

Министерство здравоохранения Республики Беларусь

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ГРОДНЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии

С. М. Зиматкин, Е. В. Узлова

**АТФ-СИНТАЗА И НЕЙРОГЛОБИН
В НЕЙРОНАХ МОЗГА КРЫСЫ ПРИ ИШЕМИИ**

Монография

Гродно
ГрГМУ
2024

УДК 612.82.014.2:577.12:616.831-005.4]-092.9

ББК 28.06

3-62

Рекомендовано Редакционно-издательским советом ГрГМУ
(протокол № 6 от 26.03.2024 г.).

Авторы: зав. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии учреждения образования
«Гродненский государственный медицинский университет»,
д-р биол. наук, проф. С. М. Зиматкин;
зав. каф. химии и биотехнологии учреждения образования
«Гродненский государственный университет имени Янки Купалы»
канд. биол. наук Е. В. Узлова.

Рецензенты: зав. каф. патологической физиологии им. Д. А. Маслакова
учреждения образования «Гродненский государственный
медицинский университет», д-р мед. наук, проф. Н. Е. Максимович;
проф. каф. анатомии животных учреждения образования
«Гродненский государственный аграрный университет»,
д-р ветеринар. наук, проф. В. В. Малашко.

Зиматкин, С. М.

3-62 АТФ-синтаза и нейроглобин в нейронах мозга крысы при ишемии : монография
/ С. М. Зиматкин, Е. В. Узлова. – Гродно : ГрГМУ, 2024. – 164 с.
ISBN 978-985-595-885-8.

В монографии представлены аналитические обзоры литературы по АТФ-синтазе и нейроглобину, обобщены результаты иммуногистохимических исследований, проводившихся на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии ГрГМУ по изучению регионального и клеточного распределения этих специфических белков в мозге крысы. Представлены соответствующие топографические атласы и результаты корреляционного анализа распределения АТФ-синтазы и нейроглобина в структурах мозга. Оценены степень повреждения нейронов разных отделов мозга и изменения содержания изучаемых белков при субтотальной ишемии мозга. Проанализирована связь исходного содержания и изменений АТФ-синтазы и нейроглобина со степенью ишемического повреждения нейронов мозга.

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

УДК 612.82.014.2:577.12:616.831-005.4]-092.9

ББК 28.06

ISBN 978-985-595-885-8

© Зиматкин С. М., Узлова Е.В., 2024
© ГрГМУ, 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

Перечень сокращений и обозначений.....	4
Введение.....	5
Глава 1	
АТФ-СИНТАЗА КЛЕТКИ	6
Глава 2	
НЕЙРОГЛОБИН	14
Глава 3	
РЕГИОНАЛЬНОЕ И КЛЕТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АТФ-СИНТАЗЫ В МОЗГЕ КРЫСЫ.....	31
Глава 4	
РЕГИОНАЛЬНОЕ И КЛЕТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ НЕЙРОГЛОБИНА В МОЗГЕ КРЫСЫ.....	52
Глава 5	
СРАВНЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АТФ-СИНТАЗЫ И НЕЙРОГЛОБИНА В МОЗГЕ КРЫСЫ.....	76
Глава 6	
ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В НЕЙРОНАХ РАЗНЫХ ОТДЕЛОВ МОЗГА КРЫСЫ ПРИ СУБТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ	81
Глава 7	
ЗНАЧЕНИЕ ИСХОДНОГО СОДЕРЖАНИЯ АТФ-СИНТАЗЫ И НЕЙРОГЛОБИНА ДЛЯ ХАРАКТЕРА И СТЕПЕНИ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕЙРОНОВ МОЗГА	100
Глава 8	
ИЗМЕНЕНИЯ АТФ-СИНТАЗЫ В НЕЙРОНАХ РАЗНЫХ ОТДЕЛОВ МОЗГА КРЫСЫ ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ	104
Глава 9	
ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОГЛОБИНА В НЕЙРОНАХ РАЗНЫХ ОТДЕЛОВ МОЗГА КРЫСЫ ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ	111
Глава 10	
СРАВНЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ В МОЗГЕ АТФ-СИНТАЗЫ И NG2 ПОСЛЕ ИШЕМИИ И СО СТЕПЕНЬЮ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕЙРОНОВ.....	118
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	123
Библиографический список	125
Приложение	145

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДФ	– аденозиндифосфорная кислота
АТФ	– аденозинтрифосфорная кислота
АТФ-синтаза	– аденозинтрифосфатсинтаза
Ед. опт. пл.	– единица оптической плотности
ИР	– иммунореактивность
КП	– клетки Пуркинье
П	– Приложение
СИГМ	– субтотальная ишемия головного мозга
ТПМ	– травматическое повреждение мозга
Увелич.	– увеличение
у. е.	– условные единицы (единицы оптической плотности, $\times 10^3$)
ЦНС	– центральная нервная система
ЭТЦ	– электрон-транспортная цепь
LQ	– нижний квартиль
Me	– медиана
Ngb	– нейроглобин
p	– уровень значимости
PDGF	– рецептор тромбоцитарного фактора роста
pH	– водородный показатель
PINK-1	– PTEN-индуцированная киназа 1
UQ	– верхний квартиль

ВВЕДЕНИЕ

Аденозинтрифосфатсинтаза (АТФ-синтаза) – интегральный белок внутренней мембраны митохондрий, обеспечивающий ее складчатость и синтез большей части аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) в клетке [1, с. 1-47; 2; 3; 4, с. 1-15; 5, с. 13231-13236; 6, с. 286-294]. Нарушения сборки и функционирования АТФ-синтазы – причина многих метаболических расстройств [7, с. 161-191] и нейродегенеративных заболеваний [8, с. 254-260; 9, с. 190-194]. В связи с этим АТФ-синтаза является потенциальной терапевтической мишенью [9, с. 194-195; 10, с. 2-9].

Металлопротеин нейроглобин (Ngb) обеспечивает в нервных клетках депонирование и перенос кислорода к митохондриям, нейтрализацию активных форм кислорода и азота, уменьшение окислительного стресса и апоптоза [11, с. 18279-18284; 12, с. 66-78; 13, с. 111-118; 14; 15, с. 2-5; 16, с. 491-494; 17, с. 36507-36511]. Ngb является нейропротектором и регулятором функционирования нейронов в норме и при патологии. В опытах с Ngb-трансгенными крысами было установлено, что Ngb защищает мозг при ишемии-реперфузии [18, с. 15306-15310; 19, с. 4-12; 20; 21, с. 1876-1880; 22; 23].

Комплексное исследование АТФ-синтазы и Ngb нейронов разных структур мозга в норме и при ишемии интересно вследствие участия обоих белков в поддержании кислородного гомеостаза нервных клеток [24, с. 6996-7006]. Сравнительное изучение регионального и клеточного распределения этих белковых комплексов в мозге может дать более полную оценку энергетическому потенциалу и депо кислорода в нейронах разных отделов мозга и взаимосвязям между ними. Полученная информация будет актуальна для дальнейших исследований роли и функций АТФ-синтазы и Ngb в норме и при нейропатологиях различного генеза.

Церебральная ишемия – одна из наиболее частых причин смерти и инвалидизации населения во всем мире и, как следствие, проблема медицинская и социально значимая [25, с. 184-316]. Последствия церебральной ишемии зависят от степени и длительности снижения мозгового кровотока, а также особенностей региональной чувствительности к ней структур головного мозга [26, с. 34-93, с. 157-166, с. 178-186].

Все это определяет важность и актуальность изучения особенностей регионального и клеточного распределения АТФ-синтазы и Ngb в мозге, их изменений при ишемии.

Глава 1

АТФ-СИНТАЗА КЛЕТКИ

АТФ – универсальный источник энергии в живых организмах, и его синтез является неотъемлемой частью жизнедеятельности клетки. Основной способ образования АТФ – окислительное фосфорилирование [27, с. 73-79] – представляет собой результат совместной работы электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) и АТФ-синтазы митохондрий. ЭТЦ включает так называемые комплексы: I – НАДН-дегидрогеназный комплекс, II – сукцинатдегидрогеназу, III – цитохром- bc_1 -комплекс, IV – цитохром-с-оксидазу – и АТФ-синтазу, которая иногда рассматривается как V комплекс цепи, хотя и не принимает участия в процессе переноса электронов (рисунок 1.1). При этом особый интерес представляет АТФ-синтаза, поскольку именно она является основным компонентом в процессе синтеза АТФ и играет ключевую роль в развитии нейродегенеративных заболеваний [9, с. 190-194].

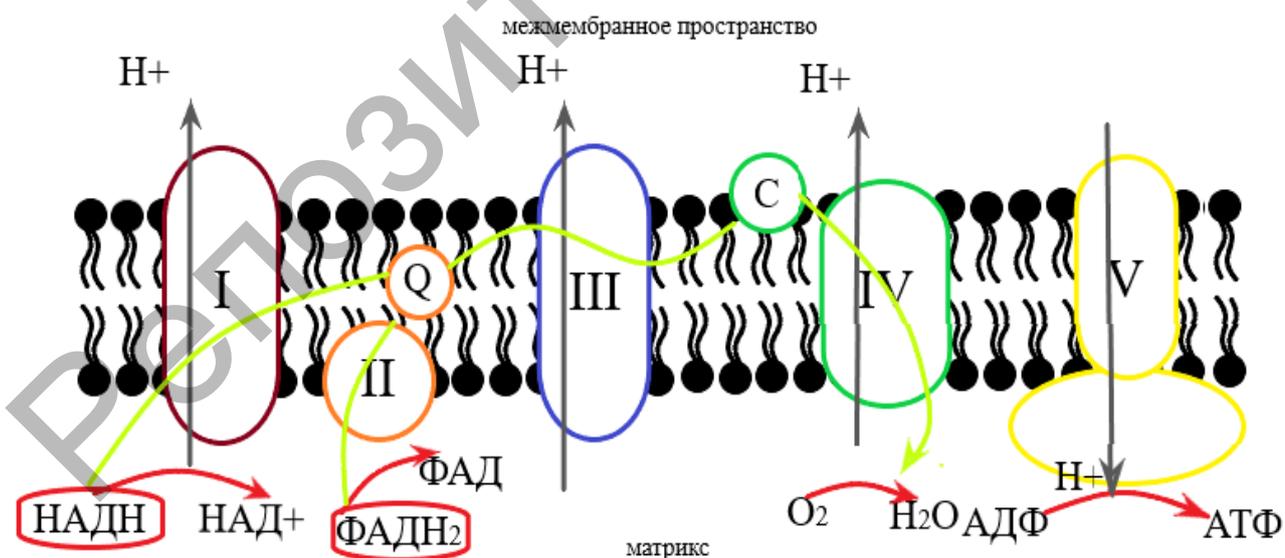


Рисунок 1.1 – Расположение и взаимодействие комплексов ЭТЦ во внутренней мембране митохондрий (I-V – комплексы ЭТЦ, Q – убихинон, с – цитохром с)

АТФ-синтаза – фермент, состоящий из белковых субъединиц и представляющий собой «молекулярную машину», снабженную уникальным роторным механизмом [3; 4, с. 1-15; 5, с. 13232-13233]. АТФ-синтаза универсальна, поскольку присутствует как в клетках прокариот, так и эукариот.

Митохондриальная АТФ-синтаза млекопитающих сложна и весьма разнообразна. Она имеет вид грибовидной структуры с каналом внутри и включает два компонента: F_0 , или фактор сопряжения F_0 (индекс «о» обозначает олигомицин), пронизывает внутреннюю мембрану митохондрий – гидрофобный; F_1 , или фактор сопряжения F_1 (сокр. от англ. fraction 1 – ‘часть 1’), располагается в матриксе митохондрий – гидрофильный (рисунок 1.2). В свою очередь каждый из этих компонентов состоит из множества субъединиц [1, с. 1-47; 2; 6, с. 286-294].

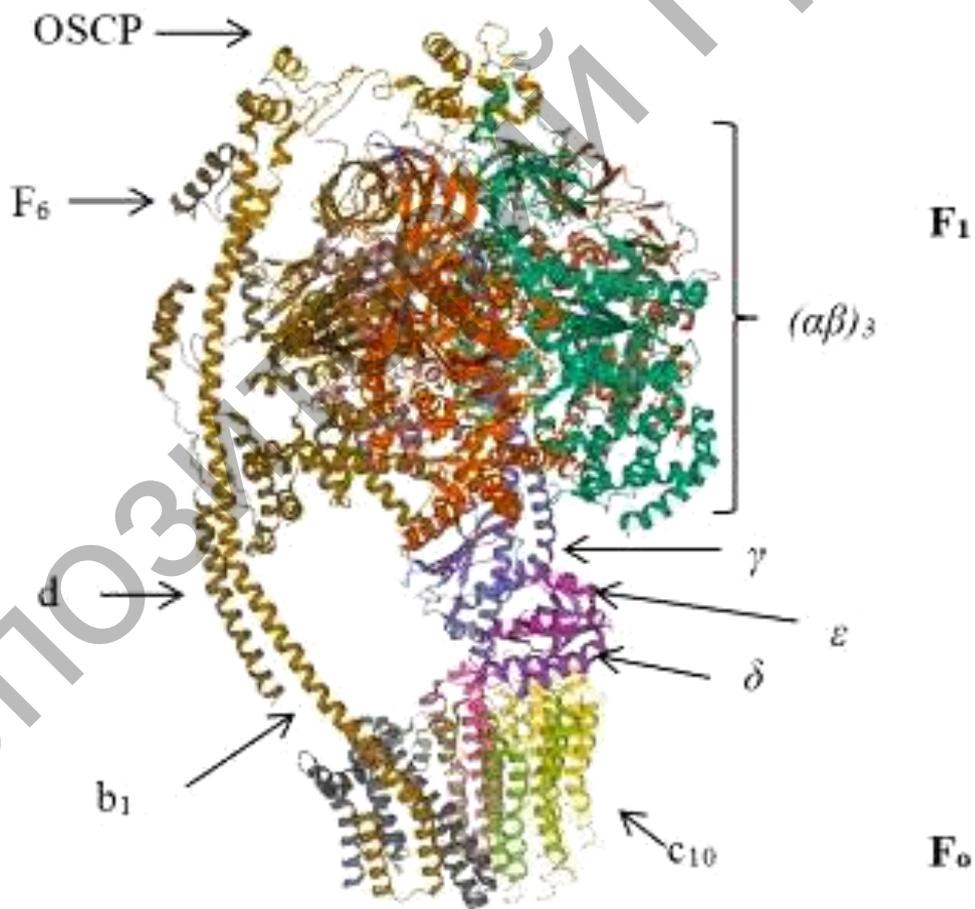


Рисунок 1.2 – Структура АТФ-синтазы митохондрий бычьих кардиомиоцитов, конформация 1А (OSCP, F_6 , d, b_1 , c_{10} , α -, β -, γ -, δ -, ϵ -субъединицы) (модифицировано по Zhou et al. [4, с. 1-15])

Компонент F_1 эукариот, являющийся «головной» частью грибовидной структуры, состоит из девяти субъединиц: трех α и трех β , одной γ , δ и ϵ [2]. Полипептидные цепи α и β расположены таким образом, что формируют шарообразный гексамер $(\alpha\beta)_3$ с шестью сайтами связывания (три из которых – каталитические и три – некаталитические) и полостью [28, с. 27283-27293; 29, с. 366-375; 30, с. 106-110]. В полости гексамера $(\alpha\beta)_3$ располагаются субъединицы γ и ϵ , при этом γ располагается и вращается под углом 120° к гексамеру; δ -субъединица располагается на наружной стороне. Вместе эти три субъединицы входят в состав центрального стержня [1, с. 1-47; 30, с. 106-110].

Диаметр фактора сопряжения F_1 достигает 9 нм [31, с. 74-80, с. 88-98], поэтому АТФ-синтазу можно увидеть в электронном микроскопе на кристах внутренней мембраны митохондрий и с помощью криоэлектронной томографии [32, с. 4251-4253].

Компонент F_0 АТФ-синтазы весьма вариабелен, и в зависимости от вида организма в нем возможно наличие большего или меньшего количества субъединиц [33, с. 1069-1072; 34, с. 214-216; 35, с. 5475-5480; 36, с. 18230-18232]. F_0 состоит из с-кольца (роторного кольца), содержащего 8 копий субъединицы, и одной копии каждой из субъединиц а и b [1, с. 1-47; 2; 6, с. 286-294]. С-кольцо связано с b-субъединицей через а-субъединицу [1, с. 1-47; 30, с. 106-110]. Кроме этих трех основных субъединиц, которые присутствуют в том числе и у бактерий, у эукариот имеются и другие – олигомицин-чувствительный белок (название белок получил благодаря антибиотику олигомицину, действие которого подавляет действие АТФ-синтазы) [37, с. 72-77; 38, с. 507-515], а также b, d, F_6 , иногда – f, e и g. Функции некоторых из этих субъединиц до сих пор не установлены. Известно, что субъединицы b, d, f, e, g и F_6 формируют периферический стержень АТФ-синтазы [1, с. 1-47; 6, с. 286-294].

АТФ-синтаза использует энергию, созданную протонным электрохимическим градиентом, для фосфорилирования аденозиндифосфорная кислота (АДФ) в АТФ в компоненте F_1 [39, с. 191-196; 40, с. 154-159; 41, с. 2153-2155]. Механизм ее работы носит название ротационного, или вращательного, катализа [42, с. 2-5]. В течение полного оборота субъединицы γ , каждый каталитический сайт меняет три конформации [43, с. 220-221, с. 228-229].

При этом можно выделить две функциональные части в АТФ-синтазе – движущуюся, так называемый ротор, и статор [1, с. 1-47].

Механизм работы АТФ-синтазы представляется следующим образом: из межмембранного пространства протоны переносятся в F_0 компонент, приводя его в движение, и, как следствие, приводя в движение связанный с ним F_1 компонент [44, с. 346-349]; движение последнего поочередно активирует каталитические субъединицы и изменение их конформаций [45, с. 233-238]. Первая конформация отвечает за удержание АДФ и фосфорной кислоты, вторая – за образование макроэргической связи, третья – за высвобождение АТФ и захват новой АДФ и фосфорной кислоты.

Значительный вклад в изучение механизма работы АТФ-синтазы внесла группа японских ученых, сумевшая «прикрепить» к этому комплексу магнитные частицы и привести ее в действие. При движении по часовой стрелке происходил синтез АТФ в количестве 5 молекул в секунду, а при движении против часовой стрелки или отсутствии движения – гидролиз АТФ [46]. Примечательно, что АТФ-синтаза отличается чрезвычайно высоким коэффициентом полезного действия – близким к 100% [47, с. 7-17].

АТФ-синтаза способна осуществлять и обратный ротационному катализу процесс – гидролиз АТФ и перекачивать протоны через внутреннюю мембрану. В нормально функционирующих митохондриях АТФ-синтаза работает в направлении синтеза АТФ. Если же нормальное течение дыхания в митохондриях подвергается риску, АТФ-синтаза начинает осуществлять процесс гидролиза АТФ, а поскольку расщепление большого количества АТФ нежелательно, АТФ-синтаза ингибируется особым белком – фактором ингибирования IF_1 [1, с. 1-47; 48, с. 3763-3768], активность которого зависит от уровня рН. IF_1 блокирует F_1 -АТФазную активность [49, с. 10142-10145], связываясь с двумя участками F_1 -компонента, и играет исключительно важную роль в защите клеток при ишемии [44, с. 346-349; 50; 51, с. 15-19].

Количество IF_1 в нейронах возрастает при гипоксии и при ишемическом прекондиционировании, а собственно нейропротекторный эффект обеспечивается за счет препятствия IF_1 снижению количества АТФ, изменению проницаемости митохондриальной мембраны и накоплению PINK1 при гипоксии и ишемии [50].

Существуют и другие соединения, оказывающие ингибирующий эффект на гидролизную активность АТФ-синтазы, например бедаквилин [52, с. 3-7].

Иногда АТФ-синтаза не способна выполнять функцию синтеза АТФ – так происходит в бурой жировой ткани. Окислительное фосфорилирование в ее клетках находится на очень низком уровне вследствие присутствия белка термогенина UCP1 [53, с. 10-18], относящегося к трансмембранным разобщающим белкам. Механизм его действия заключается в увеличении проницаемости внутренней мембраны для протонов, что за счет разобщения клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования ведет к значительному снижению протонного градиента и синтеза АТФ [54, с. 36-45; 55, с. 299-303].

Кроме энергоснабжения, АТФ-синтаза участвует и в формировании структуры крист внутренней мембраны митохондрий [56, с. 2-7; 57, с. 13602-13606; 58, с. 221-230]. Это осуществляется за счет существования АТФ-синтазы в виде V-образных димеров с углом 70-90° градусов между фрагментами димера, которые соединяются в так называемые «ленты», расположенные вдоль сильно изогнутых краев крист внутренней мембраны и «растягивающиеся» на сотни нанометров [32, с. 4251; 58, с. 221-230; 59, с. 14122-14123; 60, с. 1779; 61, с. 445-453]. С помощью электронной криотомографии было доказано, что димеры АТФ-синтазы образуются самопроизвольно и таким образом «изгибают» мембраны, что является первой ступенью в формировании структуры внутренней мембраны митохондрий (рисунок 1.3) [32, с. 4251-4252].

Исследование, проведенное на мутантных мышах с экспрессией человеческого IF₁ в нервных клетках, продемонстрировало и возможную связь активностей АТФ-синтазы с клеточной смертью [62, с. 763-767]. IF₁, блокирующий синтазную и гидролизную активности АТФ-синтазы [63, с. 1169-1177], используется раковыми клетками для ингибирования ее способности синтезировать активные формы кислорода, так как их синтез приводит к запуску апоптотических процессов. Оказалось, что опосредованное IF₁ метаболическое прекондиционирование приводило к «мягкому» окислительному стрессу и повышению функционального порога, на котором повреждения приводили к клеточной смерти. За счет ингибирования активностей АТФ-синтазы IF₁-мышь оказались частично

защищены от повреждения некоторыми агентами, например хинолиновой кислотой, несмотря на весьма низкие количества АТФ и АДФ. Таким образом, удалось избежать значительного повреждения нервных клеток за счет предотвращения синтеза активных форм кислорода, что предполагает значительную роль АТФ-синтазы в гибели клеток и делает фермент потенциальной «мишенью» для ее предотвращения [62, с. 763-767].

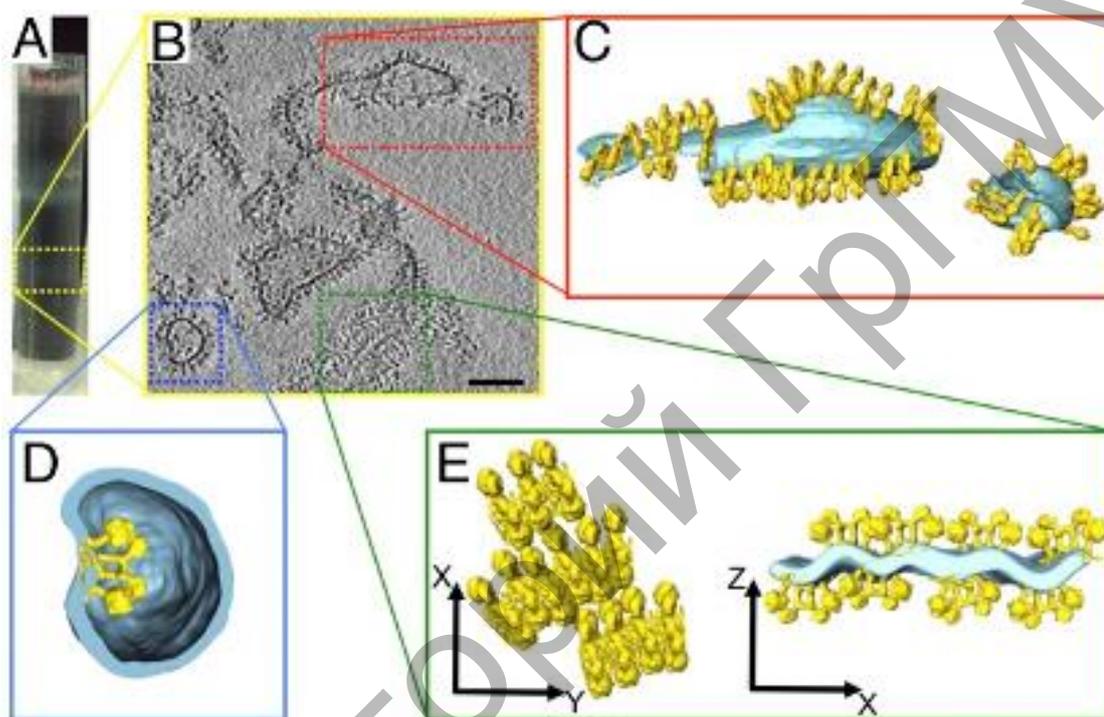


Рисунок 1.3 – Димеры АТФ-синтазы *Polytomella sp.*, изгибающие мембраны:

- А** – выделенная нижняя полоса градиента содержит протеолипосомы;
- В** – плотно упакованные димерами мембраны; **С** – димеры;
- Д** – АТФ-синтаза направлена внутрь везикулы компонентом F_1 , что вызывает локальную кривизну мембраны;
- Е** – мембрана с параллельными рядами димеров

Криоэлектронная томография (модифицировано по Blum et al., 2019)

Кроме синтеза АТФ, АТФ-синтаза, вероятно, связана с самой индукцией клеточной гибели. Согласно некоторым литературным данным, АТФ-синтаза и/или ее димеры являются основными структурными компонентами поры, изменяющей проницаемость митохондрий [64, с. 10580-10585; 65, с. 3-7; 66, с. 5889-5891; 67, с. 3-4; 68, с. 1078-1084; 69, с. 2-4; 70, с. 21-46; 71], которая играет важнейшую роль в кальциевом обмене между митохондриями и цитоплазмой

и при патологии индуцирует клеточную гибель [72, с. 816-826; 73, с. 1126-1133]. На сегодняшний день не существует детального описания механизма работы АТФ-синтазы как поры, изменяющей проницаемость митохондрий, а ряд публикаций и вовсе ставит данную функцию АТФ-синтазы под сомнение [74, с. 9088-9091; 75, с. 3410-3413; 76, с. 12817-12820].

Правильная сборка и функционирование АТФ-синтазы – необходимые условия нормальной жизнедеятельности клетки. С нарушениями строения или функций АТФ-синтазы ассоциировано достаточно большое количество разных заболеваний, среди которых нейродегенеративные и митохондриальные, ожирение, онкологические заболевания, иммунодефицит, диабет и муковисцидоз [77, с. 2823-2826; 78, с. 57-62; 79, с. 11075-11081]. Мутации в некоторых субъединицах АТФ-синтазы приводят к нарушениям ее сборки, что ведет к изменениям морфологии крист митохондрий [80, с. 1156-1159] – это еще раз подтверждает роль АТФ-синтазы как необходимого условия для формирования крист внутренней мембраны. Например, такие изменения обнаруживаются при болезни Лея (мутация α -субъединицы), NARP-синдроме (мутация субъединицы F_6), митохондриальной кардиомиопатии и др. [9, с. 190-194; 81, с. 4-12]. Как следствие, АТФ-синтаза стала эффективной потенциальной мишенью для лекарственных препаратов [10, с. 2-9]. В настоящее время известно более 300 естественных и синтезируемых молекул, способных связываться с комплексом и изменять его активность [52, с. 3-7; 82, с. 1960-1969; 83, с. 591-626].

Литературные данные указывают на связь митохондрий и нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Паркинсона, Альцгеймера, Гентингтона и боковой амиотрофической склероз [8, с. 257-260; 84]. Имеется и ряд метаболических расстройств, обусловленных митохондриальной дисфункцией [7, с. 161-191], основной чертой которой является нарушение работы ЭТЦ [8, с. 254-260].

Наиболее зависима от нормальной работы митохондрий центральная нервная система (ЦНС), поскольку нейроны требуют для своей работы большого количества энергии [85, с. 883-887; 86, с. 380-385; 87; 88; 89, с. 143-180]. Поскольку уровень синтеза АТФ является центральным показателем биоэнергетики мозга, его функции, старения и нейродегенерации, а АТФ-синтаза

непосредственно отвечает за данный процесс, ее сравнительное исследование в структурах мозга весьма актуально. По строению и функциям мозг очень сложно организован, что предполагает и гетерогенность распределения в нем АТФ-синтазы.

Известно, что в процессе постнатального развития гистаминергических нейронов гипоталамуса с 5 по 90 сутки происходит увеличение содержания АТФ-синтазы в 1,5 раза, что соответствует интенсивному развитию энергетического аппарата нейронов в этот период [90, с. 390-393]. Увеличение количества АТФ-синтазы в постнатальном развитии также было продемонстрировано посредством иммуноблоттинга на замороженных образцах мозга крысы [91].

Исследование структур мозга крыс при гипертензии указало на митохондриальную дисфункцию и значительные нарушения в сборке и работе АТФ-синтазы в стволе мозга. На основании этого было выдвинуто предположение, что именно недостаток АТФ и увеличение активных форм кислорода приводят к нарушению кардиоваскулярного гомеостаза [92, с. 416-418].

Имеющаяся информация указывает на то, что АТФ-синтаза мозга – «ключевая» цель для повреждающих факторов. Причиной систематических нарушений различных субъединиц, особенно субъединиц α и β , является липоксидирование, которое ведет к потере активности комплекса V. Результаты иммуногистохимических исследований свидетельствуют о повреждении в мозге нейронов, а также о том, что модификации АТФ-синтазы обнаруживаются в различных областях коры мозга и их количество возрастает по мере старения организма и при патологии. При болезни Альцгеймера энторинальная кора страдает уже на самых ранних этапах болезни [93, с. 225-231]. Также липоксидирование АТФ-синтазы обнаружено в гиппокампе и париетальной коре при болезни Альцгеймера, но на более поздних этапах, чем в энторинальной коре [93, с. 225-231; 94, с. 110-117]. Особенно важно, что, несмотря на инактивацию АТФ-синтазы, уровень экспрессии компонентов белка данного фермента не снижается [94, с. 225-231]. В клетках Пуркинье (КП) мозжечка и клетках фронтальной и теменной коры при холестазах установлены значительные волнообразные изменения (повышение, снижение, нормализация) количества АТФ-синтазы [95, с. 57-60].

Глава 2

НЕЙРОГЛОБИН

Нейроглобин (Ngb) – особый металлопротеин семейства глобинов, экспрессируемый преимущественно в центральной и периферической нервной системе. Его аминокислотная последовательность лишь на 20-25% сходна со структурой других железосодержащих глобинов, что свидетельствует об их раннем филогенетическом расхождении [13, с. 111-118; 96]. Имеются сведения о 6%-м различии аминокислотных последовательностей Ngb человека и мыши, что свидетельствует о его достаточно высокой эволюционной консервативности и важности в функционировании нервных клеток [12, с. 66-78; 13, с. 111-118; 97, с. 22841; 98, с. 137-142]. Расчеты показали, что Ngb эволюционирует примерно в три раза медленнее, чем гемоглобин (Hgb) и миоглобин (Mgb) [14].

Ngb имеет молекулярную массу 17 кДа и состоит примерно из 150 аминокислотных остатков [96; 99]. Включает в себя симметрично расположенные α -спиральные сегменты и простетическую группу – гем-протопорфирин с атомом железа в центре (рисунок 2.1) [100; 101, с. 156-157]. В результате исследований кристаллической структуры Ngb обнаружены полости, которые не были ранее найдены у других белков данного семейства. Предполагается, что эти полости оказывают влияние на связывание лиганда и диффузионные пути внутри молекулы [96]. Как в Mgb и Hgb, железо (Fe^{2+}) Ngb образует шесть координационных связей, все из которых заняты, включая предназначенную для лигандов шестую связь, занятую эндогенным лигандом, гистидином. Поэтому O_2 , CO и NO конкурируют с гистидином за присоединение к железу [102, с. 51713-51521]. Значительное влияние на степень связывания лиганда оказывает pH [13, с. 111-118; 93; 96]. В целом способность Ngb связывать O_2 равна таковой у миоглобина [103, с. 38951-38955].

Необычная структурная характеристика нейроглобина – наличие так называемой гексакоординированной схемы связывания

железа гема в Fe^{2+}/Fe^{3+} -состояниях, точная роль которой до сих пор не установлена. Предполагается, что она способствует независимости процесса связывания лиганда от температурных изменений в окружающей среде, а также защите Fe^{3+} от окислителей [13, с. 111-118; 99; 103, с. 38951-38955; 104, с. 7993-7996; 105, с. 5888-5891; 106, с. 36378-36381].

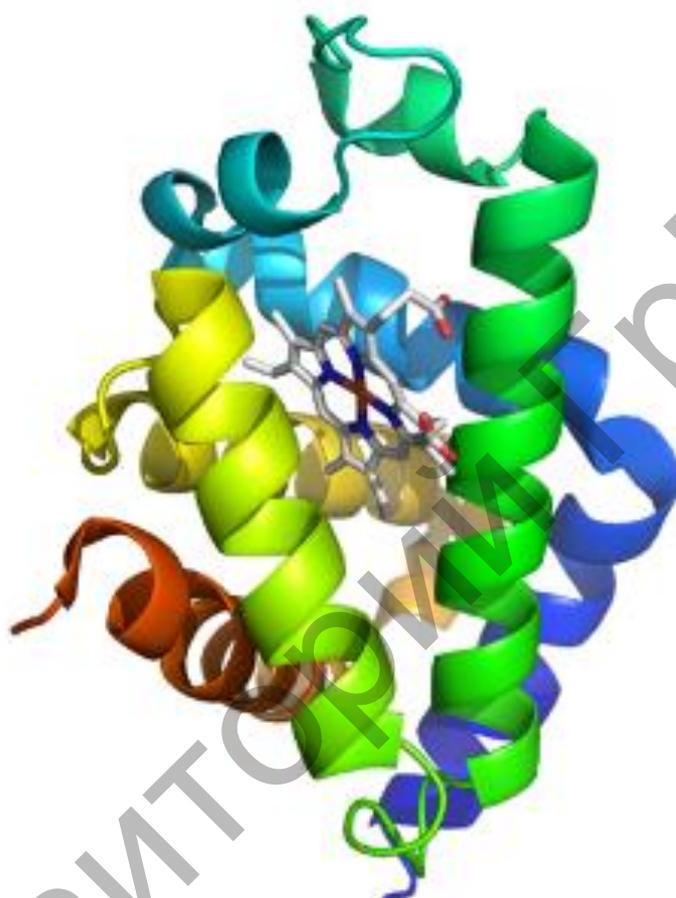


Рисунок 2.1 – Структура нейроглобина
[Protein Data Bank]

Результаты исследований последних лет показали наличие структурно и функционально значимых дисульфидных связей, зависящих от содержащихся в полипептидной цепи остатков цистеина в Ngb [107].

Уровень экспрессии Ngb и его иРНК в мозге различается и регионально, и клеточно [99]. Распределение белка Ngb в мозге положительно коррелирует с распределением кодирующей его иРНК [108, с. 59-71]. Для их выявления используют иммуногистохимический метод, гибридизацию *in situ*, ПЦР в режиме реального времени и Вестерн-блоттинг [109, с. 3-4].

На субклеточном уровне, в нервных клетках Ngf присутствует в цитоплазме, преимущественно в везикулярных структурах и нейротрубочках, ядрышке, дендритах, внутренней мембране и матриксе митохондрий [110], хотя данные о присутствии этого белка в нейротрубочках и ядрышке вызывают сомнения и требуют подтверждения. В синапсах Ngf не выявляется [108, с. 59-71].

В 2023 году Li et al. описали наличие Ngf не только в самих митохондриях, но и их ко-локализацию и ко-миграцию в нейронах. Гипоксия стимулирует ко-миграцию Ngf и митохондрий в направлении клеточной мембраны, то есть в ответ на недостаточную обеспеченность кислородом Ngf мигрирует к источнику поступления кислорода для усиления нейрональной оксигенации [111].

Существуют данные о зависимости между экспрессией и функционированием в нервных клетках Ngf и АТФ-синтазы- β , цитохрома С, субъединицы α -трансферрина и сукцинатдегидрогеназой [111, 112, с. 4-12; 113; 114].

Ngf присутствует в нейронах центральной и периферической нервной системы, сетчатке глаза, в некоторых эндокринных структурах и органах – островках Лангерганса поджелудочной железы, аденогипофизе, надпочечниках [115]. Распределение Ngf в сетчатке положительно коррелирует с уровнем потребления кислорода разными клетками. Наибольшее его количество определяется в областях с повышенной потребностью O_2 , таких как сетчатый и внутренний фотосенсорный слой, а также в областях, содержащих большое количество митохондрий. Концентрация Ngf в сетчатке примерно в 100 раз превышает его среднюю концентрацию в мозге и находится на уровне концентрации миоглобина в скелетных мышцах [99]. Показано, что концентрация мРНК Ngf в оптическом нерве крысы в 10 раз выше среднего уровня [116, с. 1773-1777]. Отмечается иммунореактивность Ngf в наружном эпителии и эндотелии роговицы человека, радужной оболочке и передней камере глазного яблока [117, с. 865-868]. Обнаружено, что этот белок присутствует у человека и в клетках Клаудиуса Кортиева органа, и в нейронах спинального ганглия. Примечательно, что количество Ngf при патологии может быть значительно выше, чем в норме [118, с. 57-62]. Ngf в клетках млекопитающих ко-локализован с холинацетилтрансферазой в латеродорсальном и тегментальном ядрах мозга [119, с. 117-119], что предполагает его присутствие в холинергических нейронах.

Сведения о содержании *Ngf* в различных структурах мозга довольно неоднозначны. Так, согласно одним данным, наибольшее его содержание в мозге мыши иммуногистохимически обнаружено в латеральном септальном ядре, голубом пятне, субпарабрахиальном и перипедункулярных ядрах, миндалевидном теле, нескольких гипоталамических ядрах, уздечке верхнего мозгового паруса и значительно меньшее – в мозжечке и II-V слоях неокортекса и палеокортекса. Гибридизация *in situ* не подтвердила наличие мРНК *Ngf* в мозжечке и гиппокампе [108, с. 59-71]. По другим данным, мРНК *Ngf* была обнаружена в коре головного мозга, клетках Пуркинье мозжечка, гипоталамусе, таламусе и ядрах черепно-мозговых нервов [120]. Гибридизация *in situ* указала на повсеместное распространение мРНК *Ngf* в мозге с наибольшими концентрациями в ядрах черепно-мозговых нервов, клетках Пуркинье мозжечка, гранулярных клетках зубчатой извилины и пирамидных нейронах гиппокампа [121, с. 646-654]. Другое исследование не подтвердило повсеместное распространение мРНК *Ngf*, но указало на значительную ее концентрацию в преоптическом ядре гипоталамуса, латеральном тегментальном ядре и ядре одиночного пути, миндалевидном теле и голубом пятне [122, с. 1593]. Зарегистрирована экспрессия мРНК *Ngf* и в передних, задних и боковых рогах шейно-грудных сегментов спинного мозга мыши [121, с. 646-654].

У человека Вестерн-блоттингом наибольшее количество *Ngf* выявлено в субталамическом ядре, чуть меньшее во фронтальной коре, продолговатом мозге и таламусе, значительно меньшее – в коре мозжечка и черном веществе [99]. Иммуногистохимическое исследование мозга человека выявило наиболее сильную экспрессию *Ngf* в гипоталамусе, миндалевидном теле и тегментальном ядре варолиева моста, слабую – в коре мозжечка. В гиппокампе человека *Ngf* иммуногистохимически не выявлен [123, с. 605-608]. Существует расхождение в результатах иммуногистохимического исследования мозжечка человека. В одном случае *Ngf* не был обнаружен [123, с. 605-608], в другом – выявлена средняя его экспрессия в клубочках и высокая в клетках Пуркинье мозжечка [124]. Расхождение в результатах может быть объяснено количеством использованных образцов – 2 против 7 [125, с. 222-224].

Только в нескольких случаях была выявлена экспрессия *Ngf* в астроглиальных клетках, в том числе в глиальных клетках

оптического нерва крысы [116, с. 1773-1777] и культивируемых астроцитах коры мозжечка мыши [126]. Экспрессия Ngf отмечена в кортикальных астроцитах, во всех культивируемых [126] и реактивных астроцитах после травм мозга, церебральной малярии и экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита [127, с. 1222-1226; 128, с. 195-199]. Также обнаружена мРНК Ngf в спинномозговой жидкости женщин, страдающих хроническими регионарными и системными болями [128, с. 195-199], и клетках глиобластомы [129, с. 2-4], но не в астроцитах клеток мозга человека после инсульта [130]. Полагают, что наличие Ngf в глиальных клетках может быть связано с церебральной гипоксией [125, с. 222-224]. Наибольшего значения уровень Ngf в кортикальных слоях II/III достигает на 14-й день после рождения [131, с. 114-119] и снижается по мере взросления [109]. Однако сообщается и о том, что количество Ngf в ядре одиночного пути и каротидных тельцах повышается с возрастом [132, с. 267-271]. В еще одном исследовании было показано, что в течение 1-3 дней жизни крысят с пренатальной гипоксией мозжечка, родившихся от матерей со склонностью к эпилептическим припадкам во время беременности, уровень Ngf в два раза выше, чем в контроле. Это может являться компенсаторным механизмом в ответ на фетальную гипоксию/ишемию мозга вследствие припадков матери [133, с. 892-896].

В 2022 году Kim et al. наблюдали наличие Ngf в норме не только в нейронах мозга мыши, но и в кровеносных сосудах головного мозга – в PDGF-положительных перицитах. Примечательно, что кровеносные сосуды, включавшие PDGF-положительные перициты, значительно экспрессирующие Ngf, после транзиторной ишемии демонстрировали снижение утечки через гематоэнцефалический барьер. Ранее подобная функция Ngf в литературных источниках описана не была [134].

Ngf регулирует функционирование клетки в норме, способствуя депонированию и переносу кислорода к митохондриям и обеспечивая кислородный гомеостаз нервных клеток [13, с. 111-118]. Ngf связывает активные формы кислорода и азота, которые возникают после реперфузии или реоксигенации, что напрямую связано с нейропротекторной функцией Ngf [12, с. 66-78]. Оксигенированная форма Ngf (Ngf-O₂) взаимодействует с оксидом азота, что приводит к образованию мет-Ngf и NO³⁻ [13, с. 111-118; 17, с. 36507-36511].

Также Ngf выступает ингибитором диссоциации G_{α} -белка: такое взаимодействие GDP G_{α} с Ngf высвобождает $G_{\beta\gamma}$, предотвращая клеточную смерть [14]. Вероятно, Ngf связан и с работой ЭТЦ, так как его отсутствие приводит к значительному снижению активности I и III комплексов ЭТЦ [135, с. 2264-2270].

Кроме непосредственного предотвращения апоптотического процесса, Ngf снижает уровень клеточных повреждений, необходимых для запуска апоптоза, что подтверждено отрицательной корреляцией между содержанием этого белка и количеством маркеров апоптоза. Также Ngf вмешивается в путь апоптоза, зависящий от митохондрий, посредством прямого взаимодействия с цитохромом c, при этом *in vitro* в присутствии Ngf цитохром теряет активность. В исследовании *in vivo* после индуцирования сверхпродукции Ngf в клетках нейробластомы уже через сутки снизилось количество апоптотических клеток. Нейропротекторный эффект был связан со снижением попадания цитохрома c в цитозоль, что запускает каспаза-9-зависимый апоптоз [15, с. 2-5; 16, с. 491-494].

Ngf способен функционировать как нитрит-редуктаза, защищая митохондрии от негативного воздействия активных форм кислорода [11, с. 18279-18281]. В условиях гипоксии Ngf выступает регулятором межклеточного NO-сигналинга. Эта функция связана с положением редокс-чувствительных внешних тиоловых групп цистеина, отвечающих за связывание нитрита и продукцию NO и трансформацию пентакоординированного гема в гексокоординированный [11, с. 18281-18283].

В некоторых случаях нейропротекторное действие веществ достигается за счет индуцирования экспрессии Ngf. Так, стимулирование NO-редуктазной активности трипентадеканоином за счет увеличения экспрессии Ngf рассматривается как один из возможных подходов к лечению протеинопатий и нейродегенеративных изменений сетчатки [136, с. 2-7]. Нейропротекторное действие эстрадиола и некоторых эстрогенных веществ также опосредовано увеличением экспрессии Ngf [137, с. 2-5, с. 6-7].

Исследована роль Ngf как модулятора клеточного анаболизма. При сверхэкспрессии Ngf в гиппокампальных клетках HT22 обнаружено повышение синтеза АТФ и снижение гликолиза, а также ингибирование АМФ-активируемого протеинкиназного сигналинга и активация ацетил-КоА-карбоксилазы. Содержание гликогена

и липидов при этом в клетках повышается [101, с. 156-157; 138, с. 1257-1263]. Ингибирование ацетил-КоА-карбоксилазы происходит и в среде трансгенных *Ngb*-сверхэкспрессирующих крыс, с параллельным увеличением содержания гликогена и липидов [138, с. 1257-1263].

Исследования Gøtzsche et al. предоставили данные, предполагающие роль *Ngb* как внутренней защиты нейронов от гипервозбудимости нейронов и окислительного стресса через буферизацию активных форм кислорода в миндалинах и других *Ngb*-содержащих структурах мозга [139].

Известно, что сверхсинтез *Ngb* может устранять агрегацию органелл, вызванную гипоксией, а также влиять на транспорт пероксид-индуцированного актина. Было предположено, что *Ngb* выполняет нейротекторную функцию именно через воздействие на митохондрии [14; 16, с. 491-494; 107, с. 59-71; 111; 140]. При исследовании эффектов *Ngb* особое внимание заслужила его взаимосвязь с работой митохондрий – синтезом АТФ, стабилизацией мембранного потенциала, снижением повреждения митохондриальной ДНК [107, с. 59-71].

Ngb в клетках млекопитающих ко-локализован с холинацетилтрансферазой в латеродорсальном и тегментальном ядрах и участвует в регуляции цикла сон-бодрствование [117, с. 122-124]. Считается, что вследствие непрерывной деятельности нейронов при длительном бодрствовании усиливается окислительный стресс и свободные радикалы, накапливающиеся в результате длительного бодрствования, убираются в течение сна. Иммуногистохимическое исследование после 24-часовой депривации сна показало снижение количества *Ngb*-положительных клеток во всех отделах мозга [141, с. 3-4]. Также сообщалось о снижении количества *Ngb* у крыс после 24-часовой депривации сна в участках, ответственных за регуляцию быстрой фазы сна, а именно в ядрах покрышки, и восстановлении иммунореактивности *Ngb* в них уже после трехчасового сна [141, с. 3-4]. Все это указывает на возможную вовлеченность *Ngb* в регуляцию циклов сон-бодрствование и индукцию экспрессии *Ngb* в процессе сна [141, с. 3-5].

Отмечается и возможная роль *Ngb* в адаптации к условиям среды, когда основным приоритетом является сохранение нормального метаболизма, в том числе уровня кислорода в клетках

и тканях [125, с. 222-224]. Структура Ngb водных и наземных млекопитающих отличается на 2-3 аминокислотных остатка, однако это отличие вряд ли оказывает значительное влияние на сродство к кислороду. В то же время уровень иРНК Ngb в мозге у водных млекопитающих в целом в 4-15 раз выше, чем у наземных [142, с. 195-199].

Особое внимание в литературе уделяется роли Ngb при церебральной ишемии. Для изучения его роли при ишемии/гипоксии используются трансгенные культуры клеток/организмы с его дефицитом или сверхэкспрессией [111, с. 4-12], при этом подавляющее количество исследований проводится именно на культурах клеток/организмах со сверхэкспрессией Ngb.

Наиболее крупная ранняя работа, в которой описывались изменения количества Ngb при гипоксии и нейропротекторный эффект Ngb при гипоксии/ишемии-реперфузии, – проведенное в 2001 году Sun et al. [18, с. 15306-15310] индуцирование экспрессии Ngb *in vitro* и *in vivo* при гипоксии/ишемии-реперфузии. Исследование *in vitro* проводилось на клеточных культурах кортикальных нейронов 16-дневных эмбрионов мышей Charles River CD1, которых лишали кислорода путем помещения в модульную инкубационную камеру. При гипоксии количества Ngb-мРНК и собственно Ngb увеличивались. Также к увеличению экспрессии Ngb приводило добавление к культуре клеток хлорида кобальта и дефероксамина, которые, как известно, усиливают экспрессию генов, связанных с гипоксией, в том числе и фактора, индуцируемого гипоксией 1-альфа (HIF-1 α).

