

© Коллектив авторов, 2006
УДК 617.735:611.018.8:611.013

Н.Ю. Матвеева, С.Г. Калиниченко, И.И. Пущин и П.А. Мотавкин

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В АПОПТОЗЕ НЕЙРОНОВ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА

Кафедра гистологии (зав. — проф. П.А.Мотавкин) Владивостокского государственного медицинского университета, лаборатории цитофизиологии (зав. — канд. биол. наук М.А.Вашенко) и физиологии (зав. — канд. биол. наук С.Л.Кондрашов) Института биологии моря ДВО РАН, г. Владивосток

Исследовали локализацию NADPH-диафоразы (NADPH-d), индуцибельной NO-синтазы (iNOS) и TUNEL-иммунореактивных нейронов в сетчатке плодов человека I–III триместров беременности. Высокая активность NADPH-d обнаружена во внутренних сегментах фотосенсорных клеток, амакриновых и ганглионарных клетках. Популяция NADPH-d-позитивных амакриновых клеток включает 3 типа нейронов. Нейроны первого типа имеют большой размер и бедное дендритное поле, занимающее внутренний ядерный и наружный сетчатый слои. Мелкие нейроны второго типа локализируются во внутреннем сетчатом слое. Эктопированные амакриновые клетки третьего типа выявляются в наружном отделе ганглионарного слоя. Высокая плотность NADPH-d-позитивных нейронов наблюдается в центральной части сетчатки, окружающей центральную ямку и область диска зрительного нерва. Активность NADPH-d в онтогенезе прогрессивно возрастает и коррелирует с появлением в нейронах иммунореактивной iNOS. Последняя маркирует субпопуляцию амакриновых и ганглионарных клеток, которые появляются на 20–21-й неделе развития и достигают максимума иммунореактивности к концу III триместра. TUNEL-иммунореактивные ядра нейронов с признаками апоптотической деструкции обнаруживаются на 30–31-й неделе беременности. Наибольший апоптотический индекс определяется в популяциях ганглионарных и амакриновых клеток. Полученные данные позволяют рассматривать NO как фактор, опосредующий апоптоз нейронов в критический период дифференцировки межнейронных связей сетчатки глаза человека.

Ключевые слова: апоптоз, оксид азота, амакриновые клетки, ганглионарные клетки, фотосенсорные клетки, нейрогенез сетчатки глаза человека.

Размеры исходной популяции нейронов мозга регулируются с помощью эмбрионального апоптоза, синхронизированного с пролиферацией и миграцией постмитотических клеток; в плодном и постнатальном периодах развития апоптоз обусловлен образованием и специализацией синаптических мишеней и рассматривается как элемент пластичности формирующихся нервных связей [6, 23, 32, 37].

В сетчатке глаза птиц, млекопитающих животных и человека апоптоз развивается в результате взаимодействия различных нейротрофических факторов и инициируется генной индукцией, меняющей метаболические условия ближайшего микроокружения [2–5]. Так, после перерезки зрительного нерва у мышей апоптоз затрагивает более 90% популяции ганглионарных нейронов сетчатки [11, 20]. Этот процесс ингибируется введением мозгового нейротрофического фактора (BDNF), снижение экспрессии которого в онтогенезе, напротив, повышает количество апоптотических нейронов [28, 40]. Действие BDNF опосредуется индуцибельной изоформой NO-синтазы (NOS), что указывает на регулируемую функцию оксида азота (NO) в механизмах апоптоза нейронов [20, 21, 38].

Программа гибели клеток в онтогенезе и при реакции на повреждение запускает однотипный молекулярный механизм, однако выраженность процесса связана с различными, цитотоксическими и нейротрофическими, эффектами NO [1, 9]. Динамика апоптоза нейронов в развивающейся сетчатке глаза человека остается невыясненной.

Цель настоящей работы — изучение апоптоза NO-ергических нейронов сетчатки в эмбриогенезе человека.

Материал и методы. Исследовали сетчатку 6 глаз от трех плодов человека 10–11 нед развития, 5 глаз от трех плодов 20–21 нед развития и 2 глаз от одного плода 30–31 нед развития. Плоды I триместра беременности получали при медицинских абортках, II триместра — в результате самопроизвольного выкидыша и аборта, проведенного по медицинским показаниям (экстрагенитальное заболевание матери), III триместра — в результате интранатальной смерти плода (асфиксия) без врожденных пороков развития. Глаз извлекали на стекло, промывали дистиллированной водой и разрезали по лимбу. После удаления стекловидного тела сетчатку отделяли от задней стенки глаза с помощью кисти и стеклянных палочек, помещали в холодный 4% раствор параформальдегида, приготовленного на 0,1M фосфатном буфере (pH 7,4) и фиксировали в течение 3–4 ч при 4 °C.

Для определения активности NADPH-диафоразы (NADPH-d) материал дополнительно фиксировали 2 ч при 4 °C в 4% растворе параформальдегида на 0,1 M Na-фосфатном буфере (pH 7,4), промывали в 15% растворе сахаразы в течение 1 сут. Криостатные срезы, проходящие через заднюю стенку глаза, толщиной 15 мкм термостатировали в течение 1 ч при 37 °C в среде следующего состава: 50 mM Трис-буфер, 0,2% Тритон X-100 (Serva, Германия), 0,8 мг/мл β -NADPH (Sigma, США), 0,4 мг/мл нитросинового тетразолия (Sigma, США); pH 8,0 [18].

