

УДК612.822.5:611.813.1]:546.172.6-31:547.466.6

А. Г. Матвеев

ФЕНОМЕН ЦИТОТОКСИЧНОСТИ И МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕЙРОНОВ НОВОЙ КОРЫ ПРИ ГИПОКСИИ И ИШЕМИИ

Владивостокский государственный медицинский университет

Ключевые слова: нейроны головного мозга, оксид азота, глутамат, цитотоксичность.

Вскоре после того, как Ван Харревелд обнаружил длительную деполяризацию нейронов неокортекса при аппликации глутамата и аспартата, Т. Hayashi [25] описал гибель нервных клеток вокруг очагов инъекции моновалентной соли глутаминовой кислоты. Локальное поражение нейронов от токсического действия возбуждающего медиатора получило впоследствии название «смерть от перевозбуждения», или «феномен эксайтотоксичности» [1]. Становление феномена влечет за собой метаболические, медиаторные и структурные изменения нейронной сети с непрямым развитием некроза и апоптоза корковых клеток.

В настоящее время глутамат признан основным возбуждающим нейромедиатором для всей центральной нервной системы [8, 26]. Потенциация его синаптического действия является триггером патологических расстройств, связанных с гипоксией и окислительным стрессом. Изменения микроциркуляторного окружения нейронов дополняются на функциональном уровне дефицитом нейровазальной регуляции и тормозящих синаптических процессов. В настоящем обзоре на основе данных литературы и собственных исследований авторов обсуждаются некоторые аспекты медиаторных и нейрорегуляторных механизмов новой коры в условиях окислительного стресса и ишемии.

ТЕОРИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Особая уязвимость неокортекса к ишемическим повреждениям определяется чрезвычайной интенсивностью окислительных реакций, необходимых для постоянного восполнения пластического и энергетического обмена нейронов и глиальных клеток. Мозг человека, составляющий приблизительно 2% от общей массы тела, утилизирует 95% всего потребляемого кислорода [2]. При прекращении снабжения мозга субстратами из крови эндогенные ресурсы могут обеспечить нормальный метаболизм лишь в течение 10–15 мин. у человека и около 5–10 мин. у крысы [7]. Аноксия не только оказывает мощное деполяризующее действие на нейроны, последующая реперфузия крови через участок ишемии ведет к развитию окислительного стресса. Последний характеризуется

образованием агрессивных форм кислорода и недостаточностью системы антиоксидантной защиты в зоне ишемизации [11].

Окислительный стресс как неизменный спутник гипоксии и ишемии имеет решающее значение в механизмах повреждения мозга при болезни Альцгеймера и Паркинсона, хореи Гентингтона, эпилепсии и других нейродегенеративных заболеваний [15]. Пусковым элементом процесса на пике развития феномена эксайтотоксичности выступает массивное поступление в клетки ионов Ca^{2+} . Избыточная продукция глутамата нейронами ведет к утечке медиатора из синаптической щели и дальнейшей активации одноименных рецепторов на всех клетках из их ближайшего микроокружения (рис. 1). При этом ионотропные рецепторы регулируют поступление внеклеточного кальция в цитоплазму нейронов, а метаботропные рецепторы обеспечивают высвобождение ионов из каналов эндоплазматического ретикулума. Функциональная неоднородность рецепторов, зависящая от их пост-, пре- или экстраинаптической локализации, является определяющей в реализации физиологических эффектов аспартата и глутамата. Если ионотропные рецепторы чаще располагаются в области активных зон синаптических контактов, то метаботропные рецепторы занимают преимущественно околосинаптическую позицию и активируются при длительной экспозиции или гиперпродукции медиаторов. Объемное влияние глутамата, связывание его рецептором и вход Ca^{2+} — синхронизированные процессы, необходимые для формирования всех звеньев цитотоксичности [2].

Перевозбуждение глутаматных рецепторов оказывает основное поражающее действие на нейроны, которое реализуется посредством образования свободных радикалов и перекисного окисления липидов (рис. 1). Ареал токсического действия супероксидных анионов определяется константой их диффузии. Метаболиты оксида азота (NO) способны диффундировать приблизительно на 130 мкм от источника, супероксид — на 4 мкм, пероксинитрит — на 9 мкм, а гидроксильные радикалы распространяются на расстояние, не превышающее 1 нм [11]. Поскольку диаметр тела нейрона составляет в среднем 10–25 мкм, деструктивный эффект анион-радикалов будет сфокусирован главным образом на его внутриклеточных компартментах.

