

Министерство здравоохранения Республики Беларусь

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ГРОДНЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

С. М. Зиматкин

**ИММУНОГИСТОХИМИЯ
В ОЦЕНКЕ НЕЙРОНОВ МОЗГА**

Монография

Гродно
ГрГМУ
2023

УДК 611.81.018.82:616-092.18

ББК 28.06

3-62

Рекомендовано Редакционно-издательским советом ГрГМУ
(протокол № 12 от 12.10.2023 г.).

Автор: зав. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии учреждения образования
«Гродненский государственный медицинский университет»,
д-р биол. наук, проф. С. М. Зиматкин.

Рецензенты: зав. кафедрой патологической физиологии имени Д. А. Маслакова,
учреждения образования «Гродненский государственный
медицинский университет», д-р мед. наук, проф. Н. Е. Максимович;
проф. каф. биохимии учреждения образования
«Гродненский государственный университет имени Янки Купалы»,
д-р биол. наук, проф. И. Б. Заводник.

Зиматкин, С. М.

3-62 Иммуногистохимия в оценке нейронов мозга : монография / С. М. Зиматкин. –
Гродно : ГрГМУ, 2023. – 132 с.
ISBN 978-985-595-847-6.

В монографии обобщён многолетний опыт работы сотрудников кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГрГМУ, связанный с использованием современных методов иммуногистохимии для оценки морфофункционального состояния нейронов мозга в норме и при различной экспериментальной патологии.

Книга предназначена для научных сотрудников, преподавателей, студентов медицинского и биологического профиля, магистрантов, аспирантов, врачей-неврологов, для всех, кто интересуется нейробиологией и биомедицинскими исследованиями головного мозга.

УДК 611.81.018.82:616-092.18
ББК 28.06

ISBN 978-985-595-847-6

© Зиматкин С. М., 2023
© ГрГМУ, 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

Перечень условных обозначений	4
Предисловие	5
Глава 1 ОЦЕНКА ПРОЛИФИРАЦИИ, МИГРАЦИИ И СОЗРЕВАНИЯ НЕЙРОНОВ МОЗГА	6
Глава 2 ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕЙРОМЕДИАТОРНОЙ ПРИРОДЫ НЕЙРОНОВ.....	14
Глава 3 ОЦЕНКА ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА НЕЙРОНОВ	19
Глава 4 СОДЕРЖАНИЕ НЕЙРОГЛОБИНА В НЕЙРОНАХ МОЗГА.....	40
Глава 5 ОЦЕНКА ДЕПО КАЛЬЦИЯ В НЕЙРОНАХ	53
Глава 6 ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ АУТОФАГИИ.....	73
Глава 7 ВЫЯВЛЕНИЕ БЕЛКА ГЕНА БЫСТРОГО РЕАГИРОВАНИЯ НЕЙРОНОВ.....	82
Глава 8 ОЦЕНКА СИНАПТИЧЕСКОГО АППАРАТА.....	93
Глава 9 ДРУГИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЁРЫ НЕЙРОНОВ	111
Заключение	114
Литература	115
Приложение	128
Summary	131

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТФ-синтаза	– маркер крист митохондрий
ВЗС	– внутренний зернистый слой
ГДК	– глутаматдекарбоксилаза
ГрЭС	– гранулярная эндоплазматическая сеть
ГЭБ	– гематоэнцефалический барьер
Ед. опт. пл.	– единица оптической плотности
Кальбиндин	– белок, депонирующий ионы кальция
КГ	– комплекс Гольджи
КФ	– кислая фосфатаза
МАО Б	– моноаминоксидаза типа Б
НАДН-ДГ	– дегидрогеназа восстановленного НАД
Нейроглобин	– белок, депонирующий кислород в нейронах
ОЖП	– общий желчный проток
РНП	– рибонуклеопротеины
СДГ	– сукцинатдегидрогеназа
Ув.	– увеличение
УДХК	– урсодезоксихолевая кислота
ЦНС	– центральная нервная система
ХАТ	– холинацетилтрансфераза
AMBRA1	– белок активатор аутофагии клетки
C-fos	– белок гена быстрого реагирования
GAD-67	– глутаматдекарбоксилаза
IQR	– интерквартильный диапазон
Me	– медиана
n	– количество животных в эксперименте
NeuN	– маркер зрелых нейронов

ПРЕДИСЛОВИЕ

В последние десятилетия в нейробиологии все шире используются иммуногистохимические методы для микроскопического исследования молекулярных маркёров нейронов в нормальном мозге или при различной нейропатологии. Эти методы оказываются более точными и эффективными для оценки состояния нейронов по сравнению с традиционными, классическими нейрогистологическими и гистохимическими методами. Иммуногистохимическими методами в нейронах можно выявить любые белки, пептиды и другие вещества, к которым удаётся получить антитела, специфически связывающиеся с ними. В результате окрашенные конечные продукты иммуногистохимической реакции визуализируются с помощью разных микроскопов, позволяя выявлять в нейронах сотни разнообразных белков (структурных, функциональных и ферментативных) и регуляторных пептидов, указывающих на морфофункциональное состояние этих нервных клеток.

Иммуногистохимические исследования специфических молекулярных маркёров – надёжный и эффективный инструмент для оценки морфофункционального и метаболического состояния нейронов мозга в норме и при различной патологии. Исследование молекулярных маркеров позволяет определять нейромедиаторную природу нейронов, выявлять делящиеся и мигрирующие предшественники нейронов, оценивать зрелость нейронов, их энергетический потенциал, содержание белков, депонирующих кислород и кальций, оценивать в нейронах содержание белка-активатора аутофагии, содержание белка быстрого реагирования нейронов на воздействия, а также организацию их синаптического аппарата, состояние цитоскелета, способность к образованию NO и многое другое.

В монографии обобщён многолетний опыт работы сотрудников кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГрГМУ и моих учеников (Барабан О.В., Карнюшко О.А., Бонь Е.И., Заерко А.В., Узлова Е.В., Емельянчик С.В.), связанный с использованием современных методов иммуногистохимии для изучения состояния нейронов мозга в норме и при различной экспериментальной патологии.

Профессор С. М. Зиматкин

Глава 1

ОЦЕНКА ПРОЛИФИРАЦИИ, МИГРАЦИИ И СОЗРЕВАНИЯ НЕЙРОНОВ МОЗГА

Выявление делящихся предшественников нейронов

Известно, что деление нейронов головного мозга обычно завершается в эмбриогенезе, до рождения животных и человека. Во взрослом мозге выявляются единичные нейрогенные стволовые клетки в околожелудочковой области и зубчатой извилине, которые способны к делению. Кроме того, в раннем постнатальном онтогенезе во временном наружном зернистом слое (НЗС), выявляются митотически делящиеся предшественники зернистых нейронов коры мозжечка.

НЗС – герминативная зона, состоящая из 3-6 рядов предшественников зернистых нейронов [Kawaji et al., 2004. Dual]. При этом 1-3-й наружные ряды содержат пролиферирующие клетки, которые после последнего митоза вытесняются во внутренние ряды НЗС, готовятся к миграции, принимают веретеновидную форму и начинают радиальную миграцию в область будущего внутреннего зернистого слоя (ВЗС) [Komuro et al., 2001]. НЗС наибольшего развития достигает к 7-м суткам, между 7-15-ми сутками постнатального развития образуются большинство зернистых нейронов, формирующих ВЗС, а зернистые нейроны становятся самыми многочисленными нейронами мозга. К 20-21-м суткам постнатальной жизни НЗС у крыс исчезает и новообразование зернистых нейронов прекращается.

В делящихся предшественниках зернистых нейронов экспрессируется пептид **Ki-67**, который иммуногистохимически выявляется в ядрах этих клеток. Точнее, Ki-67 присутствует только в ядрах клеток в фазах G^1 , S, G^2 и особенно во время митоза. При переходе

клеток в фазу G_0 , пептид Ki-67 быстро подвергается катаболизму и не обнаруживается в ядрах интерфазных клеток.

Используя данный маркер, мы избирательно выявляли делящиеся клетки во временном наружном зернистом слое коры развивающегося мозжечка на 2-20 дни после рождения. Установлено, что в НЗС коры мозжечка, который является основным источником зернистых нейронов, Ki-иммунопозитивные клетки выявлялись на 2-15-е сутки после рождения (рис. 1.1).

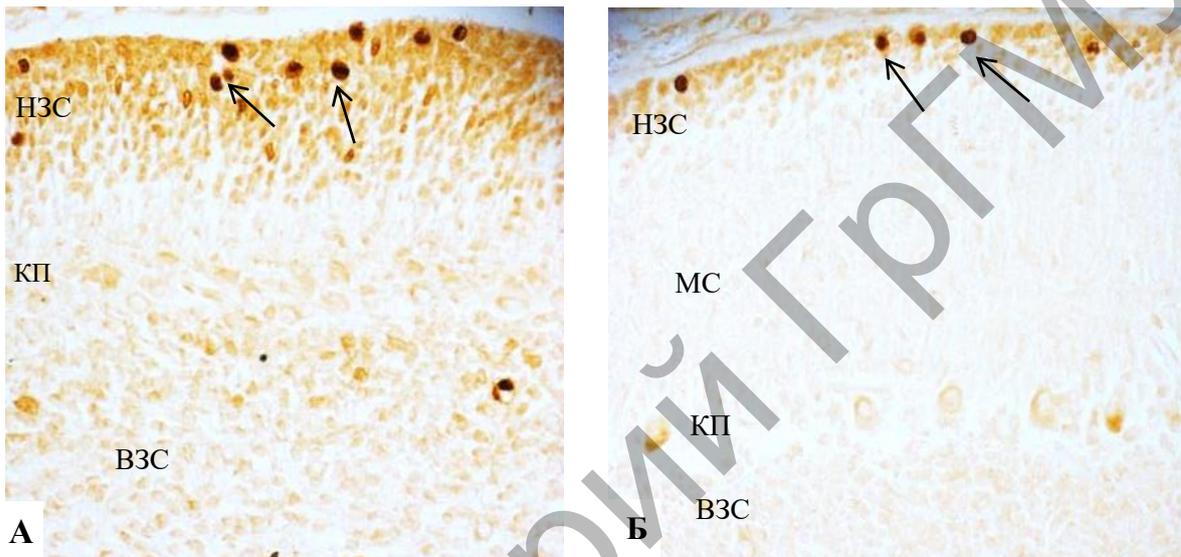


Рисунок 1.1 – Экспрессия Ki-67 в делящихся предшественниках зернистых нейронах (показаны стрелками) развивающейся коры мозжечка крыс:

7-е сутки (А), 15-е сутки (Б) после рождения

НЗС – наружный зернистый слой; КП – клетки Пуркинью;

ВЗС – внутренний зернистый слой

Иммуноцитохимическая реакция на Ki-67. Ув. 200

Показано, что хотя визуально количество Ki-иммунопозитивных нейронов в НЗС максимально на 7-й день (рис. 1.1), плотность их расположения со 2-го дня уменьшается. У 15-суточных крыс их количество на единицу площади НЗС в 2 раза меньше, чем у 2-суточных (рис. 1.2). Это свидетельствует о постепенном уменьшении митотической активности предшественников зернистых нейронов в НЗС, которая полностью исчезает после 20-го дня, при исчезновении этого слоя, когда все предшественники зернистых нейронов заканчивают миграцию в дефинитивный, внутренний зернистый слой и переходят в G_0 -фазу.

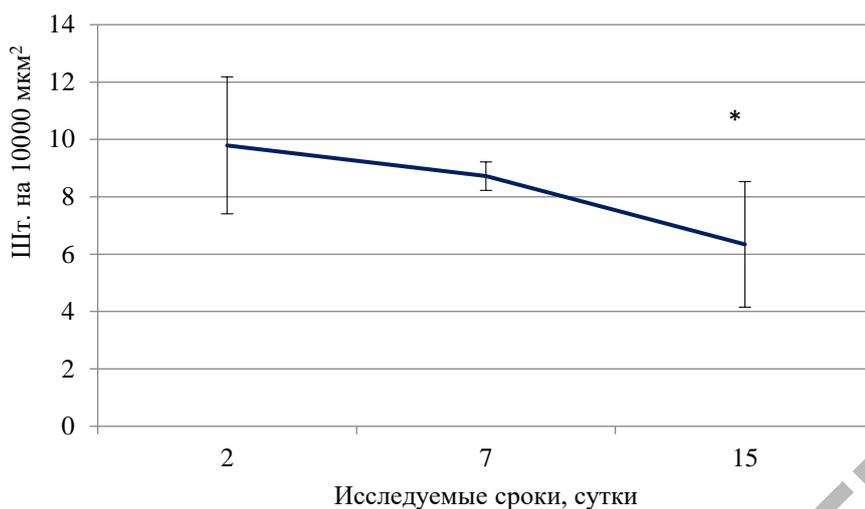


Рисунок 1.2 – Количество Ki-67-иммунопозитивных нейронов на 10000 мкм² наружного зернистого слоя (Me+IQR)

Примечание –* – $p < 0,05$ по сравнению с 7-суточными крысами.

Выявление мигрирующих предшественников нейронов.

Образующиеся в эмбриогенезе из нервной трубки нейробласты обычно мигрируют в места постоянной дислокации будущих нейронов в растущем мозге. Эти мигрирующие предшественники нейронов можно выявить по белку, стабилизирующему микро-трубочки, необходимые для миграции этих клеток, *даблкортину (DCX)* [Friocourt et al., 2003. Doublecortin]. Мы успешно использовали этот маркер для выявления предшественников зернистых нейронов, мигрирующих из временного НЗС в постоянный ВНС развивающегося мозжечка крысы [Зиматкин, Карнюшко, 2016].

В двух-трёх наружных рядах НЗС коры мозжечка, в которых находятся делящиеся клетки, иммунопозитивная окраска на DCX отсутствует (рис. 1.3). Интенсивная экспрессия DCX определяется в двух-трёх внутренних рядах клеток НЗС, на границе с молекулярным слоем, где располагаются постмитотические предшественники зернистых нейронов, готовящиеся к радиальной миграции (рис. 1.3).

На 7-е сутки постнатального онтогенеза, когда НЗС достигает максимальной толщины, в его постмитотических нейронах, готовящихся к миграции, иммунореактивность DCX снижается. Экспрессия DCX возрастает в мигрирующих нейронах, количество которых в этот период достигает максимума (рис. 1.3).

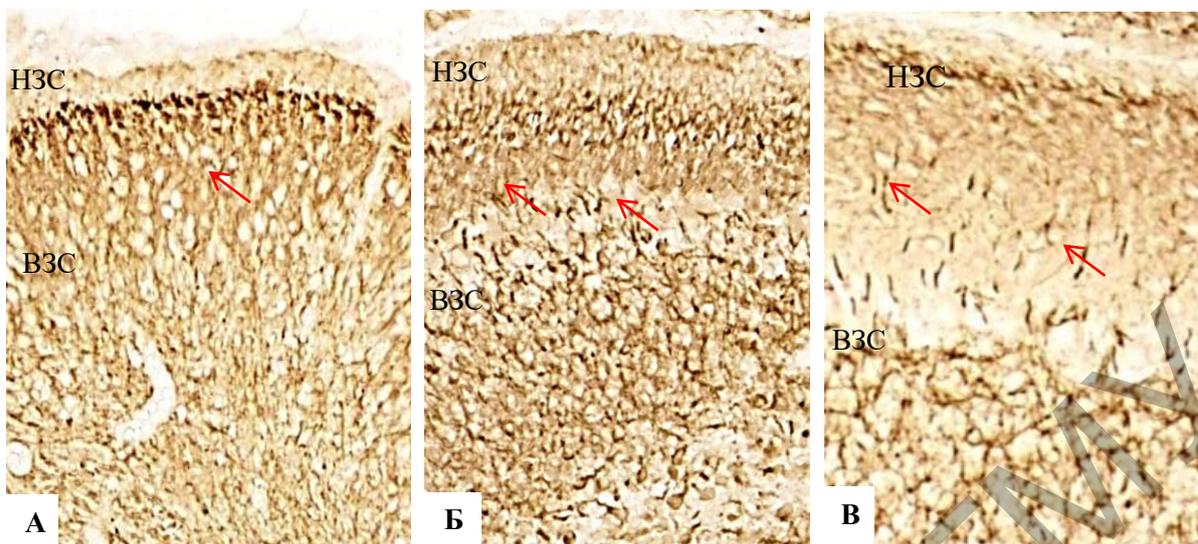


Рисунок 1.3 – Экспрессия даблкортина в коре мозжечка крыс в постнатальном онтогенезе: 2-е (А), 7-е (Б) и 15-е (В) сутки после рождения
 НЗС – наружный зернистый слой; ВЗС – внутренний зернистый слой
 Стрелками показаны мигрирующие предшественники зернистых нейронов.
 Иммуногистохимическая реакция на даблкортин.
 Цифровая микрофотография. Ув. 100

На 15-е сутки после рождения толщина НЗС становится в 2 раза меньше, чем на 7-е сутки. В этот период в нейронах, готовящихся к миграции, окрашивание на DCX ещё более снижается. Оно выявляется в мигрирующих зернистых нейронах, но уже отсутствует в телах нейронов ВЗС. Однако в его нейропиле (в растущих отростках зернистых нейронов) иммунореактивность на DCX довольно высока (рис. 1.3).

Таким образом, экспрессия DCX в предмиграционных нейронах НЗС в старой и новой коре мозжечка постепенно снижается со 2-х по 15-е сутки постнатального онтогенеза. Интересно, что в неocerebellуме 2- и 7-суточных крысят экспрессия DCX была больше, чем в палеocerebellуме, но уже к 15-м суткам достигала уровня старой коры.

Таким образом, DCX отсутствует в митотически делящихся клетках НЗС, экспрессируется в постмитотических нейронах, готовящихся к миграции и мигрирующих, и исчезает в телах нейронов, завершивших миграцию и дифференцирующихся. Это соответствует данным литературы о появлении DCX в нейронах, готовящихся к миграции, и исчезновении его в телах зрелых нейронов [Takács, 2008].

DCX участвует в стабилизации микротрубочек необходимых для миграции нейронов [Gleeson et al., 1999. Doublecortin], а также для формирования отростков зернистых нейронов. Возрастание DCX в нейропиле зернистого слоя на 7-15-е сутки совпадает с периодом интенсивного роста отростков нейронов и синаптогенеза в коре мозжечка [Hashimoto, Kano, 2013].

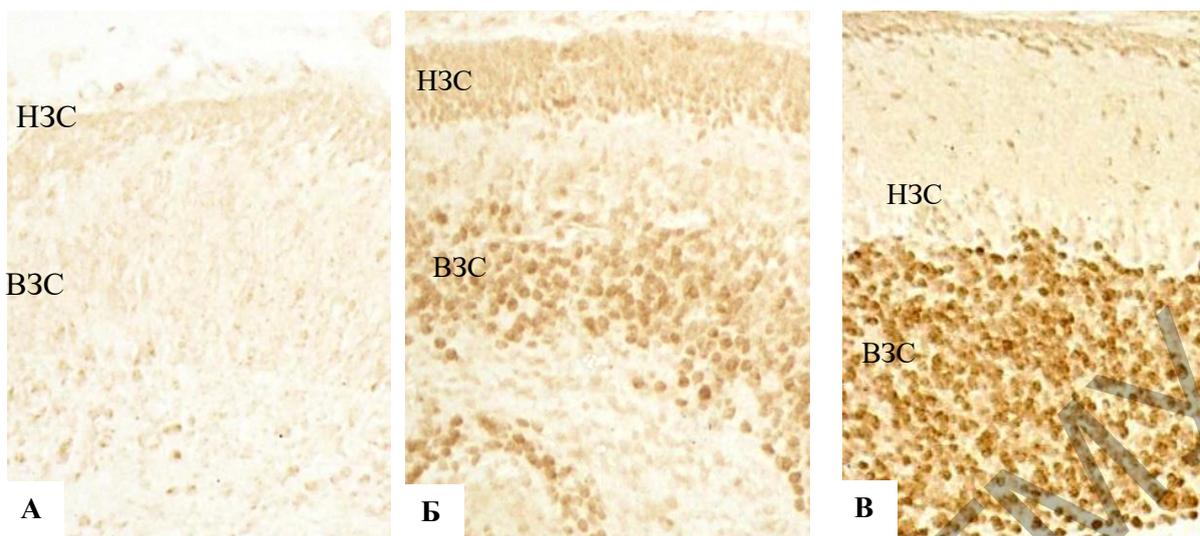
Интересно, что в других отделах, например в ядрах мозжечка, где миграция нейронов закончилась ещё до рождения, даблкортин не выявляется.

Оценка созревания нейронов мозга

После завершения миграции предшественников нейронов по мере их созревания, дифференцировки в них образуются и накапливаются специфические белки и пептиды, например участвующий в сплайсинге *NeuN*. NeuN (neuronal nuclear antigen) – нейрональный ядерный антиген, который выявляется только в нейронах, появляется в постмитотических нейробластах, увеличивается в дифференцирующихся нейронах и достигает максимума в терминально дифференцированных нейронах, сохраняясь на протяжении всего последующего онтогенеза. Данный белок играет роль в нейроспецифическом сплайсинге нейронов [Mullen, 1992]. NeuN экспрессируется в ядрах и перинуклеарной цитоплазме большинства зрелых нейронов ЦНС и не определяется в незрелых нервных клетках. Однако NeuN не экспрессируется в клетках Пуркинье мозжечка, а также в глиальных клетках [Mullen et al., 1992].

Этот маркёр зрелых нейронов мы использовали для оценки созревания зернистых нейронов коры и нейронов ядер мозжечка, а также гистаминергических нейронов гипоталамуса в постнатальный период развития мозга крысы [Зиматкин, Карнюшко, 2016; Зиматкин и др., 2020].

В предшественниках зернистых нейронов, готовящихся к миграции и мигрирующих, экспрессия NeuN минимальна; она возрастает по мере созревания нейронов ВЗС (рис. 1.4). По мере их созревания со 2-го по 45-й день после рождения экспрессия в них NeuN прогрессивно нарастает (рис. 1.4, 1.5).



**Рисунок 1.4 – Экспрессия NeuN в коре мозжечка крыс
в постнатальном онтогенезе:**

2-е (А), 7-е (Б), 15-е (В) сутки после рождения

НЗС – наружный зернистый слой;

ВЗС – внутренний зернистый слой

Иммуногистохимическая реакция на NeuN.

Цифровая микрофотография. Ув. 100

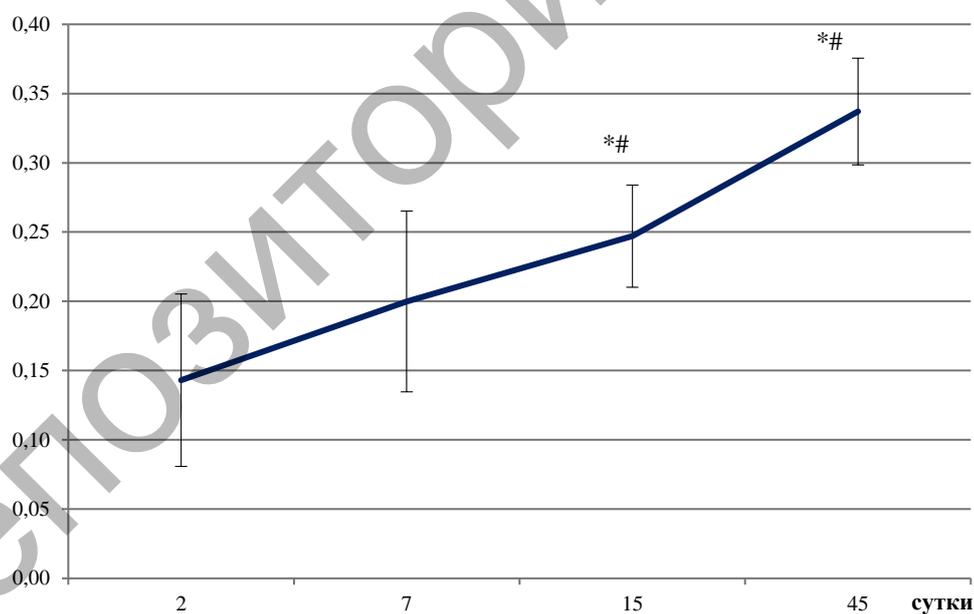


Рисунок 1.5 – Экспрессия NeuN (в ед. опт. пл.)

в нейронах внутреннего зернистого слоя

в постнатальном онтогенезе коры мозжечка крыс (Me+IQR)

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению со вторыми сутками; # – $p < 0,05$ по сравнению с 7-ми сутками.

В нейронах промежуточного ядра в постнатальном онтогенезе иммунореактивность NeuN также возрастает (рис. 1.6, 1.7). Это свидетельствует о дифференцировке, созревании этих нейронов.

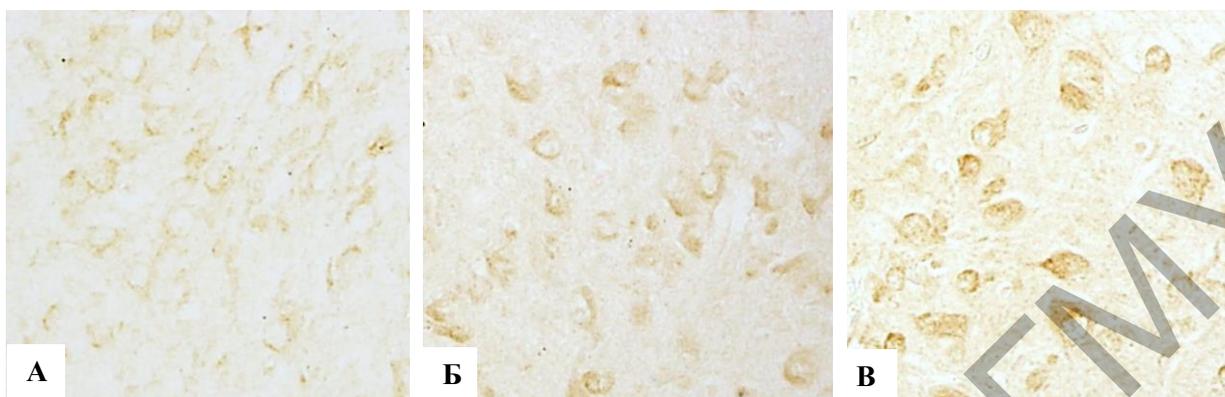


Рисунок 1.6 – Экспрессия NeuN в нейронах промежуточного ядра мозжечка крыс: 2-е (А), 7-е (Б), 15-е (В) сутки в постнатальном онтогенезе
Иммуногистохимическая реакция на NeuN.
Цифровая микрофотография. Ув. 400

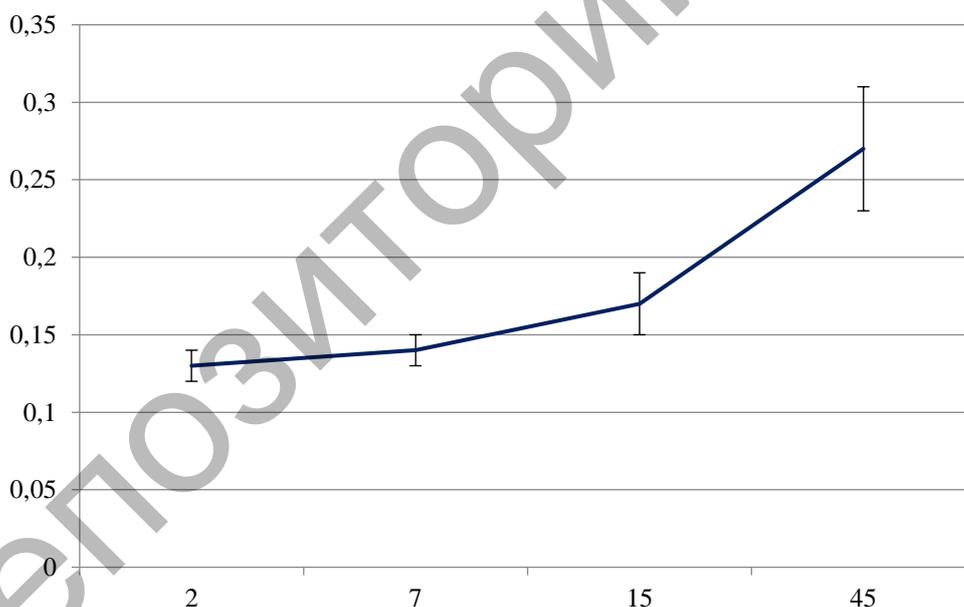


Рисунок 1.7 – Иммунореактивность NeuN (в ед. опт. пл.) в нейронах промежуточного ядра мозжечка в постнатальном онтогенезе крыс (Me+IQR)

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению со вторыми сутками; # – $p < 0,05$ по сравнению с 7-ми сутками.

Со 2-го по 15-й день постнатального онтогенеза крыс плотность расположения иммунопозитивных по NeuN нейронов во ВЗС прогрессивно увеличивается (в 3-4 раза), при этом в них возрастает (в 2-2,5 раза) экспрессия NeuN (рис. 1.4, 1.5).

При сравнении старой и новой коры мозжечка выявлено некоторое запаздывание в нарастании экспрессии NeuN в неocerebellуме по сравнению с палеocerebellумом. На 15-е сутки после рождения в неocerebellуме НЗС несколько толще, а ВЗС тоньше, чем в старой коре.

Экспрессия DCX в нейронах промежуточного ядра мозжечка на 2-е, 7-е и 15-е сутки постнатального развития не выявляется. Это свидетельствует, что к 2-м суткам постнатального онтогенеза миграция этих нейронов уже завершена и идёт процесс их дифференцировки, что сопровождается прогрессивным возрастанием в них экспрессии NeuN.

Напротив, в незрелых постмитотических нейронах НЗС экспрессия NeuN очень низкая, но прогрессивно нарастает в мигрирующих и особенно созревающих нейронах ВЗС, что соответствует данным литературы [Mullen, 1992].

Глава 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕЙРОМЕДИАТОРНОЙ ПРИРОДЫ НЕЙРОНОВ

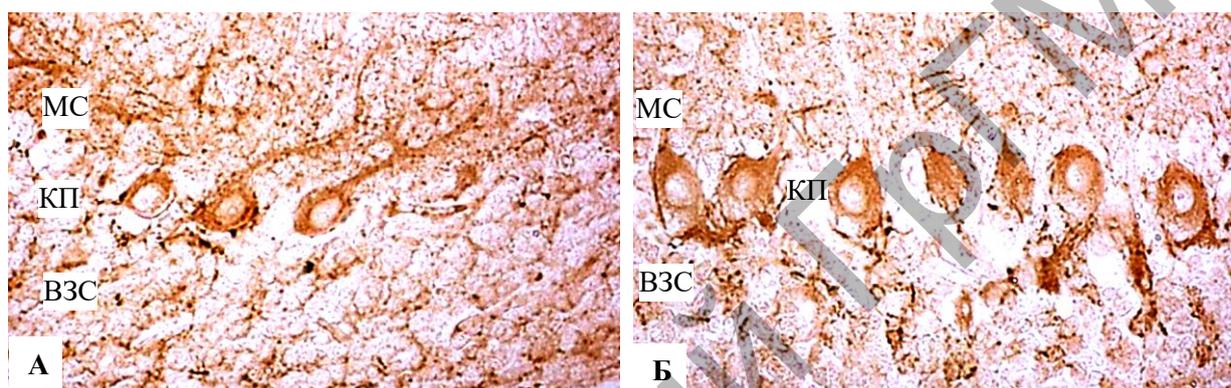
В мозге имеются десятки типов нейронов различной нейромедиаторной природы – холинергические, аминергические, ГАМКергические, пуринергические и др. При исследовании любой популяции нейронов важно определить их нейромедиаторную природу. Для этого в качестве маркёров чаще используют специфические ферменты синтеза данного медиатора, например фермент синтеза ацетилхолина, холинацетилтрансферазу, для выявления холинергических нейронов (только эти нейроны экспрессируют данный белок) или фермент синтеза гистамина, гистидиндекарбоксилазу, для выявления гистаминергических нейронов. Очень редко (в связи со сложностью получения антител) в качестве маркеров нейронов используют сами медиаторы, например гистамин.

В своих исследованиях мы использовали в качестве маркёра ГАМКергических нейронов мозжечка фермент синтеза ГАМК, глутаматдекарбоксилазу (ГДК), а в качестве маркёра гистаминергических нейронов гипоталамуса фермент деградации гистамина – моноаминоксидазу Б (МАО Б). Экспрессия этих ферментов избирательно возрастала при постнатальном развитии, дифференцировке именно соответствующих типов нейронов [Зиматкин, Карнюшко, 2020; Зиматкин и др., 2020].

Выявление ГАМКергических нейронов и синапсов

В качестве маркёра для выявления ГАМКергических нейронов мы использовали фермент образования ГАМК – ГДК [Зиматкин, Карнюшко, 2020]. Для демонстрации возможностей этого гистохимического метода мы выбрали кору мозжечка, в которой из семи основных типов нейронов пять – ГАМКергические.

На 15-е сутки после рождения крыс равномерное ГДК-иммуно-
 позитивное окрашивание наблюдалось в перикарионах клеток
 Пуркинью (КП) вокруг иммунонегативных ядер и в проксимальной
 части дендритов. Тело и дендриты многих клеток КП были
 покрыты переменным количеством ГДК-иммунопозитивных точек –
 аксосоматических и аксодендритических тормозных синапсов.
 Среди зернистых нейронов определяются иммунопозитивные
 по ГДК мелкие по размеру точки, расположенные по периферии
 формирующихся клубочков мозжечка (рис. 2.1 А).



**Рисунок 2.1 – Экспрессия ГДК в коре мозжечка у крыс
 на 15-е (А) и 45-е (Б) сутки после рождения**

МС – молекулярный слой; КП – клетки Пуркинью;
 ВЗС – внутренний зернистый слой

Иммуногистохимическая реакция на ГДК. Ув. 400

На 45-е сутки ГДК-иммунореактивность выявляется по всей
 цитоплазме тел клеток Пуркинью, вокруг которых появляются кор-
 зинки из ГДК-позитивных нервных волокон. Ширина ГДК-иммуно-
 реактивной зоны в молекулярном слое увеличивается по сравнению
 с 15-суточными крысами и иммунное окрашивание зоны синапто-
 генеза становится более гомогенным. ГДК-иммунореактивность на-
 блюдалась в телах звездчатых и корзинчатых нейронов, но она была
 значительно выше в аксонах этих нейронов, которые формируют
 сплетения (корзинки) вокруг перикарионов КП. ГДК-иммунопози-
 тивные точки (аксодендритические синапсы) по периферии сфор-
 мированных клубочков мозжечка становятся крупнее (рис. 2.1 Б).

В ядрах мозжечка на 15-е и особенно на 45-е сутки после
 рождения на поверхности тел нейронов отчётливо выявляются
 аксосоматические синапсы; при этом тела большинства нейронов

промежуточного ядра полностью окружены ГДК-иммунопозитивными крупными точками; при этом в нейропиле хорошо видны аксо-дендритические синапсы (рис. 2.2). Эти синапсы образованы в основном аксонами ГАМКергических КП [Зиматкин, Карнюшко, 2020].

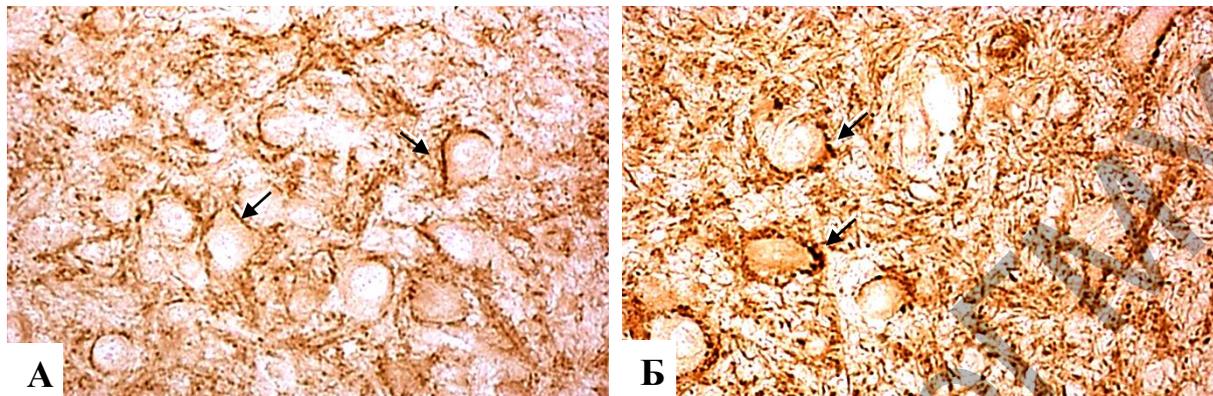


Рисунок 2.2 – ГДК-иммунореактивные синапсы на телах (указаны стрелками) и дендритах нейронов промежуточного ядра мозжечка крысы на 15-е (А), 45-е (Б) сутки после рождения

Иммуногистохимическая реакция на ГДК. Ув. 400

Выявление гистаминергических нейронов гипоталамуса

Классическими методами выявления гистаминергических нейронов мозга являются гистохимические методы выявления самого гистамина [Panula et al., 1984] и фермента его синтеза – гистидин-декарбоксилазы [Watanabe et al., 1984. Distribution].

Иммуногистохимия гистамина. Ранее для выявления гистаминергических нейронов мозга в норме и при патологии мы использовали метод выявления гистамина [метод описан Panula et al., 1984] (рис. 2.3).

Нами разработан иммуногистохимический метод выявления гистаминергических нейронов мозга в парафиновых срезах головного мозга крысы с помощью антител к белку фермента MAO Б [Зиматкин, Заерко, 2019]. В полученных иммуногистохимических препаратах гипоталамуса избирательно и чётко визуализируются гистаминергические нейроны (рис. 2.4). Высокая иммунореактивность MAO Б выявляется в их цитоплазме, умеренная – в отростках, в ядрах нейронов она отсутствует. Их локализация точно соответствует гистаминергическим нейронам, определяемым в криостатных

срезах гипоталамуса гистохимическим методом на выявление активности MAO Б. Нейроны другой медиаторной природы этими методами в гипоталамусе не выявляются.

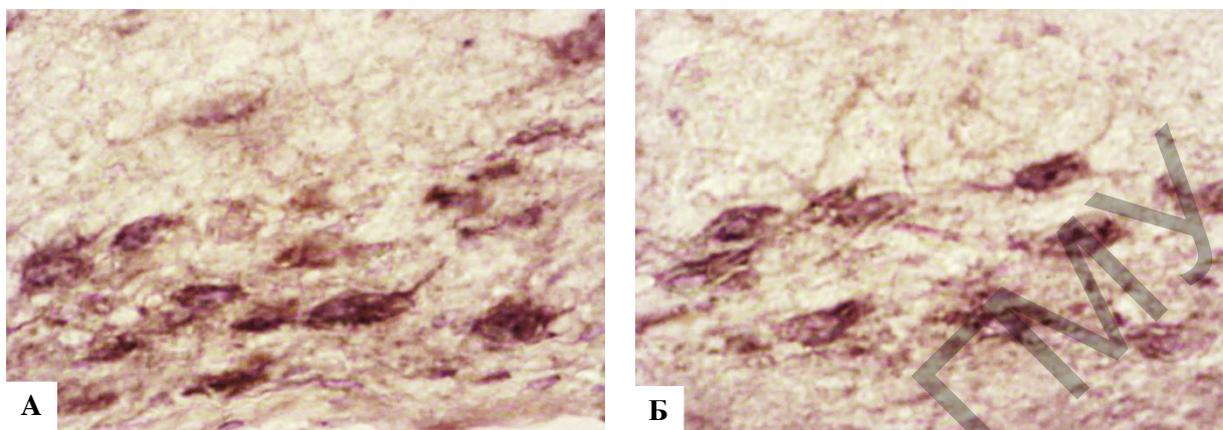


Рисунок 2.3 – Содержание гистамина в нейронах ядра E2 гипоталамуса в контроле (5 сутки после ложной операции) (А); снижение его в опыте (5 суток отведения желчи) (Б)

Иммуногистохимический метод. Цифровая микрофотография. Ув. 400

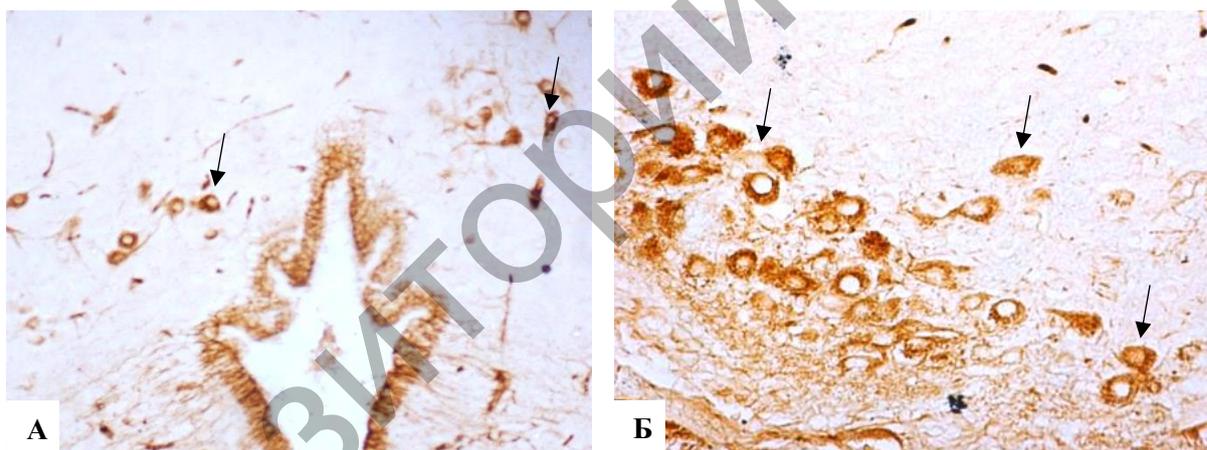


Рисунок 2.4 – Гистаминергические нейроны в ядре E4 (А) и E2 (Б) гипоталамуса крысы (показаны стрелками). Ув. 100 (А) и 200 (Б)

Следует отметить, что высокая активность и иммунореактивность MAO Б определяется и в эпендимоцитах, выстилающих желудочки мозга, умеренная – в эндотелии кровеносных капилляров мозга (рис. 2.4 А). Однако их окраска не мешает выявлению самих гистаминергических нейронов в гипоталамусе. В других отделах мозга MAO Б определяется и в иных типах нейронов, особенно в серотонинергических нейронах ядер шва моста, в которых MAO Б участвует в метаболизме серотонина. Однако в гипоталамусе MAO Б выявляется только в гистаминергических нейронах. А поскольку

тела гистаминергических нейронов мозга расположены только в гипоталамусе, это позволяет использовать метод для избирательного выявления этих нейронов в мозге [Зиматкин, Заерко, 2019].

