged rats, revisited: contribution of temporal constraints related to slice preparation // *PLoS One.* – 2010. – Vol. 24; №5(3). – P. 9843.
56. Bobkowski W., Nowak A., Durlach J. The importance of magnesium status in the pathophysiology of mitral valve prolapse // *Magnes. Res.* – 2005. – Vol. 18(1). – P. 35-52.
57. Brauchi S., Krapivinsky G., Krapivinsky L. and Clapham D. E. TRPM7 facilitates cholinergic vesicle fusion with the plasma membrane // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2008. – Vol. 105. – P. 8304-8308.
58. Brown R.C. The cytoskeleton and spatial control of cytokinesis in the plant life cycle // *Protoplasma.* – 2001. – Vol. 215(1-4). – P. 35-49.
59. Brown R.C., Wu L., Hicks K., O'neil R.G. Regulation of blood-brain barrier permeability by transient receptor potential type C and type v calcium-permeable channels // *Microcirculation.* – 2008. – Vol. 15(4). – P. 359-71.
60. Burgmer U., Schulz U., Tränkle C., Mohr K. Interaction of Mg²⁺ with the allosteric site of muscarinic M2 receptors // *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* – 1998. – Vol. 357(4). – P. 363-70.
61. Burke S.N., Barnes C.A. Neural plasticity in the ageing brain // *Nat Rev Neurosci.* – 2006. – Vol. 7(1). – P. 30-40.
62. Callera G.E., He Y., Yogi A., Montezano A.C., Paravicini T., Yao G., Touyz R.M. Regulation of the novel Mg²⁺ transporter transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) cation channel by bradykinin in vascular smooth muscle cells // *J. Hypertens.* – 2009. – Vol. 27(1). – P. 155-66.
63. Cao G., van der Wijst J., van der Kemp A., van Zeeland F., Bindels R.J., Hoenderop J.G. Regulation of the epithelial Mg²⁺ channel TRPM6 by estrogen and the associated repressor protein of estrogen receptor activity // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284. – P. 14788-95.
64. Chen H-S., Xie J., Zhang Z., Su L-T., Yue L., Runnels L.W. Blockade of TRPM7 channel activity and cell death by inhibitors of 5-lipoxygenase. // *PLoS.* - 2010. – Vol. 5. – P. 111-61.
65. Choi Y.B., Lipton S.A. Redox modulation of the NMDA receptor // *Cell Mol. Life Sci.* – 2000. – Vol. 57(11). – P. 1535-41.

66. Chouinard G., Beauclair L., Geiser R., Etienne P. A pilot study of magnesium aspartate hydrochloride (Magnesiocard) as a mood stabilizer for rapid cycling bipolar affective disorder patients // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* – 1990. – Vol. 14(2). – P. 171-80.
67. Chubanov V., Gudermann T., Schlingmann K.P. Essential role for TRPM6 in epithelial magnesium transport and body magnesium homeostasis // *Pflugers Arch.* – 2005. – Vol. 451. – P. 228-34.
68. Chubanov V., Waldegger S., Mederos y Schnitzler M., Vitzthum H., Sassen M.C., Seyberth H.W., Konrad M., Gudermann T. Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2004. – Vol. 101. – P. 2894-9.
69. Chutkow J.G., Tyce G.M. Brain norepinephrine, dopamine, and 5-hydroxytryptamine in magnesium-deprivation encephalopathy in rats // *J. Neural. Transm.* – 1979. – Vol. 44(4). – P. 297-302.
70. Clapham D.E., Runnels L.W. The TRPM7 channel is inactivated by PIP(2) hydrolysis // *Nat. Cell. Biol.* – 2002. – Vol. 4(5). – P. 329-36.
71. Clark K., Langeslag M., van Leeuwen B., Ran L., Ryazanov A.G., Figdor C.G., Moolenaar W.H., Jalink K., van Leeuwen F.N. TRPM7, a novel regulator of actomyosin contractility and cell adhesion // *EMBO J.* – 2006. – Vol. 25. – P. 290-301.
72. Clark K., Middelbeek J., Dorovkov M. V., Figdor C. G., Ryazanov A. G., Lasonder E. and van Leeuwen F. N. The alpha-kinases TRPM6 and TRPM7, but not eEF-2 kinase, phosphorylate the assembly domain of myosin IIA, IIB and IIC // *FEBS Lett.* – 2008. – Vol. 582. – P. 2993-2997.
73. Cook N.L., van den Heuvel C., Vink R. Are the transient receptor potential melastatin (TRPM) channels important in magnesium homeostasis following traumatic brain injury? // *Magnes. Res.* – 2009. – Vol. 22. – P. 225-34.
74. Cox I.M., Campbell M.J., Dowson D. Red blood cell magnesium and chronic fatigue syndrome // *Lancet.* – 1991. – Vol. 337(8744). – P. 757-60.
75. Cladman W., Chidiac P. Characterization and comparison of RGS2 and RGS4 as GTPase-activating proteins for m2 muscarinic receptor-stimulated G(i) // *Mol Pharmacol.* – 2002. – Vol. 62(3). – P. 654-9.