Для идентификации индуцибельной NOS (iNOS) срезы сетчатки выдерживали в течение 3–4 ч при 4 °C в 0,1 M фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 3% нормальную сыворотку козы и 0,25% Тритон X-100. Затем на срезы наносили поликлональные первичные антитела против iNOS (ICN, США) в разведении 1:200, инкубировали в течение 48 ч при 4 °C, после чего промывали в трех порциях фосфатного буфера по 5 мин в каждой смене раствора. После промывки срезы инкубировали в течение 1 ч с биотинилированными вторичными антителами против иммуноглобулинов кролика, выработанных у козы, в разведении 1:100

(Vector Laboratories, США), а затем в растворе авидин-пероксидазного комплекса (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, США) также в течение 1 ч. Обработку заканчивали выявлением пероксидазы ABC-комплекса с помощью 0,03% раствора диаминобензидина и 0,001% перекиси водорода в 50 мМ Трис-НСl-буфере (pH 7,4) в течение 10–20 мин. Затем срезы тщательно отмывали в фосфатном буфере, обезживали и заключали в бальзам по общепринятой методике. В качестве контроля из среды исключали первичные антитела, окрашивание клеток отсутствовало.

Апоптоз изучали с помощью иммуноцитохимического метода TUNEL, основанного на выявлении фрагментированных цепочек ДНК. После фиксации образцы промывали в течение 1 сут в 0,1 М фосфатном буфере с 7–8-кратной сменой раствора, а затем погружали в 15% забуференный раствор сахарозы. Срезы сетчатки толщиной 15 мкм изготавливали на замораживающем микротоме, монтировали на предметные стекла и дополнительно фиксировали в охлажденном растворе этанол-уксусной кислоты в течение 5 мин при -20°C , после чего промывали дважды по 5 мин в фосфатном буфере. На срезы наносили 75 мкл уравнивающего буфера, в котором выдерживали не менее 10 с при комнатной температуре. Для выявления TUNEL-окрашенных структур использовали набор реактивов AporTag In Situ Aporosis Detection Kit (Chemicon, США). Срезы инкубировали согласно стандартной прописи во влажной камере в течение 1 ч при 37°C , затем на 10 мин погружали в стоп-буфер. Срезы промывали в фосфатном буфере 3-кратно по 5 мин в каждой смене раствора, после чего инкубировали в течение 1 ч в растворе авидин-пероксидазного комплекса. Срезы тщательно отмывали в фосфатном буфере, обезживали и заключали в бальзам. Часть срезов докрашивали толуидиновым синим.

Для электронно-микроскопического исследования апоптотических нейронов участки сетчатки размером $0,5 \times 0,5$ см фиксировали в смеси 2% глутаральдегида и 4% параформальдегида, приготовленных на 0,1 М какодилатном буфере (pH 7,3) с 5% D-сахарозой. Затем образцы обрабатывали в 1% растворе четырехоксида осмия, разведенном на 0,1 М какодилатном буфере в течение 1 ч, обезживали в спирте, ацетоне и заливали в эпон-812. Срезы готовили на ультратоме LKB-3 (Швеция), контрастировали в 2% спиртовом растворе уранилацетата. Препараты просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100B (Япония) при увеличении от 4000 до 150 000 и ускоряющем напряжении 80 кВ.

Визуализацию изображений всех микропрепаратов получали на компьютере с помощью видеосистемы, смонтированной на микроденситометре Vickers M-85 (Великобритания). Цифровую обработку изображений проводили с помощью персонального компьютера. Активность NADPH-d определяли по плотности гистохимического преципитата в цитоплазме нейронов и выражали в единицах оптической плотности.

Плотность и пространственное распределение NADPH-d-позитивных клеток исследовали на тотальных препаратах сетчатки площадью $2,34 \text{ мм}^2$. Для этой цели каждый препарат условно разделяли на равновеликие участки площадью $0,0133 \text{ мм}^2$, в которых подсчитывали количество клеток, прореагировавших с субстратом инкубационной среды.

Количественную оценку TUNEL-позитивных ядер ганглионарных нейронов проводили с помощью окулярной морфометрической сетки на участках сетчатки размерами $1,0 \times 1,0$ мм. Апоптотический индекс (АИ) определяли как отношение общего числа TUNEL-позитивных ядер (N_{TUNEL}) к количеству клеток, окрашенных толуидиновым синим и имеющих видимое непикнотизированное ядро (N_{T}) по формуле $\text{АИ} = (N_{\text{TUNEL}} \times 100) / N_{\text{T}}$ [37]. Данные обрабатывали методом вариационной статистики. Различия оценивали по критерию Стьюдента и считали значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования. При реакции на NADPH-d в срезах сетчатки человека выявляются внутренние сегменты фотосенсорных клеток, амакриновые и ганглионарные клетки (рис. 1).

Тела NADPH-d-позитивных амакриновых клеток имеют округлую форму, большой диаметр, локализируются во внутреннем ядерном и внутреннем сетчатом слоях (рис. 1). Нейроны определяются по наличию единичного отростка, который продолжается в тонкий горизонтальный ствол, прослеживается на небольшом расстоянии, теряясь в нейропиле. Морфологические особенности и качество окрашивания позволяют выделить три типа NADPH-d-позитивных амакриновых клеток. Нейроны первого типа наиболее крупные, располагаются во внутреннем ядерном слое, имеют редкие слабоветвленные отростки, проникающие во внутренний сетчатый слой (см. рис. 1, а). Нейроны второго типа меньшего размера имеют бедное дендритное поле, целиком локализуясь во внутреннем сетчатом слое (см. рис. 1, б). Нейроны третьего типа представляют собой эктопированные формы и наблюдаются в наружной части ганглионарного слоя (см. рис. 1, в).

Популяция NADPH-d-позитивных ганглионарных нейронов неоднородна. Высокий уровень активности энзима превалирует в клетках поверхностного уровня одноименного слоя; в глубоких отделах слоя клетки имеют низкую степень активности NADPH-d: незначительное количество преципитата контурирует без видимых четких границ лишь узкий ободок их цитоплазмы, окружающий светлое крупное ядро (см. рис. 1, г). Большая часть ганглионарных клеток являются NADPH-d-негативными.

