

93/5

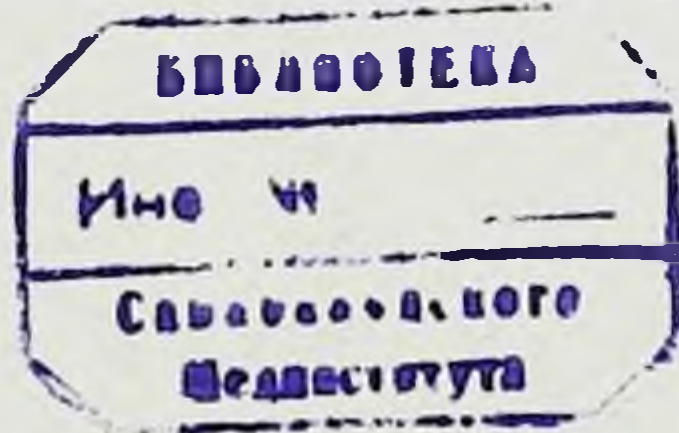
ЛЕНИНГРАДСКИЙ ПЕДИАТРИЧЕСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
ИНСТИТУТ

---

С. Н. ОЛЕНЕВ

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА НЕЙРОНОВ  
ЗРИТЕЛЬНОЙ КОРЫ СРЕДНЕГО МОЗГА  
(ТЕСТУМ ОРТИСУМ) ПТИЦ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук



Ленинград  
1964

ЛЕНИНГРАДСКИЙ ПЕДИАТРИЧЕСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
ИНСТИТУТ

---

С. Н. ОЛЕНЕВ

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА НЕЙРОНОВ  
ЗРИТЕЛЬНОЙ КОРЫ СРЕДНЕГО МОЗГА  
(ТЕСТУМ ОРТИСУМ) ПТИЦ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Ленинград  
1964

Работа выполнена на кафедре гистологии и эмбриологии Ленинградского педиатрического медицинского института.

Научный руководитель — профессор А. Г. Киорре.

Официальные оппоненты:

профессор Г. З. Левин (Психо-неврологический институт  
им. В. М. Бехтерева),

доктор медицинских наук А. С. Ионтов (Институт физиологии  
АН СССР им. И. П. Павлова)

Защита диссертации состоится \_\_\_\_\_ 1964 г. в \_\_\_\_\_ час.  
на Ученом Совете Ленинградского педиатрического медицинского института.

Автореферат разослан 30/IX \_\_\_\_\_ 1964 г.

Изучение процесса дифференцировки тканевых элементов нервной системы, как и изучение дифференцировки вообще, имеет большое практическое значение. Понимание причинных факторов развития поможет не только лучше понять пороки развития мозга, но и дать отправные моменты для изыскания целого ряда высокоактивных веществ, влияющих на развитие и рост нервных элементов.

Задача настоящей работы — исследование основных этапов дифференцировки нейронов зрительной коры среднего мозга (*tectum opticum*) птиц, попытка выяснения закономерностей их развития.

Первая часть диссертации посвящена изучению обычными гистологическими и отчасти гистохимическими методами внешних проявлений дифференцировки нейронов зрительной коры в нормальном онтогенезе. Во втором разделе диссертации проявления дифференцировки изучены с применением метода тканевых культур. Третья часть содержит изложение опытов с воздействием некоторых веществ, стимулирующих рост нервных элементов в культуре. Диссертация заканчивается попыткой построения схемы дифференцировки нейронов.

### **Дифференцировка нейронов зрительной коры среднего мозга (*tectum opticum*) в нормальном эмбриогенезе**

Проблеме дифференцировки нейронов посвящена обширная литература. Многочисленные исследователи предлагали различные схемы периодизации (Гис, 1889; Скотт, 1899; Гельд, 1909; Ховен, 1910; П. Е. Снесарев, 1935; Я. А. Винников, 1946; А. Г. Кнорре, 1949; Л. С. Гольдин, 1949; Гамбургер и Леви-Монтальчини, 1950; А. Д. Зурабашвили, 1951; Е. И. Калинин, 1952; Гесс, 1957; А. М. Иваницкий, 1958; А. Г. Кнорре и Л. В. Суворова, 1959; К. В. Гегелашвили, 1959).

Многочисленные экспериментальные исследования (Гамбургера, Букера, Баррона, Вейсса и др.) давали основание для гипотез о механизме дифференцировки в целом (Я. Г. Эренпрейс, 1961; Браше, 1962; и др.) и дифференцировки нейронов в частности (Гамбургер и Леви-Монтальчини, 1950; Легисса, 1951, 1958; Вейсс, 1961).

Данные по дифференцировке и эмбриогенезу тектум относительно неполны.