Для определения изменения уровня экспрессии Ngb *in vivo* оценивалась иммунореактивность этого белка у крыс, на которых моделировалась фокальная церебральная ишемия окклюзией средней церебральной артерии в течение 90 минут с последующей реперфузией от 4 до 24 часов. Иммунореактивность Ngb в цитоплазме нейронов увеличивалась на всех сроках, однако степень увеличения различалась топографически: менее выраженное увеличение – в ишемическом ядре, более выраженное – в ишемической полутени, то есть экспрессия Ngb при ишемии избирательно увеличивается в тех нейронах, которым «суждено» выжить [18, с. 15308-15310].

Нейропротекторный эффект Ngb исследовался также на культуре клеток HN33 – «бессмертных» клетках гиппокампа, поскольку

их реакция на гипоксию хорошо изучена. Сверхэкспрессия в них *Ngb* привела к повышению жизнеспособности клеток HN33 при гипоксии, однако не наблюдалось нейропротекторного эффекта при воздействии на культуру стауроспорина и нитропрусида натрия (донор NO) [18, с. 15308-15310].

Достоверно известно об увеличении гипоксических повреждений при снижении экспрессии *Ngb* и, наоборот, об их уменьшении при увеличении экспрессии *Ngb*. Степень повреждений оценивалась с помощью тестов жизнеспособности культур: колориметрического теста МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид) (позволяет оценить функцию митохондрий) и/или ТВЕ (определение жизнеспособности клеток с помощью трипанового синего, неспособного проникнуть в клетку через неповрежденную мембрану). Выявлено, что клетки со сниженной экспрессией *Ngb* синтезировали большее количество белков, типичных для клеток, погибающих в результате ишемии, чем клетки с нормальной экспрессией *Ngb* [18, с. 15308-15310].

Нейропротекторная роль *Ngb in vivo* подробно продемонстрировалась в исследовании Sun et al., 2003 [22]. Показано, что интрацеребровентрикулярное введение крысам антисмысловых олигонуклеотидов *Ngb* при церебральной фокальной ишемии, вызванной окклюзией средней мозговой артерии, привело к дефициту *Ngb*, увеличению размера инфаркта и серьезным функциональным неврологическим нарушениям. Противоположный результат получен у крыс, которым при этом вводили *Ngb*-экспрессирующий аденовирусный вектор: размер инфаркта был меньше, а неврологические нарушения менее выражены [22], то есть изменение экспрессии *Ngb* влияет на степень тяжести гистологических и функциональных нарушений в мозге.

Несколькими годами позже Khan et al. [23] создали трансгенных мышей со сверхэкспрессией *Ngb* в нейронах и астроцитах мозга (где *Ngb* экспрессируется, в том числе в норме) и в некоторых «нетипичных» органах, включая сердце. Вне зависимости от группы мышей – дикий тип или *Ngb*-сверхэкспрессирующие – при фокальной церебральной ишемии пострадали прежде всего полосатое тело и кора мозга. В целом результаты продемонстрировали снижение размера инфаркта на 30% в группе *Ngb*-трансгенных мышей.

На гистологических препаратах мозга сверхэкспрессирующих трансгенных мышей при ишемии, в отличие от сверхэкспрессирующих мышей из контрольной группы, наблюдались изменения типичные для ишемического повреждения: пикнотические ядра и перинейрональная вакуолизация [23]. Замечено и то, что регионарный церебральный кровоток значительно не отличался между группами трансгенных мышей и мышей дикого типа, однако в другом исследовании между такими же группами не обнаружено разницы по церебральному кровотоку в покое и снижению уровней перфузии в течение ишемии-реперфузии, поэтому защитное действие Ngb при фокальной церебральной ишемии маловероятно связано с особенностями регионарного кровотока [143, с. 1871-1874; 23].

В тканях сердечной мышцы экспрессия Ngb в норме (у мышей дикого типа) не наблюдается, но у Ngb-трансгенных мышей с окклюзией левой нисходящей коронарной артерии зарегистрировано снижение размера инфаркта приблизительно на 25% в сравнении с мышцами дикого типа. На гистологических срезах у мышей обеих групп обнаружены пикнотические ядра и интерстициальный отек [23]. Таким образом, был продемонстрирован цитопротекторный эффект нейроглобина в тканях для него нетипичных.

Способность Ngb защищать нейроны от окислительного стресса при ишемии-реперфузии показана Li et al. [21, с. 1876-1880] на Ngb-трансгенных мышцах со сверхэкспрессией Ngb в гиппокампе. Авторами были выявлены снижение окисления липидов (маркер – малоновый диальдегид (МДА)), образования нитротирозина и продукции активных форм кислорода у Ngb-трансгенных мышей, что значительно уменьшало окислительный стресс, и, следовательно, ишемия-реперфузия-индуцированные повреждения в целом. При этом отмечено отсутствие влияния сверхэкспрессии Ngb на эндогенную антиоксидантную систему, поскольку уровни каталазы, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы, измеренные до операции и через сутки, не отличались [21, с. 1876-1880].

Связь между Ngb в структурах мозга и его нейропротекторными свойствами при ишемии описана Raida et al. [19, с. 4-12] на примере Ngb-сверхэкспрессирующих мышей JAX. Иммуногистохимически были выявлены структуры с наибольшей Ngb-иммунореактивностью – кора, скорлупа хвостатого ядра, гиппокамп и мозжечок. В сравнении с мышцами дикого типа у трансгенных

мышей особенно выделялись II-IV и VI слои всех отделов коры, а также пириформная кора в частности. Различия иммунореактивности между мышами дикого типа и Ngb-трансгенными наблюдались во всех полях гиппокампа и зубчатой извилине. В гипоталамусе, однако, различий между мышами дикого типа и Ngb-трансгенными не наблюдалось; наибольшая Ngb-иммунореактивность в обоих случаях выявлялась в нейронах латеродорсального тегментального ядра. Далее, после моделирования ишемии, область инфаркта определялась по кариопикнозу, кариолизису и кариорексису, и в области инфаркта и/или полутени Ngb-иммунореактивность не наблюдалась, поэтому авторы предположили, что при ишемии Ngb-положительные нейроны не являются предпочтительно выживающими. В то же время зона инфаркта у Ngb-трансгенных мышей оказалась значительно меньше [126, с. 4-12], как это сообщалось и в других исследованиях [22; 23]. Однако авторами так и не были подробно описаны изменения, произошедшие в результате ишемии в областях с более высоким содержанием Ngb, на которые они обратили внимания ранее.

Отдельно изучался вопрос зависимости сенсомоторного исхода у Ngb-сверхэкспрессирующих крыс при гипоксии, вызванной травматическим повреждением мозга (ТПМ). Было смоделировано ТПМ путем контролируемого кортикального воздействия на область первичной и вторичной моторной коры, а также на первичную соматосенсорную кору. Гипоксия при ТПМ появляется как вторичная реакция на травму, что влечет за собой активацию гипоксия-индуцируемых генов и увеличивает выживаемость клеток [20]. Путем количественной ПЦР в реальном времени выявлено значительное повышение экспрессии Ngb у крыс дикого типа, но только на 7-й день после ТПМ, причем количество Ngb значительно увеличилось в областях, расположенных возле повреждений. Увеличение количества Ngb было подтверждено и иммуногистохимически: прежде всего экспрессия Ngb возрастает в течение подострого периода. Также сверхэкспрессия Ngb нивелирует сенсомоторные повреждения после моделирования ТПМ – у Ngb-трансгенных крыс наблюдался значительно меньший уровень сенсомоторных нарушений, чем у крыс дикого типа [20].

На сегодняшний день опубликовано лишь две работы по исследованию роли Ngb при гипоксии/ишемии на трансгенных

животных с дефицитом *Ngb*. Их результаты значительно отличаются от того, о чем сообщалось в исследованиях со сверхэкспрессией. Так, Hundahl et al. [144, с. 2-9] сообщили, что при гипоксии не наблюдалось различий по выживаемости между группами мышей дикого типа и мышами без экспрессии *Ngb*. Не обнаружено и значительного изменения иммунореактивности ко-экспрессирующихся с *Ngb* орексина А и *Cgb* в латеральном гипоталамусе и заднем мозге, даже в группах после 24-48 часов гипоксии. Кроме того, в обеих группах не обнаружена иммунореактивность маркера апоптотических механизмов – расщепленной каспазы-3 [144, с. 2-9].

В результатах второго исследования с мышами без экспрессии *Ngb* во всех группах с ишемией был обнаружен колликативный некроз, у животных дикого типа (контрольная группа и группа с ишемией) выявлена незначительная экспрессия *Ngb* в некоторых структурах, в области ишемической полутени не наблюдалось увеличения иммунореактивности *Ngb*. Кроме того, авторы сообщали, что *Ngb*-иммунореактивность не отмечалась в нейронах II и V слоя коры мышей дикого типа с ишемией, в отличие от мышей дикого типа без ишемии, и зона инфаркта у неэкспрессирующих *Ngb* мышей значительно меньше [145, с. 5-7]. Эти результаты ставят под сомнение нейропротекторную роль *Ngb* при его нормальных количествах.

Среди небольшого количества исследований, проведенных на нормальных (нетрансгенных) крысах, выделяются работы двух исследовательских групп. Так, Schmidt-Kastner et al. [146, с. 174-179] сообщают о значительном увеличении экспрессии *Ngb* в культурах клеток NH33 и PC12 (нейроэндокринные клетки опухоли мозгового слоя надпочечников крысы) после тяжелой длительной гипоксии (0-1% O₂ в течение 24 часов) и отсутствии увеличения экспрессии у крыс после глобальной транзиторной ишемии, несмотря на повышающиеся уровни экспрессии фактора роста эндотелия сосудов и глюкозного транспортера-1 [146, с. 174-179]. Григорьев и др. [147, с. 16-21] не обнаружили увеличения экспрессии *Ngb* в нейронах структур переднего мозга (в зонах возле повреждения или в отдалении) после транзиторной ишемии. Более того, содержание *Ngb* снижалось в пораженном полушарии за счет дегенерации *Ngb*-положительных нейронов, тем самым

демонстрируя неспособность Ngb препятствовать их гибели при эндогенных концентрациях. Таким образом, в обеих работах демонстрируется отсутствие увеличения содержания Ngb *in vivo* при их нормальных количествах.

Отдельные исследования посвящены нейропротекторному действию, опосредованному повышением экспрессии Ngb. Опираясь на данные о том, что гемин увеличивает продукцию клетками Hb и Mb, Zhu et al. [148] предположили, что такой же эффект гемин будет оказывать на Ngb. Исследование проводилось на культуре клеток гиппокампа HN33, которая уже упоминалась ранее. В питательную среду клеток добавляли гемин в течение трех дней без замены питательной среды на новую, что привело, согласно результатам ПЦР в реальном времени и Нозерн-блот анализа, к увеличению количества мРНК Ngb в 4 раза [148].

Опираясь на данные Zhu et al. [148], Song et al. [149, с. 2165-2169] и Xie et al. в 2014 [150] году описали нейропротекторный эффект гемина за счет индуцирования экспрессии Ngb и их более эффективный нейропротекторный сочетанный эффект. Исследования проводились на коре мозга крыс. Животных подразделяли на контрольную группу, группу с ишемией, группу с ишемией + экзогенный Ngb, ишемия + гемин, ишемия + экзогенный Ngb + гемин. После фокальной церебральной ишемии уровень экспрессии Ngb оценивался различными методами, в том числе иммуногистохимически. Количество выявленных Ngb-положительных клеток было гораздо больше в группе с ишемией + экзогенный Ngb + гемин, чем в группах по отдельности. В этой же группе обнаружено наибольшее снижение области ишемического повреждения мозга. Методом TUNEL-окрашивания выявлено уменьшение количества TUNEL-положительных, то есть апоптотических клеток, в группе с введением Ngb с гемомин в сравнении с другими группами, а с помощью иммуногистохимического метода установлено наиболее значительное увеличение экспрессии регулятора апоптоза Bcl-2, обладающего антиапоптотическим эффектом [149, с. 2165-2169; 150, с. 2010-2016].

С целью изучения связи между Ngb, гемомин и белком Bcl-2, был проведен Вестерн-блот анализ: количество Bcl-2 белка значительно не отличалось между контрольной группой и группой с ишемией. В группах с ишемией + экзогенный Ngb или гемомин

количество белка выше, чем в группе с ишемией. В группе с ишемией + экзогенным Ngb + геминном количество Bcl-2 значительно больше, чем в группах с экзогенным Ngb или геминном по отдельности. Таким образом, в сравнении с группами крыс, которым был введен Ngb или гемин по отдельности, совместное их действие давало лучший нейропротекторный эффект: количество апоптотических нейронов при сочетанном действии было значительно ниже, а размер инфаркта – меньше [150, с. 2010-2016]. Авторы отмечают также и положительную корреляцию между областями экспрессии Ngb с их толерантностью к гипоксии [150, с. 2010-2016], однако конкретные структуры не называются.

В 2018 году стало известно [151, с. 2-7] об усилении нейропротекторной функции Ngb при гипоксическом прекондиционировании. Исследование проводилось на нейронах поля CA1 гиппокампа. У группы крыс с гипоксическим прекондиционированием иммунореактивность Ngb резко возрастала после глобальной церебральной ишемии, в отличие от крыс без прекондиционирования, у которых иммунореактивность плавно уменьшалась в течение первых 26 часов после реперфузии, а к 50 часам возвращалась на исходный уровень [151, с. 2-7].

В 2021 году Oamen et al. сообщили о способности трипентадеканоина – редкого липида дрожжевого происхождения – стимулировать экспрессию Ngb у млекопитающих, предположительно, через предотвращение формирования протеиновых агрегатов [152].

На сегодняшний день предполагается, что как минимум два сигнальных пути участвуют в индукции экспрессии Ngb. Связь с гипоксия-индуцируемыми сигнальными путями подтверждается тем, что к увеличению экспрессии Ngb приводит добавление агентов, усиливающих экспрессию гипоксических генов – хлорида кобальта и дефероксамина, в то время как стауроспорин и нитропруссид натрия (донор NO) такого эффекта не демонстрируют [18, с. 15308-15310]. Индукция экспрессии Ngb через второй сигнальный путь – гуанилатциклаза-протеинкиназа G (sGC-PKG) – была продемонстрирована при действии гемина: нейропротекторный эффект был нивелирован за счет действия ингибиторов гуанилатциклазы и протеинкиназы G (KT5823 и KY83583 соответственно). Различия в регуляции экспрессии Ngb при гипоксии и введении гемина продемонстрировали действием ингибитора

митоген-активируемой протеинкиназы/внечелочной сигнал-регулируемой киназы PD98059, что блокировало гипоксия-индуцируемое увеличение количества Ngb [149, с. 2165-2169].

Касательно нейропротекторного действия Ngb в литературе описано несколько возможных механизмов. Burmester et al. [99] отмечали способность Ngb, подобно Mb, обратимо связывать кислород и облегчать его доставку к митохондриям с периферии клетки, то есть облегчать внутриклеточную диффузию O_2 . Однако имеется ряд фактов, ставящих такой механизм работы Ngb под сомнение. Во-первых, подобный механизм работы Mb возможен благодаря его относительно высокой концентрации в мышечной ткани [153, с. 625-630], а концентрация Ngb в мозге очень мала. Исключение – сетчатка, где концентрация Ngb в 100 раз больше, чем в мозге, что сопоставимо с количеством Mb в мышцах, а распределение Ngb коррелирует с субклеточной локализацией митохондрий и потребностями отдельных структур в кислороде [154; 155, с. 1324-1327]. Во-вторых, не было обнаружено изменения потребления клетками мозга кислорода при изменении экспрессии Ngb. Несмотря на ранние сообщения о связи потребления нейронами кислорода с количеством в них Ngb [99], позднее были получены иные результаты: с помощью кислородного электрода Кларка Sun et al. [18, с. 15308-15310] отслеживали потребление кислорода в клетках с нормальной и повышенной экспрессией Ngb, но значительное повышение потребления клетками кислорода в связи со сверхэкспрессией ими Ngb не обнаружено. Скорее всего, ограничением в данном случае является высокое сродство Ngb к O_2 и при физиологических условиях он не может быть высвобожден [156].

Серьезный интерес представляют взаимодействия между Ngb и NO. Сообщалось, что Ngb, подобно Mb, может устранять молекулы NO, участвующие в гипоксически-ишемическом повреждении нейронов [157, с. 8484-8487]. Хотя данное утверждение можно поставить под сомнение: ранее сообщалось, что сверхэкспрессия Ngb не защищала нейроны от действия нитропруссид натрия, являющегося источником NO [18, с. 15308-15310].

Большой вклад в понимание связи между Ngb и NO при патологии внесли Tiso et al. Оказалось, что Ngb может защищать митохондрии от активных форм O_2 не путем прямого взаимодействия с ним, а через ингибирование клеточного дыхания, связывая NO

с цитохром с-оксидазой (IV комплекс ЭТЦ). NO генерируется непосредственно Ngb за счет нитрит-редуктазной активности. Также Ngb регулирует внутриклеточную NO-сигнализацию при гипоксии за счет перехода из шестикоординатного состояния гема в пятикоординатное, что позволяет Ngb быстрее (в 2000 раз) восстанавливать нитрит до NO [11, с. 18282-18283].

Другим механизмом нейропротекторного действия Ngb является его способность уменьшать окислительный стресс. На модели со сверхэкспрессией Ngb Wang et al. [140, с. 1871-1874] изучали изменения уровня МДА как маркера окислительного стресса при переходящей очаговой фокальной ишемии в полушариях мозга, в результате чего было выявлено, что у Ngb-сверхэкспрессирующих мышей количество МДА значительно ниже после 8- и 22-часовой ишемии, в отличие от мышей дикого типа.

Нейропротекторный эффект Ngb при глобальной церебральной ишемии и гипоксическом прекондиционировании достигается за счет предотвращения работы Na^+/K^+ -АТФаз. На примере нейронов поля гиппокампа CA1 была оценена активность Na^+/K^+ -АТФаз в разные сроки после реперфузии у групп крыс с прекондиционированием и без него. Результаты показали сохранение активности Na^+/K^+ -АТФаз именно в группе с гипоксическим прекондиционированием. Одновременно уменьшалось количество активных форм кислорода и снижался уровень глутатионилирования транспортной субъединицы бета-1 Na^+/K^+ -АТФазы [152, с. 5-7].

Xiong et al. [158, с. 2-8] сообщили о новом механизме действия Ngb при патологии: Ngb накапливается в конусе роста нейронов, пострадавших от ишемии, и способствует регенерации аксонов во время реперфузии через активацию сигнального пути p38-MAPK (связывается с p38 и активирует его, что и приводит к регенерации) [159, с. 2-8].

В силу «широких» возможностей Ngb – крайне перспективное соединение с фармакологической точки зрения. Серьезным препятствием на пути к разработке Ngb-содержащих препаратов является неспособность Ngb проникать через гематоэнцефалический барьер [160; 161]. В настоящее время в качестве альтернативы рассматриваются системы адресной доставки, а именно наночастицы. Теоретически они смогут не только доставить Ngb, но и повысить его биодоступность для пораженных областей [162].

По доступным на сегодняшний день данным трудно однозначно оценить роль Ngb в развитии опухолей. Известно, что Ngb увеличивает устойчивость клеток эстрогензависимых опухолей к стресс-индуцированному апоптозу [163, с. 1-2]. В то же время сообщается о выступлении Ngb в роли супрессора в развитии колоректального рака: сверхэкспрессия Ngb ингибирует рост и ангиогенез опухоли *in vivo* [164].

Таким образом, несмотря на многочисленные исследования Ngb, его региональное и клеточное распределение в мозге остается неизученным, а связь его содержания в нейронах мозга с их устойчивостью к ишемии не установлена.

Глава 3

РЕГИОНАЛЬНОЕ И КЛЕТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АТФ-СИНТАЗЫ В МОЗГЕ КРЫСЫ

Исследование проводилось на материале от самцов беспородных белых крыс массой 230 ± 20 г. Крыс содержали в стандартных условиях в виварии Гродненского государственного медицинского университета при естественном освещении и температуре воздуха от 20 до 26 °С, со свободным доступом к воде и пище. Исследование выполнено в строгом соответствии со всеми требованиями Директивы Европейского Парламента и Совета № 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, используемых для научных целей [165, с. 38-79], с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» [166, с. 26-32, с. 123-160, с. 172-190, с. 222].

Материал для изучения топографического распределения АТФ-синтазы и нейроглобина в норме – головной мозг и шейный отдел спинного мозга – забирался после одномоментной декаптации крыс.

Для оценки иммунореактивности АТФ-синтазы использовали первичные моноклональные мышинные антитела Anti-АТР5А antibody фирмы Abcam (Великобритания, ab. 14748) в разведении 1:2400 (выбрано как оптимальное по соотношению сигнал/шум из серии разведений от 1:100 до 1:3000) при температуре +4 °С, экспозиция 20 часов, во влажной камере. При изучении топографического распределения АТФ-синтазы в норме для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (Великобритания, ab. 80436). При изучении иммунореактивности АТФ-синтазы при субтотальной ишемии головного мозга (СИГМ) для выявления связавшихся первичных антител использовали набор Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit-Micro-polymer (Великобритания, Abcam, ab236466).

При проведении иммуногистохимического исследования в качестве положительного контроля использовали ткани с известным высоким содержанием АТФ-синтазы (миокард) и Ngb (сетчатка глаза). В качестве отрицательного контроля использовали срезы, которые вместо первичных антител обрабатывали нормальной кроличьей сывороткой (иммунопозитивная окраска в них отсутствовала). Дополнительным внутренним отрицательным контролем служили оболочки мозга и ядра нейронов, которые не должны были окрашиваться.

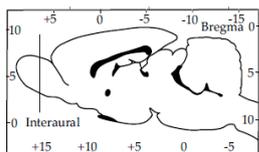
Иммунореактивность АТФ-синтазы и нейроглобина в норме изучена в 102 структурах мозга крысы.

Изучение гистологических и иммуногистохимических препаратов, их микрофотографирование и цитофотометрию 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).

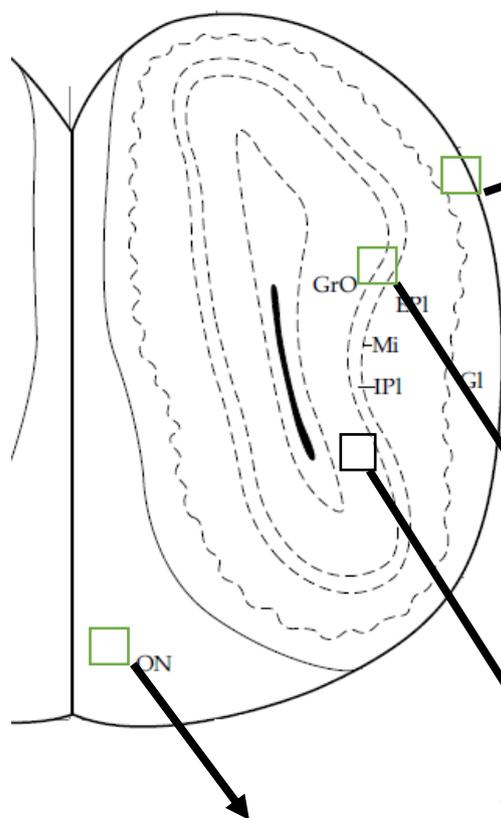
Цитофотометрическое исследование иммуногистохимических препаратов подразумевало измерение оптической плотности полученного осадка хромогена (диаминобензидина) в цитоплазме нейронов, на максимуме поглощения окрашенных продуктов реакции. Иммунореактивность выражали в единицах оптической плотности $\times 10^3$ (условных единицах – у. е.).

Иммунореактивность АТФ-синтазы разной интенсивности обнаружена в нейронах всех отделов мозга крысы (рисунки 3.1-3.16, таблица П.1) [167, 168].

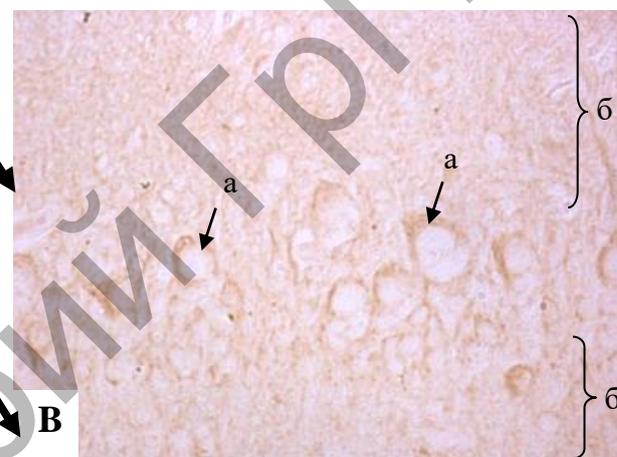
В цитоплазме нейронов отчетливо видны скопления окрашенных продуктов иммуногистохимической реакции в виде гранул, соответствующих представлениям о расположении митохондрий в цитоплазме тел нейронов и их отростках [164]. В ядрах нейронов АТФ-синтаза не выявляется (рисунки 3.12, 3.13, 3.16). Кроме того, интенсивное окрашивание отмечается в эпендимоцитах, выстилающих желудочки мозга и покрывающих сосудистые сплетения (рисунок 3.5) [167, 168].



Bregma 6,7



A



B



D

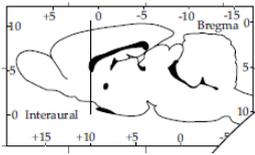


C

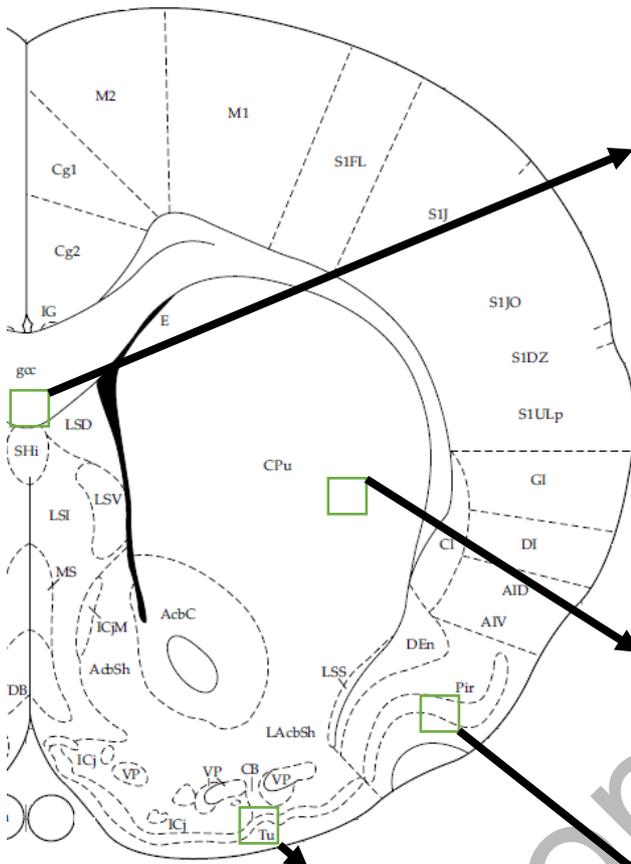
Иммуногистохимическое окрашивание на АТФ-синтазу.
Цифровая микрофотография. Увелич. 200 (А, D) и 400 (В, С)

Рисунок 3.1

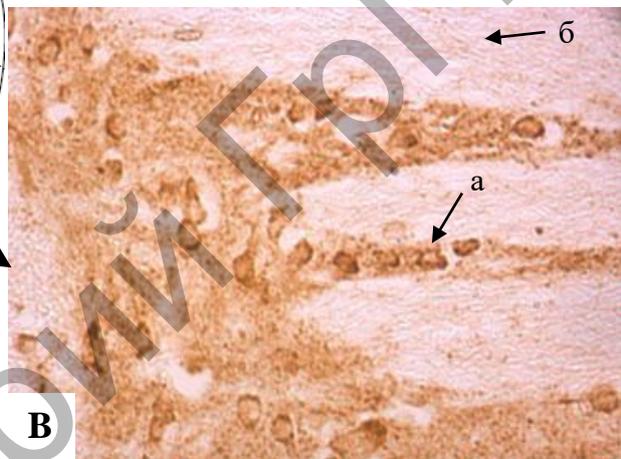
- А** – гломерулярный слой обонятельной луковицы;
- В** – митральные клетки и плексиформные слои
(**а** – митральные клетки, **б** – плексиформные слои);
- С** – внутренний гранулярный слой, **Д** – слой обонятельного нерва



Bregma 1,0



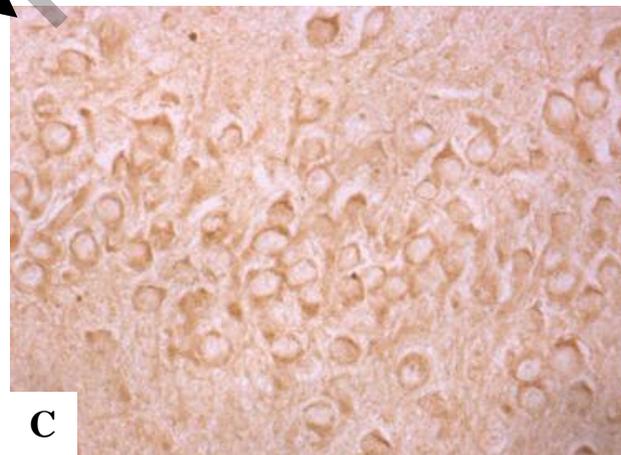
A



B



D

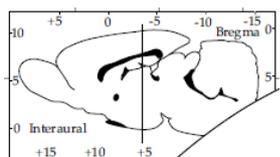


C

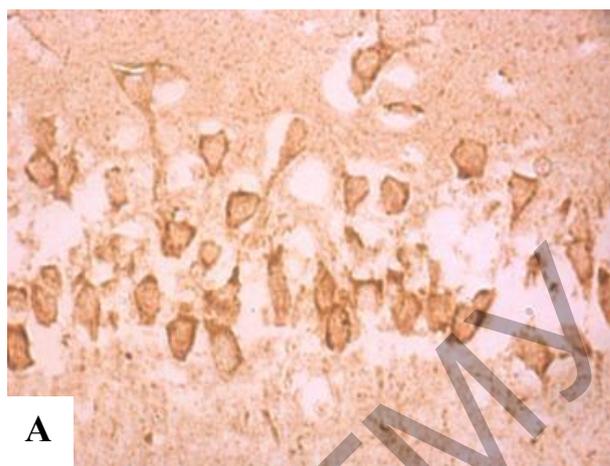
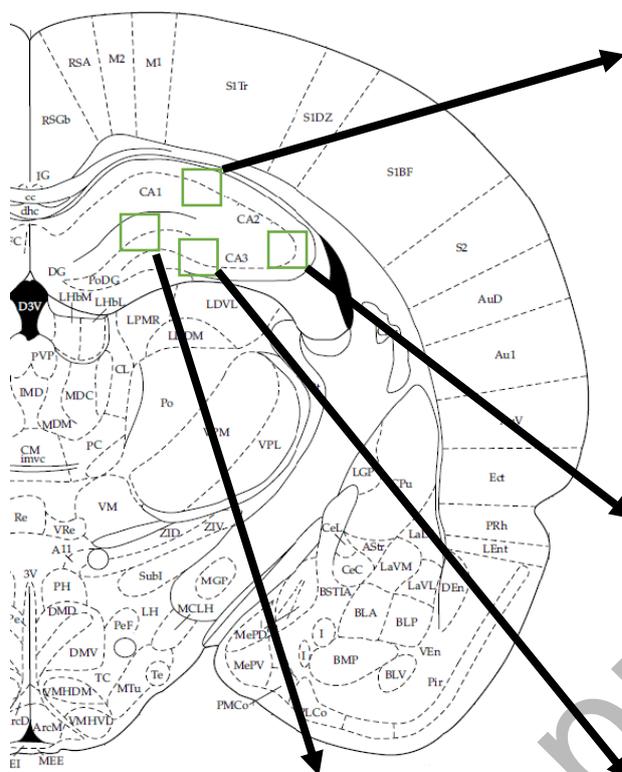
Иммуногистохимическое окрашивание на АТФ-синтазу.
Цифровая микрофотография. Увелич. 400 (А-С) и 1000 (D)

Рисунок 3.2

А – передний отдел мозолистого тела; **В** – полосатое тело
(**а** – нейроны, **б** – белое вещество); **С** – пириформная кора, II слой;
Д – обонятельный бугорок



Bregma -3,3



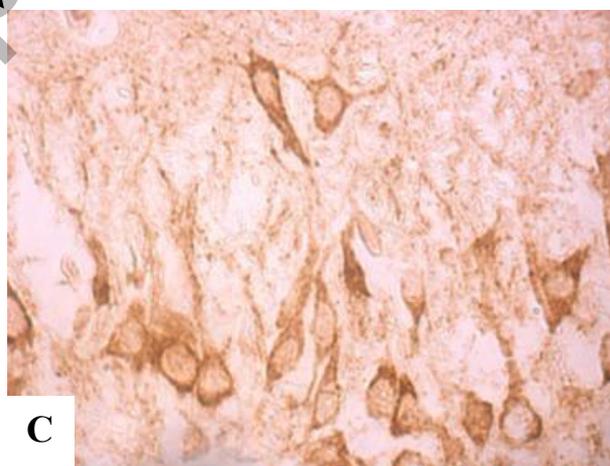
A



B



D

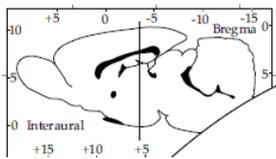


C

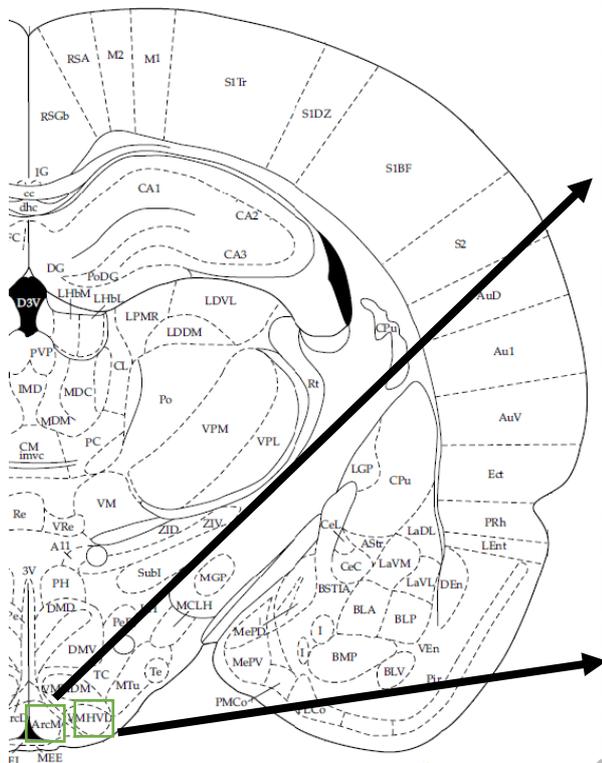
Иммуногистохимическое окрашивание на АТФ-синтазу.
Цифровая микрофотография. Увелич. 400

Рисунок 3.3

**A – гиппокамп СА1, II слой; В – гиппокамп СА2, II слой;
С – гиппокамп СА3, II слой; D – зубчатая извилина, II слой**



Bregma -3,3



A



B

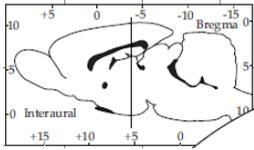
Иммуногистохимическое окрашивание на АТФ-синтазу.

Цифровая микрофотография. Увелич. 1000

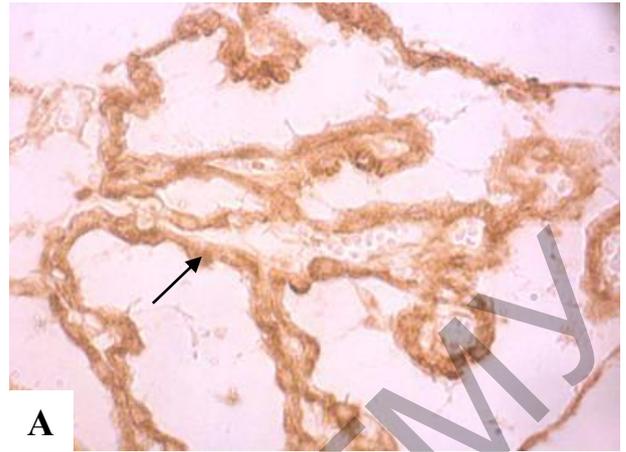
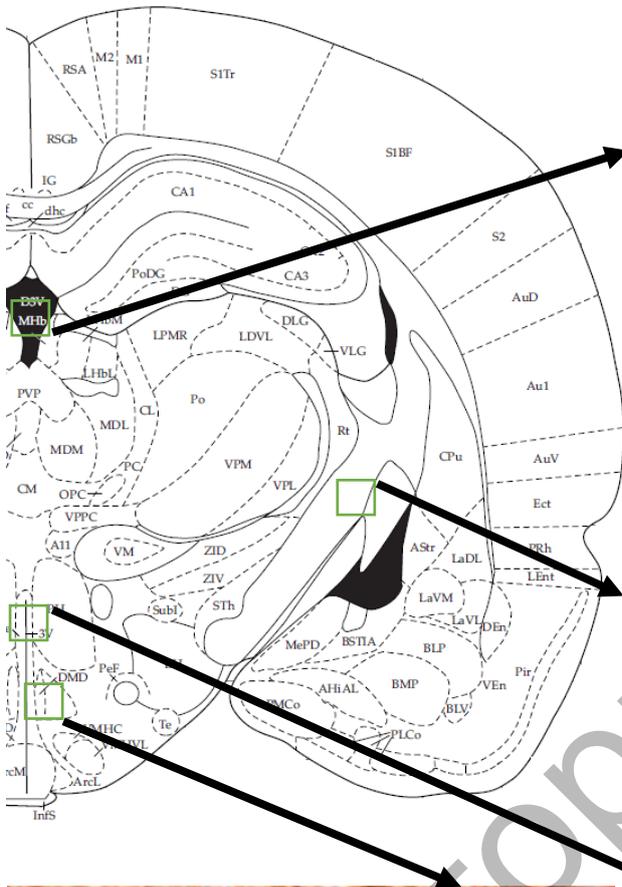
Рисунок 3.4

A – дугообразное ядро гипоталамуса;

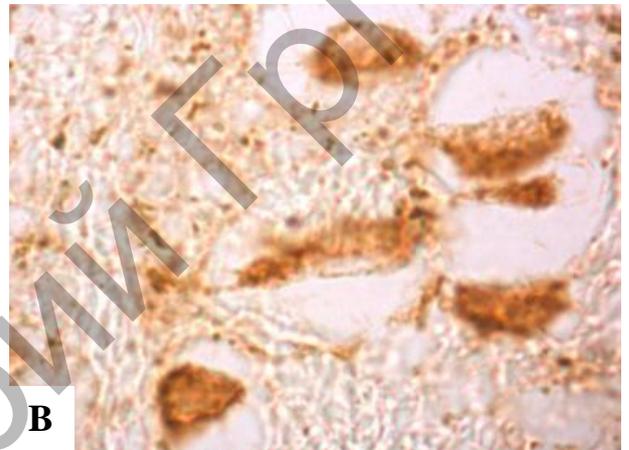
B – вентромедиальное ядро гипоталамуса



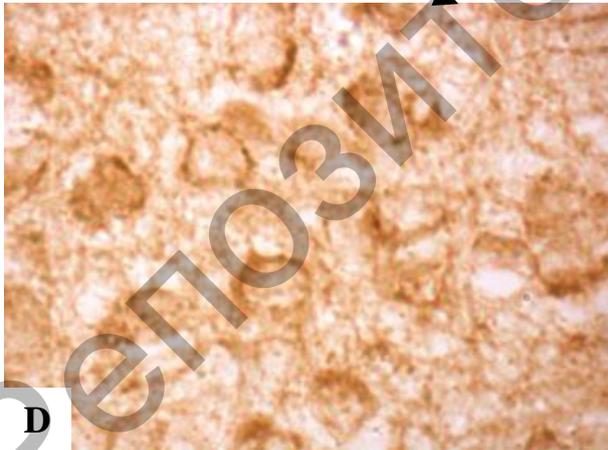
Bregma -3,6



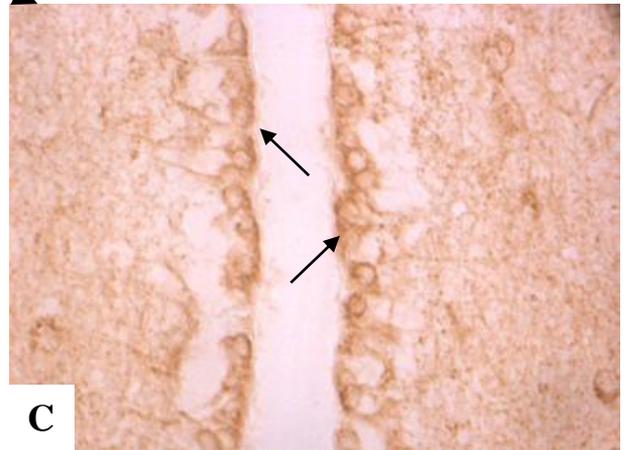
A



B



D



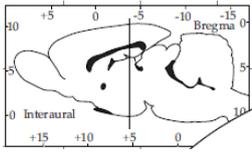
C

Иммуногистохимическое окрашивание на АТФ-синтазу.
Цифровая микрофотография. Увелич. 400 (А, В) и 1000 (С)

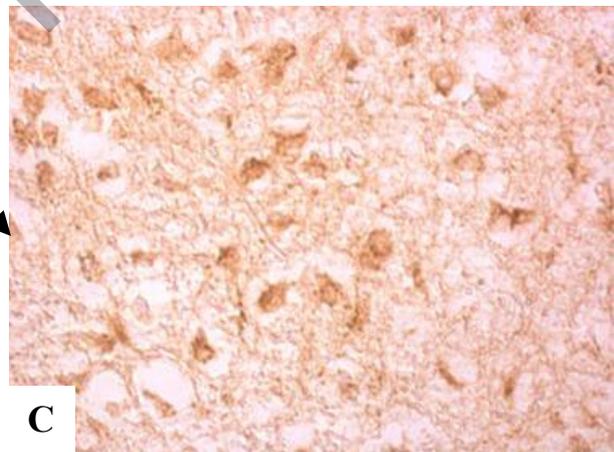
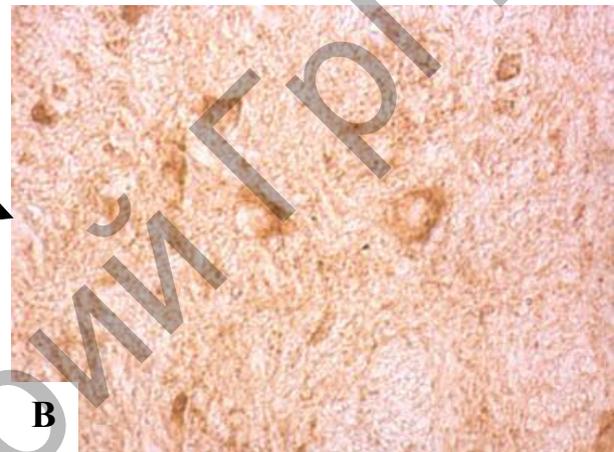
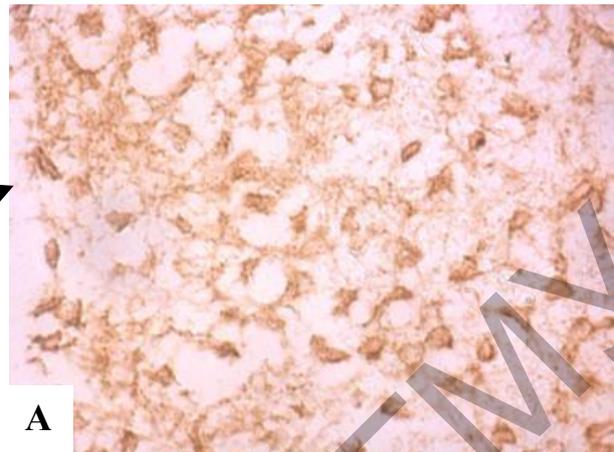
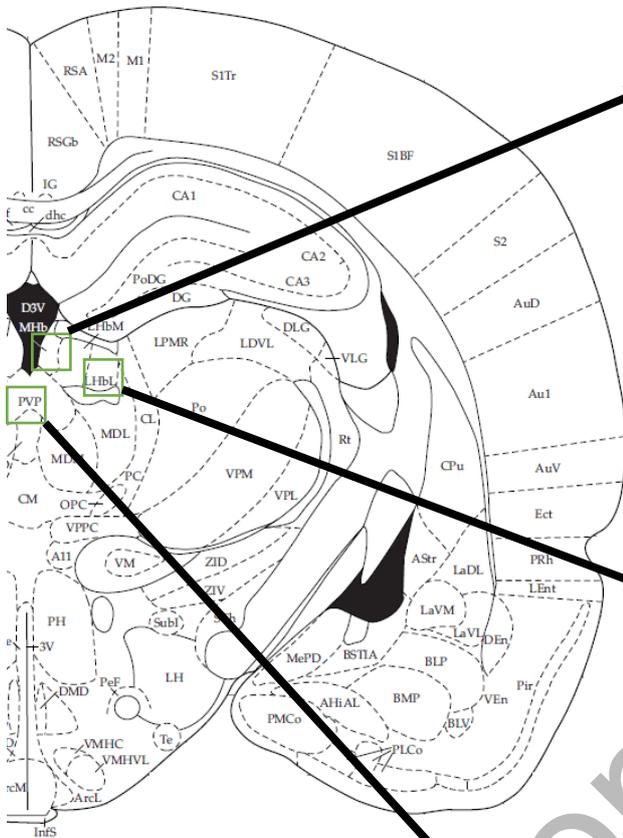
Рисунок 3.5

А – сосудистое сплетение в верхней части III желудочка
(а – эпендимоциты, б – собственно сплетение);

В – ретикулярное ядро таламуса; С – танициты, выстилающие полость
нижней части III желудочка; D – дорсомедиальное ядро гипоталамуса



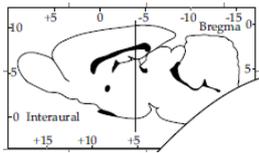
Bregma -3,6



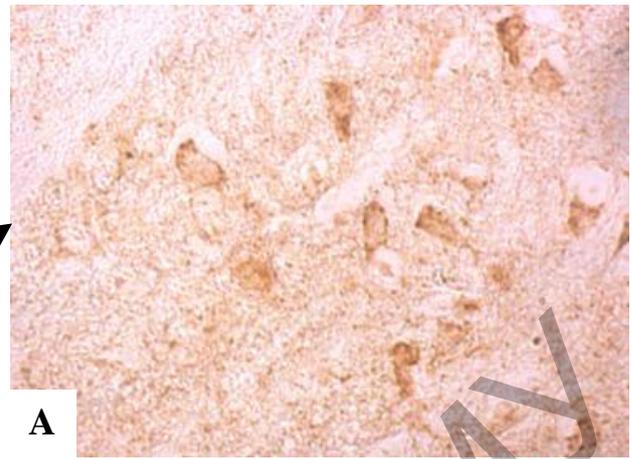
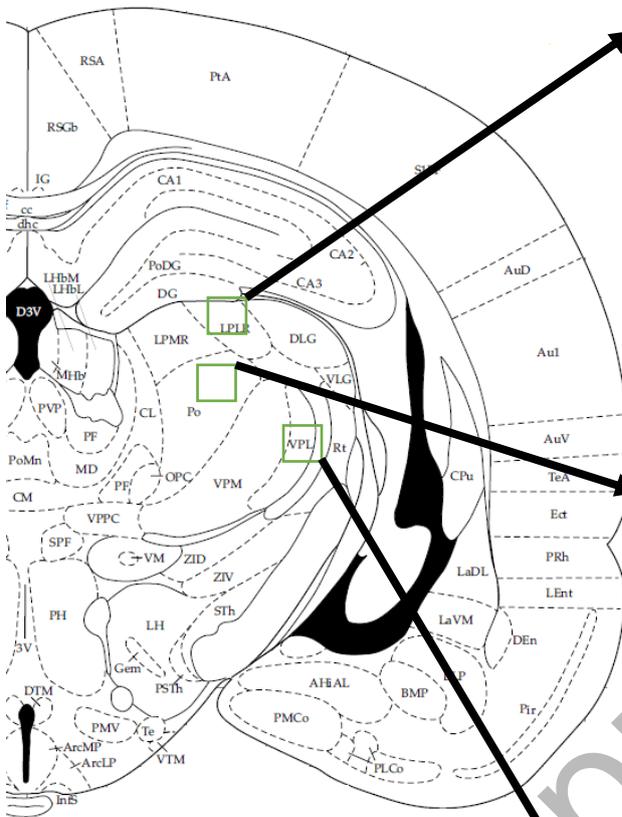
Иммуногистохимическое окрашивание на АТФ-синтазу.
Цифровая микрофотография. Увелич. 400

Рисунок 3.6

- А** – медиальное габенулярное ядро таламуса;
- В** – латеральное габенулярное ядро таламуса;
- С** – паравентрикулярное ядро таламуса



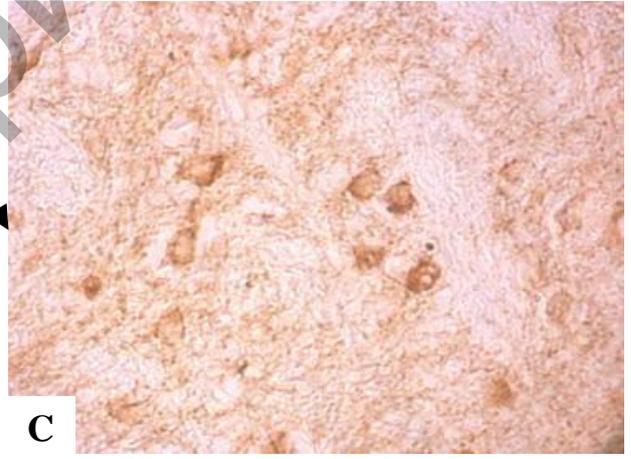
Bregma -3,8



A



B



C

Иммуногистохимическое окрашивание на АТФ-синтазу.