На всех изученных стадиях развития сетчатки, описанные типы нейронов имеют единообразное распределение. Различие заключается в активности NADPH-d, которая варьирует по возрастающему градиенту (табл. 1).

На тотальных препаратах сетчатки выявляются все типы NADPH-d-позитивных клеток, что позволяет оценить топографическое представительство нейронов с различной степенью активности энзима. Наибольшая плотность маркированных нейронов выявляется в центральной части сетчатки, охватывающей центральную ямку и область диска зрительного нерва (рис. 2). На периферии сетчатки количество NADPH-d-позитивных клеток неизменно снижается.

Таблица 1

Активность NADPH-диафоразы в нейронах сетчатки человека на разных стадиях онтогенеза ($\bar{x} \pm s_x$, ед. оптич. плотности)

Тип нейронов	Активность NADPH-диафоразы у плодов		
	10-11 нед	20-21 нед	30-31 нед
Внутренние сегменты фотосенсорных клеток	$54,7 \pm 1,3$	56 ± 3	$62,2 \pm 2,2$
Амакриновые клетки:			
первого типа	$60,1 \pm 2,4$	$68,1 \pm 1,2$	$70,2 \pm 2,4$
второго типа	$51,1 \pm 2,1$	59 ± 3	$66,1 \pm 1,4$
третьего типа	$68,7 \pm 1,6$	$76,3 \pm 2,4$	$83,3 \pm 1,2$
Ганглионарные клетки	$41,2 \pm 2,8$	$57,2 \pm 1,4$	$69,2 \pm 1,3$

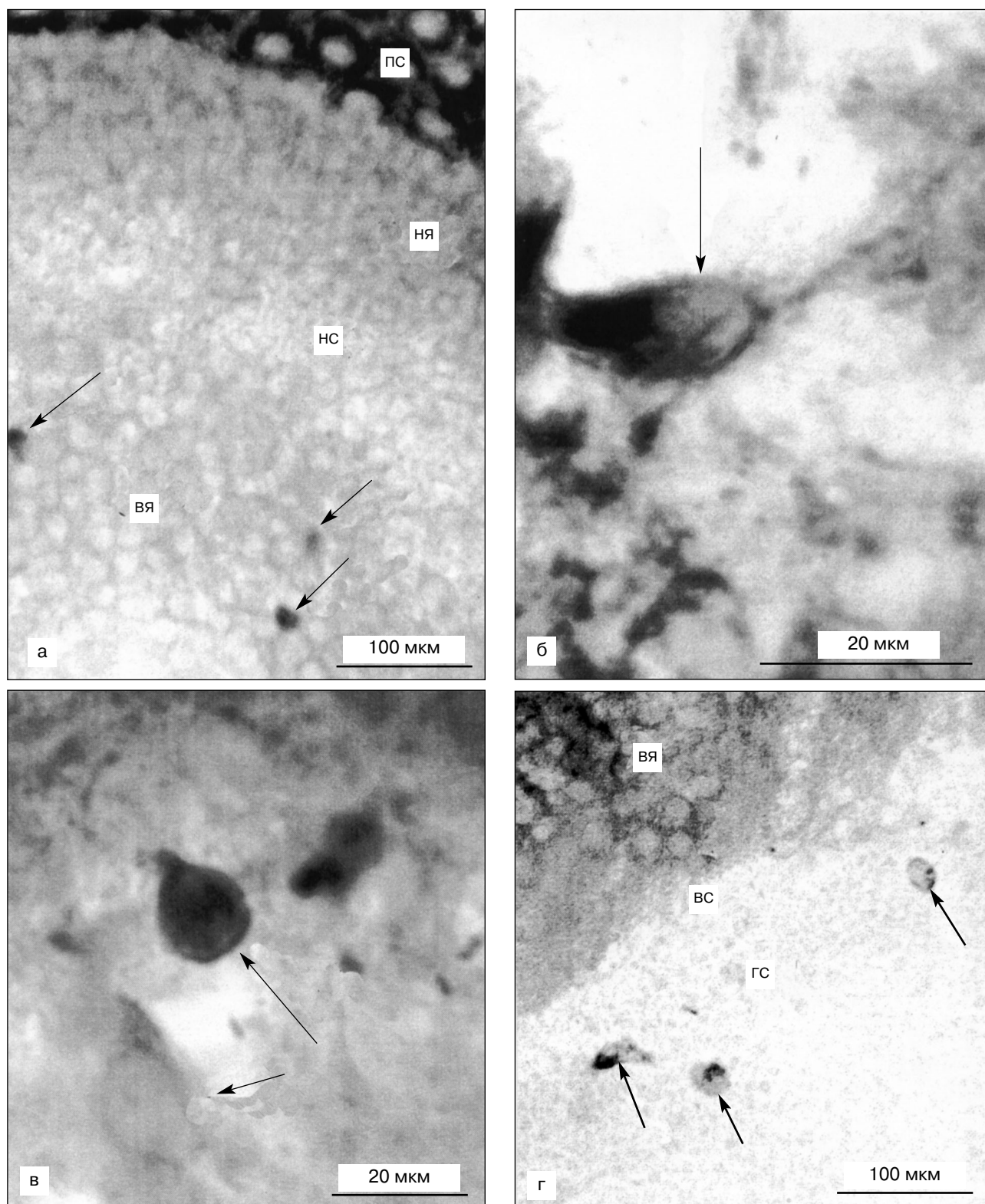


Рис. 1. Локализация NADPH-диафоразы(d) в сетчатке глаза плодов человека 20 нед развития.

