

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 (pH 7,4), 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 (pH 7,4) 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 (pH 8,0) и на 1 час

помещали в термостат при 37°C. После инкубации срезы промывали дистиллированной водой, проводили через спирты возрастающей крепости и заключали в бальзам.

Анализ полученных данных позволяет говорить о наличии в белом веществе коры нервных клеток, продуцирующих оксид азота на всех исследованных сроках развития головного мозга. Результаты двойного иммуногистохимического мечения свидетельствовали о солокализации NADPH-диафоразы и NOS во всех субкортикальных нейронах. Вместе с тем на каждом этапе онтогенеза зарегистрированы особенности распределения, активности и нейрохимического статуса нитроксидаергических нейронов.

У плодов 26-28 недель NOS/NADPH-диафоразопозитивные клетки располагались преимущественно в нижних слоях корковой пластинки и между подлежащими миелиновыми волокнами. Дифференцирующиеся и растущие нейроны с признаками фенотипической незрелости, концентрируясь в поверхностной зоне белого вещества, как бы подстилали VI слой коры. Тела клеток переполнены гранулами диформазана и на светлом фоне нейропиля казались иссиня-черными. Небольшой просвет в центре перикариона, где активность NOS не выявлялась, соответствовал локализации ядра. Выпадающий в результате гистохимической реакции осадок контурировал неровности и варикозности дендритных ответвлений — в этом случае картина напоминает множество разнокалиберных бусинок, нанизанных на тончайшую нить нервного волокна. Клеточные тела большинства нейронов и их короткие отростки имели вертикальную ориентацию, что определялось, вероятно, траекторией роста таламокортикальных волокон [6].

В белом веществе новорожденных (первые сутки постнатального развития) количество нитроксидапозитивных нейронов было значительно увеличено. Обращала на себя внимание их необычная морфология — тела имели неправильные, угловатые контуры. Горизонтально ориентированные клетки с длинными, толстыми, дихотомически ветвящимися отростками располагались на разных этажах подкоркового белого вещества.

С помощью двойного гистоиммуноцитохимического метода удалось показать, что в этот период в белом веществе мозга отдельная популяция нитроксидаергических нейронов синтезирует серотонин (рис. 1). Они составляли примерно одну треть от общего количества нитроксидаергических элементов. Этот факт примечателен тем, что у плодов 26-28 недель серотонинергические нейроны не обнаруживались. Синтез серотонина к моменту рождения и в первые сутки жизни сопутствовал возрастающей к этому же времени продукции оксида азота.

Часть клеток, содержащих солокализированный с оксидом азота серотонин, стремилась к образованию нейровазальных контактов. Можно выделить два их варианта. В одном случае тело нейрона нахо-

дилось в непосредственной близости от микрососуда или располагалось в месте его деления. В другом взаимодействии обеспечивалось дендритами, которые стелились по поверхности сосуда и на некоторых его участках формировали сетевидные манжетки.

В мозге взрослого человека количество нитроксидаергических нейронов белого вещества неодинаково в разных регионах коры. Особенно много их в областях, прилежащих к зрительной коре, а минимальное число соответствовало височным и лобным полям неокортекса. По сравнению с ранними этапами развития, в мозге взрослого человека количество этих нейронов значительно уменьшено. Известно, что в коре головного мозга взрослых людей серотонинергические нейроны отсутствуют [2]. На наших препаратах мы не наблюдали клеток с такой медиаторной специализацией и в белом веществе, в то время как основная их масса по-прежнему синтезировала оксид азота. Уменьшение числа подкорковых нейронов у взрослого человека можно объяснить как гибелью части клеток, так и рассеиванием оставшихся в результате роста мозга [10]. Среди гибнущих нейронов могут оказаться исчезающие впоследствии серотонинергические клетки.

Современные исследователи приписывают нейронам белого вещества ключевую роль в процессе созревания нервной системы [3, 7]. Эти клетки являются первыми мишенями для волокон, прорастающих в кору из таламуса, и регулируют порядок послойного построения корковых колонок [6]. Успешному выполнению этой функции способствует динамический характер медиаторной специализации данных клеток. На разных этапах нейрогенеза они экспрессируют разные нейротрансмиттеры, нейромодуляторы и специфические рецепторы [3]. По результатам настоящего исследования можно заключить, что на всех этапах развития коры человека неизменной остается их способность синтезировать оксид азота. В сфере нитроксидаергического влияния в развивающемся и зрелом мозге находятся не только механизмы межклеточных и нейрососудистых коммуникаций, но и процессы апоптотической гибели нейронов [7].