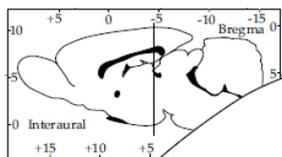
Цифровая микрофотография. Увелич. 400

Рисунок 3.7

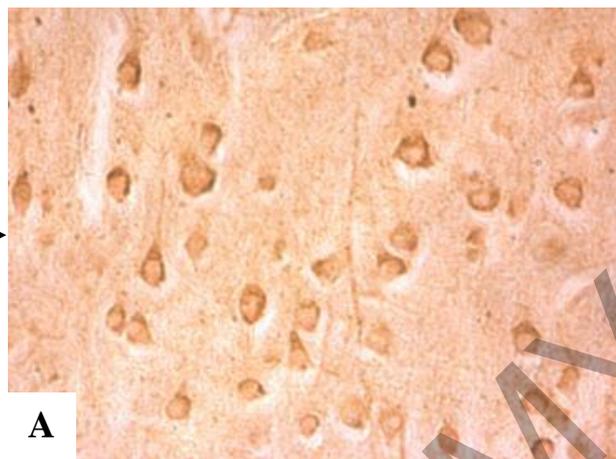
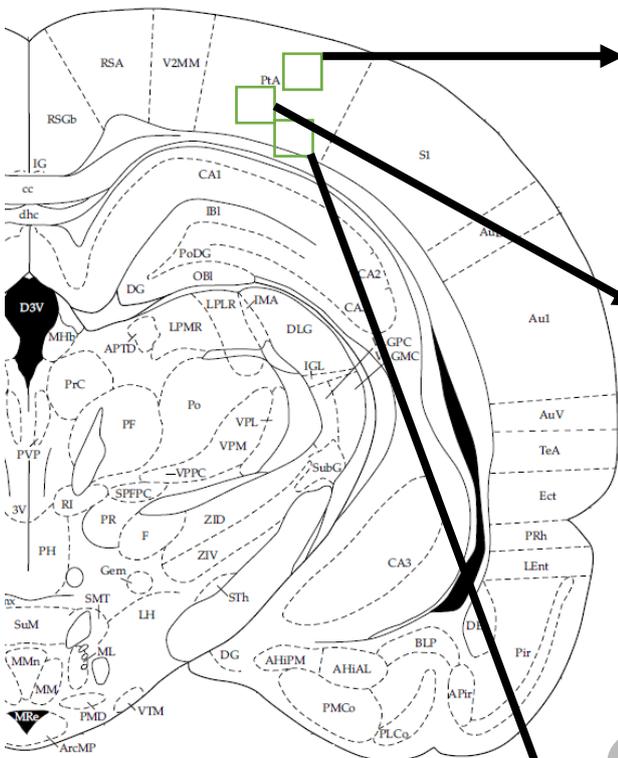
A – заднелатеральное ядро таламуса;

B – задняя группа таламических ядер;

C – вентральное постеролатеральное таламическое ядро



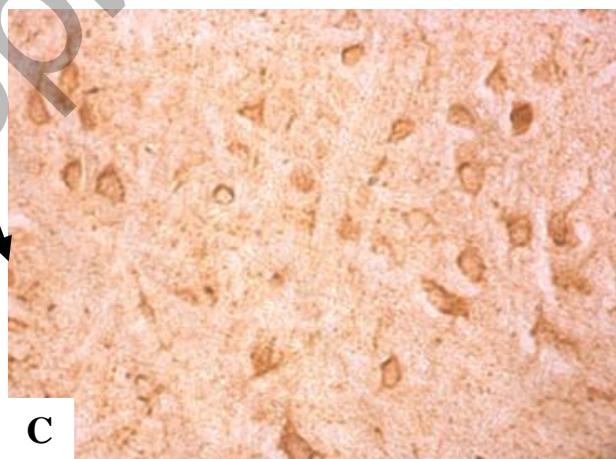
Bregma -4,3



A



B



C

Иммуногистохимическое окрашивание на АТФ-синтазу.

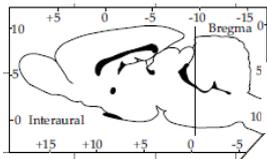
Цифровая микрофотография. Увелич. 400

Рисунок 3.8

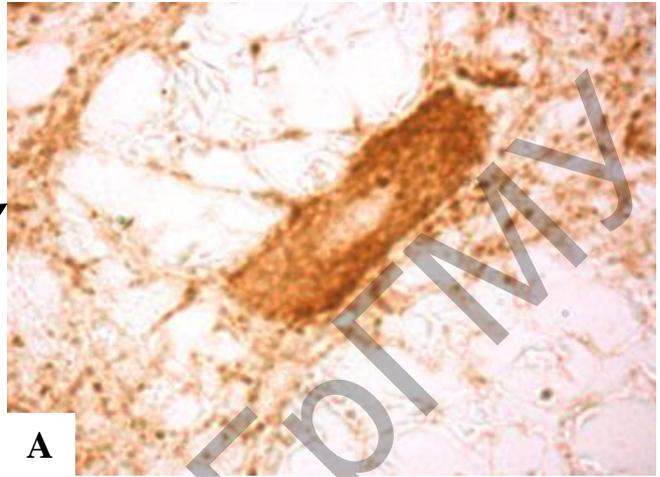
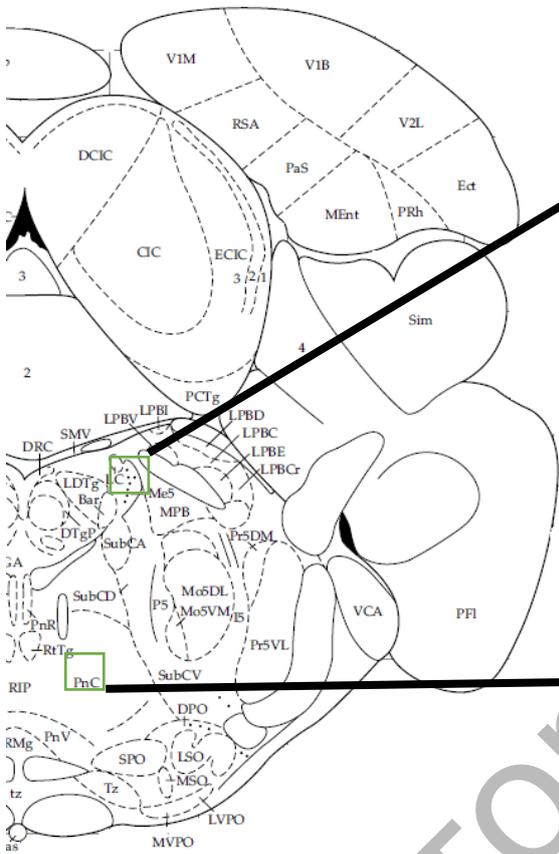
A – парietальная кора, III слой;

B – парietальная кора, V слой;

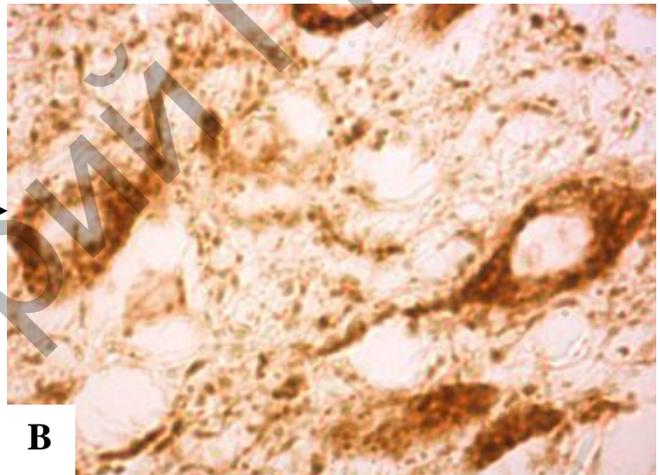
C – парietальная кора, VI слой



Bregma -9,3



A



B

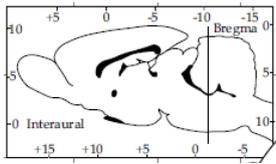
Иммуногистохимическое окрашивание на АТФ-синтазу.

Цифровая микрофотография. Увелич. 1000

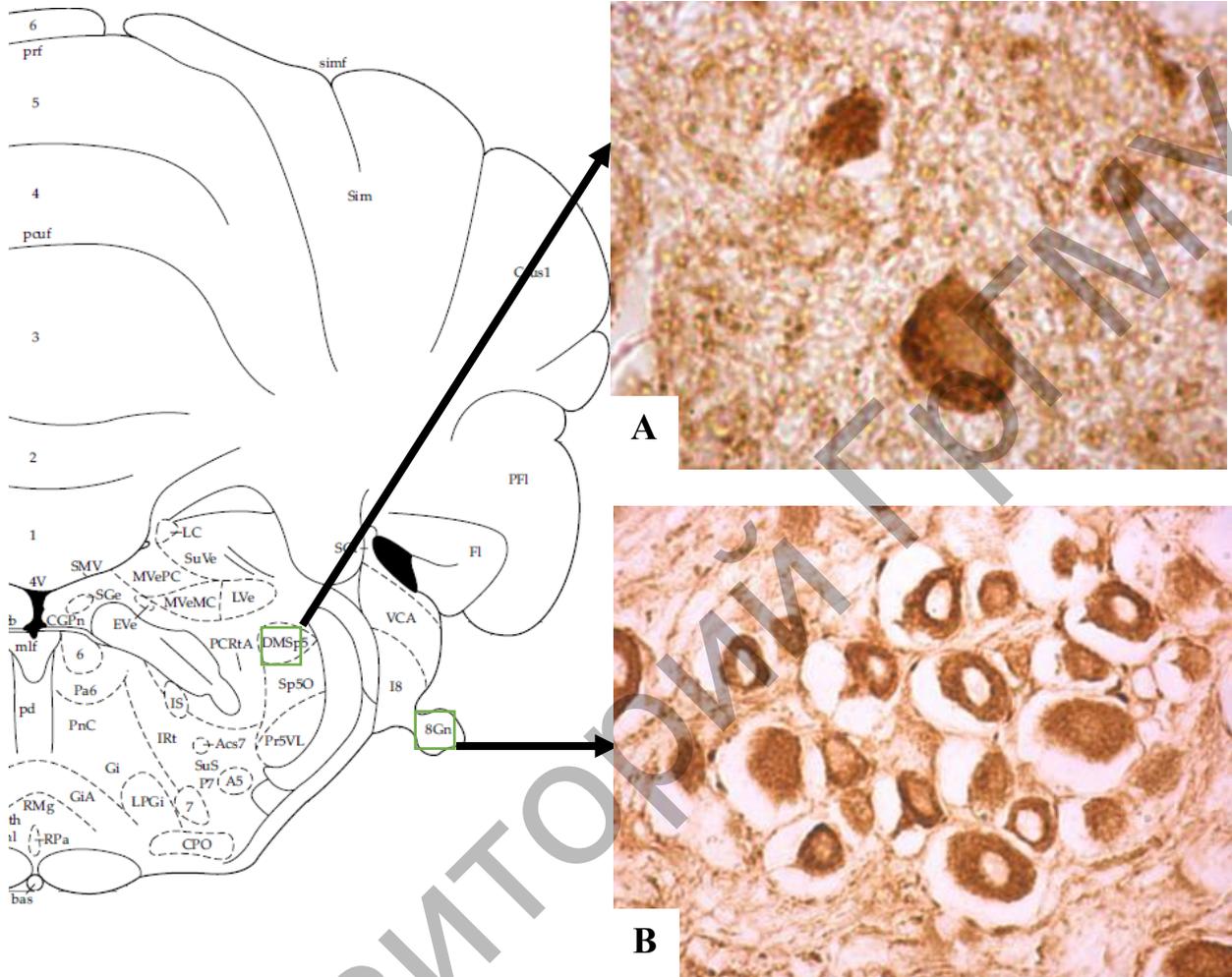
Рисунок 3.9

А – нейрон мезенцефалического ядра тройничного нерва;

В – нейроны ядра одиночного пути



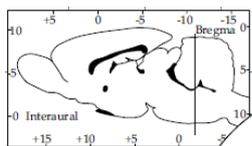
Bregma -10,3



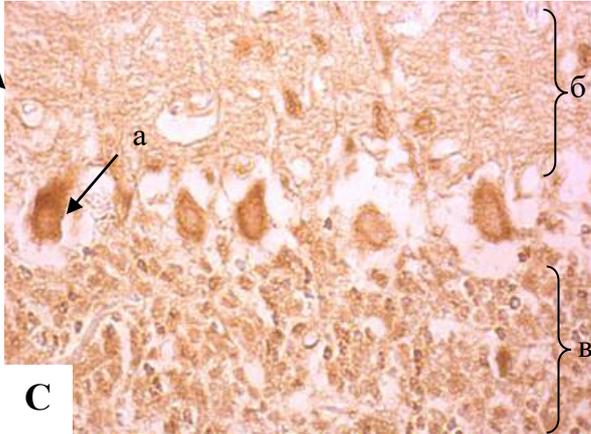
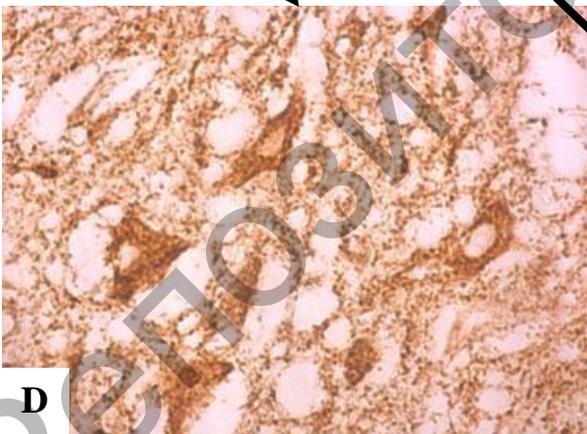
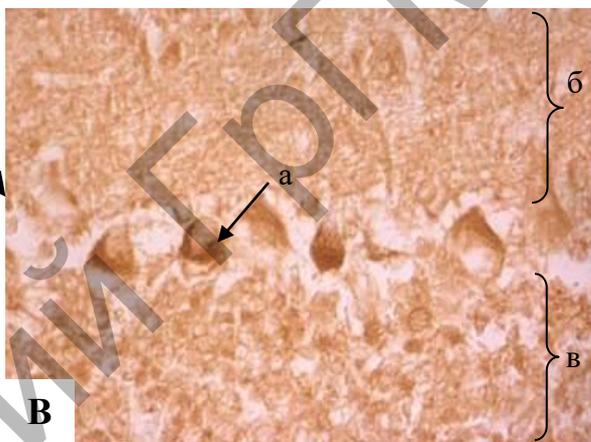
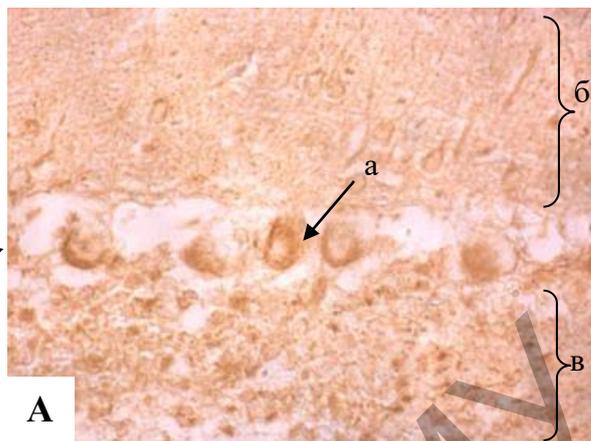
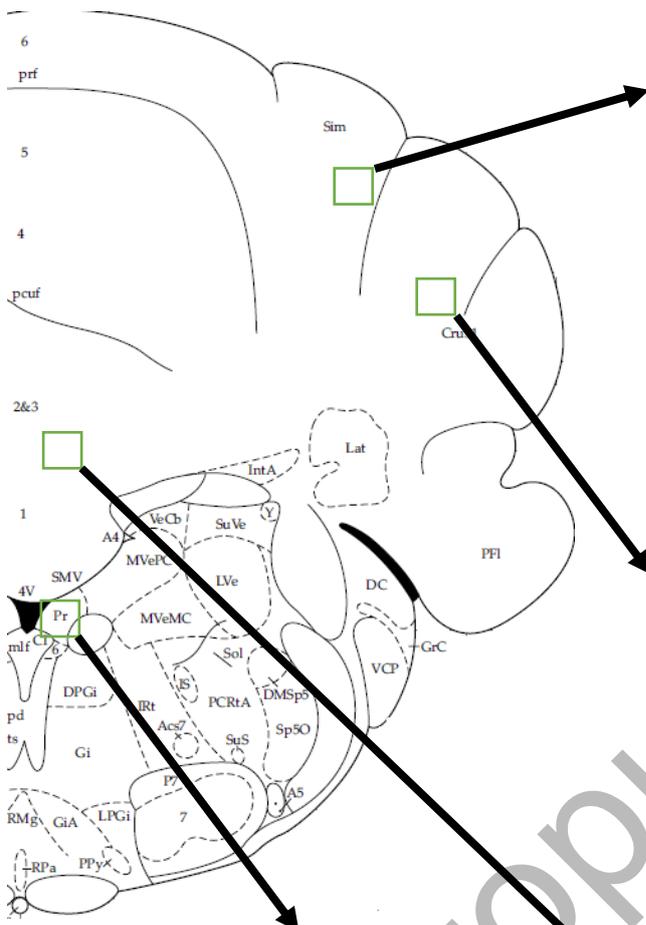
Иммуногистохимическое окрашивание на АТФ-синтазу.
Цифровая микрофотография. Увелич. 1000 (А) и 400 (В)

Рисунок 3.10

**А – дорсомедиальная часть ядра тройничного нерва;
В – вестибулокохлеарный ганглий**



Bregma -10,8

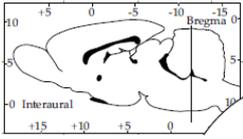


Иммуногистохимическое окрашивание на АТФ-синтазу.

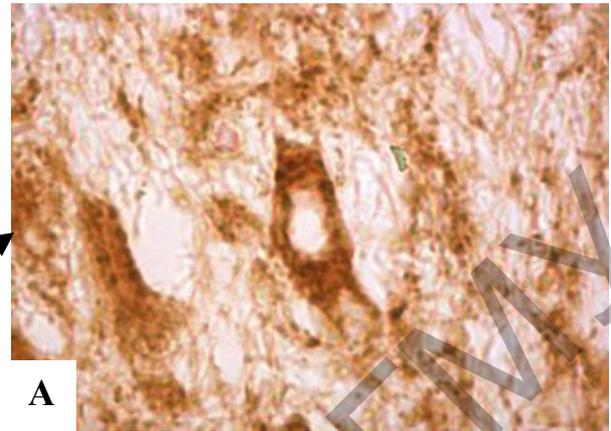
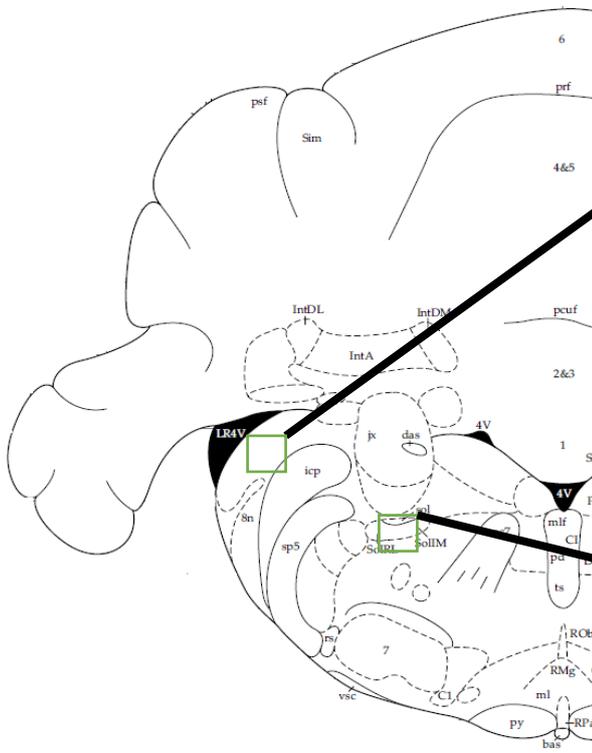
Цифровая микрофотография. Увелич. 400

Рисунок 3.11

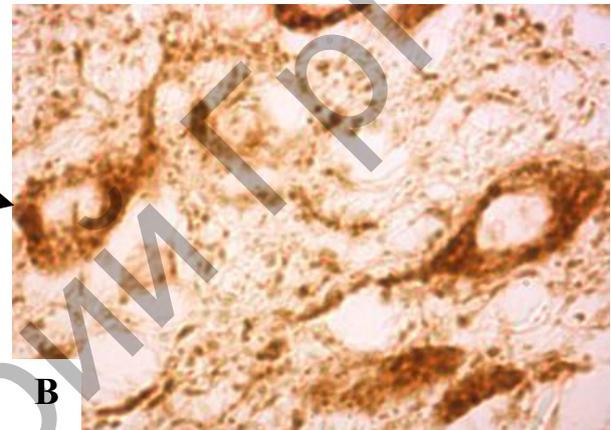
А – простая долька (а – клетка Пуркинье, б – молекулярный слой, в – зернистый слой); **В** – crus I (а – клетка Пуркинье, б – молекулярный слой, в – зернистый слой); **С** – червь (а – клетка Пуркинье, б – молекулярный слой, в – зернистый слой); **Д** – препозитарное ядро



Bregma -11,3



A



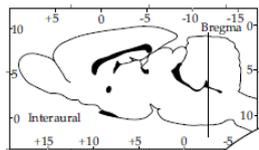
B

Иммуногистохимическое окрашивание на АТФ-синтазу.

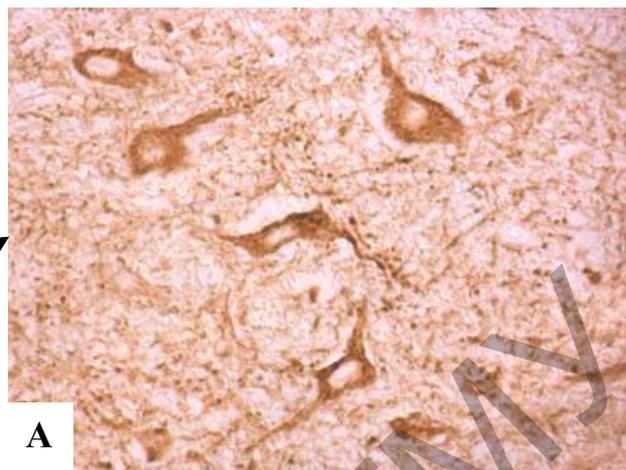
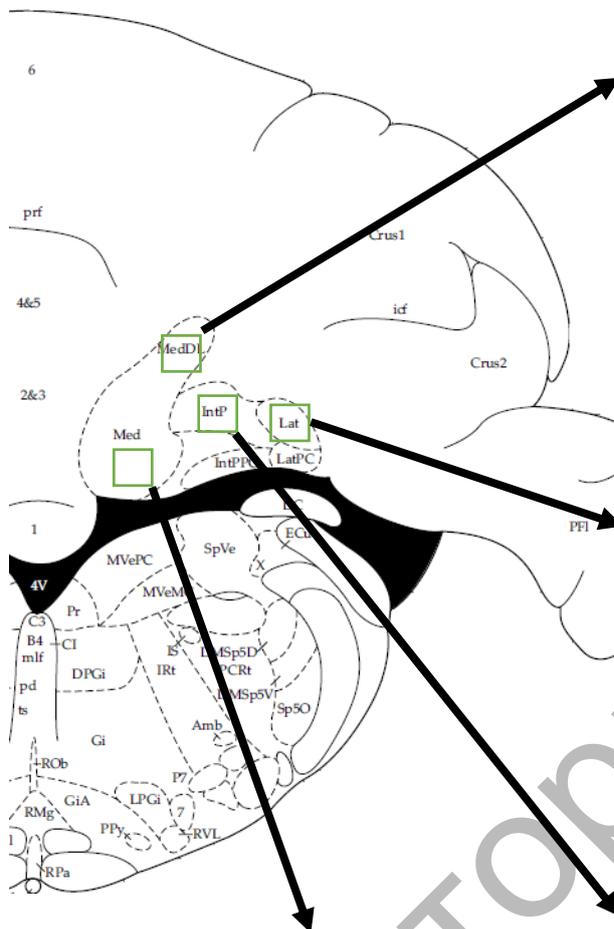
Цифровая микрофотография. Увелич. 1000

Рисунок 3.12

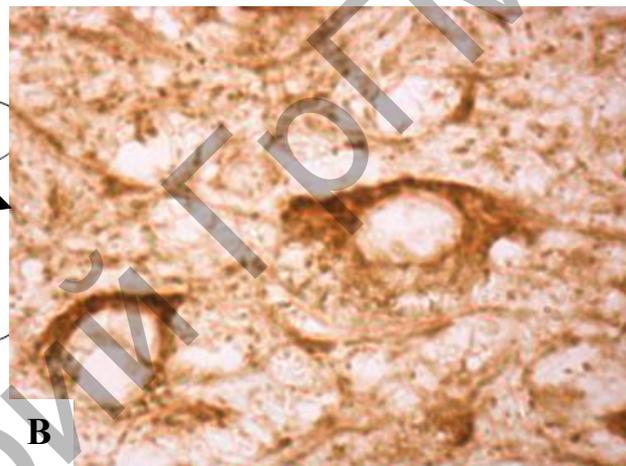
A – дорсальное слуховое ядро; Б – ядро одиночного пути



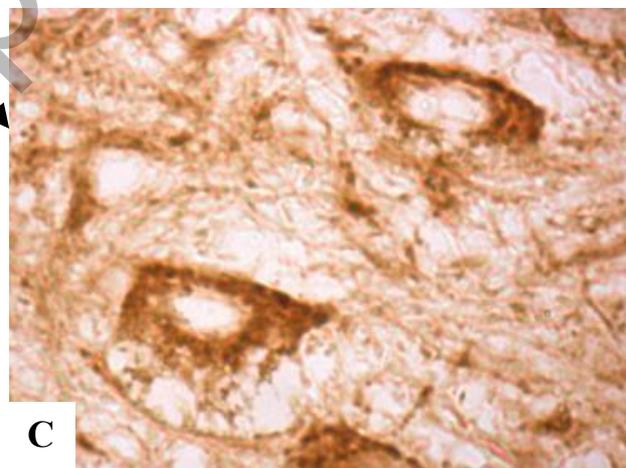
Bregma -12,8



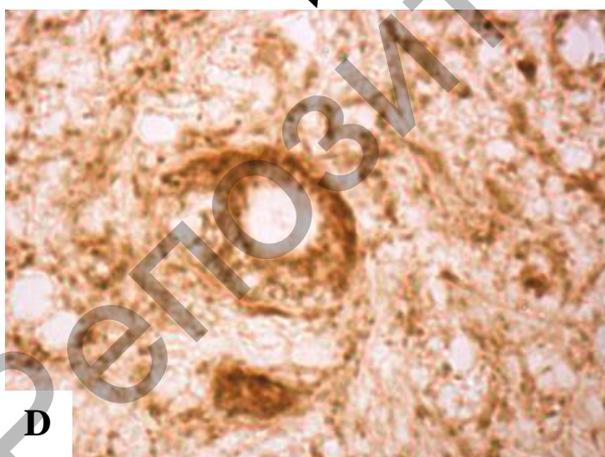
A



B



C

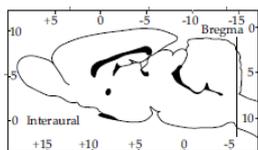


D

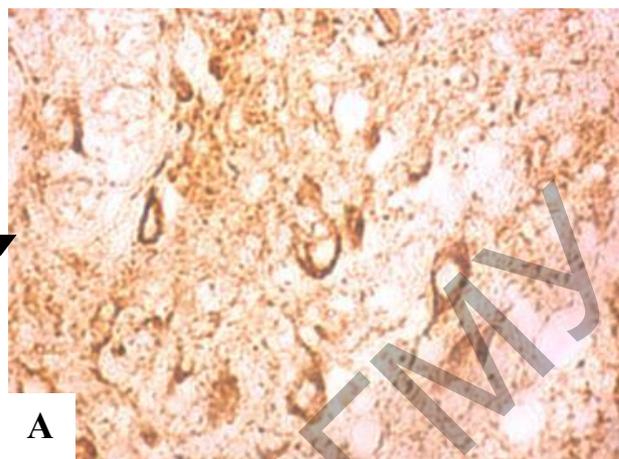
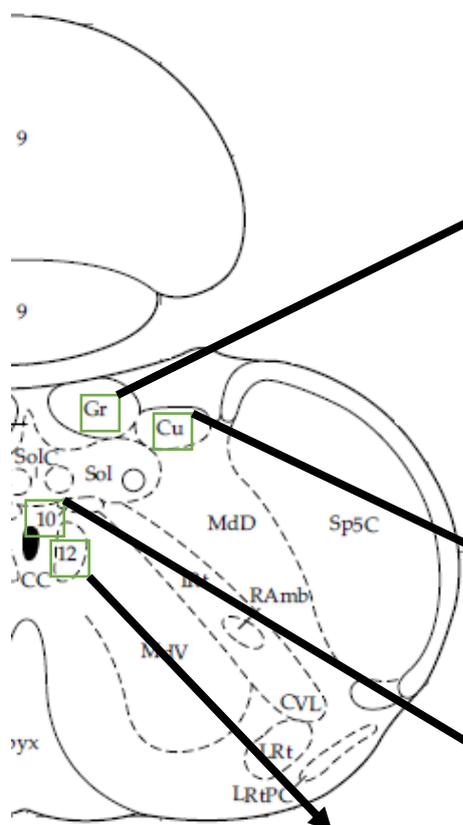
Иммуногистохимическое окрашивание на АТФ-синтазу.
Цифровая микрофотография. Увелич. 400 (А) и 1000 (В-Д)

Рисунок 3.13 – Ядра мозжечка:

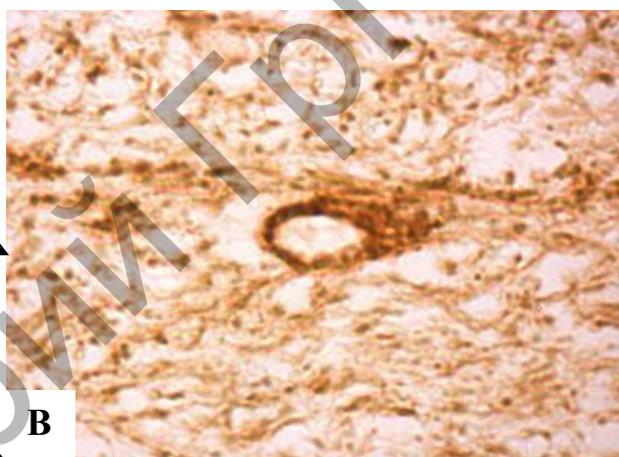
- А** – нейроны дорсолатеральной части медиального ядра мозжечка;
- В** – нейроны медиального ядра мозжечка; **С** – нейроны латерального ядра мозжечка;
- Д** – нейрон промежуточного ядра мозжечка



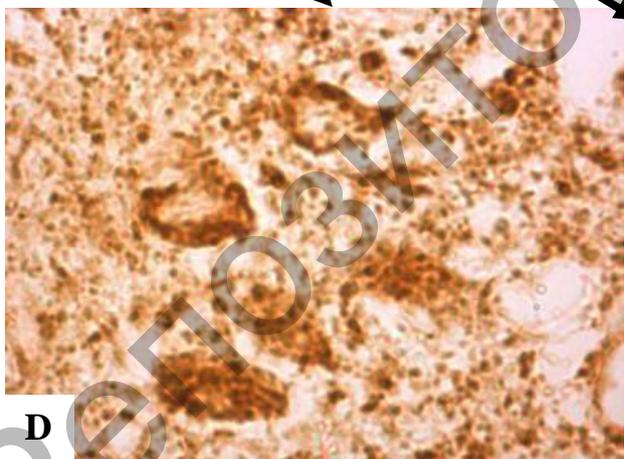
Bregma -14,6



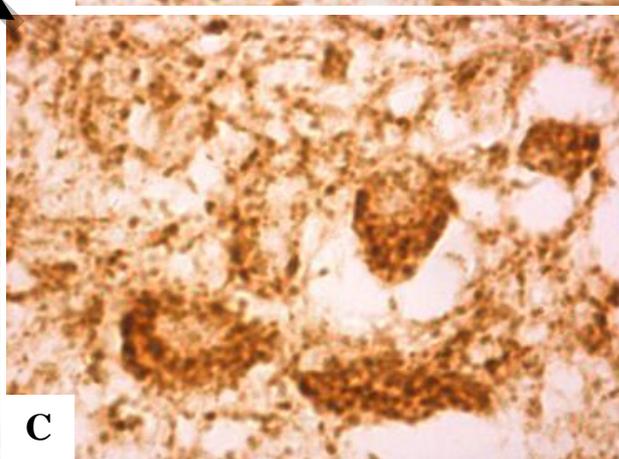
A



B



D

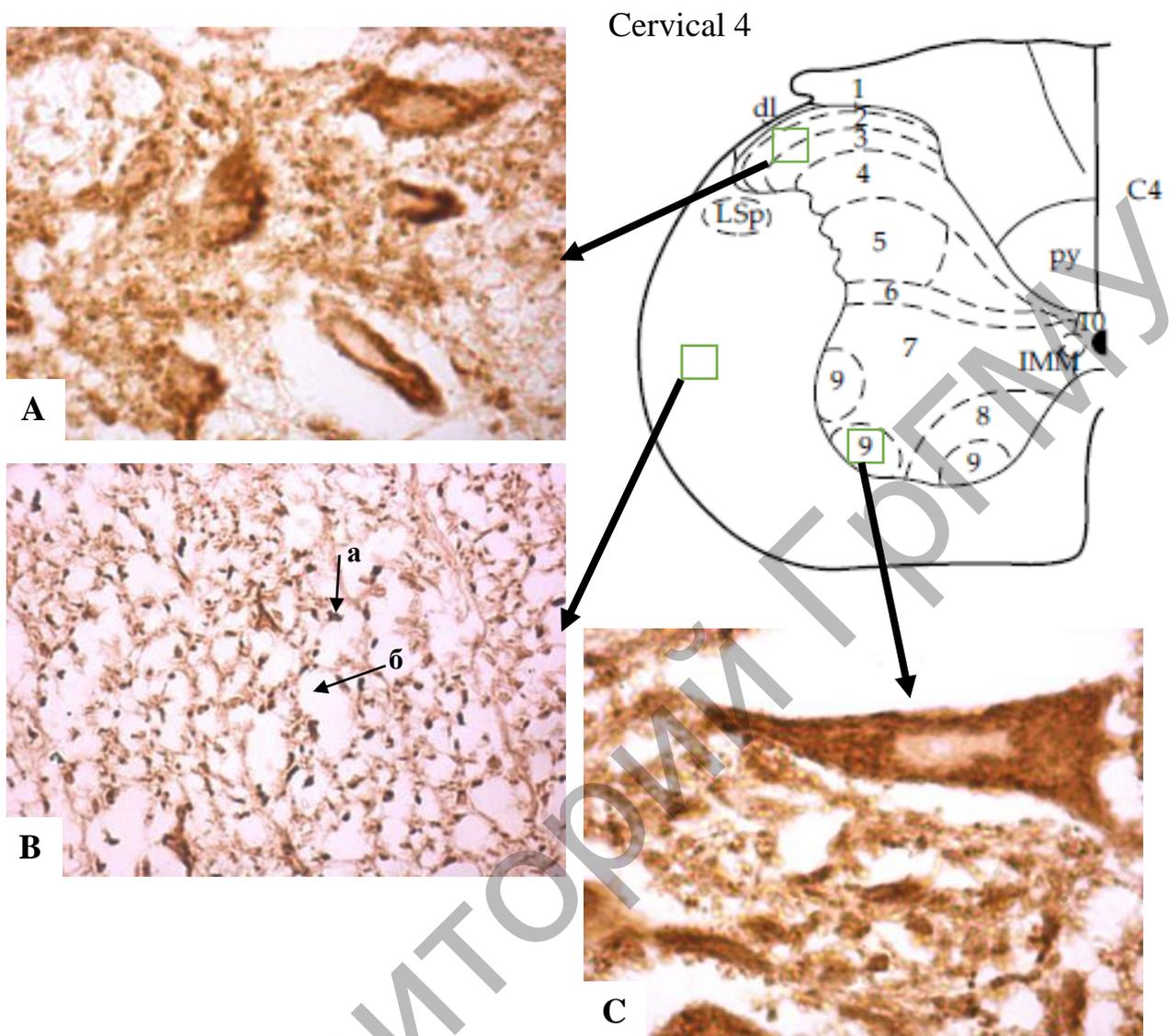


C

Иммуногистохимическое окрашивание на АТФ-синтазу.
Цифровая микрофотография. Увелич. 400 (А) и 1000 (В-Д)

Рисунок 3.15

**А – клиновидное ядро; В – тонкое ядро;
С – ядро X пары черепных нервов; Д – ядро XII пары черепных нервов**



Иммуногистохимическое окрашивание на АТФ-синтазу.
 Цифровая микрофотография. Увелич. 1000 (А, С) и 400 (В)

Рисунок 3.16

Структуры шейного отдела спинного мозга:

- А – нейроны задних рогов шейного отдела спинного мозга;**
- В – боковой канатик шейного отдела спинного мозга**
(а – осевые цилиндры; б – неокрашенные миелиновые оболочки);
- С – мотонейроны передних рогов спинного мозга**

Региональное распределение АТФ-синтазы в мозге крысы характеризуется высокой гетерогенностью: нейроны разных типов и отделов мозга содержат неодинаковое количество этого фермента (таблица П.1). Содержание АТФ-азы варьирует от 159-172 у. е. в нейронах медиального ядра миндалина, митральных клетках обонятельной луковицы (рисунок 3.1) и нейронах ядра подъязычного нерва до 515-545 у. е. в вестибулокохлеарном ганглии и центральном ядре спинного мозга крысы (рисунки 3.10, 3.16, таблица П.1). В среднем для большинства структур мозга характерен умеренный уровень иммуноокрашивания в пределах от 250 до 350 у. е. (таблица П.1) [167, 168].

Для нейронов конечного мозга характерна наибольшая гетерогенность содержания АТФ-синтазы: обнаруживаются как нейроны с низкой интенсивностью окрашивания, так и с умеренной и интенсивной иммуноокраской (рисунки 3.1-3.3, 3.8). Для структур нео-, палео- и архикортекса характерны разнообразные уровни содержания АТФ-синтазы (таблица П.1). В целом более высокие уровни АТФ-синтазы в пределах конечного мозга обнаружены в крупных нейронах (пирамидных и клетках-канделябрах) (рисунки 3.3, 3.8; таблица П.1) [167, 168].

Нейроны ствола мозга выделяются преимущественно высоким, в некоторых случаях и очень высоким, содержанием АТФ-синтазы с очевидной тенденцией к увеличению ее в переднезаднем направлении (рисунки 3.9, 3.10, 3.14, 3.15; таблица П.1) [167, 168].

В нейронах коры мозжечка содержание АТФ-синтазы варьирует от умеренного до высокого и отличается в зависимости от слоя (рисунок 3.11). При этом ядра мозжечка содержат больше АТФ-синтазы, чем клетки Пуркинье (рисунки 3.11, 3.13; таблица П.1) [167, 168].

Наиболее высокая гетерогенность распределения АТФ-синтазы характерна для конечного мозга. Вероятно, это связано с большим числом и функциональным разнообразием структур конечного мозга [167, 168]. Относительно низкое количество АТФ-синтазы в митральных клетках обонятельной луковицы может быть объяснено уникальным типом их работы – ритмической активностью (при вдыхании пахучих веществ) [169], что, возможно, приводит к меньшей скорости расхода энергии и, как следствие, менее развитому энергетическому аппарату, чем у большинства других нейронов.

При рассмотрении интенсивности иммуноокрашивания отдельно в многослойных структурах конечного мозга, заметно, что она зависит от функций, выполняемых нейронами в пределах конкретного слоя. Нейроны II-III слоев, отвечающие за внутрикорковые связи, характеризуются менее развитым энергетическим аппаратом, чем нейроны V и VI слоев, являющиеся началом комиссуральных и проекционных волокон и филогенетически более молодыми [167, 168].

В нейронах II слоя гиппокампа (полях CA1-CA3) и зубчатой извилины количество АТФ-синтазы наименьшее в нейронах поля CA1, эквивалентному мелкоклеточной области в сравнении с нейронами крупноклеточной области. Также немалый вклад вносит характер функций нейронов полей: нейроны поля CA3 крупноклеточной области соединяют потоки информации древних структур ствола мозга и ассоциативных областей коры и характеризуются несколько более развитым энергетическим аппаратом, чем нейроны поля CA2. Своеобразным исключением являются нейроны зернистого слоя зубчатой извилины, которые, несмотря на некрупные размеры, по уровню развития энергетического аппарата близки к нейронам CA2 и CA3 полей [167, 168]. Вполне вероятно, это может быть связано с продолжением их дифференцировки во взрослом организме [170].

В стволе мозга нейроны с высоким содержанием АТФ-синтазы встречаются чаще. Данная тенденция объясняется прежде всего характером расположенных здесь структур: они включают ядра черепных нервов и жизненно важные центры, что предполагает значительную функциональную нагрузку и, вероятно, требует хорошо развитого энергетического аппарата [167, 168].

В коре мозжечка высокое содержание АТФ-синтазы определяется в клетках Пуркинье. Это можно объяснить очень большим количеством синаптических связей клеток Пуркинье, что, без сомнения, требует существенных энергетических затрат, а также большим размером этих нейронов. Однако в зависимости от участка коры мозжечка содержание АТФ-синтазы сильно различается. Содержание АТФ-синтазы в нейронах ядер мозжечка более высокое, чем в клетках [167, 168].

В определенной степени выраженность энергетического аппарата нейронов определяется их функциональным типом

и расположением в рефлекторных дугах. Причем рецепторные нейроны вестибулокохлеарного ганглия содержат больше АТФ-синтазы, чем рецепторные нейроны мезенцефалического ядра тройничного нерва, располагающегося в среднем мозге (рисунок 3.9, таблица П.1) [167, 168]. Мезенцефалическое ядро состоит преимущественно из типичных для ганглиев черепных нервов псевдоуниполярных нейронов [171, с. 2-8] и имеет только электрические синапсы [172, с. 48-59], а вестибулокохлеарный ганглий содержит в основном биполярные нейроны [173, с. 464-467]. Возможно, различие в развитии энергетических аппаратов нейронов данных структур обусловлено разными структурными типами нейронов и/или превалирующим типом синапсов.

Среди исследованных структур головного и спинного мозга крысы имеется небольшое количество структур, содержащих рецепторные и эффекторные нейроны. Эти структуры характеризуются высоким содержанием АТФ-синтазы [167, 168].

Выводы:

1. АТФ-синтаза локализована в цитоплазме всех нейронов и характеризуется гетерогенным распределением в структурах головного мозга и шейного отдела спинного мозга крысы. Для большинства нейронов характерно относительно умеренное содержание АТФ-синтазы в цитоплазме.

2. Высокий уровень АТФ-синтазы выявлен в рецепторных и эффекторных нейронах ствола мозга и нейронах ядер мозжечка, а также крупных, ганглиозных нейронах мозга.

3. В спинном мозге содержание АТФ-синтазы наибольшее в мотонейронах передних рогов. В белом веществе АТФ-синтаза содержится только в отростках нейронов – осевых цилиндрах, но не в миелиновых оболочках.

Глава 4

РЕГИОНАЛЬНОЕ И КЛЕТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ НЕЙРОГЛОБИНА В МОЗГЕ КРЫСЫ

Для определения иммунореактивности нейроглобина применяли первичные моноклональные мышинные антитела (Anti-Ngb antibody фирмы Abcam, Великобритания, ab. 197670) в разведении 1:600 (выбрано как оптимальное из серии разведений от 1:100 до 1:3000) при температуре +4 °С, экспозиция 20 часов, во влажной камере. При изучении топографического распределения нейроглобина в норме для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (Великобритания, ab. 80436). При изучении иммунореактивности нейроглобина при СИГМ, для выявления связавшихся первичных антител использовали набор Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit-Micro-polymer (Великобритания, Abcam, ab236466).

Иммунореактивность Ngb выявляется в цитоплазме нейронов и в их отростках всех отделов мозга, при этом в ядрах клеток она не обнаружена. Иммунореактивность Ngb выявлялась также и в глиальных клетках, особенно эпендимоцитах, выстилающих желудочки головного мозга, меньше – в эпендимоцитах сосудистых сплетений (рисунки 4.5С, 4.8А) [174, 175].

Установлена высокая гетерогенность распределения Ngb в цитоплазме нейронов разных структур мозга крысы: от 140-160 у.е. в нейронах различных слоев моторной, височной коры и митральных клетках обонятельной луковицы (рисунки 4.1Б, 4.9, таблица П.1) до 459-497 у.е. в нейронах вестибулокохлеарного ганглия и центрального ядра спинного мозга (рисунки 4.12А, 4.20В; таблица П.1). В целом для большинства структур характерен именно умеренный или низкий уровень Ngb. Очень высокое содержание Ngb обнаружено лишь в единичных структурах и характерно исключительно для мотонейронов спинного мозга и вестибулокохлеарного ганглия (таблица П.1) [174, 175].