Выявление холинергических нейронов мозга

Хорошим молекулярным маркёром холинергических нейронов мозга является фермент синтеза ацетилхолина – холинацетилтрансфераза (ХАТ). ХАТ образуется в гранулярной эндоплазматической сети в телах нейронов и транспортируется по аксонам в терминали, где образует медиатор ацетилхолин. Этот маркёр избирательно выявляет холинергические нейроны фронтальной (моторной) и теменной (сенсомоторной) коры больших полушарий головного мозга и гиппокампа. ХАТ чётко выявляется в цитоплазме перикарионов и апикальных дендритов пирамидных нейронов и отсутствует в ядрах этих нейронов, глиальных клетках и кровеносных сосудах (рис. 2.5).

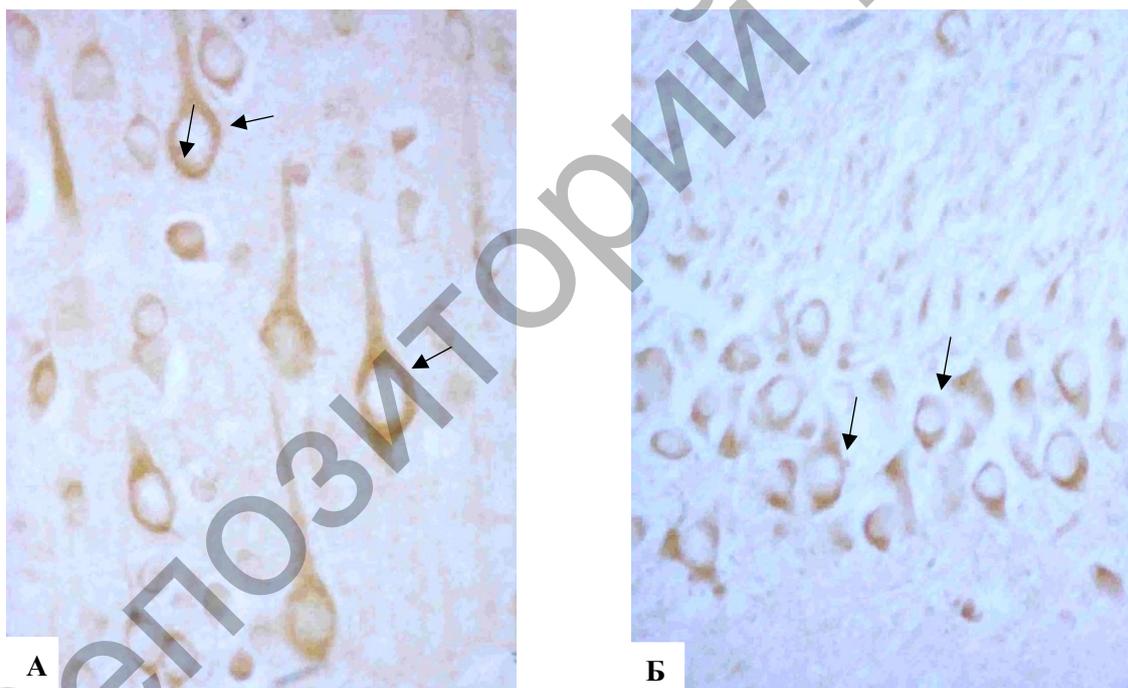


Рисунок 2.4 – Холинергические пирамидные нейроны фронтальной коры (А) и гиппокампа (В) мозга крысы (показаны стрелками)

Иммуногистохимический метод. Ув. 400

Таким образом, выявляемые иммуногистохимическими методами ферменты метаболизма медиаторов и сами медиаторы являются хорошими молекулярными маркёрами для установления медиаторной природы нейронов мозга.

Глава 3

ОЦЕНКА ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА НЕЙРОНОВ

Оценка энергетического потенциала нейронов разных отделов мозга

Энергетический аппарат нейронов представлен митохондриями. Именно в них образуется большая часть АТФ клетки, необходимая для её функционирования. Важнейший фермент, образующий АТФ, – **АТФ-аза**. Этот мультисубъединичный белковый комплекс участвует и в образовании крист внутренней мембраны митохондрий [Узлова, Зиматкин, 2020]. Поэтому его содержание в нейронах отражает их энергетическое обеспечение. Этот молекулярный маркер оказался очень удобным для сравнительной оценки энергетического потенциала нейронов разных отделов мозга, для характеристики его становления в развивающихся нейронах мозга и для оценки его нарушений при церебральной ишемии и при холестазах [Зиматкин и др., 2020. Иммунореактивность; Емельянчик и др., 2018, Изменения; Емельянчик и др., 2019, Состояние; Карнюшко и др., 2018; Бонь и др., 2020].

Исследование регионального и клеточного распределения АТФ-синтазы в мозге крысы проведено у беспородных белых крыс-самцов [Узлова, Зиматкин, 2020]. Головной мозг делили на три части фронтальными разрезами. Фиксация проводилась в комбинированном фиксаторе – цинк-этанол-формальдегиде [Коржевский и др., 2017] при +4 °С в течение 20 часов, затем образцы обезживали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли в ксилолах и заключали в парафин. Серийные срезы толщиной 5 мкм изготавливали через каждые 500 мкм с использованием микротомы Leica 2125 RTS (Германия) и монтировали на заранее подготовленные стекла.

Один срез из каждой серии окрашивали по методу Ниссля для идентификации структур мозга по атласу [Paxinos, Watson, 2007], другой окрашивали иммуногистохимически для выявления содержания АТФ-синтазы. Всего изучено 102 структуры мозга. В них у каждого животного измеряли иммунореактивность (содержание) АТФ-синтазы в цитоплазме 20-30 нейронов, которую выражали в единицах оптической плотности $\times 10^3$, или условных единицах (усл. ед.).

Иммунореактивность АТФ-синтазы разной интенсивности обнаружена в нейронах всех структур мозга крысы. При этом в цитоплазме нейронов отчётливо видны скопления окрашенных продуктов иммуногистохимической реакции в виде гранул, соответствующих представлениям о расположении митохондрий в цитоплазме тел нейронов и их отростках. В ядрах нейронов АТФ-синтаза не выявляется (рис. 3.1-3.7).

Региональное и клеточное распределение АТФ-синтазы в мозге крысы характеризуется высокой гетерогенностью: нейроны разных типов и отделов мозга содержат неодинаковое количество этого фермента, что отражает их разный энергетических потенциал. При этом содержание АТФ-азы варьирует от 159-172 усл. ед. в нейронах медиального ядра миндалина, митральных клетках обонятельной луковицы и нейронах ядра подъязычного нерва до 515-545 усл. ед. в вестибулокохлеарном ганглии и центральном ядре шейного отдела спинного мозга крысы.

Все исследованные структуры были разделены на четыре группы в зависимости от интенсивности иммуноокрашивания: низкая (150-250 усл. ед.), умеренная (250-350 усл. ед.), высокая (350-450 усл. ед.) и очень высокая (450-550 усл. ед.). К первой группе (15,6% от общего количества структур) относятся преимущественно структуры конечного мозга. Вторая группа – с умеренным содержанием АТФ-синтазы – самая многочисленная, в неё входит более половины структур (56,9%) из разных отделов головного мозга (преобладающего отдела нет). К структурам третьей группы (22,6%) относятся структуры ствола, а также нейроны V-VI слоёв неокортекса. Группа с очень высокой интенсивностью иммуноокрашивания – самая малочисленная (4,9%), в неё входят нейроны шейного отдела спинного мозга, а также медианное добавочное

ядро продолговатого мозга и вестибулокохлеарный ганглий. Таким образом, для большинства структур мозга характерен умеренный уровень иммуноокрашивания в пределах от 250 до 350 усл. ед.

Для нейронов конечного мозга характерна наибольшая гетерогенность содержания АТФ-синтазы: обнаруживаются как нейроны с низкой интенсивностью окрашивания, так и с умеренной и высокой иммуноокраской (рис. 3.1). Эта гетерогенность с большой вероятностью связана с большим числом и функциональным разнообразием структур конечного мозга. Для структур нео-, палео- и архикортекса характерны разнообразные уровни содержания АТФ-синтазы. В целом более высокие уровни АТФ-синтазы в пределах конечного мозга обнаружены в крупных нейронах (пирамидных и клетках-канделябрах).

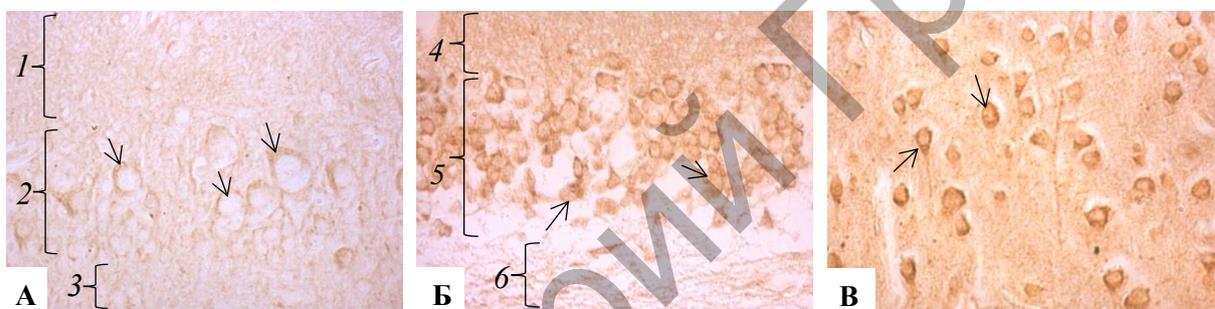


Рисунок 3.1 – Содержание АТФ-синтазы в нейронах конечного мозга

А – митральные клетки обонятельной луковицы (низкая интенсивность иммуноокрашивания), где 1 – наружный плексиформный слой, 2 – слой митральных клеток, 3 – внутренний плексиформный слой; Б – нейроны II слоя зубчатой извилины (умеренная интенсивность), где 4 – молекулярный слой, 5 – слой гранулярных клеток, 6 – фрагмент полиформного слоя; В – нейроны III слоя париетальной коры (высокая интенсивность)

Стрелки указывают на перикарионы нейронов.

Иммуноокрашивание на АТФ-синтазу. Ув. 400

Необычайно низким содержанием АТФ-синтазы характеризуются участвующие в обонянии митральные клетки обонятельной луковицы и нейроны ядер миндалина, в то время как боковое обонятельное ядро и нейроны II слоя зубчатой извилины содержат умеренные количества АТФ-синтазы (рис. 3.1). Относительно слабое развитие энергетического аппарата в митральных клетках обонятельной луковицы может быть объяснено уникальным типом

их работы – ритмической активностью (при вдыхании пахучих веществ) [Yamaguchi, Ueda, 1984], что, возможно, приводит к меньшей скорости расхода энергии и, как следствие, менее развитому энергетическому аппарату, чем у большинства других нейронов.

Достаточно высокое содержание АТФ-синтазы обнаруживается в крупных ганглиозных нейронах, таких как нейроны II слоя гиппокампа (особенно поля СА3), нейронах внутреннего пирамидного слоя неокортекса, нейронах ядер мозжечка, нейронах ядер продолговатого мозга и мотонейронах спинного мозга (рис. 3.2-3.4). Следовательно, размеры нейронов оказывают влияние на степень развития энергетического аппарата.

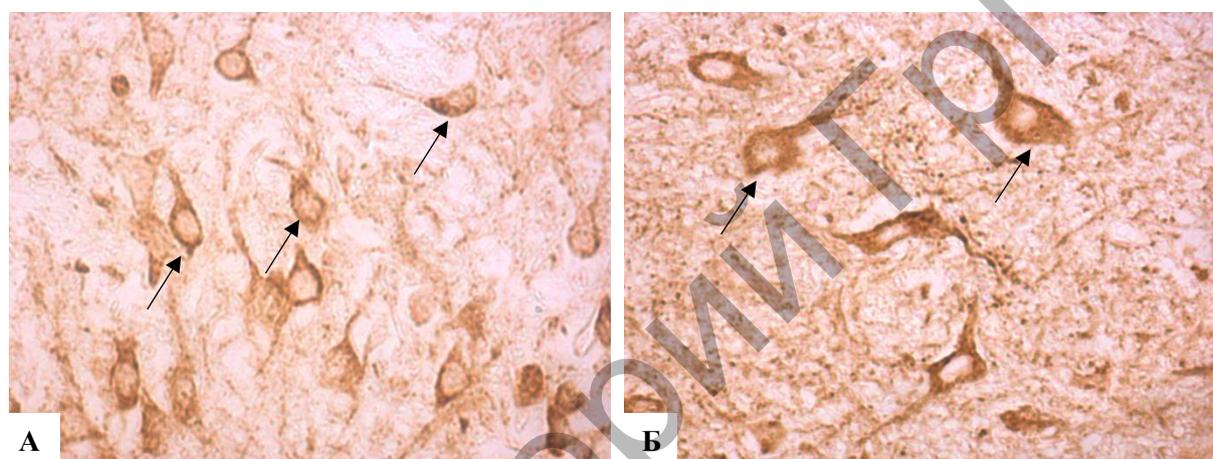


Рисунок 3.2 – Содержание АТФ-синтазы в нейронах мозга

А – нейроны II слоя гиппокампа, СА3;

Б – нейроны медиального ядра мозжечка

Стрелки указывают на перикарионы нейронов.

Иммуногистохимическая окраска на АТФ-синтазу. Ув. 400

Если рассматривать интенсивность иммуноокрашивания отдельно в многослойных структурах конечного мозга, заметно, что она зависит от функций, выполняемых нейронами в пределах конкретного слоя. Нейроны II-III слоёв, отвечающие за внутрикорковые связи (их аксоны образуют ассоциативные волокна), характеризуются менее развитым энергетическим аппаратом, чем нейроны V и VI слоёв, образующих комиссуральные и проекционные волокна.

Отдельного внимания заслуживает гетерогенное распределение АТФ-синтазы в нейронах II слоя гиппокампа и зубчатой извилины.

Прежде всего это связано с размером клеток: нейроны поля СА1, эквивалентного мелкоклеточной области, имеют менее развитый энергетический аппарат, чем нейроны полей СА2 и СА3 крупноклеточной области. Также немалый вклад вносит характер функций нейронов полей: нейроны поля СА3 крупноклеточной области соединяют потоки информации древних структур ствола мозга и ассоциативных областей коры и характеризуются несколько более развитым энергетическим аппаратом, чем нейроны поля СА2. Исключением являются нейроны зернистого слоя зубчатой извилины, которые, несмотря на некрупные размеры, по уровню развития энергетического аппарата близки к нейронам полей СА2 и СА3. Вполне вероятно, это связано с продолжением их дифференцировки во взрослых организмах.

Нельзя не отметить тенденцию к повышенному содержанию АТФ-синтазы в нейронах структур филогенетически более старых отделов – промежуточного мозга, среднего мозга, моста и продолговатого мозга крысы (рис. 3.3, 3.4). Доля структур ствола в группах возрастает по мере увеличения интенсивности иммуноокрашивания. Данная тенденция объясняется прежде всего характером структур, расположенных в стволе: они включают ядра черепных нервов и жизненно важные центры, что предполагает значительную функциональную нагрузку и, вероятно, требует хорошо развитого энергетического аппарата.

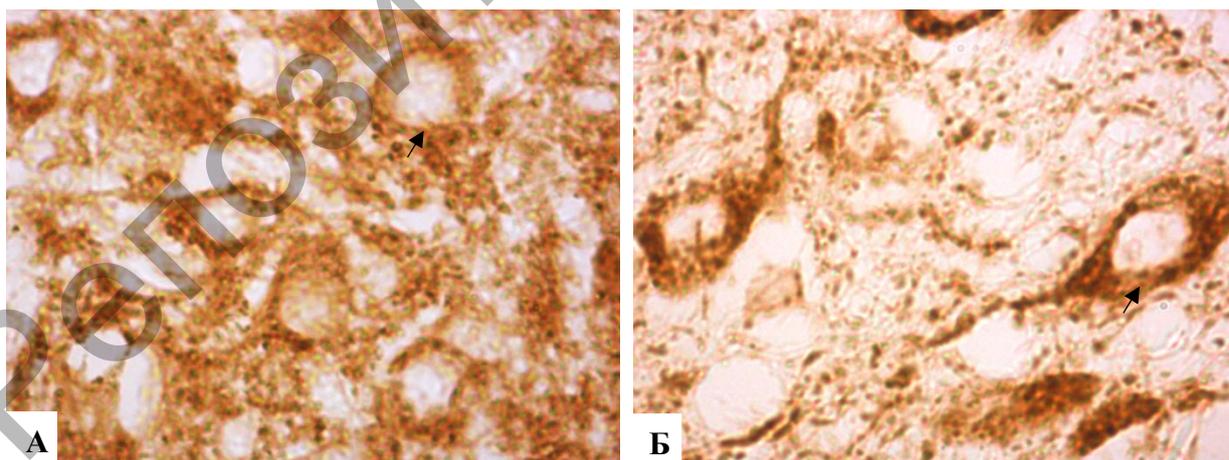


Рисунок 3.3 – Содержание АТФ-синтазы в нейронах ствола мозга

А – нейроны большого ядра шва;

Б – нейроны ядра одиночного пути

Иммуноокрашивание на АТФ-синтазу. Ув. 1000

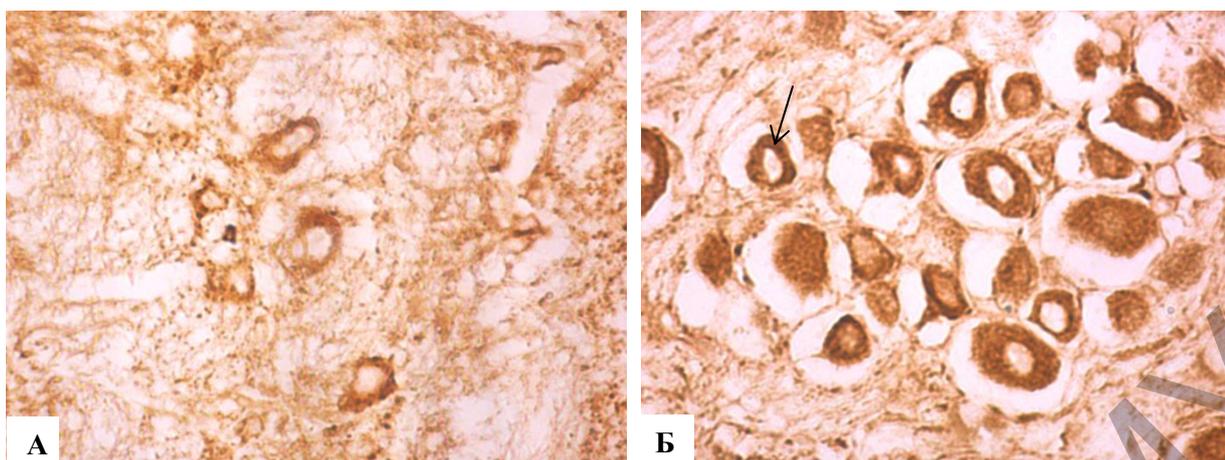


Рисунок 3.4 – Содержание АТФ-синтазы в нейронах ствола мозга

А – нейроны мезенцефалического ядра тройничного нерва;

Б – нейроны вестибулокохлеарного ганглия

Иммуногистохимическая окраска на АТФ-синтазу. Ув. 400

Среди исследованных структур головного и спинного мозга крысы имеется небольшое количество структур, содержащих рецепторные и эффекторные нейроны. Эти структуры характеризуются высоким и очень высоким содержанием АТФ-синтазы. Из этого следует, что в определенной степени выраженность энергетического аппарата нейронов определяется их функциональным типом и расположением в рефлекторных дугах. Причём рецепторные нейроны вестибулокохлеарного ганглия содержат больше АТФ-синтазы, чем рецепторные нейроны мезенцефалического ядра тройничного нерва, располагающегося в среднем мозге (рис. 3.4). Мезенцефалическое ядро состоит преимущественно из типичных для ганглиев черепных нервов псевдоуниполярных нейронов [Mameli et al., 2017. Neurons] и имеет только электрические синапсы [Baker, Llinás, 1971], а вестибулокохлеарный ганглий содержит преимущественно биполярные нейроны [Carricondo F., Romero-Gómez, 2019]. Возможно, различие в развитии энергетических аппаратов нейронов данных структур обусловлено разными структурными типами нейронов и/или превалирующим типом синапсов.

В нейронах мозжечка содержание АТФ-синтазы варьирует от умеренного до высокого уровня. В коре мозжечка содержание варьирует по слоям, и оно наибольшее в клетках Пуркинье (рис. 3.5 А). Это можно объяснить очень большим количеством синаптических связей клеток Пуркинье, что, без сомнения, требует

существенных энергетических затрат, а также большим размером данных нейронов. При этом нейроны филогенетически более древних ядер мозжечка содержат больше АТФ-синтазы, чем клетки Пуркинье (рис. 3.5).

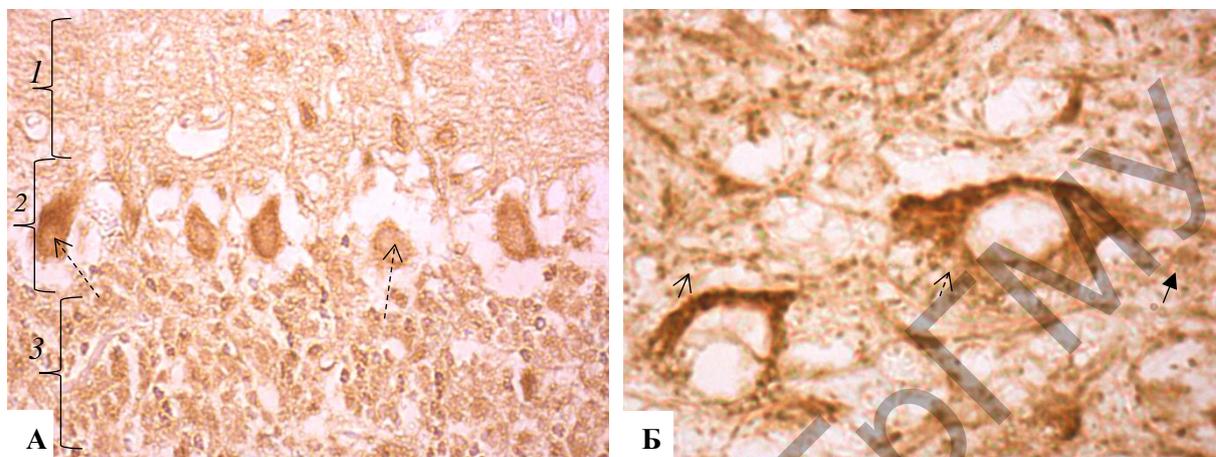


Рисунок 3.5 – Содержание АТФ-синтазы в нейронах мозжечка

А – нейроны коры мозжечка, червь: 1 – молекулярный слой, 2 – слой клеток Пуркинье, 3 – зернистый слой;

Б – нейроны вставочного ядра мозжечка

Иммуноокрашивание на АТФ-синтазу. Ув. 400 (А) и 1000 (Б)

В нейронах спинного мозга содержание АТФ-синтазы выше, чем в нейронах головного мозга. Но оно варьирует и зависит как от размера нейронов, так и от слоя серого вещества, в котором располагаются эти нейроны (рис. 3.6).

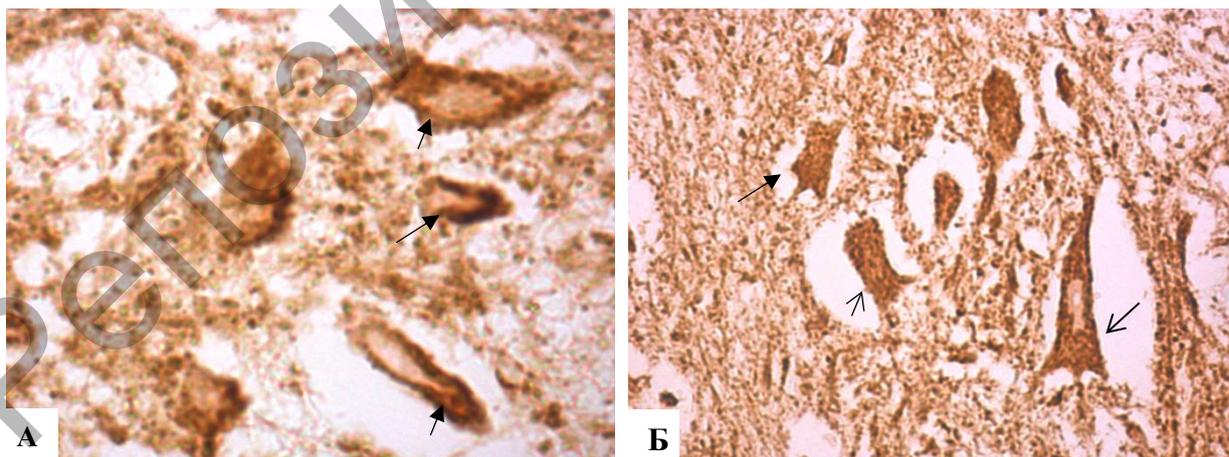


Рисунок 3.6 – Содержание АТФ-синтазы в нейронах спинного мозга

А – вставочные нейроны шейного отдела спинного мозга;

Б – мотонейроны шейного отдела спинного мозга

Стрелки указывают на перикарионы.

Иммуноокрашивание на АТФ-синтазу. Ув. 1000 (А) и 400 (Б)

Таким образом, АТФ-синтаза обнаружена в нейронах всех отделов головного и шейного отдела спинного мозга крысы. Ее распределение в структурах мозга гетерогенно. Большинство нейронов мозга с умеренным содержанием АТФ-синтазы в цитоплазме. Оно высоко в рецепторных и эффекторных нейронах ствола мозга, нейронах ядер мозжечка и спинного мозга. Крупные (ганглиозные) нейроны мозга характеризуются более высоким содержанием АТФ-синтазы. Связи между нейромедиаторной природой нейронов и содержанием в них АТФ-синтазы не обнаружено.

Учитывая важнейшую роль АТФ-синтазы в энергообеспечении клеток, полученные данные можно использовать для оценки энергетического потенциала нейронов в норме и его изменений при различных экспериментальных воздействиях и патологических состояниях, например при ишемии мозга или холестазах. Представляет интерес выяснение взаимосвязей между содержанием АТФ-синтазы и функциональным состоянием нейронов, а также динамика становления энергетического аппарата развивающихся нейронов.

Изменения АТФ-синтазы в развивающихся гистаминергических нейронах гипоталамуса крыс

Исследование выполнено на потомстве беспородных белых крыс. Декапитация крысят осуществлялась на 5, 10, 20, 45 и 90-е сутки после рождения (для лучшей оценки динамики развития из каждого помета брали по одному крысёнку на каждый срок), быстро извлекали головной мозг, вырезали гипоталамус. Образцы гипоталамуса фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде (при +4 °С, на ночь), затем заключали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью микротомы (Leica RM 2125 RTS, Германия). Препараты обрабатывали согласно протоколу иммуноцитохимической реакции на АТФ-синтазу для световой микроскопии, исключаяющей процедуру теплового демаскирования антигенов (см. Приложение) [Зиматкин и др., 2020].

Результаты проведённого нами иммуногистохимического исследования показали, что с 5-х по 90-е сутки постнатального развития крыс содержание АТФ-синтазы в гистаминергических нейронах значительно возрастает (рис. 3.7). На фотографиях видно, что она располагается в виде мелкой зернистости преимущественно

в цитоплазме перикарионов, не выявляется в ядрах нейронов и её мало в нейропиле, между телами нейроцитов (рис. 3.8).

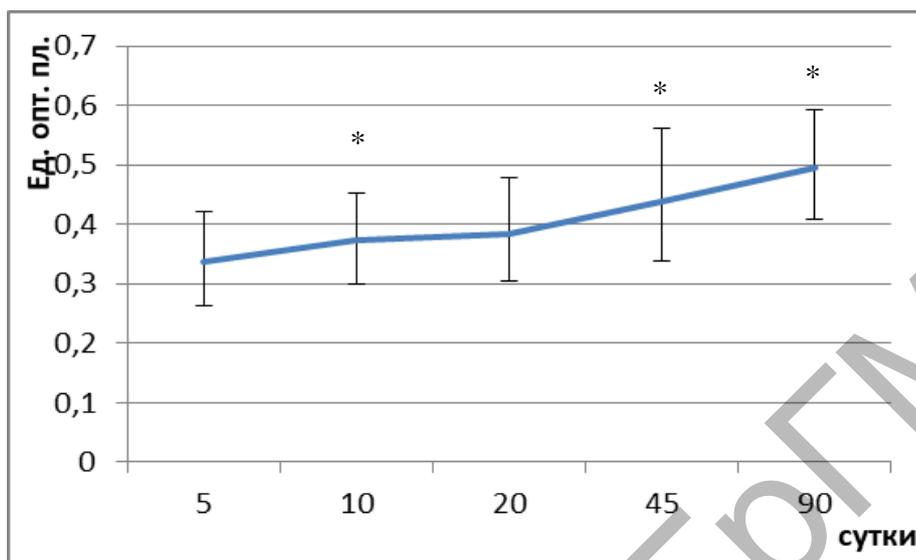


Рисунок 3.7 – Содержание АТФ-синтазы в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса крыс в динамике постнатального онтогенеза (Me+IQR)

Примечание – * – $p < 0,001$ при сравнении с предыдущим сроком.

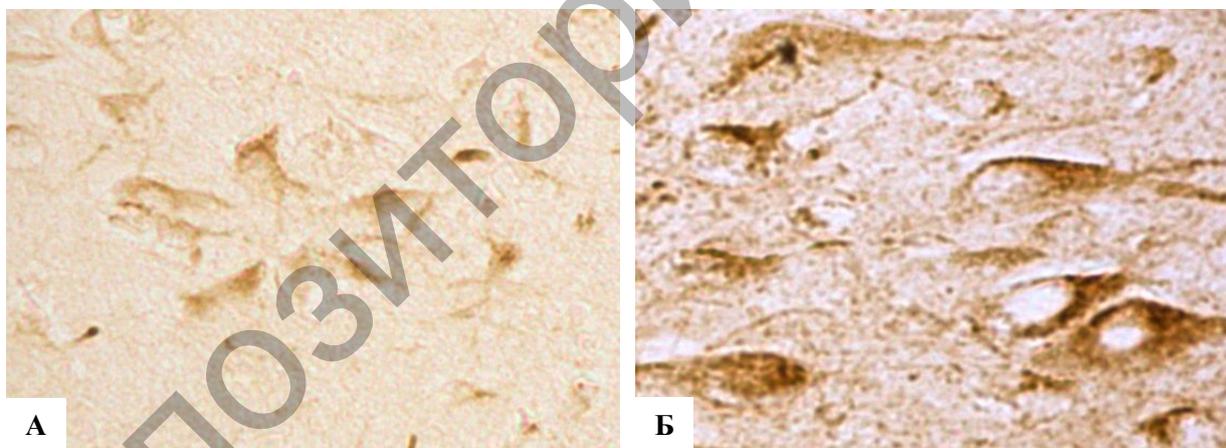


Рисунок 3.8 – АТФ-синтаза в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса крыс на 5-е (А) и 90-е (Б) сутки после рождения

Иммуноцитохимическая реакция.

Цифровая микрофотография. Ув. 800

В наших предварительных исследованиях показано, что переход гистаминергических нейронов от малодифференцированного к зрелому состоянию в постнатальном онтогенезе сопровождается определенными изменениями их структуры. При этом идёт

закономерное развитие функциональных аппаратов клетки: энергетического, синтетического, а также переваривания и защиты [Зиматкин и др., 2019].

Активно дифференцирующиеся гистаминергические нейроны нуждаются в значительном количестве энергии, запасаемой в макроэргических связях АТФ, синтез которой является одной из основных функций митохондрий. Митохондриальная мембранная АТФ-синтаза продуцирует АТФ из АДФ с помощью трансмембранного градиента протонов, который генерируется электрон-транспортными комплексами дыхательной цепи. Энергия трансмембранного градиента используется для синтеза АТФ и для активного транспорта необходимых субстратов через внутреннюю митохондриальную мембрану. Сочетание этих реакций обеспечивает эффективный обмен АТФ-АДФ между митохондрией и цитозолем, что позволяет поддерживать в клетке высокий уровень энергообеспечения. Во время дифференцировки клеток, АТФ-синтаза также способствует созреванию крист митохондрий [Бонь, Максимович, 2019]. Ранее проведенное нами электронно-микроскопическое исследование показало, что количество митохондрий в цитоплазме гистаминергических нейронов по мере их развития динамично нарастает, происходит развитие их крист [Зиматкин и др., 2019]. Поэтому продемонстрированное нами возрастание иммунореактивности АТФ-синтазы с 5-х по 90-е сутки постнатального развития гистаминергических нейронов гипоталамуса крыс вполне соответствует нашим электронно-микроскопическим данным.

В цитоплазме гистаминергических нейронов, окрашенных на выявление иммунореактивности АТФ-синтазы, наблюдается преимущественно равномерное распределение иммунопозитивных гранул и глыбок. У части исследуемых нейронов скопление этих агрегатов визуализируется в перинуклеарной области. Поскольку АТФ-синтаза локализуется на внутренней мембране митохондрий, расположение этих гранул и глыбок в цитоплазме гистаминергических нейронов, по-видимому, соответствует распределению в них этих органелл. Такое расположение митохондрий действительно характерно для гистаминергических нейронов гипоталамуса крыс [Зиматкин и др., 2019]. В ходе дифференцировки гистаминергических нейронов наблюдается контакт митохондрий с ядерной

оболочкой [Зиматкин и др., 2019], что соответствует описанному нами в данном исследовании скоплению иммунопозитивных агрегатов в перинуклеарной области описываемых нейроцитов, которое указывает на высокий уровень обменных процессов со значительными энергетическими затратами именно в этой зоне.

Мы наблюдали рост иммунореактивности АТФ-синтазы в цитоплазме клеток Пуркинье мозжечка крыс в постнатальном онтогенезе. На 2-е сутки после рождения в цитоплазме клеток Пуркинье выявляется очень низкое содержание АТФ-синтазы. Оно значительно возрастает на 7 и 15 дни после рождения, оставаясь на высоком уровне в дальнейшие сроки [Карнюшко и др., 2020].

Изменения АТФ-синтазы в нейронах мозга при холестазах

Холестаз (застой желчи в желчевыводящих путях, нарушающий её отток из печени в двенадцатиперстную кишку) в результате желчнокаменной болезни или другой патологии гепатобилиарной системы, широко распространён в современном обществе [Емельянчик, Зиматкин, 2011]. В наших предыдущих исследованиях установлено, что экспериментальный холестаз у крыс вызывает раннее повреждение митохондрий, глубокие структурные и метаболические нарушения в гистаминергических нейронах гипоталамуса, нейронах коры больших полушарий головного мозга, а также клетках Пуркинье мозжечка, приводящие к гибели некоторых из них [Зиматкин и др., 2007; Емельянчик, Зиматкин, 2011, 2013]. В частности, на 5-20 сутки после перевязки общего жёлчного протока у крыс в нейронах коры мозга отмечалось повреждение крист митохондрий и снижение активности маркерных ферментов митохондрий – сукцинат- и НАДН-дегидрогеназ [Зиматкин и др., 2007; Емельянчик, Зиматкин, 2011]. Представляло значительный интерес изучение в этих условиях иммунореактивности молекулярного маркера митохондрий АТФ-синтазы (комплекса V, образующего АТФ из АДФ), расположенного на кристах внутренней мембраны митохондрий нейронов коры мозга и мозжечка.

В работе использован материал от 60 беспородных белых крыс-самцов массой 200 ± 25 г. Крысам контрольной группы проводили лапаротомию без перевязки общего желчного протока (ОЖП).

Опытным животным производили перевязку ОЖП на 3-5 мм ниже слияния долевых протоков двумя лигатурами с последующим пересечением между ними. Через 2, 5, 10, 20, 45 и 90 суток в утренние часы (для синхронизации по времени) животных контрольной и опытной группы соответствующего срока выводили из эксперимента декапитацией. Быстро извлекали головной мозг, для получения сопоставимых результатов кусочки фронтальной и теменной коры мозга и коры мозжечка всех животных обрабатывали параллельно и в одинаковых условиях, как описано в Приложении. Изучение иммуногистохимических препаратов, их микрофотографирование и цитофотометрию проводили при разных увеличениях микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры Leica DFC320 (Leica Microsystems GmbH, Германия) и программы компьютерного анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США). Для исследования брали участки фронтальной доли коры больших полушарий головного мозга (frontal cortex, primary motor cortex – M1; bregma – от 4,20 до 1,80 мм), теменной доли коры больших полушарий головного мозга (temporal association cortex – TeA; bregma – от -1,2 до -3,3 мм); коры мозжечка (cerebellum cortex, crus1 ansiform lobule – Crus1; bregma – от -9,8 до -11,8 мм) (Paxinos 2007).

Результаты иммуногистохимического исследования показали, что иммунореактивность маркера митохондрий АТФ-синтазы в коре мозга и мозжечка выявляется в цитоплазме всех типов нейронов и нейропиле в соответствии с известным расположением в них митохондрий. При этом размеры выявляемой коричневой зернистости осадка хромогена (диаминобензидина) соответствуют размерам этих органелл, что хорошо видно особенно в крупных нейронах при больших увеличениях микроскопа (рис. 3.9). В цитоплазме нейронов теменной и фронтальной коры через 1 и 5 суток после перерезки ОЖП холестаза приводит к увеличению экспрессии АТФ-синтазы (рис. 3.9, табл. 3.1). Затем, на 10-45-е сутки, иммунореактивность АТФ-синтазы понижена, а на 90-е сутки не отличается от контроля (рис. 3.9, табл. 3.1). Аналогичные волнообразные изменения АТФ-синтазы обнаружены и в цитоплазме клеток Пуркинью коры мозжечка: повышение на 2-е сутки после перевязки ОЖП и снижение на 5-20-е сутки (особенно в гибнущих клетках) с последующей нормализацией в выживших нейронах на 45-е и 90-е сутки (рис. 3.10, 3.11, табл. 3.2).

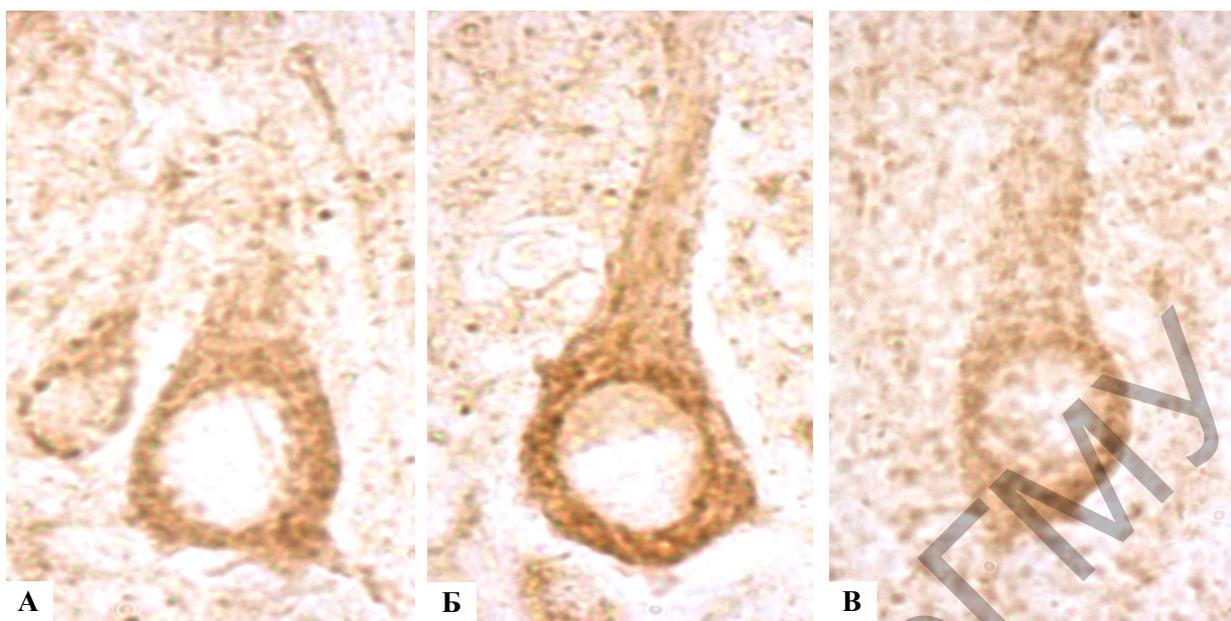


Рисунок 3.9 – Иммунореактивность АТФ-синтазы в нейронах пятого слоя теменной коры головного мозга крыс
 А – 5 суток после ложной операции; Б – увеличение через 5 суток холестаза;
 В – снижение через 10 суток холестаза
 Цифровая микрофотография. Ув. 1000

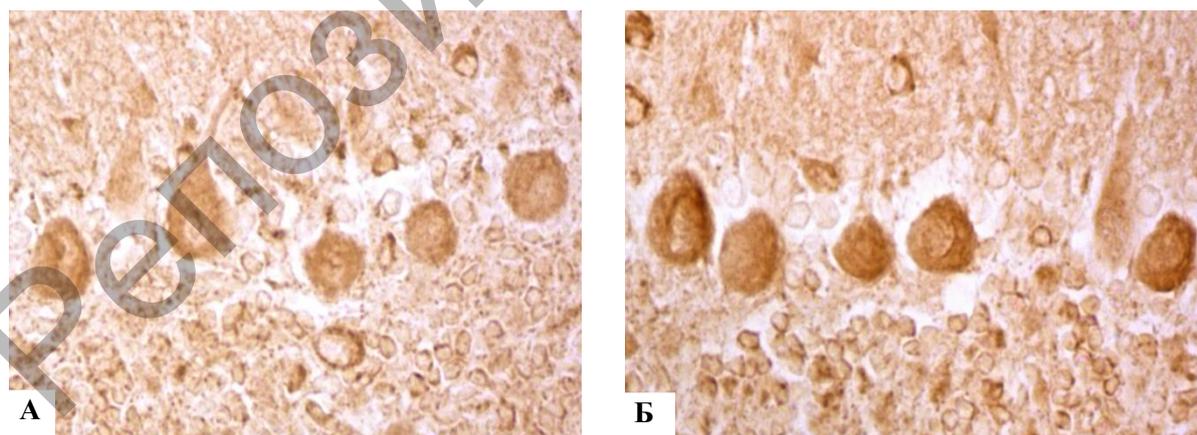
Таблица 3.1 – Иммунореактивность АТФ-синтазы в нейронах слоёв фронтальной и теменной коры головного мозга контрольных крыс в разные сроки после перевязки общего жёлчного протока (ед. $\times 10^3$) (Me \pm IQR)

Слой коры	Кора головного мозга			
	фронтальная		теменная	
	Контроль (n=17)	Опыт (n=17)	Контроль (n=30)	Опыт (n=30)
2 суток				
Второй	292,37 \pm 14,86	329,6 \pm 17,6*** \uparrow	313,48 \pm 9,12	351,9 \pm 17,1*** \uparrow
Третий	292,37 \pm 14,86	315,9 \pm 32,3** \uparrow	314,79 \pm 14,11	342,94 \pm 33,01* \uparrow
Пятый	320,43 \pm 10,71	332,67 \pm 32,33* \uparrow	325,88 \pm 22,97	351,82 \pm 33,2* \uparrow
5 суток				
Второй	307,72 \pm 11,66	370,2 \pm 15,4*** \uparrow	331,47 \pm 9,99	392,0 \pm 12,9*** \uparrow
Третий	305,28 \pm 14,40	326,6 \pm 19,3*** \uparrow	326,18 \pm 17,21	352,6 \pm 28,1*** \uparrow
Пятый	316,19 \pm 17,22	339,5 \pm 22,6*** \uparrow	338,98 \pm 17,21	365,7 \pm 31,1*** \uparrow

Продолжение таблицы 3.1

10 суток				
Второй	298,58±11,81	252,4±31,7***↓	321,27±12,05	279,7±14,3***↓
Третий	303,37±14,75	226,5±28,5***↓	324,72±14,47	254,2±25,6***↓
Пятый	314,16±13,67	243,2±29,4***↓	334,51±9,67	264,5±27,0***↓
20 суток				
Второй	294,94±29,42	271,1±26,2***↓	321,14±23,35	289,7±25,3***↓
Третий	302,67±16,79	245,4±27,0***↓	325,05±13,88	268,6±23,2***↓
Пятый	313,34±11,36	270,5±33,8***↓	335,84±15,94	279,8±25,1***↓
45 суток				
Второй	293,94±38,11	292,43±43,25	323,18±39,54	311,03±49,42
Третий	305,53±36,44	297,64±39,39	327,46±27,98	298,3±54,8**↓
Пятый	316,09±32,52	313,19±63,21	340,12±18,18	315,8±54,8***↓
90 суток				
Второй	283,88±32,37	289,89±36,70	316,01±32,90	319,44±43,18
Третий	288,91±45,60	304,55±44,0	320,44±48,06	330,68±48,41
Пятый	306,73±44,71	319,71±47,36	330,84±51,52	340,50±52,61

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем; *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем; ↓ – статистически значимое снижение изучаемого параметра; ↑ – статистически значимое увеличение изучаемого параметра.