Разные авторы, изучавшие строение этого отдела мозга, основываясь на различных принципах, предлагали свои подразделения слоев: на основании данных описательной морфологии Стеида (1868) различал 12 слоев, Беллончи (1888) — 11 слоев, Сантьяго Рамон-и-Кахал (1891, 1911), так же как впоследствии его брат Педро Рамон-и-Кахал (1943), выделил 15 слоев, ван Гехухтен (1892) — 3 большие группы слоев, Келликер (1896) и Рис (1899) — 9 слоев. Хьюбер и Кросби (1933), подразделившие тектум на 6 слоев, хотели создать классификацию, применимую к строению этого отдела мозга у различных представителей класса позвоночных. Жангер (1945) различал 6 слоев. Шаррер и Синден (1949) подразделили с точки зрения «хемоархитектоники» тектум на 17 слоев. Ширасу (1953), сравнивая строение этого отдела мозга у различных видов птиц на препаратах, обработанных по Ниссию, выделил 14 слоев. Крег, Ивэнс и Хамлин (1954) выделили 6 слоев, используя морфо-физиологический принцип. Они показали соответствие направлений нервных волокон разностям электрических потенциалов внутри слоев и между ними. Морфо-эмбриологический принцип Легисса (1958), различавшего 4 зоны, 9 слоев и 12 этажей, привел этого автора к нумерации слоев не от поверхностных к глубоким, а наоборот, чтобы лучше подчеркнуть последовательность миграции. Коуэн, Адамсон и Пауелл (1961) приводят свое подразделение слоев серого вещества тектум голубя (по буквам латинского алфавита от a до i).

Периодизация дифференцировки нейронов тектум птиц имеется только в работах Легисса (1958), различавшего размножение, миграцию, общую дифференциацию, специальную дифференциацию и функциональную дифференциацию, и Боунишон (1962), выделившей два периода развития. В 1-м преобладает деление клеток и их миграция (медуллобласты дифференцируются в нейробласты). Второй период, начинающийся со стадии 10 дней инкубации, соответствует превращению нейробласта в нейрон. Помимо этих двух работ, охватываю-

ших весь период развития, имеется ряд исследований, посвященных отдельным этапам дифференцировки (Тельо, 1923; А. Д. Зурабашвили, 1958; Бошишон, 1960, 1962; Филогамо, 1960; Х. Фуджита и С. Фуджита, 1963; Клика и Елинек, 1963).

В результате процессов дифференцировки образуются различные типы нейронов, их классификацией занимались Сантьяго Рамон-и-Кахал (1891, 1911), Рис (1899), Педро Рамон-и-Кахал (1943, 1946), Ширасу (1953), Легисса (1958).

Многочисленные биохимические, гистологические и физиологические данные показывают глубокие изменения в нервных клетках в процессе дифференцировки.

Противоречивость и недостаточность литературных данных, посвященных дифференцировке нейронов тектум, побудили исследовать морфологическими и, отчасти, гистохимическими методами развитие нейронов: изменение ядер, рост отростков, появление нислевского вещества, динамику нуклеиновых кислот, соотношение различных типов нейронов.

Материал и методика. Методами импрегнации серебром (всего импрегнировано около 90 зародышей), окрасками по Ниссию, метиловым зеленым — пиронином, галлоцианином по Эйнарсону (для суммарного выявления ДНК и РНК), галлоцианином после действия рибонуклеазы (для выявления ДНК) и реакцией Фельгена, исследованы следующие стадии развития зрительной коры среднего мозга (тектум оптикум) у кур: куриные зародыши 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 17, 21 суток инкубации, стадия вылупления. Среди испытанных методов импрегнации по Бильшовскому — Буке, Кахалу I, III, V, Гольджи — Дейнека, Холмсу, Гольджи — Бюбенету, Гольджи — Колосову, Расмуссену дали наилучшие результаты импрегнация по Гольджи — Колосову при 27°; для ранних стадий — методы Холмса, Кахала I, Гольджи — Дейнека; для поздних стадий — Кахала V, Гольджи — Дейнека. Выборочные стадии обрабатывались для выявления щелочной фосфатазы по Гомори, аденозинтрифосфатазы по Падиккуле и Герман, эстеразы с использованием  $\alpha$ -нафтилацетата.

### Собственные данные

Процесс формирования и расслоения тектум схематически можно представить следующим образом. Со 2-го до 5-го дня инкубации строение стенки существенно не изменяется. Она медленно и незначительно увеличивается в толщине. В стенке можно выделить три зоны: 1) узкая зародышевая зона у вну-

тренней пограничной мембраны, 2) еще более узкая промежуточная зона, в которой согласно определению Фуджита должны встречаться клетки на стадиях прометафазы и телофазы, 3) плащевая зона, занимающая основную толщину стенки мозгового пузыря. Начиная с 4-го дня инкубации, когда в поверхностных отделах тектум появляются нейробласты, можно выделить 4-ю зону — краевую вуаль. В процессе дальнейшего развития из краевой вуали и будут образовываться многочисленные слои зрительной коры среднего мозга, тогда как генеративные (камбиальные) зоны (зародышевая, промежуточная, плащевая), которые объединены Фуджита под названием «матрикса», будут занимать все меньшую и меньшую часть стенки тектум и в конце развития превратятся в эпендиму. Начиная с 5-х суток инкубации, когда согласно литературным данным (Романов, 1960) подрастают волокна из сетчатки, начинается массовая миграция клеток, приводящая к расслоению и значительному увеличению толщины стенки тектум. Клетки, которые к началу миграции более дифференцированы (имеют более крупные размеры цитоплазмы, ядер и нейрофибриллы), обладают очень ограниченной миграционной способностью, по сравнению с основной массой мелких клеток. Первоначально эти более крупные клетки развиваются в поверхностных частях мозгового пузыря, но с началом миграции они оказываются в более глубоких слоях из-за массовой миграции в поверхностные слои других клеток. По мере дифференциации мигрирующие клетки прекращают свое передвижение и образуют слои, тогда как менее дифференцированные элементы продолжают мигрировать в более поверхностные отделы. Благодаря этому нейроны, располагающиеся более глубоко, более дифференцированы, чем поверхностные.