а — стратификация NADPH-d-положительных нейронов. Стрелки — тела амакриновых клеток первого типа; б — NADPH-d-положительная амакриновая клетка второго типа (стрелка) внутреннего сетчатого слоя; в — эктопированная амакриновая клетка третьего типа (длинная стрелка); короткая стрелка — ганглионарная клетка с положительной реакцией на NADPH-d; г — NADPH-d-положительные ганглионарные клетки (стрелки). ПС — пигментный слой; НЯ — наружный ядерный слой; НС — наружный сетчатый слой; ВЯ — внутренний ядерный слой. ВЯ — внутренний ядерный слой; ВС — внутренний сетчатый слой; ГС — ганглионарный слой.

Метод TUNEL дает неплохие результаты избирательного выявления апоптотических клеток, имеющих признаки фрагментации ДНК: конденсированный хроматин, пикноз, кариорексис. Морфологические

признаки апоптоза и некроза, определяемые на срезах сетчатки глаза плодов человека, являются взаимосоключающими. Для TUNEL-положительных элементов характерно наличие неповрежденной внешней клеточ-

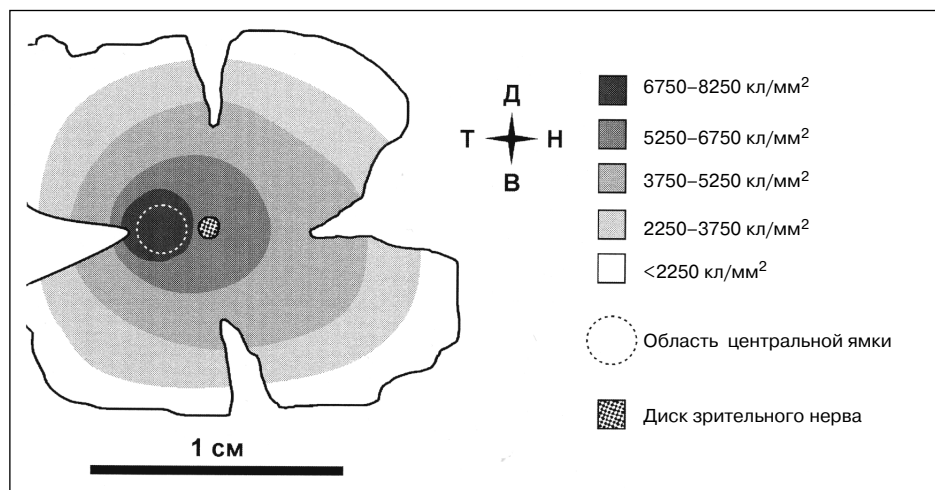


Рис. 2. Распределение NADPH-диафорозо-позитивных нейронов на тотальном препарате сетчатки глаза плода человека 26 нед.

Д — дорсальная сторона;
В — вентральная сторона;
Н — назальная сторона;
Т — темпоральная сторона.

ной мембраны, вокруг них отсутствуют очаги воспалительной инфильтрации. Ядра апоптотических нейронов, обработанные с помощью реагентов TUNEL, выглядят как интенсивно окрашенные точки, которые, сливаясь, образуют кольца, полукольца, а также сплошные однородные конгломераты. Они локализируются на месте расположения ядра, равномерно распределяются по цитоплазме, смещаются к внешней клеточной мембране либо группируются у одного из полюсов тела клетки (рис. 3, а–в).

Электронно-микроскопическая картина апоптоза нейронов характеризуется глыбчатым распадом ядра с формированием электронно-плотных фрагментов хроматина, окруженных остатками ядерной оболочки (см. рис. 3, г). Чаще они располагаются в виде концентрических полуокружностей на месте разрушенного ядра либо распределяются по цитоплазме случайным образом. Апоптотический распад ядра сочетается с сохранной структурой цитоплазмы и целостных органелл. Как предстadium апоптоза мы рассматриваем пикнотизированные ядра некоторых ганглионарных клеток, на завершающей стадии процесса определяются апоптотические тельца различных размеров и формы (см. рис. 3, г).

Распространенность апоптоза неодинакова на разных стадиях развития сетчатки и коррелирует с появлением в нейронах активности iNOS (рис. 4). Самые высокие показатели апоптотического индекса регистрируются на 30-й неделе пренатальной жизни (табл. 2). TUNEL-позитивные нейроны локализируются преимущественно в поверхностной зоне ганглионарного слоя, иногда объединяются в группы, каждая содержит от 1 до 3 ядер апоптотических клеток (см. рис. 3, в). В глубоком отделе ганглионарного слоя TUNEL маркирует очень редкие единичные ядра апоптотических клеток. Можно полагать, что описанные типы iNOS- и TUNEL-иммунореактивных нейронов относятся к популяции ганглионарных и/или эктопированных амакриновых клеток.

Обсуждение полученных данных. Данные, полученные в настоящей работе, указывают на взаимосвязь апоптоза нейронов с экспрессией в них NADPH-d/iNOS.

Согласно нашим наблюдениям, основной источник NO в сетчатке глаза плодов человека представляют фотосенсорные, амакриновые и ганглионарные

клетки. Однотипный паттерн локализации NOS обнаруживается в постнатальном периоде развития человека, а также у птиц, грызунов и обезьян [19, 24, 39]. Это сходство позволяет рассматривать NO как универсальный фактор, регулирующий функцию нейронной сети в онтогенезе животных и человека. Известно, что аппликация доноров NO в сетчатку у крыс ведет к увеличению концентрации циклического гуанозинмонофосфата, который может изменять мембранный потенциал ганглионарных нейронов [8]. NO в определенной степени выполняет функцию стыковочного звена в пространственных взаимодействиях между нейронами. Выделяясь через мембраны постсинаптической клетки, NO играет роль своеобразного «маяка» для подрастающих аксонных терминалей и выступает адаптивным фактором синхронизации импульсной активности клетки-мишени и нейрона-эффектора [16]. В комплекс нейрогенетического влияния NO включаются ионы кальция, рецепторы NMDA (N-метил-D-аспаратиновой кислоты) и ГАМК. Их суммарная активность в отдельных случаях модулирует синтез ДНК, модифицируя генетическую программу и апоптоз клеток-предшественников [27].