76. Cristofanilli M., Akopian A. Calcium channel and glutamate receptor activities regulate actin organization in salamander retinal neurons // *J. Physiol.* – 2006. – Vol. 575. – P. 543-54.
77. Dachtler J., Hardingham N.R., et al. Experience-dependent plasticity acts via GluR1 and a novel α NOS1 dependent synaptic mechanism in adult cortex // *J. Neurosci.* – 2011. – Vol. 31(31). – P. 11220–11230.
78. Dinerman J.L. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: Implications for synaptic plasticity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994. – Vol. 91. – P. 4214-4218.
79. Dorovkov M.V., Beznosov S.N., Shah S., Kotlianskaia L. and Kostiukova A.S. Effect of mutations imitating the phosphorylation by TRPM7 kinase on the function of the N-terminal domain of tropomodulin // *Biofizika.* – 2008. – Vol. 53. – P. 943-949.
80. Dorovkov M. V. and Ryazanov A. G. Phosphorylation of annexin I by TRPM7 channelkinase // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 50643-50646.
81. Durlach J., Guet-Bara A., Bara M. Magnesium ions and ionic channels: activation, inhibition or block--a hypothesis // *Magnes. Res.* – 2007. – Vol. 20(2). – P. 100-6.
82. Durlach J., Maurois P., Pages N., Bac P., German-Fattal M., Agnani G., Delplanque B., Poupaert J., Vamecq J. Threshold to N-methyl-D-aspartate-induced seizures in mice undergoing chronic nutritional magnesium deprivation is lowered in a way partly responsive to acute magnesium and antioxidant administrations // *Br. J. Nutr.* – 2009. – Vol. 101(3). – P. 317-21.
83. Ebel H., Hollstein M., Gunther T. Role of the choline exchanger in Na⁺-independent Mg²⁺ efflux from rat erythrocytes // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2002. – Vol. 1559. – P. 135-44.
84. Ebel H., Jüttner R. Characterization of Mg²⁺ transport in brush border membrane vesicles of rabbit ileum studied with mag-fura // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1998. – Vol. 1370(1). – P. 51-63.
85. Efrati E., Arsentiev-Rozenfeld J., Zelikovic I. The human paracellin-1 gene (hPCLN-1): renal epithelial cell specific expression and regulation // *Am. J. Physiol.* – 2005. – Vol. 288. – P. 272-83.

86. el-Beheiry H., Puil E. Effects of hypomagnesia on transmitter actions in neocortical slices // *Br. J. Pharmacol.* – 1990. – Vol. 101(4). – P. 1006-10.
87. Escuela M.P., Guerra M., Añón J.M., Martínez-Vizcaíno V., Zapatero M.D., García-Jalón A., Celaya S. Total and ionized serum magnesium in critically ill patients // *Intensive Care Med.* – 2005. – Vol. 31(1). – P. 151-6.
88. Fehlinger R., Seidel K. The hyperventilation syndrome: a neurosis or a manifestation of magnesium imbalance? // *Magnesium.* – 1985. – Vol. 4(2-3). – P. 129-36.
89. Fonfria E., Murdock P.R., Cusdin F.S., Benham C.D., Kellsell R.E., McNulty S. Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family // *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* – 2006. – Vol. 26(3). – P. 159-78.
90. Foster T.C. Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain // *Aging Cell.* – 2007. – Vol. 6(3). – P. 319-25.
91. Geinisman Y., Ganeshina O., Berry R.W., Petralia R.S., Nicholson D.A. Differences in the expression of AMPA and NMDA receptors between axospinous perforated and nonperforated synapses are related to the configuration and size of postsynaptic densities // *J. Comp. Neurol.* – 2004. – Vol. 468(1). – P. 86-95.
92. Grimaldi B.L. The central role of magnesium deficiency in Tourette's syndrome: causal relationships between magnesium deficiency, altered biochemical pathways and symptoms relating to Tourette's syndrome and several reported comorbid conditions // *Med. Hypotheses.* – 2002. – Vol. 58(1). – P. 47-60.
93. Gróenestege W.M., Hoenderop J.G., van den Heuvel L., Knoers N., Bindels R.J. The epithelial Mg²⁺ channel transient receptor potential melastatin 6 is regulated by dietary Mg²⁺ content and estrogens // *J. Am. Soc. Nephrol.* - 2006. – Vol. 17. – P. 1035-43.
94. Grunze H., Walden J. Reduction of the frequency of occurrence of low magnesium induced field potentials in the hippocampus slice preparation of guinea pigs: a good screening tool for calcium antagonistic effects of anticonvulsant and antipsychotic drugs // *Magnes. Res.* – 1997. – Vol. 10(2). – P. 119-26.
95. Gueux E., Azais-Braesco V., Bussièrè L., Grolier P., Mazur A., Rayssiguier Y. Effect of magnesium deficiency on triacylglycerol-rich lipoprotein and tissue susceptibility to peroxidation in relation to vitamin E content // *Br. J. Nutr.* – 1995. – Vol. 74(6). – P. 849-56.