Токсические оксиданты нарушают связи между компонентами клеточных мембран и цитоплазматических белков, что на фоне стремительно возрастающей гипервозбудимости нейронов усугубляет аноксию и энергетический дисбаланс клеток [18]. Этот «порочный круг» дополняется накоплением ионов калия, повышением осмолярности межклеточного пространства, набуханием нейронов и глии и в конечном итоге — снижением проницаемости нейрона для ионов и медиаторов.

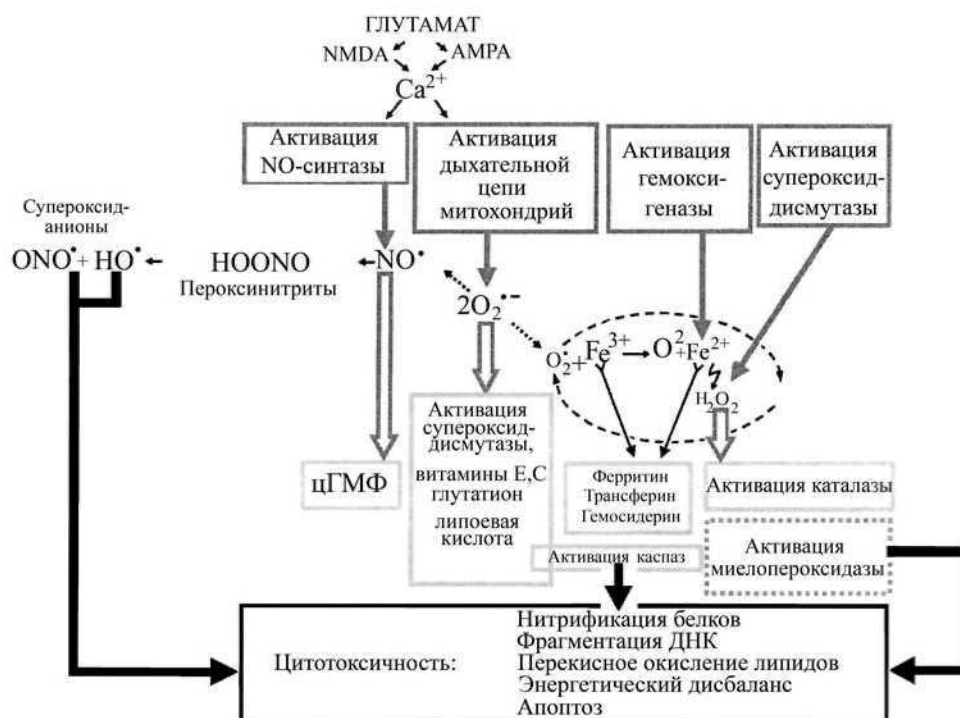


Рис. 1. Схема формирования окислительного стресса и глутаматной цитотоксичности (по Bidmon et al., Chan и Lipton). Избыточное синаптическое высвобождение глутамата активирует ионотропные NMDA- и AMPA-подтипы рецепторов, вызывающие массивный приток ионов Ca^{2+} в цитоплазму постсинаптического нейрона. Кальций запускает каскад ферментативных реакций, в результате которых происходит выработка свободных радикалов. Накопление последних ведет к интоксикации и гибели нервной клетки.

Деструктивное действие свободных радикалов опосредуется деаминированием нуклеотидов ДНК и в этом случае рассматривается как патогенетическое звено в сценарии «энергетического голода» [11]. Последующая фрагментация цепи ДНК активирует NAD-зависимую поли(ADP-рибозо)полимеразу (ПАРП), которая катализирует присоединение ADP-рибозы к белкам-гистонам и ДНК. Аберрация ДНК вызывает стрессорную реакцию в клетке и прикрепление ПАРП к месту разрыва цепочек, после чего связанный фермент увеличивает синтез короткоживущих полимеров. Для транспортирования 1 моля ADP-рибозы требуется 1 моль NAD^+ и 4 моля АТФ, что при значительной мобилизации ПАРП после обширных повреждений ДНК быстро истощает энергетический запас клетки [14]. Активные метаболиты кислорода стимулируют также ADP-зависимое рибозилирование глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы, следующую за этим инактивацию фермента и нарушение реакций гликолиза.