В сетчатке апоптоз развивается в различных клеточных элементах и разделяется на 2 периода. Первый период устанавливается на 15–17-е сутки эмбриогенеза у мышей, совпадает с началом пролиферации, миграцией нейронов в сетчатку и прорастанием их первичных отростков [13]. Второй период естественной (физиологической) гибели нейронов сопряжен с анатомической перестройкой локальных систем нейрокциркуляции между сетчаткой и ядрами мозгового ствола, а также переводом «молчащих» синапсов в функционирующие [34]. У крыс этот процесс происходит на 1-й неделе постнатальной жизни, когда аксоны ганглионарных нейронов достигают своих мишеней в верхнем холмике пластины крыши среднего мозга и латеральном колленчатом теле, меняют свой облик и погибают в 50% [35].

Наши наблюдения показывают, что интенсивная иммунореактивность ядер апоптотических клеток, окрашенных с помощью метода TUNEL, обнаруживается на протяжении всего периода пренатального развития сетчатки, однако количество маркированных клеток существенно отличается на разных стадиях онтогенеза. У человека пик физиологической гибели нейро-

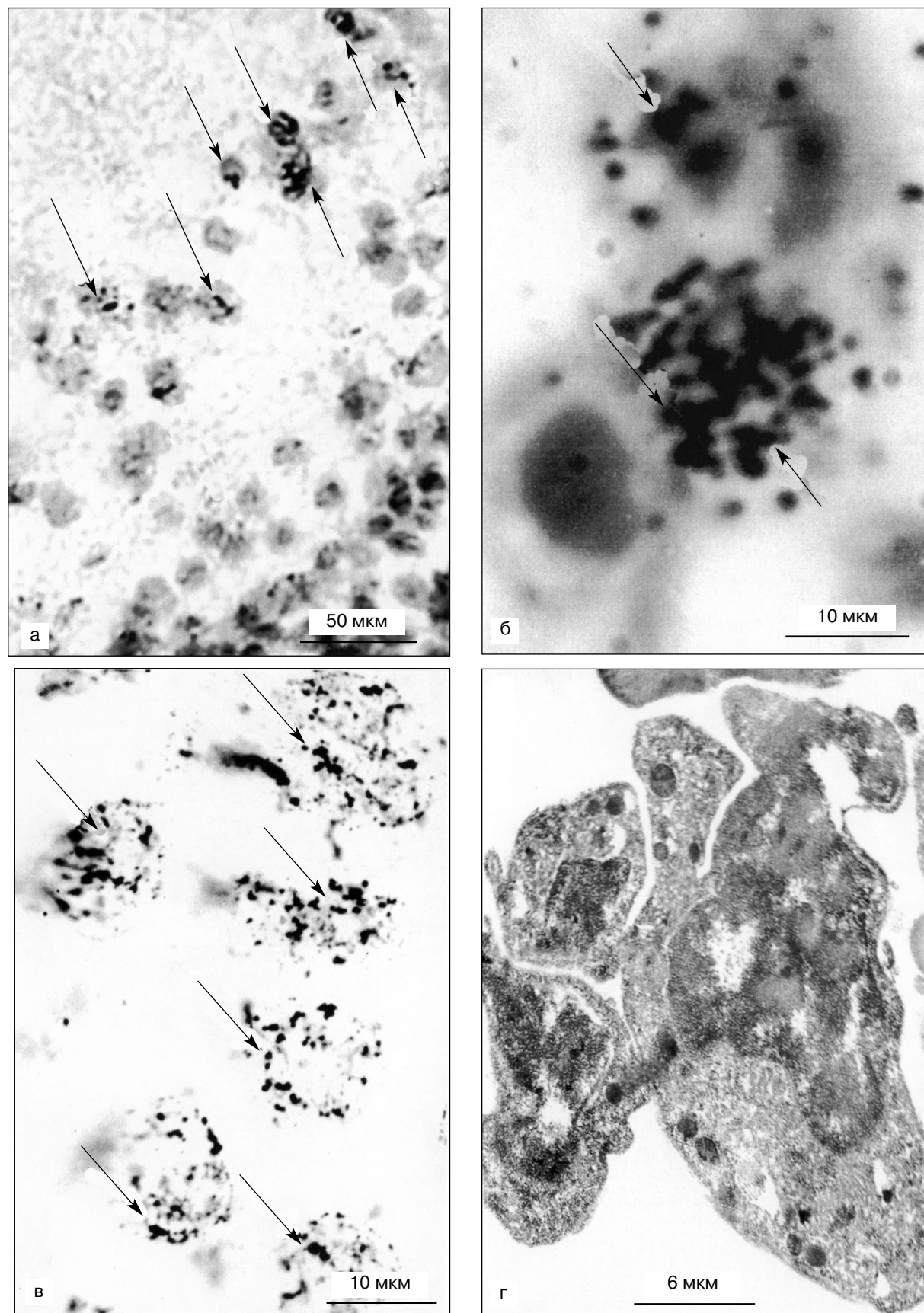


Рис. 3. Апоптоз нейронов ганглионарного слоя сетчатки глаза плода человека 30 нед развития.

а — TUNEL-иммунореактивные ядра ганглионарных клеток (стрелки). Препарат докрашен толуидиновым синим; б — распад ядер ганглионарных клеток (стрелки) при реакции TUNEL; в — кластер TUNEL-иммунореактивных апоптотических клеток (стрелки); г — апоптотические тельца.