96. Gwanyanya A., Amuzescu B., Zakharov S.I., Macianskiene R., Sipido K.R., Bolotina V.M., Vereecke J., Mubagwa K. Magnesium-inhibited, TRPM6/7-like channel in cardiac myocytes: permeation of divalent cations and pH-mediated regulation // *J. Physiol.* – 2004. – Vol. 559. – P. 761-76.
97. Hafen G., Laux-End R., Truttmann A.C., Schibler A., McGuigan J.A., Peheim E., Bianchetti M.G. Plasma ionized magnesium during acute hyperventilation in humans // *Clin. Sci. (Lond).* – 1996. – Vol. 91(3). – P. 347-51.
98. Hanano T., Hara Y., Shi J., Morita H., Umebayashi C., Mori E., Sumimoto H., Ito Y., Mori Y., Inoue R. Involvement of TRPM7 in cell growth as a spontaneously activated Ca²⁺ entry pathway in human retinoblastoma cells // *J Pharmacol Sci.* – 2004. – Vol. 95(4). – P. 403-19.
99. Hardingham G.E. Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events // *Biochem. Soc. Trans.* – 2009. – Vol. 37. – P. 1147-60.
100. Hashimoto T., Nishi K., Nagasao J., Tsuji S., Oyanagi K. Magnesium exerts both preventive and ameliorating effects in an in vitro rat Parkinson disease model involving 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) toxicity in dopaminergic neurons // *Brain Res.* – 2008. – Vol. 1197. – P. 143–51.
101. Held K., Antonijevic I.A., Künzel H., Uhr M., Wetter T.C., Golly I.C., Steiger A., Murck H. Oral Mg(2+) supplementation reverses age-related neuroendocrine and sleep EEG changes in humans // *Pharmacopsychiatry.* – 2002. – Vol. 35(4). – P. 135-43.
102. Hennigan A., O'Callaghan R.M., Kelly A.M. Neurotrophins and their receptors: roles in plasticity, neurodegeneration and neuroprotection // *Biochem. Soc. Trans.* – 2007. – Vol. 35(Pt 2). – P. 424-7.
103. Hetman M., Kharebava G. Survival signaling pathways activated by NMDA receptors // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 6. – P. 787-99.
104. Holl J.E. Quinidine-like activity of atropine in rabbit atria // *Eur. J. Pharmacol.* – 1978. – Vol. 47(4). – P. 423-30.
105. Iezhitsa I.N., Spasov A.A., Kharitonova M.V., Zheltova A.A. Effect of magnesium L-aspartate and magnesium chloride alone and in combination with pyridoxine on hyperalgesia in rats fed with magnesium –deficient diet // *J. Pharmacol. Sci.* – 2011. – Vol.115, suppl.1. – P. 255.

106. Ikonomidou C., Kaindl A.M. Neuronal death and oxidative stress in the developing brain // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2011. – Vol. 14(8). – P. 1535-50.
107. Inoue K., Branigan D. and Xiong Z. G. Zinc-induced neurotoxicity mediated by transient receptor potential melastatin 7 channels // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – P. 7430-7439.
108. Jiang H., Tian S.L., Zeng Y., Li L.L., Shi J. TrkA pathway(s) is involved in regulation of TRPM7 expression in hippocampal neurons subjected to ischemic-reperfusion and oxygen-glucose deprivation // *Brain. Res. Bull.* – 2008. – Vol. 76. – P. 124-30.
109. Jiang J., Li M., Yue L. Potentiation of TRPM7 inward current by protons // *J. Gen. Physiol.* – 2005. – Vol. 126. – P. 137-50.
110. Jin J., Desai B. N., Navarro B., Donovan A., Andrews N. C. and Clapham D. E. Deletion of Trpm7 disrupts embryonic development and thymopoiesis without altering Mg²⁺ homeostasis // *Science* – 2008. – Vol. 322. – P. 756-760.
111. Jørgensen H., Riis M., Knigge U., Kjaer A., Warberg J. Serotonin receptors involved in vasopressin and oxytocin secretion // *J. Neuroendocrinol.* – 2003. – Vol. 15(3). – P. 242-9.
112. Johnston M.V. Excitotoxicity in perinatal brain injury // *Brain Pathol.* – 2005. – Vol.15. – P. 234-40.
113. Kantak K.M. Magnesium deficiency alters aggressive behavior and catecholamine function // *Behav. Neurosci.* – 1988. – Vol. 102(2). – P. 304-11.
114. Kayne L.H., Lee D.B. Intestinal magnesium absorption // *Miner. Electrolyte Metab.* – 1993. – Vol. 19(4-5). – P. 210-7.
115. Kim B.J., Jeon J.H., Kim S.J., So I., Kim K.W. Regulation of transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) currents by mitochondria // *Mol. Cells.* – 2007. – Vol. 23(3). – P. 363-9.
116. Kim H.J., Kim T.H., Choi S.J., Hong Y.J., Yang J.S., Sung K.W., Rhie D.J., Hahn S.J., Yoon S.H. Fluoxetine suppresses synaptically induced [Ca²⁺]_i spikes and excitotoxicity in cultured rat hippocampal neurons // *Brain Res.* – 2013. – Vol. 1490. – P. 23-34
117. Kjaer A. Vasopressin as a neuroendocrine regulator of anterior pituitary hormone secretion. // *Acta Endocrinol.Copenh.* – 1993. – Vol. 126. – P. 489.