А

Б

Рисунок 3.10 – Иммунореактивность АТФ-синтазы в коре мозжечка крыс в контроле – А (2 суток после ложной операции) и увеличение её в опыте – Б (2 суток холестаза)

Иммуногистохимическая реакция на АТФ-синтазу.

Цифровая микрофотография. Ув. 400

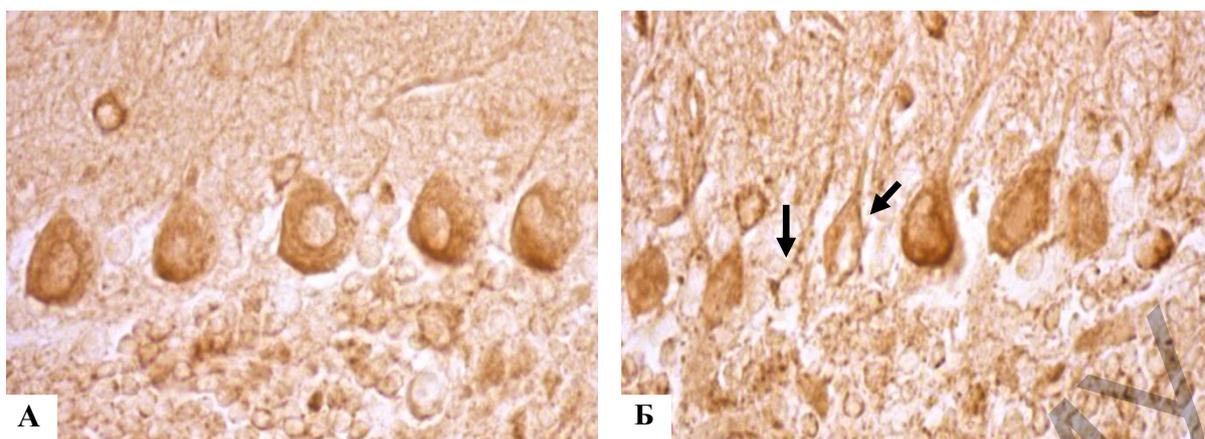


Рисунок 3.11 – Иммунореактивность АТФ-синтазы в коре мозжечка крыс в контроле – А (5 суток после ложной операции) и снижение её, особенно в повреждённых клетках Пуркинье, в опыте – Б (5 суток холестаза)

Имуногистохимическая реакция на АТФ-синтазу.
Цифровая микрофотография. Ув. 400

Таблица 3.2 – Иммунореактивность АТФ-синтазы в перикарионах клеток Пуркинье коры мозжечка контрольных крыс в разные сроки подпечёночного холестаза (ед. $\times 10^3$) (Me \pm IQR)

Сутки	Контроль (n=30)	Опыт (n=30)
2	341,17 \pm 35,56	356,56 \pm 48,69 ** \uparrow
5	345,79 \pm 23,97	285,25 \pm 34,07*** \downarrow
10	341,62 \pm 26,69	250,13 \pm 88,10 *** \downarrow
20	347,08 \pm 32,10	313,80 \pm 14,63*** \downarrow
45	347,03 \pm 38,84	343,74 \pm 17,34
90	341,45 \pm 31,67	334,06 \pm 16,80

Примечание –* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Результаты исследования показали, что после перевязки ОЖП иммунореактивность маркёрного фермента митохондрий АТФ-синтазы сначала кратковременно повышается (на 2-е сутки в цитоплазме клеток Пуркинье мозжечка и на 2-5-е сутки в нейронах коры мозга). Это можно рассматривать как попытку нейронов приспособиться к холестазу, нарастающему в крови уровню билирубина, жёлчных кислот и холестерина, что требует дополнительных затрат энергии для выживания нейронов. Затем в условиях

нарастающего холестаза происходит снижение в них иммунореактивности АТФ-синтазы с минимумом на 10-20-е сутки опыта. Эти изменения коррелируют с нарастающими морфофункциональными нарушениями в этих нейронах (структурными, ультраструктурными и гистохимическими), приводящими к гибели более 10% нейронов коры мозга и мозжечка, что свидетельствует о срыве их адаптации в условиях нарастающего холестаза [Емельянчик, Зиматкин, 2011, 2013]. Это сопровождается гибелью значительной части экспериментальных животных (в результате полиорганной недостаточности) [Емельянчик, Зиматкин, 2011].

В наших предыдущих исследованиях показано, что наиболее значительные нарушения среди органелл нейронов коры мозга и мозжечка при экспериментальном холестазе у крыс наблюдаются именно в митохондриях – разрушение их крист, набухание матрикса, снижение активности маркерных ферментов (сукцинат- и НФДН-дегидрогеназ) с максимумом на 10-20-е сутки опыта [Емельянчик, Зиматкин, 2011, 2013]. Как известно, нейроны из-за их высоких энергетических потребностей зависят от митохондрий, а дисфункция этих органелл играет ключевую роль в нарушении функций и гибели нейронов при острых и хронических заболеваниях ЦНС, нейродегенерации [Lin, Beal, 2006; Galluzzi et al., 2009].

Билирубин в нервной ткани обладает выраженной нейротоксичностью: в нейронах происходит разрушение плазматических мембран, нейровоспаление, окислительный стресс и остановка клеточного цикла [Watchko et al., 2016. Bilirubin]. Это напрямую отражается на мембранах митохондрий, на активности ферментов их дыхательной цепи, что может свидетельствовать об окислительном стрессе в головном мозге. Причем перевязка ОЖП приводила в нейронах головного мозга к отёку, просветлению матрикса, деформации крист, разрушению мембран [Dhanda et al., 2018. Mitochondrial], что подтверждает наши более ранние исследования [Емельянчик, Зиматкин, 2011].

В наших предыдущих исследованиях установлено, что уже с 5-х суток после перерезки ОЖП от его культи к двенадцатиперстной кишке начинают прорастать обходные желчевыводящие пути. Это приводит к устранению холестаза и выживанию тех животных, у которых реканализация успела завершиться до развития

полиорганной недостаточности. Поэтому у выживших животных на 45-90 сутки после перевязки ОЖП происходит нормализация структурных и гистохимических параметров в сохранившихся нейронах коры мозга и мозжечка, в частности состояния в них митохондрий и активности их маркерных ферментов [Емельянчик, Зиматкин, 2011]. Это совпадает по времени с нормализацией иммунореактивности АТФ-синтазы в цитоплазме этих нейронов, что можно рассматривать как признак восстановления в них энергетического аппарата, ведущего к нормализации морфофункционального состояния нейронов.

Выявленные метаболические изменения отражают негативное влияние повышенной концентрации компонентов желчи в крови, а также адаптационные изменения в изученных нейронах мозга при резком нарушении циркуляции желчи; с другой стороны, эти изменения могут свидетельствовать об активном участии нейронов мозга в регуляции компенсаторных процессов при холестазах в организме. Повышенная экспрессия АТФ-синтазы может свидетельствовать об активации внутриклеточных энергозатратных процессов в нейронах, направленных на устранение внутриклеточных повреждений, возможно происходящих в результате токсического повреждения и ускоренного износа органелл при увеличенной активности клеток.

Таким образом, после перевязки ОЖП экспрессия АТФ-синтазы в нейронах новой коры мозга и клетках Пуркинье мозжечка меняется волнообразно: сначала (через 2-5 суток) она кратковременно повышается, затем (на 10-20-е сутки) резко снижается, а в отдалённые сроки (45-90-е сутки) в выживших нейронах нормализуется.

Изменения АТФ-синтазы нейронов мозга при ишемии

1. Ишемический инсульт – одна из главных причин смертности и инвалидизации населения. В связи с высокой метаболической активностью, головной мозг крайне уязвим к нарушениям кровотока. Поскольку степень ишемического повреждения нейронов зависит от расположения в мозге, их филогенетического возраста, функциональных особенностей, медиаторной природы и других факторов [Wang, Michaelis, 2010. Role; Rashad et al., 2020. Metabolic],

актуальным является сравнительное исследование происходящих в них нарушений в разных отделах мозга.

Для расширения уже имеющихся представлений о патогенезе субтотальной ишемии головного мозга (СИГМ), необходима систематическая сравнительная оценка степени повреждения нейронов разных популяций и отделов мозга. Актуальным является и вопрос изучения содержания в них таких маркёров, как АТФ-синтаза, отражающих энергетический потенциал нейронов мозга [Bornhovd et al., 2006. Mitochondrial], поскольку данные об её динамике при СИГМ отсутствуют. Это позволит провести корреляцию тяжести ишемического повреждения нейронов разных структур мозга с изменениями в них АТФ-синтазы и *Ngb* и тем самым предоставить новую информацию о патогенезе данных нарушений.

Иммуногистохимически показано уменьшение содержания АТФ-синтазы в цитоплазме нейронов теменной коры и гиппокампа крыс при ишемии головного мозга, особенно тотальной (декапитация), менее значительно при субтотальной (перевязка обеих сонных артерий) и меньше при частичной (перевязка только одной сонной артерии) [Бонь и др., 2021; Von et al., 2021].

В другом исследовании нами установлены закономерности снижения АТФ-азы в нейронах разных отделов мозга крысы через 30 минут и 3 часа после одномоментной перевязки обеих общих сонных артерий и связи этих изменений с глубиной дегенеративных изменений в этих нейронах [Узлова, Зиматкин, 2022].

Исследование выполнено на материале от 12 самцов белых беспородных крыс (контрольная и две опытные группы включали по 4 животных) массой 230 ± 20 г. СИГМ моделировалась путём двусторонней перевязки общих сонных артерий в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (40-50 мг/кг). Животным из контрольной группы проводилась ложная операция без перевязки общих сонных артерий. Забор мозга крыс опытных групп осуществлялся через 30 минут и 3 часа после операции.

Проводилась быстрая декапитация, извлекали головной мозг и делили его на три части фронтальными разрезами. Фиксация проводилась в комбинированном фиксаторе цинк-этанол-формальдегиде при $+4$ °С в течение 20 часов. Образцы обезвоживали в спиртах, просветляли в ксилолах и заключали в парафин. Серийные срезы

толщиной 5 мкм изготавливали через каждые 500 мкм с использованием микротомы Leica 2125 RTS (Германия) и монтировали на стекла. Срезы окрашивали по Нисслю и иммуногистохимически на выявление АТФ-синтазы.

Полученные данные об изменении содержания АТФ-синтазы в структурах разных отделов мозга крыс демонстрируют различную степень и скорость снижения содержания АТФ-синтазы при субтотальной ишемии. Наибольшие изменения иммунореактивности АТФ-синтазы обнаружены в нейронах неокортекса и периадгипофизарного кортекса конечного мозга (рис. 3.12). Значительное снижение иммунореактивности наблюдается во всех исследованных слоях коры уже после 30-минутной СИГМ. После 3-часовой СИГМ иммунореактивность продолжает снижаться.

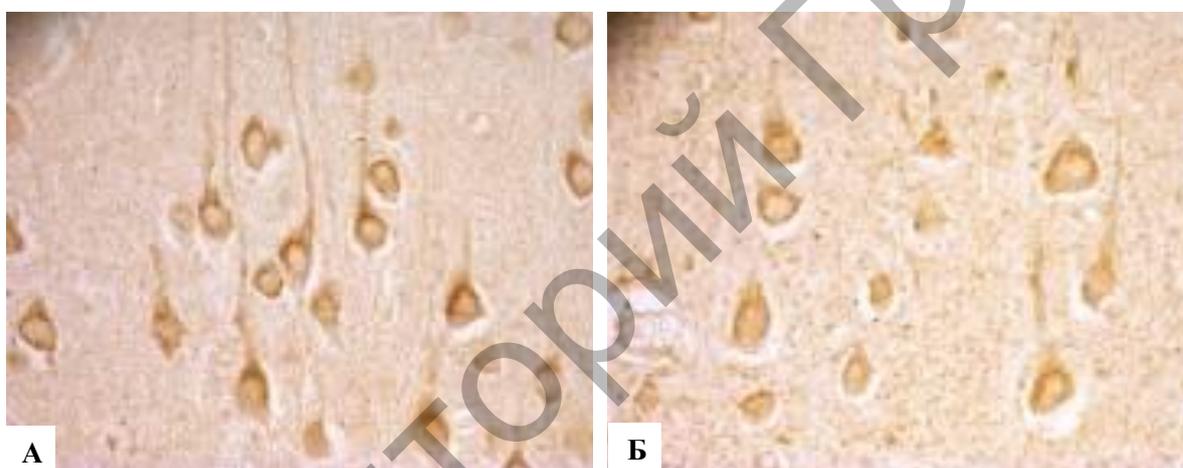


Рисунок 3.12 – Изменения содержания АТФ-синтазы в нейронах V слоя височной коры

А – контрольная группа; Б – 30-минутная СИГМ

Иммуногистохимическая реакция.

Цифровая микрофотография. Ув. 400

Наиболее значительное и быстрое снижение содержания АТФ-синтазы характерно для структур конечного мозга крысы, на которые приходится наибольшая степень ишемического воздействия в данной экспериментальной модели ишемии. В пределах конечного мозга скорость и степень снижения также разнообразны, что соответствует данным литературы [Schmidt-Kastner, 2015; Бонь и др., 2019]. Наибольшие изменения иммунореактивности АТФ-синтазы обнаружены в нейронах височной и ретроспленальной агранулярной коры конечного мозга. Весьма резкое снижение

иммунореактивности – на 30-50% – наблюдается во всех исследованных слоях коры мозга (III, V, VI) уже после 30-минутной СИГМ. После 3-часовой СИГМ иммунореактивность несколько повышается в сравнении с предыдущим сроком или остается на прежнем уровне, то есть дальнейшего снижения не наблюдается.

Пириформная кора, поля гиппокампа СА1-СА3 и зубчатая извилина характеризуются относительно меньшим снижением иммунореактивности АТФ-синтазы после 30-минутной и 3-часовой СИГМ. В разных полях гиппокампа и зубчатой извилине изменения иммунореактивности АТФ-синтазы неодинаково выражены: наибольшее снижение после 30-минутной СИГМ обнаружено в нейронах поля СА3 и зубчатой извилине, и оно продолжается после 3-часовой СИГМ.

Единственной из исследованных структур конечного мозга (и мозга крысы в целом), в которой после 30-минутной СИГМ наблюдается резкое возрастание (на 50%) иммунореактивности АТФ-синтазы, являются митральные клетки обонятельной луковицы (рис. 3.13). После 3-часовой СИГМ она частично восстанавливается.



Рисунок 3.13 – Иммунореактивность АТФ-синтазы

в митральных клетках обонятельной луковицы при СИГМ

А – контрольная группа; Б – 30-минутная СИГМ; В – 3-часовая СИГМ

Иммуногистохимическое окрашивание.

Цифровая микрофотография. Ув. 400

В нейронах ядер промежуточного мозга скорость и характер изменения иммунореактивности АТФ-синтазы различаются. Выделяются нейроны задней группы ядер таламуса, в которых наблюдается снижение, а затем повышение иммунореактивности. В остальных исследованных ядрах через 3 часа СИГМ содержание АТФ-синтазы снижается ещё больше, чем через 30 минут.

В нейронах ствола мозга изменения АТФ-синтазы носят менее выраженный характер. Для их ядер не выявлено резкого снижения или увеличения иммунореактивности АТФ-синтазы как после 30-минутной, так и после 3-часовой СИГМ, а некоторые их структуры (вентральная область покрышки и спинальное ядро тройничного нерва) и вовсе не имеют статистически значимых изменений. Примечательно, что даже в случае сравнительно сильного падения значений иммунореактивности АТФ-синтазы после 30-минутной СИГМ (например, в компактном веществе чёрной субстанции), после 3-часовой СИГМ происходит не снижение, а повышение содержания АТФ-синтазы.

В нейронах структур мозжечка иммунореактивность АТФ-синтазы не изменяется при 30-минутной субтотальной ишемии, но уже при 3-часовой СИГМ они достоверны: в ядрах зарегистрировано снижение иммунореактивности на 15-20%. Реакция клеток Пуркинье различается в зависимости от участка коры мозжечка и более выражена через 3 часа.

Таким образом, выявляемая иммуногистохимически АТФ-синтаза является хорошим молекулярным маркёром энергетического потенциала (энергетических возможностей), отражающим состояние нейронов мозга в норме и при патологии.

Глава 4

СОДЕРЖАНИЕ НЕЙРОГЛОБИНА В НЕЙРОНАХ МОЗГА

Нейроглобин (Ngb) – эволюционно высоко консервативный металлопротеин семейства глобинов, содержащий протопорфирин с атомом железа в центре, образующий шесть координационных связей [Burmester et al., 2000. A vertebrate; Tosqui, Colombo, 2011; Узлова, Зиматкин, 2019]. Ngb экспрессируется преимущественно в нервной системе, сетчатке и некоторых эндокринных структурах [Burmester et al., 2000; Reuss et al., 2002. Expression]. Сходство структуры Ngb с другими глобиновыми белками позволяет предположить и сходные функции обеспечения кислородного гомеостаза клеток. Однако, поскольку уровень сродства Ngb к кислороду очень высок и это является серьёзным препятствием для высвобождения кислорода, нейроглобин все чаще фигурирует как сенсор уровня кислорода в митохондриях, окисляющих органические вещества и образующих АТФ [Yu et al., 2013]. Также считается, что Ngb регулирует функционирование клетки при патологии: подавляет окислительный стресс, блокирует митохондриальные факторы апоптоза, связывает свободные радикалы и оксид азота (II) [Узлова, Зиматкин, 2019]. Хорошо исследована нейропротекторная функция Ngb в условиях его сверхэкспрессии, однако до сих пор неясно, можно ли экстраполировать полученные данные на эндогенные количества нейроглобина [Schmidt-Kastner et al., 2006].

Известно, что экспрессия Ngb различается на клеточном и региональном уровнях. На клеточном уровне Ngb обнаруживается в цитоплазме, везикулярных структурах, нейротрубочках, ядре и митохондриях. Сведения о региональном распределении Ngb в структурах мозга неоднозначны: сообщается как о повсеместном распространении Ngb [Wystub et al., 2003. Localization], так и о концентрации

его в отдельных структурах [Hundahl et al., 2013; Fabrizius et al., 2016. Critical]. Известно и то, что количество Ngb может существенно увеличиваться при патологии [Vorasubin et al., 2016. Neuroglobin]. Таким образом, региональное распределение Ngb в мозге, его закономерности и особенности до сих пор не установлены, что и определяет актуальность нашей работы. В предварительном исследовании мы показали присутствие Ngb в некоторых структурах мозга, но без его количественной оценки [Узлова, Зиматкин, 2019].

Ngb способен связывать и депонировать кислород в нейронах, а также передавать его митохондриям, участвуя в энергообеспечении этих нервных клеток, а также в их защите, связывая свободные радикалы кислорода [Узлова, Зиматкин, 2019]. Ngb расположен в цитоплазме нейронов вблизи митохондрий и даже в их матриксе. Мы изучили региональное и клеточное распределение этого молекулярного маркера в мозге крысы, накопление его в развивающихся нейронах мозга и изменения в нейронах разных отделов мозга крысы при церебральной ишемии и холестазах [Емельянчик и др., 2018; Емельянчик и др., 2020; Узлова, Зиматкин, 2019; Узлова, Зиматкин, 2021].

Распределение нейроглобина в мозге крысы

Для исследования использован материал от 5 беспородных белых крыс-самцов массой 220-250 г. Проводилась быстрая декапитация крыс в утренние часы, быстро извлекали головной мозг и шейный отдел спинного мозга. Головной мозг делили на три части фронтальными разрезами. Фиксация образцов проводилась в цинк-этанол-формальдегиде при +4 °С в течение 20 часов, затем их обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли в ксилолах и заключали в парафин. Серийные фронтальные срезы мозга толщиной 5 мкм готовили через каждые 500 мкм с использованием микротомы Leica 2125 RTS (Германия) и монтировали на заранее подготовленные стекла. Один срез из каждой серии окрашивали по методу Ниссля для идентификации структур мозга по атласу, другой окрашивали иммуногистохимически для выявления содержания Ngb.

Иммунореактивность Ngb выявляется в цитоплазме нейронов и в их отростках всех отделов мозга, при этом в ядрах клеток она не обнаружена. Установлена высокая гетерогенность распределения Ngb в цитоплазме нейронов разных структур мозга крысы:

от 140-160 усл. ед. в нейронах различных слоёв моторной, височной коры и митральных клетках обонятельной луковицы до 459-497 усл. ед. в нейронах вестибулокохлеарного ганглия и центрального ядра спинного мозга [Узлова, Зиматкин, 2021] (рис. 4.1, 4.2).

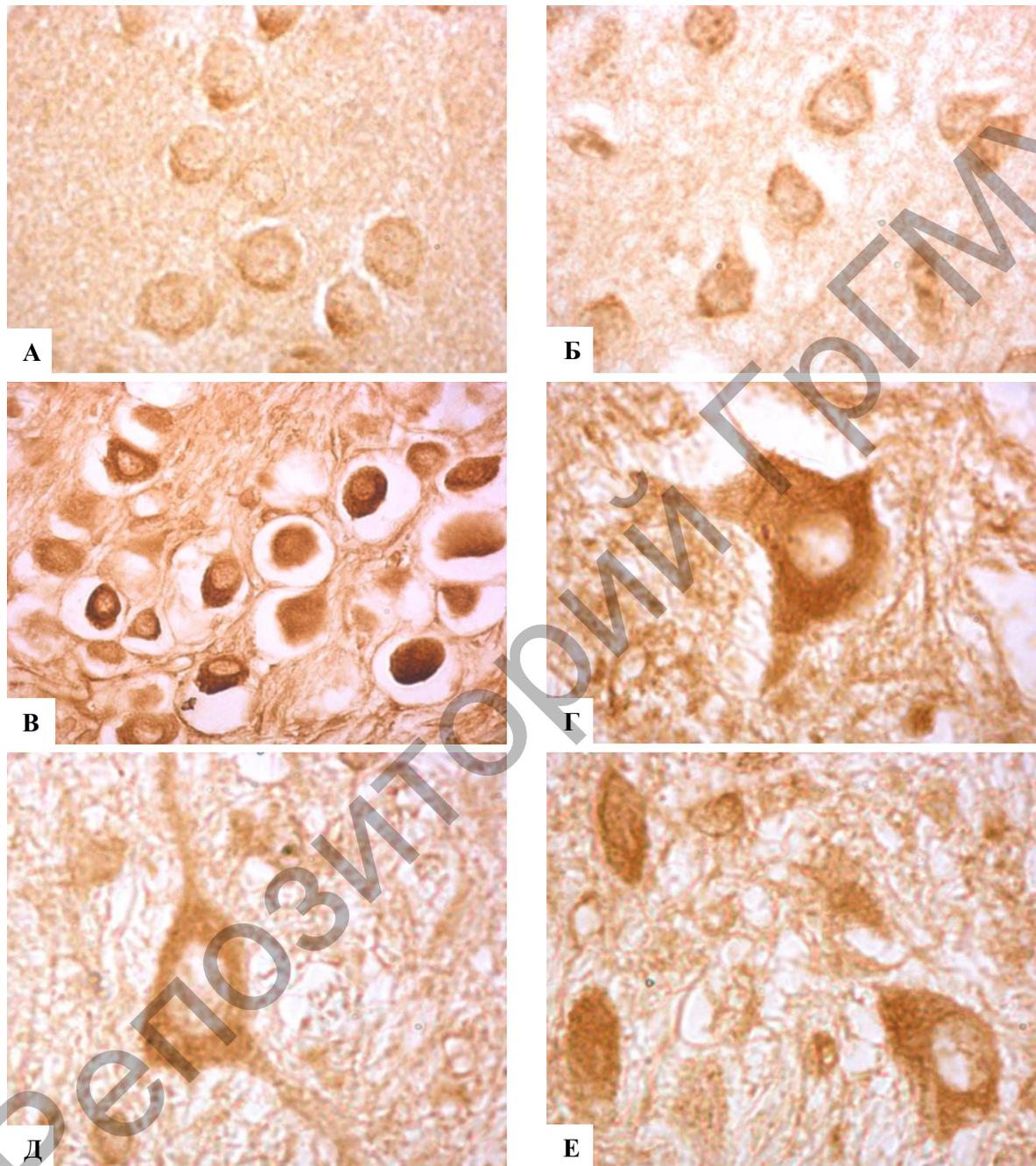


Рисунок 4.1 – Содержание нейроглобина в нейронах 2-го слоя орбитальной коры (А), 5-го слоя фронтальной коры (Б), в нейронах вестибулокохлеарного ганглия (В) и двигательного ядра зрительного нерва (Г), в нейронах медиального ядра мозжечка (Д) и парвацеллюлярного ретикулярного ядра (Е)

Иммуногистохимическая окраска на нейроглобин.

Ув. 400 (А-В) и 1000 (Г-Е)

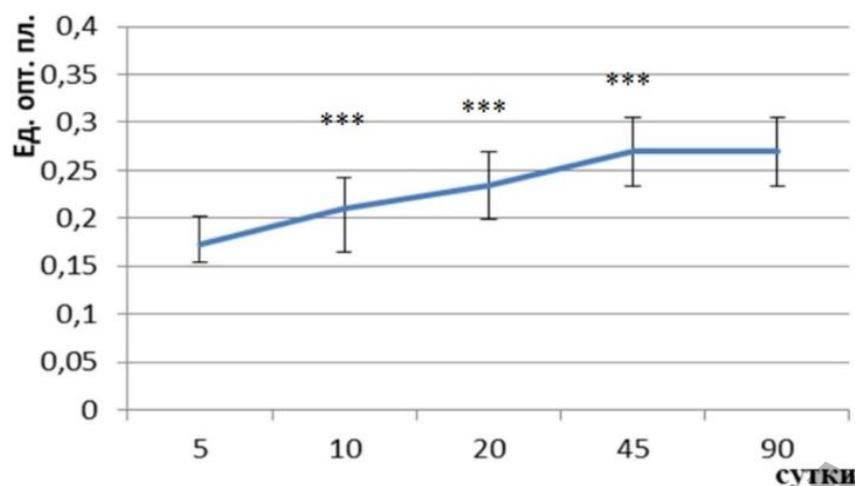


Рисунок 4.2 – Иммунореактивность Ngf в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса крыс в динамике постнатального онтогенеза (Me (LQ; UQ))

Примечание – *** – $p < 0,001$; при сравнении показателей каждый последующий срок сопоставляли с предыдущим.

Мы выделили четыре уровня содержания Ngf в нейронах: низкий (+), умеренный (++) , высокий (+++) и очень высокий (++++). Структуры, в нейронах которых Ngf-ИР отсутствует, не обнаружены. То есть можно утверждать о повсеместном распространении Ngf в пределах серого вещества головного и спинного мозга, что согласуется с данными Wustub, 2003. Кроме того, повсеместное присутствие глобина указывает на его исключительную важность для работы нейронов и нервной системы.

Выявлена высокая гетерогенность распределения Ngf в цитоплазме нейронов разных структур мозга крысы: от 140-160 усл. ед. в нейронах различных слоёв моторной, височной коры и митральных клетках обонятельной луковицы до 459-497 усл. ед. в нейронах вестибулокохлеарного ядра головного мозга и центрального ядра спинного мозга (рис. 4.1).

Несмотря на повсеместное распространение Ngf, для большинства структур характерен именно низкий уровень Ngf (50%) и немного реже встречаются структуры с умеренным уровнем (37%), редко – с высоким (10%). Очень высокое содержание Ngf обнаружено в единичных структурах и характерно исключительно для мотонейронов спинного мозга и вестибулокохлеарного ядра головного мозга (3%). То есть для нормального функционирования нейронам большинства структур достаточно низкого или умеренного

количества Ngb. Высокий и очень высокий уровни, скорее всего, ассоциированы с необходимостью более тщательного контроля уровня кислорода и АТФ в нейронах конкретных структур.

Но более высокий уровень Ngb-ИР не обязательно может быть ассоциирован с большей устойчивостью структуры к гипоксии. Результаты исследований роли Ngb при гипоксии/ишемии, проведенных на животных дикого типа и животных с дефицитом Ngb [Schmidt-Kastner et al., 2006; Hundahl et al., 2010], ставят под сомнение нейропротекторную роль Ngb при его эндогенных количествах. Возможно, большее количество Ngb позволяет более эффективно компенсировать малейшие изменения уровня кислорода и АТФ в нейронах и быстрее на них реагировать, но не обеспечивать клетку дополнительным кислородом, что в случае длительного его дефицита приведёт к серьёзным повреждениям нейронов. Это объяснило бы причину отсутствия нейропротекторного действия Ngb при его эндогенных количествах. Кроме того, по данным Sun et al. (2001), увеличение экспрессии Ngb не связано с увеличением потребления кислорода нейронами, даже при сверхэкспрессии при физиологических условиях Ngb не может высвобождать кислород. В условиях гипоксии, возможно, условия позволяют Ngb выступать и как сенсору дефицита кислорода и АТФ, и высвобождать кислород, что могло бы объяснить обнаруженный нейропротекторный эффект Ngb при сверхэкспрессии [Sun et al., 2003; Khan et al., 2006; Li et al., 2010].

Среди структур головного мозга крысы наблюдается тенденция к увеличению уровня Ngb в ряду конечный мозг – промежуточный мозг – средний мозг – мост и продолговатый мозг (рис. 4.1), то есть по мере увеличения филогенетического возраста структур. Это в большей степени не соответствует биохимическим данным о концентрации Ngb в конкретных отделах мозга возможно потому, что в образцы мозга для биохимического анализа попадают не только тела нейронов, но и белое вещество и глиальные клетки.

Филогенетический возраст структур также влияет на уровень Ngb в структурах коры: в архи- и палеокортексе она несколько выше, чем в неокортексе. Для коры наблюдается ещё и увеличение Ngb по мере продвижения к глубоким слоям. Чаще всего максимальные значения Ngb в пределах одного типа коры приходятся на нейроны V слоя – слоя больших пирамидных нейронов, содержащего большое количество крупных нейронов.

В целом достаточно широкий разброс значений Ngb (то есть гетерогенность) характерен для всех отделов мозга крысы, но особенно – для конечного мозга (разброс значений от 140 до 281 усл. ед.), моста и продолговатого мозга (от 222 до 497 усл. ед.). В конечном мозге это, вероятнее всего, является следствием филогенетического, высокого структурного и функционального разнообразия структур. В мосте и продолговатом мозге гетерогенность достигается за счёт высоких значений Ngb для большого ядра шва и вестибулокохлеарного ганглия. Скорее всего, столь большое содержание в них Ngb является следствием необходимости жёсткого контроля в них уровня кислорода и АТФ из-за высокой функциональной нагрузки: вестибулокохлеарный ганглий содержит тела биполярных чувствительных нейронов (это единственные рецепторные нейроны мозга), а большое ядро шва получает информацию от большого количества структур – центрального преакведуктального серого вещества, ядер миндалина, гипоталамуса, разных отделов коры – и отправляет импульсы к передним рогам спинного мозга.

Наблюдается тенденция к увеличению содержания Ngb по мере увеличения филогенетического возраста, в том числе в пределах отделов мозга (рис. 4.1, 4.2). Наибольшие значения иммунореактивности Ngb отмечаются в нейронах продолговатого и спинного мозга. Установлено, что нейроны ядер мозжечка содержат большее количество Ngb по сравнению с КП коры мозжечка.

Отдельного внимания заслуживает вопрос распределения Ngb в мозжечке. Установлено, что нейроны ядер мозжечка (рис. 4.1) содержат большее количество Ngb в сравнении с КП коры мозжечка (рис. 4.1). Вставочное ядро и КП пирамиды, демонстрирующие наибольший уровень Ngb, относятся к древней части мозжечка – палеоцеребеллуму (спиноцеребеллуму), связанному со спинным мозгом.

В шейном отделе спинного мозга содержание Ngb значительно различается в передних и задних рогах серого вещества спинного мозга. В мотонейронах передних рогов оно в два раза больше, чем во вставочных, ассоциативных нейронах задних рогов. Различается содержание Ngb и в структурах, образованных мотонейронами, что видно на примере добавочного и центрального шейного ядра.

Ngb различается в слоях (пластинках) серого вещества. Наиболее интенсивное иммуноокрашивание наблюдается в пластинках

с VI по X, что объясняется их структурными и функциональными различиями: нейроны этих слоёв преимущественно крупные, отвечают за связь между левой и правой частями спинного мозга, между сегментами и иннервируют мускулатуру туловища.

Таким образом, нейроглобин обнаружен в нейронах всех отделов головного и спинного мозга крысы; преобладают структуры с низким или умеренным его количеством.

Существует отчётливая тенденция к увеличению содержания Ngb в нейронах структур головного мозга крысы в передне-заднем направлении: конечный, промежуточный, средний, задний мозг, спинной мозг, что совпадает с возрастанием филогенетического возраста структур. В коре мозга содержание Ngb в палеокортексе также выше, чем в неокортексе. Кроме того, в коре наблюдается возрастание содержания Ngb от наружных слоёв к более глубоким.

Большим содержанием Ngb характеризуются нейроны ядер мозжечка в сравнении с клетками Пуркинье коры мозжечка, а также большее количество его обнаруживается в палеоцеребеллуме, чем в неоцеребеллуме.

Нейроглобин в развивающихся гистаминергических нейронах гипоталамуса

Иммунореактивность нейроглобина (Ngb) с пятых по 90-е сутки постнатального развития крысы возрастает в 1,6 раза ($p < 0,001$) (рис. 4.3).

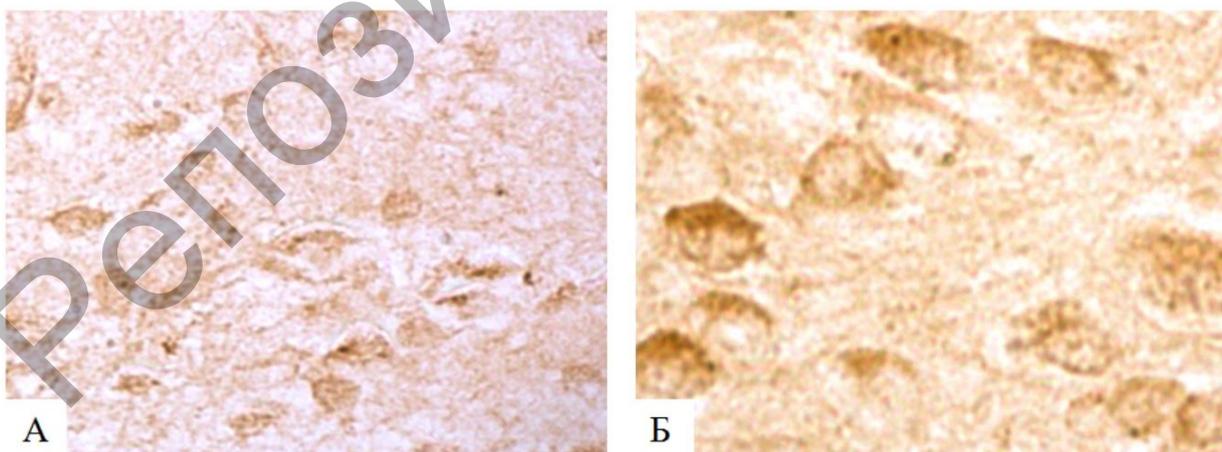


Рисунок 4.3 – Иммунореактивность Ngb в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса пятисуточных (А) и 90-суточных (Б) крыс

Иммуноцитохимическая реакция на нейроглобин.

Цифровая микрофотография. Ув. 800

При этом с пятых по 10-е сутки она увеличивается в 1,2 раза ($p < 0,001$), с 10 по 20-е – в 1,1 раза ($p < 0,001$), с 20 по 45-е сутки – в 1,2 раза ($p < 0,001$), а с 45 по 90-е сутки не претерпевает значительных изменений (рис. 4.3).

Таким образом, содержание нейроглобина в развивающихся гистаминергических нейронах мозга постепенно возрастает, вплоть до 45-го дня после рождения. Это указывает на повышение кислороддепонирующих возможностей зрелых нейронов и их устойчивости к повреждающему действию свободных радикалов.

Изменения нейроглобина в нейронах мозга при ишемии

Изменения содержания Ngb при СИГМ, вызванной перевязкой обеих сонных артерий, обнаружены во всех исследованных отделах мозга крысы. Преимущественно отмечается уменьшение содержания Ngb, однако степень и скорость его отличаются. Это свидетельствует об общей неустойчивости кислородного депо большинства нейронов мозга к ишемическому воздействию. Структуры без изменения Ngb составляют малую долю в мозге.

В конечном мозге выделяется несколько групп структур по характеру изменения Ngb при СИГМ. Для пириформной коры характерно снижение иммунореактивности после 30-минутной СИГМ на 18% и увеличение иммунореактивности Ngb до контрольного уровня после 3-часовой СИГМ, то есть «волнообразное» изменение. В митральных клетках обонятельной луковицы, наоборот, Ngb-иммунореактивность повышается на 16% после 30-минутной СИГМ и возвращается к контрольным цифрам после 3-часового воздействия.

В гиппокампе и зубчатой извилине снижение иммунореактивности Ngb усиливается при увеличении продолжительности ишемического воздействия. То есть сохранения или повышения иммунореактивности не отмечается ни в одной из частей гиппокампа, что отличается от типа и скорости изменений иммунореактивности в других изученных структурах аллокортекса. В слоях периаллокортекса и неокортекса не наблюдается уменьшения содержания Ngb после 30-минутной СИГМ. После 3-часового воздействия иммунореактивность снижается на 19-24% в периаллокортексе

и на 11-33% в неокортексе. Таким образом, структуры периаллокортекса и неокортекса характеризуются более медленным снижением содержания Ngb по сравнению с филогенетически более старыми структурами конечного мозга.

В нейронах структур промежуточного мозга иммунореактивность Ngb существенно снижается после 30-минутной СИГМ, сохраняясь после 3-часовой СИГМ.

В среднем и продолговатом мозге только в одной из исследованных структур – спинальном ядре тройничного нерва – не отмечается достоверного уменьшения количества Ngb. В вентральной области покрышки происходит даже увеличение иммунореактивности Ngb после 30-минутной СИГМ, но уже после 3-часового воздействия уровень Ngb возвращается к контрольным значениям. В остальных же исследованных структурах среднего и продолговатого мозга снижение иммунореактивности отмечается уже после 30-минутного воздействия. После 3-часовой СИГМ наблюдается как сохранение уровня иммунореактивности в сравнении с предыдущим сроком, так и дальнейшее снижение.

В мозжечке наименее существенные изменения содержания Ngb обнаружены в клетках Пуркинье коры мозжечка. При этом в клетках Пуркинье простой дольки изменений не отмечено ни после 30-минутной, ни после 3-часовой СИГМ. В околоклочке происходит относительно небольшое снижение (на 7%) после 30-минутного воздействия и остаётся на прежнем уровне даже после 3 часов СИГМ. Разные ядра мозжечка отличаются неодинаковым снижением содержания Ngb: во вставочном ядре происходит снижение уже после 30-минутного воздействия, без дальнейшего снижения, в то время как в латеральном ядре достоверное снижение отмечается после более длительного воздействия (рис. 4.4).

Обнаруженные изменения позволяют говорить и о разной устойчивости кислородного депо в структурах в зависимости от филогенетического возраста: более молодые периаллокортекс, неокортекс и кору мозжечка можно выделить как структуры с более устойчивым кислородным депо, так как 30-минутная СИГМ не приводит к снижению в них Ngb-иммунореактивности, в то время как в аллокортексе, стволе мозга и ядрах мозжечка кислородное депо уменьшается рано.

