

УДК618.232:611.818:546.172.6-31

Г.Ю. Ишпахтин, Л.С. Логотова, Ю.И. Ишпахтин

МЕТАБОЛИЗМ ОКСИДА АЗОТА В ПРОДОЛГОВАТОМ МОЗГЕ ПЛОДА С УЧЕТОМ ПРЕДЛЕЖАНИЯ

Владивостокский государственный медицинский университет,
Московский областной НИИ акушерства
и гинекологии

Ключевые слова: оксид азота, продолговатый мозг, предлежание плода.

К важнейшим биохимическим медиаторам, вовлеченным в регуляцию физиологических и патофизиологических процессов, относится оксид азота (NO). Он синтезируется NO-синтазой, которая обладает диафоразной активностью, переносит электрон с NADPH на одноэлектронный акцептор и катализирует эквимольное образование NO в ходе реакции превращения L-аргинина в L-цитруллин [2]. Конститутивная NOS — мембрано-связанный фермент, который в отличие от лабильных неспецифических дегидрогеназ наиболее стабилен при фиксации [2, 8]. Это свойство позволяет исследовать активность конститутивной NOS с помощью гистохимической реакции на NADPH-диафорузу (NADPH-d) [11].

Исследовали продолговатый мозг 20 плодов: 6 плодов родилось в головном предлежании (1-я группа), 7 плодов родилось в тазовом предлежании (2-я группа) и 7 плодов родилось в головном предлежании в результате беременности, осложнившейся хронической фетоплацентарной недостаточностью (3-я группа). Причиной смерти плодов и новорожденных были преждевременная отслойка плаценты, предлежание плаценты, механические травмы, обвитие пуповины.

При изучении состояния NO-синтазы использовали метод V. Норе, S. Vincent [11] на NADPH-диафорузу. Материал фиксировали 2 часа при 4°C в 4% растворе параформальдегида на 0,1М натриево-фосфатном буфере (pH 7,4), промывали в 15% растворе сахарозы в течение суток. Криостатные срезы толщиной 25 мкм термостатировали в течение 1 часа при 37°C в среде следующего состава: 50 мМ Трис-буфер, 0,2% Тритон X-100, 0,8 мг/мл а-NADPH (Sigma), 0,4 мг/мл НСТ; pH 8,0. Активность фермента в нейронных структурах продолговатого мозга определяли по плотности гистохимического преципитата на цитоденситометре Vickers и выражали в единицах оптической плотности. Данные обрабатывали методом вариационной статистики с определением критерия достоверности по Стьюденту.

У плодов, родившихся в головном предлежании, можно идентифицировать три типа нейронов: с высокой, умеренной и низкой активностью фермента. Клетки с высоким уровнем активности NADPH-диа-

форазы окрашивались в темно-синий цвет. Их дендриты маркировались на значительном протяжении от клеточного тела. Иногда можно было проследить полное окрашивание аксодендритного ветвления. В клетках с умеренной активностью преципитат фиолетового цвета выявлялся в начальных сегментах дендритов и перикарионе, оставляя свободной ядерную зону. В нейронах с очень низкой степенью активности NADPH-диафоразы осадок формазана приобретал бледно-голубой цвет и лишь слегка контурировал поверхность перикариона, не указывая на наличие отростков клетки.

Активность NADPH-диафоразы в продолговатом мозге у плодов при головном предлежании обнаруживалась в нейронах холинергических и серотонинергических ядер.