Если избыточное образование свободных радикалов потенцирует механизмы повреждения нейрона, то факторы, снижающие их выработку, можно считать компенсаторными (рис. 1). В этом смысле особое внимание исследователей привлекает семейство супероксиддисмутаз, которые утилизируют супероксидные анионы, превращая их в перекись водорода и молекулярный кислород [21].

В зависимости от субклеточной локализации и активности супероксиддисмутазы разделяются на мито-

хондриальную Mn-зависимую изоформу и цитозольную — Cu/Zn-зависимую. Эффективность нейропротективного действия супероксиддисмутаз повышается при гипоксии и глутаматной цитотоксичности, за счет транслокации дополнительных порций фермента из интерстициального пространства внутрь клетки. Поэтому в культуре корковых нейронов у трансгенных мышей, генетически предрасположенных к гиперсекреции супероксиддисмутаз, имеет место почти абсолютная резистентность клеток к токсичности NMDA и фокальной ишемии [22]. Важно отметить, что степень активности и протективные свойства нейрональной супероксиддисмутазы находятся в определенной зависимости от уровня выработки NO, образования супероксидов и концентрации ионов Ca^{2+} .

По нашим наблюдениям, индукция митохондриальной изоформы супероксиддисмутазы выявляется в NO-ергических интернейронах новой коры, находящихся вблизи зоны ишемического инсульта уже в ранние сроки после повреждения (рис. 2, а). Этот факт позволяет объяснить селективную устойчивость NO-ергических клеток, составляющих всего 2% всей клеточной популяции коры. При этом пирамидные клетки, не экспрессирующие нитроксидсинтазу (NOS), как правило, меняют свой облик и погибают в 70% случаев. Так как эндогенная NOS способна напрямую продуцировать супероксидные анионы, вызывающие аутоинтоксикацию клетки, то наличие в ней супероксиддисмутазы можно рассматривать как элемент ферментативной защиты. В результате ее активации в зоне ишемического инсульта ингибируется

продукция свободных радикалов и блокируется активность каспаз — ферментов, инициирующих апоптоз [29].

СТРУКТУРНЫЕ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ КЛЕТОК КОРЫ В УСЛОВИЯХ РЕДУЦИРОВАННОГО КРОВотоКА

Структурная реорганизация корковых нейронов вследствие аноксии и перевозбуждения сводится к метаболическим изменениям цитоплазмы и синапсомодификации. Ранним признаком гипоксии является появление в дендритах включений различной плотности. Структурные изменения в фокусе ишемии заключаются в неспецифических дистрофических и некротических изменениях нейронов и синапсов, очаговом выпадении клеток, нейронофагии, разрежении нейропиля и глиозе. При ишемическом инсульте в моторной коре крыс постоянно обнаруживается интенсивная реакция зрелых астроцитов с иммунореактивным глиальным кислым фибриллярным белком (рис. 2,б). Выработка белка маркирует раздраженные клетки, обычно сопровождается активацией трофических факторов, защищающих астроциты и нейроны от перевозбуждения и гибели [23].

Пролонгированная и чрезмерная активация афферентного входа меняет сопротивление дендритного шипикового аппарата клеток, адаптируя его к возросшему уровню глутаматергического возбуждения. Спустя 3 недели после окклюзии средней мозговой артерии у крыс имеет место значительное увеличение плотности шипиков на дистальных дендритах пирамидных нейронов II и III слоев в контралатеральном от очага ишемии полушарии большого мозга. Однако в нейронах VI слоя подобные изменения не выявлены [28]. Предполагается, что это явление обусловлено дистантными кортико-кортикальными связями пирамидных клеток III слоя, формирующих топически организованные проекции в соответствующие области коры «своего» и соседнего полушарий.

К адаптивным структурным модификациям поврежденного нейрона следует отнести коллатеральный рост аксонов, который обнаруживается уже в первые сутки после ишемического инсульта и продолжается в течение нескольких недель. Процесс компенсации восполняет утраченные связи, уравнивает баланс между тормозными и возбуждающими механизмами коры, выступает элементом пластичности и регенерации в очаге ишемии.