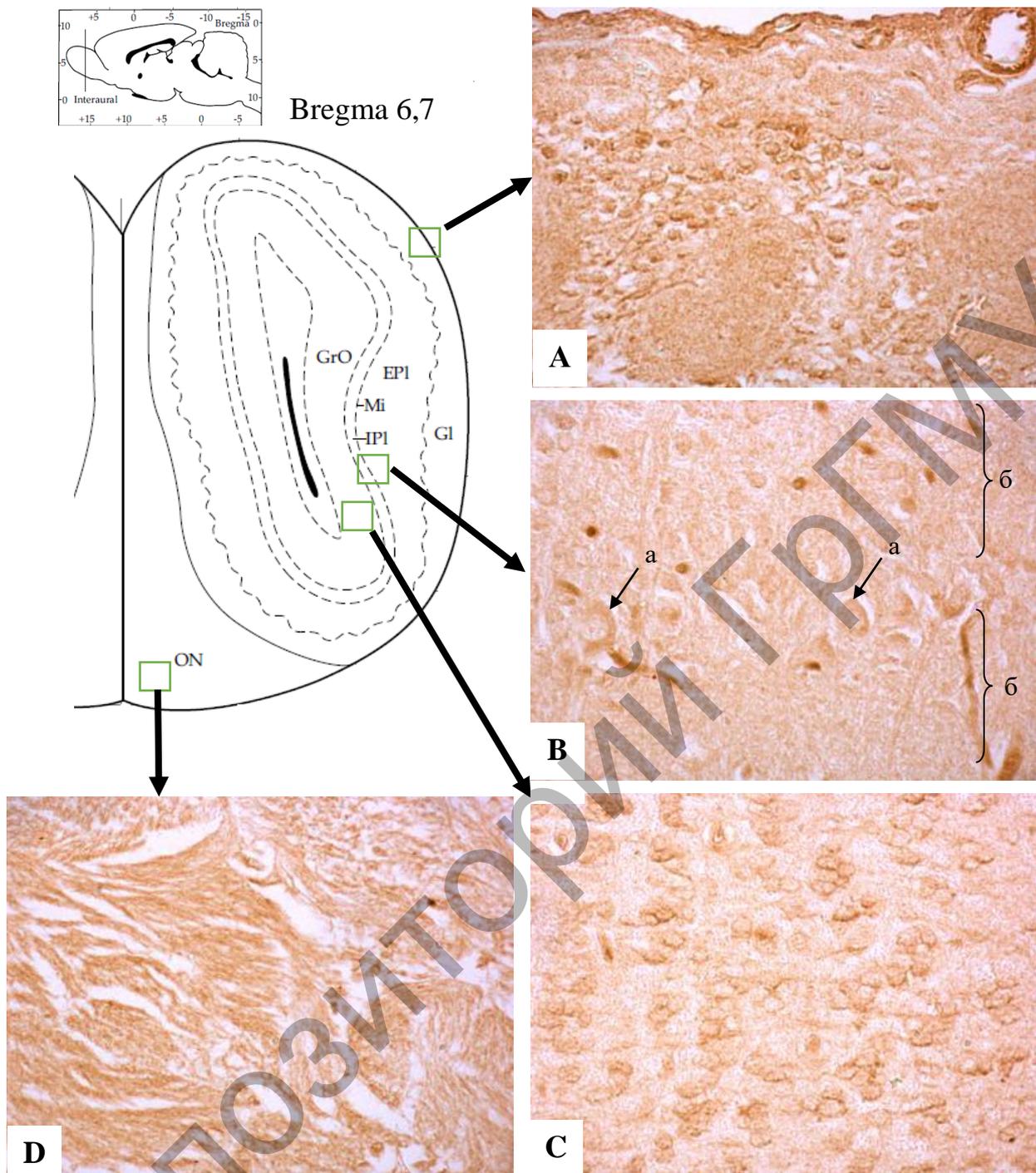
В целом достаточно широкий разброс значений Ngb характерен для всех отделов мозга крысы, особенно для конечного мозга (от 140 до 281 у. е.), моста и продолговатого мозга (от 222 до 497 у. е.) (таблица П.1) [174, 175].

Уровень Ngb в структурах коры в архи- и палеокортексе несколько выше, чем в неокортексе (рисунки 4.1-4.4, 4.7, таблица П.1). Для коры наблюдается еще и увеличение содержания Ngb по мере продвижения от поверхностных к глубоким слоям. Чаще всего максимальные значения Ngb в пределах одного типа коры приходятся на нейроны V слоя, внутреннего пирамидного слоя, содержащий большое количество крупных нейронов (таблица П.1) [174, 175].

Наблюдается тенденция к увеличению содержания Ngb по мере увеличения филогенетического возраста, в том числе в пределах отделов мозга (таблица П.1). Наибольшие значения иммунореактивности Ngb отмечаются в нейронах продолговатого и спинного мозга (рисунки 4.12, 4.14-4.16, 4.18, 4.19, таблица П.1). Установлено, что нейроны ядер мозжечка содержат большее количество Ngb по сравнению с клетками Пуркинье коры мозжечка (рисунки 4.13, 4.17) [174, 175].

В шейном отделе спинного мозга содержание Ngb значительно различается в передних и задних рогах серого вещества. В мотонейронах передних рогов оно в два раза больше, чем во вставочных, ассоциативных нейронах задних рогов (рисунок 4.20, таблица П.1). Различается содержание Ngb и в разных двигательных ядрах спинного мозга, что видно на примере добавочного и центрального ядер (таблица П.1). Наиболее интенсивное иммуноокрашивание наблюдается в нейронах пластинок VI-X серого вещества (таблица П.1) [174, 175].

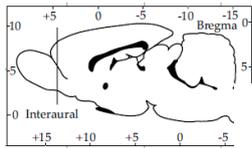
Иммунореактивность Ngb выявляется в нейронах всех отделов мозга. Это указывает на повсеместное распространение Ngb в сером веществе головного и спинного мозга, что согласуется с данными Wustub [120]. Кроме того, повсеместное присутствие Ngb указывает на его важность и необходимость для работы нейронов и нервной системы [174, 175].



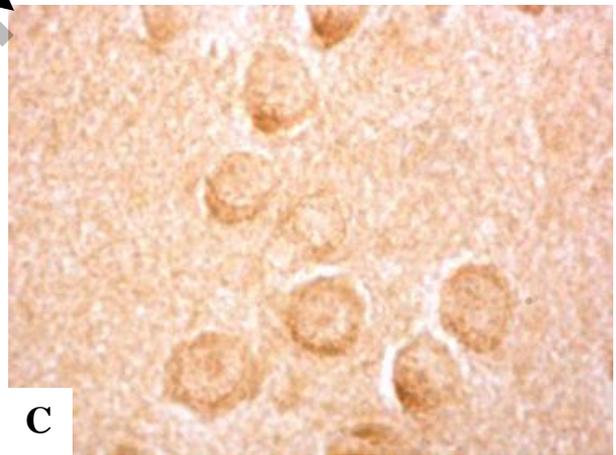
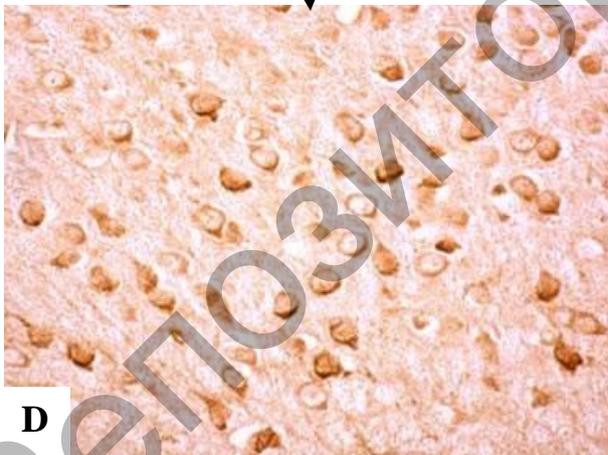
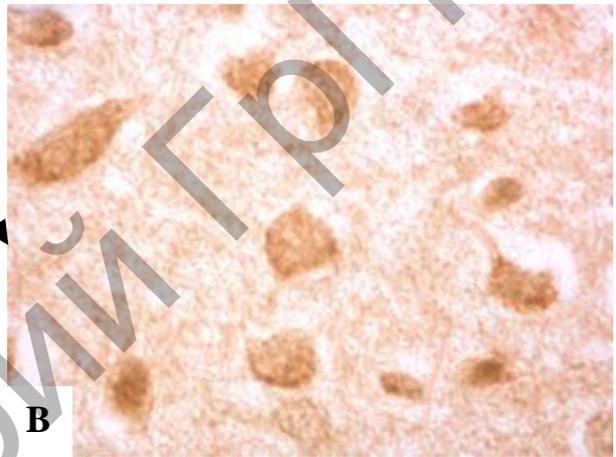
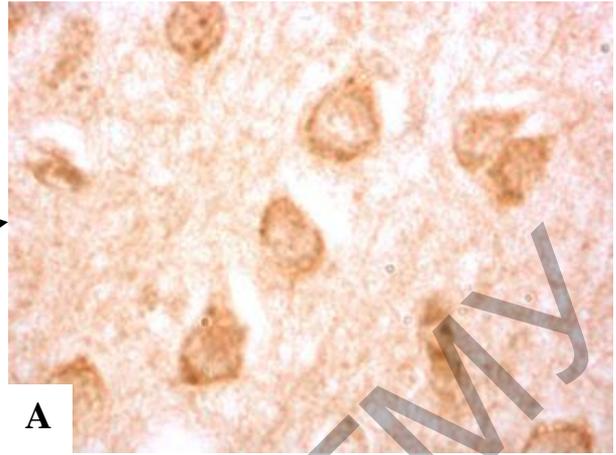
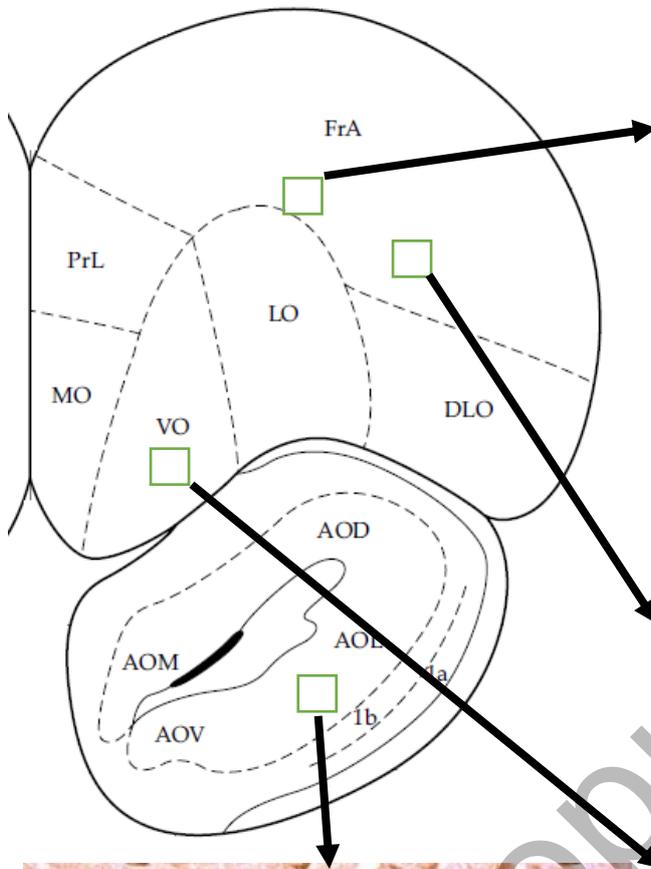
Иммуногистохимическое окрашивание на нейроглобин.
 Цифровая микрофотография. Увелич. 400

Рисунок 4.1

- А** – гломерулярный слой обонятельной луковицы;
- В** – митральные клетки и плексиформные слои
 (а – митральные клетки, б – плексиформные слои);
- С** – внутренний гранулярный слой; **Д** – слой обонятельного нерва



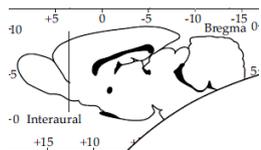
Bregma 4,7



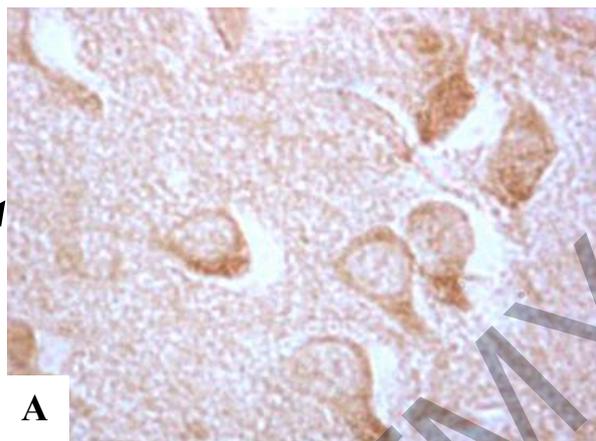
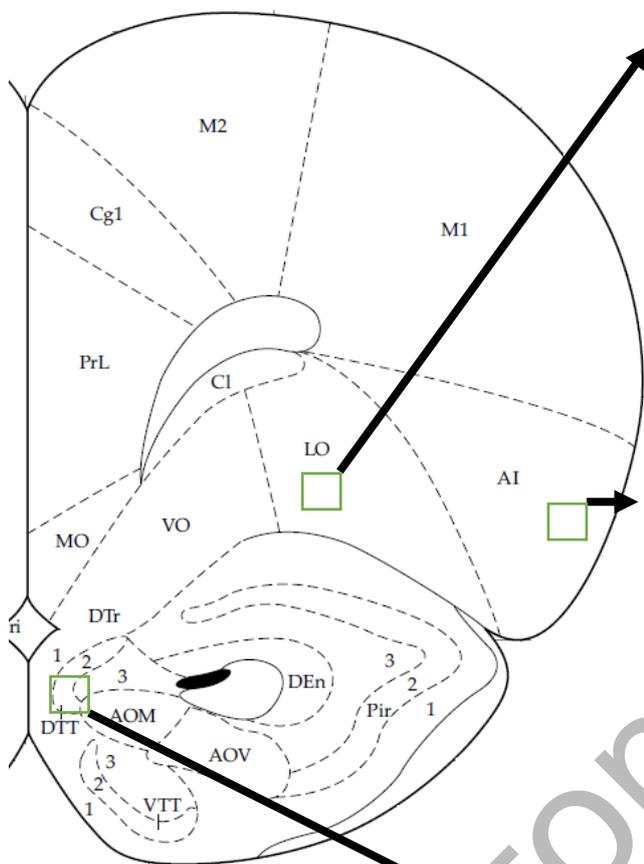
Иммуногистохимическое окрашивание на нейроглобин.
Цифровая микрофотография. Увелич. 400 (A-C) и 100 (D)

Рисунок 4.2

**A – фронтальная кора, V слой; B – фронтальная кора, VI слой;
C – вентральная орбитальная кора, II слой;
D – латеральная передняя обонятельная кора**



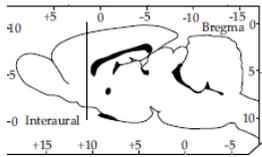
Bregma 3,7



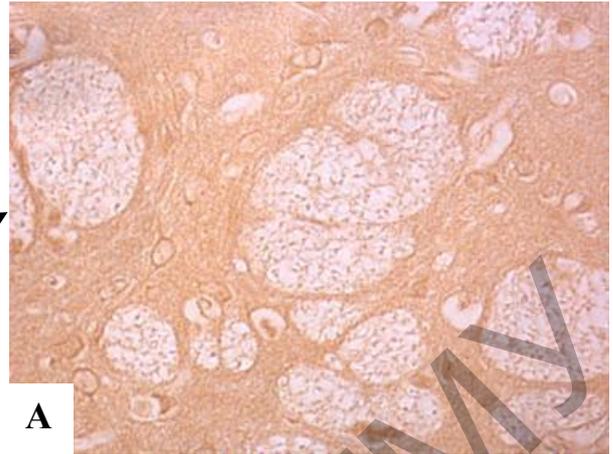
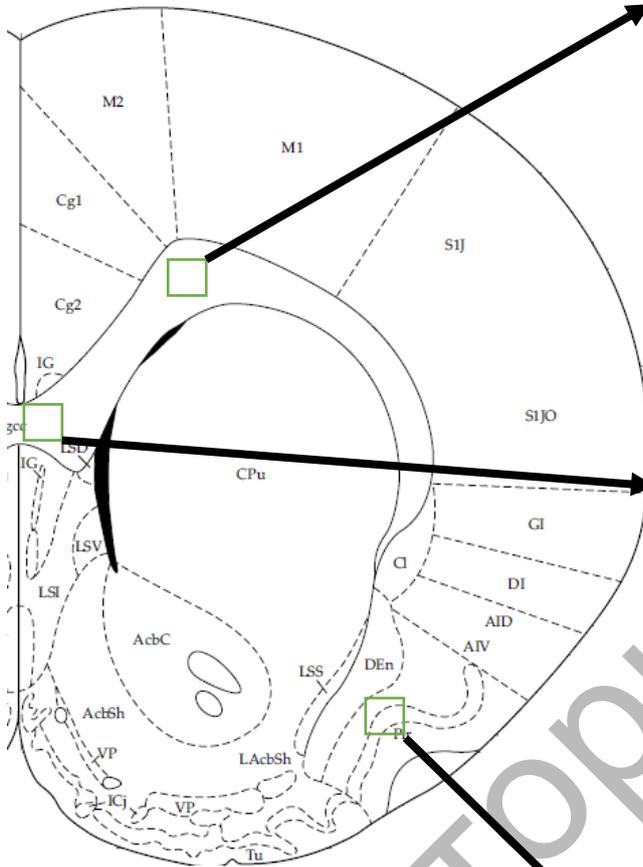
Иммуногистохимическое окрашивание на нейроглобин.
Цифровая микрофотография. Увелич. 1000

Рисунок 4.3

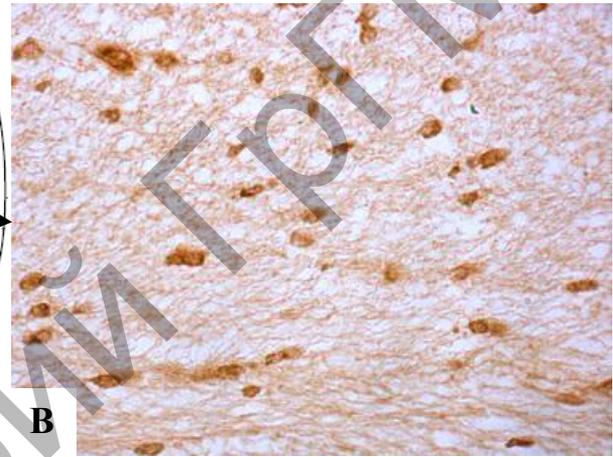
- А** – латеральная орбитальная кора, II слой;
- В** – агранулярная инсулярная кора, II слой;
- С** – задние обонятельные центры



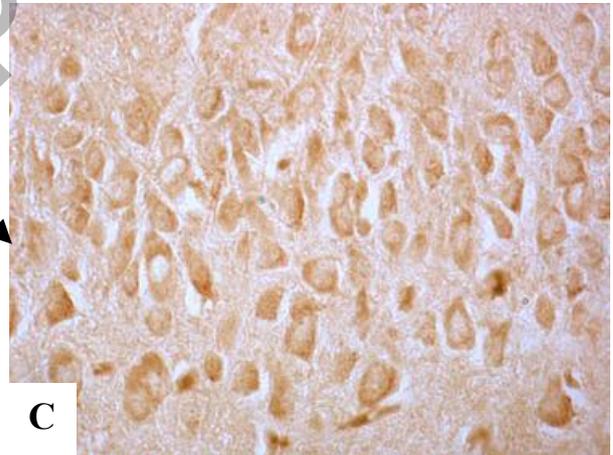
Bregma 1,60



A



B

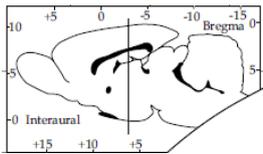


C

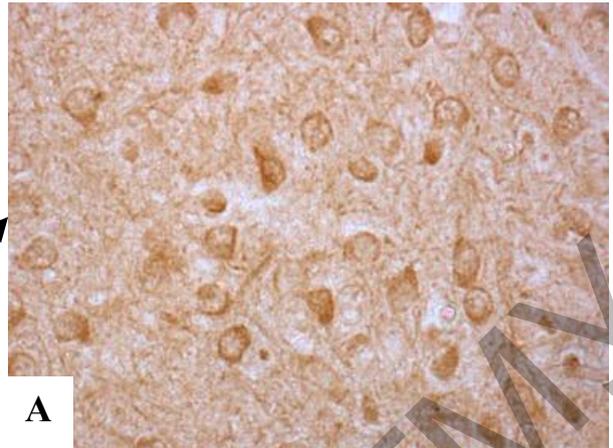
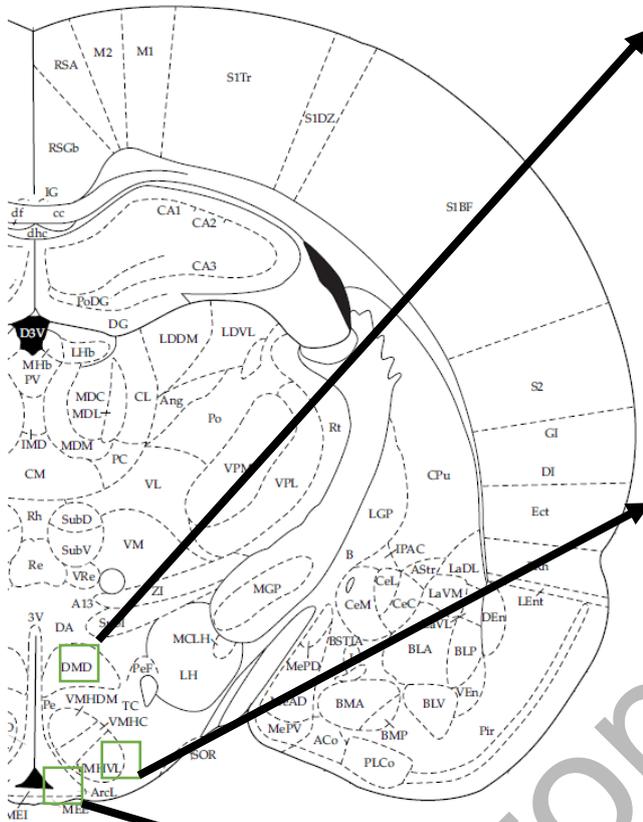
Иммуногистохимическое окрашивание на нейроглобин.
Цифровая микрофотография. Увелич. 400

Рисунок 4.4

- A – малые щипцы мозолистого тела;**
- B – колено мозолистого тела;**
- C – пириформная кора, II слой**



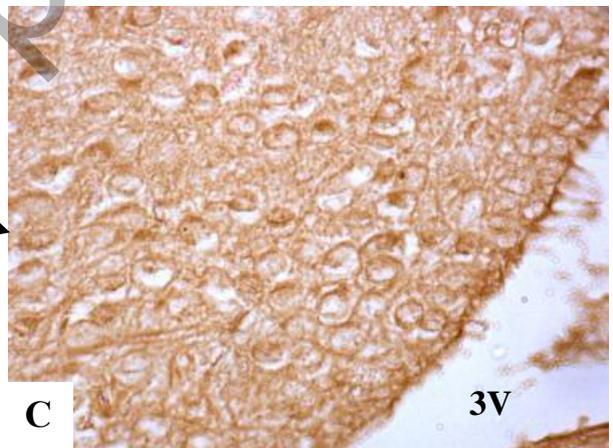
Bregma -2,8



A



B



C

3V

Иммуногистохимическое окрашивание на нейроглобин.

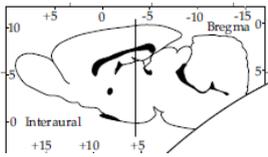
Цифровая микрофотография. Увелич. 400

Рисунок 4.5

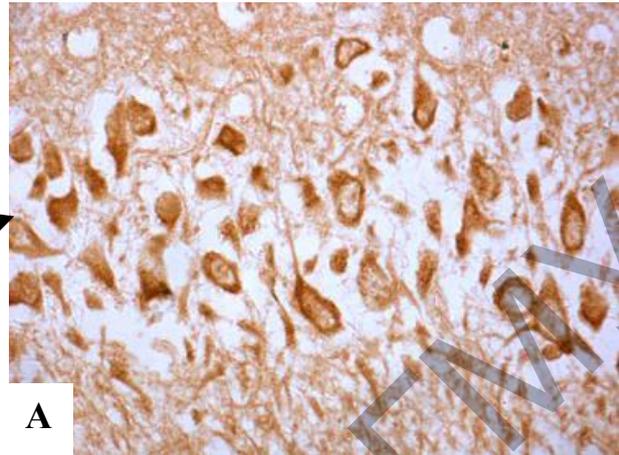
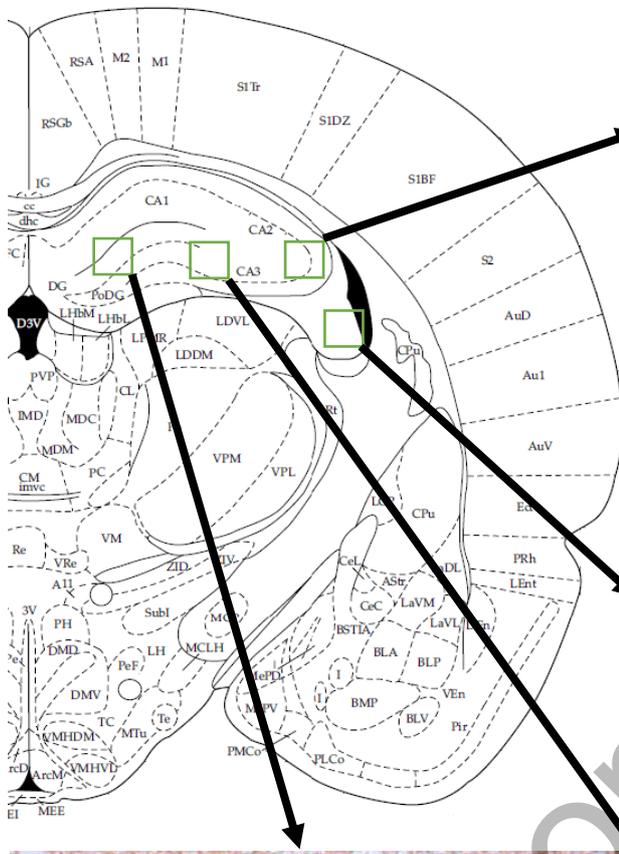
A – дорсомедиальное ядро гипоталамуса;

B – ветромедиальное ядро гипоталамуса;

C – дугообразное ядро гипоталамуса (3V – третий желудочек)



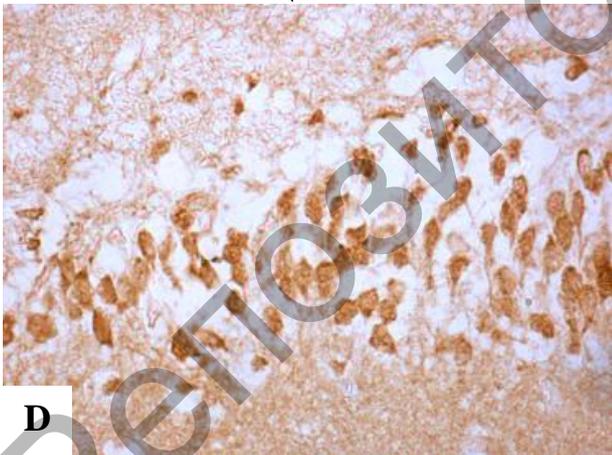
Bregma -3,3



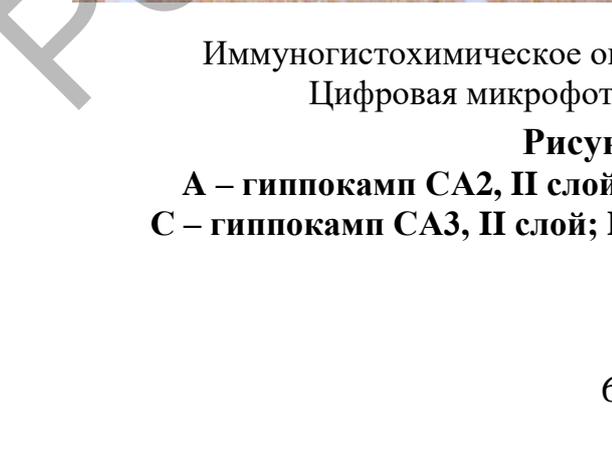
A



B



C



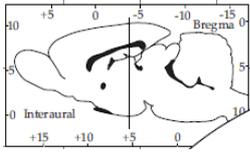
D

Иммуногистохимическое окрашивание на нейроглобин.

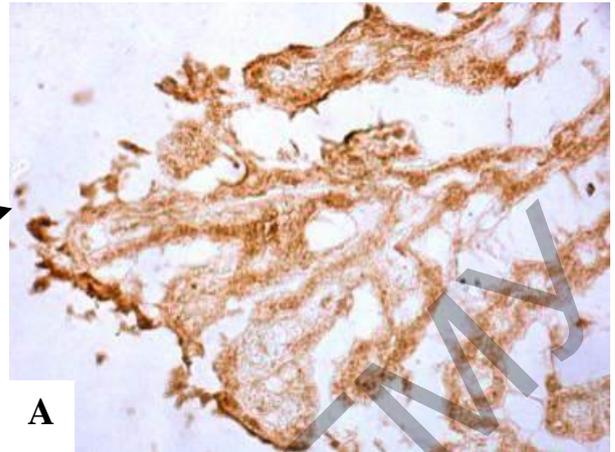
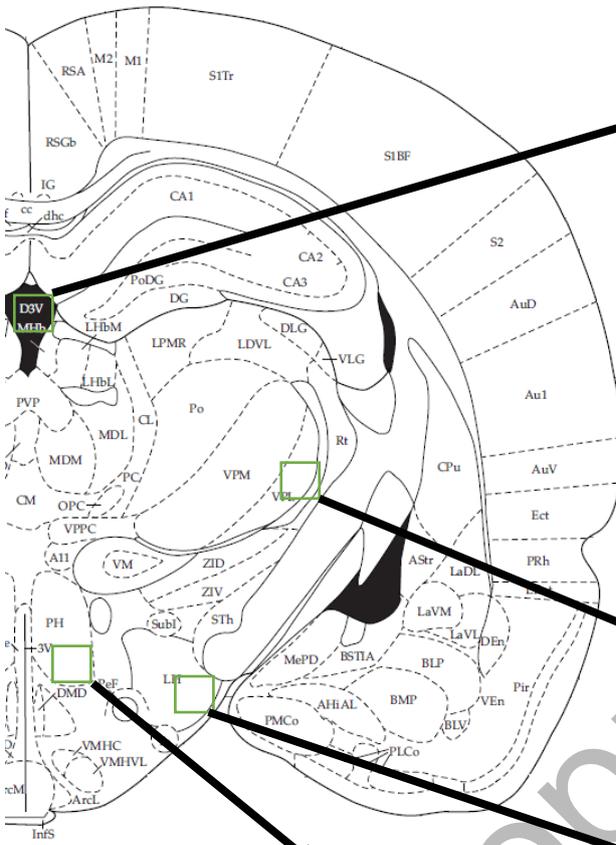
Цифровая микрофотография. Увелич. 400

Рисунок 4.7

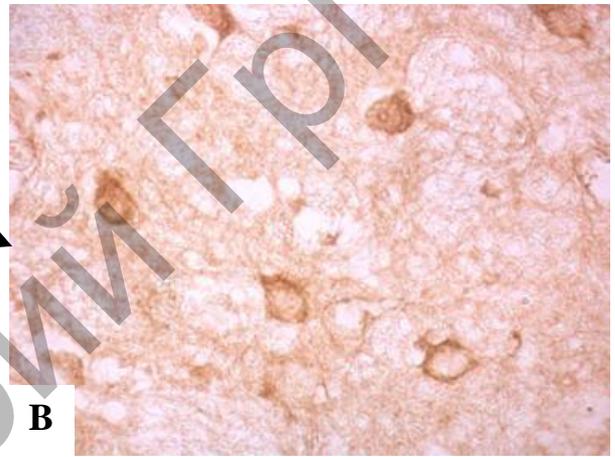
**A – гиппокамп CA2, II слой; В – бахромка гиппокампа;
C – гиппокамп CA3, II слой; D – зубчатая извилина, II слой**



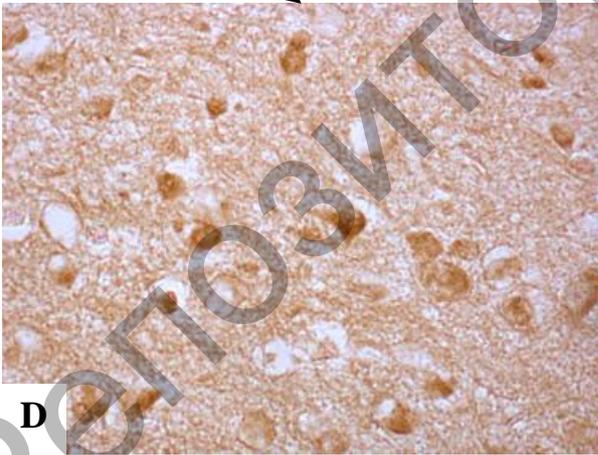
Bregma -3,6



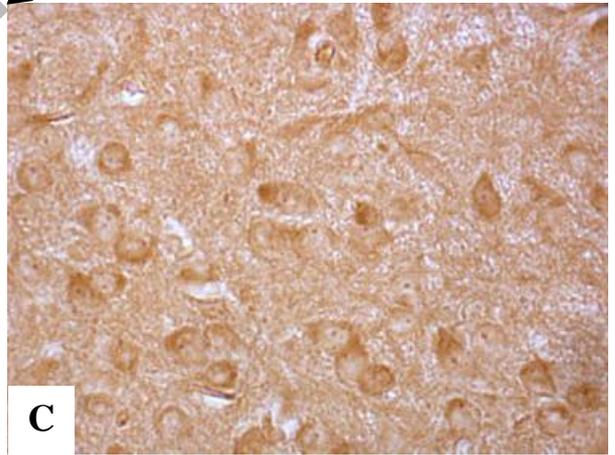
A



B



D

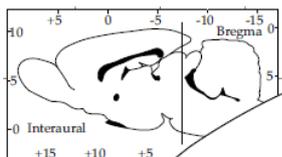


C

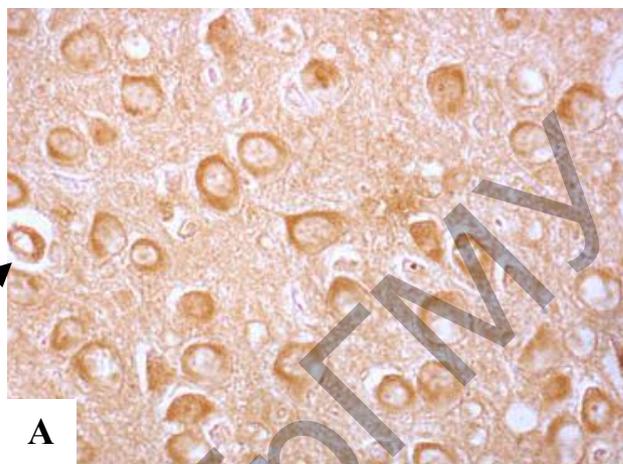
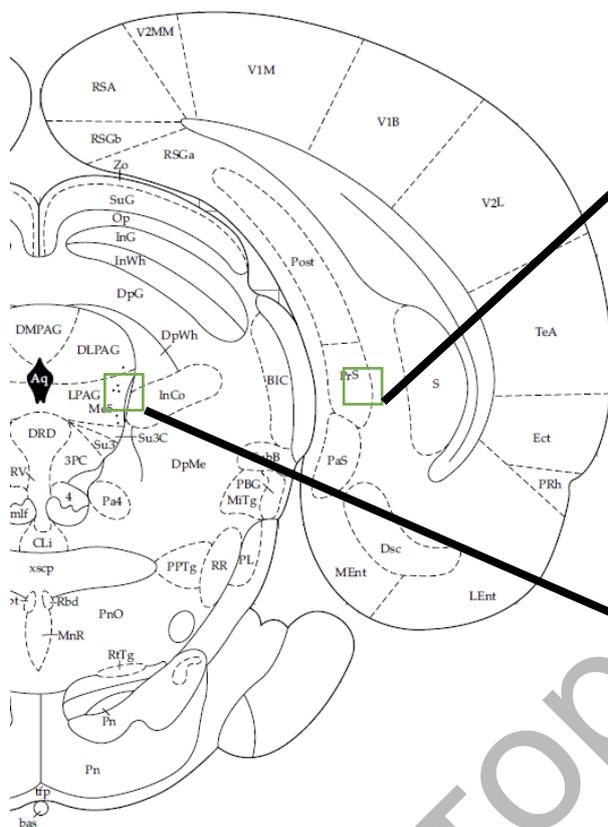
Иммуногистохимическое окрашивание на нейроглобин.
Цифровая микрофотография. Увелич. 400

Рисунок 4.8

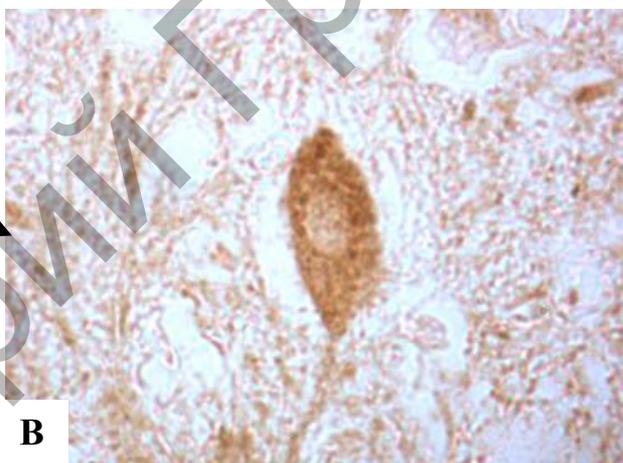
- A – сосудистое сплетение III желудочка;**
- B – вентральное постеролатеральное ядро таламуса;**
- C – латеральная область гипоталамуса;**
- D – задняя область гипоталамуса (премаммилярное ядро)**



Bregma -7,3



A



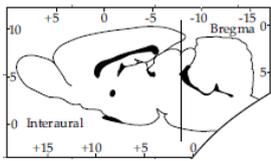
B

Иммуногистохимическое окрашивание на нейроглобин.
Цифровая микрофотография. Увелич. 400 (А) и 1000 (В)

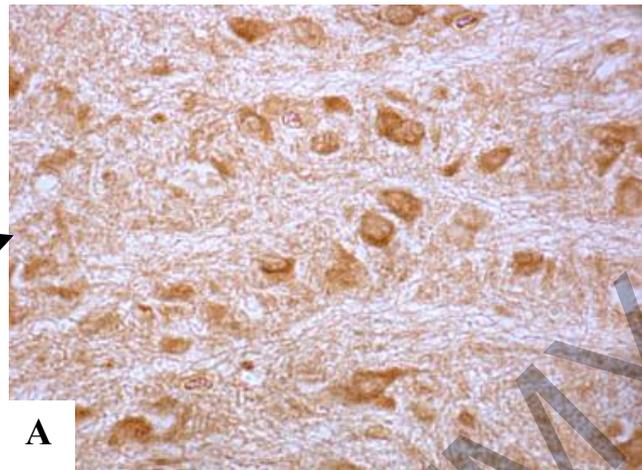
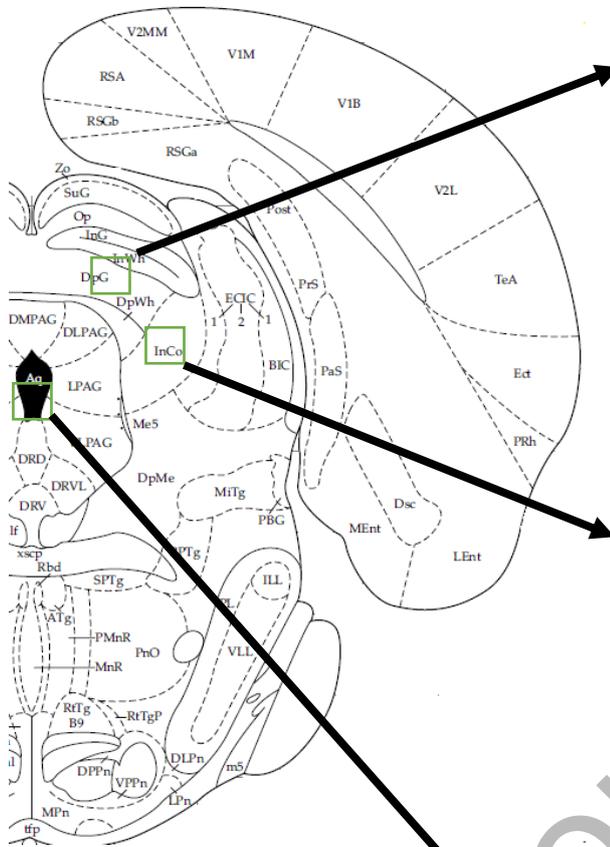
Рисунок 4.10

А – парасубикулум, II-III слои;

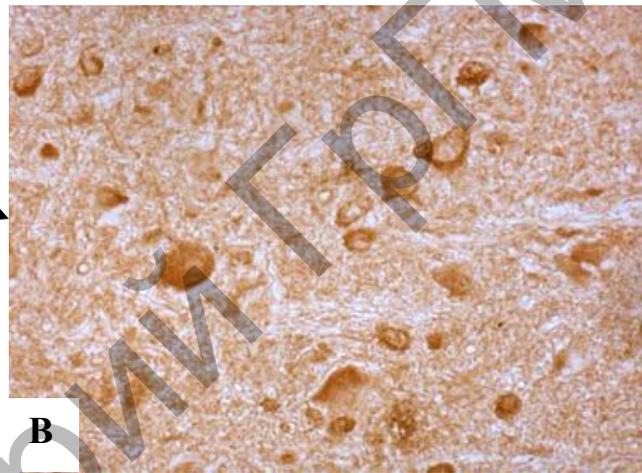
В – нейрон мезенцефалического ядра тройничного нерва



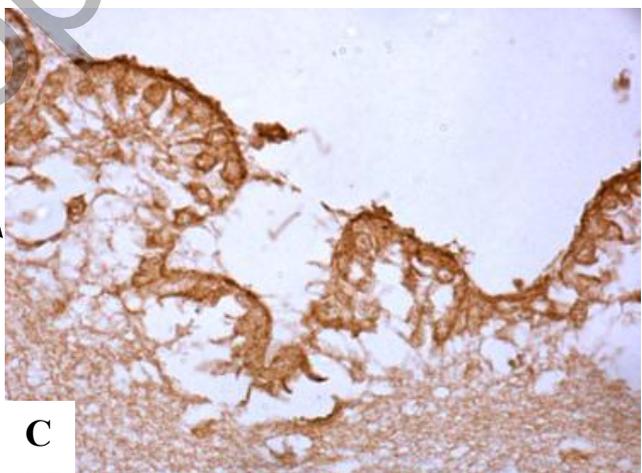
Bregma -7,8



A



B

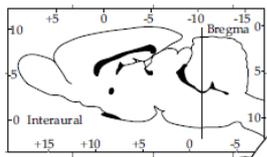


C

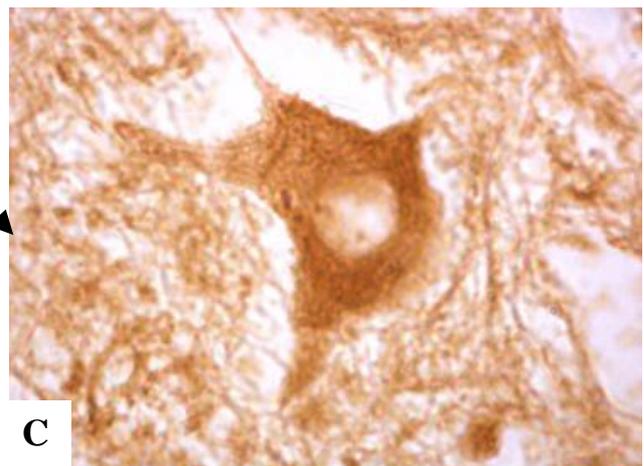
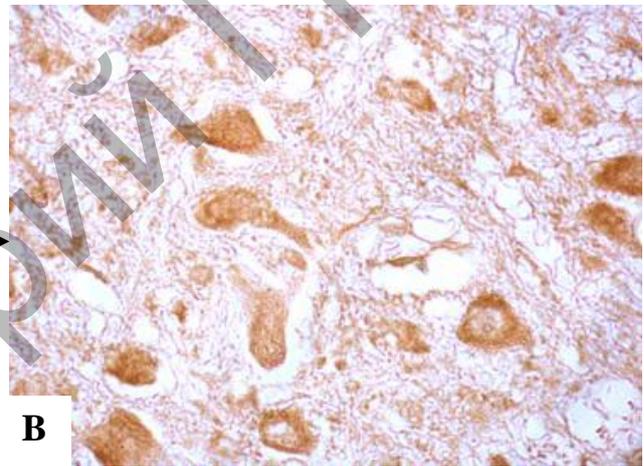
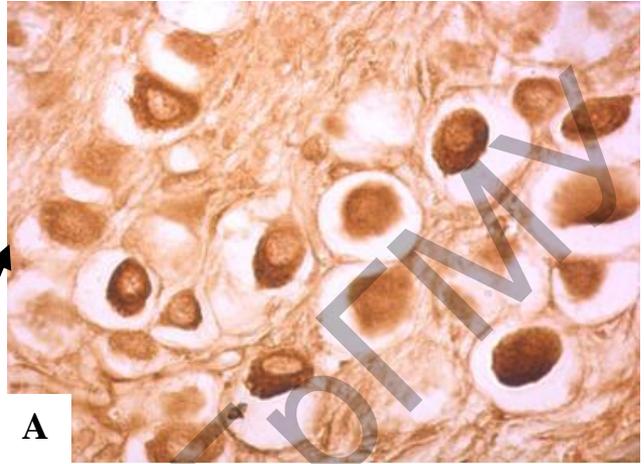
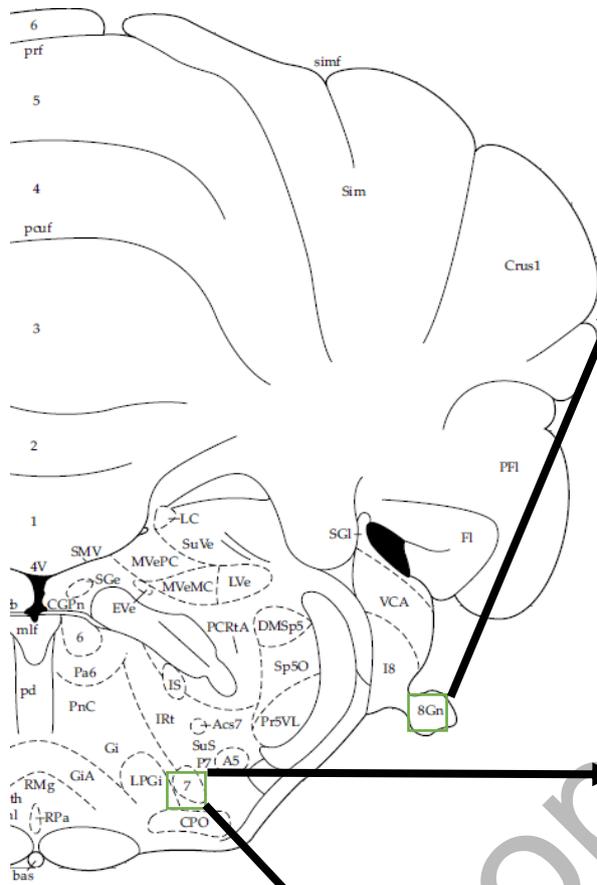
Иммуногистохимическое окрашивание на нейроглобин.
Цифровая микрофотография. Увелич. 400

Рисунок 4.11

**A – глубокие слои серого вещества верхнего двухолмия;
B – интерколликкулярное ядро; C – дно водопровода
(высокое содержание Ngb в выстилающих эпиндимоцитах)**



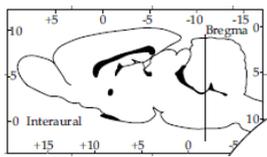
Bregma -10,3



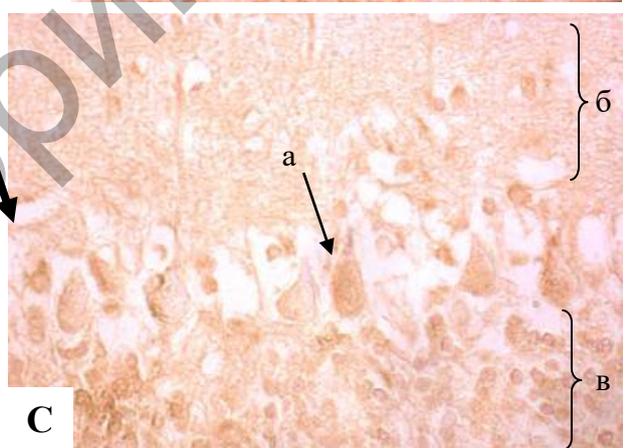
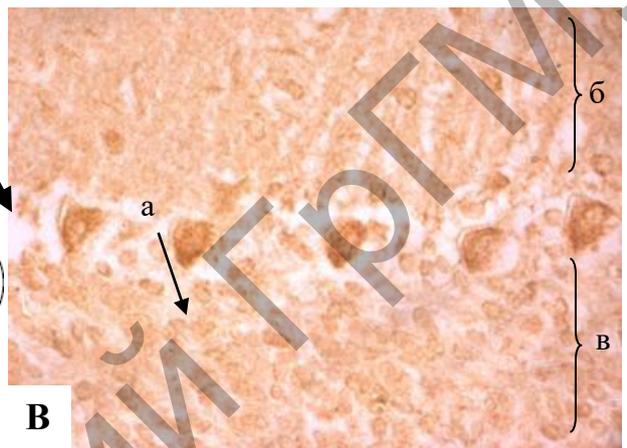
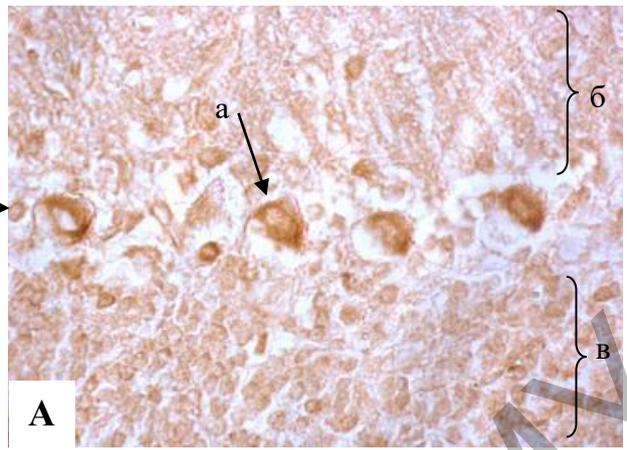
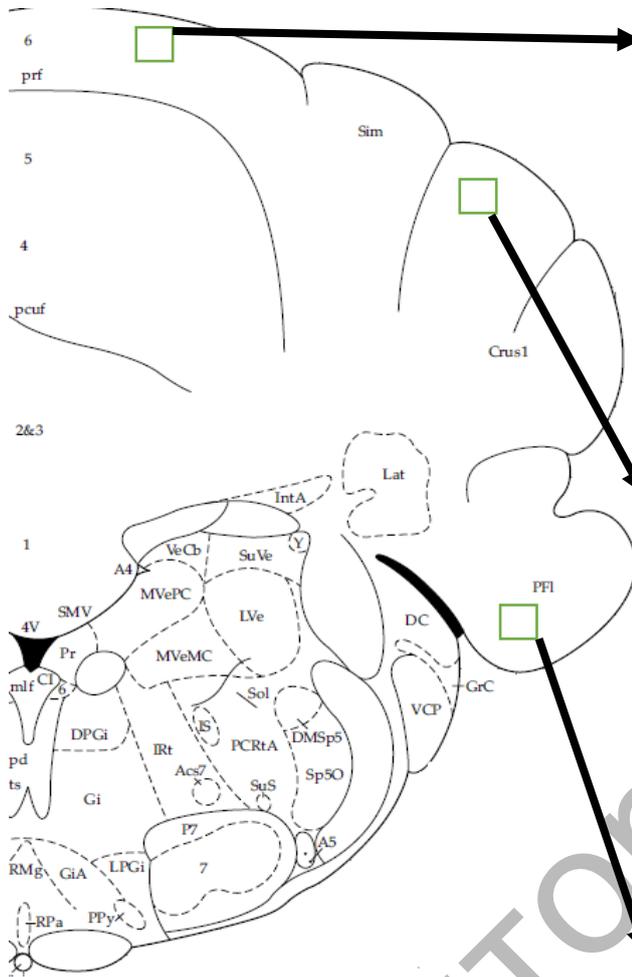
Иммуногистохимическое окрашивание на нейроглобин.
 Цифровая микрофотография. Увелич. 400 (А-В) и 1000 (С)

Рисунок 4.12

А – вестибулокохлеарный ганглий; В-С – ядро VII пары черепных нервов



Bregma -10,8



Иммуногистохимическое окрашивание на нейроглобин.