Наиболее крупным образованием комплекса ядер шва является бледное или большое ядро (n. raphe pallidus). Будучи непарным, оно впервые появляется на поперечных срезах продолговатого мозга, проведенных через середину нижней оливы. Выше ядро увеличивается в размере и достигает кульминации своего развития на уровне перехода в мост. На срезах, проведенных через верхушку ядра нижней оливы, бледное ядро шва приобретает форму неправильного четырехугольника. Сзади и снаружи от него в продолговатом мозгу располагаются ретикулярное гигантоклеточное ядро и ретикулярное парамедианное ядро, а в мосту — ретикулярное гигантоклеточное нижнее ядро моста. Нейроны бледного ядра шва имеют среднюю и крупную величину, веретеновидную, округлую, треугольную или мультиполярную форму; при окрашивании по Нисслю в перикарионе нейронов на периферии выявляется лишь несколько глыбок тигроида, что является их главным отличительным признаком [4]. При окрашивании на NADPH-диафорузу нейроны ядра содержали иссиня-черный преципитат формазана, что является показателем очень высокой активности энзима (рис. 1, а).

Дорсальное ядро блуждающего нерва, парное, лежит сзади и снаружи от центрального канала и ядра подъязычного нерва. Ядро достигает высоты своего развития на уровне раскрытия центрального канала в четвертый желудочек, где образует треугольник ядра блуждающего нерва, который располагается латеральнее от треугольника подъязычного нерва. Ядро состоит из трех клеточных групп: задней, передней наружной и передней внутренней. Нейроны дорсального ядра блуждающего нерва характеризуются малым и средним размером, имеют различную форму — веретеновидную, округлую или овальную. При реакции на NADPH-диафорузу выявлялись единичные клетки (рис. 1, б). Их было больше в ростральной области ядра, где также отмечается преобладание элементов с умеренной активностью энзима. Относительное количество NADPH-d-позитивных нейронов в дорсальном ядре блуждающего нерва составляло $7,4 \pm 2,3\%$.

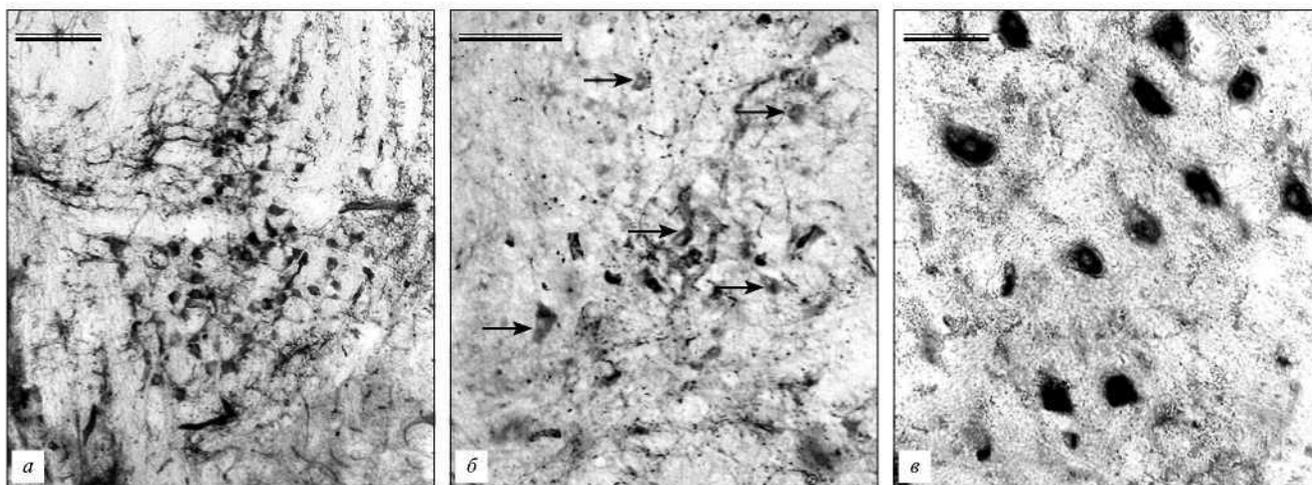


Рис. 1. NADPH-диафараза продолговатого мозга плода человека 37 недель беременности (головное предлежание). а - бледное ядро шва; б - дорсальное ядро блуждающего нерва. Маркируются нейроны с низкой и умеренной активностью NADPH-диафаразы (стрелки); в — нейроны двойного ядра. Масштаб: а — 200 мкм; б, в — 100 мкм.