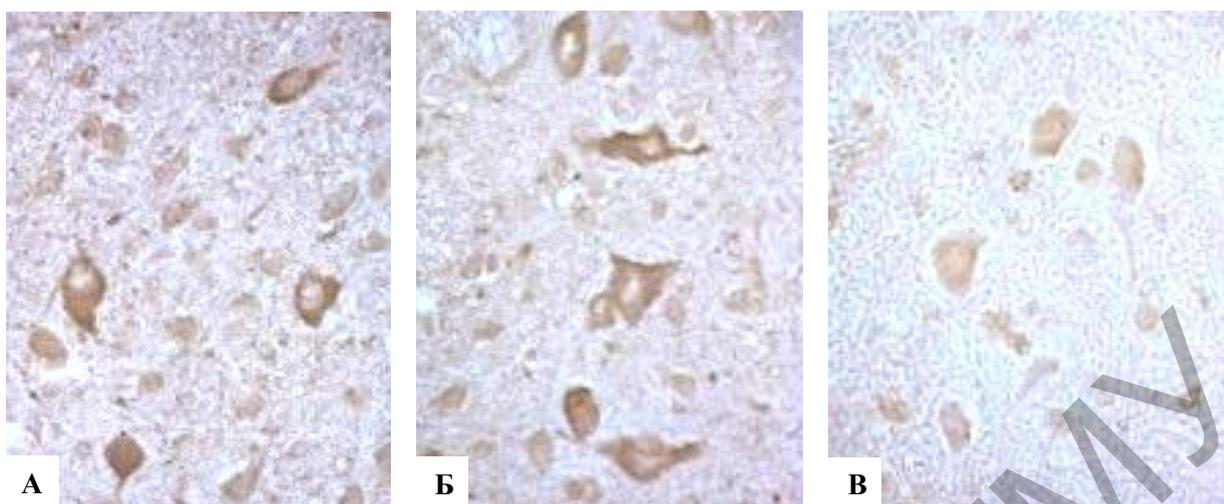


Рисунок 4.4 – Содержание NgB в нейронах латерального ядра мозжечка

А – контроль; Б – 30-минутная СИГМ; В – 3-часовая СИГМ

Иммуногистохимическая реакция на Ngb.

Цифровая микрофотография. Ув. 400

Неустойчивость кислородного депо зависит от длительности ишемического воздействия. После 3-х часовой ишемии содержание Ngb в нейронах большинства структур снижается более значительно, чем после 30-минутной ишемии. То есть нейроны не могут поддерживать кислородное депо на прежнем уровне

Важно отметить и отсутствие случаев увеличения Ngb относительно контрольного уровня после 3-часовой СИГМ, что согласуется с данными других исследований о экспрессии Ngb в нервных клетках с нормальной экспрессией этого белка [Tiso et al., 2011. Human]. Как известно из литературы, увеличение экспрессии Ngb при ишемии/гипоксии наблюдалось у Ngb-сверхэкспрессирующих животных и в отдельных культурах клеток [Allegretti et al., 2015. Horizontal], но не в нетрансгенных организмах.

Меньшая чувствительность кислородного депо филогенетически молодых структур при ишемии ранее отмечалась в литературе [Shang, 2006], однако факторы, определяющие данное различие, до сих пор не обнаружены. Причиной этого является более ранняя активация нейропротекторной функции нейроглобина в нейронах гиппокампа вследствие существенно более высокого уровня нейрональной синтазы оксида азота (nNOS) при кислород-глюкозной депривации в сравнении с нейронами коры [Jiang, 2004].

Несмотря на то, что более высокий уровень nNOS описывался для развивающихся нейронов [Jiang, 2004], нельзя исключать возможность существования аналогичных различий в уровнях nNOS и среди нейронов взрослых организмов.

Известно, что после 1-часовой СИГМ происходит 29%-е снижение Ngb в гиппокампе (поле CA1) [Bon, 2022], что соответствует нашим данным о снижении Ngb после 30-минутного и 3-часового воздействия на 21% и 37% соответственно.

Также известно о 32%-м снижении Ngb в пирамидных нейронах V слоя париетальной коры после 1-часовой субтотальной ишемии [Bon, 2021], в то время как по нашим данным в височной коре после 30-минутной ишемии значимое изменение не было обнаружено, а после 3-часовой составило только 19%. Подобные результаты указывают на разнообразную по скорости и степени реакцию кислородного депо разных участков неокортекса на ишемическое воздействие.

Неустойчивость кислородного депо зависит от длительности ишемического воздействия. После 3-часовой ишемии содержание Ngb в нейронах большинства структур снижается более значительно, чем после 30-минутной ишемии. То есть нейроны не могут поддерживать кислородное депо на прежнем уровне длительное время.

Таким образом, в нейронах большинства исследованных структур происходит уменьшение содержания Ngb, особенно в филогенетически более старых структурах ствола мозга и при длительной ишемии, по сравнению с корой конечного мозга и мозжечка.

Изменения нейроглобина в нейронах мозга при холестазах

Содержание нейроглобина в нейронах мозга в динамике холестаза меняется волнообразно (рис. 4.5). После 2-суточного холестаза оно снижается в перикарионах нейронов 2-го слоя на 5,1 % ($p=0,000$), 3-го слоя – на 7,4 % ($p=0,012$) (рис. 4.5), 5-го слоя – на 5,8 % ($p=0,019$). После 5 суток холестаза во всех слоях нейронов происходит, наоборот, увеличение экспрессии NgB: во 2-м слое – на 12 % ($p=0,002$), в 3-м – на 8,0 % ($p=0,001$), в 5-м слое – на 3,7 % ($p=0,001$) (рис. 4.5-4.7).

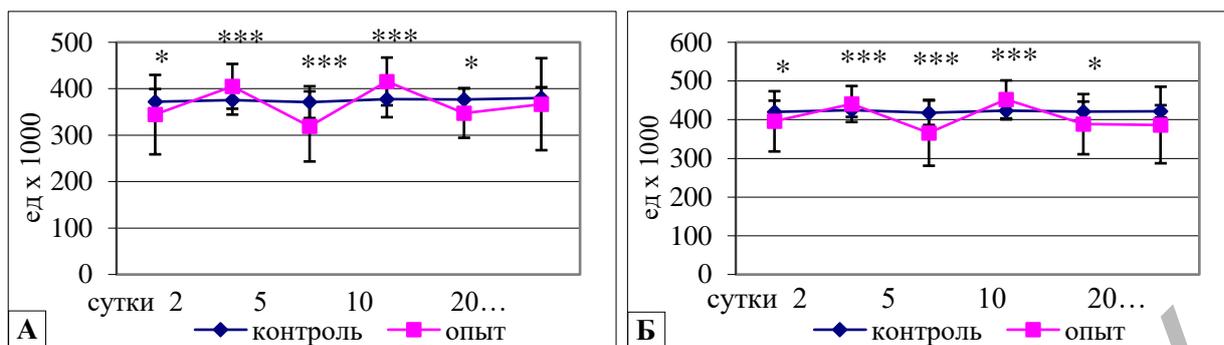


Рисунок 4.5 – Иммунореактивность нейроглобина в нейронах лобной коры мозга контрольных крыс в разные сроки холестаза

А – 3-й слой; Б – 5-й слой

Примечание – $Me \pm IQR$; * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

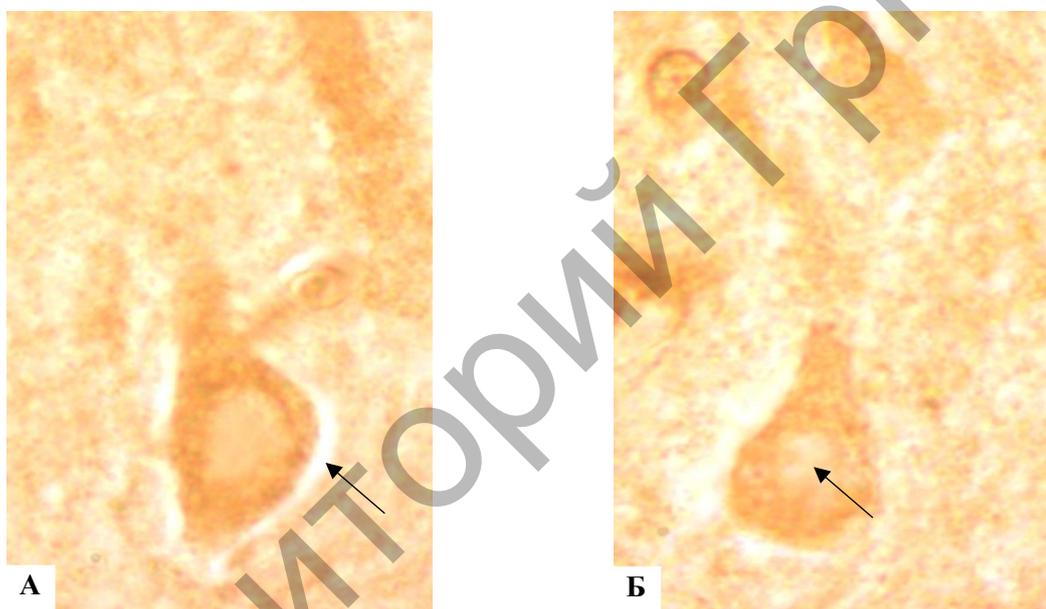


Рисунок 4.6 – Иммунореактивность нейроглобина в нейронах 3-го слоя лобной коры мозга крыс в контроле; 2-е суток после ложной операции (А); снижение ее в опыте (2-е суток холестаза) (Б)

Иммуногистохимическая реакция на нейроглобин.

Цифровая микрофотография. Ув. 1000

10-суточный холестаз приводит к повторному снижению иммунореактивности нейроглобина во 2-м слое нейронов на 5,5 % ($p=0,022$), в 3-м – на 14 % ($p=0,000$), в 5-м – на 12 % ($p=0,000$). 20-суточный холестаз приводит к повторному возрастанию иммунореактивности нейроглобина в 3-м слое нейронов лобной коры на 10 % ($p=0,000$) (рис. 4.7), а в 5-м – на 7,0 % ($p=0,000$).

Через 45 суток после перевязки ОЖП в 3 и 5-м слоях нейронов иммунореактивность нейроглобина опять снижается – на 7,7 % ($p=0,022$) и на 7,6 % ($p=0,047$) соответственно. Через 90 суток во всех слоях коры в опыте и контроле различий в экспрессии нейроглобина не определено (рис. 4.5).

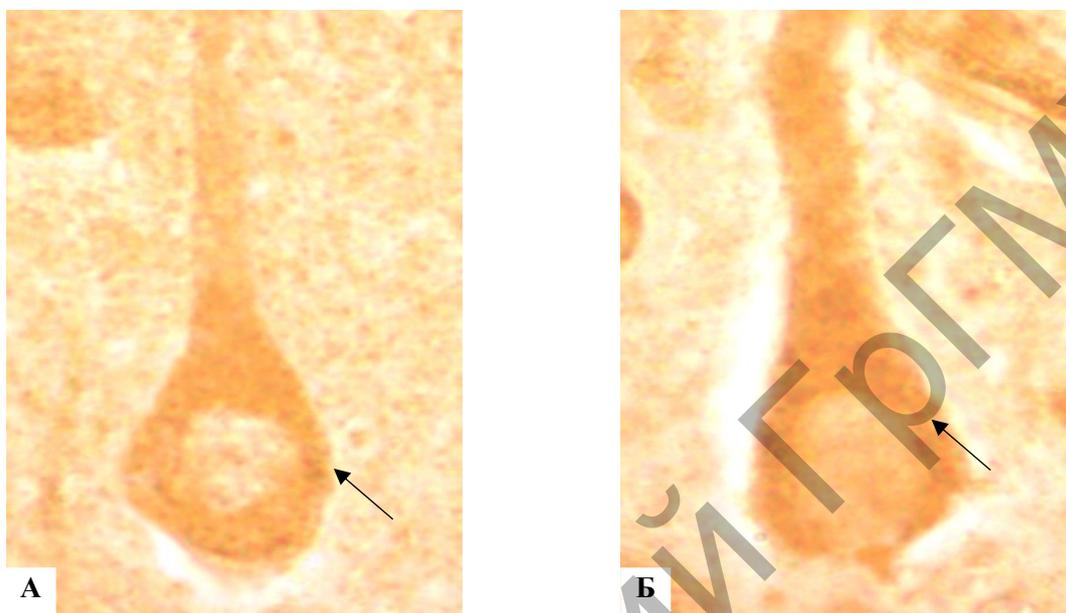


Рисунок 4.7 – Иммунореактивность нейроглобина в нейронах 5-го слоя лобной коры мозга крыс в контроле; 5 суток после ложной операции (А); усиление ее в опыте (5 суток холестаза) (Б)

Иммуногистохимическая реакция на нейроглобин.
Микрофотография. Ув. 1000

Таким образом, содержание нейроглобина значительно различается в нейронах разных отделов мозга. Оно выше в нейронах структур большего филогенетического возраста. В них же происходит и более значительное снижение NgB при ишемии. В постнатальном онтогенезе содержание NgB в нейронах мозга постепенной возрастает. Постхолистатические изменения в нейронах коры мозга носят волнообразный характер.

Глава 5

ОЦЕНКА ДЕПО КАЛЬЦИЯ В НЕЙРОНАХ

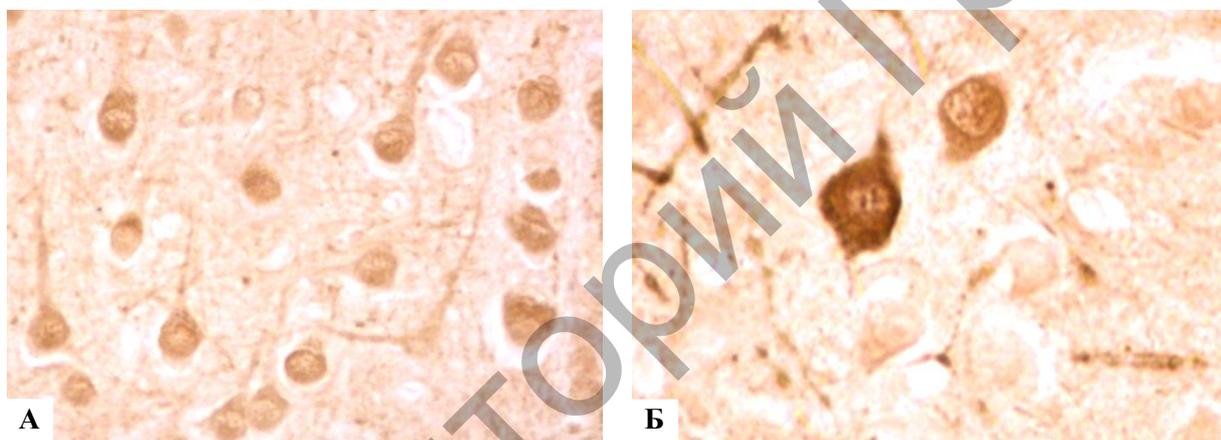
Кальций необходим для деятельности всех клеток, особенно возбудимых, и относится к числу универсальных внутриклеточных регуляторов. В ответ на внутри- или внеклеточные сигналы происходит кратковременное локальное увеличение концентрации кальция, а при различных стрессах или критических состояниях его концентрация в цитоплазме существенно увеличивается, что может приводить к гибели клеток. Белок кальбиндин – важный компонент системы внутриклеточного гомеостаза кальция [Piccolini et al., 2013. Platinum]. Его главная функция – связывание и депонирование кальция. Эндогенные буферы ионов кальция, такие как парвальбумин и кальбиндин, являются модуляторами нейротрансмиссии [Bornschein et al., 2013. Paired-pulse]. Экспрессию кальбиндина используют в качестве специфического маркера для идентификации клеток Пуркинье коры мозжечка [Karelina et al. 2016. Downregulation]. Гиперэкспрессия белка кальбиндина-D28k в клетках Пуркинье коры мозжечка может играть роль в нейропротекции [Pascual et al., 2014. Single].

Ионы кальция необходимы для возбуждения нейронов и передачи нервных импульсов между нейронами через синаптические соединения. Избыточное накопление свободного кальция в нейронах приводит к их перевозбуждению, эксайтотоксичности, ведущей к повреждению и гибели нейронов. Из белков, депонирующих кальций и предупреждающих накопление его свободных ионов в нейронах мозга, мы изучали белок **кальбиндин** в нейронах коры мозга и мозжечка крысы в нормальных условиях, в постнатальном онтогенезе и при холестазах [Зиматкин и др., 2019; Емельянчик и др., 2019; Карнюшко, Зиматкин, 2020].

Содержание кальбиндина в нейронах коры мозга и мозжечка

Для исследования кальбиндина брали участки фронтальной (от -4,2 до 1,8 мм) и теменной (от -6,84 до -8,52 мм) доли коры больших полушарий головного мозга и коры мозжечка от 18 беспородных белых крыс-самцов (от -10,08 до -12,72 мм) [Paxinos, Watson, 2007].

Фронтальная и теменная кора. Во втором слое коры больших полушарий головного мозга большинство нейронов умеренно иммунопозитивны по кальбиндину. Продукты иммуногистохимической реакции в виде тёмно-коричневых мелких и мельчайших гранул распределены по всему перикариону и в видимых участках отростков, преимущественно дендритов (рис. 5.1).



**Рисунок 5.1 – Иммунореактивность кальбиндина
во фронтальной коре мозга крысы**

А – наружный зернистый слой; Б – внутренний пирамидный слой

Иммуногистохимическая реакция на кальбиндин.

Цифровая микрофотография. Ув. 400

В третьем, пятом и шестом слоях коры видны единичные нейроны с высокой иммунореактивностью кальбиндина, встречаются также нейроны с умеренной и низкой иммунореактивностью, но большинство нейронов в этих слоях иммунонегативны. Интересно, что данные нейроны с высокой иммунореактивностью кальбиндина в этих слоях по количеству (0,3-0,5% от общего числа нейронов), форме и расположению очень напоминают гиперхромные нейроны, выявляемые при окраске по Нисслию у нормальных животных. В некоторых нейронах наряду с перинуклеарной

областью окрашиваются и сами ядра, при этом окраска напоминает расположение ядерного хроматина (рис. 5.1). Вместе с телами нейронов выявляются вертикально расположенные отдельные нервные волокна, преимущественно дендриты пирамидных нейронов. Некоторые из них окрашиваются чёткообразно: участки с интенсивной окраской чередуются с иммунонегативными участками.

Мозжечок. Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии кальбиндина в коре мозжечка показали отсутствие окрашивания мозговых оболочек и интенсивное иммунопозитивное окрашивание тел и дендритов клеток Пуркинью. При этом в молекулярном слое выявляются не только крупные, но и многочисленные мелкие ветвления дендритов клеток Пуркинью, а их аксоны остаются неокрашенными (рис. 5.2). Интересно, что все тела нейронов молекулярного слоя иммунонегативны, а в зернистом слое значительная часть нейронов умеренно иммунопозитивны. Кроме того, в зернистом слое мозжечка очень чётко окрашиваются некоторые афферентные нервные волокна, идущие из белого вещества. Поскольку они не идут в слой клеток Пуркинью и молекулярный слой, а заканчиваются в зернистом слое, их можно отнести к моховидным (рис. 5.2)

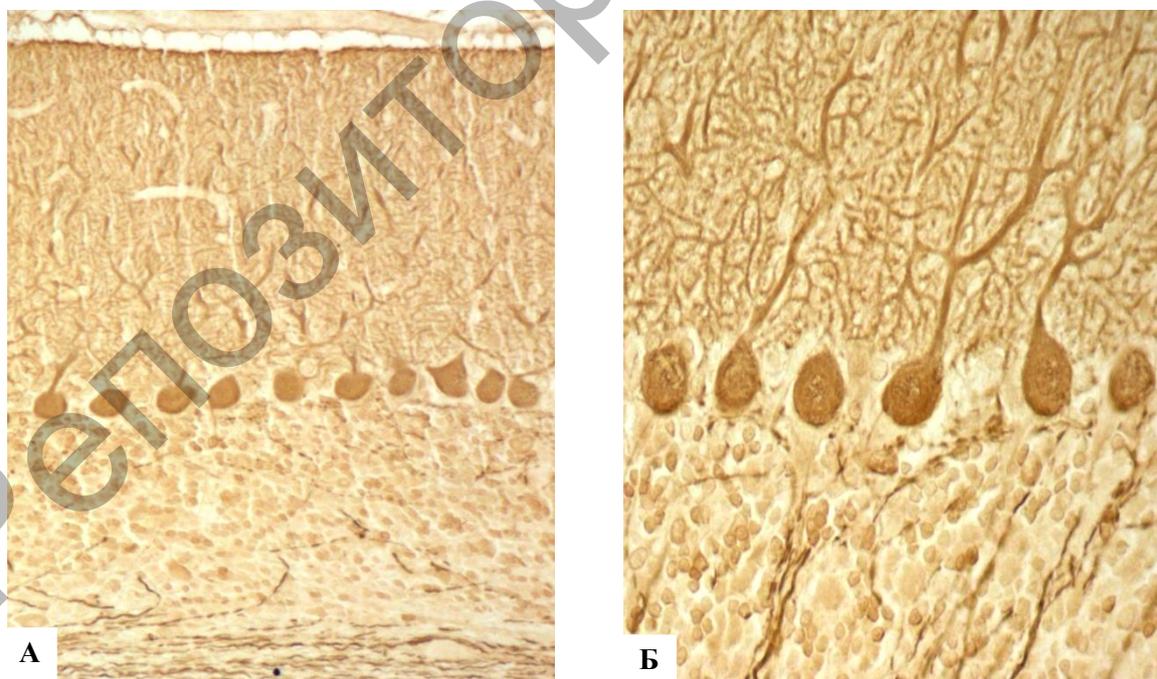


Рисунок 5.2 – Экспрессия кальбиндина в коре мозжечка крысы

Иммуногистохимическая реакция на кальбиндин.
Цифровая микрофотография. Ув. 100 (А) и 200 (Б)

Следует отметить неодинаковую иммунореактивность кальбиндина в клетках Пуркинье на поверхности и в глубине извилин мозжечка: ближе к поверхности окрашивание этих клеток меньше, чем в средних отделах, и наибольшее в глубоких отделах извилины и в месте самого изгиба. Так, если средняя оптическая плотность в перикарионах клеток Пуркинье составляет $0,298 \pm 6$ единицы, то те клетки, которые находятся ближе к мягкой мозговой оболочке окрашиваются на 10,8% слабее, а в глубоких участках извилин – на 9,4% сильнее.

Проведённое исследование показало отсутствие иммунореактивности кальбиндина в мозговых оболочках и глиальных клетках. В поверхностных слоях коры мозга и извилин мозжечка она всегда была выше, а число окрашенных нейронов было больше. Это же отмечали и другие авторы, показавшие, что экспрессия кальбиндина в нейронах глубоких слоёв цингулятной коры мозга морских свинок была выше, чем поверхностных [Hermanowicz-Sobieraj et al., 2018]. Возможно, это связано со скоростью проникновения фиксатора в кусочек мозга и, соответственно, с длительностью его воздействия и является артефактом. Однако нельзя исключить и разное содержание кальбиндина в разных типах нейронов поверхностных и глубоких слоёв. Вызывает вопросы и окрашивание структур ядра, похожих на хроматин, и области ядерной оболочки. Однако это не является артефактом, поскольку присутствие кальбиндина D28k в ядре разных типов нейронов мозга, включая клетки Пуркинье мозжечка, было показано в специальном исследовании [German et al., 1997]. Это обусловлено возможностью проникновения сигналов кальция в ядро, где они могут регулировать экспрессию генов, а присутствие кальбиндина в ядре важно для функции клетки.

Некоторые нервные волокна в коре мозга, реже в зернистом слое коры мозжечка, окрашиваются чёткообразно: в них участки с интенсивной окраской чередуются с иммунонегативными участками. Судя по расположению, это аксоны нейронов, входящие в кору. Неравномерное расположение в них кальбиндина, возможно, связано с особенностями прохождения по ним нервного импульса. При этом дендриты клеток Пуркинье мозжечка всегда окрашиваются равномерно.

В целом можно полагать, что распределение кальбиндина связано с особенностями обмена кальция, возбудимостью или какими-то

инными функциональными особенностями нейронов. Это подтверждается тем, что в глубоких слоях коры мозга иммунопозитивными являются менее 1% нейронов. При этом отдельные типы нейронов не выявляются совсем. Однотипные соседние нейроны значительно отличаются по содержанию кальбиндина – от резко иммунопозитивных до иммунонегативных. Размеры, форма и пространственная организация нейронов с высокой иммунореактивностью кальбиндина в глубоких слоях коры мозга совпадает с гиперхромными нейронами, выявляемыми по Ниссию. Иммунопозитивными также является лишь небольшая часть нервных волокон; в них часто наблюдается чёткообразное иммуноокрашивание: участки с интенсивной окраской чередуются с иммунонегативными участками. Однако связь иммунореактивности кальбиндина с функциональным состоянием нейронов нуждается в дальнейшем исследовании.

Можно предположить, что иммунореактивность кальбиндина в нейронах мозга будет значительно меняться при экспериментальных воздействиях и патологических состояниях. Так, при развитии мозга у мышей действие пропофола (анестетическое средство) приводит к уменьшению числа кальбиндин-иммунопозитивных клеток Пуркинье и уменьшению длины их дендритов в молекулярном слое [Xiao et al., 2017]. В дегенерирующих клетках Пуркинье с признаками апоптоза экспрессия казпазы-3 сопоставима с экспрессией кальбиндина [Erekat, 2017].

Таким образом, иммунореактивность кальбиндина в нейронах коры мозга и мозжечка у нормальных крыс значительно варьирует и может быть связана как с типом нейронов, так и с их функциональным состоянием [Зиматкин и др., 2019].

Содержание кальбиндина в развивающихся нейронах мозжечка крысы

Кальций-связывающие белки широко экспрессируются во многих отделах головного мозга, включая мозжечок. Они поддерживают кальциевый гомеостаз для нормального функционирования нейронов. В нейронах кальций регулирует нейротрансмиттерную передачу, синаптическую пластичность, лежащую в основе обучения, памяти, модулирует возбудимость и транскрипцию генов [Brini et al., 2014]. При избытке кальция оказывает цитотоксическое действие.

Считается, что кальций-связывающие белки важны для развития головного мозга, поскольку такие процессы, как деление клеток, рост отростков и миграция клеток, тесно связаны с внутриклеточной концентрацией кальция [Tsai et al., 2015. Ca²⁺]. Одним из таких кальций-связывающих белков является кальбиндин.

Известно, что в мозжечке крыс уже на 15-е сутки эмбрионального развития клетки Пуркинье становятся кальбиндин-положительными, а нейроны ядер мозжечка в процессе развития также временно экспрессируют кальбиндин [Enderlin et al., 1987]. Биохимически было установлено, что к моменту рождения у крыс экспрессия кальбиндина в клетках Пуркинье гетерогенна [Wassef et al., 1985. Transient]. В мозжечке взрослых крыс кальбиндин экспрессируется равномерно всеми клетками Пуркинье. Тенденция к снижению иммунореактивности кальбиндина в этих нейронах наблюдается при старении крыс [Amenta et al., 1994. Calbindin].

Показано, что в мозжечке кальбиндин участвует в поддержании долгосрочной депрессии, необходимой для функционирования клеток Пуркинье и, следовательно, нормальной двигательной координации и сенсорной интеграции [Barski et al., 2003]. В дегенерирующих клетках Пуркинье с признаками апоптоза экспрессия казпазы-3 сопоставима с экспрессией кальбиндина [Enderlin et al., 1987. Calbindin]. У экспериментальных животных и человека кальбиндин используют в качестве специфического маркера клеток Пуркинье коры мозжечка. При этом у человека низкая иммунореактивность выявлялась в развивающихся зернистых нейронах, а также интернейронах зернистого слоя во взрослом мозжечке [Flace et al., 2014. Calbindin]. Однако динамика иммунореактивности кальбиндина в КП и других нейронах мозжечка в постнатальном онтогенезе крысы детально в литературе не описана.

Исследование выполнено на 16 беспородных белых крысах. Установлено, что на вторые сутки после рождения у крыс на поверхности коры мозжечка находится тонкий наружный зернистый слой, где располагаются нейроны с низкой кальбиндин-иммунореактивностью. Клетки Пуркинье располагаются в несколько рядов. В узком ободке цитоплазмы КП определяется высокая кальбиндин-иммунореактивность, а в их ядрах – более низкая. Мигрирующие предшественники зернистых нейронов, а также

зернистые нейроны формирующегося внутреннего зернистого слоя имеют высокую иммунореактивность кальбиндина в их цитоплазме (рис. 5.3 А).

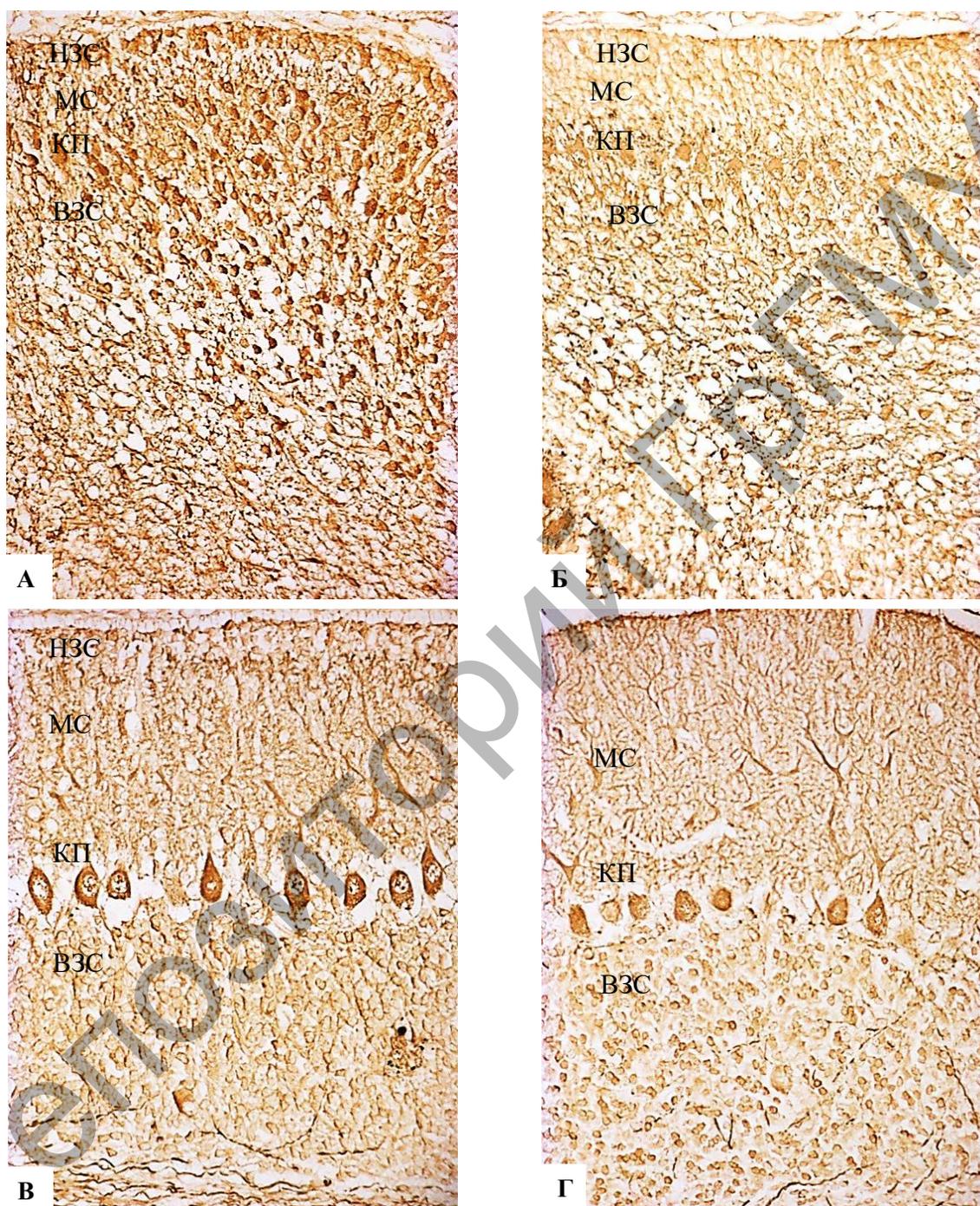


Рисунок 5.3 – Иммунореактивность кальбиндина в палеocerebellуме крыс на 2-е (А), 7-е (Б), 15-е (В) и 45-е (Г) сутки после рождения

НЗС – наружный зернистый слой; МС – молекулярный слой;

КП – клетки Пуркинью; ВЗС – внутренний зернистый слой

Иммуногистохимическая реакция на кальбиндин.

Цифровая микрофотография. Ув. 200

На 7-е сутки толщина наружного зернистого слоя увеличивается в два раза; его нейроны становятся иммунонегативными. В КП увеличиваются размеры перикарионов в апикальной части, где выявляется гомогенная равномерная иммунореактивность кальбиндина, а в их ядрах – в виде крупных 2-3 гранул с высокой иммунореактивностью. В этот срок также выявлено сильное иммунопозитивное окрашивание синапсов в виде единичных точек на растущих дендритах и перикарионах КП. В формирующемся зернистом слое и белом веществе по сравнению со вторыми сутками количество нервных клеток с высокой иммунореактивностью кальбиндина увеличивается (рис. 5.3 Б).

На 15-е сутки после рождения у крыс высокое кальбиндин-иммунопозитивное окрашивание выявляется в цитоплазме всех КП и отходящих от перикарионов проксимальных частях дендритов, вплоть до их более тонких концевых ветвлений, которые чётко определяются на фоне светлого нейропиля молекулярного слоя. На границе с иммунонегативным наружным зернистым слоем на терминальных ветвлениях дендритов КП наблюдались синапсы в виде точек с высокой кальбиндин-иммунореактивностью. Иммунореактивность нейронов внутреннего зернистого слоя снижается, а некоторые из них становятся иммунонегативными. На этом фоне становятся отчётливо видны кальбиндин-иммунореактивные волокна с варикозными расширениями, проходящие через зернистый слой. В белом веществе наблюдаются многочисленные интенсивно окрашенные пучки нервных волокон и единичные кальбиндин-иммунореактивные клетки (рис. 5.3 В).

На 45-е сутки после рождения у крыс высокая кальбиндин-иммунореактивность сохраняется во всех перикарионах, ядрах и дендритах КП. В молекулярном слое все нейроны остаются иммунонегативными. На дендритах КП в молекулярном слое размеры и иммунореактивность кальбиндин-позитивных синапсов уменьшается. В зернистом слое умеренная иммунореактивность сохраняется в некоторых нейронах, располагающихся группами (рис. 5.3 Г). Визуально не выявлено существенных отличий распределения кальбиндина между долями мозжечка разного филогенетического возраста (палео- и неocerebellумом).

Промежуточное ядро. На вторые сутки после рождения в цитоплазме нейронов промежуточного ядра выявляется низкая

иммунореактивность, а в ядрах она отсутствует. На седьмые сутки в перикарионах нейронов иммунореактивность остается низкой, к 15-м и 45-м суткам на их телах и в нейропиле определяются единичные мелкие кальбиндин-иммунореактивные точки (синапсы). При этом цитоплазма этих нейронов умеренно гомогенная иммунопозитивная, а ядра иммунонегативны (рис. 5.4 В, Г).

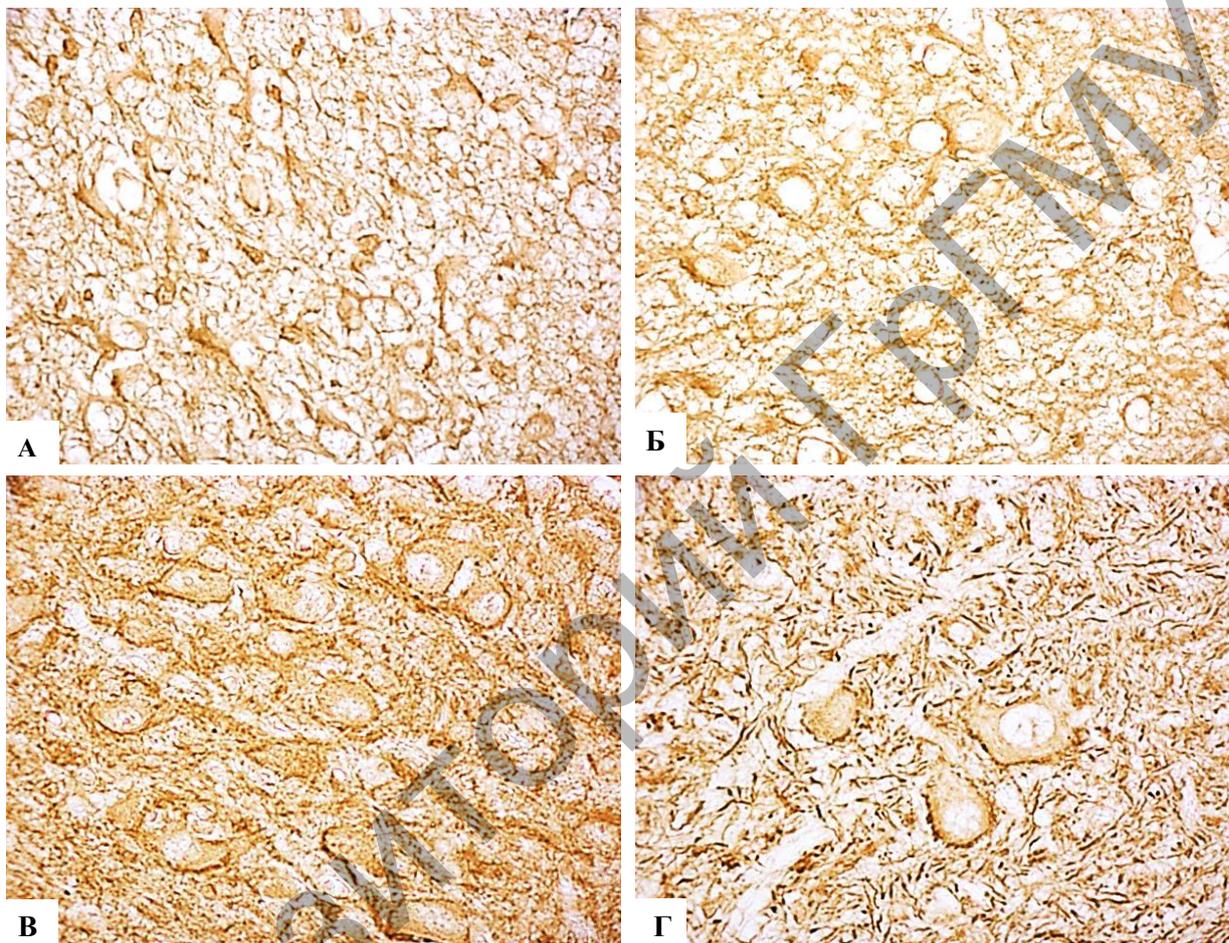


Рисунок 5.4 – Иммунореактивность кальбиндина в промежуточном ядре крыс на 2-е (А), 7-е (Б), 15-е (В) и 45-е (Г) сутки после рождения

Иммуногистохимическая реакция на кальбиндин.

Цифровая микрофотография. Ув. 400

Таким образом, в нашем исследовании подтверждено отсутствие иммунореактивности кальбиндина в нейронах молекулярного слоя у крыс в постнатальном онтогенезе. Полагают, что в этих нейронах основным кальций-связывающим белком является парвальбумин [Bastianelli, 2003]. Высокая иммунореактивность кальбиндина выявлялась в перикарионах КП уже на 2-е сутки после рождения, а к 15-м суткам она появлялась в дендритах

и не изменялась к 45-м суткам. При этом во все сроки исследования в КП она выявлялась не только в цитоплазме, но и в ядре.

Ранняя экспрессия кальбиндина обусловлена активным процессом дифференцировки нейронов и синаптогенезом. Сохранение экспрессии на протяжении всего постнатального онтогенеза обусловлено важностью регуляции внутриклеточного содержания кальция в КП для обеспечения их функциональной активности. Наличие иммунореактивности кальбиндина в ядре КП связано с тем, что этот кальций-связывающий белок участвует и в регуляции экспрессии генов.

На 2-е сутки после рождения у крыс выявляется иммунопозитивное окрашивание в виде точек на растущих дендритах и перикарионах КП, а также возникновение кальбиндин-иммунореактивных волокон, проходящих через зернистый слой, что связано с формированием афферентных волокон. Ранее кальбиндин выявляется в лазающих волокнах (ЛВ) [8]. ЛВ достигают коры развивающегося мозжечка и устанавливают синаптические контакты непосредственно с КП. Поэтому выявляющиеся в белом веществе и зернистом слое иммунореактивные волокна можно отнести к ЛВ или аксонам КП.

Со вторых суток постнатального онтогенеза у крыс в нейронах зернистого слоя наблюдалось постепенное уменьшение иммунореактивности кальбиндина, а к 45-м суткам эта иммунореактивность сохранялась лишь в некоторых нейронах, лежащих группами. По данным литературы, в зернистом слое развивающегося мозжечка крыс высокая экспрессия кальбиндина в зернистых нейронах отсутствует, поскольку основным кальций-связывающим белком в них является кальретинин [Scotti, 1995. Calbindin].

Иммунореактивность кальбиндина выявлялась в виде точек на перикарионах нейронов промежуточного ядра мозжечка уже на 7-е сутки и увеличивалась на 15 и 45-е сутки. Известно, что на нейронах ядер мозжечка устанавливают синапсы коллатерали афферентных волокон и аксоны КП у крыс в конце эмбрионального развития. Количество их прогрессивно увеличивается в постнатальном онтогенезе.

Таким образом, учитывая что экспрессия Calbindin-D28k выявляется на протяжении всего периода развития КП, а также его физиологическую роль в поддержание функции и гомеостаза кальция в них, Calbindin-D28k является ценным маркером для морфофункциональной характеристики КП в развивающемся и взрослом мозжечке крыс в норме и при патологии.

Иммуногистохимия кальбиндина в нейронах коры мозга и мозжечка при холестазае у крыс

В последние десятилетия в мире отмечен рост заболеваемости печени и желчевыводящих путей, связанный с возрастающей химизации продуктов питания и неблагоприятным действием других факторов внешней и внутренней среды. При этом нередко развивается состояние холестаза – нарушение оттока желчи из печени в двенадцатиперстную кишку, приводящее к нарушению деятельности всех органов и систем организма, включая ЦНС [Емельянчик, Зиматкин, 2011]. При этом у пациентов и животных с холестазом развиваются значительные нервно-психические и поведенческие изменения [Ганиткевич, 1959; Le Sueur-Maluf et al., 2015. Behavioral].

В предыдущих исследованиях мы обнаружили тяжёлые гистологические, гистохимические и ультраструктурные нарушения в нейронах коры головного мозга и мозжечка крыс при экспериментальном подпечёночном холестазае, приводящие к повреждению и гибели значительной их части [Емельянчик, Зиматкин, 2011, 2018]. Представляет большой интерес изучение при этом молекулярных нейромаркёров, которые могут быть связаны с найденными морфофункциональными нарушениями. Одним из них может выступать кальций-связывающих белок кальбиндин. Как известно Ca^{++} – универсальный внутриклеточный посредник многих нейрогуморальных сигналов, регулятор разнообразных процессов в нейронах, включая нейротрансмиссию. При экстремальных состояниях для клетки (стрессы) внутриклеточная концентрация этого иона существенно возрастает, что может быть причиной чрезмерного возбуждения и гибели нейронов. При этом кальбиндин-D28k может связывать избыток кальция, являясь важным компонентом системы внутриклеточного гомеостаза кальция [Piccolini et al., 2013. Platinum]. Кальбиндин часто используют в качестве специфического маркёра идентификации клеток Пуркинье коры мозжечка [Karelina, 2016. Downregulation]. Гиперэкспрессия белка кальбиндина-D28k в клетках Пуркинье коры мозжечка может играть роль в нейропротекции [Pascual, 2014. Single].