118. Kovač R., et al. Endogenous Nitric Oxide Is a Key Promoting Factor for Initiation of Seizure-Like Events in Hippocampal and Entorhinal Cortex Slices // *J. Neurosci.* – 2009. – Vol. 29(26). – P. 8565– 8577.
119. Konrad M., Schlingmann K. P. and Gudermann T. Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis // *Am. J. Physiol Renal Physiol.* – 2004. – Vol. 286. – P. 599-605.
120. Krapivinsky G., Mochida S., Krapivinsky L., Cibulsky S. M. and Clapham D. E. The TRPM7 ion channel functions in cholinergic synaptic vesicles and affects transmitter release // *Neuron.* – 2006. – Vol. 52. – P. 485-496.
121. Kubota T., Shindo Y., Tokuno K., Komatsu H., Ogawa H., Kudo S., Kitamura Y., Suzuki K., Oka K. Mitochondria are intracellular magnesium stores: investigation by simultaneous fluorescent imaging in PC12 cells // *Biochim. Biophys. Acta* – 2005. – Vol. 1744. – P.19-28.
122. Ladner C.J., Lee J.M. Reduced high-affinity agonist binding at the M(1) muscarinic receptor in Alzheimer's disease brain: differential sensitivity to agonists and divalent cations // *Exp. Neurol.* – 1999. – Vol. 158(2). – P. 451-8.
123. Landfield P.W., Morgan G.A. Chronically elevating plasma Mg²⁺ improves hippocampal frequency potentiation and reversal learning in aged and young rats // *Brain Res.* – 1984. – Vol. 322(1). – P. 167-71.
124. Langeslag M., Clark K., Moolenaar W. H., van Leeuwen F. N. and Jalink K. Activation of TRPM7 channels by phospholipase C-coupled receptor agonists // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282. – P. 232-239.
125. Leicher C.R., Mezzoff A.G., Hyams J.S. Focal cerebral deficits in severe hypomagnesemia // *Pediatr Neurol.* – 1991. – Vol. 7(5). – P. 380-1.
126. Levine J., Stein D., Rapoport A., Kurtzman L. High serum and cerebrospinal fluid Ca/Mg ratio in recently hospitalized acutely depressed patients // *Neuropsychobiology.* – 1999. – Vol. 39(2). – P. 63-70.
127. Lewin G.R., Barde Y.A. Physiology of the neurotrophins // *An. Rev. Neurosci.* – 1996. - №19. – P. 289-317.
128. Li M., Jiang J., Yue L. Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7 // *J Gen Physiol.* – 2006. – Vol. 127. – P. 525-37.

129. Liu X., Wu Y., Zhou Y. Intracellular linkers are involved in Mg²⁺-dependent modulation of the Eag potassium channel // *Channels (Austin)*. – 2010. – Vol. 4(4). – P. 311-8.
130. Libby P., Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease // *Circulation*. – 2005. – Vol. 111(25). – P. 3481-8
131. Lipton S.A. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond // *Nat. Rev. Drug. Discov.* – 2006. – Vol. 5. – P. 160-70.
132. Ma J., Folsom A.R., Melnick S.L., Eckfeldt J.H., Sharrett A.R., Nabulsi A.A., Hutchinson R.G., Metcalf P.A. Associations of serum and dietary magnesium with cardiovascular disease, hypertension, diabetes, insulin, and carotid arterial wall thickness: the ARIC study. Atherosclerosis Risk in Communities Study // *J. Clin. Epidemiol.* – 1995. – Vol. 48(7). – P. 927-40.
133. MacDonald J.F. et al. Acute 5-HT₇ receptor activation increases NMDA-evoked currents and differentially alters NMDA receptor subunit phosphorylation and trafficking in hippocampal neurons // *Mol Brain*. – 2013. – Vol. 6(1). – P. 24.
134. Maier J.A., Mazur A., Rock E., Gueux E., Nowacki W., Rayssiguier Y. Magnesium and the inflammatory response: potential physiopathological implications // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2007. – Vol. 1;458(1). – P. 48-56.
135. Maier J.A., Ferrè S., Baldoli E., Leidi M. Magnesium deficiency promotes a pro-atherogenic phenotype in cultured human endothelial cells via activation of NFκB // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2010. – Vol. 1802(11). – P. 952-8.
136. Malpuech-Brugère C., Nowacki W., Gueux E., Kuryszko J., Rock E., Rayssiguier Y., Mazur A. Accelerated thymus involution in magnesium-deficient rats is related to enhanced apoptosis and sensitivity to oxidative stress // *Br. J. Nutr.* – 1999. – Vol. 81. – P. 405-11.
137. Madsen K.S., Jernigan T.L., Iversen P., Frokjaer V.G., Mortensen E.L., Knudsen G.M., Baaré W.F. Cortisol awakening response and negative emotionality linked to asymmetry in major limbic fibre bundle architecture // *Psychiatry Res.* – 2012. – Vol. 201(1). –P. 63-72.
138. Martin H., Uring-Lambert B., Adrian M., Lahlou A., Bonet A., Demougeot C., Devaux S., Laurant P., Richert L., Berthelot A. Effects of long-term dietary intake of magnesium on oxidative stress, apoptosis and ageing in rat liver // *Magnes. Res.* – 2008. – Vol. 21. – P. 124-30.