При рассмотрении этапов дифференцировки нейронов тектум можно, следуя за Легисса, выделить стадии размножения, миграции, общей дифференциации.

**Р а з м н о ж е н и е.** Первоначально стенка среднего мозгового пузыря представлена однородными клетками. У внутренней пограничной мембраны сосредоточены митотические фигуры, а в плащевой зоне — неделящиеся клетки. По Зауеру (1934), клетки, находящиеся в интеркинетическом состоянии в плащевой зоне, совершают предмитотическую миграцию к внутренней пограничной мембране и, разделившись, уходят обратно. Ряд фактов доказал правильность этой гипотезы (Зауер и Чилленден, 1959; Кэллен и Вальмин, 1963). Фуджита (1963), изучавший включение тимидина —  $H^3$  в синтезируе-

мую ДНК и доказавший предмитотическую миграцию ядер, на основании распределения меченых митозов делает вывод об однородности клеточной популяции в среднем мозговом пузыре 6-дневного куриного эмбриона.

В настоящем исследовании удалось установить, что со 2-го по 6-й день инкубации в клетках уменьшаются размеры ядрышек, ядра становятся более гранулярными, реакция Фельгена на 6-е сутки выявляет ядра гораздо более ярко, чем на ранних стадиях. На основании подсчета клеток по специальной методике\* количество клеток равнялось: на стадии 2 дней инкубации — около 11 тыс., 2,5 дня — 28 тыс., 3 дня — 50 тыс., 4 дня — 220 тыс., 5 дней — 530 тыс., 6 дней — 2200 тыс., 10 дней — 4,8 миллиона, 21 день — 5 миллионов. Интерпретируя полученные численные данные, можно задать вопрос — сколько раз делились клетки, начиная с презумптивного зачатка тектум, прежде чем тектум будет сформирован? Правомочность постановки подобного вопроса основывается на гистоавторадиографических данных об однородности клеточной популяции, установленное Фуджита (1963) для клеток среднего мозгового пузыря 6-дневного куриного зародыша. После 2-го дня инкубации, когда уже обособлен средний мозговой пузырь, дающий начало тектум, клетки последовательно должны делиться около 8—9 раз. Морфологическое изучение делящихся клеток на имеющихся препаратах в основном подтвердило литературные данные (Кэллен, 1961; Бонишон, 1962). Митотические фигуры до 8-го дня инкубации встречались только у внутренней пограничной мембраны, после 8-го дня и в других слоях. Митотический коэффициент повышается до 4-го дня инкубации, а затем снижается: 2 дня — 80%, 2,5 дня — 75%, 3 дня — 93%, 4 дня — 94%, 6 дней — 72%, 8 дней — 69%, 10 дней — 50%, 12 дней — 36%.

**М и г р а ц и я.** Определить, на какой стадии мигрируют нервные клетки, довольно сложно. Можно исключить медуллобласты, так как их крупные светлые ядра с большим эмбрионального типа ядрышком отличаются от ядер мигрирующих

---

\* Число клеток в слое (N) подсчитывалось по выведенной формуле

$$N = N^2 \cdot \frac{2}{3} \pi \cdot (R_1^3 - R_2^3) \cdot (1 - \cos \alpha)$$

N — поверхностная плотность клеток;  $R_1$  — большой радиус слоя (сферы);  $R_2$  — малый радиус слоя;  $\angle \alpha$  — угол между осью и радиусом, идущим к краю тектум.



клеток. Кроме того никогда не удавалось видеть делящихся мигрирующих клеток. С другой стороны, у этих клеток далеко не всегда выявляются нейрофибриллы. Вопрос осложняется еще и тем, что у мелких ассоциативных нейронов, которые мигрируют на большие расстояния, трудно выявить нейрофибриллы (даже в дифференцированном состоянии). Поэтому говорить о миграции нейробластов приходится с оговорками. Единственной гипотезой, которая в какой-то степени способна объяснить причину миграции, расслоения и образования отдельных нейронных взаимосвязей, является теория хемотаксиса, обоснованная Рамон-и-Кахалом. Нейростимулирующие факторы, открытые Леви-Монтальчини, Коэном и др., могут служить оправданием для попытки применения теории хемотаксиса к рассмотрению эмбриогенеза тектум.