Ядро подъязычного нерва, парное, определяется на поперечных срезах, проведенных через нижнюю половину продолговатого мозга; нижней границей ядра является верхнее поле супраспинального ядра, верхней — нижнее поле ядра Марбурга (*n. praepositus hypoglossi*). Ядро имеет форму цилиндра, суженного к нижнему концу, и достигает у плодов человека 8-10 мм в длину. На поперечных срезах нижняя часть ядра располагается спереди и снаружи от центрального канала. На уровне перехода последнего в четвертый желудочек верхняя часть ядра образует возвышенность, называемую треугольником подъязычного нерва. В этом треугольнике сзади и снаружи от ядра подъязычного нерва располагается вставочное ядро (Стадерини) и заднее ядро блуждающего нерва, а спереди определяется ядро Роллера. При специфической реакции на NADPH-диафаразу в нейропиле ядра выявлялись одиночные астроциты и микрососуды. Нейроны ядра подъязычного нерва не реагировали, либо имеют низкую активность энзима. Следует отметить, что позитивное окрашивание клеток на NADPH-диафаразу появляется в смежном холинергическом ядре — *n. praepositus hypoglossi*.

Двойное ядро представляет собой длинный клеточный тяж, который на поперечных срезах определяется в виде немногочисленной группы из 10-15 нейронов. Спинальный полюс ядра располагается среди нервных клеток латерального поля центрального ретикулярного ядра продолговатого мозга; верхушка ядра достигает верхней трети моста и лежит в окружении нейроцитов мелкоклеточного ретикулярного ядра. Длина двойного ядра в нижневерхнем направлении достигает у человека 16 мм. На всем протяжении двойное ядро граничит с ядром спинно-мозгового пути тройничного нерва, которое огибает его сзади и снаружи. При окрашивании срезов продолговатого мозга на NADPH-диафаразу нейроны двойного ядра выявлялись как компактные скопления крупных

мультиполюров, «смешивающихся» по периферии с популяцией мелких клеток ретикулярной формации (рис. 1, в). Доля NADPH-d-позитивных нейронов двойного ядра у человека составляет $8,4 \pm 2,3\%$ [1, 5, 6]. Так, активность NADPH-диафаразы в базальных отделах продолговатого мозга составила $143,2 \pm 4,6$ ед., в дистальных отделах активность была чуть ниже — $130,6 \pm 7,8$ ед. В среднем нитрооксидпродуцирующая функция всех исследуемых структур продолговатого мозга при головном предлежании составила $136,7 \pm 11,8$ ед.

Обобщая данные продукции NO при головном предлежании, можно отметить, что каждый момент времени тонус сосудов, а следовательно, и уровень артериального давления, определяется балансом вазоконстрикторных и вазодилаторных влияний на гладкомышечные волокна сосудистой стенки. Характерной особенностью NO является способность быстро диффундировать через мембрану в межклеточное пространство и легко проникать в клетки-мишени. Внутри клетки он активирует один фермент и ингибирует другие. Ингибиторы NO вызывают сокращение сосудов мозга, и в ряде случаев их введение сопровождается снижением базального мозгового кровообращения, в том числе и в периоде антенатального онтогенеза с вытекающим отсюда последствием [7].

При тазовом предлежании в продолговатом мозге наряду с нейронами NADPH-диафараза обнаруживалась в астроцитах, олигодендроцитах и капиллярах мозга. Астроциты характеризовались малыми размерами, не совсем правильной формой тела и наличием тонких отростков, которые расходились по радиусам перикариона, лежали по ходу сосудов, главным образом капилляров. Округлые крупные ядра клеток располагались в центре перикариона, не образуя осадка (рис. 2). Подобные им по форме и размеру клетки были видны в сером веществе ядер, на основании чего они определялись нами тоже как астроциты [4].