139. Massieu L., Tapia R. Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats in vivo // *J. Neurochem.* – 1997. – Vol. 69(3). – P. 1151-60.
140. Mattson M.P. Apoptosis in neurodegenerative disorders // *Nat. Rev. Cell Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 1. – P. 120-9.
141. Maurois P., Pages N., Bac P., German-Fattal M., Agnani G., Delplanque B., Durlach J., Poupaert J., Vamecq J. Threshold to N-methyl-D-aspartate-induced seizures in mice undergoing chronic nutritional magnesium deprivation is lowered in a way partly responsive to acute magnesium and antioxidant administrations // *Br. J. Nutr.* – 2009. – Vol. 101(3). – P. 317-21.
142. Mayer M.L., Westbrook G.L., Guthrie P.B. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurons // *Nature.* – 1984. – Vol. 309(5965). – P. 261-3.
143. McCoy M.A., Young P.B., Hudson A.J., Davison G., Kennedy D.G. Regional brain monoamine concentrations and their alterations in bovine hypomagnesaemic tetany experimentally induced by a magnesium-deficient diet // *Res. Vet. Sci.* – 2000. – Vol. 69(3). – P. 301-7.
144. Murakami A. Chemoprevention with phytochemicals targeting inducible nitric oxide synthase // *Forum Nutr.* – 2009. – Vol. 61. – P. 193-203.
145. McKinney M., Jacksonville M.C. Brain cholinergic vulnerability: relevance to behavior and disease // *Biochem. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 70(8). – P. 1115-24.
146. Mody I., Lambert J.D., Heinemann U. Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices // *J. Neurophysiol.* – 1987. – Vol. 57(3). – P. 869-88.
147. Monteilh-Zöller M. K., Hermosura M. C., Nadler M. J., Scharenberg A. M., Penner R. and Fleig A. TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions // *J. Gen. Physiol.* – 2003. – Vol. 121. – P. 49-60.
148. Morris R.G., Moser E.I., Riedel G., Martin S.J., Sandin J., Day M., O'Carroll C. Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of activity-dependent synaptic plasticity in memory // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* – 2003. – Vol. 29; 358(1432). – P. 773-86.
149. Murck H. Ketamine, magnesium and major depression - From pharmacology to pathophysiology and back // *J. Psychiatr. Res.* – 2013. – Vol. 47(7). – P. 955-65.

150. Murck H., Steiger A. Mg²⁺ reduces ACTH secretion and enhances spindle power without changing delta power during sleep in men -- possible therapeutic implications // *Psychopharmacology (Berl)*. – 1998. – Vol. 137(3). – P. 247-52.
151. Nadler M. J., Hermosura M. C., Inabe K., Perraud A. L., Zhu Q., Stokes A. J., Kurosaki T., Kinet J. P., Penner R., Scharenberg A. M. and Fleig A. LTRPC7 is a Mg-ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability // *Nature*. – 2001. – Vol. 411. – P. 590-595.
152. Nakagawa T., Sheng M. *Neurobiology*. A stargazer foretells the way to the synapse // *Science*. – 2000. – Vol. 290(5500). – P. 2270-1.
153. Olney J.W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate // *Science* – 1969. – Vol. 164. – P. 719-721.
154. Oyanagi K., Kawakami E., Kikuchi-Horie K., Ohara K., Ogata K., Takahama S., Wada M., Kihira T., Yasui M. Magnesium deficiency over generations in rats with special references to the pathogenesis of the Parkinsonism-dementia complex and amyotrophic lateral sclerosis of Guam // *Neuropathology*. – 2006. – Vol. 26(2). – P. 115-28.
155. Pagès N., Gogly B., Godeau G., Igondjo-Tchen S., Maurois P., Durlach J., Bac P. Structural alterations of the vascular wall in magnesium-deficient mice. A possible role of gelatinases A (MMP-2) and B (MMP-9) // *Magnes. Res.* – 2003. – Vol. 16(1). – P. 43-8.
156. Palacios-Prado N., et al. Intracellular magnesium-dependent modulation of gap junction channels formed by neuronal connexin36 // *J. Neurosci.* – 2013. – Vol. 33(11). – P. 4741-53.
157. Paravicini T.M., Chubanov V., Gudermann T. TRPM7: a unique channel involved in magnesium homeostasis // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2012. – Vol. 44(8). – P. 1381-4.
158. Paravicini T.M., Yogi A., Mazur A., Touyz R.M. Dysregulation of vascular TRPM7 and annexin-1 is associated with endothelial dysfunction in inherited hypomagnesemia // *Hypertens.* – 2009. – Vol. 53. – P. 423-9.
159. Parente L., Solito E. Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein // *Inflamm. Res.* – 2004. – Vol. 53(4). – P. 125-32.