**Дифференциация.** В период дифференциации четко различаются нейроны двух типов. Нейроны I типа — «первичные», самодифференцирующиеся (по Легисса) — дифференцируются самыми первыми, они представлены клетками, отсылающими свой нейрит из тектум. Нейроны II типа — «вторичные», дифференцировка которых, по Легисса, зависит от влияния клеточного окружения, — дифференцируются во вторую очередь, к ним относятся мелкие ассоциативные нейроны, чьи нейриты не покидают тектум.

Первые признаки дивергенции в развитии клеток тектум выявляются на стадии 3,5 дня инкубации, когда в поверхностных отделах стенки появляются ядра более бедные ДНК по сравнению с ядрами большинства клеток. Эта визуальная разница в содержании ДНК еще более отчетлива на стадии 4 дней, при почти одинаковых размерах ядер. Впоследствии клетки с ядрами, более бедными ДНК, становятся «первичными» нейронами. В процессе дифференцировки объем этих ядер увеличивается в 12 раз, фельген-отрицательное ядрышко становится довольно крупным, ДНК локализуется в глыбках перинуклеолярного хроматина; в клетках выявляются хорошо развитое нислевское вещество и легко импрегнируемые нейрофибриллы. Активность щелочной фосфатазы, относительно одинаково выраженная у 4- и 8-дневного эмбрионов, значительно возрастает к 15-му дню инкубации в слоях межклеточных сплетений. В цитоплазме «первичных» нейронов активность этого фермента выявляется в виде гранул. АТФ-азная активность была обнаружена в дифференцированных нейронах в ядрышке и ядре и в меньшей степени в виде гранул в цитоплазме. Активность неспецифической эстеразы возрастает

в тектум с развитием слоев межклеточных сплетений и локализуется в последних.

Дифференцировка «вторичных» нейронов начинается значительно позднее. К сожалению, эти клетки не имеют такой естественной метки, какой является бедность ДНК у «первичных» нейронов. Значительную трудность представляет отличие ядер мелких нейронов от ядер глии. Достоверно выделить «вторичные» нейроны на препаратах, обработанных по Фёльгену, можно лишь после сопоставления с данными импрегнации по Гольджи, начиная со стадии, когда сформирован 6-й слой. Этот слой, формирующийся в период между 10 и 12 днями инкубации, почти полностью представлен «вторичными» ассоциативными нейронами. В процессе развития этих нейронов не удается визуально отметить изменения содержания ДНК. Объем перинуклеарной цитоплазмы возрастает незначительно, в этих нейронах крайне трудно выявить нейрофибриллы и тигроид. Мелкие ассоциативные нейроны хорошо импрегнируются по Гольджи — Колосову. АТФ-азная активность в основном локализуется в ядрах, активность щелочной фосфатазы и неспецифической эстеразы в ветвлениях отростков (слоях сплетений). В процессе дифференцировки наблюдается заметное возрастание активности ферментов.

### Дифференцировка нейронов зрительной коры среднего мозга в культуре

Литературные данные о культивировании нервной ткани для удобства изложения подразделены на три части — данные о культивировании эксплантатов, содержащих главным образом медуллобласты (I), нейробласты (II), нейроны (III).

В культуре медуллобласты не дают отчетливой картины роста, переживая в составе эксплантата, они вскоре дифференцируются в нейробласты (начинается рост нейритов) (Оливо, 1928; Мей, Куртей, Денефль, 1961).

Эксплантаты, содержащие главным образом нейробласты, по литературным данным (Оливо, 1928; Л. М. Григорьев, 1931; Хьюз, 1953; и др.) в течение первых пяти дней культивирования дают картину интенсивного роста отростков. Эти многочисленные радиально направленные отростки, вышедшие в зону роста, первоначально ничем не сопровождаются, затем по ним происходит миграция как нейробластов, так и клеток глии. Впоследствии вырастающие изолированные нервные волокна распадаются. В многочисленных работах рост таких от-

ростков подвергался специальному исследованию и обсуждению (Вейсс, 1934; Накаи и Кавасаки, 1959; и др.). Если у нейробластов, находящихся в составе кусочка, происходит дифференциация (рост и ветвление отростков), то судьба нейробластов, покинувших кусочек, не ясна (Леви, 1934). Через 10—14 дней культивирования наблюдается эпителиоидный рост глии. Четкая граница между центральным кусочком и зоной роста исчезает. Нейробласты, лежащие на глиальной подкладке, могут существовать относительно долго и способны митотически делиться (Леви, 1934), в них можно выявить нейрофибриллы. Достоверная дифференциация нейробласта в нейрон в условиях культуры не описана.