Повреждение и снижение функциональной активности нейронов представляют собой относительно обратимые явления, однако процесс восстановления их зависит от регенерации связей между различными группами нейронов. Этот процесс детерминирован секрецией различных нейроростковых факторов и рецепторов нейротрофинов [12]. Оказывая влияние на продвижение медиаторов, локализацию, адгезивные свойства и связи нейронов в коре, они создают благоприятный метаболический фон для регенерации си-

наптических терминалей, опосредуют двусторонний обмен информацией между нейронами и совершенно необходимы для выживания и нормального функционирования пре- и постсинаптических клеток.

В сложную систему регуляции морфогенеза после ишемии включаются гликопротеины клеточной поверхности и внеклеточного матрикса [12]. Гликопротеин тенаascin, ингибирующий или активирующий аксональный рост, играет здесь особенно важную роль. Так, тенаascin-иммунонегативные, непродлиферирующие астроциты стимулируют рост аксонов пирамидных клеток. Напротив, тенаascin-позитивные с интенсивной пролиферацией астроциты, постоянно появляющиеся в зоне инсульта, тормозят рост и реорганизацию синаптических терминалей. Структурные модификации в фокусе ишемии протекают одновременно с уменьшением плотности тормозных NO-ергических интернейронов [9, 24].

ЗНАЧЕНИЕ НЕЙРОВАЗАЛЬНЫХ МЕССЕНДЖЕРОВ В РЕГУЛЯЦИИ ЛОКАЛЬНОГО КРОВотоКА И МЕХАНИЗМАХ ОКСИДАТИВНОЙ ЗАЩИТЫ

Механизмы мозгового кровообращения функционируют в результате взаимодействия различных регуляторных факторов, среди которых интимальный (эндотелиозависимый) и нейровазальный признаны преобладающими [4]. Развитие этой концепции связано с открытием специфических сигнальных молекул — NO, нейропептида Y, вазоинтестинального полипептида и ангиотензина, посредством которых нейроны адаптируют состояние локальной гемодинамики к уровню своей метаболической активности [3, 16, 19]. Данные соединения имеют гетерогенную локализацию в различных типах нейронов, что определяет неодинаковое поражение последних в условиях ишемии. Так, пирамидные нейроны коры экспрессируют вазопрессорное вещество ангиотензин, а непиримидные локальные интернейроны — нейропептид Y, вазоинтестинальный полипептид и NO, оказывающие, напротив, релаксирующее влияние на микрососуды [3, 27].

Мощный релаксирующий эффект на внутрикорковые сосуды опосредуется также у-аминомасляной кислотой, которая выделяется в участках периваскулярных контактов тормозных интернейронов [20]. Расширение сосудов в этой ситуации опосредуется активностью подтипов ее рецепторов [20]. Иммунореактивная у-аминомасляная кислота выявляется в цитоплазме эндотелиоцитов, а на люминальной поверхности капилляров обнаруживается система высокоаффинной ее транспортировки.

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В ПАТОГЕНЕЗЕ КОРКОВОЙ ИШЕМИИ

NO является медиатором NMDA-зависимой глутаматной цитотоксичности, которая купируется в эксперименте введением антагонистов NMDA-рецепторов либо ингибиторов NOS [1, 5, 6]. Известно,