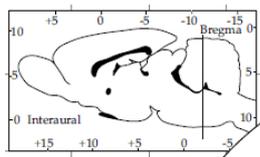
Цифровая микрофотография. Увелич. 400

Рисунок 4.13

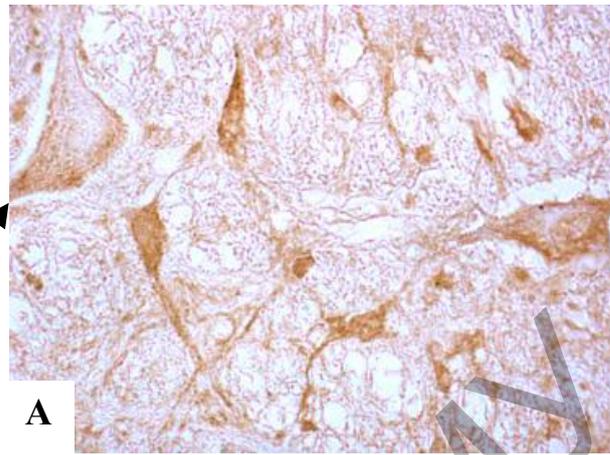
A – червь (а – клетка Пуркинье, б – молекулярный слой, в – зернистый слой);

B – crus I (а – клетка Пуркинье, б – молекулярный слой, в – зернистый слой);

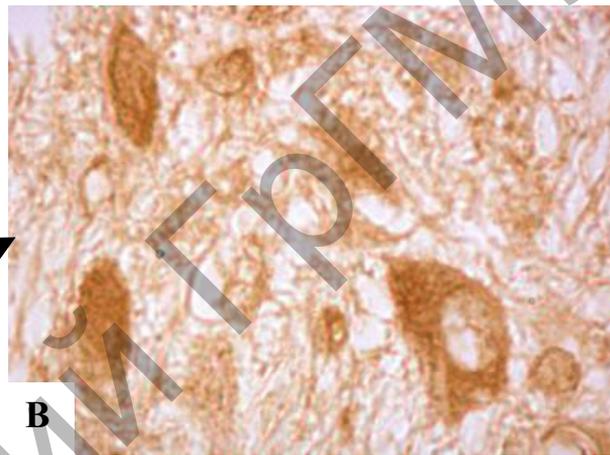
С – околочлочок (а – клетка Пуркинье, б – молекулярный слой, в – зернистый слой)



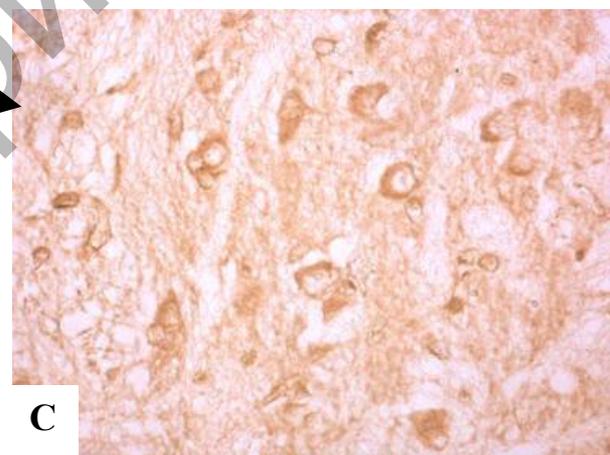
Bregma -11,0



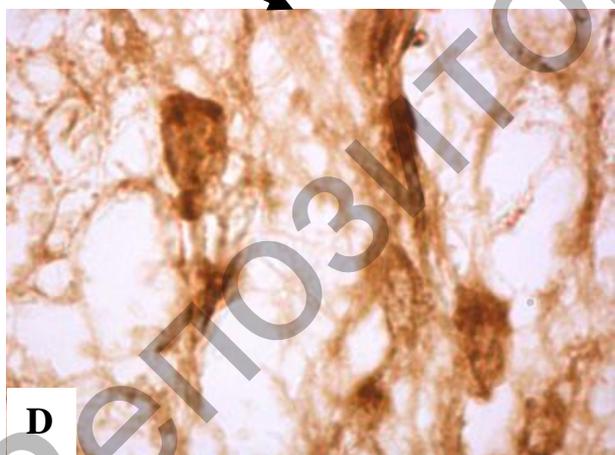
A



B



C

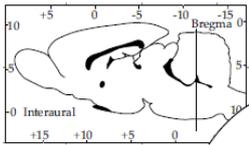


D

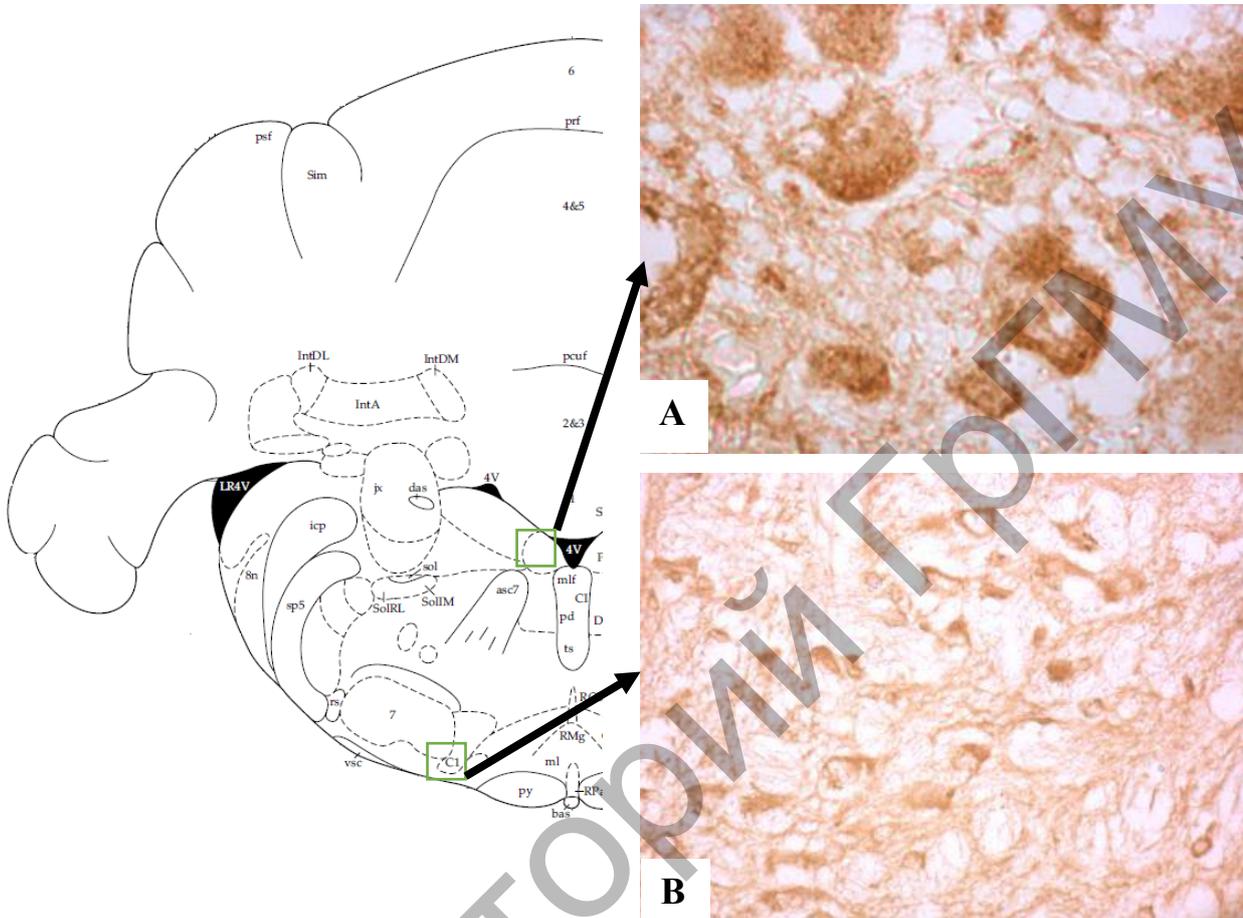
Иммуногистохимическое окрашивание на нейроглобин.
Цифровая микрофотография. Увелич. 400 (A, C) и 1000 (B, D)

Рисунок 4.14

- A – гигантоцеллюлярное ядро;**
- B – парвоцеллюлярное ретикулярное ядро;**
- C – латеральное парагигантоцеллюлярное ядро; D – бледное ядро шва**



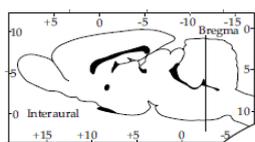
Bregma -11,3



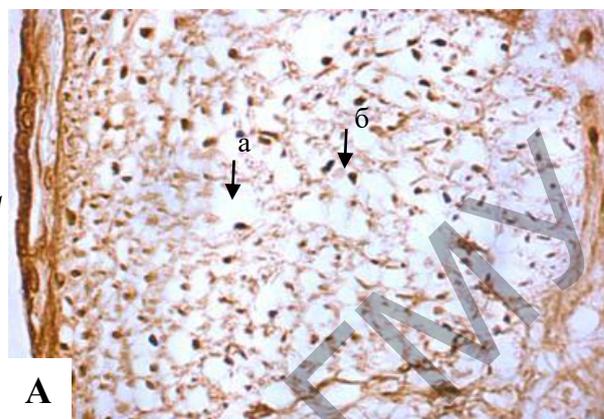
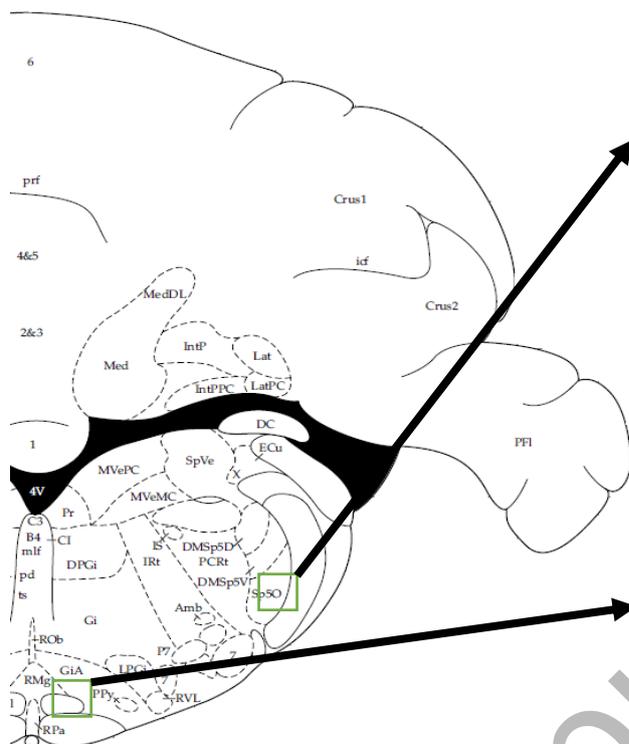
Иммуногистохимическое окрашивание на нейроглобин.
Цифровая микрофотография. Увелич. 1000 (А) и 400 (В)

Рисунок 4.15

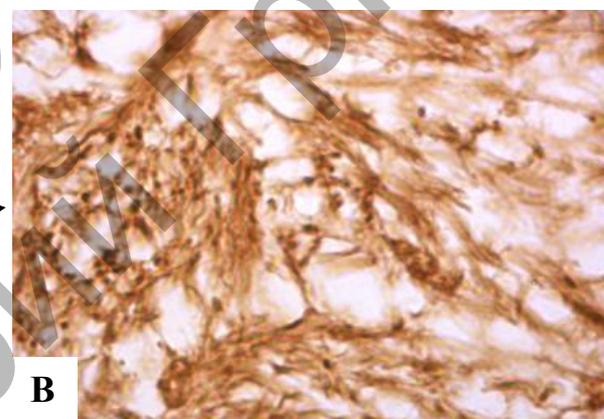
А – препозитарное ядро подъязычного нерва;
В – адрелинергическое ядро С1



Bregma -12,8



A

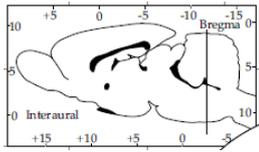


B

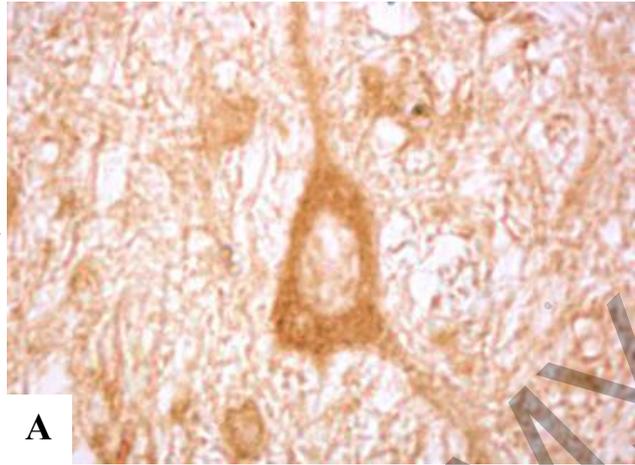
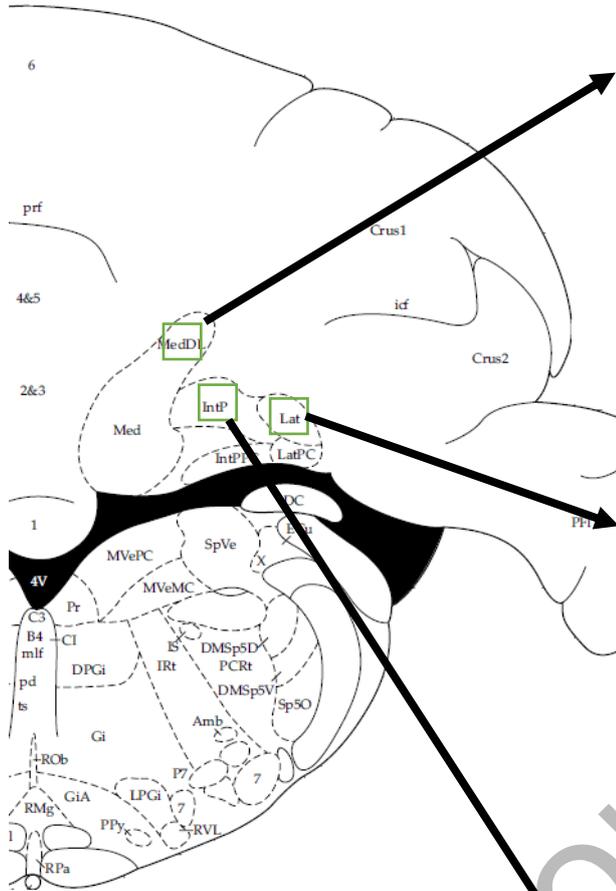
Иммуногистохимическое окрашивание на нейроглобин.
Цифровая микрофотография. Увелич. 400 (A) и 1000 (B)

Рисунок 4.16

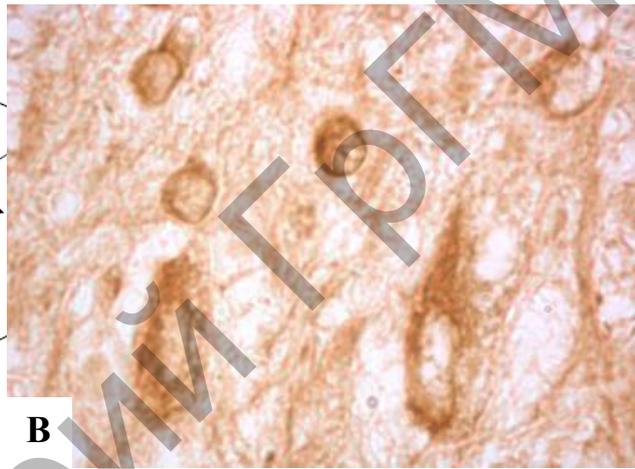
**A – спинномозговой тракт тройничного нерва
(а – миелиновые оболочки, б – осевые цилиндры);
B – волокна пирамидного пути**



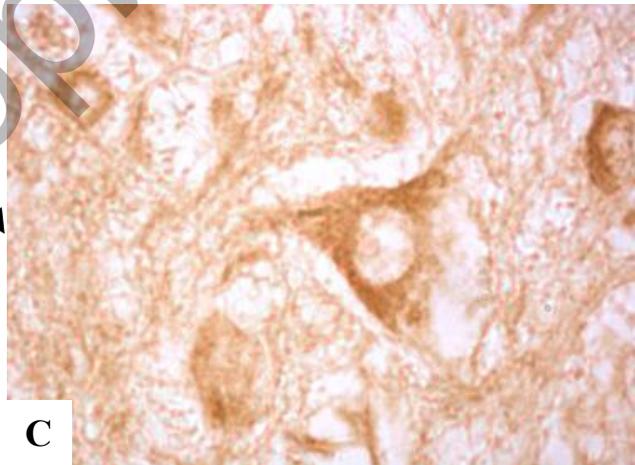
Bregma -12,8



A



B



C

Иммуногистохимическое окрашивание на нейроглобин.

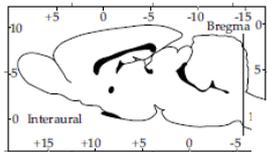
Цифровая микрофотография. Увелич. 1000

Рисунок 4.17. – Ядра мозжечка:

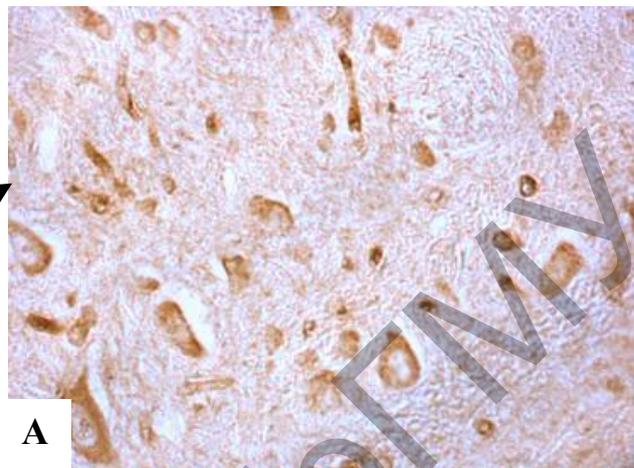
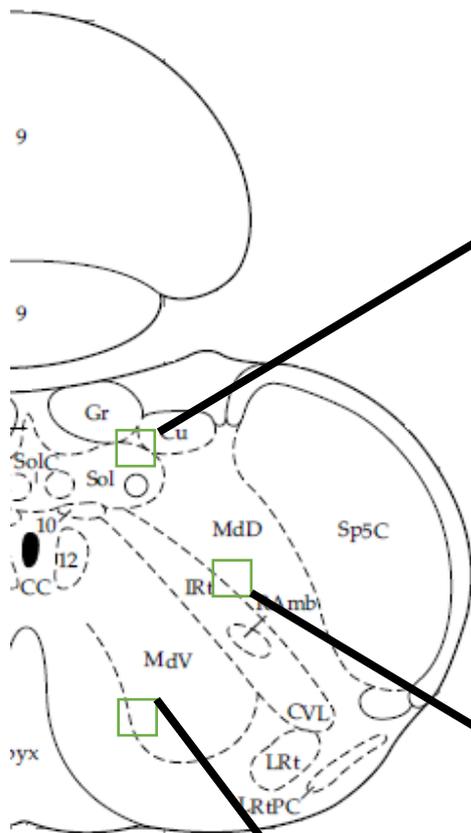
A – нейрон дорсолатеральной части медиального ядра;

B – нейроны латерального ядра;

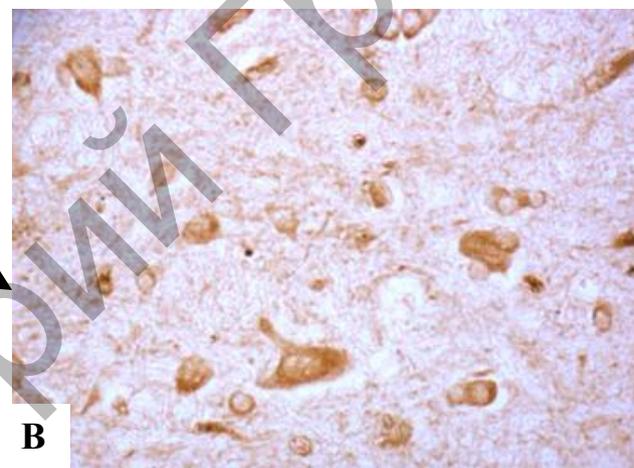
C – нейроны промежуточного ядра мозжечка



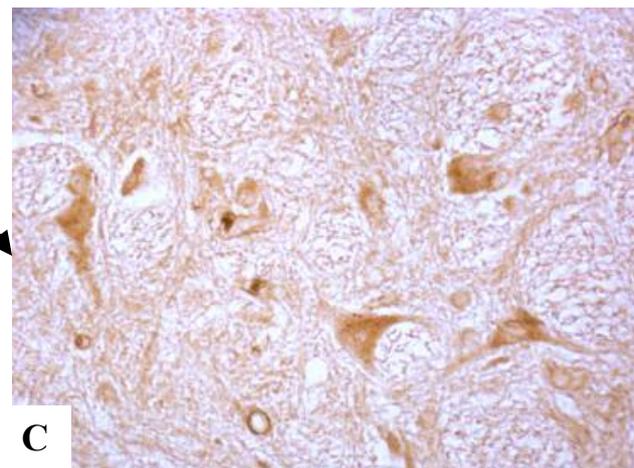
Bregma -14,6



A



B

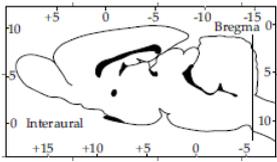


C

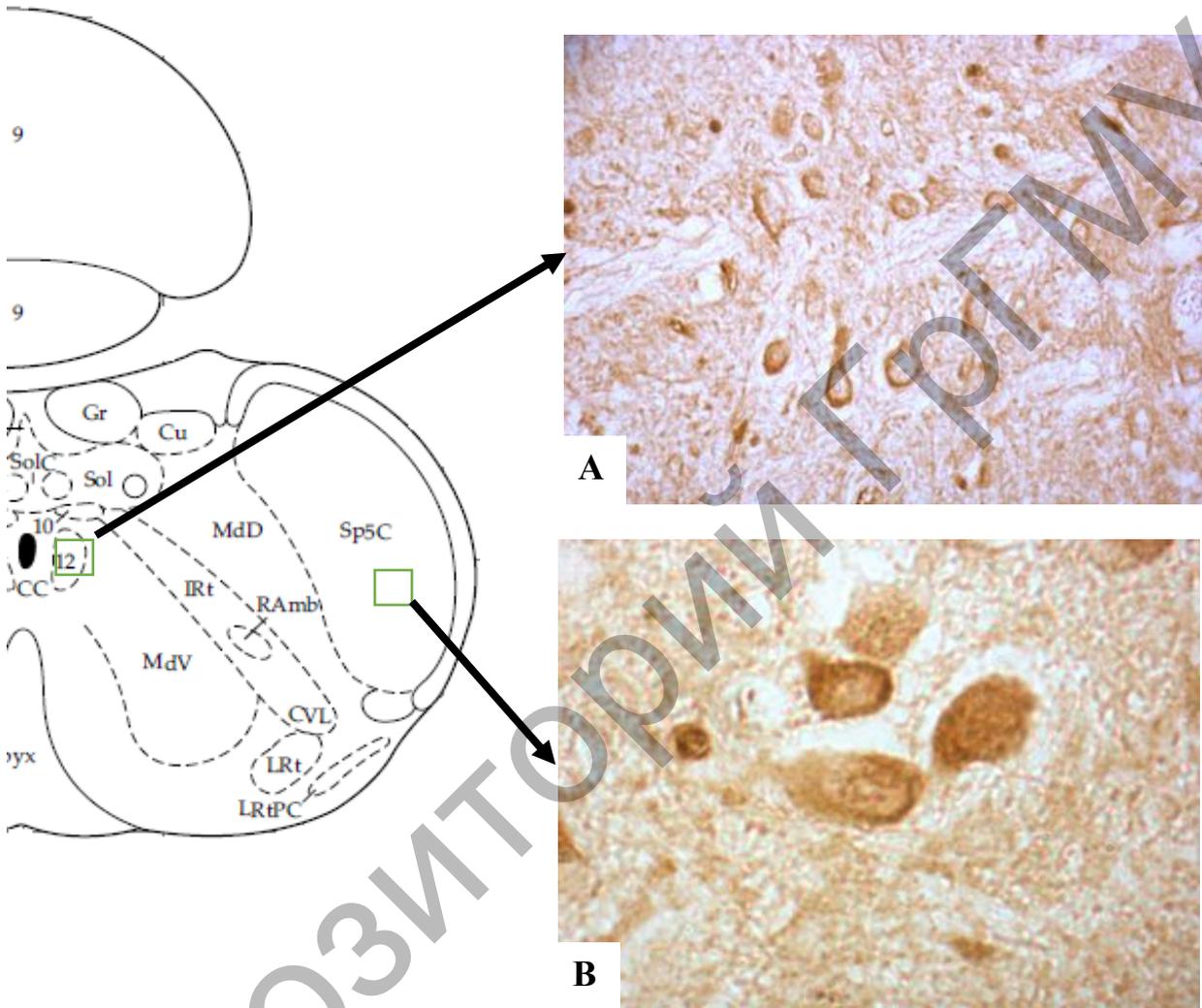
Иммуногистохимическое окрашивание на нейроглобин.
Цифровая микрофотография. Увелич. 400

Рисунок 4.18

**A – клиновидное ядро; B – медулярное ретикулярное ядро, дорсальное;
C – медулярное ретикулярное ядро, вентральное**



Bregma -14,6

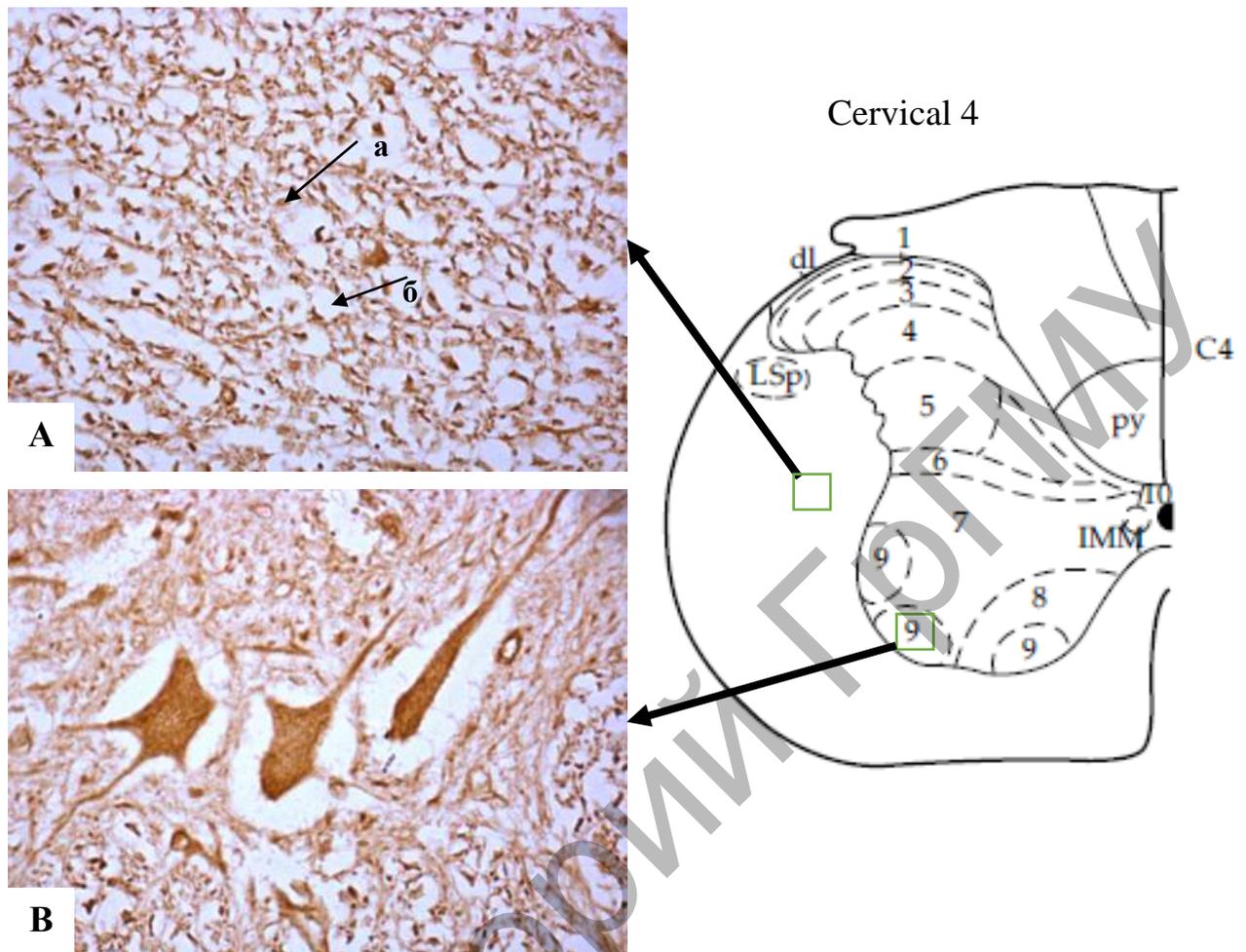


Иммуногистохимическое окрашивание на нейроглобин.
 Цифровая микрофотография. Увелич. 400 (А) и 1000 (В)

Рисунок 4.19

А – ядро XII пары черепных нервов;

В – каудальная часть спинального ядра тройничного нерва



Иммуногистохимическое окрашивание на нейроглобин.
Цифровая микрофотография. Увелич. 400

Рисунок 4.20 – Структуры шейного отдела спинного мозга:

- А – боковой канатик шейного отдела спинного мозга (а – осевые цилиндры; б – неокрашенные миелиновые оболочки);**
- В – мотонейроны передних рогов спинного мозга**

В основном нейроны большинства структур содержат низкое или умеренное количества Ngb, что предполагает достаточность такого содержания Ngb для нормального функционирования нервных клеток. Высокий и очень высокий уровни, скорее всего, ассоциированы с необходимостью более тщательного контроля уровня кислорода и АТФ в нейронах конкретных структур мозга [174, 175].

Высокая гетерогенность распределения Ngb в конечном мозге, вероятнее всего, является следствием разного филогенетического возраста структур, их высокого структурного и функционального разнообразия. В мосту и продолговатом мозге гетерогенность достигается за счет высоких значений Ngb для большого ядра шва и вестибулокохлеарного ганглия. Скорее всего, столь высокое содержание в них Ngb является следствием необходимости жесткого контроля в них уровня кислорода и АТФ из-за высокой функциональной нагрузки: вестибулокохлеарный ганглий содержит тела биполярных чувствительных нейронов, а большое ядро шва получает информацию от большого количества структур – центрального преакведуктального серого вещества, ядер миндалина, гипоталамуса, различных отделов коры – и посылает импульсы к передним рогам спинного мозга [174, 175].

Тенденция к увеличению количества Ngb по мере увеличения филогенетического возраста структур мозга не соответствует биохимическим данным о концентрации Ngb в конкретных отделах мозга [108, с. 59-71; 122, с. 1593; 123, с. 605-608; 176, с. 340-352], возможно потому, что в образцы мозга для биохимического анализа попадают не только тела нейронов, но и нейропиль, глиальные клетки, белое вещество и кровеносные сосуды [174, 175].

Содержание Ngb также различается в нейронах разных пластинок серого вещества спинного мозга. Наиболее интенсивное иммуноокрашивание наблюдается в пластинках с VI по X, что объясняется их структурными и функциональными особенностями: их нейроны преимущественно крупные, отвечают за связь между левой и правой частями спинного мозга, между сегментами и иннервируют мускулатуру туловища [174, 175].

Вставочное ядро и КП пирамиды, демонстрирующие наибольший уровень Ngb, относятся к древней части мозжечка, палеocerebellumu (спиноcerebellumu), связанному со спинным мозгом [174, 175].

Выводы:

1. Иммунореактивность Ngb выявляется преимущественно в цитоплазме нейронов, а также в глиальных клетках, особенно в эпендимоцитах желудочков и каналов мозга. В ядрах нейронов иммуноокрашивания не наблюдалось.

2. Ngb содержится в нейронах всех отделов головного и шейного отдела спинного мозга. Преобладают структуры с его низким-умеренным количеством.

3. Существует тенденция к увеличению содержания Ngb в нейронах отделов головного мозга крысы в передне-заднем направлении, что совпадает с возрастанием филогенетического возраста структур. В конечном мозге содержание Ngb выше в палеокортексе, чем в неокортексе, при этом содержание возрастает от наружных к филогенетически более древним глубоким слоям коры. Также высоким содержанием Ngb характеризуются филогенетически более старые эффекторные и рецепторные нейроны мозга.

4. В шейном отделе спинного мозга содержание Ngb значительно выше в мотонейронах, по сравнению со вставочными нейронами.

Глава 5

СРАВНЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АТФ-СИНТАЗЫ И НЕЙРОГЛОБИНА В МОЗГЕ КРЫСЫ

В среднем иммунореактивность АТФ-синтазы в нейронах мозга была выше, чем Ngb (таблица П.1, рисунок 5.1). Разброс иммунореактивности АТФ-синтазы и Ngb в нейронах разных отделов мозга крысы, а также симметричность данных видны на диаграмме (рисунок 5.1) [177].

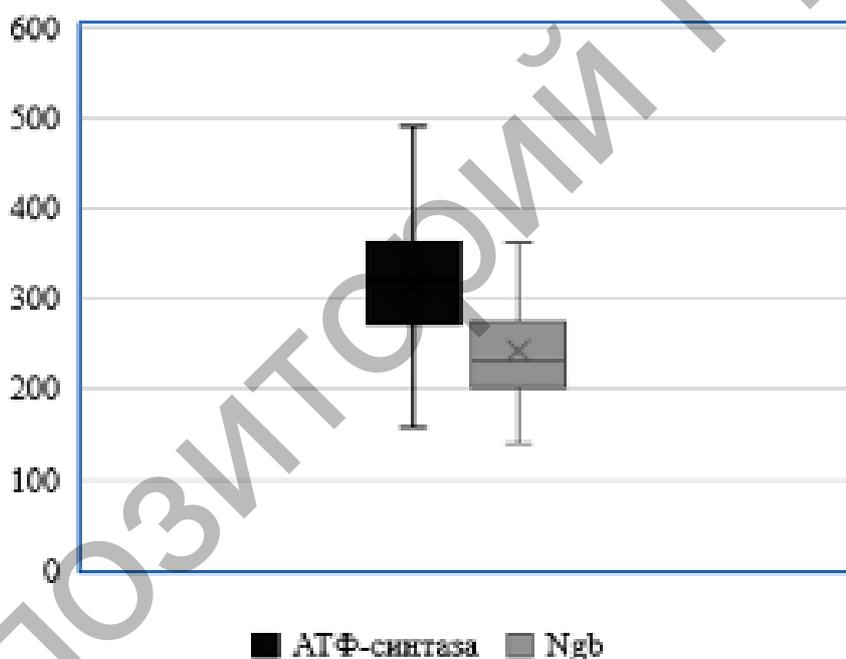
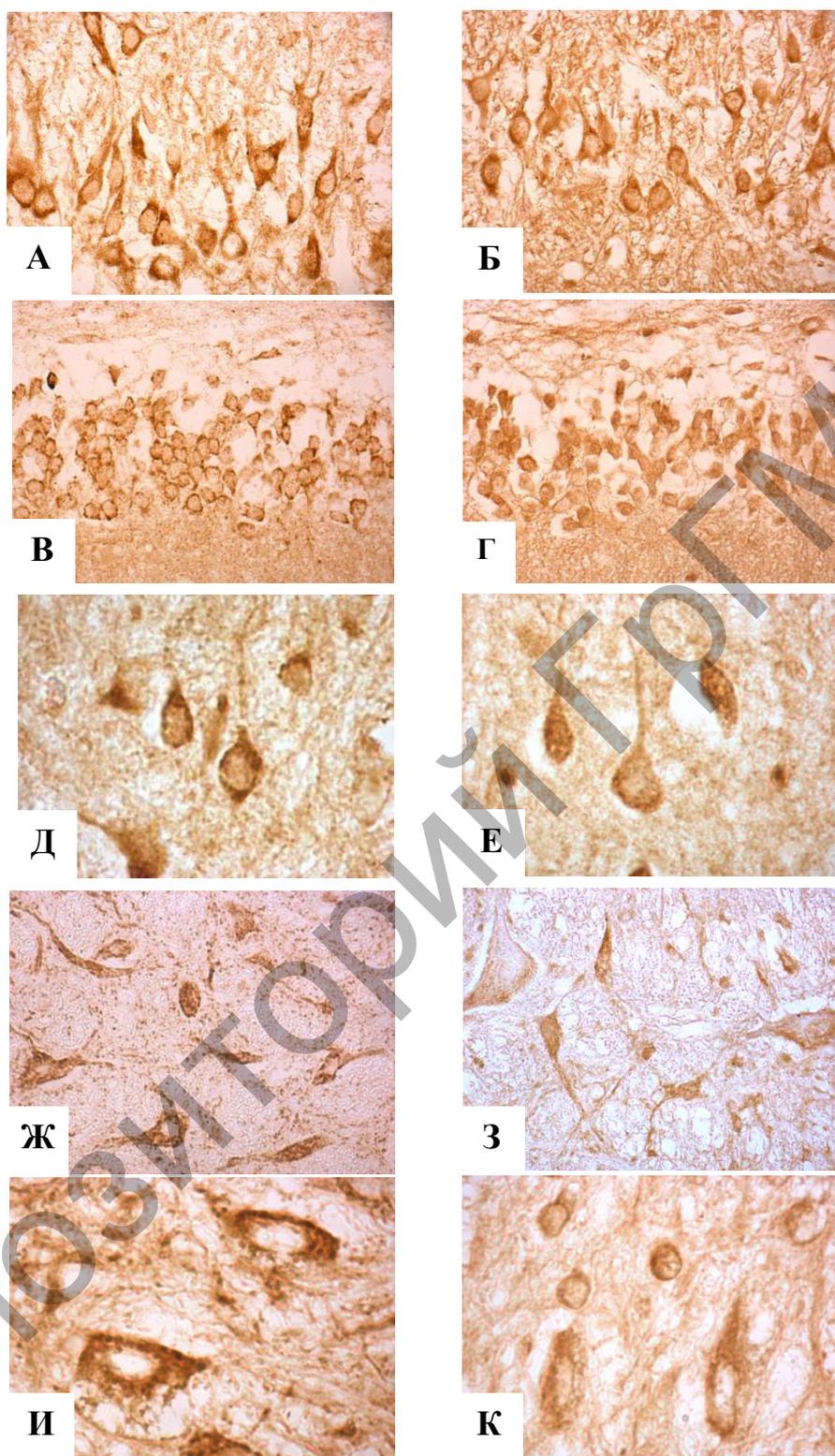


Рисунок 5.1 – Разброс иммунореактивности АТФ-синтазы и Ngb в нейронах мозга крысы

Отношение содержания АТФ-синтазы/Ngb в нейронах разных структур мозга крысы значительно варьирует (рисунок 5.2, таблица П.1). Этот коэффициент среди всех 102 типов изученных нейронов мозга крысы в 8% случаев колеблется от 0,5 до 1,0, в 52% – от 1 до 1,5, в 33% – от 1,5 до 2,0, в 7% – от 2 до 2,5 (таблица П.1) [177].



Иммуногистохимическая реакция.

Цифровая микрофотография. Увелич. 400 (А-Г, Ж-З), 1000 (Д-Е, И-К)

Рисунок 5.2 – Сравнительное распределение АТФ-синтазы (А, Б, Д, Ж, И) и Ngb (Б, Г, Е, З, К) в нейронах разных отделов мозга крысы (А-Б – II слой гиппокампа СА3, В-Г – II слой зубчатой извилины, Д-Е – V слой височной коры, Ж-З – гигантоцеллюлярное ядро, И-К – латеральное ядро мозжечка)

В первую группу с коэффициентом 0,5-1,0 вошли нейроны филогенетически более старых структур мозга – ядро подъязычного нерва, медиальное и латеральное ядра миндалина, большое ядро шва, интермедидорсальное ядро таламуса, медиальное вестибулярное ядро, а также III и V слои моторной коры мозга. Во вторую группу (1,0-1,5) – также преимущественно филогенетически старые структуры, но по мере возрастания отношения АТФ-синтазы к Ngb, количество среди них структур неокортекса возрастает. В третьей группе (1,5-2,0) доля филогенетически молодых составляет более половины. Связи с нейромедиаторной природой нейронов не наблюдаются. В четвертой группе (2,0-2,5) количество структур невелико, они значительно разнятся по филогенетическому возрасту. Нейромедиаторная природа их нейронов – гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), аспартат- и глутаматергические [177].

Между распределениями АТФ-синтазы и Ngb в нейронах разных структур мозга существует положительная корреляция: $r=0,57$; $p<0,001$ (рисунок 5.3) [177].

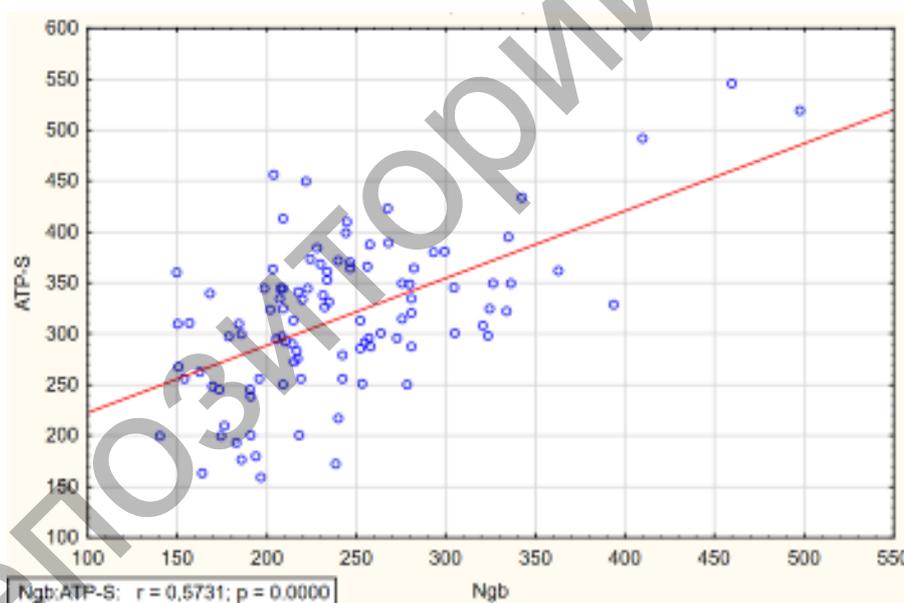


Рисунок 5.3 – Корреляция между АТФ-синтазой и Ngb во всех изученных структурах

Поскольку отмечено увеличение доли филогенетически молодых структур по мере увеличения коэффициента, был дополнительно проведен отдельный корреляционный анализ: результаты указывают на отсутствие достоверной корреляции ($r=0,29$; $p>0,05$) между содержанием АТФ-синтазы и Ngb в структурах неокортекса

и неocerebellума и ее наличии в филогенетически более старых отделах мозга ($r=0,53$; $p<0,01$) (рисунок 5.4) [177].