К моменту рождения в головном мозге человека регистрируется временная нейрохимическая перестройка, проявляющая себя появлением серотонинергических клеток в белом веществе коры. У новорожденных во многих нитроксидапродуцирующих клетках подкорковой пластинки солокализирован 5-окситриптамиин, в то время как в коре мозга плодов (26-28 нед.) и взрослых людей серотонинергические клетки отсутствуют. Учитывая взаимомодулирующее действие этих медиаторов и их выраженные вазомоторные свойства [9], мы полагаем, что на начальном этапе постнатальной жизни человека серотонин/нитроксидаергические клетки подкоркового белого вещества, формирующие нейрососудистые контакты, дополняют и координируют вегетативные механизмы регуляции мозговой гемодинамики.

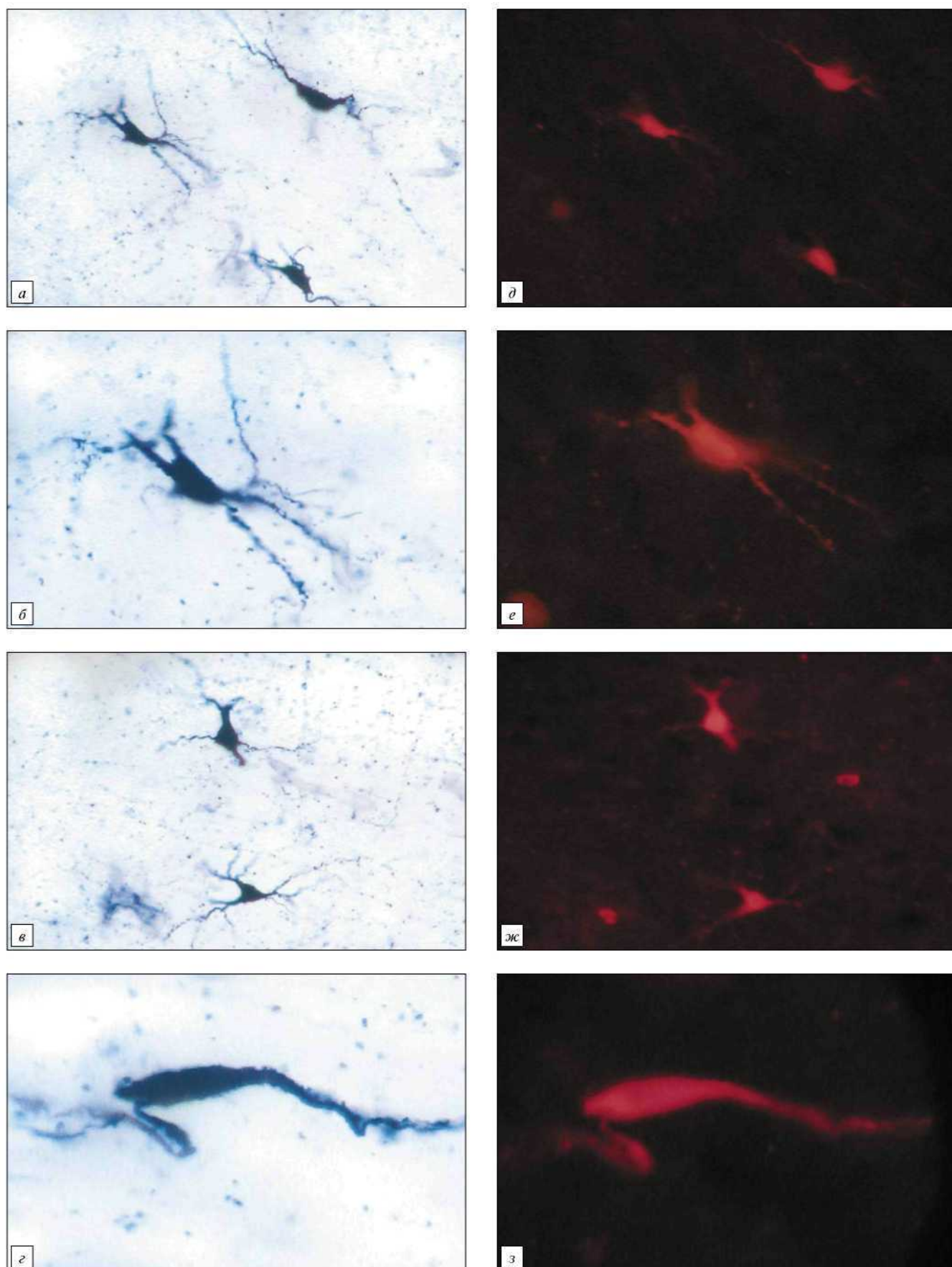


Рис. 1. Нитроксид/серотонинергические клетки подкоркового белого вещества головного мозга новорожденного.
а, б, в, г — гистохимическая локализация *NADPH*-диафоразы; д, е, ж, з — иммуноцитохимическая локализация серотонина.