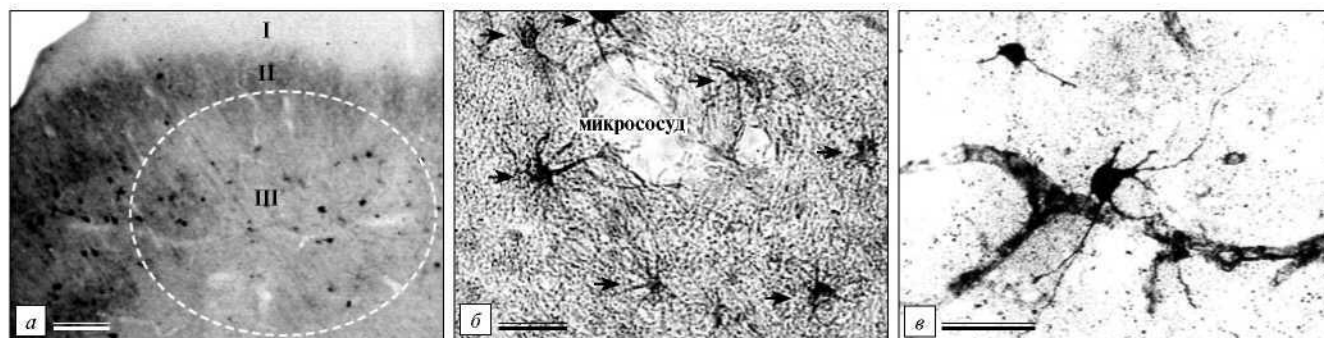


Рис. 2. Нейрохимическая специализация клеток в зоне ишемического инсульта (пунктир) моторной коры крысы. а - интернейроны с положительной реакцией на Mn-зависимую супероксиддисмутазу, I-III - слои коры; б - индукция глиального кислого фибриллярного белка в астроцитах (стрелки) вокруг очага ишемического повреждения; в - тесная ассоциация NADPH-диафоразопозитивного интернейрона с микрососудом. Масштаб: а — 150 мкм, б, в — 20 мкм.

что NOS экспрессируется клетками перифасцикулярного таламического ядра, стимуляция которого повышает локальный кровоток. Применение специфических ингибиторов NOS — N-нитро-L-аргинина, N-нитро-L-аргинин-метил-эфира, N-монометил-L-аргинина — приводит к снижению локальной гемодинамики [27]. Вполне вероятно вовлеченность в процессы NO-опосредуемой вазодилатации двух изоформ фермента — эндотелиальной и нейрональной. Первая локализуется в эндотелии, синтезирует эндотелиальный фактор релаксации сосудов, вызывающий посредством активации растворимой гуанилатциклазы и синтеза вторичного мессенджера цГМФ расслабление сосудистых миоцитов. Участие нейрональной NOS в этих механизмах связано с формированием тесных аксозавальных, дендрозавальных и соматовазальных ассоциаций локальных клеток коры (рис. 2, в). Именно в области этих контактов реализуется сосудорасширяющее действие NO [19].

Диапазон участия NO в регуляции сосудистого тонуса зависит от соотношения активности возбуждающих и тормозящих элементов коры. В условиях ишемии и окислительного стресса нейроны, вовлеченные в генерацию высокочастотных разрядов, способны экспрессировать индуцибельную изоформу NOS. Поэтому внутрикорковые NO-ергические нейроны следует считать эффективным звеном регуляции локального кровотока. Они снижают возбуждающую нагрузку глутаматергических клеток коры и выступают протективным фактором, ограничивающим распространение зоны ишемического некроза.

Результаты исследований поведения NO на моделях патологических состояний можно рассматривать с различных точек зрения и убедиться в том, что его протективные и нейротоксические действия часто следуют одно за другим. Нейротоксическая и защитная функции NO широко обсуждаются в связи с исследованиями материала мозга, полученного в результате инсультов. Показано, что NO-ергические клетки гиппокампа и неокортекса устойчивы к гипоксии и дегенерации в модельных опытах по аппликации экзогенного NMDA и глутамата [30]. Качественным признаком гипоксии мозга можно считать

усиление окрашивания корковых микрососудов и пирамидных клеток на NADPH-диафорузу, которое обычно наблюдается при ишемических состояниях и перевозбуждении нейронов.

Экспозиция культуры корковых нейронов в растворе NMDA и ингибиторов NOS ведет к снижению нейротоксического действия глутамата. С другой стороны, именно NOS-позитивные нейроны имеют особую резистентность к NMDA-токсичности. Например, аппликация небольших доз нитроаргинина во время экспериментально вызванной окклюзии средней мозговой артерии ограничивает зону ишемического инсульта, а высокие дозы ингибиторов NOS, напротив, усиливают очаг ишемии. В острый период церебральной ишемии NO функционирует как нейропротектор, но спустя уже несколько часов, особенно при реперфузии и поступлении кислорода в ишемизированную ткань, его эффект меняется на противоположный [30]. В этой ситуации в фокусе ишемического повреждения происходит интенсивное накопление большого количества супероксидных анион-радикалов, нейротоксическое действие которых многократно усиливается в результате взаимодействия с молекулами NO и образования пероксинитритов. Последние, в свою очередь, распадаются на высокореактивные свободные радикалы гидроксил-ион и пероксинитрит — окончательные эффекторы токсичности NO, вызывающие нейродеструкцию.