Поскольку данные литературы по изучению содержания выше-названного белка в нейронах мозга при холестазах отсутствуют, представилось весьма интересным изучить иммунореактивность кальбиндина-D28k в нейронах коры головного мозга и мозжечка при моделировании подпечёночного холестаза у крыс.

Исследование проведено на 36 беспородных белых крысах-самцах массой 200-250 г. Опытным животным под общим эфирным наркозом перевязывали ОЖП на 3-5 мм ниже слияния долевых протоков двумя лигатурами с последующим пересечением между ними. Контрольной группе проводили ложную операцию, то есть лапаротомию, без перевязки ОЖП. Животных исследовали через 2, 5, 10, 20, 45 и 90 суток после операции, выводя из эксперимента декапитацией в утренние часы. Для получения сопоставимых результатов кусочки коры мозга от всех животных обрабатывали параллельно и в одинаковых условиях. Иммуногистохимический метод исследования кальбиндина описан в Приложении 1.

Во втором слое *лобной и теменной коры* головного мозга большинство нейронов умеренно иммунопозитивны по кальбиндину. Продукты иммуногистохимической реакции в виде мелких тёмно-коричневых гранул распределены по всему перикариону и в начальных участках отростков, преимущественно дендритов (рис. 5.4 А). В третьем, пятом и шестом слоях коры видны единичные нейроны с высокой иммунореактивностью кальбиндина (по количеству они составляют менее 1% от общего числа нейронов, выявляемых по Нисслю). Встречаются также нейроны с умеренной и низкой иммунореактивностью, но большинство нейронов в этих слоях иммунонегативны. Многие нервные волокна окрашиваются прерывисто, «чёткообразно» (рис. 5.4 А).

В *коре головного мозга* на вторые сутки после перевязки ОЖП в некоторых препаратах выявляются группы иммунопозитивных клеток в виде колонок, идущих от второго до шестого слоя коры. Подобное явление в другие сроки эксперимента не наблюдалось. При этом происходит увеличение количества нейронов с высокой иммунореактивностью в третьем слое в 1,2 раза, в пятом – в 1,2 раза, в шестом – в 1,4 раза. Однако средняя иммунореактивность кальбиндина в цитоплазме перикарионов нейронов второго слоя была снижена на 6,0%, в пятом – на 6,8% (табл. 5.1, 5.2).

Таблица 5.1 – Количество кальбиндин-позитивных нейронов во фронтальной и теменной коре головного мозга контрольных крыс в разные сроки после перевязки ОЖП (шт. в 1 мм²) (Me±IQR)

Слой коры	Кора головного мозга			
	фронтальная		теменная	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
2 суток				
Третий	6,50±0,50	7,70±0,90*↑	7,50±0,60	8,50±0,40*↑
Пятый	6,10±0,0	7,20±0,90*↑	7,10±0,50	8,60±0,20*↑
Шестой	3,10±0,30	4,40±1,10*↑	3,40±0,30	3,40±0,50*↑
5 суток				
Третий	6,40±0,10	9,0±1,20*↑	7,40±0,70	9,90±0,60*↑
Пятый	6,10±0,70	7,50±0,60*↑	7,0±0,80	8,70±0,30*↑
Шестой	3,20±0,40	3,80±0,50*↑	3,30±0,20	4,0±0,20*↑
10 суток				
Третий	6,30±0,20	8,90±1,40*↑	7,60±0,10	10,50±0,60*↑
Пятый	6,50±0,50	10,60±0,90*↑	6,90±0,30	11,30±0,50*↑
Шестой	3,20±0,70	4,90±0,20*↑	3,3±0,30	5,70±0,30*↑
20 суток				
Третий	6,10±0,20	10,20±1,10*↑	7,60±0,80	12,10±0,50*↑
Пятый	6,20±0,60	10,60±0,90*↑	7,20±0,50	12,70±0,30*↑
Шестой	3,10±0,40	6,10±1,20*↑	3,40±0,40	6,30±0,30*↑
45 суток				
Третий	6,30±0,30	6,30±0,20	7,40±0,70	7,20±0,70
Пятый	6,20±0,40	6,30±0,40	7,20±0,10	7,10±0,50
Шестой	3,10±0,40	3,20±0,40	3,10±0,20	3,0±0,40
90 суток				
Третий	6,10±0,30	6,10±0,50	7,10±0,70	7,10±0,20
Пятый	6,30±0,40	6,0±0,90	7,0±0,10	7,20±0,50
Шестой	3,10±0,40	3,20±0,20	3,10±0,20	3,10±0,60

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ↑ – статистически значимое увеличение изучаемого параметра.

Таблица 5.2 – Иммунореактивность кальбиндина в нейронах слоёв фронтальной коры головного мозга контрольных крыс в разные сроки холестаза (ед. $\times 10^3$) (Me \pm IQR)

Слой коры	Кора головного мозга			
	фронтальная		теменная	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
2 суток				
Второй	204,35 \pm 32,28	192,11 \pm 16,84*** \downarrow	227,42 \pm 17,89	218,40 \pm 18,90*** \downarrow
Третий	308,97 \pm 21,72	302,84 \pm 45,94	335,53 \pm 18,27	329,65 \pm 50,62
Пятый	348,73 \pm 26,20	324,96 \pm 53,63** \downarrow	380,56 \pm 20,88	355,15 \pm 48,24*** \downarrow
5 суток				
Второй	198,39 \pm 24,49	189,85 \pm 49,62	218,17 \pm 22,53	220,41 \pm 33,62
Третий	292,48 \pm 48,65	309,20 \pm 39,12** \uparrow	322,10 \pm 37,06	355,65 \pm 33,35*** \uparrow
Пятый	362,64 \pm 45,46	360,14 \pm 32,84	383,48 \pm 29,28	400,26 \pm 30,84*** \uparrow
10 суток				
Второй	205,02 \pm 32,19	226,48 \pm 57,97*** \uparrow	228,12 \pm 19,72	229,95 \pm 62,59
Третий	303,40 \pm 33,62	336,48 \pm 41,0*** \uparrow	334,11 \pm 28,54	377,32 \pm 63,33*** \uparrow
Пятый	363,20 \pm 34,62	389,55 \pm 68,83** \uparrow	388,46 \pm 20,33	417,0 \pm 69,87* \uparrow
20 суток				
Второй	198,04 \pm 41,73	249,70 \pm 38,55*** \uparrow	222,78 \pm 26,14	240,15 \pm 61,13*** \uparrow
Третий	311,26 \pm 36,65	364,62 \pm 55,56*** \uparrow	336,0 \pm 24,73	387,59 \pm 55,52*** \uparrow
Пятый	354,51 \pm 41,84	381,98 \pm 65,72** \uparrow	376,68 \pm 24,71	430,48 \pm 62,25*** \uparrow
45 суток				
Второй	199,56 \pm 40,22	202,23 \pm 26,67	225,66 \pm 20,53	226,48 \pm 15,08
Третий	305,95 \pm 27,92	293,85 \pm 26,25	334,16 \pm 17,92	321,45 \pm 39,39
Пятый	350,19 \pm 23,52	354,46 \pm 28,06	379,40 \pm 21,98	394,13 \pm 31,29** \uparrow
90 суток				
Второй	202,32 \pm 28,20	203,30 \pm 19,52	230,14 \pm 15,16	228,29 \pm 18,62
Третий	312,30 \pm 24,50	305,21 \pm 34,50	342,09 \pm 15,49	333,15 \pm 26,75
Пятый	358,69 \pm 37,77	351,27 \pm 37,48	385,50 \pm 16,69	382,59 \pm 23,42

Примечание – * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем; \downarrow – статистически значимое снижение изучаемого параметра; \uparrow – статистически значимое увеличение изучаемого параметра.

Пятисуточный холестаза приводит к увеличению количества высоко иммунопозитивных нейронов в третьем слое в 1,4 раза, в пятом – в 1,2 раза, а в шестом – в 1,2 раза. При этом отмечено увеличение экспрессии данного белка в нейронах третьего слоя коры (на 5,7%) (табл. 5.1, 5.2).

Десятисуточный холестаза вызывает увеличение количества иммунопозитивных клеток в третьем слое в 1,4 раза, в пятом – в 1,6 раза, а в шестом – в 1,5 раза. Иммунореактивность кальбиндина в нейронах второго слоя возрастает на 10,5%, третьего – на 10,9%, пятого – на 7,3%. При этом если процентное соотношение нейронов с сильной, средней и слабой экспрессией в третьем слое в контроле примерно одинаковое, то в опыте нейроны с сильной иммунореактивностью составляют 42,4%, средней – 28,2%, слабой – 29,4%. В пятом слое картина примерно идентичная: нейроны с сильной иммунореактивностью составляют 45,0%, средней – 28,8%, слабой – 26,2% (рис. 5.5, табл. 5.1, 5.2).

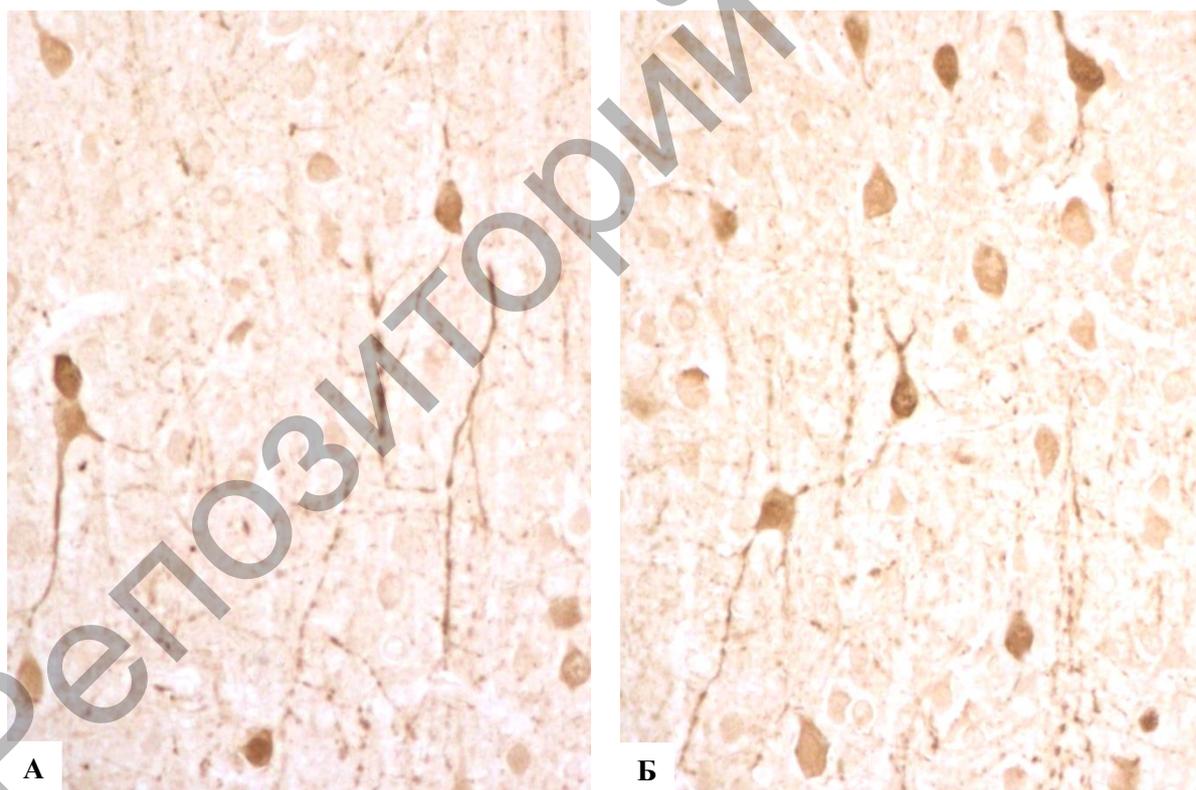


Рисунок 5.5 – Экспрессия кальбиндина в нейронах третьего-пятого слоёв фронтальной коры мозга крыс в контроле – А (10 суток после ложной операции), увеличение количества иммунопозитивных нейронов в опыте – Б (10 суток холестаза)

Иммуногистохимическая реакция на кальбиндин-D28K.

Цифровая микрофотография. Ув. 200

Двадцатисуточный холестаз приводит к увеличению количества иммунопозитивных нейронов в третьем слое в 1,7 раза, в пятом – в 1,7 раза, в шестом – в 2,0 раза. При этом иммунореактивность кальбиндина во втором слое увеличена на 26,1%, в третьем – на 17,1%, в пятом – на 7,7%. Если процентное соотношение нейронов третьего слоя с высокой, средней и малой иммунореактивностью в контроле примерно равное, то в опыте происходит увеличение нейронов с сильной иммунореактивностью – до 60,2%, средней – 25,8%, слабой – 14,0%. В пятом слое картина примерно идентична: нейроны с сильной активностью составляют 60,8%, средней – 22,2%, слабой – 17,0% (табл. 5.1, 5.2).

Через 45 и 90 суток после перевязки ОЖП во всех слоях фронтальной коры в опыте и контроле разницы в количестве кальбиндин-иммунореактивных нейронов и интенсивности их окрашивания не достоверны (табл. 5.1, 5.2).

В теменной коре мозга крыс через 2 суток после перевязки ОЖП происходит увеличение количества иммунопозитивных нейронов в третьем слое в 1,1 раза, в пятом – в 1,2 раза. При этом во втором слое выявлено снижение экспрессии кальбиндина-D28k на 4,0%, в пятом – на 6,7%. Через 5 суток после перевязки ОЖП количество иммунопозитивных нейронов в третьем слое теменной коры увеличивается в 1,3 раза, в пятом – в 1,2 раза, в шестом – 1,2 раза. При этом в нейронах третьего слоя иммунореактивность кальбиндина увеличена на 10,4%, пятого – на 4,4% (табл. 5.1, 5.2).

Через 10 суток после перевязки ОЖП происходит увеличение количества иммунопозитивных нейронов в третьем слое в 1,4 раза, в пятом – в 1,6 раза, в шестом – в 1,7 раза. При этом в третьем слое происходит увеличению иммунореактивности данного белка на 12,9%, в пятом – на 7,3%. Процентное соотношение в третьем слое нейронов с сильной, средней и слабой экспрессией в контроле примерно равное, а в опыте с сильной иммунореактивностью – до 44,4%, средней – 30,2%, слабой – 25,4%. В пятом слое аналогичные изменения: с сильной активностью – 47,0%, средней – 30,8%, слабой – 22,2% (табл. 5.1, 5.2).

Через 20 суток после перевязки ОЖП происходит увеличение количества иммунопозитивных нейронов в третьем слое в 1,6 раза, в пятом – в 1,8 раза, в шестом – в 1,9 раза. При этом во втором слое отмечено увеличение иммунореактивности кальбиндина

на 7,8% (рис. 5.6), в третьем – на 15,4%, в пятом – на 14,3%. Если в контроле процентное соотношение нейронов в третьем и пятом слое с сильной, средней и слабой иммунореактивностью примерно равное, то в опыте происходит увеличение нейронов с сильной иммунореактивностью до 62,2%, средней – 25,8%, слабой – 12,0%. В пятом слое картина примерно идентичная: с сильной активностью – 65,8%, средней – 20,2%, слабой – 14,0% (табл. 5.1, 5.2).

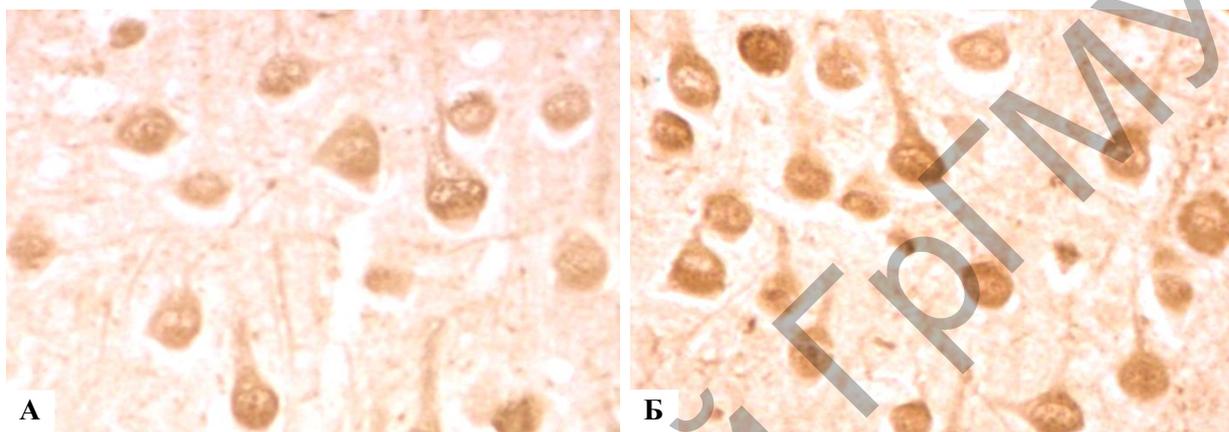


Рисунок 5.6 – Иммунореактивность кальбиндина в нейронах второго слоя теменной коры мозга крыс в контроле – А (20 суток после ложной операции), увеличение её в опыте – Б (20 суток холестаза)
Иммуногистохимическая реакция на кальбиндин.
Цифровая микрофотография. Ув. 400

Спустя 45 и 90 суток после перевязки ОЖП количество кальбиндин-иммунопозитивных нейронов в контроле и опыте не различается, а иммунореактивность кальбиндина достоверно повышена только на 45 сутки в нейронах пятого слоя – на 3,9% (табл. 5.1, 5.2).

В коре мозжечка результаты иммуногистохимического исследования кальбиндина в коре мозжечка в контроле показали высокое содержание этого белка в перикарионах КП и их дендритах, интенсивно ветвящихся в молекулярном слое (рис. 5.7 А). В телах КП определены мелкие гранулы коричневого цвета, относительно равномерно распределенные по цитоплазме. Внутри ядер видны более крупные гранулы, напоминающие глыбки хроматина. В зернистом слое коры мозжечка выявляются умеренно окрашенные клетки зёрна и моховидные волокна.

Через двое суток после перевязки ОЖП в перикарионах КП экспрессии белка кальбиндина снижается на 16,7%, а через 5 суток она не отличается от контрольных значений (табл. 5.3).

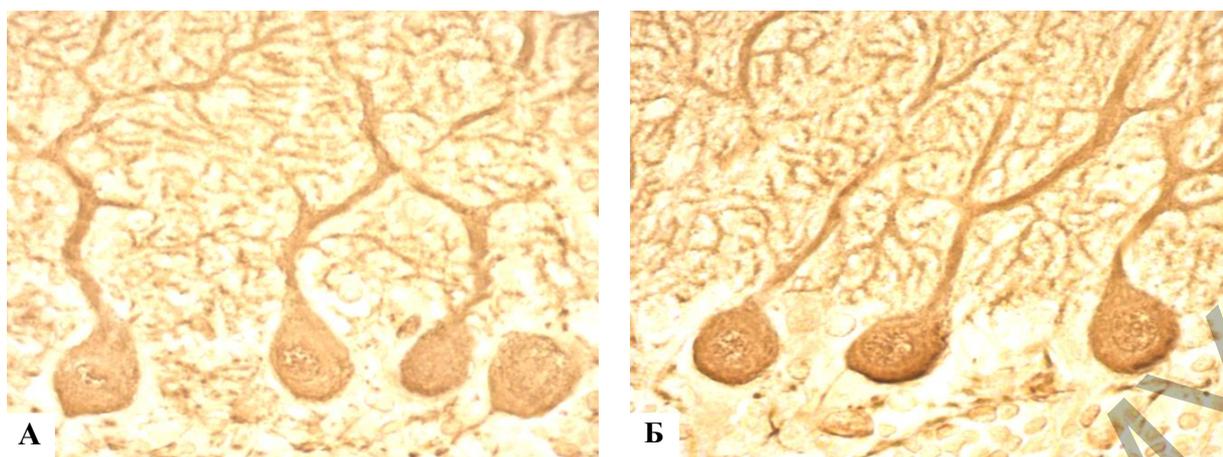


Рисунок 5.7 – Экспрессия белка кальбиндина в коре мозжечка крыс в контроле – А (20 суток после ложной операции), её увеличение в опыте – Б (20 суток холестаза)

Видны иммунопозитивные перикарионы клеток Пуркинью. Иммуногистохимическая реакция на белок кальбиндин. Цифровая микрофотография. Ув. 400

Таблица 5.3 – Иммунореактивность кальбиндина в перикарионах клеток Пуркинью мозжечка контрольных крыс в разные сроки после перевязки ОЖП (ед. $\times 10^3$) (Me \pm IQR)

Сутки	Контроль (n=36)	Опыт (n=34)
2-е	307,47 \pm 39,05	256,0 \pm 46,54*** \downarrow
5-е	298,47 \pm 28,73	292,69 \pm 39,28
10-е	295,05 \pm 39,35	376,0 \pm 82,38*** \uparrow
20-е	299,72 \pm 42,32	362,09 \pm 22,78*** \uparrow
45-е	298,88 \pm 39,45	338,12 \pm 21,86*** \uparrow
90-е	290,72 \pm 43,47	326,24 \pm 9,47*** \uparrow

Примечание – *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем; \downarrow – статистически значимое снижение изучаемого параметра; \uparrow – статистически значимое увеличение изучаемого параметра.

Через 10 суток после перевязки ОЖП в перикарионах КП экспрессии кальбиндина увеличивается на 27,4%, а через 20 дней – на 20,8% (рис. 5.7, табл. 5.3).

Через 45 и 90 суток после перевязки ОЖП иммунореактивность кальбиндина в КП остаётся повышенной на 12,2% и 8,2% соответственно (табл. 5.3).

В наших предыдущих исследованиях установлено, что после перевязки ОЖП у крыс постепенно развивается холестаза с максимумом его проявлений на 10-20 сутки опыта, что сопровождается глубокими структурными и гистохимическими нарушениями в нейронах коры мозга и мозжечка и гибелью 60% животных [Емельянчик, Зиматкин, 2011]. Затем на 45-90 сутки опыта у выживших животных и в сохранившихся нейронах все выявленные нарушения постепенно нормализуются. Это объясняется разрастанием обходных желчевыводящих путей, восстановлением оттока желчи в двенадцатиперстную кишку и устранением холестаза [Емельянчик, Зиматкин, 2018].

В условиях нарастающего холестаза количество кальбиндин-иммунореактивных нейронов во фронтальной и теменной коре мозга постепенно увеличивается: на 10-20% на вторые сутки после перевязки ОЖП и на 70-100% на 20-е сутки. Интересно, что средняя иммунореактивность кальбиндина в нейронах в динамике холестаза меняется волнообразно: сначала, через двое суток после перевязки ОЖП, в нейронах коры мозга и мозжечка снижается, затем постепенно возрастает с максимумом на 10-20 сутки, позднее, через 45 и 90 суток, частично нормализуется параллельно со всеми другими структурными и гистохимическими параметрами.

Какую же роль играет кальций-связывающий и депонирующий белок кальбиндин в этих реактивных и адаптационных изменениях корковых нейронов? При экстремальных состояниях для клетки внутриклеточная концентрация этого иона существенно возрастает, что может быть причиной чрезмерного возбуждения и гибели нейронов. Безусловно, холестаза является таким экстремальным состоянием и мощным метаболическим стрессом для всего организма и нейронов мозга. При этом триггером его, вероятно, становится резкое повышение в крови билирубина (с максимумом на 5-е сутки после перевязки ОЖП) и токсических жёлчных кислот [Емельянчик, Зиматкин, 2021]. Пока не показано, но весьма возможно и повышение при холестаза содержания кальция в нейронах мозга. Вероятно, это и сопровождается адаптационным повышением экспрессии кальбиндина в нейронах с максимумом на 10-20-е сутки, в период наиболее тяжёлых структурных и гистохимических нарушений в корковых нейронах мозга.

Известно, что кальбиндин может связывать избыток кальция, являясь важным компонентом системы внутриклеточного гомеостаза этого иона [Piccolini et al., 2013. Platinum], в том числе и в условиях эксайтотоксичности, вызванной возбуждающим медиатором глутаматом [Slemmer, 2005]. Известно, что гиперэкспрессия белка кальбиндина-D28k в КП коры мозжечка может играть роль в нейропротекции [Pascual, 14. Single]. Поэтому вполне возможно, что кальбиндин таким образом предохраняет нейроны мозга от гибели в условиях холестаза.

Можно предполагать, что в коре мозга и мозжечка крыс при холестазе выживают именно нейроны с повышенной экспрессией кальбиндина. Интересно, что в КП мозжечка повышенная иммунореактивность кальбиндина сохраняется даже в отдалённые сроки после устранения холестаза, когда большинство структурных и метаболических параметров полностью нормализуется. Возможно, эта долгосрочная гиперэкспрессия кальбиндина обеспечит повышенную выживаемость нейронов в условиях вероятного повторного холестаза.

Примечательно, что нейроны с высокой иммунореактивностью кальбиндина очень напоминают по количеству, размерам и форме гиперхромные нейроны коры мозга и мозжечка, количество которых при холестазе также значительно возрастает [Емельянчик, Зиматкин, 2011, 2018]. В этих нейронах увеличено количество свободных рибосом, обеспечивающих синтез белка для собственных нужд клетки, что способствует адаптации к неблагоприятным условиям и выживанию нейронов [Зиматкин, Бонь, 2017]. Одним из интенсивно синтезируемых в нейронах белков и может быть кальбиндин.

Таким образом, в условиях нарастания холестаза, вызванного перевязкой ОЖП у крыс, иммунореактивность кальбиндина в нейронах коры мозга и мозжечка постепенно возрастает с максимумом на 10-20-е сутки опыта. При устранении холестаза в результате разрастания обходных желчевыводящих протоков иммунореактивность кальбиндина в нейронах коры мозга нормализуется, но остаётся несколько повышенной в КП мозжечка. Более выраженные изменения иммунореактивности кальбиндина при холестазе отмечены в КП мозжечка и внутренних пирамидных нейронах коры головного мозга. Выявленные изменения иммунореактивности кальбиндина-D28k свидетельствуют о важной роли этого кальций-связывающего белка в процессах адаптации корковых нейронов при холестазе.

Глава 6

ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ АУТОФАГИИ

Аутофагия – процесс утилизации повреждённых, «отслуживших свой срок» и ненужных (избыточных) структур клетки (мембран, органелл, белковых агрегатов), необходимый для поддержания клеточного гомеостаза. Аутофагия обеспечивается лизосомами и осуществляется посредством катаболических процессов, с известными сложными регуляторными механизмами (Luzio et al., 2007; Grumati, 2018).

Первое описание явления аутофагии сделано Кристианом де Дювом [Duve & Wattiaux, 1966]. В настоящее время её изучению придаётся большое значение и Нобелевская премия 2016 года по физиологии и медицине присуждена японскому клеточному биологу Осуми Ёсинори за открытие механизмов аутофагии. Выделяют три её вида: макроаутофагия (или просто аутофагия, когда участки цитоплазмы с подлежащими элиминации органеллами окружаются мембранами и образуются аутофагосомы), аутофагия осуществляемая шаперонами (направленный транспорт частично денатурированных белков внутрь лизосом) и микроаутофагия (макромолекулы и обломки мембран захватываются лизосомами). Выделяют также аутофагический тип клеточной гибели как альтернативу апоптозу [Liu, 2015]. Аутофагия усиливается при стрессе, инфекционных и онкологических болезнях. Однако при нейродегенеративных заболеваниях (болезнь Паркинсона, Альцгеймера, Хантингтона и др.) элиминация белковых агрегатов в нейронах может нарушаться [Kumar, 2018. Autophagy].

Основной компонент запуска аутофагии – комплекс фосфатидилинозитола III (PI3K-III), который генерирует сигнальный фосфатидилфосфинозитол-3-фосфат (PtdIns3P). Каталитической единицей этого комплекса выступает липидкиназа VPS34, которая

связывается с мембранным фактором VPS15 и с многовалентным белком-адаптером BECLIN 1, который способствует созреванию аутофагосом. Поскольку большинство регуляторных процессов проходят именно через этот белок, его роль как белка-регулятора аутофагии велика [Vieira et al., 2001. Distinct]. В регуляции этого комплекса выступают дополнительные регуляторные белки, такие как ATG14L, AMBRA1 и UVRAG. При этом эндоплазматическая сеть и митохондрии, необходимы как источники мембран и энергии для аутофагосом [Hamasaki et al., 2013. Autophagosomes].

Белок AMBRA1 представляет собой молекулу активации BECLIN-1-зависимой аутофагии и служит стабилизатором комплекса VPS34-BECLIN 1, тем самым способствуя образованию аутофагосом. AMBRA 1 активирует аутофагию у млекопитающих через моторный белок динеин [Fimia et al., 2007. Ambra1; Di Bartolomeo et al., 2010. The dynamic]. Кроме того, этот белок связывает аутофагию и клеточную смерть [Fimia et al., 2013. Ambra1].

Аутофагия естественно усиливается при напряжённой работе нейронов, при неблагоприятных воздействиях и патологических состояниях, когда количество повреждённых мембран и органелл возрастает. Для изучения регуляции этого процесса в нейронах оценивают в них активатор аутофагии AMBRA1. Мы показали возрастание его содержания в нейронах мозга при холестазах [Емельянчик, 2019].

Известно, что холестаз – это застой желчи в желчевыводящих путях в результате нарушения её оттока в двенадцатиперстную кишку. Холестаз является частым осложнением желчнокаменной болезни и другой патологии гепатобилиарной системы. В предыдущих исследованиях мы обнаружили глубокие и закономерные гистологические, гистохимические и ультраструктурные изменения в нейронах головного мозга крыс при экспериментальном холестазах, вызванном перевязкой/перерезкой ОЖП [Емельянчик, Зиматкин, 2011; 2016]. При этом наиболее повреждаемыми среди изученных типов нейронов оказались клетки Пуркинье мозжечка. Поэтому экспериментальный холестаз и клетки Пуркинье мозжечка, а в них AMBRA1 и лизосомы были выбраны нами в качестве модели и объекта изучения.

Для оценки роли AMBRA1 в развитии аутофагии в нейронах мозга при холестазах мы использовали комплекс методов: гистохимия, электронная микроскопия, иммуногистохимия.

Эксперимент выполнен на 72 беспородных белых крысах-самцах массой 200 ± 25 г. Крысам контрольной группы проводили лапаротомию без перевязки желчного протока. Опытным животным производили перевязку ОЖП на 3-5 мм ниже слияния долевых протоков двумя лигатурами с последующим пересечением между ними, как описано ранее [Емельянчик, Зиматкин, 2018]. Через 2, 5, 10, 20, 45 и 90 суток в утренние часы (для синхронизации по времени) животных выводили из эксперимента декапитацией. Быстро извлекали мозжечок, для получения сопоставимых результатов кусочки мозжечка опытных и контрольных животных обрабатывали параллельно и в одинаковых условиях.

Для *гистохимического* исследования кусочки мозжечка замораживали и хранили в жидком азоте, кусочки опытных и контрольных животных монтировали в один блок, криостатные срезы после фиксации в 10% нейтральном формалине обрабатывали для выявления активности кислой фосфатазы (КФ) – маркёрного фермента лизосом (КФ, фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты, КФ 3.1.3.2) по методу G. Gomori [Пирс, 1962] и заключали в глицерин-желатину.

Для *электронно-микроскопического исследования* кусочки, взятые из коры мозжечка контрольных и опытных животных, обрабатывали общепринятым методом и заключали в аралдит. Срезы готовили с помощью ультратома MT-7000 (США). Изучение и микрофотографирование препаратов проводили с помощью электронного микроскопа JEM 100CX II (JEOL, Япония) в Центре электронной и световой микроскопии Института физиологии НАН Беларуси. Морфометрию комплекса Гольджи и лизосом проводили по методу Морозова [Морозов, 1974].

Методика *иммуногистохимического* исследования AMBRA1 в нейронах мозга описана в Приложении.

Полученные результаты обрабатывали методом непараметрической статистики с помощью лицензионной компьютерной программы Statistica 6.0 для Windows.

Результаты гистохимического исследования показали, что активность маркёрного фермента лизосом КФ в клетках Пуркинье мозжечка контрольных животных умеренная и определяется по отложению в цитоплазме нейронов тёмно-коричневого зернистого осадка продукта гистохимической реакции сульфида свинца,

который выявляет места ферментативной активности (рис. 6.1 А). Через двое суток холестаза активность КФ в клетках Пуркинье не меняется, на пятые сутки происходит увеличение активности КФ в клетках Пуркинье на 17,1%, на 10-е сутки – на 26,4% (рис. 6.1 Б), на 20-е сутки – на 12,7%. Спустя сорок пять и девяносто суток после перевязки ОЖП активность КФ в клетках Пуркинье нормализуется (табл. 6.1).

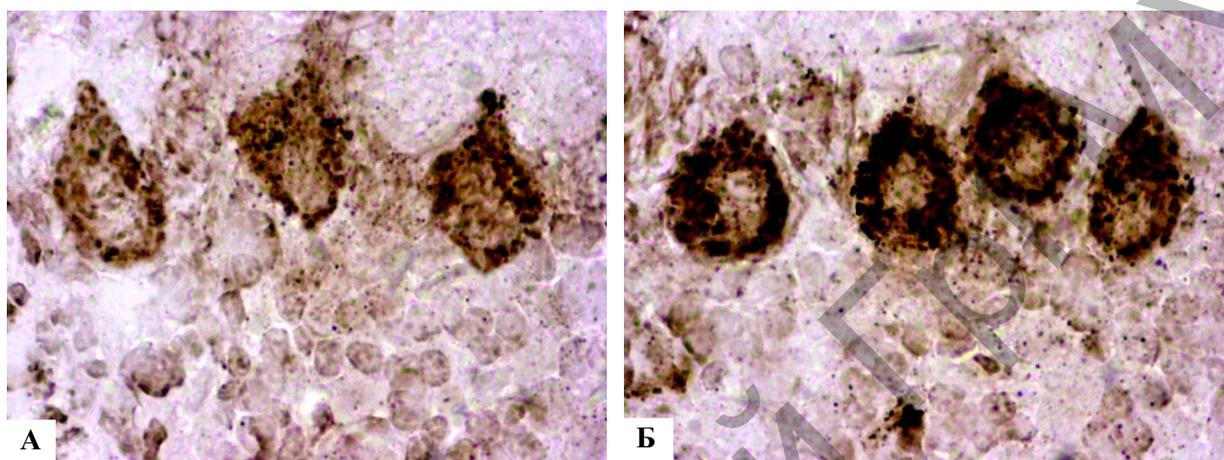


Рисунок 6.1 – Активность кислой фосфатазы в клетках Пуркинье мозжечка крыс – А (контроль – 10 суток после ложной операции), увеличение её в опыте – Б (10 суток холестаза)

Окраска по методу Гомори.
Цифровая микрофотография. Ув. 400

Таблица 6.1 – Активность кислой фосфатазы в перикарионах клеток Пуркинье мозжечка крыс в разные сроки после перевязи ОЖП (ед. $\times 10^3$) (Me \pm IQR)

Сутки	Контроль (n=36)	Опыт (n=36)	P
2-е	361,28 \pm 36,83	370,97 \pm 43,54	0,277
5-е	339,89 \pm 13,20	398,13 \pm 69,99* \uparrow	0,010
10-е	354,58 \pm 11,90	448,05 \pm 41,05** \uparrow	0,002
20-е	372,91 \pm 55,03	437,34 \pm 44,06* \uparrow	0,021
45-е	368,49 \pm 6,29	421,50 \pm 72,31	0,110
90-е	360,21 \pm 34,01	368,16 \pm 18,82	0,705

Примечание – * – p<0,05; ** – p<0,01 по сравнению с контролем.

Результаты электронной микроскопии показали, что на 10-е сутки холестаза практически во всех клетках Пуркинью наблюдаются деструктивные (дегенеративные) изменения: от мелких, незначительных до тяжелых – сморщивание нейронов. Отмечается набухание митохондрий с частичным или полным разрушением крист, уменьшение площади поверхности гладкой эндоплазматической сети и гипертрофия комплекса Гольджи (со значительным увеличением площади его мембран и расширением цистерн). Более чем в 2 раза увеличивается количество и более чем в 3 раза увеличивается площадь сечения лизосом ($p < 0,05$). При этом в цитоплазме нейронов встречаются крупные фаголизосомы и мультивезикулярные тельца (рис. 6.2, табл. 6.2).

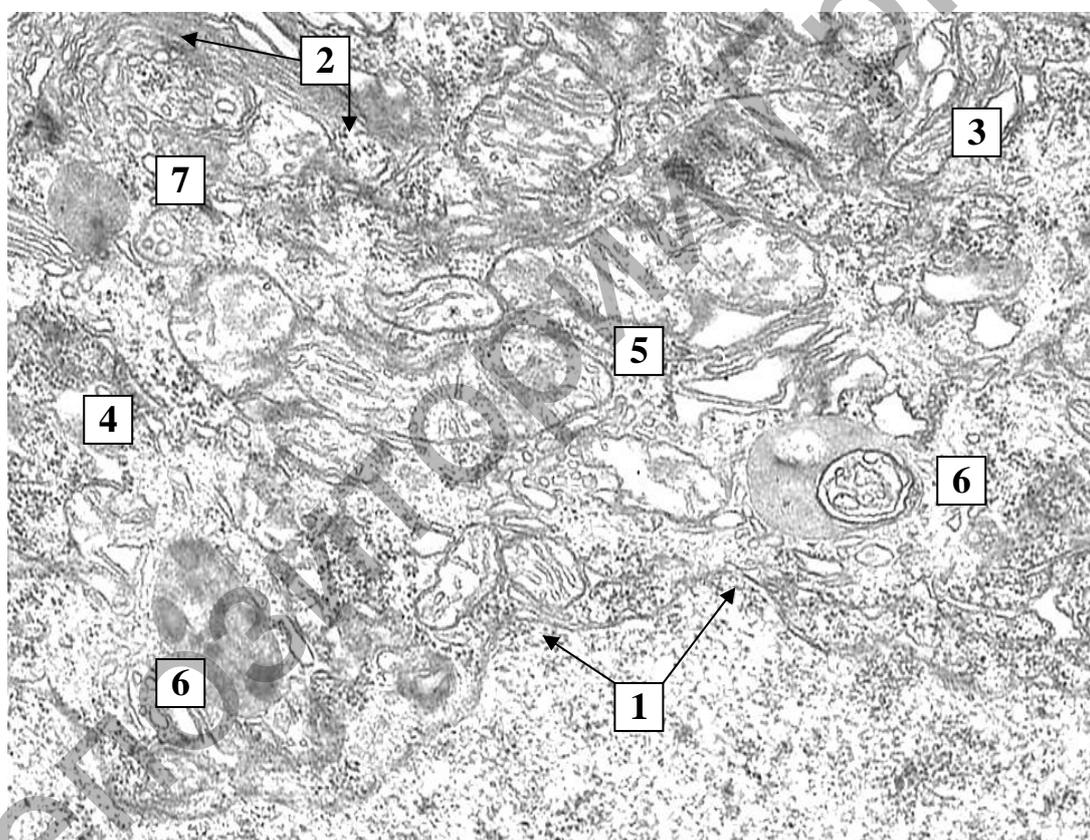


Рисунок 6.2 – Участок клетки Пуркинью коры мозжечка крысы после 10 суток холестаза:

- 1 – складки кариолеммы; 2 – гипертрофированный комплекс Гольджи;
- 3 – расширенная гранулярная эндоплазматическая сеть;
- 4 – свободные рибосомы; 5 – митохондрии с разрушенными кристами;
- 6 – аутофаголизосомы; 7 – мультивезикулярные тельца

Электронная микрофотография. Ув. 12000

Таблица 6.2 – Показатели ультрамикроскопической морфометрии клеток Пуркинье мозжечка крыс после десяти суток холестаза (Me±IQR)

Показатель		Контроль (n=2)	Опыт (n=3)	Р	
Клетки Пурки- нье	Комп- лекс	Площадь поверхности мембран, в 1 мкм ²	1,432±0,330	3,226±0,98**	0,005
	Голь- джи				
	Лизо- сомы	Штук, в 1 мкм ²	4,50±1,50	9,0±0,0**	0,005
		Площадь 1 органеллы, в 1 мкм ²	1,413±0,30	5,411±1,32**	0,005

Примечание – * – p<0,05; ** – p<0,01 по сравнению с контролем.

Иммуногистохимия. В перикарионах клеток Пуркинье мозжечка контрольных крыс выявляются мелкие, гомогенно расположенные гранулы коричневого цвета – продукт иммуногистохимической реакции на выявление белка AMBRA1. При этом ядра нейронов иммунонегативны (рис. 6.3 А). При холестазах отмечено появление клеток Пуркинье с очень высокой иммунореактивностью AMBRA1 (рис. 6.3 Б).

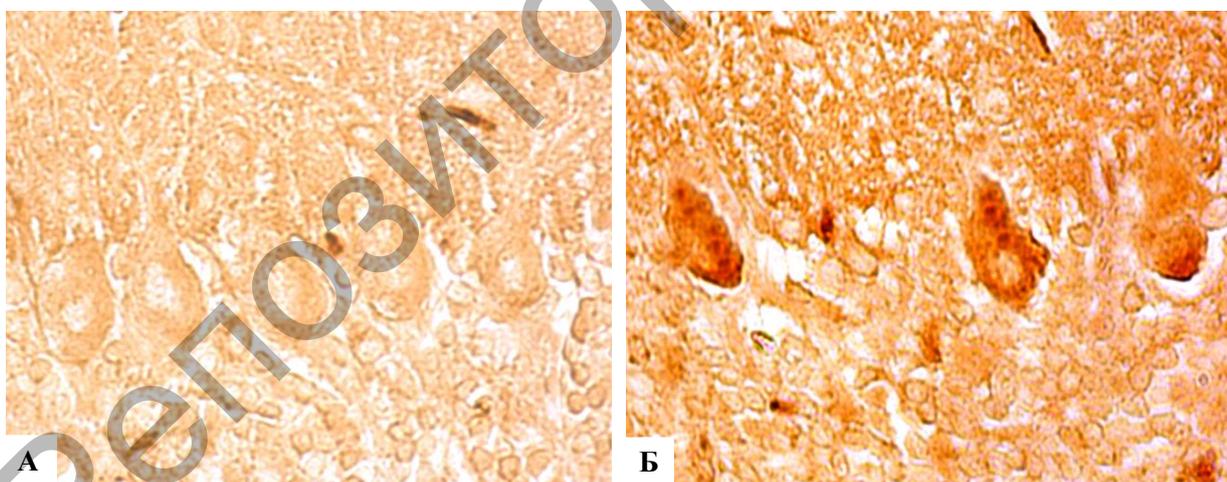


Рисунок 6.3 – Умеренная экспрессия AMBRA1 в коре мозжечка крысы в контроле – А (10 суток после ложной операции), появление резко иммунопозитивных клеток Пуркинье в опыте – Б (10 суток холестаза)

Иммуногистохимическая реакция на AMBRA1.
Цифровая микрофотография. Ув. 300

После двух суток холестаза происходит увеличение средней иммунореактивности в клетках Пуркинье AMBRA1 на 30,5%, после пяти суток – на 18,8%, после 10 суток – на 39,5%. После 20 суток холестаза сохраняется небольшое, но достоверное увеличение иммунореактивности AMBRA1 (на 6,7%). Через сорок пять и девяносто суток после перевязки/перерезки ОЖП иммунореактивность AMBRA1 в клетках Пуркинье нормализуется (табл. 6.3).