Эксплантаты, содержащие нервные клетки на стадии нейрона, дают в условиях культуры другую картину роста, чем предыдущая стадия. В течение первых пяти дней культивирования из кусочка вырастают веретенообразные глиальные клетки (Хильд, 1957; Окамото, 1958; и др.). Одновременно с увеличением зоны роста происходит уплощение центрального кусочка. Через 20 дней культивирования центральный кусочек полностью уплощен, граница между ним и зоной роста исчезает. С прекращением миграции глиальные клетки приобретают более характерный для них вид (Померат и Костеро, 1956; Хильд, 1957; Станек, 1961). Нейроны в условиях культуры характеризуются отсутствием миграционной способности. Их отростки растут не свободно, как у нейробластов, а по глиальному пласту. В культуре нейроны сохраняют нейрофибриллы, нислевское вещество, синаптические окончания (Хильд, 1959; Гейгер, 1963). Вопрос о делении нейронов в культуре не совсем ясен. В культуре нейроны обладают способностью миэлинизировать свои волокна (Петерсон и Мэррей, 1955; Хильд, 1957), проводить и генерировать нервные импульсы (Хильд и Тасаки, 1961; Крайн и Петерсон, 1963). Максимальный срок культивирования нейронов составляет, по данным Гейгера (1958), 1,5 года. К показателям дифференцировки нейронов в культуре по литературным данным можно отнести увеличение тела клетки, рост и миэлинизацию отростков.

Из целого ряда вопросов, которые возникают после знакомства как с литературой, так и с собственными данными первой части диссертации, в настоящем исследовании будет сделана попытка осветить только один вопрос — является ли дифференцировка нервной клетки в культуре саморазвивающимся процессом, или она зависит от влияния внешнего (по отношению к клетке) окружения? Метод тканевых культур

отличается значительной трудоемкостью, поэтому ряд вопросов строения и жизнедеятельности клеток в культуре не мог быть поставлен (предельные сроки культивирования, деление нервных клеток, изменение гистохимических показателей, миэлинизация отростков, электрическая активность культуры и др.).

Материалом для посева служили частицы тектум куриных зародышей различных возрастов, начиная с 4-го дня инкубации и кончая цыпленком до и после вылупления. Всего было посеяно более 2000 культур, из которых сделано 400 препаратов; 90 из них было отобрано для дальнейшего изучения. Исследования подверглись все культуры прижизненно и 90 фиксированных и окрашенных препаратов. Культивирование производилось по методу «летающих стекол». В качестве жидкой фазы питательной среды чаще использовалась следующая: буферный раствор Хенкса + 10% аминокептида-2 + 10% лошадиной сыворотки + антибиотики. В отдельных опытах культивирование производилось в специальных камерах трех типов (похожих на камеру Роуза). Для прижизненного наблюдения был сделан из микроскопа М-9 инвертированный микроскоп с термостатическим столиком.

Среди испытанных методов импрегнации культур наилучшие результаты были получены при импрегнации по Вейссу, Бильшовскому — Буке, Боднану. Из обычных гистологических методов после фиксации по Карнуа и Буэну применялись окраски по Нисслию, галлоцианином, гематоксилином — эозином, гематоксилином — ауранцией.

### Собственные данные

Все культуры, даже находящиеся в одинаковых условиях и содержащие аналогичный материал, в значительной степени индивидуальны. Вариации интенсивности роста у посеянных эксплантатов (от его полного отсутствия до значительных проявлений) встречаются неизбежно. Это сильно осложняет описание изменений эксплантатов в динамике. Приводимое ниже описание является обобщенной схемой, основанной на изучении большого числа культур.

При сопоставлении роста эксплантатов, содержащих нервные клетки на стадиях (I) медуллобласта (эксплантаты 4-дневного куриного эмбриона), (II) нейробласта (эксплантаты 10-дневного эмбриона), (III) нейрона (эксплантаты 17—21-дневного зародыша) можно выявить следующие особенности.

В течение первых 5 дней культивирования эксплантаты, содержащие медуллобласты (1), почти не обнаруживают каких-либо проявлений роста; эксплантаты с нейробластами (2) дают интенсивные вырастания отростков нейробластов из кусочка; эксплантаты, содержащие нервные клетки на стадии нейрона (3) благодаря миграции нейроглии образуют широкую зону роста. Во всех эксплантатах ранних сроков культивирования встречаются распадающиеся клетки.

Через 10 дней культивирования у эксплантатов I группы наблюдается не очень интенсивный рост отростков (медуллобласты дифференцируются в нейробласты); из кусочков 2-й группы начинается эпителиоидный рост нейроглии, те клетки и волокна, которые лежат изолированно от эксплантатов, погибают и вместо них остается детрит; в 3-й группе вследствие миграции клеток происходит значительное уплощение центрального кусочка, который трудно бывает отграничить от зоны роста.

Через 20 дней культивирования эксплантаты 1-й группы либо не обнаруживают роста, либо дают рост, похожий на рост эксплантатов, содержащих нейробласты. Эксплантаты 2-й группы представлены эпителиоидной глиальной мембраной, на которой лежат нейробласты. В эксплантатах 3-й группы на тонкой глиальной подкладке лежат нейроны.

При изучении 5-дневных культур 4- и 6-дневных эмбрионов (их эксплантаты содержат медуллобласты) в центральном кусочке можно выявить наряду с пикнотизированными ядрами погибающих клеток ядра с хорошо сохранившейся структурой. В краевой зоне эксплантатов наблюдаются округлые клетки с крупным ядрышком и очень узким ободком цитоплазмы. Эти клетки, лишенные отростков, по-видимому, можно идентифицировать как медуллобласты.