M.J. Eliasson et al. [17] исследовали локализацию иммунореактивного цитрулина (маркера NOS) и 3-нитротирозина (маркера пероксинитрита). Оказалось, что у мышей с окклюзией средней мозговой артерии цитрулин-позитивная реактивность обнаруживается в периинфарктной ткани, где также увеличивается (до 80% от нормы) активность нейрональной изоформы NOS, а 3-нитротирозин выявляется исключительно внутри участков ишемического некроза. Ишемия стимулирует индукцию NOS и/или активирует ее конститутивную изоформу. Однако нейротоксические эффекты в данном случае не связаны напрямую с гиперпродукцией NO, а опосредованы вторичным образованием пероксинитрита в зоне ишемизации [17].

Спектр действия NO включает энергоемкое рибозилирование цитозольных макромолекул, ингибиторное влияние на активность митохондриальной цепи переноса электронов. Аппликация доноров NO в культуре корковых нейронов приводит к деполяризации митохондриальных мембран и прогрессивному снижению внутриклеточного уровня АТФ уже через 20 мин. после экспозиции [10]. Высокие дозы оксида азота (2 ммоль и более) полностью парализуют энергетический обмен, а гибель нервной клетки в этой ситуации наступает в результате одновременной и необратимой блокады анаэробного и митохондриального механизмов синтеза АТФ [10].

Протективное влияние NO на нейроны сводится к купированию окислительного стресса. Оно включает ограничение входа ионов кальция через каналы NMDA-рецепторов, ингибирование выработки супероксидных радикалов, повышение эффективности локального кровотока и ряд других механизмов. Поскольку компоненты токсического и протективного влияния NO тесно связаны, то с какой бы стороны мы ни рассматривали их, становится вполне очевидным предположение о наличии механизмов, интегрирующих регуляцию всех звеньев цитотоксичности. К ним, в частности, можно отнести модуляторное действие NO и других свободных радикалов на NMDA рецепторы, которое реализуется по принципу отрицательной обратной связи. В физиологических условиях они блокируют NMDA-ионофоры и ассоциированный с ними вход ионов Ca^{2+} , что, в свою очередь, инактивирует NOS и понижает уровень локальной выработки NO. Однако при его массивном поступлении, особенно в результате экспрессии индуцибельных изоформ NOS и десенситизации NMDA-рецепторов, компенсаторная функция этого механизма снижается.

Описанные механизмы дополняются альтернативной регуляцией синтеза NO, которая связана с обратимой модификацией каталитической активности NOS. За выработку NO отвечает активная мембраносвязанная изоформа фермента; другая изоформа NOS — растворимая — находится в цитоплазме нейрона в неактивном состоянии. Мембраносвязанную форму NOS инактивируют кальмодулинзависимые протеинкиназы, которые стимулируют фосфорилирование каталитических субъединиц фермента. В результате перемещения фосфорилированной неактивной формы NOS из плазматической мембраны в гиалоплазму, последняя изолируется от процессов синтеза и экскреции NO, а цитозольный компартмент приобретает резистентность к токсичности NO. Активность нейрональной NOS может ингибироваться непрямым путем — через блокаду кальмодулина, в которой принимают участие ганглиозиды [14]. Вслед за восстановлением нормального физиологического статуса нейрона наступают реактивация и дефосфорилирование NOS. Эту функцию выполняет кальциневрин, имеющий высокую фосфатазную активность [14].

В качестве эндогенного фактора, снижающего цитотоксическое действие NO, рассматривается также образование динитрозольных комплексов железа и S-нитрозотиолов, представляющих основные формы стабилизации оксида азота, его депонирования и межклеточного транспорта. Эти соединения, связывая свободный NO, препятствуют его взаимодействию с анионами супероксида и тем самым способны снижать уровень выработки пероксинитрита [5, 13].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гипоксия и окислительный стресс — главные патогенетические звенья цитотоксичности, которая развертывается в результате неуправляемого нарастания возбуждающей активности глутаматергических нейронов. Выработка свободных радикалов и пероксинитритов усиливается в момент возобновления кровотока через очаг ишемического повреждения и неизменно ведет к некрозу и апоптозу корковых нейронов.