Таблица 2

Апоптотический индекс и доля iNOS-позитивных нейронов сетчатки глаза плодов человека ($\bar{x} \pm s_x$)

Тип клеток	Доля iNOS-позитивных нейронов (%) у плодов			Апоптотический индекс (%) у плодов		
	10-11 нед	20-21 нед	30-31 нед	10-11 нед	20-21 нед	30-31 нед
Фотосенсорные клетки	0	0	0	0	0	0
Амакриновые клетки:						
первого типа	10,4±2,4	17, 2± 2,0	27,3±2,0	0	0	0
второго типа	7,1±1,2	12,3±1,6	21±1,1	0	0	0
третьего типа	0	0	0	0	0	0
Ганглионарные клетки	15,2±1,4	34,1±2,1	56,0±2,3	1,3±1,3	2,2±1,1	4,0±1,2

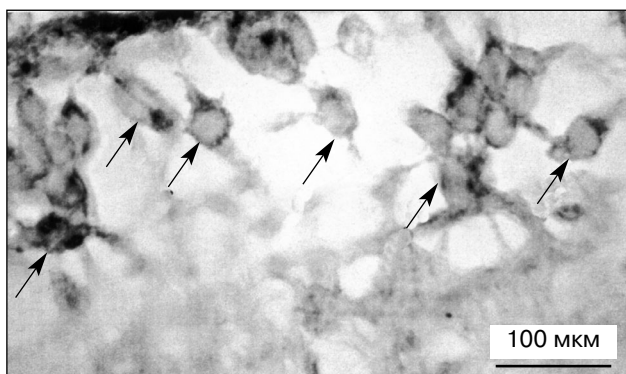


Рис. 4. Индуцибельная NO-синтаза в ганглионарных клетках (стрелки) сетчатки глаза плода человека 30 нед.

нов приходится на III триместр беременности, и именно в этот период происходит становление основного порядка внутри- и межслойных связей между локальными нейронами сетчатки [7]. Последние синтезируют NO, который влияет на баланс анти- и проапоптотических факторов, а также участвует в качестве организатора нейронных систем, особенно в критических фазах дифференцировки мозга [12].

Апоптоз зависит от баланса нейротрофиновых веществ (BDNF, фактор роста нервов, нейротрофин-3 и нейротрофин-4), которые активируют рецепторы внутриклеточных тирозинкиназ и оказывают протективное влияние на нейроны [22, 26, 31]. Наоборот, все нейротрофины при взаимодействии с рецептором p75 запускают механизмы клеточной смерти [10, 29]. Необратимую активацию этого процесса опосредуют проапоптотические ферменты — каспазы [33]. Связывание нейротрофинов с p75 неизбежно стимулирует последовательно активность каспазы-9, каспазы-3 и сфингомиелиназы, вызывающие фрагментацию ДНК, протеолиз органелл и накопление сфинголипидного церамида [30]. Спектр действия NO в этой ситуации включает энергоемкое рибозилирование цитозольных макромолекул и деаминирование нуклеотидов ДНК. Последующая фрагментация цепи ДНК ведет к аутоинтоксикации клетки и ее гибели [36]. Развитие апоптоза потенцируется способностью NO напрямую подавлять активность дыхательных ферментов и блокировать цепь переноса электронов в митохондриях [25]. Не исключено, что p53, как митохондриальный проапоптотический фактор, принимает непосредственное участие в организации этого процесса [3, 9].

Роль NO в механизмах апоптоза сводится к цитотоксическому действию молекулы на мишень [1]. По нашим наблюдениям, возрастание апоптотического индекса сочетается с появлением в нейронах позитивной реакции на iNOS. Сходным образом увеличивается активность NADPH-d, которая, вероятно, указывает на суммарное содержание конститутивной и индуцибельной NOS. Поскольку индуцибельный изофермент синтезирует в 100 раз больше молекул NO, чем его конститутивные формы [1, 25], можно считать, что созревание NO-ергической трансмиссии в сетчатке глаза человека связано с кумуляцией высоких концентраций NO в нейропиле и цитоплазме нейронов. Вовлечение NO как ретроградного и объемного мессенджера в передачу информации между нейронами обусловлено его способностью облегчать или тормозить высвобождение трофических факторов из окружающих синапсов [17].

Преждевременное развитие апоптоза сдерживается трофическими факторами, которые антероградно транспортируются по афферентным волокнам. Прерывая контакты с этими волокнами, нейроны лишаются трофической поддержки и погибают [34]. Установлено, что начальный период апоптоза в сетчатке индуцируется экспрессией фактора роста нервов, который стимулирует активность рецептора p75, однако во втором периоде нейротрофины функционируют уже как антиапоптотический фактор [13–15].

Таким образом, смена строго запрограммированных фаз избирательной гибели клеток вследствие апоптоза коррелирует с прогрессивным развитием NO-ергической специализации нейронов. Можно полагать, что массивная выработка NO компенсирует протективное действие нейротрофинов и является пусковым механизмом апоптоза нейронов сетчатки в позднем периоде внутриутробного развития человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брюне Б., Сандау К. и фон Кнетен А. Апоптотическая гибель клеток и оксид азота: механизмы активации и антагонистические сигнальные пути (обзор). Биохимия, 1998, т. 63, вып. 7, с. 966–975.
2. Лушников Е.Ф. и Абросимов А.Ю. Гибель клетки (апоптоз). М., Медицина, 2001.
3. Матвеева Н.Ю. Апоптоз: морфологические особенности и молекулярные механизмы. Тихоокеанский мед. журн., 2003, № 4, с. 12–16.