Нейробласты в культуре имеют относительно мелкие размеры (по сравнению с клетками глии), компактную базофильную цитоплазму, где методами импрегнации по Вейссу можно выявить нейрофибриллы. Нейробласты в процессе культивирования ведут себя по-разному в зависимости от того, остаются ли они в составе кусочка или мигрируют за его пределы. При распластывании эксплантата нейробласты, находящиеся в нем, оказываются как бы лежащими на эпителиоидной глиальной мембране. В условиях культуры глиальные клетки становятся весьма крупными и распластанными, тогда как нейробласты остаются мелкими, однако они выделяются на препаратах благодаря темной импрегнации и наличию нейрофибрилл или

значительной базофилии в узком ободке цитоплазмы. Нейробласты образуют сетевидный войлок переплетающихся отростков. На некоторых препаратах на глицеральной подкладке можно видеть расположение нейробластов гнездами, где тела нескольких клеток близко лежат одно к другому.

Судьба мигрирующих нейробластов иная. В течение первых дней культивирования из эксплантата выселяются довольно немногочисленные округлые клетки. Это выселение идет по уже выросшим нервным волокнам или нитям фибрина. При фазово-контрастном наблюдении из-за большой сферичности этих клеток в живом состоянии бывает затруднительно разглядеть тонкие детали клеток. В их цитоплазме можно было видеть быстрое, похожее на броуновское, движение митохондрий и перемещение крупного темного ядрышка. Когда миграция клетки закончена, из округлой цитоплазмы начинает расти длинный нейрит, который часто делится на две-три веточки. Если нейрит клетки смог «замкнуться» на другие такие же мигрирующие нейробласты, то наблюдается развитие небольшого числа дендритических веточек. При отсутствии глицеральной подкладки нейробласты, по-видимому, не могут долго существовать, и обычно мигрирующие клетки гибнут и быстро разрушаются.

Нейроны, наблюдаемые в условиях культуры, по своему типу чаще относятся к мелким ассоциативным нейронам, крупные нейроны встречаются реже.

Крупные нейроны, которые удалось наблюдать в эксплантатах 15-, 17-дневных зародышей, имеют выраженные нейрофибриллы (импрегнация по Бильшовскому — Буке и Вейссу), однако не всегда в них удается наблюдать развитое нислевское вещество. В живом виде нейроны имеют чаще одно, реже два крупных сферических ядрышка. Удалось установить, что ядрышко живого нейрона по своей структуре не является гомогенным и что в нем имеются более плотные (в фазовом контрасте) и более рыхлые участки. В цитоплазме живых нейронов при докраске янусом зеленым, а иногда и без нее можно видеть короткие палочкообразные митохондрии.

У мелких ассоциативных нейронов при тех же методах импрегнации удалось выявить аргирофилию отростков и цитоплазмы. Нейрофибриллы в культивируемых мелких нейронах не всегда выявляются достаточно отчетливо (нейрофибриллы этих клеток в организме так же выявляются плохо). Сетевидные взаимосвязи мелких ассоциативных клеток можно наблюдать особенно хорошо потому, что трехмерные пространствен-

ные взаимоотношения целого мозга в культуре заменяются двухмерными. В отдельных случаях на нервных волокнах и дендритах можно было наблюдать мелкие петлевидные или булавовидные окончания, которые являются, по-видимому, синаптическими окончаниями. На отдельных препаратах, импрегнированных по Бильшовскому — Буке, можно было выявить на некоторых нервных волокнах шипикоподобные образования. Однако существование шипиков в культуре может быть подвергнуто сомнению, поскольку этот метод импрегнации не является адекватным для выявления шипиков, а попытки применения методов Гольджи для обработки культуры пока были безуспешными. Отростки крупных и мелких нейронов сложно переплетаются.

Рассмотрим поэтапно проявления дифференцировки, которые удалось наблюдать в условиях культуры.

Развитие нейробластов из медуллобластов — вырастание нейритов из округлых малодифференцированных клеток — легко воспроизводится в условиях культуры. Если нейрит может появляться и у изолированных клеток, которые мигрируют из эксплантата, то для развития дендритов необходимо влияние непосредственного клеточного окружения. Дендриты образуются только клетками, не потерявшими связь с посеянными кусочками и его зоной роста. Воздействием химических факторов удалось не только стимулировать рост отростков у клеток эксплантата, но и добиться обильного вырастания дендритов у отдельных, вышедших из эксплантата, изолированных клеток, чего без экспериментального воздействия на настоящем материале обычно не наблюдалось (см. ниже). Таким образом можно предполагать существование критического периода дифференцировки,\* соответствующего вырастанию дендритов. В том случае, если не было внешнего толчка в виде воздействия окружающих клеток на нейробласт в эксплантате, или химических воздействий, дифференцировка приостанавливалась и через некоторое время изолированный, вышедший из эксплантата, нейробласт погибал.