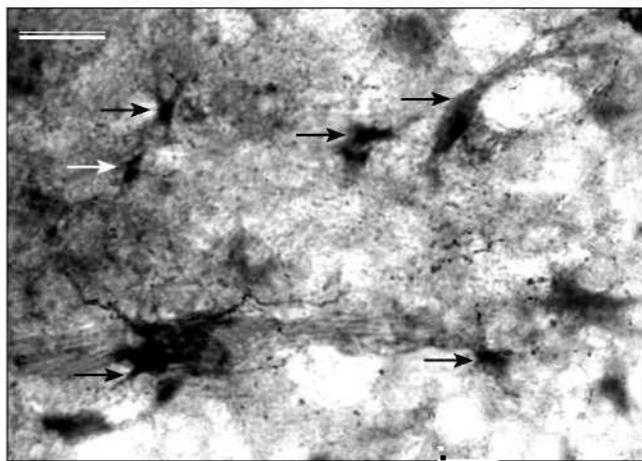


Рис. 2. Астроциты (стрелки) с позитивной реакцией на NADPH-диафорузу в продолговатом мозге плода человека 40 недель беременности (тазовое предлежание). Масштаб 50 мкм.

Элементы глии также выявлялись в белом веществе, где формировали ряды вдоль нервных волокон. Стенки сосудов окрашивались в голубой или синий цвет, на фоне которого хорошо просматривались прозрачные, овальной формы ядра эндотелиоцитов. Характер окраски, цвет осадка и его плотность были идентичны, что, очевидно, указывало на одинаковую активность фермента в астроцитах и сосудах мозга.

При тазовом предлежании активность фермента в продолговатом мозге была снижена. Нитрооксидпродуцирующая функция всех исследованных структур была минимальной и составила $118,8 \pm 11,5$ ед., что значительно ниже, чем в первой группе. Последовательное снижение активности NADPH-диафоразы продолговатого мозга плода при тазовых предлежаниях, по-видимому, связано со снижением уровня эстрогенов (что было отмечено в ранее проведенных работах) [3, 9].

Для сравнения и более наглядного представления об NO-продуцирующей функции структурных элементов продолговатого мозга плодов, родившихся в головном или тазовом предлежании, ряд исследований провели у плодов, родившихся в головном предлежании, где течение беременности осложнилось развитием хронической фетоплацентарной недостаточности (3-я группа). В зависимости от того, была или нет фетоплацентарная недостаточность, имели место определенные особенности NO-продуцирующей функции в различных отделах изучаемых тканей. Так, активность NADPH-диафоразы в базальных отделах продолговатого мозга уменьшилась по сравнению с контролем на 10% и составила $130,6 \pm 7,8$ ед.

Дистальные отделы демонстрировали пониженную активность фермента, которая изменяла контрольные значения на 23% и составила $100,6 \pm 6,8$ ед. В среднем при развитии хронической фетоплацентарной недостаточности NO-продуцирующая функция всех исследуемых структур продолговатого мозга была минимальной и ниже, чем в 1-й группе, на 20%.

Снижение уровня NO при тазовых предлежаниях неблагоприятно сказывается на артериальном давлении (больше гипертензивных синдромов), по-видимому, за счет снижения выделения простациклина эндотелиальными клетками, сопровождаемого увеличением выделения тромбоксана, снижением концентрации серотонина и релаксинопосредованной вазодилатации.