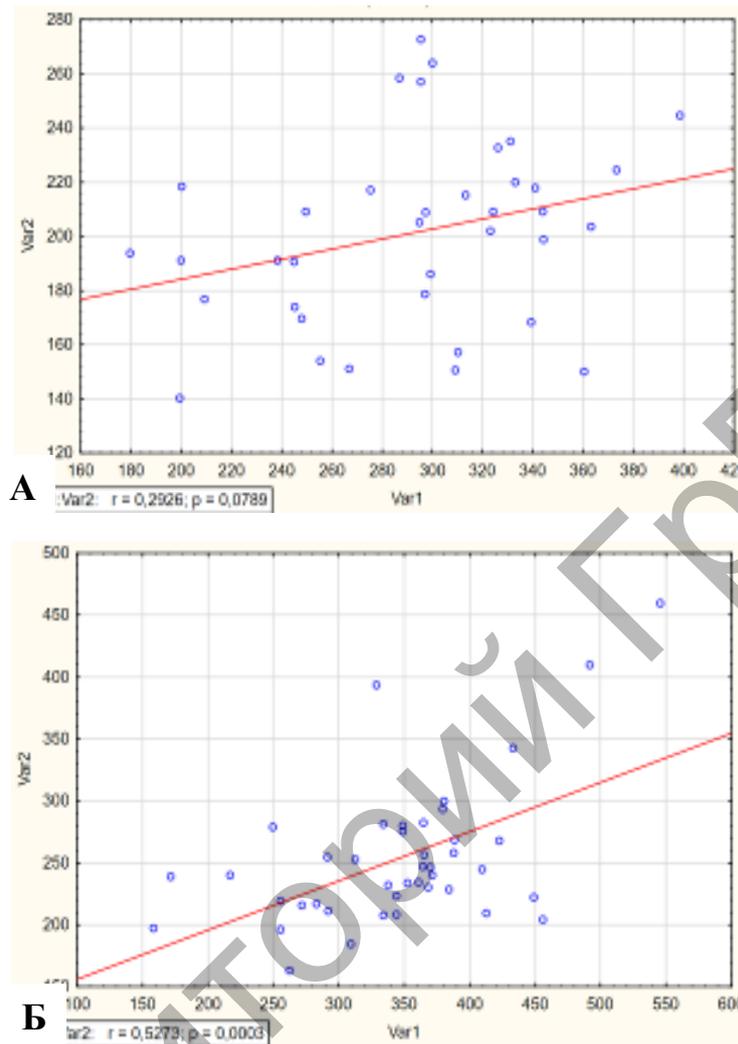


Рисунок 5.4 – Корреляция между АТФ-синтазой и Ngb в неокортексе и неocerebellуме (А) и в филогенетически более старых отделах (Б)

На клеточном уровне распределение АТФ-синтазы и нейроглобина в однотипных нейронах одинаково, а в нейронах разных структур значительно варьирует. Поскольку мы изучали не абсолютное, а лишь относительное содержание этих белков в нейронах, обнаруженную нами более высокую иммунореактивность АТФ-синтазы по сравнению с Ngb в большинстве исследованных структур можно объяснить не только тем, что АТФ-синтаза является обязательным компонентом внутренней мембраны митохондрий, но и, возможно, более высоким сродством первичных антител к этому белку. Однако сравнение относительного распределения

иммунореактивности АТФ-синтазы и нейроглобина в разных структурах мозга является вполне допустимым, учитывая, что иммуногистохимическое исследование каждого белка во всех структурах проводилось в одинаковых условиях [177].

Установленное значение коэффициента корреляции ($r=0,57$; $p<0,001$) соответствует средней силе связи между клеточным распределением двух исследуемых белков. Причем в нейронах филогенетически старых отделов мозга она выше, чем в молодых. Наряду с сообщениями о локализации Ngb преимущественно вблизи/в митохондриях [24, с. 6996-7006; 108, с. 59-71; 178, с. 705] и перекрытии паттернов иммуномечения АТФ-синтазы- β и Ngb [136, с. 2264-2270], это дает основание предполагать их пространственную и функциональную связь, особенно в нейронах филогенетических старых отделах мозга [177].

Имеется связь данного соотношения с положением нейронов в рефлекторной дуге: в мотонейронах количества АТФ-синтазы и Ngb примерно одинаковы, в то время как во вставочных нейронах задних рогов АТФ-синтазы значительно больше, чем Ngb [177].

К разным группам по соотношению АТФ-синтаза/Ngb относятся разнообразные по нейромедиаторной природе структуры. Однако зависимость между нейромедиаторной природой нейронов и соотношением в них содержания АТФ-синтазы, Ngb не обнаружена [177].

Выводы:

1. Между содержанием АТФ-синтазы и Ngb в нейронах разных отделов мозга крысы имеется положительная корреляция ($r=0,57$; $p<0,01$), что свидетельствует о наличии пространственной связи между этими белками. Однако она слабо выражена в структурах неокортекса и неocerebellума ($r=0,29$; $p>0,05$).
2. Соотношение содержания АТФ-синтазы и Ngb связано с расположением нейронов в рефлекторных дугах, но не зависит от их медиаторной природы.

Глава 6

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В НЕЙРОНАХ РАЗНЫХ ОТДЕЛОВ МОЗГА КРЫСЫ ПРИ СУБТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Церебральная ишемия – одна из наиболее частых причин смерти и инвалидизации населения во всем мире и, как следствие, является проблемой чрезвычайной медицинской и социальной значимости [179; 180]. Она приводит к тяжелому нейродегенеративному поражению мозга и нарушению реализации сенсомоторных и когнитивных функций нервной системы [181]. Последствия церебральной ишемии зависят от степени и длительности снижения мозгового кровотока, а также особенностей региональной чувствительности к ней разных структур головного мозга [25, с. 184-316; 27, с. 34-93, с. 157-166, с. 178-186].

Головной мозг – основной потребитель поступающих в организм кислорода и глюкозы – составляет около 2% от общей массы тела человека. Головной мозг потребляет 20-25% поступающего кислорода и до 70% свободной глюкозы. Более того, в периоды повышенной активности и развития головной мозг может использовать до 50% всего поступающего в организм кислорода. Поскольку собственные запасы глюкозы и кислорода в ткани мозга малы (в сравнении с уровнем потребления), его функционирование находится в полной зависимости от постоянного кровоснабжения. Так, свободной фракции гликогена, которая может быть использована при критическом снижении концентрации свободной глюкозы, хватает не более чем на 5-7 минут. Следствием снижения кровоснабжения головного мозга является ограничение поступления кислорода и глюкозы, что влечет возникновение ишемии [26, с. 17-39].

При ишемии головного мозга недостаток кислорода в сочетании с недостатком питательных веществ и задержкой токсических продуктов метаболизма (молочной кислоты, дикарбоновых

аминокислот), свободных радикалов и монооксида азота (NO) приводит к нарушению синтеза нейротрансмиттеров, увеличению содержания ионов Na^+ , K^+ и Ca^{2+} в клетках – все это становится причиной расстройства функций и гибели нейронов. Значительная роль в нарушении функций ЦНС принадлежит также веществам пептидной природы, которые оказывают влияние на функционирование различных отделов мозга [182, с. 55-57].

Патобиохимические реакции в нервной ткани при ишемии вызывают нейрональные нарушения, астроцитоз, микроглиальную активацию и связанные с ними изменения макрофагов, эндотелиальных клеток и нейтрофилов. Первые нейрональные нарушения проявляются в виде сморщивания нейронов, несколько позже появляются такие изменения, как конденсация хроматина, расширение эндоплазматической сети и набухание внутреннего матрикса митохондрий. При более продолжительном воздействии обнаруживаются необратимые изменения, что приводит к некротической гибели нейронов. Кроме того, часть нейронов погибает путем апоптоза [26, с. 157-166].

Известно, что ишемия ведет к повреждению нейронов, глиальных клеток и кровеносных сосудов. Нейроны непосредственно в ишемической области претерпевают колликвационный некроз [183, 184]. Крупные нейроны отекают, происходит вакуолизация цитоплазмы, исчезает ядро, в то время как более мелкие нейроны претерпевают изменение формы и конденсацию содержимого ядра. Среди глиальных клеток подобные изменения отмечаются в астроцитах, олигодендроцитах и микроглии [185]. В области ишемической полутени (пенумбры) появляется большое количество нейронов с ацидофильной цитоплазмой и дезинтегрировавшим эндоплазматическим ретикулумом [181].

Чувствительность структур мозга к ишемии весьма разнообразна, что указывает на большое количество определяющих ее факторов, существенные отличия в обмене веществ разных типов нервных клеток и их физиологических функций. К настоящему времени в литературе имеются данные о влиянии церебральной ишемии на отдельные структуры или области мозга [186, с. 202-208; 187, с. 551-556; 188, с. 42-46]. Также литературные источники содержат сведения, указывающие на сходный характер, но различную степень выраженности гистологических изменений

в филогенетически разных отделах мозга крысы и, как следствие, на большую устойчивость филогенетически старых структур мозга к церебральной ишемии [189, с. 52-55].

Несмотря на большое количество исследований, отсутствует систематическая сравнительная количественная оценка степени повреждения нейронов разных популяций и отделов мозга крыс при церебральной ишемии, а также изменений в них содержания АТФ-синтазы и нейроглобина, патогенетически связанных с этим состоянием.

При моделировании СИГМ мы всех крыс анестезировали путем внутривенного введения 40-50 мг/кг тиопентала натрия. По средней линии вентральной шейной поверхности выполнялся разрез длиной 2 см, обнажали общие сонные артерии. У животных опытных групп (30-минутной СИГМ и 3-часовой СИГМ) осуществлялось одновременное лигирование обеих общих сонных артерий, в то время как у животных контрольной группы лигирование артерий не проводилась и разрез ушивался. Выведение животных из эксперимента осуществлялось сразу после операции у крыс контрольной группы и через 30 минут и 3 часа после операции у крыс опытных групп.

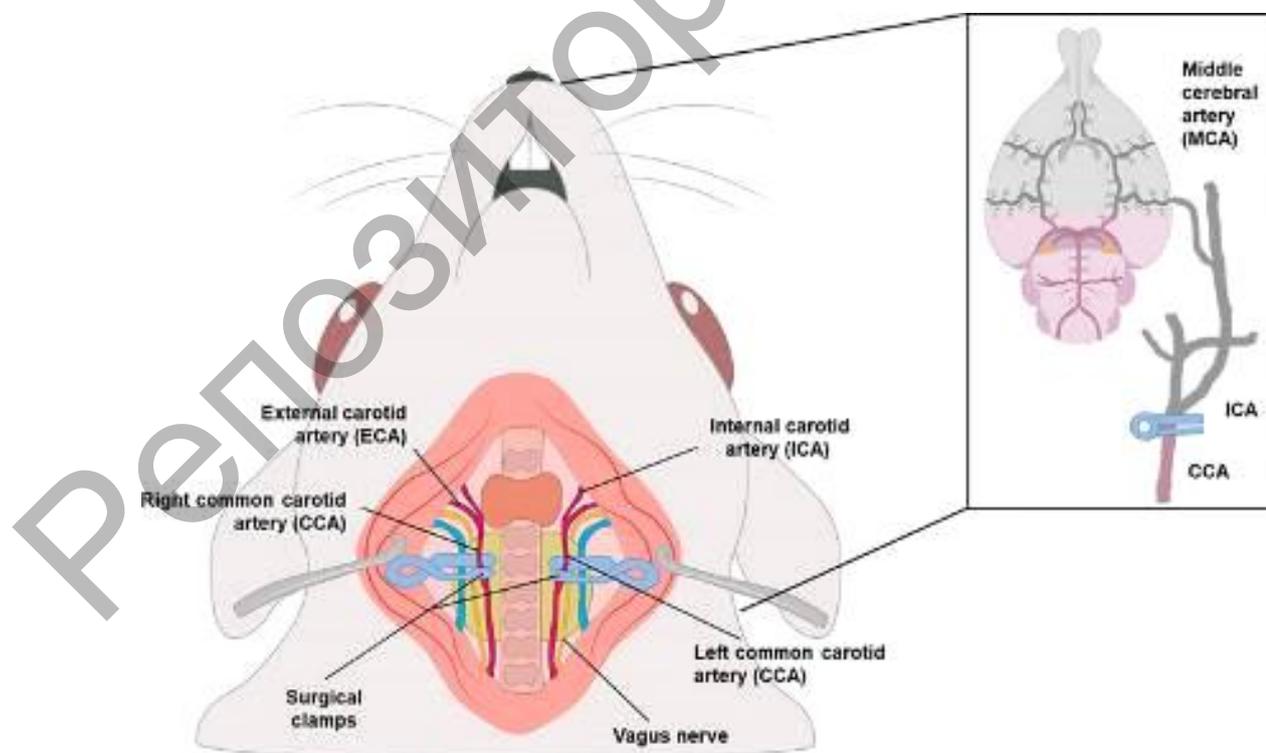


Схема моделирования субтотальной церебральной ишемии крысы путем лигирования обеих общих сонных артерий [190]

После декапитации головной мозг быстро извлекали и фронтальными разрезами делили на три части. Все образцы фиксировали в свежеприготовленном комбинированном фиксаторе – цинк-этанол-формальдегиде – при температуре +4 °С в течение 20 часов [191, с. 139]. Выбор фиксатора обусловлен тем, что при использовании цинк-этанол-формальдегида обеспечивается хорошая сохранность тканевых антигенов, не требующая процедуры теплового демаскирования перед иммуногистохимическим исследованием, хорошая выявляемость антигенов. После обезвоживания, просветления и заключения образцов в парафин с использованием микротомы Leica 2125 RTS (Германия) изготавливались фронтальные серийные срезы толщиной 5 мкм через каждые 500 мкм, которые монтировались на покрытые адгезивом предметные стекла.

Гистологическое исследование. Первый срез из каждой серии окрашивали 0,1% толуидиновым синим по методу Ниссля для выявления хроматофильной субстанции нейронов и идентификации структур мозга по схемам стереотаксического атласа [192, с. 1-448].

Оценка хроматофилии цитоплазмы нейронов выполнялась для серийных срезов, полученных из материала животных после СИГМ. Выделяли следующие группы нейронов: нормохромные (умеренно окрашенные), гиперхромные (интенсивно окрашенные), гиперхромные сморщенные (интенсивно окрашенные со сморщенными перикарионами), гипохромные (слабо окрашенные) и клетки-тени (очень слабо окрашенные, с бледным пузырьковидным ядром). Степень чувствительности нейронов структур и отделов мозга крысы к ишемии определялась по степени этих изменений по сравнению с контролем, а также по преобладанию при этом обратимых (увеличение числа гиперхромных и гипохромных нейронов) или необратимых изменений (увеличение числа гиперхромных сморщенных нейронов и клеток-теней) [193, с. 174-184; 194, с. 76-79].

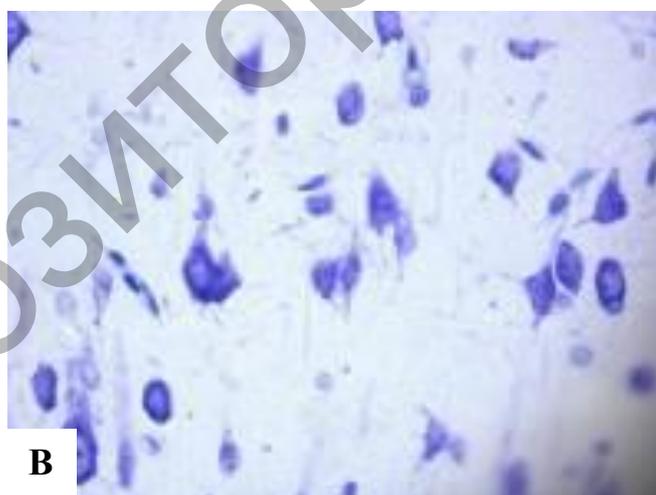
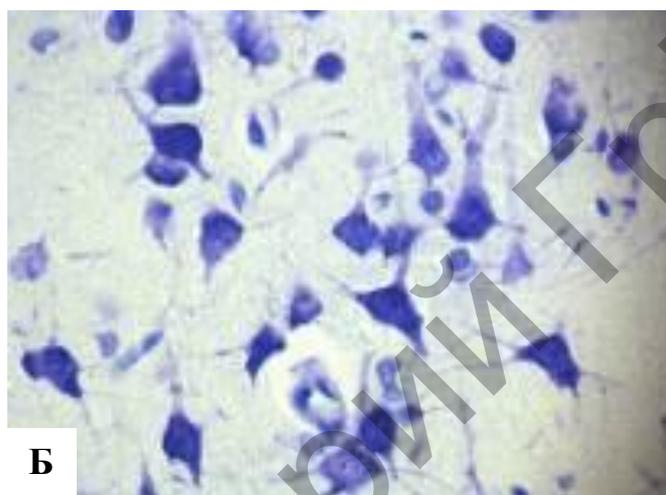
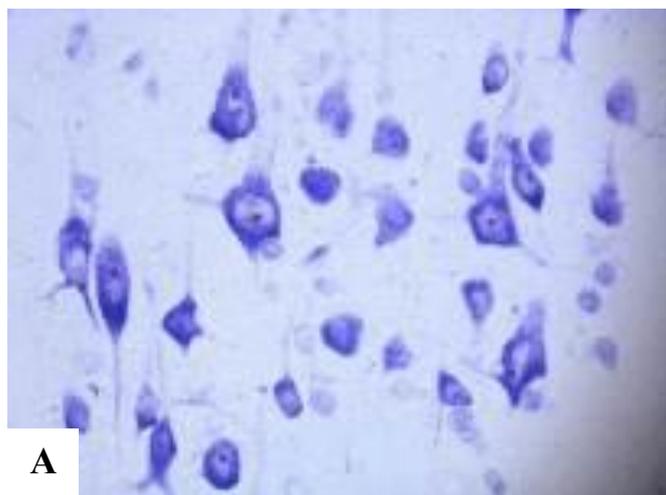
Характер хроматофилии оценивался в 60 областях мозга, слоях коры и ядрах (скоплениях нейронов) мозга. Для получения объективных данных, оценка хроматофилии в цитоплазме нейронов и их подсчет проводились в 10 полях зрения при $\times 400$ для каждой структуры у каждого животного, что обеспечило достаточное количество данных даже для структур, характеризующихся относительно небольшим числом нейронов.

У животных с церебральной ишемией второй срез из каждой серии окрашивался толуидиновым голубым и 0,1% ванадиево-кислым фуксином (VAF) по методу Викторова, что позволяло идентифицировать фуксинофильные погибающие нейроны [195, с. 135-139].

Результаты наших исследований показали, что у животных контрольной группы во всех отделах/структурах головного мозга преобладают нормохромные и гиперхромные нейроны. После 30-минутной ишемии (СИГМ) в большинстве структур мозга крысы происходит снижение числа нормохромных и увеличение числа гиперхромных, гиперхромных сморщенных, гипохромных нейронов и клеток-теней (таблица П.2). Однако обнаруживаются и устойчивые к 30-минутной ишемии нейроны в различных отделах мозга. После 3-часовой ишемии (таблица П.2) во всех исследованных структурах мозга происходит снижение доли нормохромных нейронов (вплоть до полного исчезновения, чего не наблюдается при 30-минутной СИГМ), увеличивается доля гиперхромных, гиперхромных сморщенных, гипохромных нейронов и клеток-теней. Абсолютно устойчивые к 3-часовой СИГМ структуры мозга не обнаружены (таблица П.2) [196, 197].

Наиболее значительные изменения хроматофилии нейронов при СИГМ выявляются в конечном и промежуточном мозге (таблица П.2). Среди исследованных структур конечного мозга наиболее чувствительны к СИГМ отделы неокортекса – височная, теменная и затылочная кора больших полушарий головного мозга. Во всех их слоях отмечается увеличение числа гиперхромных, гиперхромных сморщенных и гипохромных нейронов, а также появление клеток-теней (рисунок 6.1) [196, 197].

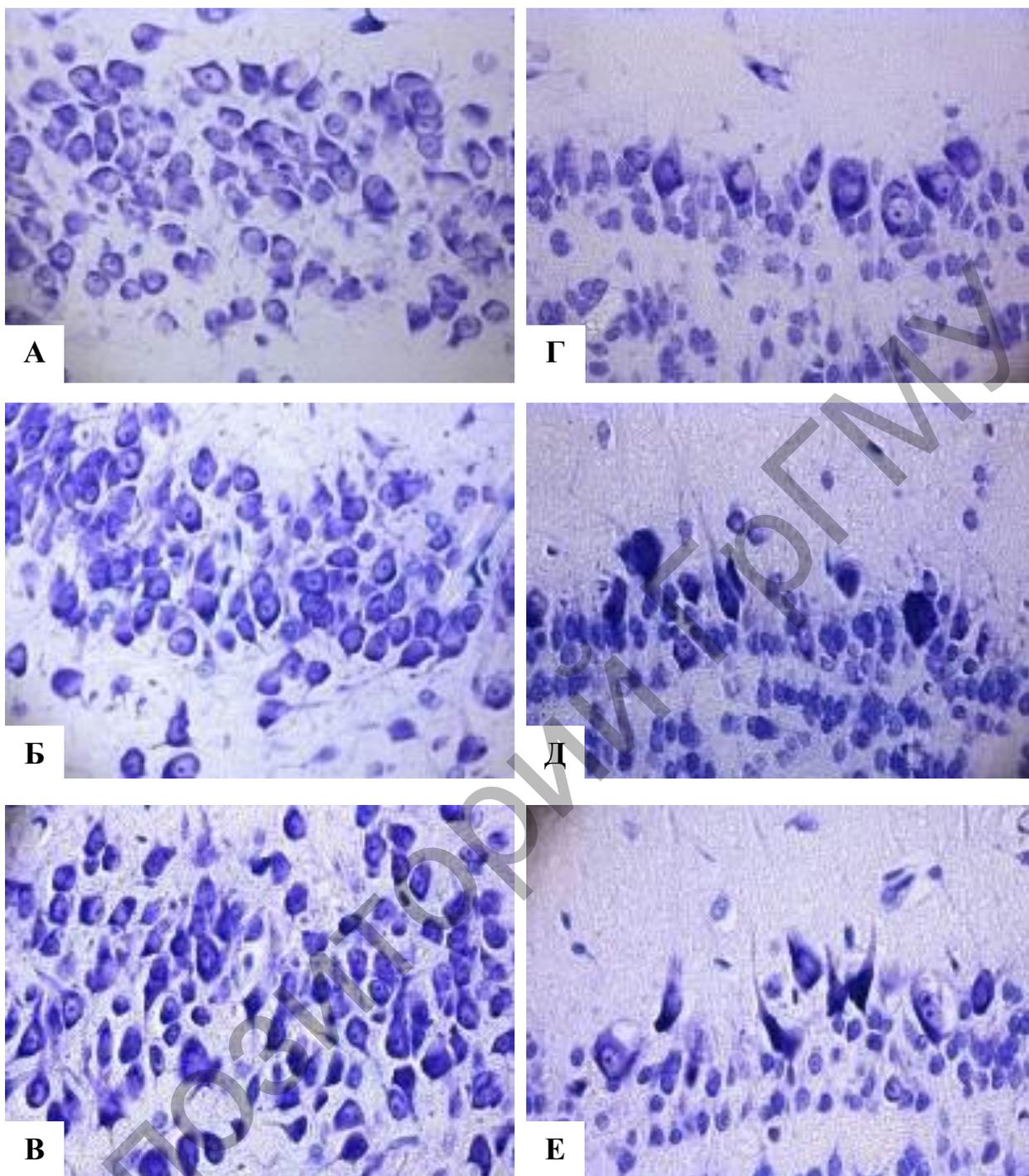
Весьма разнообразную реакцию на СИГМ демонстрируют структуры аллокортекса (рисунок 6.2, таблица П.В.2). Наиболее устойчивой является пириформная кора, так как для ее нейронов не обнаружено значительного изменения соотношения нейронов с типом хроматофилии цитоплазмы, свидетельствующем об обратимых/необратимых изменениях (рисунки 6.2, 6.3, таблица П.В.2). Наиболее уязвимы из структур аллокортекса митральные клетки обонятельных луковиц: в них значительно увеличивается доля сморщенных, гипохромных нейронов и клеток-теней (таблица П.В.2) [196, 197].



Окраска по Нисслю.

Цифровая микрофотография. Увелич. 400

**Рисунок 6.1 – Нейроны V слоя височной коры
(А – контрольная группа; Б – 30-минутная СИГМ;
В – 3-часовая СИГМ)**



Окраска по Нислю.

Цифровая микрофотография. Увелич. 400

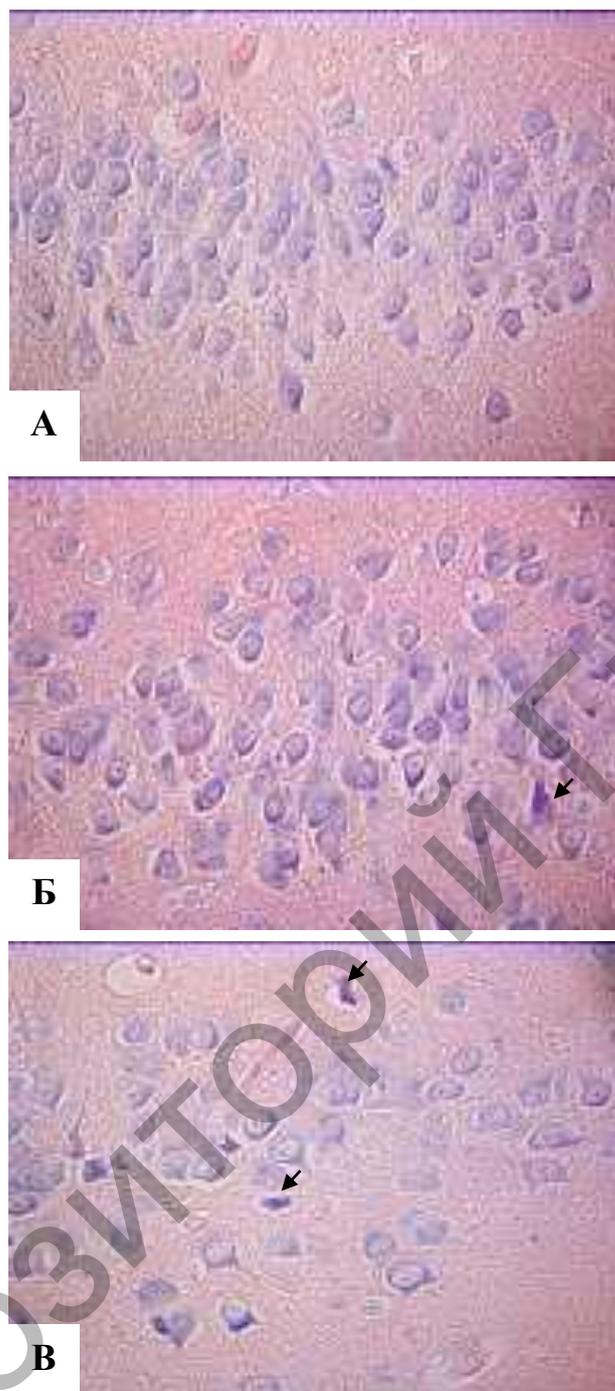
Рисунок 6.2 – Нейроны конечного мозга:

А-В – пириформная кора, II слой;

Г-Е – митральные клетки обонятельной луковицы

(А, Г – контрольная группа; Б, Д – 30-минутная СИГМ;

В, Е – 3-часовая СИГМ)



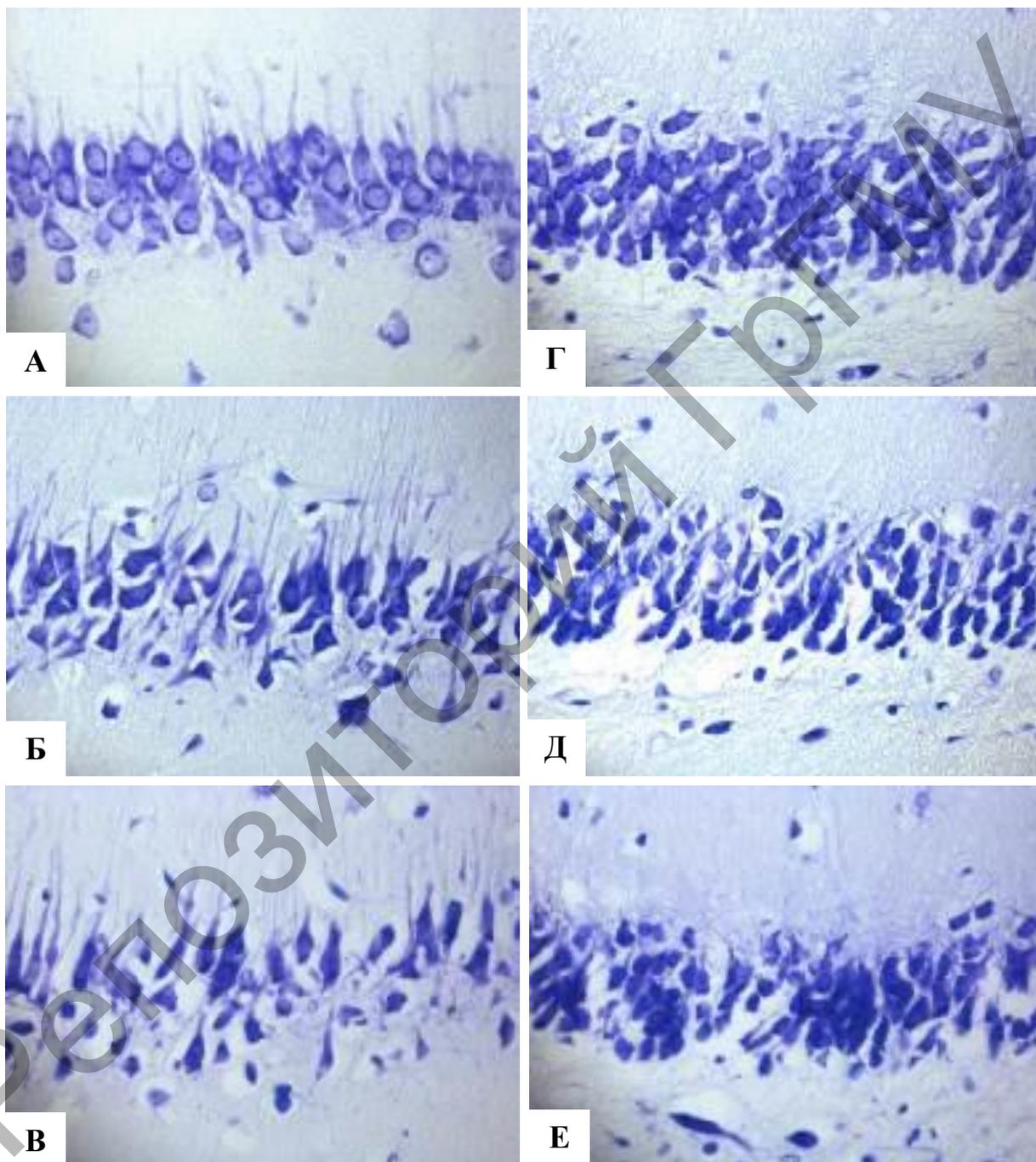
Окраска по Викторову. Цифровая микрофотография. Увелич. 400

Рисунок 6.3 – Нейроны II слоя пириформной коры
 (А– контрольная группа, Б – 30-минутная СИГМ, В – 3-часовая СИГМ)

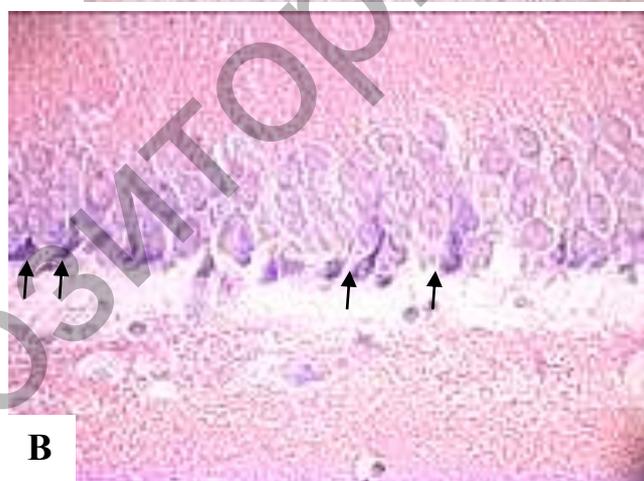
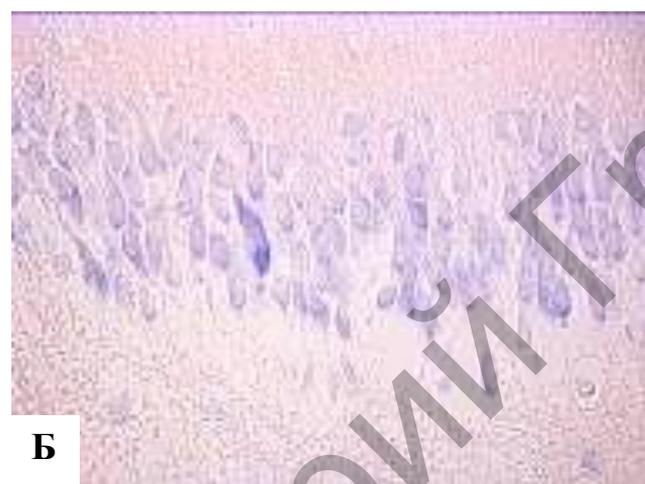
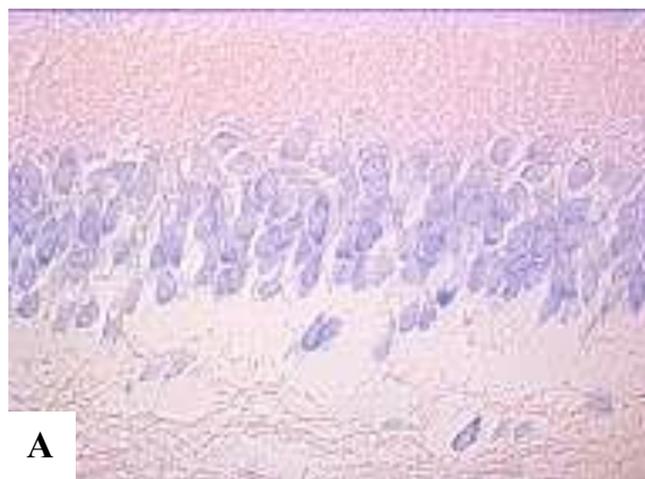
Стрелками показаны погибающие нейроны,
 отличающиеся фуксинофильными ядрами

Чувствительность нейронов варьирует в разных полях гиппокампа (таблица П.2). Наиболее чувствительные части – поля СА1 (рисунки 6.4, 6.5) и СА2: в них более чем наполовину снижается доля нормохромных нейронов, увеличивается число гиперхромных

и сморщенных нейронов. В поле СА3 и зубчатой извилине изменения менее выражены: в меньшей степени снижается доля нормохромных нейронов и увеличивается доля гиперхромных сморщенных, а доля гиперхромных несморщенных нейронов существенно не изменяется (таблица П.2) [196, 197].



Окраска по Нислю. Цифровая микрофотография. Увелич. 400
**Рисунок 6.4 – Нейроны II слоя гиппокампа поля СА1 (А-В)
и зубчатой извилины (Г-Е)**
(А, Г – контрольная группа; Б, Д – 30-минутная СИГМ;
В, Е – 3-часовая СИГМ)



Окраска по Викторову. Цифровая микрофотография. Увелич. 400

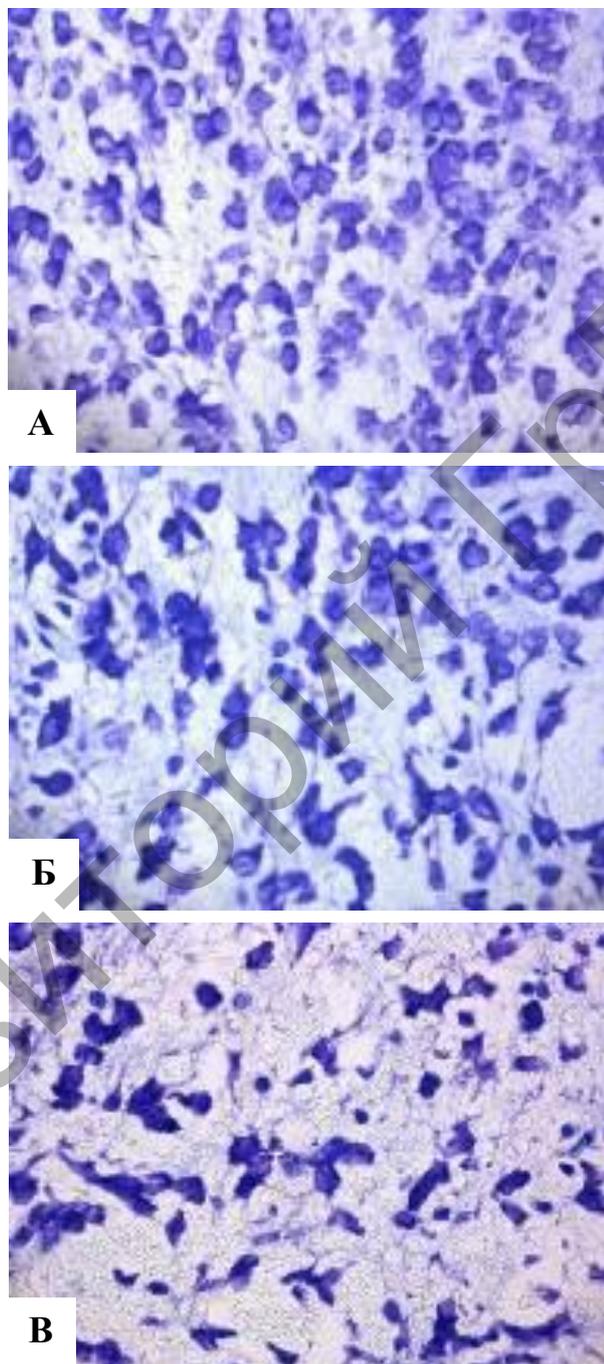
Рисунок 6.5 – Нейроны II слоя зубчатой извилины

(А – контрольная группа, Б – 30-минутная СИГМ, В – 3-часовая СИГМ)

Стрелками показаны погибающие нейроны,
отличающиеся фуксинофильными ядрами

В промежуточном мозге во всех исследованных структурах обнаружено увеличение доли гиперхромных сморщенных нейронов (рисунок 6.6, таблица П.2). В некоторых структурах, помимо этого,

увеличивается доля гиперхромных, гипохромных нейронов, еще реже – клеток-теней. Следовательно, можно говорить о неодинаковой чувствительности нейронов к ишемии и в пределах промежуточного мозга (таблица П.2) [196, 197].

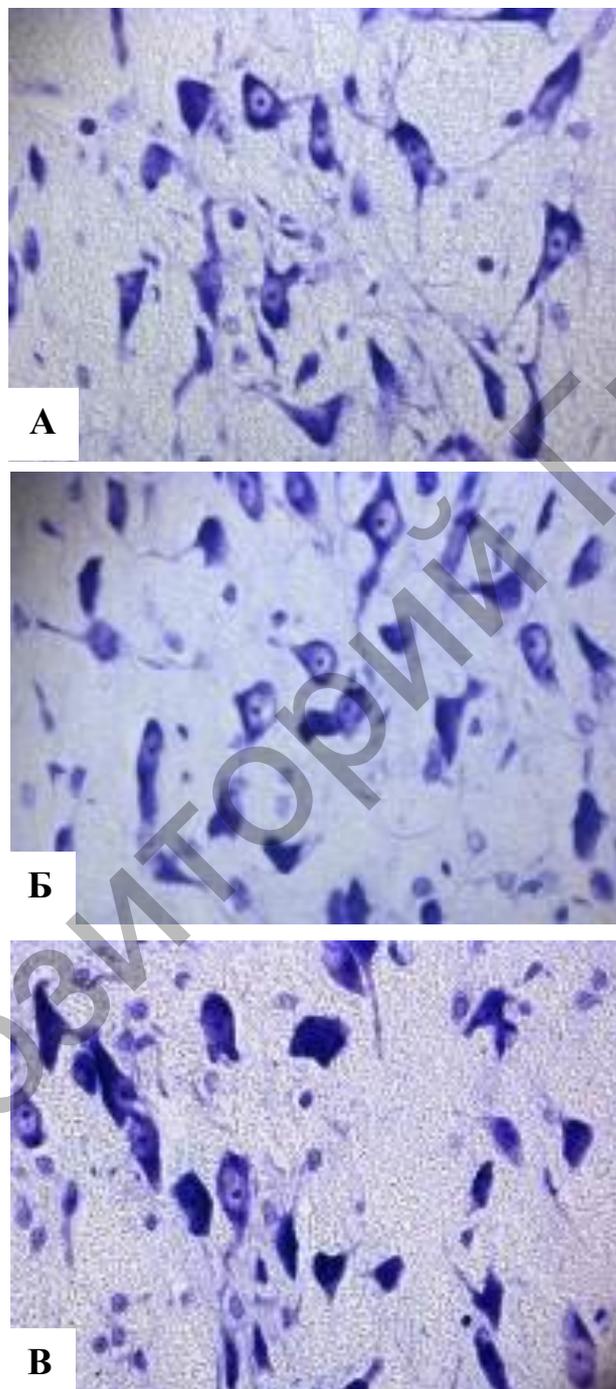


Окраска по Нислю.

Цифровая микрофотография. Увелич. 400

Рисунок 6.6 – Нейроны медиального габенулярного ядра таламуса (А – контрольная группа, Б – 30-минутная СИГМ, В – 3-часовая СИГМ)

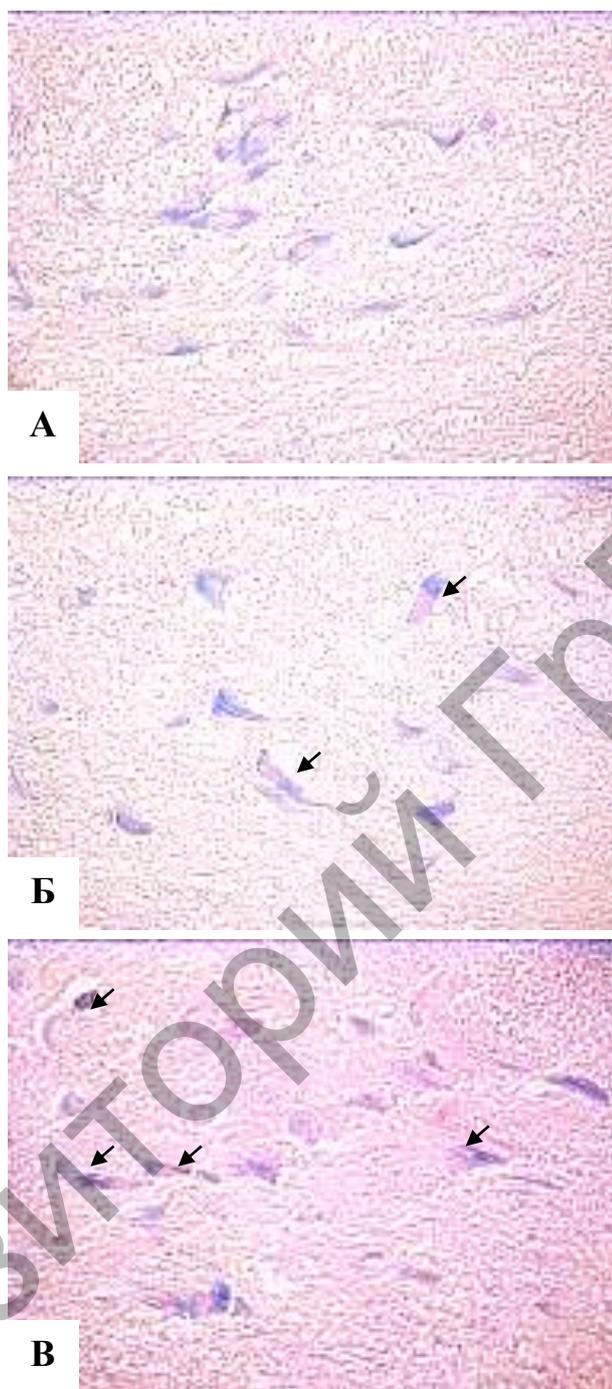
Наиболее устойчивы к перевязке общих сонных артерий нейроны среднего мозга, моста и продолговатого мозга (таблица П.2). Особенно устойчивые к 30-минутной СИГМ нейроны интерпедункулярного ядра и компактного вещества черной субстанции (рисунки 6.7, 6.8, таблица П.2 [196, 197]).



Окраска по Нисслю.

Цифровая микрофотография. Увелич. 400

Рисунок 6.7 – Нейроны компактного вещества черной субстанции (А – контрольная группа, Б – 30-минутная СИГМ, В – 3-часовая СИГМ)



Окраска по Викторову.

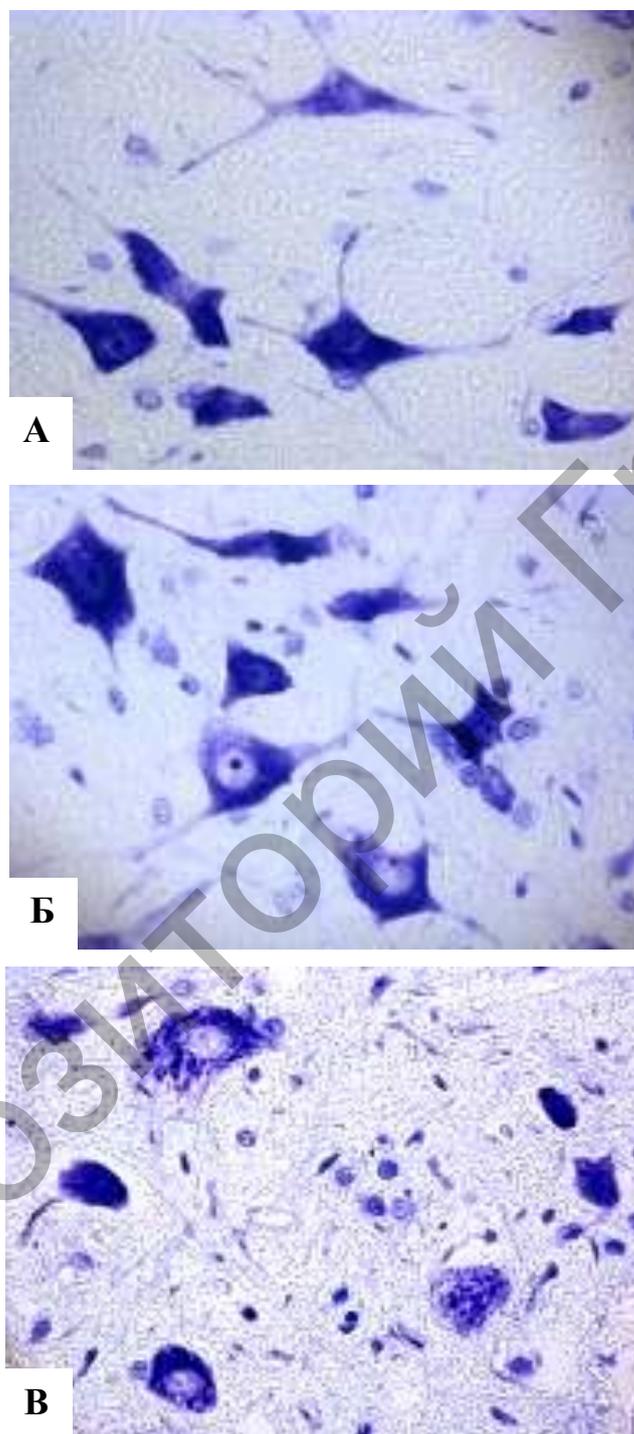
Цифровая микрофотография. Увелич. 400

Рисунок 6.8 – Нейроны компактного вещества черной субстанции (А – контрольная группа, Б – 30-минутная СИГМ, В – 3-часовая СИГМ)

Стрелками показаны погибающие нейроны с фуксинофильными ядрами

В большинстве исследованных структур моста и продолговатого мозга отсутствуют статистически значимые необратимые изменения (таблица П.2). Исключение составляют гигантоцеллюлярное ядро (рисунки 6.9, 6.10, таблица П.2), ядра Бурдаха и Голля:

в них также установлено увеличение доли сморщенных нейронов. Увеличения числа клеток-теней в структурах моста и продолговатого мозга не обнаружено [196, 197].