Наличие другого критического периода дифференцировки, по-видимому, тесно связано с началом специфического функ-

---

\* Под критическими периодами дифференцировки клетки подразумеваются периоды, в течение которых клетка наиболее чувствительна к определенным внешним воздействиям. Только благодаря этим воздействиям клетка может продолжать свою дифференцировку; без этих воздействий дифференцировка клетки приостанавливается или изменяет направление по сравнению с типичным.

ционирования клеток и возникновением в них нисселевского вещества. Это особенно отчетливо было показано работами Филогамо (1950, 1960), продемонстрировавшими развитие тектум оптикум в отсутствие зачатка глаза. Ни многочисленные литературные данные, ни собственные результаты не дают основания считать, что в условиях культуры в нейробластах может заново развиваться нисселевское вещество, то есть нейробласт может дифференцироваться в нейрон. В условиях культуры нисселевское вещество имеет те клетки, в которых оно уже было или начало формироваться.

В промежутках между этими критическими периодами дифференцировки, которые удалось выявить, по-видимому, имеет место относительная автономность процессов дифференцировки. У нейробластов с растущим нейритом последний может достигать значительной длины и ветвиться. Нейроны с развитым нисселевским веществом могут значительно увеличивать свой объем и, возможно, образовывать новые связи (синаптические окончания и шипики).

### Некоторые факторы, влияющие на рост нервной ткани в культуре

В III разделе диссертации излагаются первые результаты поисковых исследований. Факторы, влияющие на рост нервной ткани, по их действию на культуру могут быть подразделены на две группы:

1. Факторы, обладающие неспецифическим действием.
2. Факторы, обладающие специфическим действием.

В каждой из этих двух групп факторов имеются факторы как стимулирующие, так и подавляющие рост. При действии неспецифических факторов стимуляция выражается как в переживании и росте нейронов, так и в разрастании нейроглии, более пышном, чем в контроле. При специфической стимуляции будет наблюдаться активизация каких-то отдельных клеточных типов или даже отдельных процессов у клеточных типов. Примером неспецифической стимуляции является действие факторов сыворотки. Примером специфической стимуляции являются нейротропные факторы, которые избирательно вызывают усиление вырастания нервных отростков.

Неспецифическое подавление выражается в ослаблении роста по сравнению с контролем, вплоть до полной его приостановки. Специфическое подавление приводит к подавлению



проявлений жизнедеятельности определенного типа клеток, например нейроглии, тогда как жизнедеятельность нейронов при этом не страдает. Литературные данные приведены в соответствии с этой схемой.

Исследования Леви — Монтальчини и др. установили специфическую стимуляцию роста чувствительных и симпатических ганглиев при воздействии белковых веществ из мышечных сарком 180 и 37, змеяного яда и слюнных желез. Указанные литературные данные побудили исследовать действие веществ, частично известных своим влиянием на рост культуры нервной ткани, частично не изученных, но с избирательным фармакологическим эффектом на нервную систему (нативные яды гюрзы и гадюки, глютаминовая кислота, карбохолин, атропин, мезатон). На стеклах в пробирках производилось культивирование ткани переднего мозга и тектум оптикум куриных зародышей от 8 до 17-го дня инкубации, впоследствии для посева использовалась только ткань тектум. Культуры наблюдались прижизненно с использованием фазового контраста, и затем часть из них импрегнировалась по Вейссу и Боднану. Для испытуемых веществ была определена максимальная неингибирующая рост доза. В том случае, если при действии таких доз наблюдались морфологически выраженные изменения, например увеличение интенсивности вырастания нервных отростков — производилось более детальное исследование (змеяный яд, карбохолин). Установлено, что часть клеток головного мозга реагирует на действие змеяного яда. Наиболее чувствительными к действию змеяного яда оказались эксплантаты 11-дневных куриных зародышей, после 17-го дня инкубации способность к образованию отростков утрачивается. Сходным, хотя и менее выраженным действием, обладает карбохолин. В редких случаях в культуре описано действие змеяного яда и карбохолина на изолированные мигрирующие нейробласты, у которых происходит стимуляция роста дендритов. Высокая избирательность действия нейротропных стимулирующих факторов на спинальные и вегетативные ганглии и часть клеток головного мозга дает основание для предположения, что последние действуют только на клетки, обладающие каким-то определенным химизмом. Стимулирующее действие змеяного яда и карбохолина на рост отростков проявляется только на определенных стадиях дифференцировки. Для изолированных мигрировавших нейробластов змеяный яд и карбохолин являются как бы «разрешающим фактором» для роста дендритов, без которого у этих клеток дендриты не развиваются.

## РЕЗЮМЕ И ВЫВОДЫ

1. Методами импрегнации, окраски гематоксилином-эозином, галлоцианином, по Нисслию, обработки по Фельгену было исследовано развитие зрительной коры среднего мозга (*tectum opticum*) у куриного зародыша на следующих стадиях: 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 17, 21-й день инкубации куриного зародыша, вылупившийся цыпленок.