4. Матвеева Н.Ю. Ультраструктурная характеристика апоптоза ганглиозных клеток сетчатки плодов человека. Тихоокеанский мед. журн., 2004, № 3, с. 21–23.
5. Матвеева Н.Ю. и Романова Н.Е. Онтогенетические различия ганглиозного слоя сетчатки глаза плодов человека. Тихоокеанский мед. журн., 2004, № 2, с. 26–28.
6. Чельшев Ю.А., Черепнев Г.В. и Сайткулов К.И. Апоптоз в нервной системе. Онтогенез, 2001, т. 32, № 2, с. 118–129.
7. Школьник-Яррос Е.Г. и Калинина А.В. Нейроны сетчатки. М., Наука, 1986.
8. Ahmad I., Leinders-Zufall T., Kocsis J.D. et al. Retinal ganglion cells express a cGMP-gated cation conductance activatable by nitric oxide donors. *Neuron*, 1994, v. 12, p. 155–165.
9. Bahr M. Live or let die — retinal ganglion cell death and survival during development and in the lesioned adult CNS. *Trends Neurosci.*, 2000, v. 23, p. 483–490.
10. Barrett G.L. The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis. *Prog. Neurobiol.*, 2000, v. 61, p. 205–229.
11. Chen H. and Weber A.J. BDNF enhances retinal ganglion cell survival in cats with optic nerve damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001, v. 42, p. 966–974.
12. Contestabile A. Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Res. Rev.*, 2000, v. 32, p. 476–509.
13. Frade J.M. and Barde Y.A. Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord. *Development*, 1999, v. 126, p. 683–690.
14. Frade J.M., Bovolenta P., Martinez-Morales J.R. et al. Control of early cell death by BDNF in the chick retina. *Development*, 1997, v. 124, p. 3313–3320.
15. Frade J.M., Bovolenta P. and Rodriguez-Tebar A. Neurotrophins and other growth factors in the generation of retinal neurons. *Microsc. Res. Tech.*, 1999, v. 45, p. 243–251.
16. Gally J.A., Montague P.R., Reeke G.N., Jr. and Edelman G.M. The NO hypothesis: Possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, v. 87, p. 3547–3551.
17. Goldstein I.M., Ostwald P. and Roth S. Nitric oxide: a review of its role in retinal function and disease. *Vision Res.*, 1996, v. 36, p. 2979–2994.
18. Hope B.T. and Vincent S.R. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase. *J. Histochem. Cytochem.*, 1989, v. 37, № 5, p. 653–661.
19. Kim I.-B., Oh S.-J. and Chun M.-H. Neuronal nitric oxide synthase immunoreactive neurons in the mammalian retina. *Microsc. Res. Tech.*, 2000, v. 50, p. 112–123.
20. Klocker N., Cellerino A. and Bahr M. Free radical scavenging and inhibition of nitric oxide synthase potentiates the neurotrophic effects of brain-derived neurotrophic factor on axotomized retinal ganglion cells in vivo. *J. Neurosci.*, 1998, v. 18, p. 1038–1046.
21. Klocker N., Kermer P., Gleichmann M. et al. Both the neuronal and inducible isoforms contribute to upregulation of retinal nitric oxide synthase activity by brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.*, 1999, v. 19, p. 8517–8527.
22. Klocker N., Kermer P. Weishaupt J.H. et al. Brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroprotection of adult rat retinal ganglion cells in vivo does not exclusively depend on phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B signaling. *J. Neurosci.*, 2000, v. 20, p. 6962–6967.
23. Kuan C.-Y., Roth K.A., Flavell R.A. and Rakic P. Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends Neurosci.*, 2000, v. 23, p. 291–297.
24. Liepe B.A., Stone C., Koistinaho J. and Copenhagen D.R. Nitric oxide synthase in Muller cells and neurons of salamander and fish retina. *J. Neurosci.*, 1994, v. 14, p. 7641–7654.
25. Lipton S.A. Neuronal protection and destruction by NO. *Cell Death Differ.*, 1999, v. 6, p. 943–951.
26. Lossi L. and Merighi A. In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. *Prog. Neurobiol.*, 2003, v. 69, p. 287–312.
27. LoTurco J.J., Owens D.F., Heath M.J.S. et al. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron*, 1995, v. 15, p. 1287–1298.
28. Mey J. and Thanos S. Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo. *Brain Res.*, 1993, v. 602, p. 304–317.
29. Miller F.D. and Kaplan D.R. Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis. *Cell Mol. Life Sci.*, 2001, v. 58, p. 1045–1053.
30. Monti B., Zanghellini P. and Contestabile A. Characterization of ceramide-induced apoptotic death in cerebellar granule cells in culture. *Neurochem. Int.*, 2001, v. 39, p. 11–18.
31. Nakazawa T., Tamai M. and Mori N. Brain-derived neurotrophic factor prevents axotomized retinal ganglion cell death through MAPK and PI3K signaling pathways. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2002, v. 43, p. 3319–3326.
32. Oppenheim R.W. Programmed cell death. In: *Fundamental Neuroscience*. San Diego, Academic, 1999, p. 581–609.
33. Oppenheim R.W., Flavell R.A., Vinsant S. et al. Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J. Neurosci.*, 2001, v. 21, p. 4752–4760.
34. Papermaster D.S. Apoptosis of the mammalian retina and lens. *Cell Death Differ.*, 1997, v. 4, p. 21–28.
35. Perry V.H., Henderson Z. and Linden R. Postnatal changes in retinal ganglion cell and optic axon populations in the pigmented rat. *J. Comp. Neurol.*, 1983, v. 219, p. 356–368.
36. Pieper A.A., Verma A., Zhang J. and Snyder S.H. Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1999, v. 20, p. 171–181.
37. Rakic S. and Zecevic N. Programmed cell death in the developing human telencephalon. *Eur. J. Neurosci.*, 2000, v. 12, p. 2721–2734.
38. Takahata K., Katsuki H., Kume T. et al. Retinal neuronal death induced by intraocular administration of a nitric oxide donor and its rescue by neurotrophic factors in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2003, v. 44, p. 1760–1766.
39. Yamamoto R., Bredt D.S., Snyder S.H. and Stone R.A. The localization of nitric oxide synthase in the rat eye and related cranial ganglia. *Neuroscience*, 1993, v. 54, p. 189–200.
40. Zhang C.-W., Lu Q., You S.-W. et al. CNTF and BDNF have similar effects on retinal ganglion cell survival but differential effects on nitric oxide synthase expression soon after optic nerve injury. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2005, v. 46, p. 1497–1503.