Таблица 6.3 – Экспрессия белка AMBRA1 в перикарионах клеток Пуркинье коры мозжечка контрольных крыс в разные сроки подпечёночного холестаза (ед. $\times 10^3$) (Me \pm IQR)

Сутки	Контроль (n=18)	Опыт (n=18)	p
2	172,65 \pm 17,08	225,26 \pm 29,68*** \uparrow	0,000
5	187,31 \pm 15,06	222,61 \pm 39,80*** \uparrow	0,000
10	180,65 \pm 15,04	251,94 \pm 15,80*** \uparrow	0,000
20	177,04 \pm 27,42	188,95 \pm 15,82*** \uparrow	0,009
45	171,31 \pm 37,21	173,79 \pm 44,18	0,756
90	168,02 \pm 43,44	167,14 \pm 33,78	0,621

Примечание – *** – p<0,001 по сравнению с контролем.

Повышение в клетках Пуркинье мозжечка после перевязки/перерезки ОЖП активности маркёрного фермента лизосом КФ (с пятых суток, с максимумом на 10-е сутки) свидетельствует об активации лизосом. Это соответствует полученным нами электроно-микроскопическим данным об увеличении числа и размеров лизосом, особенно аутофаголизосом, в цитоплазме клеток Пуркинье через 10 суток холестаза. Это подтверждается и нашими данными о гипертрофии комплекса Гольджи, как известно, образующего первичные лизосомы (гидролазные пузырьки). Всё это свидетельствует об активации процессов аутофагии, по-видимому, для элиминации повреждаемых при холестазе мембран и органелл нейронов. Интересно, что повышение в клетках Пуркинье иммунореактивности белка-регулятора аутофагии AMBRA1 выявляется раньше, уже на 2-е сутки после операции, и сохраняется на протяжении всего периода повышения активности КФ.

Действительно, AMBRA1 является одним из факторов, запускающих и поддерживающих процесс аутофагии в нейронах.

Выявленные изменения аутофагии хорошо коррелируют с динамикой деструктивных изменений в нейронах мозга и, в частности, клетках Пуркинье мозжечка после перевязки/перерезки ОЖП, описанных в наших предыдущих исследованиях. Они появлялись на 2 и 5-е сутки опыта, достигали наибольшей степени через 10 и 20 дней, а затем в сохранившихся нейронах у выживших животных структура и метаболизм нейронов постепенно нормализовались [Емельянчик, Зиматкин, 2011, 2013]. Это соответствует и динамике изменений биохимических показателей тяжести холестаза (уровней в крови компонентов желчи – билирубина, холестерина и желчных кислот) в этом эксперименте [Емельянчик, Зиматкин, 2011].

Нормализация изученных нами в настоящей работе показателей аутофагии, а также многих других структурных и метаболических параметров в отдалённые сроки (45-90 суток) после перевязки/перерезки ОЖП может быть обусловлена разрастанием обходных желчевыводящих путей, ведущих к устранению холестаза [Емельянчик, Зиматкин, 2018].

Аутофагия выступает как необходимый фактор в процессе устранения повреждённых структур клеток и является важным условием восстановления нейронов после повреждения, в данном случае при холестазе. Это объясняет возможность полного восстановления нейронов с умеренными повреждениями в отдалённые сроки после устранения холестаза. Однако клетки Пуркинье мозжечка с тяжёлыми, необратимыми повреждениями неизбежно погибают, что приводит к уменьшению общего числа этих нейронов в отдалённые сроки опыта [Емельянчик, Зиматкин, 2011]. Вероятно, нейроны мозга при холестазе погибают в результате некроза и тотальной аутофагии, а не апоптоза, поскольку морфологические признаки последнего в нейронах в этих опытах мы не наблюдали. Интересно, что в погибших нейронах активность КФ и иммунореактивность AMBRA1 резко снижены. Это объясняется и тем, что аутофагия является энергозависимым процессом, а в погибших нейронах митохондрии повреждены, что наблюдалось нами ранее при холестазе электронно-микроскопически, а также гистохимически по угнетению маркерных ферментов митохондрий

[Емельянчик, Зиматкин, 2011]. Взаимосвязь между повреждением митохондрий и аутофагией в процессах нейродегенерации хорошо отражена в обзоре [Kumar et al., 2018. Autophagy].

Таким образом, после перевязки/перерезки ОЖП у крыс активность маркёрного фермента лизосом КФ в клетках Пуркинье мозжечка повышается на пятые сутки, достигает максимума на 10-е сутки, а затем на 20-90-е сутки постепенно нормализуется. Через 10 суток холестаза электронно-микроскопически в клетках Пуркинье наблюдается увеличение числа и размеров лизосом, аутофаголизосом, появление значительного количества мульти-везикулярных телец.

Иммунореактивность белка AMBRA1 в клетках Пуркинье мозжечка крыс значительно повышается уже на 2-е сутки после перевязки/перерезки ОЖП, на 5-е сутки это усиление менее выражено, достигает максимума на 10-е сутки, а на 20-90-е сутки постепенно нормализуется. Это подтверждает важную роль AMBRA1 в активации аутофагии.

Глава 7

ВЫЯВЛЕНИЕ БЕЛКА ГЕНА БЫСТРОГО РЕАГИРОВАНИЯ НЕЙРОНОВ

Ген C-Fos активируется в условиях, требующих быстрой мобилизации нейронов мозга. При этом в нейронах экспрессируется и накапливается белок c-Fos, который выявляется иммуногистохимически. Мы наблюдали появление и накопление этого белка в нейронах при холестазах, что отражает процессы их адаптации, способствующие выживанию нейронов в неблагоприятных условиях, например при накоплении в организме билирубина и токсических желчных кислот при моделировании подпечёчного холестаза у крыс [Емельянчик и др., 2018, 2019].

Холестаз (нарушение оттока желчи из печени в двенадцатиперстную кишку) – частое осложнение желчнокаменной болезни и другой патологии гепатобилиарной системы. Он приводит к нарушениям переваривания и всасывания в кишечнике (особенно жиров) и накоплению компонентов желчи в крови (билирубин, холестерин, желчные кислоты). При этом нарушаются все виды обмена веществ и поражаются все органы и системы организма, включая нервную систему [Емельянчик, Зиматкин, 2011, 2016]. У пациентов и животных с холестазом развиваются нервно-психические и поведенческие нарушения [Senzolo, 2007. Normal; Le Sueur-Maluf et al., 2015. Behavioral].

В предыдущих исследованиях мы обнаружили глубокие и закономерные гистологические, гистохимические и ультраструктурные изменения в нейронах коры головного мозга, мозжечка и гистаминергических нейронах гипоталамуса крыс при экспериментальном подпечёчном холестазе, приводящие к их повреждению и гибели [Зиматкин и др., 2007; Емельянчик, Зиматкин, 2011; Емельянчик, Зиматкин, 2012]. Представляет большой интерес

изучение при этом молекулярных нейромаркёров, которые могут быть связаны с выявленными морфофункциональными нарушениями. Среди них особое внимание привлекает белок c-fos, экспрессия которого отражает активацию гена C-Fos, относящегося к группе генов немедленного, раннего ответа нейронов, которые транскрипционно регулируют гены контролирующие выживание, пролиферацию и рост клеток [Fenster et al., 2010. The role; Fukuchi et al., 2017. Distinct]. Выявление данного белка используют как иммуногистохимический маркёр активации нейронов [Moretto et al., 2017].

В предыдущих исследованиях установлено, что в нейронах ядра солитарного тракта среднего мозга крыс, ответственных за поддержание артериального давления, через 5 суток после перевязки ОЖП иммунореактивность белка c-fos не менялась, а после 25 суток холестаза повышалась [Breitman, Lee, 1997]. Через 21 сутки после легирования общего желчного протока в головном мозге крыс Wistar установлено снижение иммунореактивности c-fos белка в ядре боковой перегородки и медиальном амигдаларном ядре [Le Sueur-Maluf et al., 2015. Behavioral]. Кроме того, показано, что при одном холестазе нет отличий в экспрессии c-fos и только при дополнительном стрессе (водный лабиринт Морриса) у крыс происходило увеличение количества иммунопозитивных нейронов в гиппокампе и префронтальной коре головного мозга [Méndez et al., 2008. Working]. Таким образом, данные литературы по изучению экспрессии c-fos в нейронах мозга при холестазе отрывочны и противоречивы, а по мозжечку совсем отсутствуют.

В работе использован материал от 36 беспородных белых крыс-самцов массой 200-250 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария. Для моделирования холестаза животным проводили перевязку ОЖП на 3-5 мм ниже слияния долевых протоков двумя лигатурами с последующим пересечением между ними. Животным контрольной группы проводили ложную операцию. Через 2, 5, 10, 20, 45 и 90 суток в утренние часы (для синхронизации по времени), предварительно усыпив парами эфира, животных выводили из эксперимента декапитацией. Для исследования брали стандартные кусочки полушарий мозжечка согласно стереотаксическому атласу мозга крысы (в цинк-этанол-формальдегиде при +4 °С (на ночь), а затем заключали в парафин. Парафиновые срезы

толщиной 7 мкм готовили с помощью микротомы (Leica RM 2125 RTS, Германия) и монтировали на предметные стекла. Для стандартизации полученных результатов от всех животных образцы коры обрабатывали параллельно и в одинаковых условиях.

Иммуногистохимическое выявление c-fos и изучение полученных препаратов проводили, как описано в Приложении.

Кора мозжечка

Результаты иммуногистохимического исследования показали, что c-fos-позитивные нейроны выявляются во всех слоях коры мозжечка. Ядра нейронов иммунонегативны. Цитоплазма этих нейронов заполнена мелкими коричневыми гранулами хромогена, демонстрирующими расположение исследуемого белка. Иногда окрашиваются начальные участки дендритов клеток Пуркинье. При этом c-fos-иммунореактивность разных нейронов значительно варьирует, однако преобладают клетки с умеренной c-fos-иммунореактивностью (рис. 7.1).

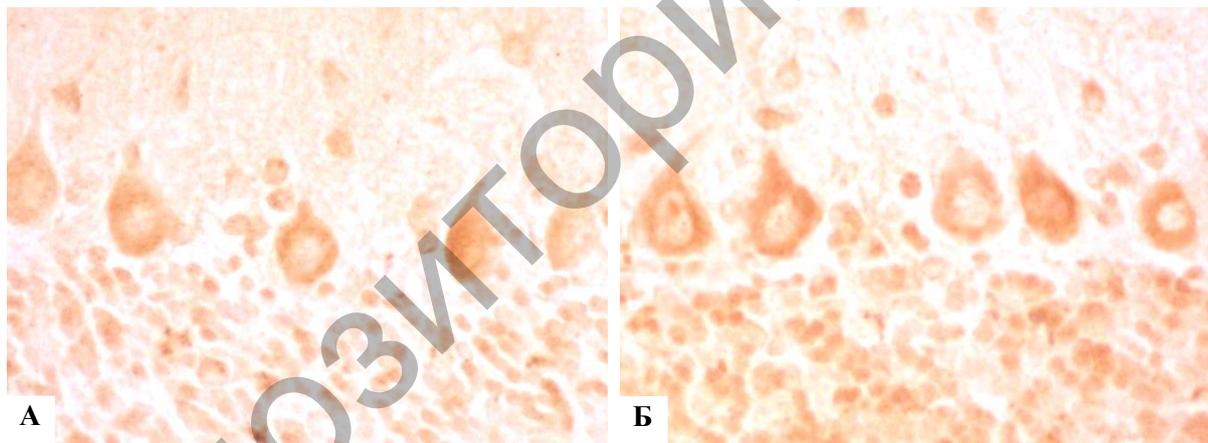


Рисунок 7.1 – Экспрессия c-fos в клетках Пуркинье коры мозжечка крыс в контроле – А (2 суток после ложной операции), увеличение её в опыте – Б (2 суток холестаза)

Иммуногистохимическая реакция на c-fos.
Цифровая микрофотография. Ув. 300

После двух суток холестаза происходит увеличение экспрессии c-fos в цитоплазме клеток Пуркинье на 13% ($p=0,002$) и возрастание числа зернистых нейронов с высокой c-fos-иммунореактивностью (с 17,3% в контроле до 24,4% в опыте) (рис. 7.1, табл. 7.1, 7.2).

Таблица 7.1 – Экспрессия c-fos в перикарионах клеток Пуркинье коры мозжечка контрольных крыс в разные сроки подпечёночного холестаза (ед. $\times 10^3$) (Me \pm IQR)

Сутки	Контроль (n=36)	Опыт (n=34)	p
2-е	274,0 \pm 39,49	310,47 \pm 79,52*** \uparrow	0,002
5-е	279,20 \pm 48,76	325,46 \pm 125,13*** \uparrow	0,001
10-е	288,31 \pm 40,15	347,31 \pm 92,28*** \uparrow	0,003
20-е	280,13 \pm 90,21	326,14 \pm 102,38*** \uparrow	0,002
45-е	270,97 \pm 80,77	271,68 \pm 58,50	0,194
90-е	242,94 \pm 73,08	248,91 \pm 33,23	0,351

Примечание – *** – p<0,001 по сравнению с контролем; \downarrow – статистически значимое снижение изучаемого параметра; \uparrow – статистически значимое увеличение изучаемого параметра.

Таблица 7.2 – Количество нейронов с высоким содержанием c-fos в зернистом слое коры мозжечка контрольных крыс в разные сроки подпечёночного холестаза (в %)

Сутки	Контроль (n=36)	Опыт (n=34)
2-е	17,3	24,4 \uparrow
5-е	17,2	26,9 \uparrow
10-е	17,2	30,3 \uparrow
20-е	17,2	25,5 \uparrow
45-е	17,2	18,8
90-е	16,9	16,8

Примечание – \uparrow увеличение изучаемого параметра.

После пяти суток холестаза экспрессия c-fos в клетках Пуркинье мозжечка возрастает на 16,6% (p=0,001), а число зернистых нейронов с высокой c-fos-иммунореактивностью возрастает до 27% (рис. 7.2, табл. 7.1, 7.2).

После десяти суток холестаза, экспрессии c-fos в клетках Пуркинье мозжечка повышена на 20,5% (p=0,003), а число зернистых нейронов с высокой c-fos-иммунореактивностью возрастает

до 30% (табл. 7.2). После двадцати суток холестаза экспрессия c-fos в клетках Пуркинье мозжечка повышена на 16% ($p=0,002$), а число зернистых нейронов с высокой c-fos-иммунореактивностью составляет 25,5% (рис. 7.3, 7.4, табл. 7.2).

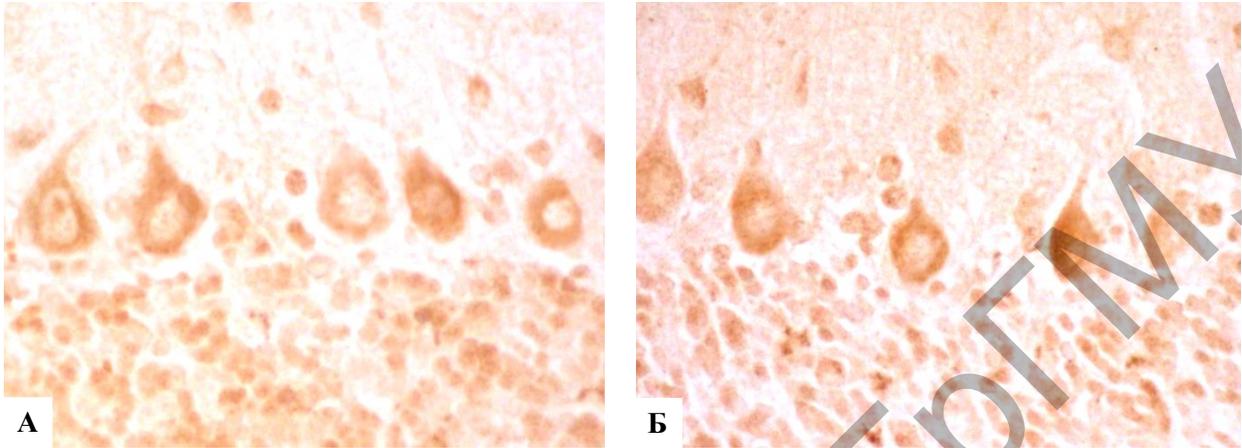


Рисунок 7.2 – Экспрессия c-fos в клетках Пуркинье коры мозжечка крыс в контроле – А (5 суток после ложной операции), увеличение её в опыте – Б (5 суток холестаза)
Иммуногистохимическая реакция на c-fos. Ув. 300

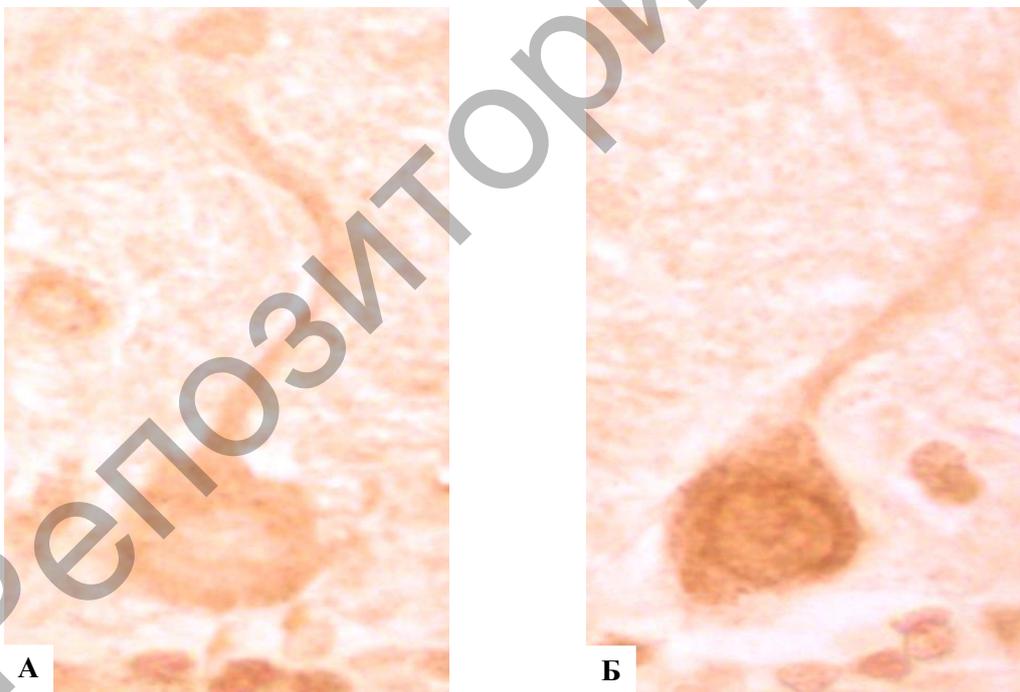


Рисунок 7.3 – Экспрессия c-fos в клетках Пуркинье коры мозжечка крыс в контроле – А (20 суток после ложной операции), увеличение её в опыте – Б (20 суток холестаза)

Иммуногистохимическая реакция на c-fos.
Цифровая микрофотография. Ув. 800

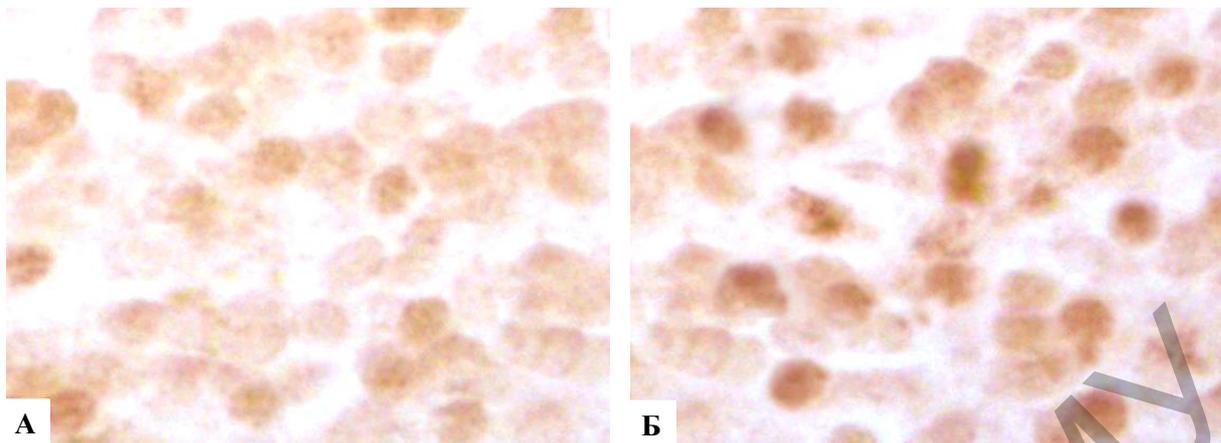


Рисунок 7.4 – Экспрессия c-fos в ядрах клеток-зерен коры мозжечка крыс в контроле – А (2 суток после ложной операции), увеличение их количества в опыте – Б (2 суток холестаза)

Иммуногистохимическая реакция на c-fos.
Цифровая микрофотография. Ув. 400

Через 45 и 90 суток после перевязки ОЖП, когда явления холестаза у выживших животных исчезают (в результате разрастания обходных желчевыводящих протоков), содержание c-fos в цитоплазме клеток Пуркинье мозжечка и число клеток с высокой c-fos-иммунореактивностью нормализуется (табл. 7.1).

Гетерогенность иммунореактивности c-fos в нейронах коры мозжечка в контроле может быть обусловлена разной функциональной активностью нейронов. Эта гетерогенность становится ещё более выраженной после перевязки ОЖП (при моделировании холестаза), когда в отдельных нейронах иммунореактивность c-fos уменьшается, вплоть до полного исчезновения (вероятно, это погибающие нейроны), а в других – резко возрастает (активированные нейроны, возможно, пытающиеся адаптироваться и выжить). Максимальное возрастание количества зернистых нейронов с высокой c-fos-иммунореактивностью отмечено на 10-е сутки опыта. Это согласуется с данными [Albertini et al., 2018. 6 Hz], показавшими что при одном и том же экспериментальном воздействии (при раздражении роговицы у мышей) экспрессия c-fos может меняться в структурах мозга по-разному: в одних она уменьшается, а в других – возрастает.

В наших предыдущих исследованиях установлено, что морфофункциональные изменения в нейронах коры мозжечка появляются уже на вторые сутки после перевязки ОЖП и достигают максимума

на 10-20-е сутки (пик холестаза). Эти данные хорошо согласуются с повышением в коре мозжечка количества нейронов с высокой c-fos-иммунореактивностью именно в указанные сроки. Это можно расценить как адаптационный процесс, направленный на повышение устойчивости нейронов к нарастающему холестазу и компенсации функций погибающих нейронов. В наших предыдущих работах при холестазе установлены ранние нарушения в нейронах коры мозжечка митохондрий (набухание матрикса, разрушение крист, сопровождающиеся снижением активности маркерных ферментов митохондрий, сукцинат- и НАДН-дегидрогеназы [Емельянчик, Зиматкин, 2011, 2013]. Считают, что нарушения структуры митохондрий приводит к клеточному стрессу, что увеличивает содержание изучаемого белка c-fos как иммуногистохимического маркера повышенной активности нейронов [Moretto et al., 2017. Working].

В отдалённые сроки (на 45-90 сутки после перевязки ОЖП) после самопроизвольного устранения холестаза (в результате прорастания обходных желчевыводящих путей), когда все исследованные нами морфофункциональные показатели нейронов коры мозжечка практически приходят к контрольным значениям [Емельянчик, Зиматкин, 2013], иммунореактивность c-fos в них также нормализуется.

Таким образом, подпечёночный холестаз у крыс сопровождается возрастанием в коре мозжечка мозга на 2-20-е сутки после перевязки ОЖП числа нейронов с повышенной c-fos-иммунореактивностью с максимумом на 10-е сутки опыта. У выживших животных после устранения холестаза в отдалённые сроки (45-90-е сутки) опыта количество нейронов с повышенной c-fos-иммунореактивностью, а также экспрессия этого белка в нейронах нормализуется.

Кора больших полушарий головного мозга

Результаты иммуногистохимического исследования показали, что c-fos-позитивные нейроны выявляются во всех слоях теменной и фронтальной коры. Цитоплазма этих нейронов целиком заполнена мелкими гранулами коричневого цвета. При этом c-fos-иммунореактивность нейронов значительно варьирует. Ядра нейронов иммунонегативны. Иногда окрашиваются начальные участки дендритов пирамидных нейронов (табл. 7.3, рис. 7.5, 7.6).

Таблица 7.3 – Количество c-fos иммунопозитивных нейронов (в 1 мм²) в теменной и фронтальной коре головного мозга контрольных крыс и в разные сроки после перевязки ОЖП (Me±IQR)

Слой коры	Кора головного мозга			
	теменная		фронтальная	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
2 суток				
Второй	1,90±0,10	6,80±1,30*↑	2,0±0,30	4,90±0,60*↑
Третий	2,0±0,20	4,80±0,60*↑	2,10±0,50	3,80±0,10*↑
Пятый	2,0±0,20	5,10±0,70*↑	2,0±0,20	4,0±0,20*↑
Шестой	1,90±0,30	4,90±1,10*↑	1,90±0,10	4,10±0,60*↑
5 суток				
Второй	1,90±0,10	7,80±0,50*↑	2,0±0,30	5,80±1,30*↑
Третий	1,90±0,10	5,50±0,30*↑	2,20±0,40	4,60±0,30*↑
Пятый	1,90±0,10	4,80±0,20*↑	1,90±0,20	4,30±0,30*↑
Шестой	2,0±0,10	5,70±0,20*↑	2,0±0,40	4,60±0,70*↑
10 суток				
Второй	2,0±0,30	5,0±0,90*↑	2,0±0,40	3,50±0,50*↑
Третий	2,0±0,20	4,50±0,70*↑	1,90±0,10	4,0±1,20*↑
Пятый	2,0±0,10	5,40±0,60*↑	2,20±0,30	4,20±0,70*↑
Шестой	2,0±0,20	7,10±0,40*↑	2,10±0,20	5,70±1,20*↑
20 суток				
Второй	1,90±0,10	4,80±0,80*↑	2,40±0,20	3,50±1,20*↑
Третий	1,90±0,20	3,90±0,30*↑	2,0±0,20	3,90±0,40*↑
Пятый	1,80±0,10	4,70±0,80*↑	1,90±0,10	3,70±0,10*↑
Шестой	1,90±0,40	7,80±0,90*↑	1,90±0,20	6,0±0,80*↑
45 суток				
Второй	2,10±0,20	2,10±0,40	1,90±0,40	2,0±0,30
Третий	2,0±0,20	1,90±0,20	2,0±0,30	2,0±0,20
Пятый	1,90±0,30	2,0±0,40	1,90±0,30	2,10±0,10
Шестой	2,10±0,20	2,0±0,20	1,90±0,10	2,10±0,10

Продолжение таблицы 7.3

90 суток				
Второй	1,90±0,20	1,90±0,80	2,30±0,20	2,20±0,20
Третий	2,10±0,20	2,10±0,30	2,0±0,40	2,0±0,10
Пятый	1,90±0,10	1,90±0,10	2,0±0,30	2,10±0,30
Шестой	2,0±0,20	1,90±0,10	2,0±0,20	2,0±0,30

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ↑ – статистически значимое увеличение изучаемого параметра.

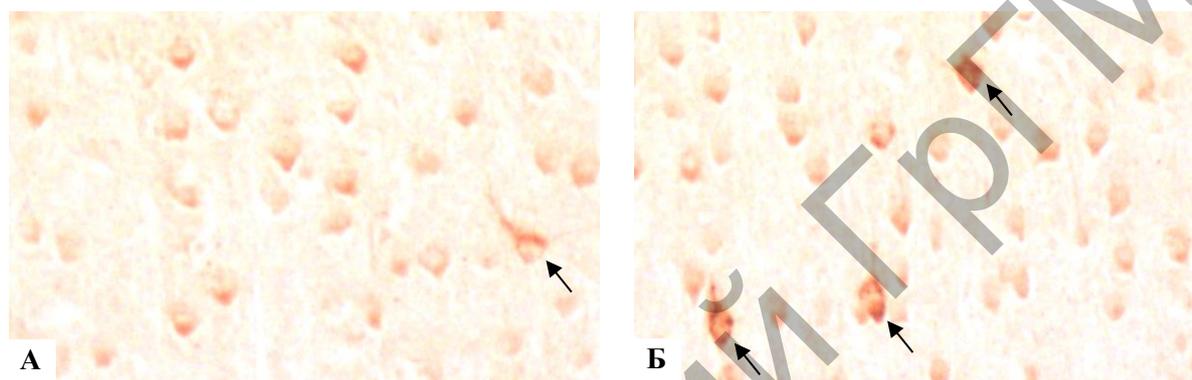


Рисунок 7.5 – Экспрессия c-fos в нейронах второго и третьего слоя теменной коры мозга крыс в контроле – А (10 суток после ложной операции), увеличение количества иммунопозитивных клеток в опыте – Б (10 суток холестаза)

Иммуногистохимическая реакция на c-fos.
Цифровая микрофотография. Ув. 100

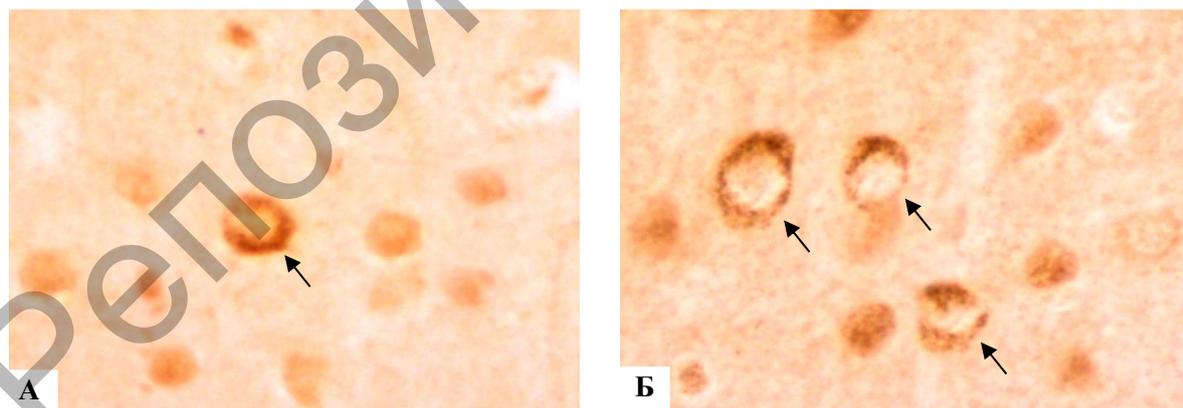


Рисунок 7.6 – Экспрессия c-fos в нейронах второго слоя теменной коры мозга крыс в контроле – А (10 суток после ложной операции), увеличение количества иммунопозитивных клеток в опыте – Б (10 суток холестаза)

Иммуногистохимическая реакция на c-fos.
Ув. 400. Цифровая микрофотография.

Через 5 суток после перерезки ОЖП в теменной коре количество c-fos-позитивных нейронов увеличено во втором слое в 4,1 раза, в третьем слое – в 2,9 раза, в пятом – в 2,5 раза, в шестом слое – в 2,9 раза (табл. 7.3).

Через 10 суток после операции в теменной коре количество c-fos-позитивных нейронов увеличено во втором слое в 1,8 раза, в третьем слое – в 2,1, в пятом – в 1,9 раза, в шестом слое – в 2,9 раза (табл. 7.3, рис. 7.5, 7.6).

Через 20 суток после операции в теменной коре количество c-fos-позитивных нейронов во втором слое увеличено в 2,5 раза, в третьем слое – в 2,1, в пятом – в 2,6 раза, в шестом слое – в 4,1 раза (табл. 7.3).

Через 45 и 90 суток после операции во всех слоях теменной коры количество c-fos-позитивных клеток в опыте и контроле не различается (табл. 7.3).

Аналогичные изменения иммунореактивности c-fos выявляются и во фронтальной коре (табл. 7.3). При этом число нейронов с повышенной иммунореактивностью c-fos увеличивалось менее значительно на 2-е сутки опыта, но более выражено на 20-е сутки, хотя на 45 и 90-е сутки их число также нормализовалось (табл. 7.3).

Гетерогенность иммунореактивности c-fos в нейронах теменной и фронтальной коры в контроле может быть обусловлена разной функциональной активностью нейронов. Эта гетерогенность становится ещё более выраженной после перевязки ОЖП (при моделировании холестаза), когда в одних нейронах иммунореактивность c-fos уменьшается, вплоть до полного исчезновения (вероятно, это погибающие нейроны), а в других – резко возрастает (активированные нейроны, возможно, пытающиеся адаптироваться и выжить). Возрастание количества последних обнаружено во всех слоях коры уже на вторые сутки после перевязки ОЖП и достигает максимума на 5-е сутки. Их количество остаётся повышенным на 10 и 20-е сутки опыта, а затем постепенно нормализуется.

В наших предыдущих исследованиях установлено, что морфофункциональные изменения в нейронах теменной коры мозга появляются уже на вторые сутки после перевязки ОЖП и достигают максимума на 10-20-е сутки (пик холестаза). Эти данные хорошо согласуются с повышением в теменной коре количества нейронов

с высокой c-fos-иммунореактивностью. Это можно расценить как механизм активации адаптационного процесса, направленного на повышение устойчивости нейронов к нарастающему холестазу и компенсации функций погибающих нейронов. В наших предыдущих работах при холестазе установлены ранние нарушения в нейронах коры мозга митохондрий (набухание матрикса, разрушение крист, сопровождающиеся снижением активности маркерных ферментов митохондрий, сукцинат- и НАДН-дегидрогеназы [Емельянчик, Зиматкин, 2011]. Считают, что нарушения структуры митохондрий приводит к клеточному стрессу, что увеличивает содержание изучаемого белка c-fos как иммуногистохимического маркера повышенной активности нейронов.

В отдалённые сроки (на 45-90 сутки после перевязки ОЖП) после самопроизвольного устранения холестаза (в результате промывания обходных желчевыводящих путей), когда все исследованные нами морфофункциональные показатели нейронов теменной коры практически приходят к контрольным значениям [Емельянчик, Зиматкин, 2011] иммунореактивность c-fos в них также нормализуется.

Таким образом, подпечёночный холестаз у крыс сопровождается возрастанием в теменной и фронтальной коре мозга на 2-20-е сутки после перевязки ОЖП числа нейронов с повышенной c-fos-иммунореактивностью с максимумом во втором и третьем слоях на 5-е сутки, в пятом слое – на 2 и 10-е сутки, в шестом – на 20-е сутки. У выживших животных после устранения холестаза в отдалённые сроки опыта (45-90-е сутки) количество нейронов с повышенной c-fos-иммунореактивностью нормализуется.

Глава 8

ОЦЕНКА СИНАПТИЧЕСКОГО АППАРАТА

Синапсы – основные коммуникационные соединения между нейронами, определяющими работу мозга. Их хорошим маркёром является белок синаптических пузырьков, **синаптофизин**. Мы наблюдали его накопление на поверхности тел нейронов (визуализирует аксосоматические синапсы) и в нейропиле (аксодендритические синапсы) во взрослом и развивающемся мозге. Обнаружено нарушение этого процесса у потомства крыс с холестазом, вызванным во время беременности, или потреблявших алкоголь во время беременности [Зиматкин, Карнюшко, 2016; Карнюшко, Зиматкин, 2016; Бонь, Зиматкин, 2017].

Синаптогенез в развивающемся мозжечке крысы

Развитие мозжечка в онтогенезе сопровождается пролиферацией, миграцией, дифференцировкой нейронов, формированием между ними синаптических связей. Предшественники клеток Пуркинье формируются на 13-16-й дни эмбриогенеза крысы в вентрикулярном слое крыши четвёртого желудочка, а затем мигрируют в радиальном направлении, сначала образуя в будущей коре мозжечка многорядный слой и только к 3-4-му дню постнатального развития – однорядный. Образование синапсов между КП и параллельными волокнами (аксонами зернистых нейронов) начинается в глубокой части молекулярного слоя коры мозжечка на 7-9-й день постнатального онтогенеза [Fujita et al., 1996]. У крыс корзинчатые нейроны образуются со 2 по 17-е сутки постнатального развития, а звездчатые нейроны – с 4 по 19-е сутки. Затем они дифференцируются и образуют синаптические контакты с КП [Fujita et al., 1996].

Лазящие волокна (аксоны нейронов нижней оливы) достигают коры развивающегося мозжечка и устанавливают синаптические контакты с КП к 18-19 дню эмбрионального развития. Затем множественная иннервация лазящими волокнами к моменту рождения сменяется моноиннервацией к 15 суткам постнатального развития [Andjus et al., 2003. A change]. Моховидные волокна образуют большинство афферентов в мозжечке и формируют гломерулы во внутреннем зернистом слое. Существует несколько источников моховидных волокон: нейроны спинного мозга (спинocerebellарный тракт проникает в мозжечок на 15-й день эмбрионального развития), вестибулярные ядра (вестибуло-цереbellарные афференты на 13-15 дни эмбриогенеза), ядра ретикулярной формации (ретикуло-цереbellарные проекции – на 16-17 дни), ядро тройничного нерва (на 22-й эмбриональный день) и ядер моста (понтocerebellарные афферентные волокна – после рождения) [Rahimi-Balaei et al., 2015. Embryonic].

В ходе дифференцировки клубочков мозжечка различают два этапа: протогломерулярный и гломерулярный. Первый этап проходит у крыс в течение первых двух недель постнатального развития и характеризуется быстрым расширением розеток моховидных нервных волокон, содержащих синаптические пузырьки вблизи плазмолеммы. Вторым этапом (гломерулярный) – формирование и стабилизация клубочков – с 15 по 45-е сутки. В этот период происходит увеличение в терминалях моховидных волокон числа синаптических пузырьков и контактов с дендритами зернистых клеток, которые образуют выпячивания (шипики), содержащие митохондрии и цистерны эндоплазматической сети (ЭПС) [Дьячкова, Хамори, 1967].

Афферентные пути мозжечка (образованы аксонами КП) начинают формироваться во время позднего эмбриогенеза, когда КП устанавливают первые синаптические контакты с клетками-мишенями (нейронами ядер мозжечка) к 20-му дню эмбрионального развития [Eisenman et al., 1991].

Охарактеризовать синаптогенез в ходе развития мозжечка позволяет молекулярный маркер синаптических пузырьков синаптофизин (SYN) [Гилерович и др., 2014. Выявление; Колос и др., 2015; Leclerc et al., 1989. Synaptophysin]. SYN составляет 10%

от всех белков синаптических пузырьков, обеспечивает их контакт с пресинаптической мембраной, участвует в эндо- и экзоцитозе нейромедиаторов [Kwon, Chapman, 2011]. Эмбриональный SYN отличается по своим биохимическим свойствам от SYN взрослых животных [Becher et al., 1999. The synaptophysin]. Присутствие SYN не является обязательным для образования синаптических пузырьков [Eshkind, Leube, 1995].

В настоящее время считают, что при отсутствии SYN не происходит нарушение экзоцитоза медиатора, но после передачи нервного импульса нарушается эндоцитоз и замедляется заполнение синаптических пузырьков медиатором, что ограничивает возможности передачи нервных импульсов нейронами [Kwon, Chapman, 2011]. SYN синтезируется в перикарионах, а затем поступает в аксоны нейронов [Fujita et al., 1996. Экспрессия SYN в молекулярном слое мозжечка главным образом обусловлена синаптическими контактами между дендритами КП и параллельными волокнами, а в зернистом слое – с моховидными волокнами [Fujita et al., 1996].

Задачей настоящего исследования была качественная и количественная оценка синаптогенеза в развивающемся мозжечке крысы с помощью иммуногистохимического выявления синаптофизина.

Эксперименты выполнены на самках беспородных белых крыс с исходной массой 180 ± 20 г и родившемся от них потомстве. Животные находились на стандартном рационе вивария. От каждой самки брали по одному крысёнку по достижении ими 2, 7, 15 и 45 суток после рождения и декапитировали (всего изучено 12 крысят). Синаптофизин выявляли иммуногистохимически и оценивали в препаратах как описано в Приложении.

Результаты исследования показали, что в коре мозжечка крыс на 2 и 15-е сутки после рождения в наружных рядах временного наружного зернистого слоя, которые образованы делящимися клетками – предшественниками зернистых нейронов – иммунопозитивная окраска на SYN отсутствует. В цитоплазме готовящихся к миграции и мигрирующих через молекулярный слой будущих зернистых нейронов она выявляется (рис. 8.1 А, Б, В). Иммунореактивность SYN присутствует и в цитоплазме зернистых нейронов дефинитивного, внутреннего зернистого слоя, но с возрастом (на 15-45-е сутки) она снижается (рис. 8.1).