Детальное рассмотрение вопросов, связанных с участием NO в регуляции кровообращения изучаемых органов, выходит за рамки данных исследований, представляя собой специальную область исследований [5, 6]. В нашей работе мы ищем методы в попытке использовать доноров NO и ингибиторов NO-синтазы в качестве возможных модуляторов системы регулирования влияния NO как мессенджера, который запускает цепь реакций, ведущих к более полноценной активности органов плода. В частности, предполагается, что NO, действуя как ретроградный мессенджер, запускает цепь реакций, ведущих к ограничению распространения судорожной активности и, таким образом, может рассматриваться как эндогенный антиконвульсант, хотя молекулярные механизмы, лежащие в основе наблюдаемой генерации NO, остаются недостаточно изученными. Можно предположить, что начальные звенья «пусковой» реакции могут быть общими [10].

Воздействуя непосредственно на клетки гладких мышц сосудов, оксид азота снимает ацетилхолиндуцированную вазоконстрикцию и повышает внутриклеточный уровень циклического гуанозин-монофосфата. Последний снижает фосфорилирование контрактильных белков, что подтверждается при изучении влияния доноров оксида азота на соседний кровоток и при оценке результатов их длительного применения в целях профилактики и лечения сердечно-сосудистых и церебрососудистых заболеваний [6].

Таким образом, в продолговатом мозге при тазовых предлежаниях наблюдается компенсаторное, статистически значимое снижение активности NADPH-диафоразы, которое сопоставимо с изменениями, наблюдаемыми при хронической фетоплацентарной недостаточности в головном предлежании. По мере прогрессирования патологического процесса наступает тотальное истощение NO-продуцирующей функции во всех органах, что сопряжено со склеротическими изменениями и клинически проявляется выраженной функциональной недостаточностью.

Литература

1. Барашков Д.И., Бессонова Ю.В. // *Акушерство и гинекология*. - 1997. - №2. - С. 28-33.
2. Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б., Реутов В.П. // *Вестник РАМН*. - 2000. - №4. - С. 30-34.
3. Кан Н.Е. *Состояние внутриутробного плода и ранняя адаптация новорожденных в зависимости от пола и предлежания плода: автореф. дис... канд. мед. наук.* — Владивосток, 2000.

4. Кутушева Г.Ф. // *Тазовое предлежание плода.* — М., 1982. — С. 26-30.
5. Малышев И.Ю. // *Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол.* — 1997. — № 1. — С. 49-55.
6. Манухина Е.Б., Малышев И.Ю., Архипенко Ю.В. // *Вестник РАМН.* — 2000. — № 4. — С. 16-21.
7. Мотавкин П.А., Дюйзен И.В. // *Тихоокеанский медицинский журнал.* — 2003. — № 2. — С. 11-16.
8. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е. *Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих.* — М.: Наука, 1997.
9. Черуха Е.П. // *Акушерство и гинекология.* — 2000. — № 5. — С. 26-31.
10. Adams D.R., Brochicq-Zewinski, Butler A.R. // *Fortsehr. Chem. Org. Naturst.* — 1999. — Vol. 76, No. 1. — P. 211.
11. Hope V.T., Vincent S.R. // *Histochem. Cytochem.* — 1989. — Vol. 37. — P. 653-661.

Поступила в редакцию 30.11.04.

NITRIC OXIDE FORMATION IN FETUS OBLONG BRAIN TAKING INTO ACCOUNT HIS PRESENTATION
G.Yu. Ishpachtin, L.S. Logutova, Yu.I. Ishpachtin
Vladivostok State Medical University, Moscow regional research institute of obstetrics and gynecology

Summary — NO-synthetase localisation and activity was examined by method of V. Hope, S. Vincent on NADPH-diaphorase (NADPH-d, coenzyme factor). It is possible to identify three types NADPH-d-positive cells with high, medium and low activity of enzyme during research of oblong brain cuts painted on NADPH-d. Enzyme's activity in pelvic presentation of the fetus to decrease to 9%, in comparison with cranial presentation. NO-inhibitors causes constriction of brain vessels, and in some cases their administration is accompanied by basal blood circulations decrease in these organs, including in antenatal period of ontogenesis with consequences following from here.

Pacific Medical Journal, 2005, No. 1, p. 24-27.