160. Patel A., Sharif-Naeini R., Folgering J. R., Bichet D., Duprat F. and Honore E. Canonical TRP channels and mechanotransduction: from physiology to disease states // *Pflugers Arch.* – 2010. – Vol. 460. – P. 571-581.
161. Penner R. and Fleig A. The Mg²⁺ and Mg(2+)-nucleotide-regulated channel-kinase TRPM7 // *Handb. Exp. Pharmacol.* – 2007. – P. 313-328.
162. Poenaru S., Manicom R., Rouhani S., Aymard P., Bajenaru O., Rayssiguier Y., Emmanouillidis E., Gueux E., Nkanga N., Durlach J., Dall'ava J. Stability of brain content of magnesium in experimental hypomagnesemia // *Brain. Res.* – 1997. – Vol. 769(2). – P. 329-32.
163. Quintero J.E., Day B.K., Zhang Z., Grondin R., Stephens M.L., Huettl P., Pomerleau F., Gash D.M., Gerhardt G.A. Amperometric measures of age-related changes in glutamate regulation in the cortex of rhesus monkeys // *Exp. Neurol.* – 2007. – Vol. 208(2). – P. 238-46.
164. Rayssiguier Y., Gueux E., Weiser D. Effect of magnesium deficiency on lipid metabolism in rats fed a high carbohydrate diet // *J. Nutr.* – 1981. – Vol. 111(11). – P. 1876-83.
165. Rayssiguier Y., Mazur A. Magnesium and inflammation: lessons from animal models // *Clin. Calcium.* – 2005. – Vol. 15(2). – P. 245-8.
166. Rego A.C., Oliveira C.R. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases // *Neurochem. Res.* – 2003. – Vol. 28(10). – P. 1563-74.
167. Riedel G., Platt B., Micheau J. Glutamate receptor function in learning and memory // *Behav. Brain. Res.* – 2003. – Vol. 140(1-2). – P. 1-47.
168. Roberts E.L. Jr. Using hippocampal slices to study how aging alters ion regulation in brain tissue // *Methods.* – 1999. – Vol. 18(2). – P. 150-9.
169. Rodan A., Cheng C.J., Huang C.L. Recent advances in distal tubular potassium handling // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2011. – Vol. 300(4). – P. 821-7.
170. Romani A.M., Maguire M.E. Hormonal regulation of Mg²⁺ transport and homeostasis in eukaryotic cells // *Biometals.* – 2002. – Vol. 15. – P. 271-83.
171. Rondon L.J., Groenestege W.M., Rayssiguier Y., Mazur A. Relationship between low magnesium status and TRPM6 expression in the kidney and large intestine // *Am. J. Physiol.* – 2008. – Vol. 294. – P. 2001-7.

172. Rosenzweig E.S., Barnes C.A. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition // *Prog. Neurobiol.* – 2003. – Vol. 69(3). – P. 143-79.
173. Rude R.K. Magnesium deficiency: a cause of heterogeneous disease in humans // *J. Bone Miner. Res.* – 1998. – Vol. 13(4). – P. 749-58.
174. Runnels L.W., Yue L., Clapham D.E. TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities // *Scienc.* – 2001. – Vol. 291. – P. 1043-1047.
175. Ryazanova L.V., Rondon L.J., Zierler S., Hu Z., Galli J., Yamaguchi T.P., Mazur A., Fleig A. and Ryazanov A.G. TRPM7 is essential for Mg(2+) homeostasis in mammals // *Nat. Commun.* – 2010. – Vol. 1. – P. 109.
176. Sabour M.S. The nephropathy of experimental potassium deficiency. An electron microscopic study // *Q. J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci.* – 1962. – Vol. 47. – P. 262-72.
177. Sah N., Sikdar S.K. Transition in subicular burst firing neurons from epileptiform activity to suppressed state by feedforward inhibition // *Eur. J. Neurosci.* – 2013. – Vol. 10. – P. 122-62.
178. Sahni J., Scharenberg A.M. TRPM7 ion channels are required for sustained phosphoinositide 3-kinase signalling in lymphocytes // *Cell. Metab.* – 2008. – Vol. 8. – P. 84-93.
179. Saris N.E., Mervaala E., Karppanen H., Khawaja J.A., Lewenstam A. Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects // *Clin. Chim. Acta.* – 2000. – Vol. 294(1-2). – P. 1-26.
180. Sartori S.B., Whittle N., Hetzenauer A., Singewald N. Magnesium deficiency induces anxiety and HPA axis dysregulation: modulation by therapeutic drug treatment // *Neuropharmacology.* – 2012. – Vol. 62(1). – P. 304-12.
181. Shiekhattar R., Aston-Jones G. NMDA-receptor-mediated sensory responses of brain noradrenergic neurons are suppressed by in vivo concentrations of extracellular magnesium // *Synapse.* – 1992. – Vol. 10(2). – P. 103-9.
182. Schimatschek H.F., Rattanatayaron W., Classen H.G., Jensen U., Drescher B., Günther T. Increase of streptozocin toxicity by magnesium deficiency in the diabetic rat model // *Arzneimittelforschung.* – 1994. – Vol. 44(11). – P. 1237-41.