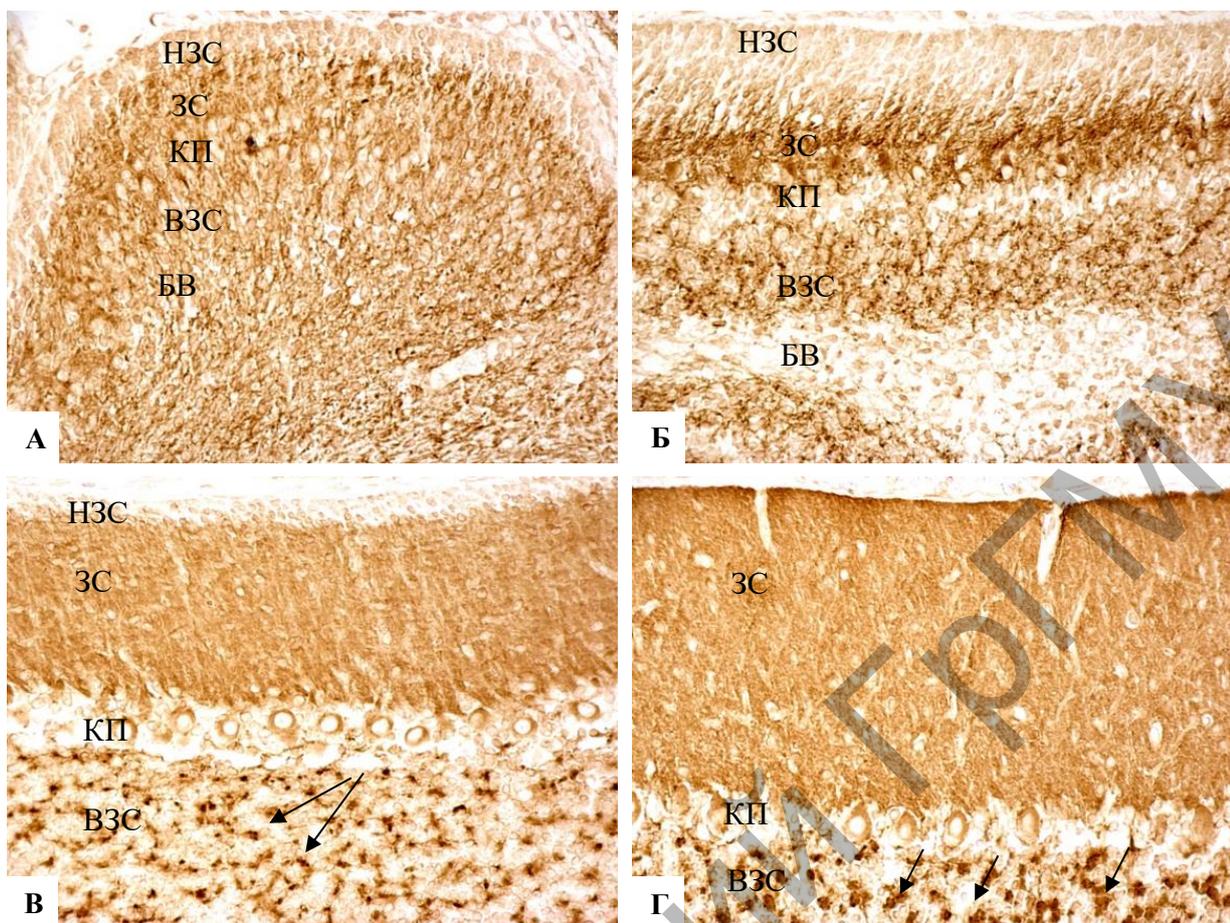


Рисунок 8.1 – Экспрессия синаптофизина в палеocerebellуме крыс в постнатальном онтогенезе: А – 2-е сутки, Б – 7-е сутки, В – 15-е сутки, Г – 45-е сутки после рождения
 НЗС – наружный зернистый слой; ЗС – зона синаптогенеза в молекулярном слое; КП – клетки Пуркинью;
 ВЗС – внутренний зернистый слой; БВ – белое вещество
 Стрелками показаны клубочки мозжечка. Ув. 200

На 7-е сутки у контрольных крыс как в палео-, так и неocerebellуме иммунопозитивное по SYN окрашивание синапсов в виде плотно расположенных точек наблюдается между перикарионами клеток Пуркинью и в глубокой части молекулярного слоя (рис. 8.2 Б). На 15-е и особенно 45-е сутки постнатального онтогенеза у крыс по мере утолщения молекулярного слоя как в палео-, так и неocerebellуме ширина зоны синаптогенеза увеличивается (рис. 8.1, табл. 8.1). При этом иммунопозитивные по SYN синапсы становятся более мелкими, многочисленными и располагаются более равномерно на иммунонегативных дендритах КП, чем на 7-е сутки, а иммунное окрашивание зоны синаптогенеза становится

более гомогенным и слабым (рис. 8.1, табл. 8.2), за исключением полосы повышенной иммунореактивности на поверхности молекулярного слоя на 45-е сутки (рис. 8.1 Г).

Таблица 8.1 – Ширина зоны синаптогенеза в молекулярном слое коры мозжечка крыс разного филогенетического возраста в постнатальном онтогенезе, мкм

Сутки	Палеocerebellum	Неocerebellum
7-е	29,22±8,45	24,19±5,64
15-е	81,99±12,03*	78,03±13,01*
45-е	170,47±17,83*	146,56±20,48*

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с 7-суточными крысами.

Таблица 8.2 – Иммунореактивность зоны синаптогенеза в молекулярном слое коры мозжечка крыс разного филогенетического возраста в постнатальном онтогенезе (в ед. опт. пл.)

Сутки	Палеocerebellum	Неocerebellum
7-е	0,29±0,02	0,32±0,04
15-е	0,25±0,05*	0,23±0,02*
45-е	0,22±0,03*	0,23±0,02*

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с 7-суточными крысами.

На 2 и 7-е сутки после рождения экспрессия SYN наблюдается между перикарионами КП (рис. 8.1 А, Б). На 7-е сутки SYN-иммунопозитивные синапсы в виде многочисленных крупных, интенсивно окрашенных точек наблюдались вокруг перикарионов клеток Пуркинье – формирующиеся аксосоматические синапсы. На 15-45-е сутки после рождения количество аксосоматических синапсов на перикарионах КП значительно уменьшается. В эти сроки количество крупных SYN-позитивных синапсов на перикарионах КП в палео- и неocerebellуме составляет только $2,0 \pm 1,0$ (Me±IQR). В этот период преобладают мелкие SYN – иммунопозитивные аксосоматические синапсы, дающие мелкую пылевидную зернистость. Иммунореактивность SYN выявляется и в цитоплазме КП: она слабая на 2-е сутки, резко возрастает, достигая максимума

на 7-е сутки, а затем постепенно уменьшается. Это хорошо видно при большом увеличении микроскопа. При этом перикарионы КП хорошо выделяются на фоне светлого нейропиля со слабой иммунореактивностью (рис. 8.1 В, Г).

На 2-е сутки постнатального онтогенеза крысы в формирующемся ВЗС иммунореактивность SYN слабая, в виде мелкой зернистости, не отличающейся от белого вещества. На 7-е сутки в формирующемся ВЗС среди зернистых нейронов равномерно располагаются преимущественно мелкие SYN-иммунопозитивные точки, по-видимому, терминали моховидных волокон, являющихся основой для формирования будущих клубочков мозжечка (рис. 8.1 Б). На 15-е сутки равномерно среди зернистых клеток определяются иммунопозитивные по SYN мелкие и средние по размеру формирующиеся клубочки мозжечка (рис. 8.1 В). К 45-м суткам число крупных SYN-позитивных клубочков с очень высокой иммунореактивностью возрастает, а мелких – уменьшается (рис. 8.1 В, табл. 8.3). При этом общее количество (плотность расположения) клубочков ВЗС не меняется (табл. 8.3).

Таблица 8.3 – Плотность расположения клубочков мозжечка на 1 мм² внутреннего зернистого слоя мозжечка 15- и 45-суточных крысят, шт.

Клубочки мозжечка	Палеocerebellум	Неocerebellум
15-е сутки		
Крупные	121,84±97,97	124,65±77,29
Средние	2193,16±1411,22	2476,98±2278,41
Мелкие	785,60±1137,94	1227,77±1000,18
Сумма	3568,80±733,23	3757,72±896,52
45-е сутки		
Крупные	472,38±11,32*	434,39±30,84*
Средние	2909,60±305,09	3185,52±893,87
Мелкие	356,66±88,31*	732,23±226,61*
Сумма	3715,36±206,42	4394,87±515,69

Примечание – * – p<0,05 по сравнению с 15-суточными крысами.

В промежуточном ядре мозжечка на вторые сутки после рождения на перикарионах нейронов наблюдались лишь единичные SYN-иммунопозитивные точки – аксосоматические синапсы. Преобладали нейроны с малым количеством аксосоматических синапсов и единичные нейроны с плотно расположенными синапсами. В нейропиле были равномерно расположены многочисленные мелкие аксодендритические синапсы. На 7-45-е сутки вокруг перикарионов некоторых нейронов промежуточного ядра образуются темные ободки из плотно расположенных аксосоматических синапсов (рис. 8.2). На 7-45-е сутки в нейропиле размеры аксодендритических синапсов увеличиваются и они начинают располагаться неравномерно, образуя скопления (рис. 8.2).

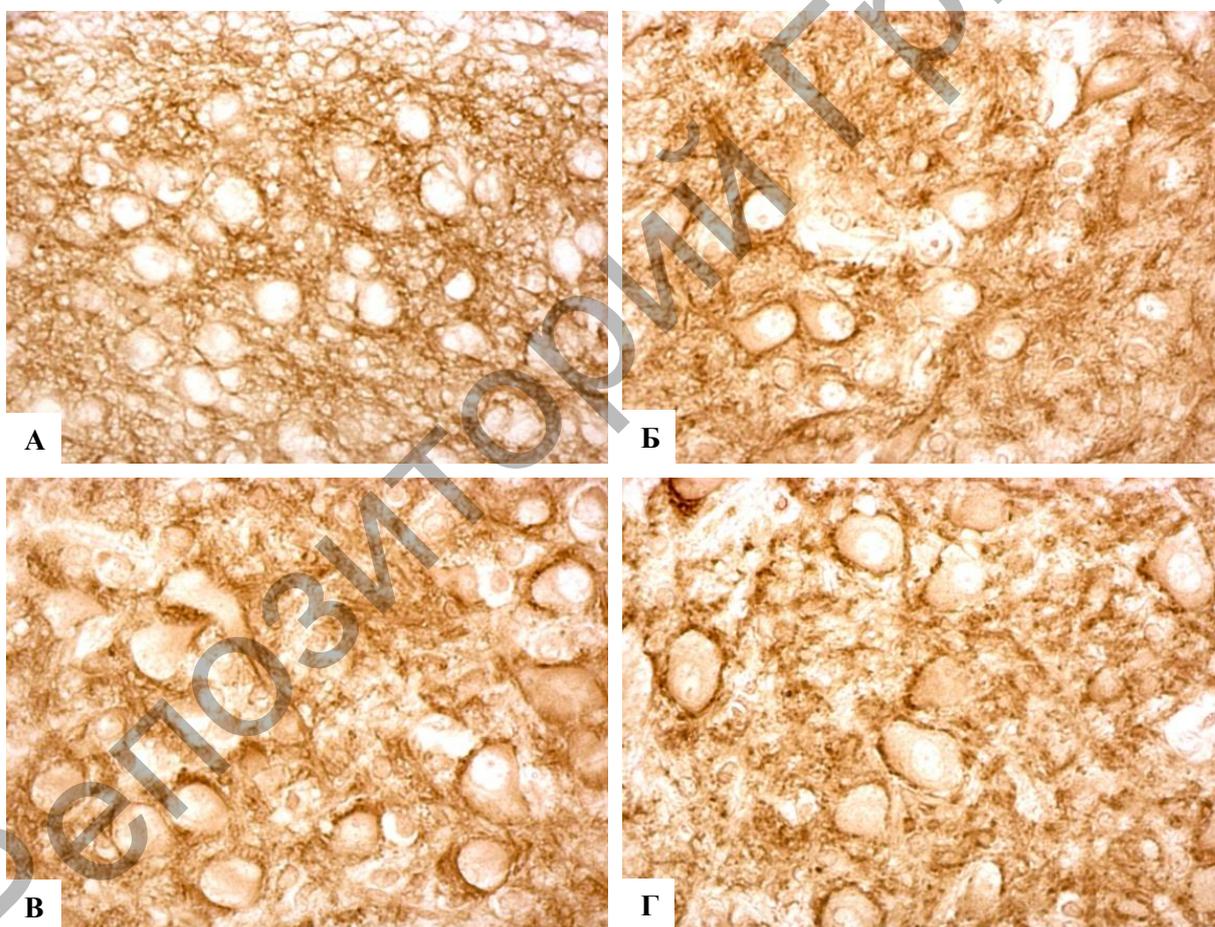


Рисунок 8.2 – Синапсы на телах и дендритах нейронов промежуточного ядра мозжечка: 2-е (А), 7-е (Б), 15-е (В) и 45-е (Г) сутки после рождения

Ув. 400

При этом общая иммунореактивность нейропиля в промежуточном ядре мозжечка в динамике постнатального онтогенеза не меняется (табл. 8.4). Иммунореактивность SYN в цитоплазме нейронов этого ядра была умеренной, гомогенной и не менялась на 7-45-е сутки после рождения (рис. 8.2).

Таблица 8.4 – Экспрессия синаптофизина в нейропиле промежуточного ядра мозжечка крыс в постнатальном онтогенезе (в ед. опт. пл.)

Срок	Экспрессия
2 сутки	0,22±0,03
7 сутки	0,23±0,03
15 сутки	0,22±0,01
45 сутки	0,21±0,04

В белом веществе коры мозжечка иммунореактивность SYN выявляется на 2-е и меньше на 7-е сутки постнатального развития, что особенно чётко видно в Crus I на 7-е сутки после рождения. В дальнейшем она исчезает.

Отсутствие иммунореактивности SYN в наружных рядах НЗС на 2-15-е сутки после рождения свидетельствует об экспрессии этого гликопротеина в цитоплазме и отсутствии нервных терминалей в зоне пролиферации предшественников зернистых нейронов. Но иммунореактивность выявляется в цитоплазме премиграторных и мигрирующих предшественников зернистых нейронов. Это подтверждается данными, что в нейронах НЗС, находящихся в премиграторной зоне, SYN локализуется в транслатеральных цистернах комплекса Гольджи и возле него в синаптически подобных пузырьках и сохраняется в этих же нейронах, мигрирующих через молекулярный слой [Fujita et al., 1996].

В нашем исследовании иммунопозитивное окрашивание на SYN было выявлено на 2-е сутки постнатального онтогенеза вокруг перикарионов КП и в формирующемся молекулярном слое. В литературе описано, что при электронно-микроскопическом исследовании первые синапсы в молекулярном слое наблюдаются уже на 19-й день эмбрионального развития [West, del Cerro M., 1976]. Возможно, это окончания моховидных волокон на КП, входящих

в мозжечок еще до рождения. Контакты с ними являются временными, когда зернистый слой созревает моховидные волокна вытесняются КП и устанавливают синапсы с дендритами зернистых нейронов [Rahimi-Balaei et al., 2015].

Увеличение ширины зоны синаптогенеза и уменьшение в ней иммунореактивности по SYN с 7 по 45-е сутки после рождения, по-видимому, связано с ростом дендритного дерева КП. Уменьшение количества иммунопозитивных по SYN синапсов вокруг перикарионов КП с 7 по 15-е сутки может быть обусловлено элиминацией избыточной иннервации лазящими волокнами и формированием ими синапсов с дендритами КП.

Во ВЗС на 2-7-е сутки постнатального онтогенеза мелкозернистая иммунореактивность по SYN, вероятно, обусловлена колбами роста и терминалями моховидных волокон, а на 15-45-е сутки, формирующимися гломерулами мозжечка [Дьячкова, Хамори, 1967], которые визуализируются в виде более крупных участков высокой иммунореактивности по SYN.

Увеличение количества SYN-позитивных синапсов на перикарионах нейронов промежуточного ядра мозжечка в постнатальном онтогенезе, очевидно, связано с формированием эфферентных терминалей от КП и по срокам соответствует данным литературы [Eisenman et al., 1991]. Кроме того, на нейронах ядер мозжечка заканчиваются и коллатерали моховидных и лазящих волокон, а также многослойные (нейромодулирующие) волокна. К последним относятся серотонинергические (формируются постнатально), норадренергические (проникают в мозжечок на 17-й день эмбрионального развития), а также холинергические, допаминергические и гистаминергические [Rahimi-Balaei et al., 2015. Embryonic]. При этом, по нашим данным, общая экспрессия SYN в нейропиле промежуточного ядра мозжечка крыс в постнатальном онтогенезе не меняется, что связано с параллельным укрупнением синапсов и уменьшением их числа (плотности расположения).

Выявленная иммунореактивность SYN в белом веществе на 2-7-е сутки после рождения, вероятно, обусловлена конусами роста развивающихся афферентных волокон. Известно, что синаптические пузырьки образуются в телах нейронов, транспортируются по растущим аксонам и накапливаются в конусах роста ещё

до начала синаптогенеза [Fujita et al., 1996]. Это объясняет присутствие умеренной иммунореактивности по SYN в цитоплазме, но не в ядрах перикарионов нейронов мозжечка (клетки Пуркинье, зернистые нейроны, нейроны ядер).

Таким образом, иммуногистохимическое исследование динамики экспрессии синаптофизина – эффективный способ оценки синаптогенеза в мозжечке в раннем постнатальном онтогенезе. Этот подход может быть использован и при изучении влияния на данный процесс разных экспериментальных воздействий и патологических состояний.

Нарушения синаптогенеза в мозжечке потомства крыс-самок с холестазом, вызванным во время беременности, и их коррекция урсодезоксихолевой кислотой

Холестаз беременных возникает в третьем триместре и сопровождается кожным зудом, уменьшением или нарушением поступления желчи в кишечник, избыточным поступлением компонентов желчи в кровь [Dixon, Williamson, 2016]. Холестаз не представляет большой опасности для матери, его симптомы и лабораторные признаки исчезают через 1-2 недели после родов [Успенская, Гончаренко, 2013]. Но данная патология способствует ухудшению состояния плода, а именно недоношенности, низкому весу при рождении, развитию респираторного дистресс-синдрома, антенатальной гибели.

В экспериментах на животных установлено, что потомство, развивавшееся в условиях холестаза, существенно отстает в физическом развитии, массе тела и морфофункциональном становлении в онтогенезе многих органов [Дудук, Зиматкин, 2011]. В предыдущих исследованиях у такого потомства нами обнаружены значительные нарушения морфогенеза мозжечка [Карнюшко, Зиматкин, 2015]. Оценка синаптогенеза в мозжечке крыс, развивавшихся в условиях холестаза матери, ранее не проводилась.

В настоящее время для терапии холестаза беременных применяют урсодезоксихолевую кислоту (УДХК). Она безопасна для приёма во время беременности и способствует улучшению состояния как матери, так и плода [Vasq et al., 2012. Efficacy]. УДХК улучшает гепатобилиарный транспорт, оказывает холеретический эффект,

защищает мембраны гепатоцитов и холангиоцитов от повреждения токсическими желчными кислотами, а также оказывает гипохолестеринемическое, иммуномодулирующее, антиоксидантное, антиапоптотическое действие, уменьшает повреждающее воздействие компонентов желчи на структуры плаценты [Serrano et al., 2003. Effect].

Развитие мозжечка в онтогенезе – сложный динамический процесс. Моховидные и лазающие волокна являются основными афферентными путями мозжечка. Моховидные волокна образуют большинство афферентов в мозжечке и формируют гломерулы во внутреннем зернистом слое на 2-6-й неделе постнатального развития [Namori, Somogyi, 1983]. Синаптические контакты между дендритами КП и параллельными волокнами (аксонами зернистых нейронов) начинают образовываться на 7-9-е сутки после рождения. В течение 1-3-й недели устанавливают синаптические контакты с КП корзинчатые и звездчатые нейроны.

Молекулярный маркер синапсов, синаптофизин (SYN), – это интегральный белок, обеспечивающий контакт синаптических пузырьков с пресинаптической мембраной, участвует в эндо- и экзоцитозе нейромедиаторов [Колос и др., 2015; Коржевский и др., 2015. Одновременное]. В настоящее время считают, что при отсутствии SYN не происходит нарушение экзоцитоза медиатора, но замедляется заполнение синаптических пузырьков медиатором, что ограничивает возможности нейротрансмиссии [Kwon, Chapman, 2011]. SYN синтезируется в перикарионах, а затем транспортируется по аксонам нейронов [Fujita et al., 1996].

Эксперименты выполнены на самках беспородных белых крыс с исходной массой 180 ± 20 г и родившемся от них потомстве (36 крысят). Крысята контрольной группы были получены от самок после лапаротомии, выполненной на 17-е сутки беременности без перевязки ОЖП. Крысята группы «холестаза» были получены от самок, которым на 17-е сутки беременности осуществляли перевязку ОЖП. Группу «холестаза+УДХК» составили крысята, родившиеся от самок, которые после операции ежедневно до родов и в течение первой недели после родов получали с пищей УДХК в дозе 50 мг/кг/сут. Полноту потребления крысами препарата строго контролировали. От каждой самки брали по одному крысёнку

по достижении ими 2, 7, 15 и 45 суток после рождения и декапитировали. Для получения сопоставимых результатов от всех животных образцы мозжечка обрабатывали параллельно и в одинаковых условиях. Иммуногистохимическое исследование синаптофизина проводили как описано в Приложении.

В филогенетически старом (палеocerebellum) и новом (неocerebellum) отделах коры мозжечка измеряли плотность расположения клубочков мозжечка на 1 мм^2 во внутреннем зернистом слое, а в молекулярном слое – ширину зоны синаптогенеза и экспрессию в нем SYN, количество синапсов на КП, а также экспрессию SYN в нейроне промежуточного ядра мозжечка крысы. Оптическую плотность среза структур, пропорциональную содержанию исследуемого маркера, измеряли в условных единицах.

Установлено, что на 2-45-е сутки постнатального онтогенеза у контрольных и опытных крыс по мере роста молекулярного слоя наблюдается прогрессивное увеличение ширины SYN-иммунореактивной зоны синаптогенеза. На 15-е сутки после рождения у потомства группы «холестаза» как в палео-, так и неocerebellуме наблюдается отставание в росте зоны синаптогенеза, а у крысят группы «холестаза+УДХК» – только в палеocerebellуме (рис. 8.3, табл. 8.5).

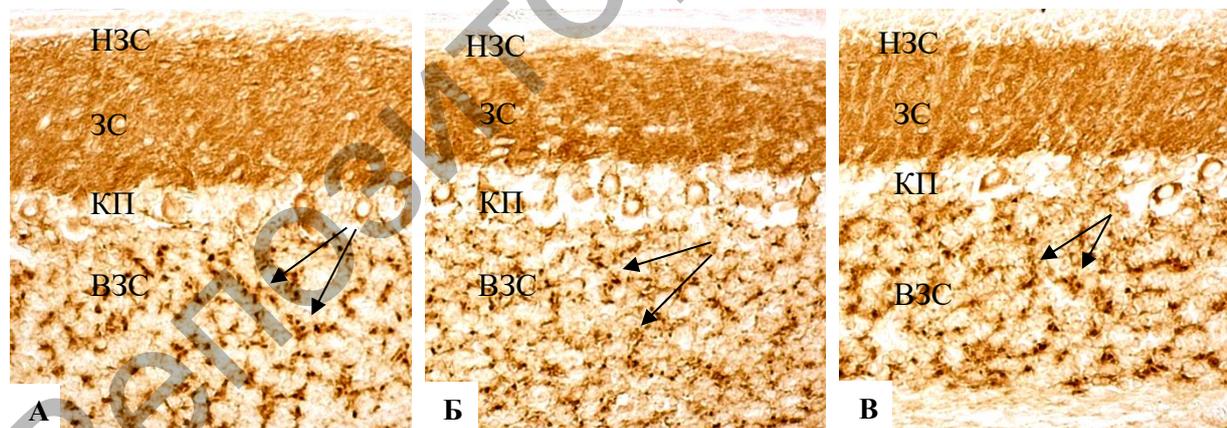


Рисунок 8.3 – Ширина SYN – иммунопозитивной зоны синаптогенеза в молекулярном слое палеocerebellума 15-суточных крысят

А – контроль; Б – «холестаза»; В – «холестаза+УДХК».

НЗС – наружный зернистый слой; ЗС – зона синаптогенеза в молекулярном слое; КП – клетки Пуркинью; ВЗС – внутренний зернистый слой

Стрелками показаны клубочки мозжечка. Ув. 200

Таблица 8.5 – Ширина зоны синаптогенеза в молекулярном слое коры мозжечка крыс в постнатальном онтогенезе (мкм)

Сутки	Контроль		Холестаза		Холестаза+УДХК	
	палеоце-ребеллум	неоцере-беллум	палеоце-ребеллум	неоцере-беллум	палеоце-ребеллум	неоцере-беллум
7-е	29,2±8,5	24,2±5,6	24,5±6,5	20,9±4,3	25,1±2,7	23,2±8,7
15-е	82,0±12,0	78,0±13,0	60,2±9,4*	69,2±3,5*	70,3±12,3*	78,6±12,6
45-е	170,5±17,8	146,6±20,5	160,9±29,2	146,7±10,2	174,0±30,6	155,8±8,1

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем в этой же возрастной группе.

У контрольных животных иммунореактивность по SYN в молекулярном слое прогрессивно снижается, а у крыс группы «холестаза» этот процесс запаздывает: на 15-е сутки иммунореактивность как в палео-, так и неоцеребеллуме выше, чем в контроле (табл. 8.6). У животных группы «холестаза+УДХК» в этот срок достоверных отличий по сравнению с контролем не выявлено (табл. 8.6), что может свидетельствовать о коррегирующем действии УДХК на нарушенный холестазом матери синаптогенез в молекулярном слое мозжечка у потомства.

Таблица 8.6 – Иммунореактивность синаптофизина в зоне синаптогенеза молекулярного слоя коры мозжечка крыс в постнатальном онтогенезе (в ед. опт. пл.)

Сутки	Контроль		Холестаза		Холестаза+УДХК	
	палеоце-ребеллум	неоцере-беллум	палеоце-ребеллум	неоцере-беллум	палеоце-ребеллум	неоцере-беллум
7-е	0,29±0,02	0,32±0,04	0,24±0,03*	0,35±0,05	0,25±0,04*	0,28±0,08
15-е	0,25±0,05	0,23±0,02	0,29±0,04*	0,29±0,04*	0,26±0,04	0,28±0,06
45-е	0,22±0,03	0,23±0,02	0,22±0,01	0,23±0,01	0,22±0,04	0,23±0,04

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем в этой же возрастной группе.

К 7-м суткам после рождения в коре мозжечка SYN-иммунопозитивные синаптические контакты наблюдаются на перикарионах КП (формирующиеся аксосоматические синапсы).

Установлено, что к 15-м суткам количество последних в контроле уменьшается до $2,0 \pm 1,0$. У потомства группы «холестаз» и «холестаз+УДХК» их количество было выше, чем в контроле, и составило $4,0 \pm 2,0$ и $4,0 \pm 1,5$ соответственно ($p < 0,05$). Это свидетельствует об отставании элиминации синапсов на КП у потомства крыс с холестазом.

В период формирования клубочков мозжечка с 7 по 45-е сутки во внутреннем зернистом слое у контрольных животных увеличивается количество крупных синапсов и уменьшается количество мелких, что характеризует образование клубочков мозжечка. У потомства крыс с холестазом на 15-е сутки после рождения в палеоцереbellуме выявлено увеличение плотности расположения мелких и уменьшение количества крупных и средних клубочков мозжечка по сравнению с контролем, а у потомства крыс с холестазом, получавших коррекцию УДХК, достоверных отличий по сравнению с контролем не обнаружено (рис. 8.3), что свидетельствует о нарушении синаптогенеза в зернистом слое мозжечка у потомства крыс с холестазом и нормализации этого процесса под действием УДХК.

В нейропиле промежуточного ядра, где располагаются аксодендритические синапсы, у крысят группы «холестаз» на 2-е сутки постнатального онтогенеза экспрессия SYN ниже, чем в контроле, а на 15-е сутки выше, что свидетельствует о запаздывании синаптогенеза. Применение УДХК нормализует этот показатель (рис. 8.4, табл. 8.7).

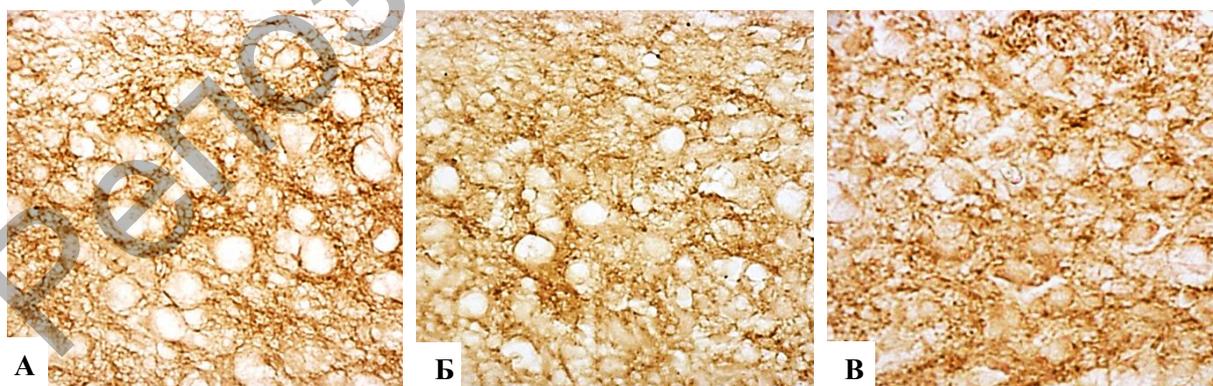


Рисунок 8.4 – SYN-иммунопозитивные синапсы промежуточного ядра мозжечка 2-суточных крысят
А – контроль; Б – «холестаз»; В – «холестаз+УДХК»

Ув. 400

Таблица 8.7 – Экспрессия синаптофизина в нейропиле промежуточного ядра мозжечка крыс в постнатальном онтогенезе (в ед. опт. пл.)

Сутки	Контроль	Холестаза	Холестаза+УДХК
2-е	0,22±0,03	0,18±0,02*	0,22±0,03
7-е	0,23±0,03	0,23±0,03	0,22±0,03
15-е	0,22±0,01	0,24±0,00*	0,23±0,04
45-е	0,21±0,04	0,20±0,07	0,23±0,03

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем в этой же возрастной группе.

Таким образом, у потомства крыс с обтурационным подпечёночным холестазом, вызванным на 17-е сутки беременности, нарушается синаптогенез в мозжечке. Известно, что экспрессия SYN в молекулярном слое мозжечка обусловлена главным образом синаптическими контактами между дендритами КП и параллельными волокнами [Leclerc et al., 1989]. Нами показано, что у развивавшихся в условиях холестаза матери крыс наблюдается отставание в росте ширины зоны синаптогенеза и замедление уменьшения в ней иммунореактивности по SYN в раннем постнатальном онтогенезе, что может быть связано с замедлением формирования дендритного дерева КП и формирования ими синапсов с параллельными волокнами. Повышенное количество SYN-иммунореактивных синапсов на перикарионах КП на 15-е сутки после рождения связано с замедлением элиминации избыточного количества синапсов, образованных лазающими волокнами, и замедлением их перемещения на дендриты КП.

У крысят группы «холестаза» на 15-е сутки после рождения наблюдалось меньшее количество крупных и средних SYN-иммунопозитивных синапсов во внутреннем зернистом слое и большее количество мелких, что, возможно, связано с нарушением формирования клубочков мозжечка. УДХК коррегировала этот процесс.

Уменьшение иммунореактивности в нейропиле промежуточного ядра крысят группы «холестаза» связано с меньшим количеством аксоденритических синапсов, которые образованы преимущественно аксонами развивающихся КП, а также коллатеральными лазающих, моховидных и многослойных волокон.

Протективное действие УДХК на синаптогенез в мозжечке может быть связано с холеретическим действием, стимуляцией билиарной секреции желчных кислот, усилением элиминации

токсических компонентов желчи, снижением транспорта желчных кислот через плаценту к плоду, что уменьшает вероятность развития его повреждения [Vasq et al., 2012. Efficacy].

Следовательно, у потомства крыс с обтурационным подпечёночным холестазом, вызванным на 17-е сутки беременности, нарушается синаптогенез в мозжечке, особенно в ранние сроки после рождения: во всех слоях его коры и промежуточном ядре изменяется динамика экспрессии маркера синаптических пузырьков синаптофизина.

УДХК коррегирует и частично нормализует нарушения синаптогенеза в мозжечке потомства, развивавшегося в условиях холестаза матери.

Содержание синаптофизина в коре развивающегося мозга нормальных крыс и у потомства крыс, потреблявших этанол во время беременности

Во всех изученных отделах коры мозга как у контрольных, так и у опытных животных в постнатальном онтогенезе наблюдалось прогрессивное нарастание экспрессии маркера синаптических пузырьков синаптофизина, но у потомства крыс, потреблявших алкоголь во время беременности, оно было значительно ниже. Так, на 5, 20 и 45-е сутки после рождения иммунореактивность синаптофизина в нейропиле нейронов 5-го слоя у антенатально алкоголизированных животных заметно уступала таковой в контроле (рис. 8.5, 8.6). Это указывает на нарушение, запаздывание синаптогенеза.

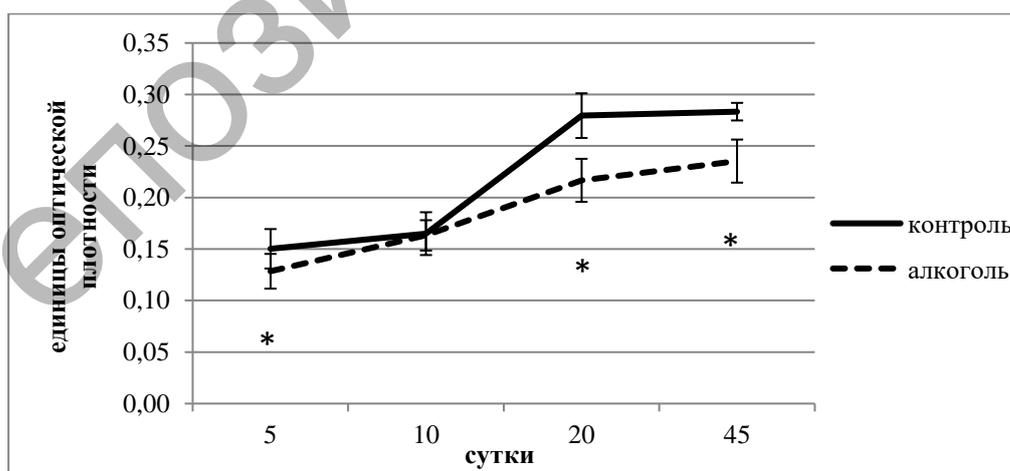


Рисунок 8.5 – Изменение экспрессии синаптофизина в пятом слое фронтальной коры мозга крыс в разные сроки после рождения

Примечание – Me±IQR; * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

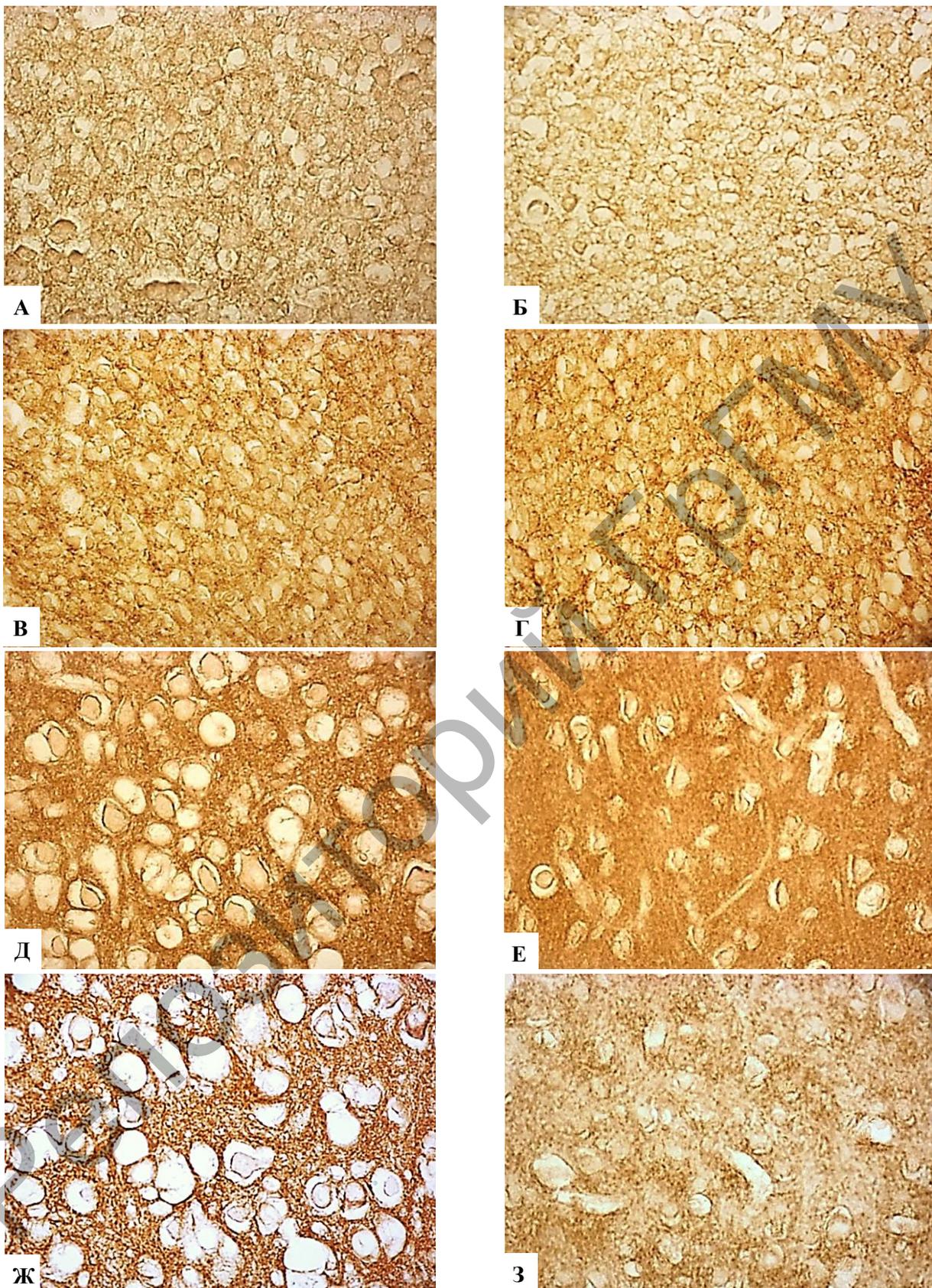


Рисунок 8.6 – Синаптофизин в пятом слое фронтальной коры мозга контрольных крыс (А, В, Д, Ж) и снижение его у алкоголизованных крыс (Б, Г, Е, З): 5-е (А, Б), 10-е (В, Г), 20-е (Д, Е) и 45-е (Ж, З) сутки после рождения. Ув. 400

Таким образом, потребление крысами раствора этанола во время беременности приводит к нарушению синаптогенеза (формирования синаптических контактов) нейронов фронтальной коры головного мозга, что проявляется в отставании экспрессии маркера синаптогенеза, синаптофизина в нейроне пятого слоя коры мозга. Выявленные нарушения носят долгосрочный характер и сохраняются на 45-е сутки постнатального развития.

В целом синаптофизин является хорошим маркером для оценки состояния синапсов нейронов и синаптогенеза в структурах мозга в норме и при патологии.

Глава 9

ДРУГИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЁРЫ НЕЙРОНОВ

Тирозингидроксилаза (ТГ) – фермент синтеза катехоламинов (дофамина, адреналина, норадреналина), которые являются медиаторами катехоламинергических нейронов мозга. Они располагаются группами, образуя многочисленные парные скопления, ядра, в стволе мозга. Одним из наиболее удачных вариантов антител, которые визуализируют ТГ в катехоламинергических нейронах и их отростках в мозге лабораторных животных (крысы, мыши) и человека, являются поликлональные антитела к ТГ фирмы Abcam (ab112), полученные к очищенному белку из клеток феохромоцитомы крысы. Тела и отростки ТГ-иммунореактивных нейронов хорошо окрашиваются в чёрной субстанции и гипоталамусе, а катехоламинергические нервные волокна – в полосатом теле (особенно скорлупе), прилежащем ядре, неокортексе, септальных ядрах, обонятельных луковицах [Коржевский и др., 2019. Иммуногистохимические].

Глутаматдекарбоксилаза (ГДК, GAD) – фермент, катализирующий декарбоксилирование глутаминовой кислоты с образованием ГАМК – основного тормозного медиатора в нервной системе. В ЦНС обнаружено две основные изоформы GAD, которые различаются своим молекулярным весом (65 и 67 кДа), обозначаются как GAD65 и GAD67 и кодируются генами *Gad1* и *Gad2* соответственно. Если GAD67 была выявлена в телах, отростках и синаптических окончаниях нейронов, то GAD65 – только в синаптических окончаниях, поэтому для иммуногистохимической визуализации ГАМКергических структур головного мозга чаще используют антитела к GAD67 [Коржевский и др., 2019. Иммуногистохимические].

Мы также успешно использовали антитела против GAD67 для исследования ГАМКергических нейронов мозжечка крысы в норме и при экспериментальной патологии (см. Глава 2).

NO-синтаза – фермент синтеза монооксида азота (NO). NO-ергические нейроны, использующие монооксид азота в качестве медиатора, разбросаны по всей нервной системе и играют роль в процессах памяти, нейрогенеза, сна, работе стресс-лимитирующей системы, восприятию слуховых сигналов. NO является участником свободнорадикальных процессов и глутаматной эксайтотоксичности и участвует в патогенезе нейродегенеративных и психических заболеваний.

В клетках NO образуется в результате окисления аминокислоты аргинита с помощью фермента NO-синтазы. Различают эндотелиальную, нейрональную и индуцибельную изоформы этого фермента. Нейрональную форму NO-синтазы выявляют с помощью кроличьих поликлональных антител Spring Bioscience (США), в частности в субвентрикулярной зоне бокового желудочка головного мозга крысы [Коржевский и др., 2019. Иммуногистохимические]. Молекула NO короткоживущая, не может диффундировать на большие расстояния и действует локально. Это указывает на высокую функциональную значимость для нейрогенеза немногочисленных NO-ергических нейронов субвентрикулярной зоны взрослого мозга.

Белки нейрофиламентов используют для маркирования перикарионов и отростков нейронов независимо от их медиаторной природы. Нейрофиламенты являются важным компонентом цитоскелета и играют структурную роль в нейронах, а также обеспечивают медленный аксоток и связи между цитоскелетом и другими цитоплазматическими структурами. Для их выявления в нервных волокнах седалищного нерва крысы использовали моноклональные мышинные антитела к белку SMI-32 (Bio Legend, США). При этом иммуногистохимически чётко выявляются осевые цилиндры нервных волокон разного диаметра [Коржевский и др., 2019. Иммуногистохимические].

Альфа-тубулин – другой важный маркёр цитоскелета нервных клеток. Это основной белок нейротрубочек, состоящий из двух субъединиц – альфа- и бета-тубулина. Он локализуется в телах нейронов и их отростках, в постсинаптическом уплотнении и участвует в образовании цитоскелета нейронов, в росте аксонов, образовании синапсов и аксоплазматическом транспорте.

При иммуногистохимическом исследовании головного мозга крысы наиболее интенсивное окрашивание наблюдается в молекулярном слое коры мозга, особенно в поясной и пириформной коре, обонятельных бугорках, а также в 3-4-м и 6-м слоях неокортекса. Иммуногистохимическое окрашивание на альфа-тубулин позволяет эффективно выявлять нейроны с их отростками во всех областях мозга, как бы обводя их контуры, как при серебрении по методу Гольджи [Коржевский и др., 2019. Иммуногистохимические].