УДК616.8-091.81:611.89:611.843.1

Н.Ю. Матвеева, Н.Е. Романова

НЕЙРОНЫ ГАНГЛИОЗНОГО СЛОЯ СЕТЧАТКИ ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА

Владивостокский государственный медицинский университет

Ключевые слова: сетчатка, ганглиозные клетки.

Унифицированная морфологическая классификация ганглиозных нейронов сетчатки глаза человека отсутствует. Наиболее подробно разнообразие этих клеток было описано в первой половине 20 века [4, 7]. Позднее авторы разделили ганглиозные клетки на две группы по принадлежности их аксонов к определенному слою латерального колечатого тела [3]. К Р-ганглионарам отнесены клетки, аксон которых связан с нейронами парвоцеллюлярного слоя [5]. Другая группа крупных ганглиозных клеток обозначена как М-нейроны, аксон которых заканчивается в магноцеллюлярном слое [6, 8]. М-нейроны, обладающие наиболее яркими морфологическими признаками, оказались удобными для характеристики развития ганглиозных клеток.

В работе использовался материал, полученный при медицинских абортах. Исследовано 7 глаз, взятых на 11-12-й неделе (I триместр), 7 глаз, взятых на 20-21-й неделе (II триместр) и 7 глаз, взятых на 30-31-й неделе (III триместр) внутриутробного развития. Для выявления ганглиозных клеток вместе с их отростками применялся метод импрегнации серебром по Гольджи. Материал фиксировали в смеси из 40 мл 3% бихромата калия и 10 мл 1% тетраоксида осмия при 37°C. Время фиксации определялось размерами глаза. Блок обсушивали фильтрованной бумагой, ополаскивали 0,75% раствором азотно-кислого серебра и помещали в такой же раствор при 25°C на 1-2 дня. Быстро промывали 40° спиртом в течение 1-2 ча-

сов. Последовательно переносили в 80° и 96° спирт. Заливали в парафин.

Фиксацию материала для электронно-микроскопических исследований проводили в 2,5% охлажденном растворе глутарового альдегида (рН 7,3) на 0,1М буфере в течение 10 минут. Выделенные участки стенки глаза дофиксировали в перфузионном растворе в течение еще 3 часов. Затем материал отмывали в 0,1М фосфатном буфере (рН 7,3) в течение 18-20 часов в ледяной бане при +4°C. Материал дофиксировали в 1% растворе четырехоксида осмия по G. Millonig в течение 2 часов при температуре 4°C с последующей двойной промывкой в том же буфере по 10 минут. Ткань дегидрировали в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне. Материал заливали в смесь эпона-812 и аралдита. Ультратонкие срезы исследовали в электронном микроскопе при ускоряющем напряжении 75 кВ и увеличении от 10 000 до 60 000 раз.

В составе гигантских диффузных нейронов [7] по положению дендритов мы выделили три вида клеток. К первому виду были отнесены нейроны с монолярным густым пучком дендритов, направленных целиком во внутренний сетчатый слой (рис. 1, а, 2, а). Размеры их тела, толщина и степень ветвления дендритов по мере созревания сетчатки значительно увеличивались. В I триместре преобладали клетки, дендриты которых образовывали фигуру, напоминавшую раскрытый зонтик (тип А). Профиль тела нейрона имел площадь от 294 до 317 мкм², толщина материнских дендритов — 3,5-4,5 мкм. Совместно с типом А, но реже, встречались во многом на них похожие клетки, которые отнесены нами к типу В. Однако профильное поле нейронов В было больше во много раз (1715-1826 мкм²), а толщина умеренно ветвящихся дендритов или равна (3,5 мкм), или больше (7,5 мкм), чем у нейронов типа А. Нейроны типа В более многочисленны у плодов II триместра. Можно предположить, что нейроны В — это более развитые клетки типа А. Количество последних во II триместре уменьшалось.