183. Schimatschek H.F., Rempis R. Prevalence of hypomagnesemia in an unselected German population of 16,000 individuals // *Magnes. Res.* – 2001. – Vol. 14(4). – P. 283-90.
184. Schmitz C., Dorovkov M.V., Zhao X., Davenport B.J., Ryazanov A.G., Perraud A.-L. The channel kinases TRPM6 and TRPM7 are functionally nonredundant // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280. – P. 37763-71.
185. Schulman M.P., Greenberg D.M. Effect of purified growth hormone on tumor growth // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1949. – Vol. 72(3). – P. 676.
186. Sharopov S., Moser J., Chen R., and al. Dopaminergic modulation of low-Mg²⁺-induced epileptiform activity in the intact hippocampus of the newborn mouse in vitro // *J. Neurosci. Res.* – 2012. - Vol. 90(10). - P. 2020-33.
187. Simon D.B., Lu Y., Choate K.A., Velazquez H., Al-Sabban E., Praga M., Casari G., Bettinelli A., Colussi G., Rodrigues- Soriano J., McCredie D., Milford D., Sanjad S., Lifton R.P. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption // *Science* – 1999. – Vol. 285. – P. 103-6.
188. Schlingmann K.P., Weber S., Peters M., Niemann N.L., Vitzthum H., Klingel K., Kratz M., Haddad E., Ristoff E., Dinour D., Syrrou M., Nielsen S., Sassen M., Waldegger S., Seyberth H.W. and Konrad M. Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family // *Nat. Genet.* – 2002. – Vol. 31. – P. 166-170.
189. Schmitz C., Perraud A. L., Johnson C. O., Inabe K., Smith M. K., Penner R., Kurosaki T., Fleig A. and Scharenberg A. M. Regulation of vertebrate cellular Mg²⁺ homeostasis by TRPM7 // *Cell.* – 2003. – Vol. 114. – P. 191-200.
190. Singewald N., Sinner C., Hetzenauer A., Sartori S.B., Murck H. Magnesium-deficient diet alters depression- and anxiety-related behavior in mice--influence of desipramine and *Hypericum perforatum* extract // *Neuropharmacology.* – 2004. – Vol. 47(8). – P. 1189-97.
191. Slutsky I., Abumaria N., Wu L.J., Huang C., Zhang L., Li B., Zhao X., Govindarajan A., Zhao M.G., Zhuo M., Tonegawa S., Liu G. Enhancement of learning and memory by elevating brain magnesium // *Neuron.* – 2010. – Vol. 65(2). – P. 165-77.
192. Spasov A.A., Zheltova A.A., Kharitonov M.V. Magnesium and the oxidative stress // *Russ. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova.* – 2012. – Vol. 98(7). – P. 915-23.

193. Spätling L., Classen H.G., Külpmann W.R., Manz F., Rob P.M., Schimatschek H.F., Vierling W., Vormann J., Weigert A., Wink K. Diagnosing magnesium deficiency. Current recommendations of the Society for Magnesium Research // *Fortschr. Med. Orig.* – 2000. – Vol. 118 (2). – P. 49-53.
194. Su L.-T., Agapito M. A., Li M., Simonson W. T., Huttenlocher A., Habas R., Yue L. and Runnels L. W. TRPM7 regulates cell adhesion by controlling the calcium-dependent protease calpain // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281. – P. 11260-11270.
195. Swaminathan R. Magnesium metabolism and its disorders // *Clin. Biochem. Rev.* – 2003. – Vol. 24(2). – P. 47-66.
196. Taniguchi R., Nakagawasai O., Tan-no K., Yamadera F., Nemoto W., Sato S., Yaoita F., Tadano T. Combined low calcium and lack magnesium is a risk factor for motor deficit in mice // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2013. – Vol. 77(2). – P. 266-70.
197. Takezawa R., Schmitz C., Demeuse P., Scharenberg A. M., Penner R. and Fleig A. Receptor-mediated regulation of the TRPM7 channel through its endogenous protein kinase domain // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2004. – Vol. 101. – P. 6009-6014.
198. Tejero-Taldo M.I., Chmielinska J.J., Weglicki W.B. Chronic dietary Mg²⁺ deficiency induces cardiac apoptosis in the rat heart // *Magnes. Res.* – 2007. – Vol. 20. – P. 208-12.
199. Thebault S., Cao G., Venselaar H., Xi Q., Bindels R.J., Hoenderop J.G. Role of the alpha-kinase domain in transient receptor potential melastatin 6 channel and regulation by intracellular ATP // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283. – P. 19999-20007.
200. Toescu E.C. Hypoxia sensing and pathways of cytosolic Ca²⁺ increases // *Cell Calcium.* – 2004. – Vol. 36(3-4). – P. 187-99
201. Touyz R.M., He Y., Montezano A.C., Yao G., Chubanov V., Gudermann T., Callera G.E. Differential regulation of transient receptor potential melastatin 6 and 7 cation channels by ANG II in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats // *Am. J. Physiol.* – 2006. – Vol. 290. – P. 73-8.
202. Torimitsu K., Furukawa Y., Tsukada S. Role of magnesium in nerve tissue // *Clin. Calcium.* – 2012. – Vol. 22(8). – P. 1197-203.