Альфа-синуклеин – небольшая молекула массой 19 кДа, наряду с бета- и гамма-синуклеином входит в семейство белков синуклеинов. Предполагают, что альфа-синуклеин участвует в разнообразных физиологических процессах – везикулярный нейрональный транспорт, регуляция кальция, гомеостаз митохондрий, связывание жирных кислот. Его нарушения вызывают развитие болезни Паркинсона и других нейродегенеративных заболеваний.

Для иммуногистохимического выявления альфа-синуклеина используют поликлональные кроличьи антитела Spring Bioscience (США). Иммунопозитивные гранулы альфа-синуклеина диффузно распределены в светлом и радиальном слоях гиппокампа, которые представляют собой конгломераты альфа-синуклеин-иммунопозитивных аксодендритных синапсов гигантских терминалей мшистых волокон [Коржевский и др., 2019. Иммуногистохимические].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследованиях, обобщённых в настоящей монографии, мы оценивали нейромедиаторную природу нейронов мозга, выявляя в них специфические ферменты синтеза или деградации нейромедиаторов. Используя маркёр Ki-67, избирательно визуализировали делящиеся предшественники нейронов, маркёр даблкортин – мигрирующие предшественники нейронов, маркёр NeuN – зрелые нейроны, а также степень и динамику их дифференцировки. Для оценки энергетического потенциала нейронов в качестве маркёра использовали белок крист митохондрий АТФ-синтазу, депо кислорода – белок нейроглобин, депо кальция – кальбиндин. Для оценки регуляции аутофагии в нейронах выявляли её активатор AMBRA1. Наблюдали появление и накопление в нейронах мозга белка гена быстрого реагирования c-Fos в ранние сроки холестаза. Для оценки синаптического аппарата нейронов мозга и синаптогенеза использовали маркёр синаптических пузырьков синаптофизин.

Иммуногистохимические исследования специфических молекулярных маркёров являются надёжным и эффективным инструментом для оценки морфофункционального и метаболического состояния нейронов мозга в норме и при разной патологии.

Иммуногистохимические методы особенно полезны в комплексных исследованиях морфофункционального состояния нейронов мозга. Они дополняют классические нейрогистологические, электронно-микроскопические и гистохимические методы, определяющие размеры и форму тел нейронов и их органелл, а также активность ферментов и содержание различных небелковых веществ, не выявляемых иммуногистохимическими методами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бонь, Е. И. Изменение иммунореактивности АТФ-синтазы и хроматофилии цитоплазмы нейронов теменной коры мозга крыс в условиях ступенчатой церебральной ишемии / Е. И. Бонь, Н. Е. Максимович, С. М. Зиматкин // Оренбургский медицинский вестник. – 2020. – № 4 (32). – С. 26–31.

2. Бонь, Е. И. Нарушение синаптогенеза в коре мозга крыс, подвергавшихся антенатальному воздействию алкоголя / Е. И. Бонь, С. М. Зиматкин // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2017. – № 5. – С. 538–543. doi: 10.25298/2221-8785-2017-15-5-538-543.

3. Бонь, Е. И. Роль митохондрий в энергетике клетки и характеризующие ее молекулярные маркеры / Е. И. Бонь, Н. Е. Максимович // Оренбургский медицинский вестник. – 2019. – Т. 7, № 1 (25). – С. 47–52.

4. Выявление клубочков в мозжечке человека при помощи иммуноцитохимической реакции на синаптофизин и конфокальной лазерной микроскопии / Е. Г. Гилерович [и др.] // Морфология. – 2014. – Т. 146, № 5. – С. 73–77.

5. Ганиткевич, Я. В. Влияние задержки и потерь желчи на аналитико-синтетическую деятельность коры головного мозга / Я. В. Ганиткевич // Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. – 1959. – Т. 9, № 5. – С. 690–700.

6. Дудук, Н. И. Холестаз беременных и его последствия для матери и потомства / Н. И. Дудук, С. М. Зиматкин // Журнал ГрГМУ. – 2011. – № 1. – С. 3–6.

7. Дьячкова, Л. Н. Формирование гломерул мозжечка крыс в онтогенезе / Л. Н. Дьячкова, И. Хамори // Арх. анат., гист. и эмбр. – 1967. – Т. 52 (2). – С. 30–39.

8. Емельянчик, С. В. Мозг при холестазе / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин. – Гродно: ГрГУ, 2011. – 265 с.

9. Емельянчик, С. В. Аутофагия в нейронах фронтальной коры мозга крысы при холестазе / С. В. Емельянчик // Веснік Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Сер. 5, Эканоміка. Сацыялогія. Біялогія. – 2019. – Т. 9, № 2. – С. 134–141.

10. Емельянчик, С. В. Изменения иммунореактивности АТФ-синтазы в нейронах коры мозга и мозжечка крыс при холестаза / С. В. Емельянчик, О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2018. – № 2. – С. 55–60.

11. Емельянчик, С. В. Иммуногистохимия кальбиндина в нейронах коры головного мозга и мозжечка при холестаза у крыс / С. В. Емельянчик, О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2019. – Т. 18(1). – С. 21–29. doi: 10.22263/2312-4156.2019.1.21.

12. Емельянчик, С. В. Нейроглобин в грушевидных нейронах мозжечка крыс при холестаза / С. В. Емельянчик, О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // Морфология. – 2019. – Т. 155(1). – С. 7–11.

13. Емельянчик, С. В. Нейроглобулин в нейронах лобной и теменной коры головного мозга белых крыс при холестаза / С. В. Емельянчик, О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2020. – Т. 9(1). – С. 24–29.

14. Емельянчик, С. В. Состояние митохондрий в клетках Пуркинье мозжечка крысы при холестаза / С. В. Емельянчик, О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2019. – Т. 8(2). – С. 41–47. doi: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-41-47.

15. Емельянчик, С. В. Структурные и гистохимические изменения в клетках Пуркинье мозжечка крыс при холестаза / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Морфология. – 2013. – Т. 143, № 2. – С. 19–23.

16. Емельянчик, С. В. Структурные и гистохимические изменения в нейронах фронтальной коры мозга крысы при холестаза / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Морфология. – 2018. – Т. 133, № 1. – С. 7–12.

17. Емельянчик, С. В. Структурные и гистохимические изменения в нейронах теменной коры мозга крыс при подпеченочном холестаза / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Новости медико-биологических наук. – 2013. – Т. 7, № 1. – С. 38–44.

18. Емельянчик, С. В. Экспрессия белка кальбиндина-D28K в коре мозжечка крыс при холестаза / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Фундаментальные и прикладные науки – медицине : труды международной научной конференции / Новости медико-биологических наук. – 2018. – Т. 18, № 1. – С. 31–32.

19. Емельянчик, С. В. Экспрессия белка c-fos в нейронах коры мозжечка крыс при холестаза / С. В. Емельянчик, О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук. – 2019. – Т. 16(2). – С. 135–141.

20. Емельянчик, С. В. Экспрессия белка C-FOS в нейронах новой коры мозга крыс при холестазае / С. В. Емельянчик, О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // Новости медико-биологических наук. – 2018. – Т.18, № 1. – С.158–160.

21. Зиматкин С. М. Синаптогенез в развивающемся мозжечке крысы / С. М. Зиматкин, О. А. Карнюшко // Морфология, Спб. – 2016. – Т. 150., № 4. – С. 34–39.

22. Зиматкин, С. М. Иммунореактивность NeuN, нейроглобина и АТФ-синтазы в развивающихся гистаминергических нейронах гипоталамуса крысы / С. М. Зиматкин, А. В. Заерко, Е. М. Федина // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2020. – Т. 18(4). – С. 389–395. doi: 10.25298/2221-8785-2020-18-4-389-395.

23. Зиматкин, С. М. Иммунореактивность кальбиндина в нейронах коры мозга и мозжечка крысы / С. М. Зиматкин, С. В. Емельянчик, О. А. Карнюшко // Морфология. – 2019. – Т. 155(3). – С. 7–11.

24. Зиматкин, С. М. Метаболические изменения в гистаминергических нейронах мозга крыс в динамике подпеченочного холестаза / С. М. Зиматкин, О. В. Барабан, С. В. Емельянчик // Морфология. – 2007. – Т. 132, № 4. – С. 27–30.

25. Зиматкин, С. М. Моноаминоксидаза в развивающихся гистаминергических нейронах мозга крысы / С. М. Зиматкин, А. В. Заерко // Морфология. – 2021. – Т. 159 (1). – С. 13–19.

26. Зиматкин, С. М. Постнатальное развитие ГАМК-ергических нейронов мозжечка крысы / С. М. Зиматкин, О. А. Карнюшко // Морфология. – 2020. – № 1. – С. 13–17. doi: 10.34922/AE.2020.157.1.002.

27. Зиматкин, С. М. Синаптогенез в развивающемся мозжечке крысы / С. М. Зиматкин, О. А. Карнюшко // Морфология. – 2016. – № 4. – С. 34–43.

28. Зиматкин, С. М. Экспрессия даблкортина и NeuN в развивающихся нейронах мозжечка крыс / С. М. Зиматкин, О. А. Карнюшко // Морфология, Спб. – 2016. – Т. 149, № 1. – С. 38–42.

29. Зиматкин, С. М. Методика выявления гистаминергических нейронов мозга / С. М. Зиматкин, А. В. Заерко // Морфология. – 2019. – Т. 156, № 4. – С. 102–105.

30. Изменение содержания АТФ-синтазы в нейронах теменной коры и гиппокампа крыс с ишемией головного мозга / Е. И. Бонь [и др.] // Новости медико-биологических наук. – 2021. – Т. 21 (4). – С.121–125.

31. Иммуногистохимические маркеры для нейробиологии / Д. Э. Коржевский [и др.] // Медицинский академический журнал. – 2019. – Т. 19. – № 4. – С. 7–24. <https://doi.org/10.17816/MAJ16548>

32. Карнюшко, О. А. Иммуногистохимическое исследование кальбиндина в развивающемся мозжечке крысы / О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2020. – Т. 18 (6). – С. 692–697. doi: 10.25298/2221-8785-2020-18-5-692-697.

33. Карнюшко, О. А. Нарушения морфогенеза коры мозжечка потомства крыс с экспериментальным холестаазом и их коррекция / О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // Вес. НАН Беларусі. Сер. мед. навук. – 2015. – № 3. – С. 95–101.

34. Карнюшко, О. А. Нарушения морфогенеза промежуточного ядра мозжечка потомства крыс с холестаазом, вызванным во время беременности; коррекция урсодезоксихолевой кислотой / О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // Новости мед.-биол. наук. – 2015. – Т. 11, № 2. – С. 139–145.

35. Карнюшко, О. А. Нарушения синаптогенеза в мозжечке потомства крыс-самок с холестаазом и их коррекция урсодезоксихолевой кислотой / О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2016. – № 2. – С. 45–49.

36. Карнюшко, О. А. Развитие энергетического аппарата клеток Пуркинье мозжечка крысы в постнатальном онтогенезе / О. А. Карнюшко, В. Р. Кот, С. М. Зиматкин // Оренбургский медицинский вестник. – 2020. – № 1(29). – С. 53–59.

37. Колос, Е. А. Маркер синаптических контактов – синаптофизин / Е. А. Колос, И. П. Григорьев, Д. Э. Коржевский // Морфология. – 2015. – Т. 147, № 1. – С. 78–82.

38. Коржевский, Д. Э. Иммуногистохимическое исследование головного мозга / Д. Э. Коржевский, И. П. Григорьев, Е. Г. Гилерович. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2017. – 143 с.

39. Морозов, И. А. Топографические особенности ультраструктуры обкладочных клеток слизистой оболочки желудка (морфометрическое исследование) / И. А. Морозов // Бюллетень эксперим. биол. и мед. – 1976. – Т. 82, № 11. – С. 1390–1394.

40. Морфологические нарушения нейронов теменной коры и гиппокампа крыс в динамике субтотальной церебральной ишемии / Е. И. Бонь [и др.] // Оренбургский медицинский вестник. – 2019. – Т. 2, № 26. – Р. 36–41.

41. Одновременное выявление глутаматдекарбоксилазы и синаптофизина в парафиновых срезах мозжечка крысы / Д. Э. Коржевский [и др.] // Морфология. – 2015. – Т. 147, № 1. – С. 74–77.

42. Пирс, Э. Гистохимия теоретическая и прикладная / Э. Пирс. – Москва: Издательство иностранной литературы, 1962. – 962 с.
43. Постнатальное развитие ультраструктуры гистаминаргических нейронов мозга крысы / С. М. Зиматкин, [и др.] // Тюменский медицинский журнал. – 2019. – Т. 21, № 1. – С. 50–54.
44. Узлова, Е. В. АТФ-синтаза в нейронах мозга крысы / Е. В. Узлова, С. М. Зиматкин // Журнал Белорусского государственного университета. Биология. – 2021. – № 3. – С. 17–27. doi: 10.33581/2521-1722-2021-3-17-27.
45. Узлова, Е. В. АТФ-синтаза клеток / Е. В. Узлова, С. М. Зиматкин // Успехи современной биологии. – 2020. – Т. 140, № 5. – С. 1–10. doi: 10.31857/S0042132420050075.
46. Узлова, Е. В. Нейроглобин в нейронах мозга крыс / Е. В. Узлова, С. М. Зиматкин // Сибирский научный медицинский журнал. – 2021. – Т. 41(4). – С. 30–39.
47. Узлова, Е. В. Нейроглобин: строение, функции, локализация в мозге в норме и при патологии / Е. В. Узлова, С. М. Зиматкин // Новости медико-биологических наук. – 2019. – Т. 19, № 1. – С. 91–96.
48. Узлова, Е. В. Распределение нейроглобина в структурах мозга крысы / Е. В. Узлова, С. М. Зиматкин // Новости медико-биологических наук. – 2019. – Т. 19 (4). – Р. 43–47.
49. Успенская, Ю. Б. Современное состояние проблемы холестаза у беременных / Ю. Б. Успенская, Н. В. Гончаренко // Пробл. женск. здоровья. – 2013. – Т. 8, № 3. – С. 70–76.
50. A change in the pattern of activity affects the developmental regression of the Purkinje cell polyinnervation by climbing fibers in the rat cerebellum / P. R. Andjus [et al.] // Neuroscience. – 2003. – Vol. 121, № 3. – P. 563–572.
51. A vertebrate globin expressed in the brain / T. Burmester [et al.] // Nature. – 2000. – Vol. 407. – №6803. – P. 520–523.
52. A vertebrate globin expressed in the brain / T. Burmester [et al.] // Nature. – 2000. – Vol. 407 (6803). – P. 520–523. doi: 10.1038/35035093.
53. Advantages and disadvantages of zinc-ethanol-formaldehyde as a fixative for immunocytochemical studies and confocal laser microscopy / D. E. Korzhevskii [et al.] // Neurosci Behav Physiol. – 2014. – Vol. 44, № 5. – P. 542–545. <https://doi.org/10.1007/s11055-014-9948-8>.
54. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system / G. M. Fimia [et al.] // Nature. – 2007. – Vol. 447. – P. 1121–1125.

55. Anatomical characterization of cytoglobin and neuroglobin mRNA and protein expression in the mouse brain / C. A. Hundahl [et al.] // *Brain. Res.* – 2010. – Vol. 1331. – P. 58–73. doi: 10.1016/j.brainres.2010.03.056.

56. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites / M. Hamasaki [et al.] // *Nature.* – 2013. – Vol. 495. – P. 389–393. doi: 10.1038/nature11910.

57. Autophagy and mitochondria: targets in neurodegenerative disorders / A. Kumar [et al.] // *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets.* – 2018. – Vol. 17, № 9. – P. 696–705. doi: 10.2174/1871527317666180816100203.

58. Autophagy and mitochondria: targets in neurodegenerative disorders / A. Kumar [et al.] // *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets.* – 2018. – Vol. 17, № 9. – P. 696–705.

59. Baker, R. Electrotonic coupling between neurones in the rat mesencephalic nucleus / R. Baker, R. Llinás // *The Journal of Physiology.* – 1971. – Vol. 212. – №1. – P. 45–63. DOI:10.1113/jphysiol.1971.sp009309.

60. Bastianelli, E. Distribution of calcium-binding proteins in the cerebellum / E. Bastianelli // *Cerebellum.* – 2003. – Vol. 2, № 4. – P. 242–262.

61. Behavioral alterations and fos protein immunoreactivity in brain regions of bile duct-ligated cirrhotic rats / L. Le Sueur-Maluf [et al.] // *An Acad Bras. Cienc.* – 2015. – Vol. 87, № 1. – P. 331–493.

62. Bilirubin-induced neurotoxicity in the preterm neonate / J. F. Watchko [et al.] // *Clinics in Perinatology.* – 2016. – Vol. 43, № 2. – P. 297–311.

63. Bon, E. I. Effect of hypoxia on morphofunctional characteristics of brain neurons and molecular markers of ischemic hypoxia / E. I. Bon, S. M. Zimatkin, N. E. Maksimovich // *Vestnik of the Smolensk State Medical Academy.* – 2021. – Vol. 20, № 1 – P. 51–57.

64. Breitman, D. R. Blunted responsiveness of the neuronal activation marker Fos in brainstem cardiovascular nuclei of cirrhotic rats / D. R. Breitman, S. S. Lee // *Hepatology.* – 1997. – Vol. 26, № 6. – P. 1380–1385.

65. Ca²⁺ signaling in cytoskeletal reorganization, cell migration, and cancer metastasis / F. C. Tsai [et al.] // *Biomed Res Int.* – 2015. – P. 409245. doi: 10.1155/2015/409245. Epub 2015 Apr 22.

66. Calbindin D-28k immunoreactivity in the rat cerebellar cortex: age-related changes / F. Amenta [et al.] // *Neurosci Lett.* – 1994. – Vol. 178, № 1. – P. 131–134.

67. Calbindin in cerebellar Purkinje cells is a critical determinant of the precision of motor coordination / J. J. Barski [et al.] // *J. Neurosci.* – 2003. – Vol. 23, №8. – P. 3469–3477.

68. Calbindin-D28K immunoreactivity in the human cerebellar cortex / P. Flace [et al.] // *Anat. Rec. (Hoboken)*. – 2014. – Vol. 297, № 7. – P. 1306–1315.
69. Calbindin-D28k in nerve cell nuclei / D. C. German [et al.] // *Neuroscience*. – 1997. – Vol. 81, № 3. – P. 735–743.
70. Carricondo, F. The Cochlear Spiral Ganglion Neurons: The Auditory Portion of the VIII Nerve / F. Carricondo, B. Romero-Gómez // *The Anatomical Record*. – 2019. – Vol. 302, № 3. – P. 463–471. doi:10.1002/ar.23815.
71. Critical re-evaluation of neuroglobin expression reveals conserved patterns among mammals / A. Fabrizius [et al.] // *Neuroscience*. – 2016. – Vol. 337. – P. 339–354. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.07.042.
72. Development of the cerebellar cortical efferent projection: an in-vitro anterograde tracing study in rat brain slices / L. M. Eisenman [et al.] // *Brain. Res. Dev.* – 1991. – Vol. 60, № 2. – P. 261–266.
73. Distinct regulation of activity-dependent transcription of immediate early genes in cultured rat cortical neurons // M. Fukuchi [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2017. – Vol. 490, № 3. – P. 682–687.
74. Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation / O. V. Vieira [et al.] // *J. Cell Biol.* – 2001. – Vol. 155. – P. 19–25. doi: 10.1083/jcb.200107069.
75. Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation / O.V. Vieira [et al.] // *J. Cell Biol.* – 2001. – Vol. 155. – P. 19–25. doi: 10.1083/jcb.200107069.
76. Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker / T. Watanabe [et al.] // *Brain Res.* – 1984. – Vol. 295. – P. 13–25.
77. Dixon, P. H. The pathophysiology of intrahepatic cholestasis of pregnancy / P. H. Dixon, C. Williamson // *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* – 2016. Jan 25. pii: S2210-7401(15)00299-5. doi: 10.1016/j.clinre.2015.12.008.
78. Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes / G. Friocourt [et al.] // *Cereb. Cortex*. – 2003. – Vol. 13, № 6. – P. 620–626.
79. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons / J. G. Gleeson [et al.] // *Neuron*. – 1999. – Vol. 23. – P. 257–271.
80. Downregulation of Purkinje cell activity by modulators of small conductance calcium-activated potassium channels in rat cerebellum / T. V. Karelina [et al.] // *Acta Naturae*. – 2016. – Vol. 8, № 4. – P. 91–99.

81. Dual phases of migration of cerebellar granule cells guided by axonal and dendritic leading processes / K. Kawaji [et al.] // *Mol. Cell. Neurosci.* – 2004. – Vol. 25, № 2. – P. 228–240.

82. Duve C. De Functions of lysosomes / C. De. Duve, R. Wattiaux // *Annu. Rev. Physiol.* – 1966. – Vol. 28. – P. 435–492. doi: 10.1146/annurev.ph.28.030166.002251.

83. Effect of ursodeoxycholic acid on the impairment induced by maternal cholestasis in the rat placenta maternal liver tandem excretory pathway / M. A. Serrano [et. al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2003. – № 305. – P. 515–524.

84. Efficacy of ursodeoxycholic acid in treating intrahepatic cholestasis of pregnancy: a meta-analysis / Y. Bacq [et all] // *Gastroenterology.* – 2012. – Vol. 143, № 6. – P. 1492–1501.

85. Embryonic stages in cerebellar afferent development / M. Rahimi-Balaei [et al.] // *Cerebellum Ataxias.* – 2015. – № 2 – P. 7. doi: 10.1186/s40673-015-0026-y.

86. Enderlin, S. Ontogeny of the calcium binding protein calbindin D-28k in the rat nervous system / S. Enderlin, A. W. Norman, M. R. Celio // *Anat. Embryol. (Berl).* – 1987. – Vol. 177, № 1. – P. 15–28.

87. Erekat, N. S. Cerebellar Purkinje cells die by apoptosis in the shaker mutant rat / N. S. Erekat // *Brain Res.* – 2017. – Vol. 1657. – P. 323–332.

88. Eshkind, L. G. Mice lacking synaptophysin reproduce and form typical synaptic vesicles / L. G. Eshkind, R. E. Leube // *Cell Tissue Res.* – 1995. – Vol. 282, № 3. – P. 423–33.

89. Evidence for the presence of a histaminergic neuron system in the rat brain: an immunohistochemical analysis / T. Watanabe [et al.] // *Neurosci. Lett.* – 1983. – Vol. 39. – P. 249–254.

90. Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues / S. Reuss [et al.] // *Neuroscience.* – 2002. – Vol. 115 (3). – P. 645–656. doi: 10.1016/s0306-4522(02)00536-5.

91. Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues / S. Reuss [et al.] // *Neuroscience.* – 2002. – Vol. 115, № 3. – P. 645-656.

92. Fimia, G. M. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system / G. M. Fimia [et al.] (Stoykova A., Romagnoli A., Giunta L., Di Bartolomeo S., Nardacci R., Corazzari M., Fuoco C., Ucar A., Schwartz P. et al.) // *Nature.* – 2007. – Vol. 447. – P. 1121–1125.

93. Fu H., Hardy J., Duff K.E. Selective vulnerability in neurodegenerative diseases / H. Fu, J. Hardy, K. E. Duff // *Nat Neurosci.* – 2018. – Vol. 21, № 10. – P. 1350–1358.

94. Fu, H. Selective vulnerability in neurodegenerative diseases / H. Fu, J. Hardy, K. E. Duff // *Nat Neurosci.* – 2018. Vol. 21. – № 10. – P. 1350–1358.
95. Fujita, M. Developmental profiles of synaptophysin in granule cells of rat cerebellum: an immunohistochemical study / M. Fujita, T. Kadota, T. Sato // *J. Electron. Microsc. (Tokyo).* – 1996. – Vol. 45, № 3. – P. 185–94.
96. Galluzzi, L. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury / L. Galluzzi, K. Blomgren, G. Kroemer // *Nature Reviews Neuroscience.* – 2009. – Vol. 10, № 7. – P. 481–494.
97. Grumati, P. Ubiquitin signaling and autophagy / P. Grumati, I. Dikic // *J. Biol. Chem.* – 2018. – Vol. 293, № 15. – P. 5404–5413. doi: 10.1074/jbc.TM117.000117.
98. Hamori, J. Differentiation of cerebellar mossy fiber synapses in the rat: a quantitative electron microscope study / J. Hamori, J. Somogyi // *J. Comp Neurol.* – 1983. – Vol. 220, № 4. – P. 365–377.
99. Hashimoto, K. Synapse elimination in the developing cerebellum / K. Hashimoto, M. Kano // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2013. – Vol. 70, № 24. – P. 4667–4680.
100. Hermanowicz-Sobieraj, B. Calcium-binding proteins expression in the septum and cingulate cortex of the adult guinea pig / B. Hermanowicz-Sobieraj, K. Bogus-Nowakowska, A. Robak // *Ann. Anat.* – 2018. – Vol. 215. – P. 30–39.
101. Horizontal membrane-intrinsic α -helices in the stator a-subunit of an F-type ATP synthase / M. Allegretti [et al.] // *Nature.* – 2015. – Vol. 521, № 7551. – P. 237–240.
102. How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina / M. Schmidt [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278 (3). – P. 1932–1935. doi: 10.1074/jbc.M209909200.
103. Human neuroglobin functions as a redox-regulated nitrite reductase / M. Tiso [et al.] // *The Journal of biological chemistry.* – 2011. – Vol. 286, № 20. – P. 18277–18289.
104. Hundahl, C. A. Neuroglobin and cytoglobin expression in the human brain / C. A. Hundahl, J. Kelsen, A. Hay-Schmidt // *Brain. Struct. Funct.* – 2013. – Vol. 218 (2). – P. 603–609. doi: 10.1007/s00429-012-0480-8.
105. Hz corneal kindling in mice triggers neurobehavioral comorbidities accompanied by relevant changes in c-Fos immunoreactivity throughout the brain / G. Albertini [et al.] // *Epilepsia.* – 2018. – Vol. 59, № 1. – P. 67–78.
106. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde / D. E. Korzhenskii [et al.] // *Eur J. Histochem.* – 2015. – Vol. 59(3). <https://doi.org/10.4081/ejh.2015.2530>.

107. Komuro, H. Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer / H. Komuro, E. Yacubova, P. Rakis // *J. Neurosci.* – 2001. Vol. 21, № 2. – P. 527-540.

108. Kwon, S. E. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons / S. E. Kwon , E. R. Chapman // *Neuron.* – 2011. – Vol. 70, № 5. – P. 847–854.

109. Lin, M. T. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases / M. T. Lin, M. F. Beal // *Nature.* – 2006. – Vol. 443, № 7113. – P. 787–795.

110. Liu, Y. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy / Y. Liu, B. Levine // *Cell Death Differ.* – 2015. – Vol. 22. – P. 367–376. doi: 10.1038/cdd.2014.143.

111. Localization of neuroglobin protein in the mouse brain / S. Wystub [et al.] // *Neurosci. Lett.* – 2003. – Vol. 346 (1-2). – P. 114–116. doi: 10.1016/s0304-3940(03)00563-9.

112. Luzio, J. P. Lysosomes: fusion and function / J. P. Luzio, P. R. Pryor, N. A. Bright // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2007. – Vol. 8, № 8. – P. 622–632.

113. Metabolic basis of neuronal vulnerability to ischemia; an in vivo untargeted metabolomics approach / S. Rashad [et al.] // *Sci Rep.* – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 6507.

114. Metabolic basis of neuronal vulnerability to ischemia; an in vivo untargeted metabolomics approach / S. Rashad [et al.] // *Sci Rep.* – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 6507.

115. Mitochondrial dysfunctions contribute to energy deficits in rodent model of hepatic encephalopathy / S. Dhanda [et al.] // *Metabolic Brain Disease.* – 2018. – Vol. 33, № 1. – P. 209–223.

116. Mitochondrial membrane potential is dependent on the oligomeric state of F1F0-ATP synthase supracomplexes / C. Bornhovd [et al.] // *J. Biol Chem.* – 2006. – Vol. 281. – № 20. – P. 13990-13998.

117. Moretto, J. N. Acute restraint stress decreases c-fos immunoreactivity in hilar mossy cells of the adult dentate gyrus / J. N. Moretto, A. M. Duffy, H. E. Scharfman // *Brain Struct. Funct.* – 2017. – Vol. 222, № 5. – P. 2405–2419.

118. Moretto, J. N. Acute restraint stress decreases c-fos immunoreactivity in hilar mossy cells of the adult dentate gyrus / J.N. Moretto, A.M. Duffy, H.E. Scharfman // *Brain Struct. Funct.* – 2017. – Vol. 222, № 5. – P. 2405–2419.

119. Mullen, R. J. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates / R. J. Mullen, C. R. Buck, A. M. Smith // *Development.* – 1992. – Vol. 116, № 1. – P. 201–211.

120. Neuroglobin immunoreactivity in the human cochlea / N. Vorasubin [et al.] // *Brain. Res.* – 2016. – Vol. 1630. – P. 56–63. doi: 10.1016/j.brainres.2015.11.002.

121. Neuroglobin mRNA expression after transient global brain ischemia and prolonged hypoxia in cell culture / R. Schmidt-Kastner [et al.] // *Brain Research.* – 2006. – Vol. 1103 (1). – P. 173–180. doi: 10.1016/j.brainres.2006.05.047.

122. Neuroglobin mRNA expression after transient global brain ischemia and prolonged hypoxia in cell culture / R. Schmidt-Kastner [et al.] // *Brain Research.* – 2006. – Vol. 1103(1). – P. 173–180. doi: 10.1016/j.brainres.2006.05.047.

123. Neuroglobin protects neurons against oxidative stress in global ischemia / R. C. Li [et al.] // *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* – 2010. – Vol. 30 (11). – P. 1874–1882. doi: 10.1038/jcbfm.2010.90.

124. Neuroglobin protects the brain from experimental stroke in vivo / Y. Sun [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – Vol. 100(6). – P. 3497–3500. doi:10.1073/pnas.0637726100.

125. Neuroglobin-overexpressing transgenic mice are resistant to cerebral and myocardial ischemia / A. A. Khan [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 103 (47). – P. 17944–17948. doi:10.1073/pnas.0607497103.

126. Neuronal calcium signaling: function and dysfunction / M. Brini [et al.] // *Cell Mol. Life Sci.* – 2014. – V.71, N15. – P. 2787–2814.

127. Neurons within the trigeminal mesencephalic nucleus encode for the kinematic parameters of the whisker pad macrovibrissae / O. Mameli [et al.] // *Physiological Reports.* – 2017. – Vol. 5, №10. e13206. DOI:10.14814/phy2.13206.

128. Normal cortical regional cerebral blood flow justifies the normal neuropsychological performance in patients with cholestatic liver disease / M. Senzolo [et al.] // *Psychiatry Clin. Neurosci.* – 2007. – Vol. 61, № 2. – P. 209–210.

129. Paired-pulse facilitation at recurrent Purkinje neuron synapses is independent of calbindin and parvalbumin during high-frequency activation / G. Bornschein [et al.] // *J. Physiol.* – 2013. – Vol. 591, № 13. – P. 3355–3370.

130. Panula, P. Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus / P. Panula, H.-Y. T. Yang, E. Costa // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1984. – Vol. 81. – P. 2572–2576.

131. Paxinos G. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th edition / G. Paxinos, C. Watson. – London: Academic Press, 2007. – 456 p.

132. Platinum drugs and neurotoxicity: effects on intracellular calcium homeostasis / V. M. Piccolini [et al.] // *Cell Biol. Toxicol.* – 2013. – Vol. 29, № 5. – P. 339–353.

133. Postnatal expression of Doublecortin (DCX) in the developing cerebellar cortex of mouse / J. Takács [et al.] // *Acta Biol.* – 2008. – Vol. 59, № 2. – P. 147–161.

134. Propofol exposure in early life induced developmental impairments in the mouse cerebellum / R. Xiao [et al.] // *Front. Cell Neurosci.* – 2017. 11:373. doi: 10.3389/fncel.2017.00373.

135. Role of the heme oxygenase/carbon monoxide pathway in the pathogenesis and prevention of hepatic encephalopathy / Q. M. Wang [et al.] // *Mol. Med. Rep.* – 2013. – Vol. 8, № 1. – P. 67–74.

136. Schmidt-Kastner, R. Genomic approach to selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia-hypoxia / R. Schmidt-Kastner // *Neuroscience.* – 2015. – Vol. 309. – P. 259–279.

137. Scotti, A. L. Calbindin D28k in the olivocerebellar projection. A light and electron microscope study / A. L. Scotti // *Journal of Anatomy.* – 1995. – Vol. 187, № 3. – P. 649–659.

138. Single course of antenatal betamethasone produces delayed changes in morphology and calbindin-D28k expression in a rat's cerebellar Purkinje cells / R. Pascual [et al.] // *Acta Neurobiol. Exp. (Wars).* – 2014. – Vol. 74, № 4. – P. 415–423.

139. Synaptophysin expression during synaptogenesis in the rat cerebellar cortex / N. Leclerc [et al.] // *J. Comp. Neurol.* – 1989. – Vol. 280, № 2. – P. 197–212.

140. The role of CD4-dependent signaling in interleukin-16 induced c-Fos expression and facilitation of neurite outgrowth in cerebellar granule neurons / C. H. Fenster [et al.] // *Neurosci. Lett.* – 2010. – Vol. 485, № 3. – P. 212–216.

141. The synaptophysin – synaptobrevin complex: a hallmark of synaptic vesicle maturation / A. Becher [et al.] // *J. Neurosci.* – 1999. – Vol. 19, № 6. – P. 1922–1931.

142. Tosqui, P. Neuroglobin and cytoglobin: two new members of globin family / P. Tosqui, M. F. Colombo // *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* – 2011. – Vol. 33 (4). – P. 307–311. doi: 10.5581/1516-8484.20110082.

143. Transient biochemical compartmentalization of Purkinje cells during early cerebellar development / M. Wassef [et al.] // *Dev. Biol.* – 1985. – № 111. – P. 129–137.

144. Wang, X. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain / X. Wang, E. K. Michaelis // *Front Aging Neurosci.* – 2010. – Vol. 2. – P. 12.

145. West, M. J. Early formation of synapses in the molecular layer of the fetal rat cerebellum / M. J. West, M. del Cerro // *J. Comp. Neurol.* – 1976. – Vol. 165, № 2. – P. 137–153.

146. Working memory impairment and reduced hippocampal and prefrontal cortex c-Fos expression in a rat model of cirrhosis / M. Méndez [et al.] // *Physiol. Behav.* – 2008. – Vol. 95, № 3. – P. 302–307.

147. Yamaguchi, K. Rhythmic discharge of mitral cells in the carp olfactory bulb / K. Yamaguchi, K. Ueda // *Brain Research.* – 1984. – Vol. 322. – № 2. – P. 378–381. DOI:10.1016/0006-8993(84)90138-0.

148. Yu, Z. Mitochondrial mechanisms of neuroglobin's neuroprotection / Z. Yu, J. L. Poppe, X. Wang // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2013. – P. 756989. doi: 10.1155/2013/756989.

Материал и методы исследования

Описанные выше исследования проведены на беспородных белых крысах разного возраста в норме и при разной экспериментальной патологии (холестаз, потомство крыс с холестазом или потреблявших алкоголь во время беременности, церебральная ишемия, вызванная перевязкой сонных артерий, и др.). Животных содержали в стандартных условиях вивария, пищу и воду не ограничивали. Исследования выполнялись в соответствии с требованиями Директивы Европейского Парламента и Совета № 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, используемых для научных целей. На проведение всех исследований получены разрешения Комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета.

Животных выводили из эксперимента быстрой декапитацией в утренние часы. Образцы соответствующих отделов мозга фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде при +4 °С в течение 20 часов, для хорошего сохранения антигенных свойств изучаемых молекулярных маркёров [Korzhevskii et al., 2014, 2015; Коржевский, 2015] обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли в ксилолах и заключали в парафин. Серийные срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью микротомы Leica 2125 RTS (Германия) и монтировали на предметные стекла.

Один срез из каждой серии окрашивали по методу Ниссля для идентификации структур мозга по атласу [Paxinos, Watson, 2007]. Другие срезы серии окрашивали иммуногистохимически для выявления необходимых молекулярных маркёров. Среди сотен имеющихся на рынке маркёров были выбраны те, которые наиболее эффективно оценивают состояние нейронов, а также применимы для парафиновых срезов мозга крысы.

Для иммуногистохимического выявления *гистидиндекарбоксилазы* применяли первичные моноклональные мышинные антитела GAD67 фирмы Abcam (Великобритания, ab. 26116) в разведении 1:2000 при +4 °С, экспозиция 20 ч во влажной камере. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (Великобритания, ab. 80436).

Для иммуногистохимического выявления **МАО Б** применяли первичные поликлональные кроличьи антитела против МАО Б фирмы Elabscience, cat. No. EPP15673 (Китай) в разведении 1:100, при +4 °С, 20 ч во влажной камере. Связавшиеся первичные антитела выявляли с помощью набора детекции Elabscience cat. No. E-IR-R213 (Китай).

Для иммуногистохимического выявления **даблкортина** применяли первичные поликлональные кроличьи антитела фирмы Abcam (Великобритания) ab.18723, для NeuN – ab.128886 (в разведении 1:400, при +4 °С, 20 ч во влажной камере). Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit ab.80437 Abcam (Великобритания)

Для выявления **АТФ-синтазы и нейроглобина** использовали первичные моноклональные мышинные антитела Anti-ATP5A antibody фирмы Abcam (Великобритания, ab. 14748) и Anti-Neuroglobin antibody фирмы Abcam (Великобритания, ab. 37258) в оптимальном разведении 1:2400 и 1:600 соответственно, экспозиция 20 ч при +4 °С во влажной камере. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit – Micro-polymer (Великобритания, Abcam, ab236466).

Для иммуногистохимического выявления **кальбиндина-D28k** применяли первичные поликлональные кроличьи антитела Rabbit polyclonal antibody фирмы Abcam (Великобритания, ab. 11426) в разведении 1:1200, при +4 °С, экспозиция 20 ч во влажной камере. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (Великобритания, ab. 80437).

Для выявления **АМВРА1** применяли первичные моноклональные мышинные антитела Anti-Neuroglobin antibody фирмы Abcam (Великобритания, ab. 37258) в разведении 1:600 при +4 °С, экспозиция 20 ч во влажной камере. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (Великобритания, ab. 80436).

Для иммуногистохимического выявления **c-fos** применяли первичные поликлональные кроличьи антитела c-fos фирмы Abcam (Великобритания, ab 209794) в разведении 1:1000 при +4 °С, экспозиция 20 ч во влажной камере. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (Великобритания, ab. 80437).

Для иммуногистохимического выявления *синаптофизина* применяли первичные поликлональные кроличьи антитела фирмы Thermo Scientific (США) Synaptophysin Antibody (PA5-27286) (в разведении 1:400, при +4 °С, экспозиция 20 ч во влажной камере). Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор Thermo Scientific (США) Super Picture™ Polymer Detection Kit.

Оптимальное разведение первичных антител (с максимальным соотношением в срезе сигнал/фон) подбирали опытным путём, выбирая из разведений от 1:50 до 1:3000. В качестве отрицательного контроля использовали препараты, при изготовлении которых вместо первичных антител срезы обрабатывали нормальной кроличьей сывороткой (иммунопозитивная окраска в них отсутствовала). Внутренним отрицательным контролем служили мозговые оболочки (они не должны окрашиваться), а положительным контролем – структуры с известным высоким содержанием изучаемого маркера.

В качестве положительного контроля использовали ткани с известным высоким содержанием изучаемых маркеров. В качестве отрицательного контроля использовали срезы, которые вместо первичных антител обрабатывали нормальной кроличьей сывороткой (иммунопозитивная окраска в них отсутствовала). Дополнительным внутренним отрицательным контролем служили мозговые оболочки и ядра нейронов (иммунопозитивная окраска в них должна была отсутствовать).

Изучение иммуногистохимических препаратов, их микрофотографирование и морфометрию проводили с помощью микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры Leica DFC 320 (Leica Microsystems GmbH, Германия) и программы компьютерного анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США).

Для анализа полученных цифровых данных использовали методы непараметрической статистики. Иммунореактивность выявляемых маркеров выражали в единицах оптической плотности $\times 10^3$. Полученные первичные цифровые данные обрабатывали с помощью компьютерной программы Statistica 10.0 для Windows (StatSoft, Inc., США; серийный номер 31415926535897). Результаты цитофотометрии представляли в виде Me (LQ; UQ), где Me – медиана, LQ – нижний квартиль, UQ – верхний квартиль. Для сравнения контрольной и опытных групп использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test) и H-критерий Краскела-Уоллиса (Kruskal-Wallis H Test). Различия между группами считались статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5% ($p < 0,05$).

SUMMARY

Zimatkin S.M.

Immunohistochemistry in assessing the brain neurons

In the studies summarized in this book, we evaluated the neurotransmitter nature of brain neurons, identifying specific enzymes of neurotransmitter synthesis or degradation in them. Using the Ki-67 as a marker, the dividing progenitors of neurons were selectively visualized, and the doublecortin marker the migrating progenitors of neurons, the NeuN marker – for determination of the mature neurons, as well as the degree and dynamics of their differentiation. To assess the energy potential of neurons, the mitochondrial crist protein ATP synthase was used as a marker, the oxygen depot in neurons – the neuroglobin protein, and the calcium depot – calbindin. To assess the regulation of autophagy in neurons, its activator AMBRA1 was detected. The appearance and accumulation of the c-Fos rapid response gene protein in brain neurons in the early stages of cholestasis were observed. Synaptophysin, a marker of synaptic vesicles, was used to evaluate the synaptic apparatus of brain neurons and synaptogenesis.

Therefore, the immunohistochemical studies of specific molecular markers are a reliable and effective tool for assessing the morphofunctional and metabolic state of brain neurons in normal and in various pathologies.

Immunohistochemical methods are especially useful in complex studies of the morphofunctional state of brain neurons. They complement classical neurohistological, electron microscopic and histochemical methods that determine the size and shape of the bodies of neurons and their organelles, as well as the activity of enzymes and the content of various non-protein substances that are not detected by immunohistochemical methods.

The book contains 128 pages, includes 151 references and illustrated by 52 figures – 52 and 17 tables.

Научное издание

Зиматкин Сергей Михайлович

**ИММУНОГИСТОХИМИЯ
В ОЦЕНКЕ НЕЙРОНОВ МОЗГА**

Монография

Ответственный за выпуск С. Б. Вольф

Компьютерная верстка М. Я. Милевской
Корректор М. Я. Милевская

Подписано в печать 18.12.2023.
Формат 60x84/16. Бумага офсетная.
Гарнитура Times New Roman. Ризография.
Усл. печ. л. 7,67. Уч.-изд. л. 5,40. Тираж 20 экз. Заказ 147.

Издатель и полиграфическое исполнение
учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет».
ЛП № 02330/445 от 18.12.2013.
Ул. Горького, 80, 230009, Гродно.