Протективные механизмы коры включают утилизацию глутамата глиальными клетками, индукцию нейрональной формы NO-синтазы, супероксиддисмутазы, нейротрофинов и антиапоптотических ферментов. На уровне отдельных нейронов и синапсов эти механизмы реализуются через локальную регуляцию гемодинамики, которую опосредуют нейроваскулярные мессенджеры и нейротрансмиттеры. Баланс нейротоксического и цитопротективного эффектов определяет избирательную устойчивость отдельных хемотипов нейронов к гипоксии и окислительному стрессу, что в перспективе может служить основой для разработки направленной фармакологической коррекции этих нарушений.

Литература

1. Башкатова В.Г., Раевский К.С.// *Биохимия*. — 1998. - Т. 63, вып. 7. - С. 1020-1028.
2. Завалишин И.А., Захарова М.Н.// *Ж. невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. — 1996. — №2. - С. 111-114.
3. Королева С.В., Ашмарин И.П.// *Успехи физиол. наук*. - 2000. - Т. 31, № 1. - С. 31-46.
4. Мотавкин П.А., Пиголкин Ю.В., Каминский Ю.В. *Гистофизиология кровообращения в спинном мозге*. - М.: Наука, 1994.
5. Реутов В.П.// *Известия Академии медицинских наук*. - 2000. - С. 35-41.
6. Раевский К.С.// *Бюлл. exper. биол. и мед.* — 1997. — Т. 123, № 5. - С. 484-490.
7. Телушкин П.К., Ноздрачев А.Д.// *Успехи физиол. наук*. - 1999. - Т. 30, № 4. - С. 14-27.
8. Bennett M.R., Balcar V.J.// *Neurochem. Int.* - 1999. - Vol. 35. - P. 269-280.
9. Bidmon H.-J., Emde B., Kowalski T. et al.// *J. Chem. Neuroanat.* - 2001. - Vol. 22. - P. 167-184.
10. Brorson J.R., Schumacker P.T., Zhang H.// *J. Neurosci.* - 1999. - Vol. 19. - P. 147-158.

11. Chan P.H. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* - 2001. - Vol. 21. - P. 2-14.
12. Chen Y., Swanson R.A. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* - 2003. - Vol. 23. - P. 137-149.
13. Colasanti M., Suzuki H. // *Trends Pharmacol. Sci.* - 2000. - Vol. 21. - P. 249-252.
14. Dawson V.L. // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* - 1995. - Vol. 22. - P. 305-308.
15. De la Torre J.C., Stefano G.B. // *Brain Res. Rev.* - 2000. - Vol. 34. - P. 119-136.
16. Del Zoppo G.J., Mabuchi T. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* - 2003. - Vol. 23. - P. 879-894.
17. Eliasson M.J.L., Huang Z., Ferrante R.J. et al. // *J. Neurosci.* - 1999. - Vol. 19. - P. 5910-5918.
18. Estevez A.G., Spear N., Manuel S.M. et al. // *J. Neurosci.* - 1998. - Vol. 18. - P. 923-931.
19. Estrada C., DeFelipe J. // *Cereb. Cortex.* - 1998. - Vol. 8. - P. 193-203.
20. Fergus A., Lee K.S. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* - 1997. - Vol. 17. - P. 992-1003.
21. Friebe A., Schultz G., Koesling D. // *Biochem. J.* - 1998. - Vol. 335. - P. 527-531.
22. Gonzalez-Zulueta M., Ensz L.M., Mukhina G. et al. // *J. Neurosci.* - 1998. - Vol. 18. - P. 2040-2055.
23. Hanbury R., Ling Z.D., Wu J. et al. // *J. Comp. Neurol.* - 2003. - Vol. 461. - P. 307-316.
24. Hata R., Maeda K., Hermann D. et al. // *Cereb. Blood Flow Metab.* - 2000. - Vol. 20. - P. 937-946.
25. Hayashi T. *Chemical physiology of excitation in muscle and nerve.* - Tokyo: Nakayama-Shoten, 1956.
26. Hicks T.P., Conti F. // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* - 1996. - Vol. 74. - P. 341-361.
27. Iadecola C., Li J., Xu S., Yang G. // *J. Neurophysiol.* - 1996. - Vol. 75. - P. 940-950.
28. Johansson B.B., Belichenko P.V. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* - 2002. - Vol. 22. - P. 89-96.
29. Keller J.N., Kindy M.S., Holtsberg F.W. et al. // *J. Neurosci.* - 1998. - Vol. 18. - P. 687-697.
30. Pieper A.A., Blackshaw S., Clements E.E. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2000. - Vol. 97. - P. 1845-1850.