Литература

1. Дюйзен И.В., Калиниченко С.Г., Охотин В.Е., Мотавкин П.А.// *Морфология*. — 1998. — Т. 113, вып. 1. — С. 47-51.
2. *Нейроонтогенез: Серия «Проблемы биологии развития»* — М.: Наука, 1985.
3. Охотин В.Е., Калиниченко С.Г.// *Морфология*. — 2002. — Т. 121, вып. 1. — С. 7-26.
4. Ang L.C., Shul D.D.// *Brain Res.* — 1995. — Vol. 674. — P. 329-335.
5. Judas M., Sestan N., Kostovic I.// *Microsc. Res. Tech.* — 1999. — Vol. 45. — P. 401-419.
6. Kostovic I., Rakic P.// *J. Neurocytol.* — 1980. — Vol. 9. — P. 219-242.
7. Marin-Padilla M.// *Cerebral cortex*. — Vol. 7: *Development and maturation of cerebral cortex*. — New York: Plenum Press, 1988. — P. 1-34.
8. Mizukawa K., Vincent S.R., McGeer P.L., McGeer E.G.// *Brain Res.* — 1988. — Vol. 461. — P. 274-281.

9. Prast H., Athineos P.// *Progr. Neurobiol.* — 2001. — Vol. 64, No. 1. — P. 51-68.
10. Valverde F., Facal-Valverde M.V.// *J. Comp. Neurol.* — 1988. — Vol. 269. — P. 168-192.
11. Vincent S.R., Kimura H.// *Neuroscience*. — 1992. — Vol. 46. — P. 755-784.

Поступила в редакцию 11.05.04.

CO-LOCALIZATION OF SEROTONIN
AND NITROOXIDESYNTASE IN NEURONS OF
SUBCORTICAL WHITE SUBSTANCE OF HUMAN BRAIN
S. V. Khrulev, I. V. Duizen
Vladivostok State Medical University

Summary — Localization of neuronal nitrooxidesynthase, serotonin and NADPH-diaphorase has been examined in cerebral cortex of fetuses (26-28 weeks), newborns and adults. In the subcortical white substance, as is shown, there is a nitroxydergic neuron population, a number and activity of which are unequal at different stages of neuroontogenesis. In an antenatal period a part of the nitroxydergic neurons synthesizes the serotonin and forms the neurovascular bonds.

Pacific Medical Journal, 2004, No. 2, p. 23-26.

УДК 611.89:611.843.1]:618.29

Н.Ю. Матвеева, Н.Е. Романова

ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ РАЗЛИЧИЯ ГАНГЛИОНАРНОГО СЛОЯ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА

Владивостокский государственный медицинский университет

Ключевые слова: сетчатка, ганглионарные клетки.

В процессе развития нервной системы образуется избыточное количество нейронов. Сокращение их числа происходит за счет апоптоза — запрограммированной гибели клеток [3, 10, 14]. В разных областях мозга физиологической гибели подвержены от 15 до 85% нейронов исходной популяции [5, 7]. Что касается сетчатки глаза человека, то соответствующие данные здесь отсутствуют. На сегодняшний день имеется незначительное число работ, посвященных морфологическому исследованию сетчатки глаза человека [1, 6, 9, 11]. Данные о структуре сетчатки и ее развитии получены в основном на животных [4, 8, 12, 13].

Цель нашего исследования заключалась в том, чтобы путем морфометрического анализа установить число клеток в ганглионарном слое сетчатки у плодов различных сроков развития и на основе полученных данных показать наличие или отсутствие физиологической гибели клеток.

В работе использовался материал, полученный при медицинских абортах. Исследовано 5 глаз, взятых на 10-12-й, и 5 глаз, взятых на 25-28-й неделях внутриутробного развития. Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине 2-3 недели. Время

фиксации определялось размерами глаза. Исследования проводились на серийных парафиновых срезах толщиной 5 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином и толудиновым синим по Нисслю. В качестве специфической пробы на ДНК использовали метод Фельгена и Россенбекка. Морфометрический анализ изображения проводили с использованием компьютерной программы Adobe PhotoShop 5.0. Ввод изображения осуществляли через телевизионную систему на базе микроскопа Vickers M 85. Математическая обработка данных осуществлялась с использованием пакета статистических программ BIOSTAT.

У плодов до 12 недель при окраске гематоксилином и эозином ядра клеток были четко дифференцированы, округлые, располагались густо, содержали плотно упакованный хроматин. В некоторых ядрах определялось базофильное ядрышко. Среди массы большинства «нормальных» встречались ядра с нарушением структуры и локализации хроматина. Из них можно выделить четыре основных типа:

1. Грубые глыбки хроматина интенсивно окрашены, локализованы по полюсам ядра; центральная часть ядра просветлена;
2. Ядро набухшее, просветлено и увеличено в размере. Хроматин мелко диспергирован, рассредоточен по ядру, слабо воспринимает основные красители. По сравнению с ядрами, которые были приняты за норму, содержание хроматина резко снижено;
3. Ядро увеличено в размерах, хорошо контурируется ядерная оболочка, редкие пылевидные зерна хроматина находятся у ее края. Большая часть ядра выглядит оптически пустой;
4. Ядро точечных размеров, пикнотичное, интенсивно синее, с плотно упакованным хроматином.