2. Производился посев кусочков зрительной коры зародышей различных возрастов от 4 дней инкубации до вылупившегося цыпленка в пробирках на стеклах в жидких питательных средах. Прослежены изменения элементов нейробластического ряда и рост нейроглии в сроки до 20—35 суток с момента посева (пересевы не производились, менялась только жидкая фаза среды).

3. Испытано действие зменного яда ( $5\mu/\text{см}^3$ ) и карбохолина ( $1\mu/\text{см}^3$ ) на развивающиеся нервные элементы в культуре.

4. В период размножения клетки многократно митотически делятся; подсчеты числа клеток тектум на различных стадиях развития показывают, что после 2-го дня инкубации до конца эмбриогенеза имеет место около 8—9 последовательных делений. Медуллобластическая однородность клеточного состава исчезает с 3—3,5 суток инкубации, когда начинают появляться ядра, более бедные ДНК (ядра нейробластов «первичных» нейронов). Возникновение нейробластов «вторичных» нейронов крайне трудно проследить в эмбриогенезе, приблизительно оно относится к 8—10 суткам. В культуре медуллобласты не дают отчетливой картины роста. Переживая в составе экплантата, они вскоре дифференцируются в нейробласты.

5. Процессу миграции нейробластов, происходящему в нормальном эмбриогенезе тектум на 7—10-е сутки, соответствует миграционная способность нейробластов этой стадии в культуре. Отростки нейробластов, как в условиях нормального развития, так и в культуре, удлиняясь, образуют варикозные расширения по их ходу и ростовую колбу с пальцевидными псевдоподиями. Вследствие высокой митотической активности размеры клеток тектум несколько уменьшаются, падает содержание РНК. В этот период наблюдается наибольшая чувствительность к действию зменного яда, карбохолина, стимулирующих вырастание отростков (дендритов и нейритов).

6. 10—17-й день инкубации характеризуется процессом расслоения зрительной коры, который как и дифференцировка нейронов, начинаясь в глубоких слоях, идет к более поверхно-

стным. Раньше других дифференцируются мультиполярные нейроны 3-го слоя, затем веретенообразные нейроны 4-го слоя, которые отстают в своем развитии от первых на 2—3 дня. В мультиполярных нейронах 3-го слоя нислевское вещество появляется на 12-е сутки, по мере развития нислевского вещества увеличивается содержание РНК. Уже на 10-е сутки при импрегнации по Гольджи — Колосову можно было отметить терминали в виде колечек, которые, по-видимому, представляют синаптические окончания; с большей уверенностью можно говорить о наличии синапсов на 15-е сутки (выявлены по Гольджи — Дейнека).

7. С увеличением возраста куриного эмбриона затрудняется получение культур из частиц тектум. Дифференцирующиеся нейроны постепенно теряют способность к миграции в организме и в культуре. С 10-го до 17-го дня инкубации куриного зародыша значительно уменьшается интенсивность выращивания нервных отростков. Уменьшается эффект змеяного яда и карбохоллина, полностью пропадающий после 17-го дня инкубации.

8. С 18-го по 21-й день инкубации окончательно развиваются 7, 8, 9-й слои зрительной коры (считая от белого вещества к поверхности), происходит дальнейшая дифференцировка их нейронов.

9. В отличие от нейробластов нейроны в культуре не мигрируют, а лишь пассивно выносятся в зону роста разрастающимся ганглиальным пластом.

10. В процессе дифференцировки имеет место повышение активности и перераспределение ферментов. Щелочная фосфатаза, начиная с 15-го дня инкубации, становится более активной в слоях нервных волокон и сплетений. Активность АТФ-азы значительно повышается в перинуклеарной зоне крупных нейронов. Активность эстеразы значительно возрастает с развитием слоев нервных волокон и сплетений.

11. Дальнейшее изучение факторов, влияющих на рост нервной ткани в культурах (веществ, стимулирующих рост нервных отростков, подавляющих рост глии и др.) может быть перспективным для нужд клинической практики.

#### **Печатные работы аспиранта Сергея Николаевича Оленева по теме диссертации**

1. Культивирование клеток коры головного мозга. Лен. педиатрич. мед. институт. Сборник студенческих научных работ. 1961, 17—23.

2. Изменение нейронов и нейроглии в культуре полушарий большого мозга. *Арх. анат.* 1962, № 2, 46—53.

3. Дифференцировка нейронов зрительной коры среднего мозга куриных зародышей. Тезисы докладов конф. студ. и асп. морф. каф. и лабораторий Ленинградских ВУЗов и научно-исследовательских институтов. 1963, 19—21.

4. Дифференцировка нейронов зрительной коры *tectum opticum* птиц. Материалы конференции нейрогистологов. Казань. 1964.

5. Некоторые нейротропные факторы, влияющие на рост отростков нейробластов в культуре. Докл. АН СССР 1964.

6. Дифференцировка нейронов зрительной коры среднего мозга (*tectum opticum*) куриного зародыша. *Арх. анат.* 1964, № 9, 99—109.



М-42197. 24-10-64.

Заказ 2806.

Тираж 300.

Бесплатно.

---

Типография Государственной Публичной библиотеки, Фонтанка, 36.