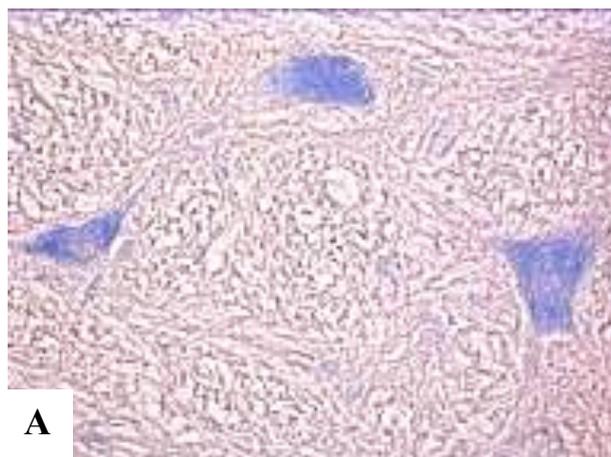


Окраска по Ниссля.

Цифровая микрофотография. Увелич. 400

**Рисунок 6.9 – Нейроны гигантоцеллюлярного ядра
продолговатого мозга**

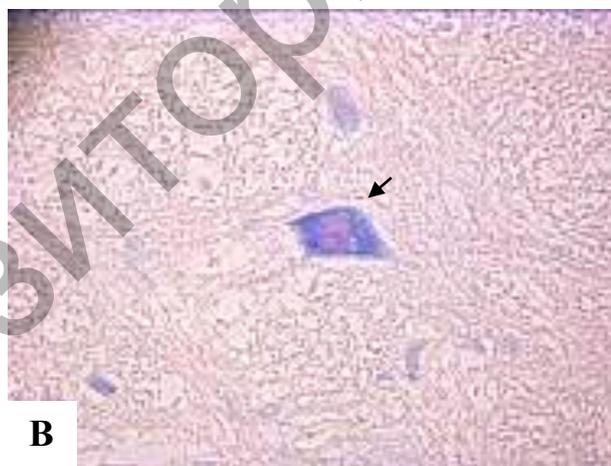
(А – контрольная группа, Б – 30-минутная СИГМ, В – 3-часовая СИГМ)



А



Б



В

Окраска по Викторову.

Цифровая микрофотография. Увелич. 400

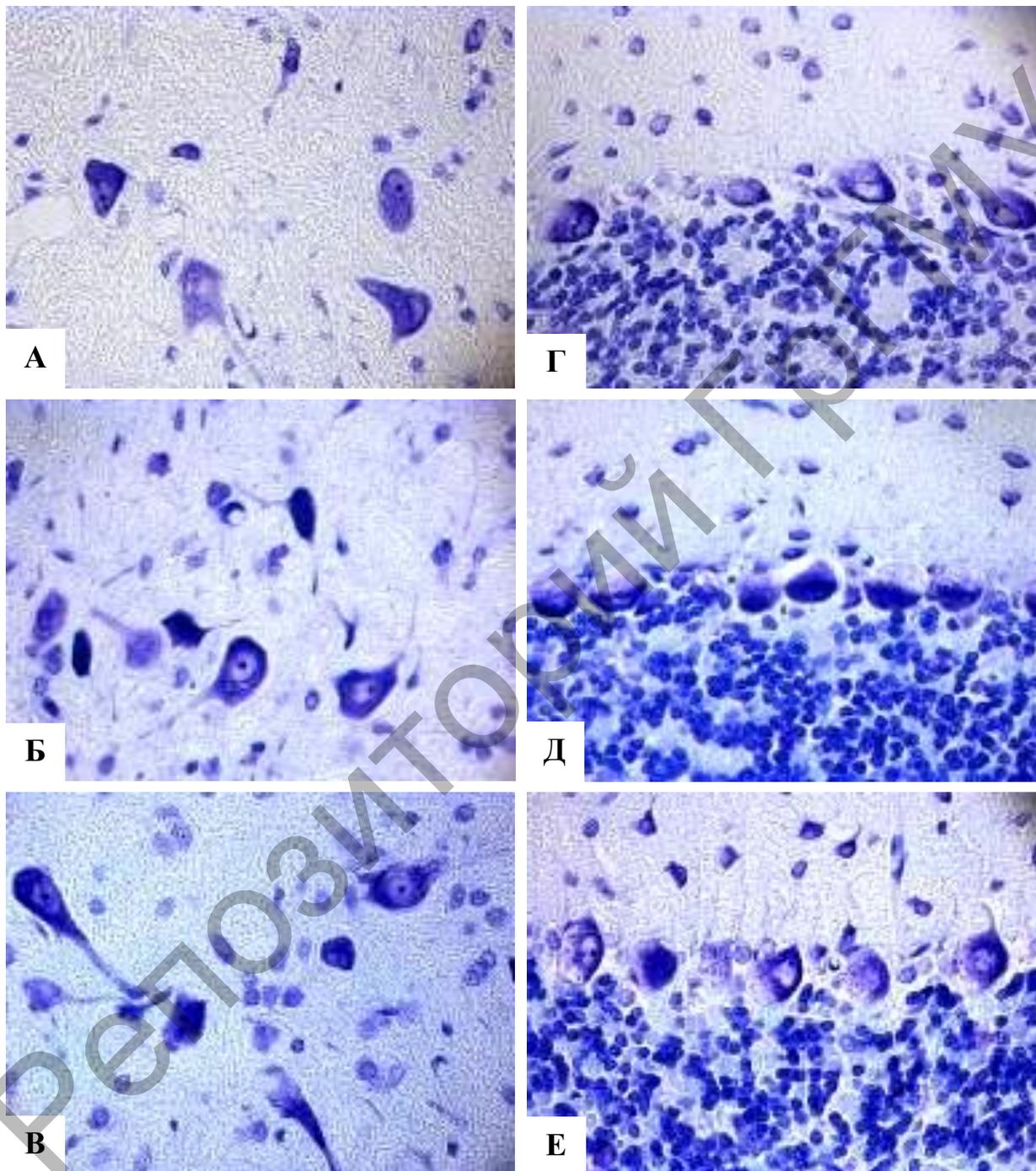
Рисунок 6.10 – Нейроны гигантоцеллюлярного ядра

(А – контрольная группа, Б – 30-минутная СИГМ, В – 3-часовая СИГМ)

Стрелкой показан погибающий нейрон с фуксинофильным ядром

Относительную устойчивость к СИГМ демонстрируют ядра мозжечка (рисунок 6.11А-В). Однако среди клеток Пуркинье коры мозжечка (рисунок 6.11Г-Е) некоторых долек обнаружено

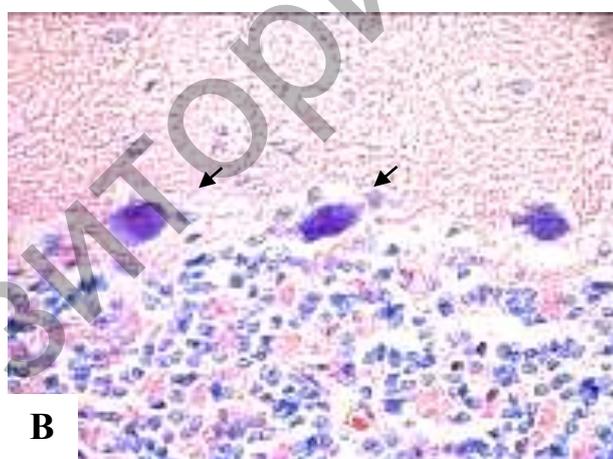
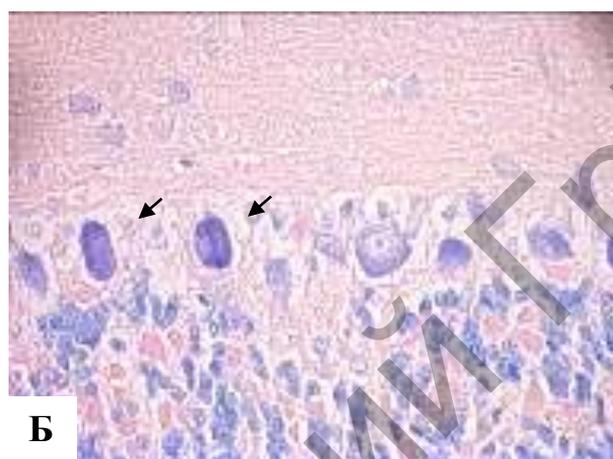
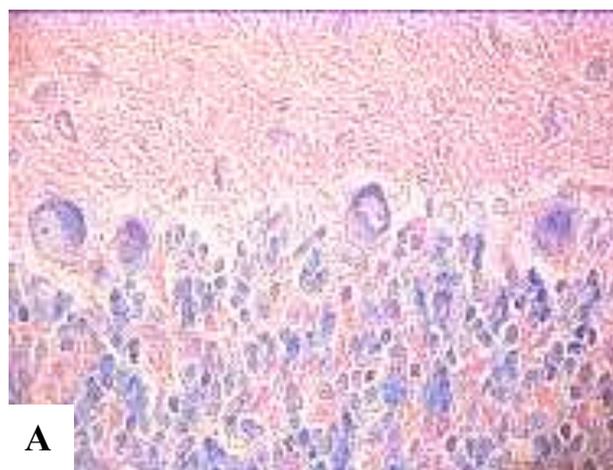
значительное увеличение численности гиперхромных сморщенных нейронов и клеток-теней. Следовательно, клетки Пуркинье обладают большей чувствительностью к СИГМ, чем нейроны ядер мозжечка (рисунок 6.12) [196, 197].



Окраска по Нисслю.

Цифровая микрофотография. Увелич. 400

Рисунок 6.11 – Нейроны латерального ядра мозжечка (А-В) и клетки Пуркинье коры околоклокча мозжечка (А, Г – контрольная группа, Б, Д – 30-минутная СИГМ, В, Е – 3-часовая СИГМ)



Окраска по Викторову. Цифровая микрофотография. Увелич. 400

Рисунок 6.12. – Клетки Пуркинье коры околоклочка мозжечка (А – контрольная группа, Б – 30-минутная СИГМ, В – 3-часовая СИГМ)

Стрелками показаны погибающие нейроны

Обнаруженные различия подтверждают литературные данные о сходном характере, но различной степени выраженности постишемических гистологических изменений в нейронах разных отделов мозга крысы [153, с. 52-54]. По нашим данным,

после перевязки общих сонных артерий быстрее и сильнее повреждаются нейроны конечного и промежуточного мозга. В пределах конечного мозга чувствительность нейронов также неоднородна, о чем ранее сообщалось и другими авторами на примере различной чувствительности полей гиппокампа и зубчатой извилины к ишемии, выявленной с помощью световой, электронной микроскопии и биохимическими методами [186, с. 202-208; 187, с. 551-556; 188, с. 42-46; 198, с. 82-85] [196, 197].

Структуры промежуточного мозга также характеризуются неоднородной чувствительностью нейронов к ишемии. При этом существенные различия между чувствительностью структур таламуса и гипоталамуса не обнаружены [196, 197].

Поскольку конечный и промежуточный мозг имеют минимальные региональные различия в кровоснабжении, объективным является сопоставление чувствительности их структур. Во-первых, в сравнении с конечным мозгом не было обнаружено структур промежуточного мозга, которые можно назвать устойчивыми на основании изменения числа нейронов с различным типом хроматофилии цитоплазмы. Во-вторых, сравнение изменений в структурах промежуточного мозга и наиболее чувствительных к субтотальной ишемии структурах конечного мозга, особенно неокортекса, подтверждает данные об относительной меньшей чувствительности к ишемии популяций нейронов промежуточного мозга [199, с. 420-425]. В упомянутом исследовании сравнивалась реакция неокортикальных пирамидных нейронов и нейронов паравентрикулярного и супраоптического ядер гипоталамуса на ишемическое повреждение. Было обнаружено, что мембраны исследованных нейронов гипоталамуса в сравнении с пирамидными нейронами деполяризуются медленнее, сопротивляются полной деполяризации и противостоят набуханию клеток и очаговому вздутию дендритов [199, с. 420-425].

В мозжечке более чувствительны к субтотальной ишемии головного мозга клетки Пуркинье коры, о высокой чувствительности которых к ишемии *in vivo* и *in vitro* сообщалось и другими авторами [198, с. 82-85; 200, с. 11-16; 201, с. 134-136]. Кроме того, полученные нами данные согласуются с информацией Horn & Schlote [198, с. 82-85] о несколько меньшей чувствительности КП к ишемии в сравнении с нейронами гиппокампа поля CA1 [196, 197].

Относительно более устойчивы к ишемии нейроны среднего мозга, моста и продолговатого мозга. Тем не менее следует отметить значительную разницу в реакции нейронов продолговатого мозга на избирательное гипоксическое и ишемическое воздействие. Так, при моделировании гипоксии путем снижения содержания кислорода в воздухе до 5% Yoshida et al. [202, с. 358-364] выявили высокую чувствительность нейронов вестибулярного ядра относительно нейронов спинального ядра тройничного нерва. При моделировании ишемии головного мозга путем двусторонней перевязки общих сонных артерий нейроны обоих ядер характеризуются сходными, но исключительно умеренными изменениями, то есть ограничение кровоснабжения нивелирует различия, имеющиеся в чувствительности нейронов структур к недостатку кислорода [196, 197].

В целом использованная нами модель субтотальной ишемии хоть и приближается к клинике, однако не исключает возможность коллатерального кровоснабжения мозга крысы, особенно его стволовой части, за счет спинномозговых артерий. Это следует учитывать при сравнении глубины ишемического повреждения нейронов передней и задней частей мозга [196, 197].

Выводы:

1. Нейроны разных отделов мозга крысы по-разному реагируют на ишемию, вызванную перевязкой общих сонных артерий, что приводит к их обратимым и/или необратимым гистологическим изменениям.

2. Наиболее уязвимы к СИГМ нейроны филогенетически более молодых отделов – конечного мозга. В пределах конечного мозга особенно чувствительны неокортекс и периаллокортекс.

Глава 7

ЗНАЧЕНИЕ ИСХОДНОГО СОДЕРЖАНИЯ АТФ-СИНТАЗЫ И НЕЙРОГЛОБИНА ДЛЯ ХАРАКТЕРА И СТЕПЕНИ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕЙРОНОВ МОЗГА

Исходное содержание (в норме) АТФ-синтазы в нейронах всех отделов головного мозга крысы коррелирует положительно с количествами ишемических гиперхромных нейронов ($r=0,43$; $p=0,04$), отрицательно – с количеством клеток-теней ($r=-0,43$; $p=0,04$) после 30 минут СИГМ. Данные корреляции АТФ-синтазы в стволе мозга и мозжечке с числом постишемических гиперхромных сморщенных нейронов ($r=0,62$; $p=0,03$) (рисунок 7.1) и клеток-теней ($r=-0,69$; $p=0,01$) более выражены. При этом исходное содержание АТФ-синтазы в конечном и промежуточном мозге более значительно коррелирует с количеством гиперхромных сморщенных нейронов ($r=0,63$; $p=0,01$). Это объясняется более высокой ишемической нагрузкой на отделы передней части мозга в данной модели экспериментальной ишемии и, как результат, большей АТФ-гидролазной активностью АТФ-синтазы в нейронах, что приводит к их быстрому повреждению, сморщиванию в случаях относительно невысокого содержания АТФ-синтазы [177].

В конечном мозге содержание АТФ-синтазы отрицательно связано с количеством клеток-теней после 30-минутной ($r=-0,91$; $p=0,002$) и 3-часовой ($r=-0,74$; $p=0,04$) СИГМ (рисунок 7.2). Кроме того, в стволе мозга, включая промежуточный мозг, исходные количества АТФ-синтазы положительно сильно коррелируют ($r=0,74$; $p=0,04$) с количеством гиперхромных нейронов после 30-минутной СИГМ [177].

Чем выше исходное содержание АТФ-синтазы, то есть выше энергетический потенциал и потребность нейронов в кислороде и чувствительность к ишемии, тем больше вероятность сморщивания нейронов, но меньше вероятность превращения их в клетки-тени (особенно для конечного мозга) [177].

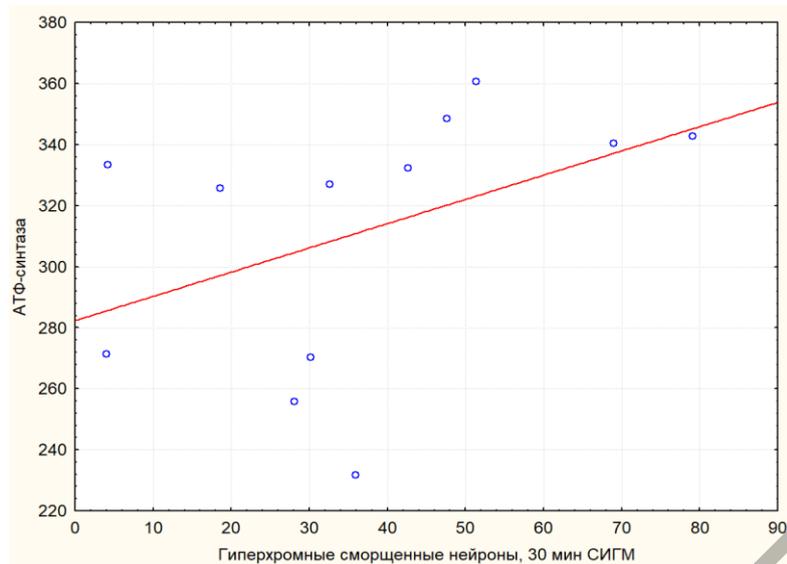


Рисунок 7.1 – Корреляция между содержанием АТФ-синтазы в норме и количеством гиперхромных сморщенных нейронов после 30-минутной СИГМ в стволе мозга и мозжечке

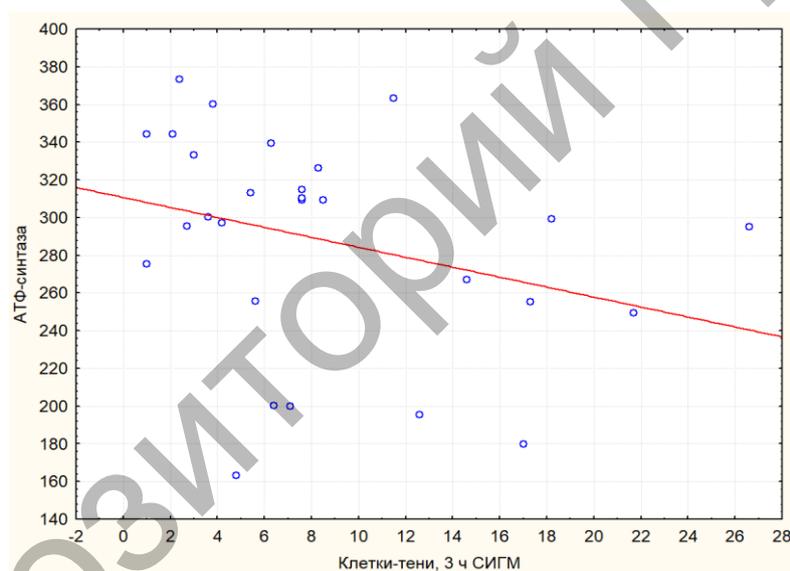


Рисунок 7.2 – Корреляция между содержанием АТФ-синтазы в норме и количеством клеток-теней после 3-часовой СИГМ в конечном мозге

Следовательно, АТФ-синтаза определяет путь, по которому пойдет ишемическая деструкция нейронов: высокий ее исходный уровень предполагает сморщивание нейронов, низкий – превращение в клетки-тени [177]. Сморщивание нейронов в данном случае объясняется накоплением внутриклеточного Na^+ вследствие дисфункции энергозависимого Na^+ -насоса при ишемии [203, с. 1885-1888; 204, с. 1402-1404; 205, с. 1769-1773; 206, с. 394-398], что неизбежно приводит к необратимым повреждениям митохондрий

[207, с. 726-735; 208, с. 270-274] и может выражаться в изменении формы перикарионов, хроматофилии цитоплазмы нейронов, открытию патологических митохондриальных пор и в дальнейшем приводить к клеточной смерти [208, с. 270-274].

Для **Ngb** особенно очевидна связь именно с клетками-тенями, так как большинство обнаруженных корреляций как во всем головном мозге, так и в его отделах касаются именно этого типа тяжелых деструктивных изменений нейронов. После 30-минутной СИГМ во всех отделах мозга крысы наблюдается отрицательная корреляция между исходным содержанием **Ngb** и количеством клеток-теней после 30-минутной ишемии ($r=-0,505$, $p=0,01$) (рисунок 7.3). Подобная по силе, но противоположная по характеру положительная корреляция обнаружена между исходным содержанием **Ngb** и количеством клеток-теней после 3-часовой СИГМ ($r=0,45$; $p=0,027$) [196].

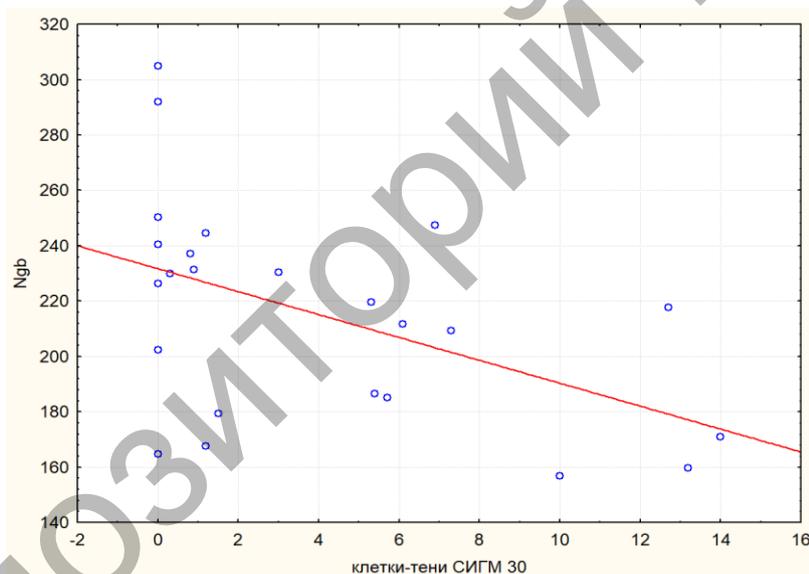


Рисунок 7.3 – Корреляция между содержанием **Ngb в норме и количеством клеток-теней после 30-минутной СИГМ**

В конечном и промежуточном мозге эти корреляции несколько выше: после 30 минут ($r=-0,53$, $p=0,04$) и 3 часов ($r=-0,54$, $p=0,04$) СИГМ. В стволе мозга и мозжечке корреляция **Ngb** с количеством клеток-теней после 30-минутной СИГМ еще выше ($r=-0,66$, $p=0,02$). В стволе мозга после 3-часовой СИГМ корреляция с количествами **Ngb** сильная и положительная ($r=0,71$; $p=0,047$) [196].

Смена отрицательных по характеру корреляций на положительные является свидетельством ограниченности нейропротекторного эффекта Ngb при его эндогенных количествах при длительной ишемии. Вероятно, это связано с изменением кислородосвязывающей или кислородовысвобождающей способности Ngb в условиях, созданных 3-часовым ишемическим воздействием [196].

Поскольку клетки-тени – нейроны с необратимыми деструктивными изменениями [193, с. 174-184], подобные негативные корреляции демонстрируют защитный эффект Ngb при кратковременном ишемическом воздействии, особенно в стволе мозга и мозжечке. Ранее в литературных источниках приводилась информация, ставящая под сомнение нейропротекторную роль Ngb при его эндогенных количествах [150, с. 16-21; 155 с. 5-7; 199, с. 260-263]. Однако, по нашим данным, при более высоком исходном содержании Ngb в нейронах их ишемическая дегенерация и превращение в клетки-тени в ранний период СИГМ ниже, особенно в стволе мозга и мозжечке. Это впервые демонстрирует нейропротекторный эффект Ngb при ишемии у нормальных немутантных животных [196].

Выводы:

1. АТФ-синтаза определяет путь, по которому пойдет ишемическая деструкция нейронов: высокий ее исходный уровень предполагает сморщивание нейронов, низкий – превращение в клетки-тени (особенно для конечного мозга). Исходное содержание (в норме) АТФ-синтазы в нейронах всех отделов головного мозга крысы положительно коррелирует с количествами ишемических гиперхромных нейронов ($r=0,43$; $p=0,04$) и отрицательно коррелирует с количеством клеток-теней ($r=-0,43$; $p=0,04$) после 30 минут СИГМ.

2. Существует кратковременный нейропротекторный эффект Ngb при ишемии у беспородных белых крыс, который подтверждается отрицательной корреляцией между исходным содержанием Ngb и количеством клеток-теней после 30-минутной ишемии ($r=-0,505$, $p=0,01$) (рисунок 7.3). В стволе мозга и мозжечке эта корреляция более высокая ($r=-0,66$, $p=0,02$).

Глава 8

ИЗМЕНЕНИЯ АТФ-СИНТАЗЫ В НЕЙРОНАХ РАЗНЫХ ОТДЕЛОВ МОЗГА КРЫСЫ ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

После ишемии вызванной перевязкой общих сонных артерий, на региональном уровне наибольшие изменения иммунореактивности **АТФ-синтазы** обнаружены в нейронах неокортекса и периллокортекса конечного мозга (рисунок 8.1, таблица П.3). Значительное снижение иммунореактивности наблюдается во всех исследованных слоях коры уже после 30-минутной СИГМ [197, 210].

После 3-часовой СИГМ иммунореактивность продолжает снижаться (II слой пириформной коры, II слой полей СА1 и СА3 гиппокампа, медиальное мамиллярное ядро, гистаминергическое ядро Е2, ядро мозжечка), остается сниженной (II слой ретроспленниальной коры, V и VI слои височной коры) либо в некоторых случаях (V слой ретроспленниальной агранулярной коры, III слой височной коры, компактное вещество черной субстанции) несколько увеличивается в сравнении с 30-минутным сроком (таблица П.3) [197, 210].

Филогенетически более старые отделы конечного мозга, такие как пириформная кора, СА1-СА3 поля гиппокампа (рисунок 8.2) и зубчатая извилина, характеризуются меньшим снижением иммунореактивности АТФ-синтазы после 30-минутной и 3-часовой СИГМ по сравнению с неокортексом и периллокортексом (таблица П.3). Исключением являются митральные клетки обонятельной луковицы, в которых после 30-минутной СИГМ наблюдается резкое увеличение иммунореактивности АТФ-синтазы, но уже после 3-часовой СИГМ происходит ее снижение до начального уровня (рисунок 8.2, таблица П.3) [197, 210].

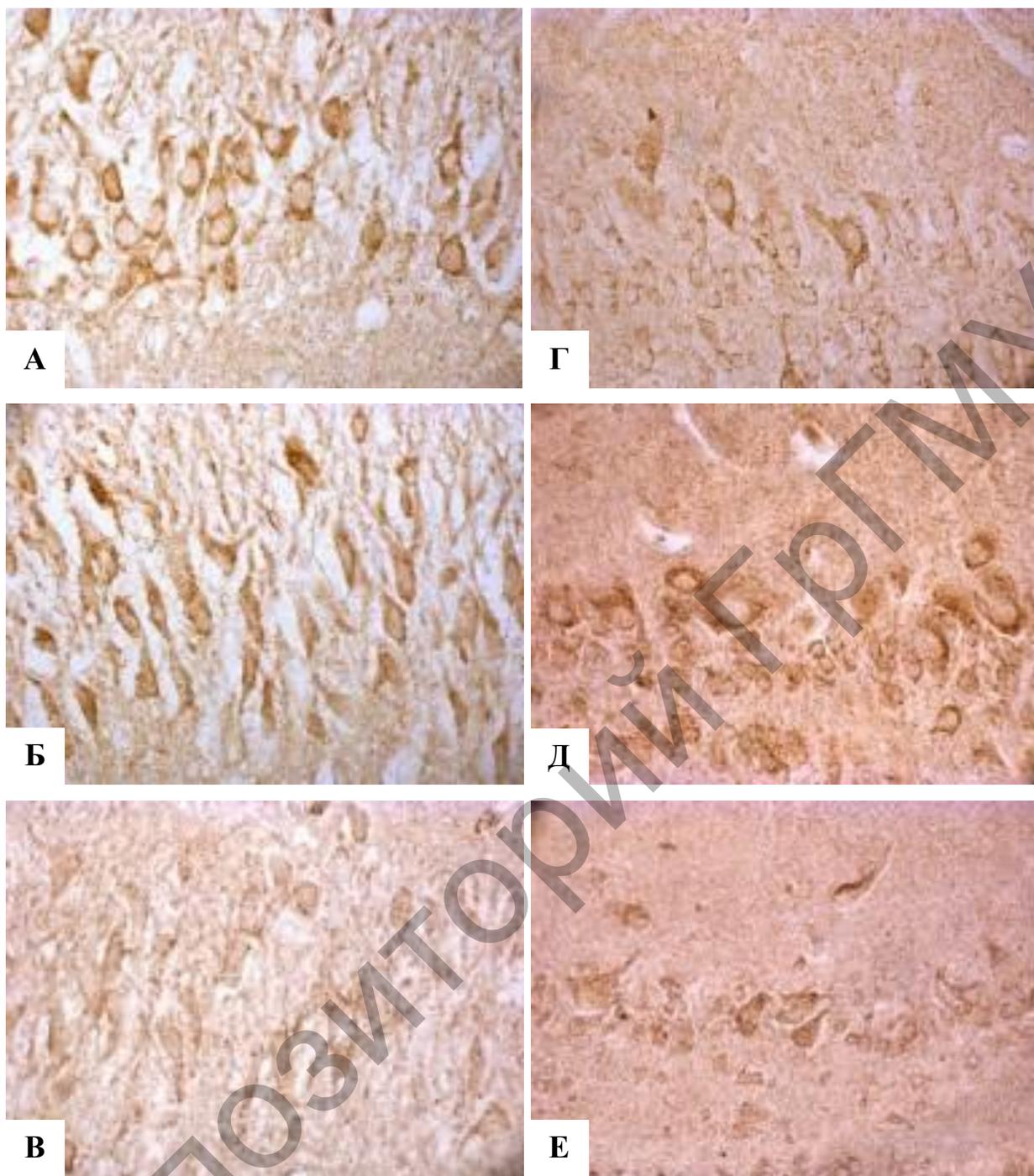
Характер изменений иммунореактивности в нейронах среднего и продолговатого мозга носит менее выраженный характер в сравнении с конечным и промежуточным мозгом (рисунок 8.3, таблица П.3) [197, 210].



Иммуногистохимическая реакция.

Цифровая микрофотография. Увелич. 400

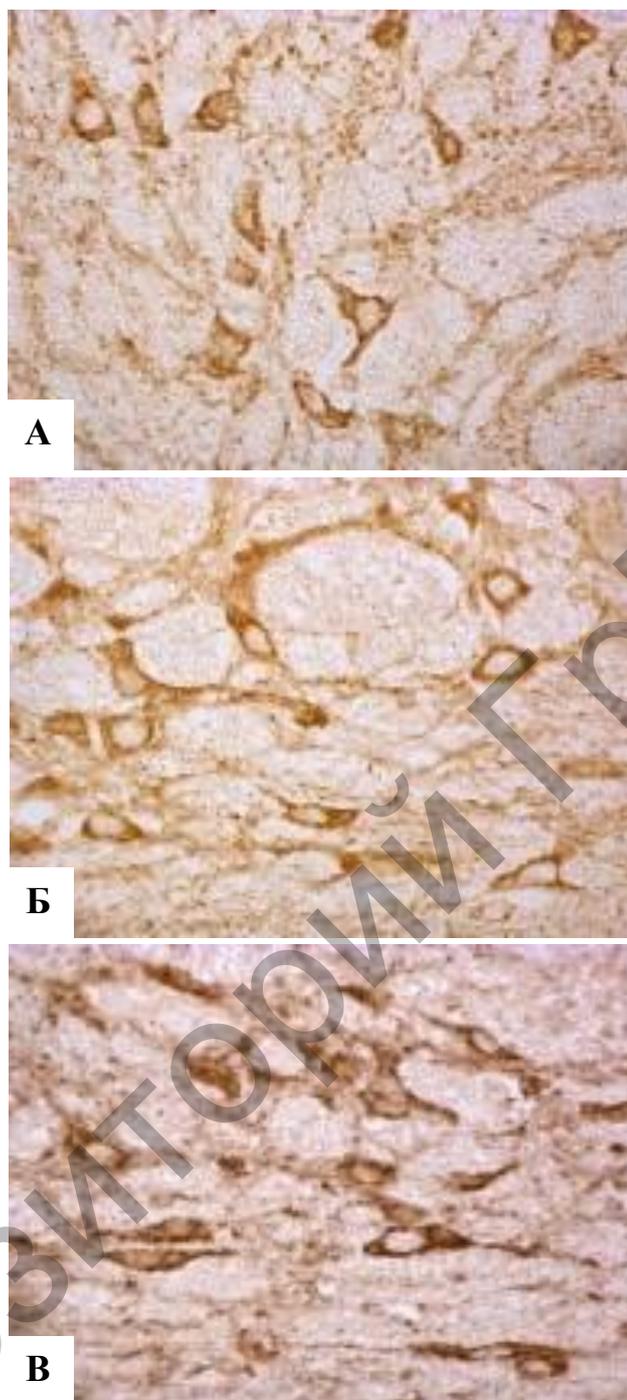
**Рисунок 8.1 – Нейроны V слоя височной коры
(А – контрольная группа, Б – 30-минутная СИГМ,
В – 3-часовая СИГМ)**



Иммуногистохимическая реакция.
Цифровая микрофотография. Увелич. 400

Рисунок 8.2 – Нейроны II слоя гиппокампа поля СА3 (А-В) и митральные клетки обонятельной луковицы (Г-Е) (А, Г – контрольная группа; Б, Д – 30-минутная СИГМ; В, Е – 3-часовая СИГМ)

Изменения иммунореактивности АТФ-синтазы, наблюдающиеся в ядрах промежуточного мозга, сходны с таковыми в конечном мозге (таблица П.3) [197, 210].

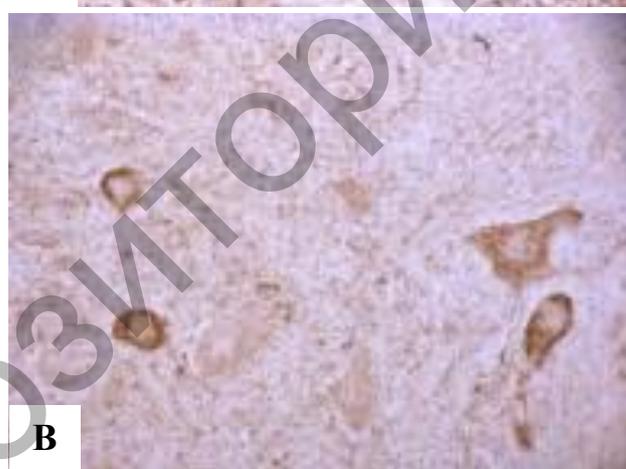
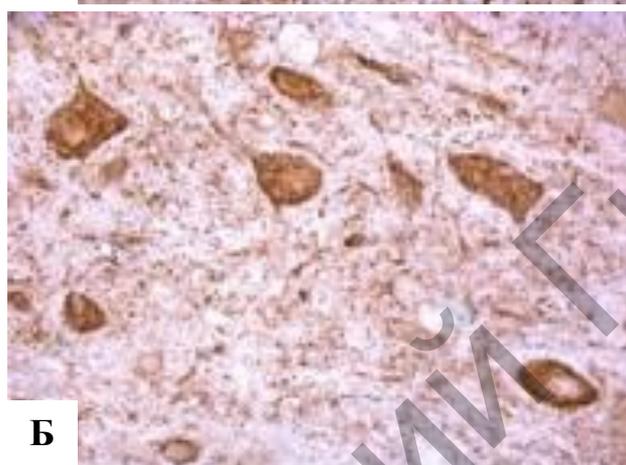
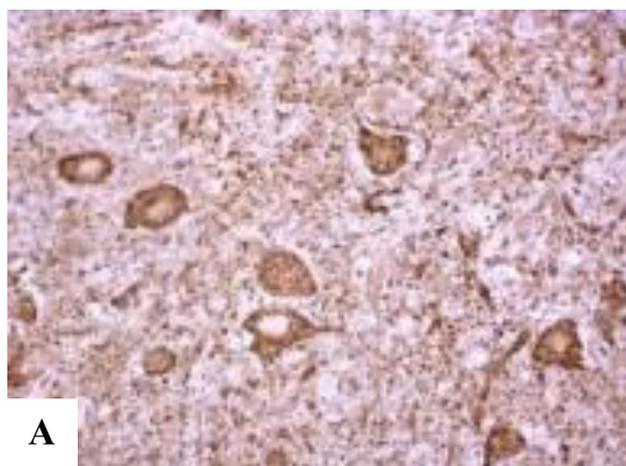


Иммуногистохимическая реакция. Цифровая микрофотография. Увелич. 400

**Рисунок 8.3. – Нейроны компактного вещества
черной субстанции среднего мозга**

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

В нейронах ядер мозжечка и клеток Пуркинью коры мозжечка изменения иммунореактивности АТФ-синтазы после 30-минутной СИГМ почти отсутствуют, однако после 3-часовой СИГМ иммунореактивность в нейронах, особенно в некоторых из них, заметно снижается по сравнению с контролем (рисунок 8.4, таблица П.3) [197, 210].



Иммуногистохимическая реакция. Цифровая микрофотография. Увелич. 400

**Рисунок 8.4. – Нейроны вставочного ядра мозжечка
(А – контрольная группа, Б – 30-минутная СИГМ, В – 3-часовая СИГМ)**

Полученные данные об изменениях содержания АТФ-синтазы в нейронах разных отделов мозга крыс после перевязки общих сонных артерий демонстрируют разные степень и скорость снижения содержания АТФ-синтазы, что может быть следствием различного кровоснабжения исследованных отделов мозга и разной чувствительности отдельных популяций нейронов мозга крысы

в пределах отделов, возможно, из-за их различной функции, метаболического статуса и нейромедиаторной природы [197, 210].

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. Однако и в этом случае скорость и степень снижения содержания АТФ-синтазы разнообразны. О различиях чувствительности к ишемии нейронов теменной коры и гиппокампа сообщалось ранее [211, 212].

Поля гиппокампа отличаются скоростью и степенью изменения иммунореактивности АТФ-синтазы при церебральной ишемии. Наиболее уязвимое к ишемическим повреждениям поле СА1 [213, с. 261-277] характеризуется достаточно плавным снижением АТФ-синтазы. В то же время относительно устойчивое к ишемическим повреждениям поле СА3 и зубчатая извилина теряют иммунореактивность АТФ-синтазы в большей степени и быстрее, а наименьшее снижение АТФ-синтазы отмечено в поле СА2 [197, 210].

Как среди структур конечного мозга, так и среди других исследованных структур мозга крысы необычными являются характер и скорость постишемического изменения иммунореактивности АТФ-синтазы митральных клеток обонятельных луковиц. В отличие от других типов нейронов, в них через 30 минут ишемии происходит резкое возрастание содержания АТФ-синтазы, возможно, в свете сравнительно слабой развитости энергетического аппарата митральных клеток в норме [197, 210].

Характер изменения содержания АТФ-синтазы в нейронах структур промежуточного мозга разнообразен. Избирательная чувствительность нейронов таламуса и гипоталамуса к ишемии описывалась в литературе [199, с. 420-425; 214, с. 697-703; 215, с. 740-744], однако изменения АТФ-синтазы их нейронов не были описаны. Несмотря на то, что таламус интенсивно кровоснабжается вследствие высоких метаболических потребностей и имеет хорошо развитую сеть коллатералей, характер изменений в его структурах очень отличается. В задней группе ядер таламуса после длительного ишемического воздействия происходит восстановление уровня иммунореактивности АТФ-синтазы, в то время как в нейронах медиального габенулярного ядра иммунореактивность падает на протяжении всех сроков воздействия [197, 210].

Для гистаминергических нейронов гипоталамуса (ядро E2) устойчивость АТФ-синтазы к ишемическому воздействию не выявлена. Из литературных источников известно, что в нейронах данного ядра после 30-минутной ишемии преобладают не только изменения, указывающие на активацию синтетических процессов, но и наблюдаются признаки деструкции ультраструктур [216], что вполне может соответствовать 9%-му снижению АТФ-синтазы после 30-минутной СИГМ [197, 210].

Полученные данные об изменении иммунореактивности АТФ-синтазы в нейронах среднего и продолговатого мозга указывают на меньшие изменения содержания АТФ-синтазы при перевязке общих сонных артерий. Возможно, это связано с сохранением коллатерального кровоснабжения за счет сохранившихся спинальных артерий. Тем не менее отмечена структура – черная субстанция, для которой обнаружено резкое снижение содержания АТФ-синтазы после 30-минутной СИГМ. Подобный характер изменений, вероятно, обусловлен большой долей чувствительных к ишемии, образующих эти ядра дофаминергических нейронов [217, с. 1710-1716] и меньшей митохондриальной массой в данных нейронах, в отличие от других структур среднего мозга (в частности, в сравнении с верхней областью покрышки) [218, с. 372-378]. Однако после 3-часовой СИГМ содержание АТФ-синтазы в них частично нормализуется, возможно, за счет коллатерального кровообращения из позвоночных и базилярной артерий [197, 210].

В нейронах структур мозжечка иммунореактивность АТФ-синтазы не изменяется при 30-минутной субтотальной ишемии, но при 3-часовой СИГМ появляются изменения: в ядрах зарегистрировано снижение иммунореактивности, в то время как реакция клеток Пуркинье различается в зависимости от участка коры мозжечка [197, 210].

Выводы

При субтотальной ишемии степень и скорость изменения содержания АТФ-синтазы в структурах головного мозга крысы значительно отличаются. Наиболее быстрое и значительное снижение отмечено в структурах конечного мозга – височной, ретросплениальной агранулярной коре, а также в ядрах гипоталамуса; наименьшее – в нейронах продолговатого мозга и мозжечка.

Глава 9

ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОГЛОБИНА В НЕЙРОНАХ РАЗНЫХ ОТДЕЛОВ МОЗГА КРЫСЫ ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

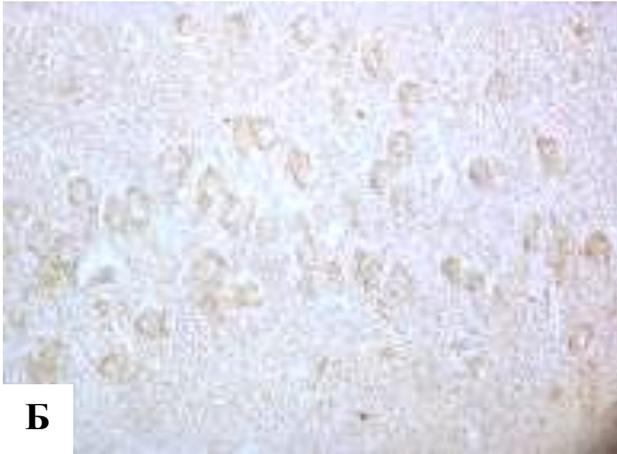
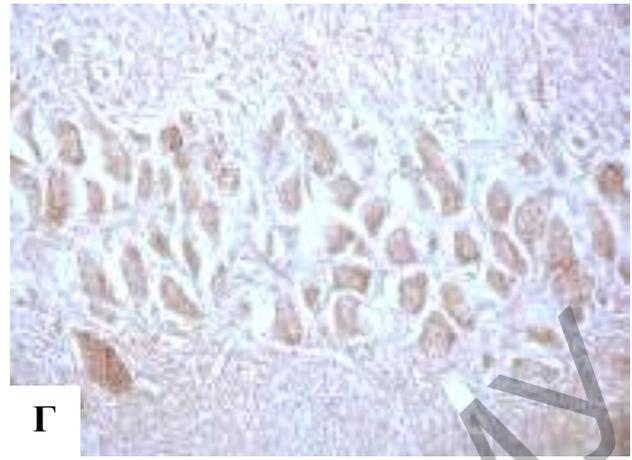
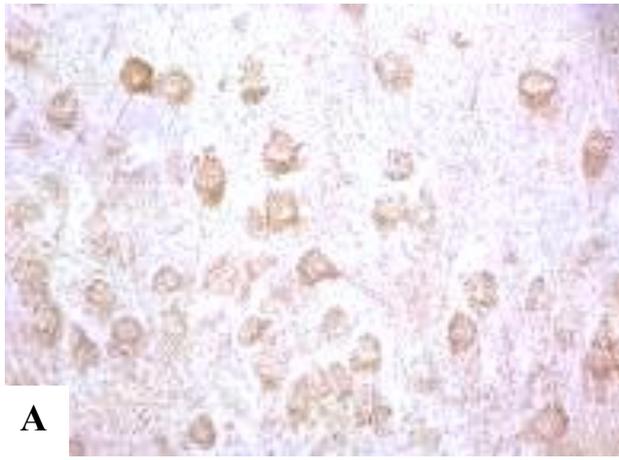
Изменения Ngb-иммунореактивности после СИГМ обнаружены в нейронах всех отделов мозга крысы. Преимущественно отмечается снижение иммунореактивности, однако степень и скорость его отличаются (таблица П.4) [197, 219].

В конечном мозге выделяется несколько групп по характеру изменения иммунореактивности Ngb при СИГМ. Для древней пириформной коры характерно ее быстрое снижение после 30-минутной ишемии и увеличение после 3-часового воздействия относительно 30-минутной СИГМ (рисунок 9.1, таблица П.4) [197, 219].

В митральных клетках обонятельной луковицы, наоборот, Ngb-ИР повышается после 30-минутной СИГМ (таблица П.4). В гиппокампе (в полях СА1-СА3) и зубчатой извилине снижение ИР Ngb отмечается в оба срока (рисунок 9.1, таблица П.4). В слоях периааллокортекса и неокортекса не наблюдается снижения ИР после 30-минутной СИГМ, но происходит снижение через 3 часа [197, 219].

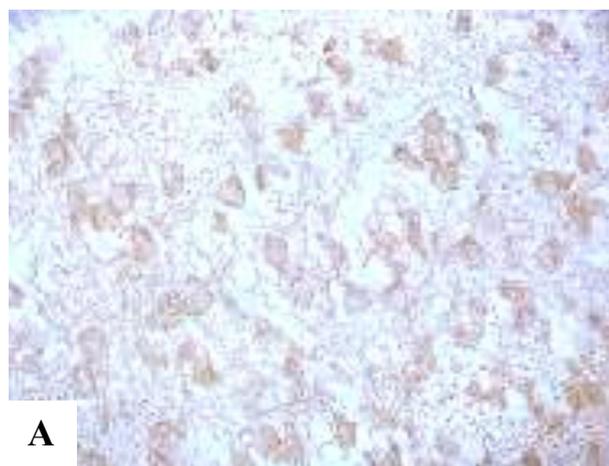
В нейронах структур таламуса Ngb-ИР снижается уже после 30-минутного ишемического воздействия и продолжается спустя 3 часа (рисунок 9.2, таблица П.4). Более медленные и менее выраженные изменения происходят только в медиальном маммилярном ядре (таблица П.4) [197, 219].

В среднем и продолговатом мозге изменения носят разнообразный характер: происходит как волнообразное изменение ИР, так и его снижение уже после 30-минутного воздействия (рисунок 9.3, таблица П.4). В одной из структур продолговатого мозга – спинальном ядре тройничного нерва – изменения ИР Ngb не обнаружено [197, 219].