Поступила в редакцию 15.11.2005 г.

ROLE OF NITRIC OXIDE IN APOPTOSIS OF RETINAL NEURONS IN HUMAN FETUSES

N.Yu. Matveyeva, S.G. Kalinichenko, I.I. Pushchin and P.A. Motavkin

The localization of NADPH-diaphorase (NADPH-d), inducible NO-synthase (iNOS) and TUNEL-immunoreactive neurons was studied in the retina of human fetuses in the I–III trimesters of pregnancy. High NADPH-d activity was found in internal segments of photosensory cells, amacrine and ganglion cells. The population of NADPH-d-positive amacrine cells included three types of neurons. Neurons of the 1st type had large size and scarce dendritic field, occupying the inner nuclear and outer plexiform layers. Small neurons of the 2nd type were located in the inner plexiform layer. Ectopic amacrine cells of 3rd type could be found in the outer part of the ganglion cell layer. High density of the NADPH-d-positive neurons was detected in the central portion of retina surrounding fovea cen-

tralis and the optic disk area. The activity of NADPH-d was found to grow progressively in ontogenesis and to correlate with the appearance of immunoreactive iNOS in neurons. Immunoreactive iNOS marked a subpopulation of amacrine and ganglion cells which appeared in weeks 20–21 of gestation and attained maximal immunoreactivity by the end of the III trimester. TUNEL-immunoreactive nuclei of the neurons with the signs of the apoptotic destruction were found in weeks 30–31 of gestation. The highest apoptotic index was found in the population of ganglion cells. The data obtained strongly suggest that NO is a factor, mediating the neuronal apoptosis during the critical period of a differentiation of interneuronal connections in the human retina.

Key words: *apoptosis, nitric oxide, amacrine cells, ganglion cells, photoreceptors, neurogenesis of the human retina.*

Department of Histology, Cytology and Embryology, Vladivostok State Medical University, Laboratories of Cytophysiology and Physiology, RAS Far-Eastern Branch Institute of Marine Biology, Vladivostok.

© В.И. Лапша, В.Н. Гурин, 2005
УДК 611-127:612..59.

В.И. Лапша и В.Н. Гурин

ИЗМЕНЕНИЯ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ГИСТОГЕМАТИЧЕСКОГО БАРЬЕРА В ПРАВОМ ПРЕДСЕРДИИ У КРЫС ПРИ КРАТКОВРЕМЕННОМ И ДЛИТЕЛЬНОМ ТЕПЛОВОМ СТРЕССЕ

Лаборатория физиологии функциональных систем (зав. — академик НАН Беларуси проф. В.Н.Гурин)
Института физиологии НАН Беларуси, г. Минск

В острых опытах на крысах изучены изменения ультраструктуры гистогематических барьеров миокарда в правом предсердии при кратковременном и длительном тепловом стрессе. Показано, что при кратковременном перегревании животных (40 °С, 30 и 60 мин) ректальная температура повышалась на 3,0–3,5 °С. Сразу после перегревания и через 24 и 48 ч наблюдались деструктивные и компенсаторно-приспособительные изменения в микроциркуляторном русле, отек перикапиллярного пространства, изменения размеров митохондрий под сарколеммой кардиомиоцитов. При длительном перегревании животных (40 °С, 4 ч/сут, 28 сут) ректальная температура повышалась на 0,4–1,6 °С, изменения в микроциркуляторном русле имели как дистрофический, так и компенсаторно-приспособительный характер. В просвете микрососудов отмечался сдвиг эритроцитов и тромбоцитов, лизис эритроцитов. Количество пиноцитозных пузырьков в эндотелиоцитах вариабельно, ядра эндотелиоцитов имеют повышенную электронную плотность, изрезанные контуры. В перикапиллярном пространстве встречались миелоноподобные фигуры и апоптозные тела. В кардиомиоцитах под сарколеммой отмечалось скопление митохондрий, вакуолизации саркоплазмы. Сравнение эффектов кратковременного и длительного действия тепла на гистогематические барьеры в правом предсердии указывает на более значительные изменения при длительном тепловом стрессе.

Ключевые слова: *тепловой стресс, сердце, правое предсердие, гистогематический барьер.*

Тепловой стресс характеризуется многими структурно-функциональными изменениями в организме [3]. Показано, что в кардиомиоцитах при этом состоянии происходят изменения, характерные для разных стадий апоптоза: скопление мелких митохондрий (чаще под сарколеммой), инвагинации цитоплазмы в ядро, глыбчатое распределение хроматина, пикноз ядра [5], появление апоптозных тел. Известно также, что патологические изменения в миокарде во многом определяются состоянием его гистогематических барьеров [4, 6]. Однако состояние этих барьеров, объединяющих микроциркуляторное русло, периваскулярное пространство и внешние клеточные мембраны кардиомиоцитов, в условиях теплового стресса не изучено.

Цель настоящего исследования — изучение изменений ультраструктуры гистогематических барьеров правого предсердия в условиях кратковременного и продолжительного теплового стресса.

Материал и методы. Эксперименты выполнены с соблюдением всех правил работы с лабораторными животными на 16 крысах-самцах линии Вистар массой 250–300 г. Животные находились в стационарных условиях вивария при температуре $22,0 \pm 1,0$ °С со свободным доступом к воде и пище.

За 12–14 ч до эксперимента крыс лишали пищи. Животные были разделены на 4 группы. 1-ю группу составили интактные крысы (контроль). Тепловой стресс вызывали перегреванием животных в хорошо вентилируемой термокамере при температуре воздуха 40 °С в течение 30 мин