Поступила в редакцию 12.05.04.

CYTOTOXICITY PHENOMENON AND MECHANISMS OF NEW CORTEX LESIONS WHEN IN HYPOXIA AND ISCHEMIA

A.G. Matveev

Vladivostok State Medical University

Summary — The paper represents a literature review devoted to the mechanisms of neurons death in the area of ischemia. The generation of both free radicals and peroxynitrites intensifies when there is a restoration of blood supply through the nidus of ischemic lesion and steadily results in necrosis and apoptosis of cortical neurons. Protective mechanisms include glutamate utilization with neuroglial cells, induction of neuronal-form nitro-oxidesynthase, superoxide dismutase, neurotrophins and anti-apoptotic enzymes. At separate neurons and synapses level, the aforementioned mechanisms are realized by way of local regulation of hemodynamics, which is mediated by neurovascular messengers and neurotransmitters. The balance of neurotoxic and cytoprotective actions determines selective resistance of separate neuron chemotypes to hypoxia and oxidizing stress that in prospects can serve as a basis for elaborating the directional pharmacological correction of the preceding abnormalities.

Pacific Medical Journal, 2004, No. 2, p. 18-23.

УДК 577.175.823+546.172.6-31]:611.813.1

С.В. Хрулев, И.В. Дюйзен

СОЛОКАЛИЗАЦИЯ СЕРТОНИНА И НИТРОКСИДСИНТАЗЫ В НЕЙРОНАХ ПОДКОРКОВОГО БЕЛОГО ВЕЩЕСТВА МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Владивостокский государственный медицинский университет

Ключевые слова: кора мозга, развитие, оксид азота, серотонин.

Нейроны белого вещества новой коры до настоящего времени остаются наиболее загадочными и малоизученными элементами головного мозга [1, 3, 4, 8]. Они неизменно встречаются у всех видов высших позвоночных и активно участвуют в формировании коры [5, 10]. В настоящей работе предпринята попытка установить их нейромедиаторный профиль в мозге человека на разных этапах нейроонтогенеза.

Изучена локализация нейрональной нитрооксидсинтазы (NOS), серотонина и NADPH-диафоразы в коре головного мозга четырех плодов (26-28 недель), трех новорожденных и пяти взрослых людей

в возрасте 25-45 лет. Кусочки коры мозга толщиной 5-6 мм фиксировали 1 час при температуре 4°C в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на 0,1М натрийфосфатном буфере (pH7,4), после чего промывали в 15% сахарозе с 5-6-кратной сменой раствора. Для иммуоцитохимической реакции криостатные срезы толщиной 20-30 мкм инкубировали в растворе первичных кроличьих антител к нейрональной NOS (Sigma, 1:1000) и серотонину (ICN, 1:1000) в течение суток при температуре +4°C. После трехкратной отмывки антител в солевом фосфатном буфере (pH7,4) срезы в течение 1 часа обрабатывали вторичными антителами козы против иммуноглобулинов кролика, конъюгированными с TRITC или FITC (Mol. Probes). Отмытые в солевом фосфатном буфере препараты заключали в забуференный раствор глицерина и просматривали в микроскопе Axioplan (Carl Zeiss), используя соответствующие фильтры.

Выявление NADPH-диафоразы проводили по методу S.R. Vincent и Н. Kimura [11] на отдельных срезах или после их иммуоцитохимической обработки. Для этого срезы заливали инкубационной средой, содержащей 0,5 ммоль р-NADPH (Sigma), 0,5 ммоль нитросинего тетразолиевого (Sigma) и 0,3% тритона X-100 в 0,15М Трис-HCl-буфере (pH8,0) и на 1 час