203. Trapani V., Mastrototaro L., Wolf F.I. Dietary Mg²⁺ regulates the epithelial Mg²⁺ channel TRPM6 in rat mammary tissue // *Magnes. Res.* – 2011. – Vol. 24(3). – P. 122-9
204. Tymianski M., and al. Suppression of hippocampal TRPM7 protein prevents delayed neuronal death in brain ischemia // *Nat. Neurosci.* – 2009. - Vol. 13. – P. 2085-2104.
205. Ueshima K. Magnesium and ischemic heart disease: a review of epidemiological, experimental, and clinical evidences // *Magnes. Res.* – 2005. – Vol. 18(4). – P. 275-84.
206. Vierling W., Liebscher D.H., Micke O., von Ehrlich B., Kisters K. Magnesium deficiency and therapy in cardiac arrhythmias: recommendations of the German Society for Magnesium Research // *Dtsch. Med. Wochenschr.* – 2013. – Vol. 138(22). – P. 1165-71.
207. Verive M.J., Irazuzta J., Steinhart C.M., Orlowski J.P., Jaimovich D.G. Evaluating the frequency rate of hypomagnesemia in critically ill pediatric patients by using multiple regression analysis and a computer-based neural network // *Crit. Care Med.* – 2000. – Vol. 28(10). – P. 3534-9.
208. Voets T., Nillius B., Hoefs S., van der Kemp A.W., G. Droogmans, Bindels R.J., Hoenderop J.G. TRPM6 forms the Mg²⁺ influx channel involved in intestinal and renal Mg²⁺ absorption // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 19-25.
209. Vink R., Nechifor M. Magnesium in the central nervous system. – Australia: University of Adelaide Press. – 2011. – 342 p.
210. Vink R., Wheaton P., Mathias J.L. Impact of pharmacological treatments on outcome in adult rodents after traumatic brain injury: a meta-analysis // *J. Psychopharmacol.* – 2011. – Vol. 25(12). – P. 1581-99.
211. Walder R.Y., Landau D., Meyer P., Shalev H., Tsolia M., Borochowitz Z., Boettger M.B., Beck G.E. Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia // *Nat. Genet.* – 2002. – Vol. 31. – P. 171-4.
212. Wang J.H., Ko G.Y., Kelly P.T. Cellular and molecular bases of memory: synaptic and neuronal plasticity // *J. Clin. Neurophysiol.* – 1997. – Vol. 14(4). – P. 264-93.
213. Wang Y. and Qin Z. H. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death // *Apoptosis.* – 2010. – Vol. 15. – P. 1382-1402.

214. Weglicki W.B., Phillips T.M. Pathobiology of magnesium deficiency: a cytokine/neurogenic inflammation hypothesis // *Am. J. Physiol.* – 1992. – Vol. 263(3). – P. 734-7.
215. Wei W.L., Sun H.S., Olah M.E., Sun X., Czerwinska E., Czerwinski W., Mori Y., Orser B.A., Xiong Z.G., Jackson M.F., Tymianski M., MacDonald J.F. TRPM7 channels in hippocampal neurons detect levels of extracellular divalent cations // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2007. – Vol. 104. – P. 16323-8.
216. Wolf F.I., Cittadini A. Chemistry and biochemistry of magnesium. *Mol. Aspects Med.* – 2003. – Vol. 24. – P. 3-9.
217. Xiao G., Hu W., Chen X. Magnesium Lithospermate B Protects Neurons from N-Methyl-D-Aspartic Acid Injury and Attenuates Kainic Acid-Induced Neurodegeneration in FVB Mice // *J. Mol. Neurosci.* – 2013. – Vol. 1. – P. 133-145.
218. Yu C., Nwabuisi-Heath E., Laxton K., Ladu M.J. Endocytic pathways mediating oligomeric A β 42 neurotoxicity // *Mol. Neurodegener.* – 2010. – Vol. 17. – P. 5-19.
219. Yuan X., Cui K. TRP Channels and Axon Pathfinding // *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. Boca Raton (FL): CRC Press; 2007. Chapter 4. *Frontiers in Neuroscience*.
220. Yuan J., Yankner B.A. Apoptosis in the nervous system // *Nature* – 2000. – Vol. 407(6805). – P.802-9.
221. Zhang Q., Hu B., Sun S., Deng X., Mei Y., Tong E. Rapid inhibition of the glutamate-induced increase of intracellular free calcium by magnesium in rat hippocampal neurons // *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* – 2004. – Vol. 24(5). – P. 424-6.
222. Zhang Y., Meng Y., Tregoubov V., Janus C., Cruz L., Jackson M., Lu W. Y., MacDonald J. F., Wang J. Y., Falls D. L. and Jia Z. Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice // *Neuron.* – 2010. – Vol. 35. – P. 121-133.