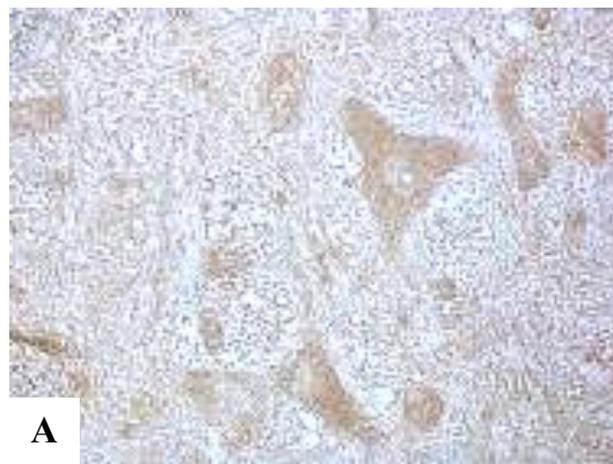
Иммуногистохимическая реакция на Ngb.
Цифровая микрофотография. Увелич. 400

**Рисунок 9.1 – Нейроны II слоя пириформной коры (А-В)
и II слоя гиппокампа поля СА2 (Г-Е)
(А, Г – контрольная группа; Б, Д – 30-минутная СИГМ;
В, Е – 3-часовая СИГМ)**



Иммуногистохимическая реакция на Ngb.
Цифровая микрофотография. Увелич. 400

**Рисунок 9.2 – Нейроны медиального габенулярного ядра таламуса
(А – контрольная группа, Б – 30-минутная СИГМ,
В – 3-часовая СИГМ)**

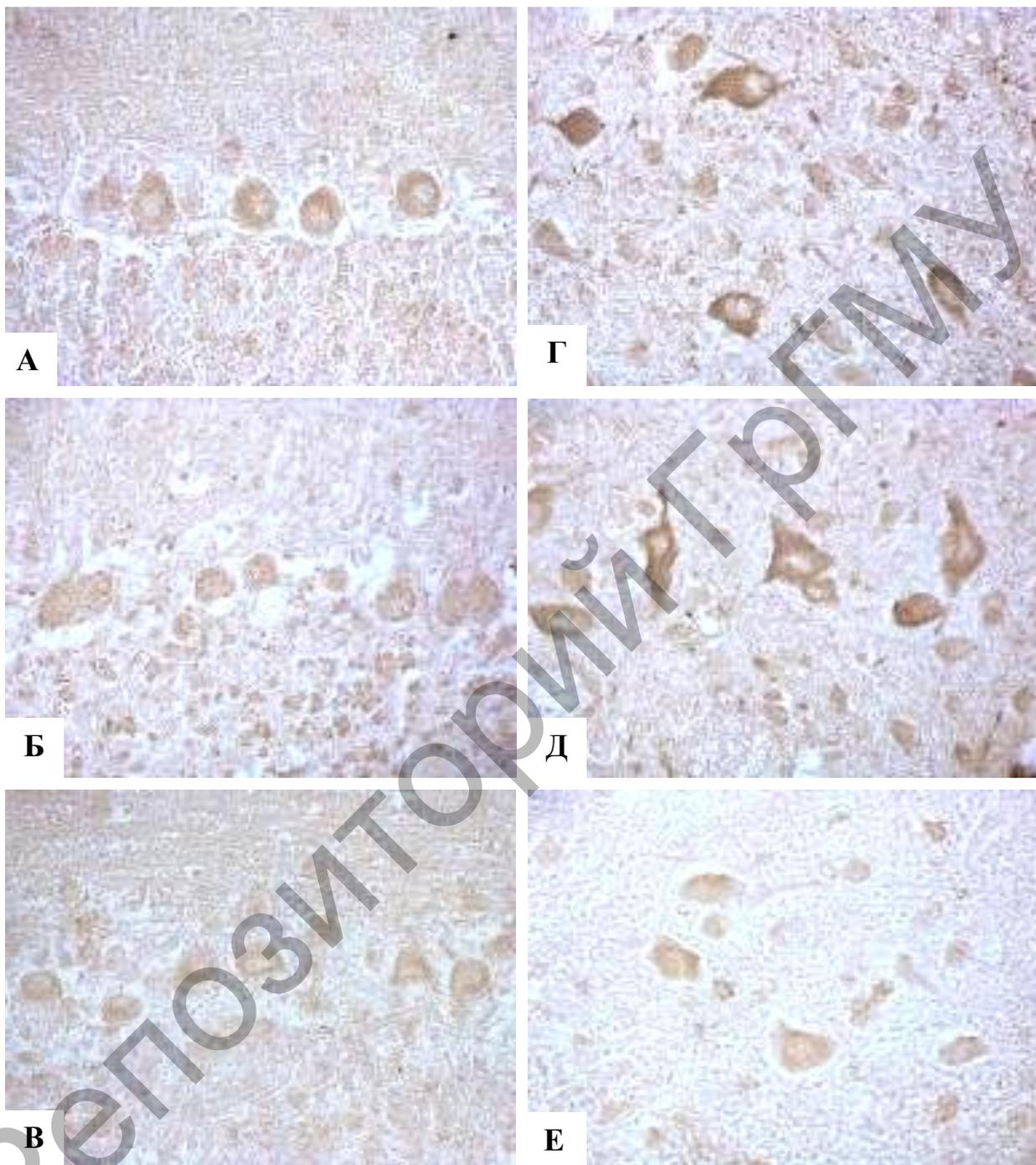


Иммуногистохимическая реакция на Ngb.
Цифровая микрофотография. Увелич. 400

**Рисунок 9.3 – Нейроны гигантоцеллюлярного ядра
продолговатого мозга
(А – контрольная группа, Б – 30-минутная СИГМ,
В – 3-часовая СИГМ)**

Структуры мозжечка характеризуются разной динамикой изменения иммунореактивности Ngb. Наименее значительные изменения Ngb-ИР наблюдаются в клетках Пуркинье коры мозжечка.

Ядра мозжечка характеризуются разным временем снижения Ngb-ИР (рисунок 9.4, таблица П.В.4) [197, 219].



Иммуногистохимическая реакция на Ngb.
Цифровая микрофотография. Увелич. 400

Рисунок 9.4 – Клетки Пуркинье коры простой долики мозжечка (А-В) и нейроны латерального ядра мозжечка (Г-Е) (А, Г – контроль; Б, Д – 30-минутная СИГМ; В, Е – 3-часовая СИГМ)

Содержание Ngb при субтотальной церебральной ишемии в нейронах большинства отделов мозга значительно снижается, что свидетельствует об общей неустойчивости кислородного депо большинства нейронов мозга к ишемическому воздействию. Структуры без изменения Ngb (спинальное ядро тройничного нерва, клетки Пуркинье простой дольки мозжечка) составляют малую долю в мозге. В отдельных типах нейронов (митральные клетки обонятельных луковиц) через 30 минут после начала ишемии происходит даже временное увеличение содержания нейроглобина с последующей нормализацией через 3 часа [197, 219].

Обнаруженные изменения позволяют говорить и о разной устойчивости кислородного депо в структурах в зависимости от филогенетического возраста: более молодые периаиллокортекс, неокортекс и кору мозжечка можно выделить как структуры с более устойчивым кислородным депо, так как 30-минутная субтотальная ишемия не приводит к снижению в них содержания Ngb, в то время как в аллокортексе, стволе мозга и ядрах мозжечка кислородное депо быстро уменьшается [197, 219].

Меньшая чувствительность кислородного депо филогенетически молодых структур при ишемии ранее отмечалась в литературе [220, с. 220-225], однако факторы, определяющие данное различие до сих пор не обозначены. Причиной 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 [221, с. 228-231]. Несмотря на то, что более высокий уровень nNOS описывался для развивающихся нейронов [221, с. 225-230], нельзя исключать возможность существования аналогичных различий в уровнях nNOS и среди нейронов взрослых организмов [197, 219].

Известно, что после 1-часовой СИГМ происходит 29%-е снижение Ngb в гиппокампе (поле CA1) [222], что соответствует нашим данным 21% и 37%-м снижению Ngb после 30-минутного и 3-часового воздействия соответственно [197, 219].

Также известно о 32%-м снижении ИР Ngb в пирамидных нейронах V слоя париетальной коры после 1-часовой субтотальной ишемии [222], в то время как по нашим данным в височной коре после 30-минутной ишемии значимое изменение не 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 [197, 219].

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 [197, 219].

Важно отметить редкость случаев увеличения Ngb относительно контрольного уровня после 3-часовой субтотальной ишемии головного мозга, что согласуется с данными других исследований о повышении Ngb в нервных клетках с нормальной экспрессией данного белка [149, с. 174-179]. Как известно из литературных данных, увеличение экспрессии Ngb при ишемии/гипоксии наблюдалось у Ngb-сверхэкспрессирующих животных / в отдельных культурах клеток [18, с. 15308-15310; 19, с. 4-12; 20; 21, с. 1876-1880; 22; 23; 146, с. 1871-1874], но не в нетрансгенных организмах [197, 219].

Выводы

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.

Глава 10

СРАВНЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ В МОЗГЕ АТФ-СИНТАЗЫ И NGF ПОСЛЕ ИШЕМИИ И СО СТЕПЕНЬЮ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕЙРОНОВ

Корреляции между распределением АТФ-синтазы и Ngn после ишемии

Если между содержаниями АТФ-синтазы и Ngn в нейронах исследованных структур в контрольной группе была найдена положительная корреляция ($r=0,561$, $p=0,004$), то после 30-минутной субтотальной ишемии корреляция отсутствует ($r=0,167$, $p=0,426$). Однако после 3-часового ишемического воздействия она снова появляется ($r=0,516$, $p=0,008$) (рисунок 10.1) [197, 210, 219].

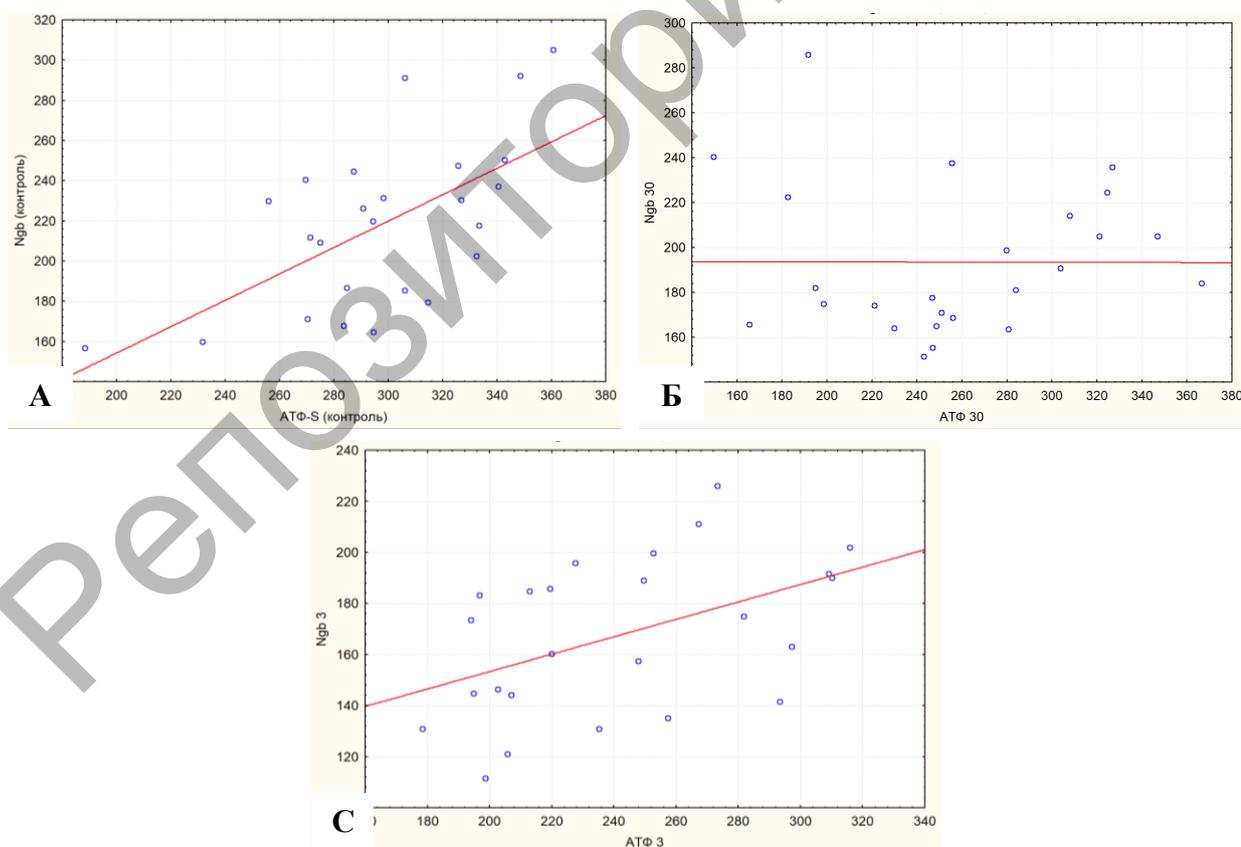


Рисунок 10.1 – Корреляция между АТФ-синтазой и Ngn в контрольной группе (А), после 30-минутной СИГМ (Б) и после 3-часовой СИГМ (В)

Также для *Ngb* характерно более равномерное, а через 3 часа и более значительное постишемическое снижение его содержания в нейронах мозга в сравнении с АТФ-синтазой, что отражено в диаграммах размаха (рисунок 10.2) [197, 210, 219].

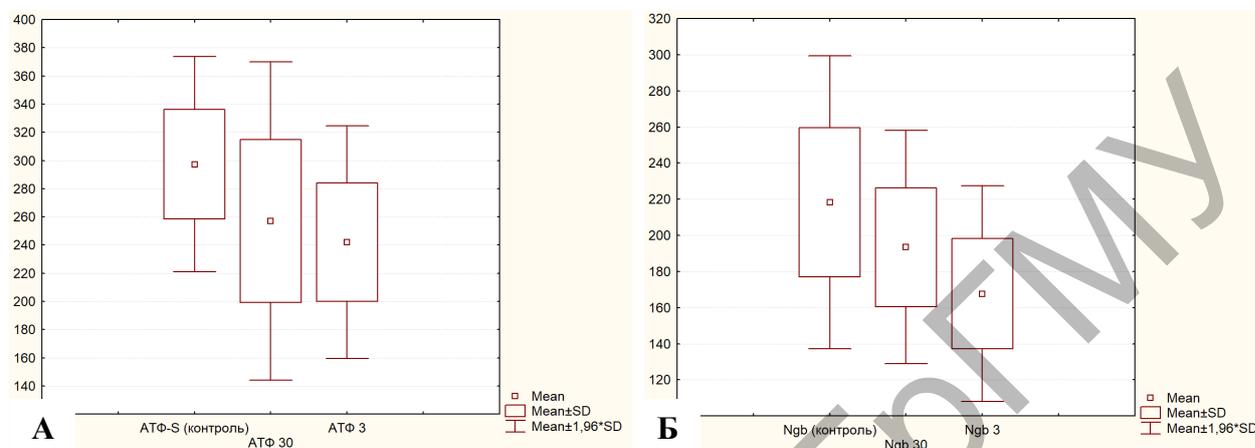


Рисунок 10.2 – Диаграммы размаха значений АТФ-синтазы (А) и *Ngb* (Б) во всех исследованных группах

Соотношение характера изменений содержания АТФ-синтазы и *Ngb* особенно важно в силу некоторых причин. Во-первых, АТФ-синтаза является «носителем» митохондриальной поры [222, с. 1192-1194; 223, с. 6-10]. При ишемии вследствие накопления активных форм кислорода, увеличения рН и уменьшения синтеза АТФ происходит необратимая диссоциация АТФ-синтазы на две субъединицы, что приводит к открытию патологических митохондриальных пор, что влечет смерть клетки [224, с. 6-10]. *Ngb* в свою очередь при условии его сверхэкспрессии способен блокировать открытие митохондриальных пор [24, с. 6996-7006; 225, с. 4-7]. При отсутствии *Ngb* их открытие усиливается [225, с. 4-7]. Во-вторых, согласно литературным данным, при кислород-глюкозной депривации усиливается транспорт *Ngb* в митохондрии, стимулируемый открытием митохондриальных пор [24, с. 6996-7006; 197, 210, 219].

Сохранение или увеличение уровня *Ngb* при субтотальной ишемии обеспечивает возможность выполнения им нейропротекторных функций, в том числе, вероятнее всего, при перемещении в митохондрии, даже при небольших изначальных физиологических концентрациях. Однако излишне высокое содержание АТФ-синтазы в условиях ишемии может привести к ее диссоциации и активации необратимых процессов [197, 210, 219].

Нейропротекторный эффект Ngb при субтотальной ишемии головного мозга был продемонстрирован на примере нейронов II слоя пириформной коры и митральных клеток обонятельных луковиц. В пириформной коре снижение количества АТФ-синтазы с сохранением содержания Ngb, вероятно, привело как к возможности проникновения Ngb в митохондрии через митохондриальные поры, так и к сохранению возможности регуляции поры, без запуска необратимых процессов. В митральных клетках резкое увеличение количества АТФ-синтазы после 30-минутного ишемического воздействия вызвало появление сморщенных, гипохромных нейронов, но уже после 3 часов благодаря стабильному повышенному уровню Ngb был достигнут нейропротекторный эффект, в том числе за счет снижения содержания АТФ-синтазы до контрольных значений [197, 210, 219].

Можно предположить, что если нейроны не достигают баланса между активацией митохондриальных пор, проникновением в митохондрии Ngb и регуляцией этих пор самим Ngb, то в нейронах развиваются разнообразные обратимые и необратимые деструктивные изменения [197, 210, 219].

Выводы:

1. После 30-минутного ишемического воздействия корреляция между количествами АТФ-синтазы и Ngb исчезает ($r=0,167$; $p=0,426$), однако уже после 3-часового воздействия она восстанавливается ($r=0,516$; $p=0,008$).

2. Для Ngb характерно более равномерное, а через 3 часа и более значительное постишемическое снижение его содержания в нейронах мозга по сравнению с АТФ-синтазой.

Связь изменений АТФ-синтазы и Ngb в нейронах мозга со степенью их ишемического повреждения

Согласно характеру и степени ишемического повреждения нейронов и изменения содержания в них АТФ-синтазы (таблица П.3) и Ngb (таблица П.4) при ишемии можно выделить несколько основных групп нейронов. Прежде всего это нейроны с незначительными

и обратимыми ишемическими деструктивными повреждениями (таблица П.2). К ним относятся только нейроны II слоя пириформной коры, которые сочетают плавное снижение содержания АТФ-синтазы с сохранением уровня Ngb (таблицы П.3, П.4) [197, 210, 219].

При плавном снижении содержания АТФ-синтазы, а также плавном снижении количества Ngb при 3-часовом ишемическом воздействии отмечаются более значительные изменения, чем в предыдущей группе, но все же эти изменения обратимы – увеличение числа гипохромных и гиперхромных нейронов. К подобным структурам относятся латеральное и промежуточное ядра мозжечка (таблицы П.2-П.4) [197, 210, 219].

При более позднем начале снижения содержания уровня АТФ-синтазы и быстром снижении количества Ngb (уже после 30-минутной субтотальной ишемии) отмечается увеличение доли клеток-теней, после 3-часовой ишемии – увеличение долей гиперхромных сморщенных и гипохромных клеток и возрастание числа клеток-теней. Такие изменения отмечены в клетках Пуркинье околочелюстного ядра мозжечка (таблицы П.2-П.4) [197, 210, 219].

При сохранении количества Ngb и позднем увеличении содержания АТФ-синтазы, как, например, происходит в клетках Пуркинье простой доли коры мозжечка (таблицы П.4, П.3), отмечается возрастание долей гипохромных нейронов и клеток-теней (таблица П.2) [197, 210, 219].

При равномерном снижении количества Ngb с относительно поздним снижением содержания АТФ-синтазы (в нейронах II слоя СА2 поля гиппокампа) (таблицы П.4, П.3) по мере увеличения продолжительности воздействия появляются гиперхромные сморщенные нейроны (таблица П.2) [197, 210, 219].

При сохранении уровней АТФ-синтазы и Ngb, как это происходит в вентральной области покрышки и спинальном ядре тройничного нерва (таблицы П.3, П.4), после 30-минутного ишемического воздействия появляются первые обратимые изменения, а после 3-часового – в том числе и необратимые, выражающиеся в увеличении количества сморщенных клеток (таблица П.2) [197, 210, 219].

Синхронное снижение количества обоих белков (во II слое СА3 поля гиппокампа, зубчатой извилины, в медиальном габенулярном ядре таламуса, гистаминергическом ядре Е2 и гигантоцеллюлярном ядре) (таблицы П.3, П.4) приводит к ранним необратимым

изменениям уже через 30 минут после субтотальной ишемии и их усугублению после 3-часовой ишемии, в том числе с появлением клеток-теней (таблица П.2) [197, 210, 219].

В митральных клетках обонятельной луковицы после 30-минутной субтотальной ишемии происходит резкое увеличение численности нейронов сморщенных, гипохромных и клеток-теней (таблица П.2), что совпадает с повышением содержания в них АТФ-синтазы (таблица П.3) и увеличением количества Ngb (таблица П.4). Однако после 3-часового воздействия остается лишь увеличенное количество гиперхромных и сморщенных нейронов (таблица П.2), что сопровождается снижением в них АТФ-синтазы (таблица П.3) и сохранением повышенного содержания Ngb (таблица П.4) [197, 210, 219].

В остальных исследованных структурах, характеризующихся весьма выраженными обратимыми и необратимыми изменениями хроматофилии цитоплазмы (таблица П.2), общим является снижение количества Ngb при разнообразных изменениях со стороны АТФ-синтазы (таблицы П.3, П.4) [197, 210, 219].

Выводы:

1. Благоприятным условием для нейронов в условиях ишемии является сохранение уровня Ngb с синхронным уменьшением количества АТФ-синтазы.

2. Одновременное сохранение уровней АТФ-синтазы и Ngb при субтотальной ишемии головного мозга не защищает нейроны от необратимых изменений.

3. Неблагоприятный исход, заключающийся в появлении сморщенных нейронов и клеток-теней, происходит при уменьшении содержания Ngb.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Среди 102 типов изученных нейронов мозга наименьшее содержание АТФ-синтазы имеют нейроны медиального ядра миндалины и митральные клетки обонятельных луковиц (оптическая плотность 159-163 у. е.), наибольшее – рецепторные, эффекторные и ганглиозные, такие как нейроны вестибулокохлеарного ганглия и мотонейроны спинного мозга (515-545 у. е.).

2. Среди 102 типов изученных нейронов мозга наименьшее содержание Ngb имеют нейроны моторной, височной коры и митральные клетки обонятельных луковиц (140-160 у. е.). Содержание Ngb выше в структурах с большим филогенетическим возрастом – палеокортексе, стволе мозга, ядре мозжечка, рецепторных и эффекторных нейронах, нейронах вестибулокохлеарного ганглия и мотонейронах спинного мозга (оптическая плотность 459-497 у. е.).

3. Между содержанием АТФ-синтазы и Ngb в нейронах разных отделов мозга крысы имеется положительная корреляция ($r=0,57$; $p<0,01$), что свидетельствует о топографической связи между этими белковыми комплексами. Однако она слабее выражена в структурах неокортекса и неocerebellума ($r=0,29$; $p>0,05$).

4. Перевязка обеих общих сонных артерий приводит к различной скорости и степени повреждения нейронов разных отделов мозга. Оно менее выражено в стволе мозга и сильнее в филогенетически более молодых структурах переднего мозга, где значительно повышается доля сморщенных нейронов и клеток-теней (с 1% до 43% и с 0% до 3,6% соответственно в VI слое ретроспленниальной агранулярной коры; $p<0,05$).

5. Исходное содержание АТФ-синтазы в нейронах мозга крысы положительно коррелирует с числом ишемических гиперхромных нейронов ($r=0,43$; $p=0,04$) и отрицательно коррелирует с количеством клеток-теней ($r=-0,43$; $p=0,04$) в этих же отделах головного через 30 минут после перевязки общих сонных артерий. Следовательно, АТФ-синтаза определяет путь, по которому пойдет ишемическая деструкция нейронов, особенно в конечном мозге, где ее высокий

исходный уровень способствует сморщиванию нейронов ($r=0,63$; $p=0,01$), а низкий – превращению в клетки-тени ($r=-0,91$; $p=0,002$).

Установлен нейропротекторный эффект Ngb при субтотальной ишемии у крыс, который подтверждается отрицательной корреляцией между исходным содержанием Ngb в нейронах мозга и количеством клеток-теней в этих же структурах после 30-минутной ишемии ($r=-0,505$; $p=0,01$), особенно в стволе мозга и мозжечке ($r=-0,66$; $p=0,02$).

6. При ишемии, вызванной перевязкой сонных артерий, наиболее быстрое (через 30 минут) и значительное снижение АТФ-синтазы отмечено в нейронах конечного мозга – нейроны V слоя височной коры (от 315 до 195 у. е.; $p<0,05$), а также в ядрах гипоталамуса – гистаминергические нейроны ядра E2 (от 361 до 253 у. е.; $p<0,05$); наименьшее – в нейронах продолговатого мозга, таких как нейроны верхней области покрышки (от 271 до 267 у. е.; $p>0,05$). При этом более значительное снижение содержания Ngb происходит в филогенетически более старых структурах ствола мозга и при длительной ишемии, например в нейронах латерального ретикулярного ядра (от 291 до 202 у. е.; $p<0,05$) и в гистаминергических нейронах ядра E2 (от 305 до 199 у. е.; $p<0,05$), по сравнению с филогенетически молодой корой конечного мозга (от 165 до 146 у. е.; $p>0,05$ в нейронах III слоя височной коры). Благоприятным условием для нейронов в условиях ишемии является сохранение Ngb при уменьшении содержания АТФ-азы, неблагоприятным – снижение Ngb.

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Полученные научно обоснованные данные могут использоваться при проведении дальнейших исследований роли АТФ-синтазы и нейроглобина в мозге в норме и при патологии, а также при исследовании причин неодинаковой чувствительности нейронов разных структур мозга крысы к ишемическому воздействию.

2. Материалы работы могут быть использованы в учебном процессе для расширения фундаментальных знаний студентов высших учебных заведений медико-биологического профиля о закономерностях распределения белков АТФ-синтазы и нейроглобина в структурах мозга крысы в норме и при церебральной ишемии.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Devenish, R. J. The structure and function of mitochondrial F1F0-ATP synthases / R. J. Devenish, M. Prescott, A. J. Rodgers // *Int Rev Cell Mol Biol.* – 2008. – Vol. 267, № 267. – P.1-58.
2. Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria / I. Watt [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – Vol. 107, № 39. – P. 16823-16827.
3. 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.
4. Structure and conformational states of the bovine mitochondrial ATP synthase by cryo-EM / A. Zhou [et al.] // *Elife.* – 2015. – Vol. 4. – e10180.
5. Structure of ATP synthase from *Paracoccus denitrificans* determined by X-ray crystallography at 4.0 Å resolution / E. Morales-Rios [et al.] // *Proc. Natl. Acad. USA.* – 2015. – Vol. 112, № 43. – P. 13231-13236.
6. Walker, J. E. The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase / J. E. Walker, V. K. Dickson // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1757, № 5-6. – P. 286-296.
7. Scholte, H. R. The biochemical basis of mitochondrial diseases / H. R. Scholte // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 1988. – Vol. 20, № 2. – P. 161-191.
8. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration / A. Federico [et al.] // *J. Neurol. Sci.* – 2012. – Vol. 322, № 1-2. – P. 254-262.
9. Mitochondrial ATP synthase disorders: molecular mechanisms and the quest for curative therapeutic approaches / R. Kucharczyk [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – Vol. 1793, № 1. – P. 186-199.
10. Ahmad, Z. Role of charged residues in the catalytic sites of *Escherichia coli* ATP synthase / Z. Ahmad, F. Okafor, T. F. Laughlin // *J. Amino Acids.* – 2011. – Vol. 2011. – Article ID 606354.
11. 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.

12. Interspecies comparison of neuroglobin, cytoglobin and myoglobin: sequence evolution and candidate regulatory elements / S. Wystub [et al.] // *Cytogenet. Genome Res.* – 2004. – Vol. 105, № 1. – P. 65-78.

13. Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family / T. Hankeln [et al.] // *J. Inorg. Biochem.* – 2005. – Vol. 99, №1. – P. 110-119.

14. Neuroglobin and cytoglobin: genes, proteins and evolution / T. Burmester [et al.] // *IUBMB Life.* – 2004. – Vol. 56, № 11-12. – P. 703-707.

15. Neuroglobin upregulation induced by 17 β -estradiol sequesters cytochrome c in the mitochondria preventing H₂O₂-induced apoptosis of neuroblastoma cells / E. De Marinis [et al.] // *Cell. Death Dis.* – 2013. – V. 4, № 2. – e508.

16. Nienhaus, K. Searching for neuroglobin's role in the brain / K. Nienhaus, G. U. Nienhaus // *IUBMB Life.* – 2007. – Vol. 59, № 8-9. – P. 490-497.

17. Wakasugi, K. Oxidized Human Neuroglobin Acts as a Heterotrimeric G α Protein Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor / K. Wakasugi, T. Nakano, I. Morishima // *Journal of Biological Chemistry.* – 2003. – Vol. 278. – P. 36505–36512.

18. Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury / Y. Sun [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – Vol. 98, № 26. – P. 15306-15311.

19. Neuroglobin over expressing mice: expression pattern and effect on brain ischemic infarct size / Z. Raida [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, № 10. – e76565.

20. Neuroglobin overexpression improves sensorimotor outcomes in a mouse model of traumatic brain injury / J. M. Taylor [et al.] // *Neurosci. Lett.* – 2014. – Vol. 577. – P. 125-129.

21. 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.

22. 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.

23. 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.
24. Neuroglobin, a novel target for endogenous neuroprotection against stroke and neurodegenerative disorders / Z. Yu [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2012. – Vol. 13, № 6. – P. 6995-7014.
25. Mozzaffarian, D. Heart Disease and Stroke Statistics – 2016 Update. A Report From the American Heart Association / D. Mozzaffarian // *Circulation.* – 2015. – V. 133, № 4. – P. 33-360.
26. Гусев, Е. И. Ишемия головного мозга / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова. – М. : Издательство «Медицина», 2001. – 328 с.
27. Schapira, A. H. Mitochondrial disease / A. H. Schapira // *Lancet.* – 2006. – Vol. 368, № 9529. – P. 70-82.
28. Structural Basis for a Unique ATP Synthase Core Complex from *Nanoarchaeum equitans* / S. Mohanty [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2015. – Vol. 290, № 45. – P. 27280-27296.
29. The $\alpha 3\beta 3$ and $\alpha 1\beta 1$ Complexes of ATP Synthase / Y. Kagawa [et al.] // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 1992. – Vol. 671. – P. 366-376.
30. Xu, T. Understanding structure, function, and mutations in the mitochondrial ATP synthase / T. Xu, V. Pagadala, D. M. Mueller // *Microb. Cell.* – 2015. – Vol. 2, № 4. – P. 105-125.
31. A macromolecular repeating unit of mitochondrial structure and function / H. Fernandez-Moran [et al.] // *J. Cell Biol.* – 1964. – Vol. 22, № 1. – P. 63-100.
32. Dimer of mitochondrial ATP synthase induce membrane curvature and self-assemble into rows / T. B. Blum [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2019. – Vol. 116, № 10. – P. 4250-4255.
33. High-resolution structure of the rotor ring of a proton-dependent ATP synthase / D. Pogoryelov [et al.] // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2009. – Vol. 16, № 10. – P. 1068-1073.
34. Jonckheere, A. I. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology / A. I. Jonckheere, J. A. Smeitink, R. J. Rodenburg // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2012. – Vol. 35, № 2. – P. 211-225.
35. Structural evidence for a constant c11 ring stoichiometry in the sodium F-ATP synthase / T. Meier [et al.] // *FEBS J.* – 2005. – Vol. 272, № 21. – P. 5474-5483.

36. Structure of the c14 rotor ring of the proton translocating chloroplast ATP synthase / M. Vollmar [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284, № 27. – P. 18228-18235.

37. Apoptolidin, a selective cytotoxic agent, is an inhibitor of F₀F₁-ATPase / A. R. Salomon [et al.] // *Chem Biol.* – 2001. – Vol. 8, № 1. – P. 71-80.

38. The oligomycin axis of mitochondrial ATP synthase: OSCP and the proton channel / R. J. Devenish [et al.] // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2000. – Vol. 32, № 5. – P. 507-515.

39. Assembly of mitochondrial ATP synthase in cultured human cells: implications for mitochondrial diseases / L. G. Nijtmans [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1995. – Vol. 1272, № 3. – P. 190-198.

40. Capaldi, R. A. Mechanism of the F₁F₀-type ATP synthase, a biological rotary motor / R. A. Capaldi, R. Aggeler // *Trends in Biochemical Sciences.* – 2002. – Vol. 27, № 3. – P. 154-160.

41. Zeviani, M. Mitochondrial disorders / M. Zeviani, S. Di Donato // *Brain.* – 2004. – Vol. 127, № 10. – P. 2153-2172.

42. Boyer, P. D. A model for conformational coupling of membrane potential and proton translocation to ATP synthesis and to active transport / P. D. Boyer // *FEBS Lett.* – 1975. – Vol. 56, № 1. – P. 1-6.

43. Boyer, P. D. The binding change mechanism for ATP synthase – some probabilities and possibilities / P. D. Boyer // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1993. – Vol. 1140, № 3. – P. 215-250.

44. IF₁: setting the pace of the F₁F₀-ATP synthase / M. Campanella [et al.] // *Trends Biochem. Sci.* – 2009. – Vol. 34, № 7. – P. 343-350.

45. Boyer, P. D. The present status of the binding-change mechanism and its relation to ATP formation by chloroplasts / P. D. Boyer, W. E. Kohlbrenner // *Developments in biochemistry.* – 1981. – Vol. 20. – P. 231-240.

46. Mechanically driven ATP synthesis by F₁-ATPase / H. Itoh [et al.] // *Nature.* – 2004. – Vol. 427, № 6973. – P. 465-468.

47. Kinosita K. Jr. F₁-ATPase: a highly efficient rotary ATP machine / K. Kinosita Jr., R. Yasuda, H. Noji // *Essays in Biochemistry.* – 2000. – V. 35 – P. 3-18.

48. Pullman, M. E. A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase / M. E. Pullman, G. C. Monroy // *J Biol Chem.* – 1963. – Vol. 238, № 11. – P. 3762-3769.

49. Recombinant bovine heart mitochondrial F1-ATPase inhibitor protein: overproduction in *Escherichia coli*, purification and structural studies / G. Van Heeke [et al.] // *Biochemistry*. – 1993. – Vol. 32, № 38. – P. 10140-10149.

50. Neuroprotective coordination of cell mitophagy by the F1F0-ATPase inhibitory factor 1 (IF1) / I. Matic [et al.] // *Pharmacol. Res.* – 2016. – Vol. 103. – P. 56-58.

51. Regulation of mitochondrial structure and function by the F1Fo-ATPase inhibitor protein, IF1 / M. Campanella [et al.] // *Cell Metab.* – 2008. – Vol. 8, № 1. – P. 13-25.

52. Neuroprotective effect of a novel ATP-synthase inhibitor bedaquiline in cerebral ischemia-reperfusion injury / D. Umbrasas [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22. – e9717.

53. Nicholls, D. G. The hunt for the molecular mechanism of brown fat thermogenesis / D. G. Nicholls // *Biochimie*. – 2017. – Vol. 134. – P. 9-18.

54. Crichton, P. G. The molecular features of uncoupling protein 1 support a conventional mitochondrial carrier-like mechanism / P. G. Crichton, Y. Lee, E. R. S. Kunji // *Biochimie*. – 2017. – Vol. 134. – P. 35-50.

55. Regulation of the uncoupling protein in brown adipose tissue / K. F. LaNoue [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1986. – Vol. 261, № 1. – P. 298-305.

56. Allen, R. D. Membrane tubulation and proton pumps / R. D. Allen // *Protoplasma*. – 1995. – Vol. 189. – P. 1–8.

57. Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae / K. M. Davies [et al.] // *Biophysics and Computational Biology*. – 2012. – Vol. 109, № 34. – P. 13602-13607.

58. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology / P. Paumard [et al.] // *EMBO J.* – 2002. – Vol. 21, № 3. – P. 221-230.

59. Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria / K. M. Davies [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2011. – Vol. 108, № 34. – P. 14121-14126.

60. Schagger, H. Supercomplexes in the respiratory chain of yeasts and mammalian mitochondria / H. Schagger, K. Pfeiffer // *EMBO J.* – 2000. – Vol. 19, № 8. – P. 1777-1783.

61. Structure of a Complete ATP Synthase Dimer Reveals the Molecular Basis of Inner Mitochondrial Membrane Morphology / A. Hahn [et al.] // *Mol Cell*. – 2016. – Vol. 63, № 3. – P. 445-456.

62. In vivo inhibition of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in neurons promotes metabolic preconditioning / L. Formentini [et al.] // *EMBO J*. – 2014. – Vol. 33, № 7. – P. 762-778.

63. Garcia-Bermudez, J. The ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1): A master regulator of energy metabolism and of cell survival / J. Garcia-Bermudez, J. M. Cuezva // *Biochim Biophys Acta*. – 2016. – Vol. 1857, № 8. – P. 1167-1182.

64. An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F₁F₀ ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore / K. N. Alavian [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2014. – Vol. 111, № 29. – P. 10580-10585.

65. Bernardi, P. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? / P. Bernardi // *Front. Physiol*. – 2013. – Vol. 4. – e95.

66. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore / V. Giorgio [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2013. – Vol. 110, №15. – P. 5887-5892.

67. Guo, H. Structure of ATP synthase under strain during catalysis / H. Guo, J. L. Rubinstein // *Nat. Commun*. – 2022. – Vol. 13, № 1. – e2232.

68. Pinke, G. Cryo-EM structure of the entire mammalian F-type ATP synthase / G. Pinke, L. Zhou, L. A. Sazanov // *Nat. Struct. Mol. Biol*. – 2020. – Vol. 27, № 11. – P. 1077-1085.

69. Purified F-ATP synthase forms a Ca²⁺-dependent high-conductance channel matching the mitochondrial permeability transition pore / A. Urbani [et al.] // *Nat Commun*. – 2019. – Vol. 10, № 1. – e4341.

70. The Mitochondrial Permeability Transition Pore and ATP Synthase / G. Beutner [et al.] // *Handb. Exp. Pharmacol*. – 2017. – Vol. 240. – P. 21-46.

71. Mitochondrial permeability transition pore-dependent necrosis / D. J. Robichaux [et al.] // *J Mol Cell Cardiol*. – 2023. – Vol. 174. – P. 47–55.

72. Rasola, A. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis / A. Rasola, P. Bernardi // *Apoptosis*. – 2007. – Vol. 12, № 5 – P. 815-833.

73. The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology / P. Bernardi [et al.] // *Physiol. Rev.* – 2015. – Vol. 95, №4. P. 1111-1155.

74. Permeability transition in human mitochondria persists in the absence of peripheral stalk subunits of ATP synthase / J. He [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* // 2017. – Vol. 114, № 34. – P. 9086-9091.

75. Persistence of the mitochondrial permeability transition in the absence of subunit c of human ATP synthase / J. He [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2017. – Vol. 114, №13. – P. 3409-3414.

76. Persistence of the permeability transition pore in human mitochondria devoid of an assembled ATP synthase / J. Carroll [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2019. – Vol. 116, № 26. – P. 12816-12821.

77. Ahmad, Z. Medicinal chemistry of ATP synthase: a potential drug target of dietary polyphenols and amphibian antimicrobial peptides / Z. Ahmad, T. F. Laughlin // *Curr. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 17, № 25. – P. 2822-2836.

78. Pathogenic VCP Mutations Induce Mitochondrial Uncoupling and Reduced ATP Levels / F. Bartolome [et al.] // *Neuron.* – 2013. – Vol. 78, № 1. – P. 57-64.

79. Structure, functioning, and assembly of the ATP synthase in cells from patients with the T8993G mitochondrial DNA mutation. Comparison with the enzyme in Rho(0) cells completely lacking mtdna / J. J. Garcia [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275, № 15. – P. 11075-11081.

80. Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane / M. Strauss [et al.] // *EMBO J.* – 2008. – Vol. 27, № 7. – P. 1154-1160.

81. ATP Synthase Diseases of Mitochondrial Genetic Origin / A. Dautant [et al.] // *Front. Physiol.* – 2018. – Vol. 9. – e329.

82. ATP Synthase: A Molecular Therapeutic Drug Target for Antimicrobial and Antitumor Peptides / Z. Ahmad [et al.] // *Curr. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 20, № 15. – P. 1956-1973.

83. Hong, S. ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease and other scientific areas / S. Hong, P. L. Pedersen // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2008. – Vol. 72, № 4. – P. 590-641.

84. ATP Synthase and Mitochondrial Bioenergetics Dysfunction in Alzheimer's Disease / S. Patro [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22. – P. 11185.

85. Magistretti, P. J. A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging / P. J. Magistretti, I. Allaman // *Neuron.* – 2015. – Vol. 86, №4. – P. 883-901.

86. Magistretti, P. J. Cellular mechanisms of brain energy metabolism. Relevance to functional brain imaging and to neurodegenerative disorders / P. J. Magistretti, L. Pellerin // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1996. – Vol. 777, № 1. – P. 380-387.

87. Raichle, M. E. Appraising the brain's energy budget / M. E. Raichle, D. A. Gusnard // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99, № 16. – P. 10237-10239.

88. The role of mitochondria in neurodegenerative diseases / M. Filosto [et al.] // *J. Neurol.* – 2011. – Vol. 258, № 10. – P. 1763-1764.

89. The selfish brain: competition for energy resources / A. Peters [et al.] // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* – 2004. – Vol. 28, № 2. – P. 143-180.

90. 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.

91. Analysis of mitochondrial respiration and ATP synthase in frozen brain tissues / P. J. Yao [et al.] // *Heliyon.* – 2023. – Vol. 22, № 9(3). – e13888.

92. Mitochondrial dysfunction in the hypertensive rat brain: respiratory complexes exhibit assembly defects in hypertension / A. Lopez-Camplastrous [et al.] // *Hypertension.* – 2008. – Vol. 51, № 2. – P. 412-419.

93. Mitochondrial ATP-Synthase in the Entorhinal Cortex is a Target of Oxidative Stress as Stages I/II of Alzheimer's Disease Pathology / B. Terni [et al.] // *Brain Pathology.* – 2010. – Vol. 20, № 1. – P. 222-233.

94. Redox proteomic identification of 4-hydroxy-2-nonenal-modified brain proteins in amnesic mild-cognitive impairment: insight into the role of lipid peroxidation in the progression and pathogenesis

of Alzheimer's disease / T. Reed [et al.] // *Neurobiol. Dis.* – 2008. – Vol. 30, № 1. – P. 107-120.

95. Емельянчик, С. В. Изменения иммунореактивности АТФ-синтазы в нейронах коры мозга и мозжечка крыс при холестазае / С. В. Емельянчик, О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // *Вестник Смоленской государственной медицинской академии.* – 2018. – Т. 17, № 2. – С. 55-60.

96. The human brain hexacoordinated neuroglobin three-dimensional structure / A. Pesce [et al.] // *Micron.* – 2004. – Vol. 35, № 1-2. – P. 63-65.

97. Reactivity studies if the Fe(III) and Fe(II)NO forms of human neuroglobin reveal a potential role against oxidative stress / S. Herold [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, № 22. – P. 22841-22847.

98. Species-specific functional evolution of neuroglobin / K. Wakasugi [et al.] // *Mar. Genomics.* – 2011. – Vol. 4, №3. – P. 137-142.

99. A vertebrate globin expressed in the brain / T. Burmester [et al.] // *Nature.* – 2000. – V. 407, № 6803. – P. 520-523.

100. 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.

101. Xie, L. K. Brain globins in physiology and pathology / L. K. Xie, S. H. Yang // *Med Gas Res.* – 2016 – Vol. 6, № 3. – P.154-163.

102. The redox state of the cell regulates the ligand binding affinity of human neuroglobin and cytoglobin / D. Hamdane [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, № 51. – P. 51713-51721.

103. Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family / S. Dewilde [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, № 42. – P. 38949-38955.

104. Ligand binding and protein dynamics in neuroglobin / J. M. Kriegl [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99, № 12. – P. 7992-7997.

105. Residues in the distal heme pocket of neuroglobin. Implications for the multiple ligand binding steps / T. Uno [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, № 7. – P. 5886-5893.

106. The heme environment of mouse neuroglobin. Evidence for the presence of two conformations of the heme pocket / M. Couture [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, № 39. – P. 36377-36382.

107. The X-ray crystal structure of human A15C neuroglobin reveals both native/de novo disulfide bonds and unexpected ligand-binding sites / S.Q. Gao [et al.] // *Proteins*. – 2022. – Vol. 90, № 5. – P. 1152-1158.

108. 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.

109. Neuroglobin, a Factor Playing for Nerve Cell Survival / D. Guidolin [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – Vol. 17, №11. – e1817.

110. Effect of aging on neuroglobin expression in rodent brain / Y. Sun [et al.] // *Neurobiol. Aging*. – 2005. – Vol. 26, № 2. – P. 275-278.

111. Neuroglobin Facilitates Neuronal Oxygenation through Tropic Migration under Hypoxia or Anemia in Rat: How Does the Brain Breathe? / C. Y. Li [et al.] // *Neurosci Bull.* – 2023. – V. 39, № 10. – P. 1481-1496.

112. Neuroglobin expression models as a tool to study its function / E. Luyckx [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2019. – Vol. 2019. – e5728129.

113. Naturally Occurring I81N Mutation in Human Cytochrome *c* Regulates Both Inherent Peroxidase Activity and Interactions with Neuroglobin / Y. Feng [et al.] // *ACS Omega*. – 2022. – Vol. 7, № 13. – P. 11510-11518.

114. Molecular Interactions between Neuroglobin and Cytochrome *c*: Possible Mechanisms of Antiapoptotic Defense in Neuronal Cells / M.A. Semenova [et al.] // *Biomolecules*. – 2023. – Vol. 13. – e1233.

115. A globin in the nucleus! / E. Geuens [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, № 33. – P. 30417-30420.

116. Neuroglobin involvement in visual pathways through the optic nerve / C. Lechaue [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013 – Vol. 1834, № 9. – P. 1772-1778.

117. Neuroglobin and cytoglobin distribution in the anterior eye segment: a comparative immunohistochemical study / J. Ostojic [et al.] // *J. Histochem. Cytochem.* – 2008. – Vol. 56, № 9. – P. 863-872.

118. Neuroglobin immunoreactivity in the human cochlea / N. Vorasubin [et al.] // *Brain. Res.* – 2016. – Vol. 1630. – P. 56-63.

119. Identification of a novel distal regulatory element of the human Neuroglobin gene by the chromosome conformation capture

approach / K.T. Tam [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2017 – Vol. 45, № 1. – P. 115-126.

120. Localization of neuroglobin protein in the mouse brain / S. Wystub [et al.] // *Neurosci. Lett.* – 2003. – Vol. 346, № 1-2. – P. 114-116.

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

122. Neuroglobin, a novel member of the globin family, is expressed in focal regions of the brain / P. P. A. Mammen [et al.] // *J. Histochem. Cytochem.* – 2002. – Vol. 50, № 12. – P. 1591-1598.

123. 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.

124. Гилерович Е. Г. Распределение нейроглобина в коре мозжечка человека (иммуногистохимическое исследование) / Е. Г. Гилерович, И. П. Григорьев, О. В. Кирик, О. С. Алексеева, Е. Г. Сухорукова, Д. Э. Коржевский // *Морфология.* – 2014. – Т. 146, № 4. – С. 75-77.

125. Алексеева, О. С. Кислородсвязывающий белок нейроглобин в нервной системе млекопитающих (локализация и предположительные функции) / О. С. Алексеева, И. П. Григорьев, Д. Э. Коржевский // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии.* – 2017. – Вып. 53, № 4. – С. 221-229.

126. Presence of neuroglobin in cultured astrocytes / X. Chen [et al.] // *Glia.* – 2005. – Vol. 50, № 2. – P. 182-186.

127. In vivo expression of neuroglobin in reactive astrocytes during neuropathology in murine models of traumatic brain injury, cerebral malaria, and autoimmune encephalitis / B. DellaValle [et al.] // *Glia.* – 2010. – Vol. 58, № 10. – P. 1220-1227.

128. Long-term neuroglobin expression of human astrocytes following brain trauma / X. Chen [et al.] // *Neuroscience Letters.* – 2015. – Vol. 606. – P. 194-199.

129. Emara, M. Hypoxic regulation of cytoglobin and neuroglobin expression in human normal and tumor tissues / M. Emara, N. Salloum, J. Allalunis-Turner // *Cancer Cell International.* – 2014. – Vol. 10. – 33.

130. Neuroglobin expression in ischemic stroke / K. Jin [et al.] // *Stroke.* – 2010. – Vol. 41, № 3. – P. 557-559.

131. Acute hypoxia modifies regulation of neuroglobin in the neonatal mouse brain / N. Hummler [et al.] // *Experimental Neurology*. – 2012. – Vol. 236. – P. 112-121.

132. Human carotid body HIF and NGB expression during human development and aging / C. Di Giulio [et al.] // *Advanced Experimental Medical Biology*. – 2012. – Vol. 758. – P. 265-271.

133. Distribution of Neuroglobin in Pericytes is Associated with Blood-Brain Barrier Leakage against Cerebral Ischemia in Mice / Y. Kim // *Exp Neurobiol*. – 2022. – Vol. 31, № 5. – P. 289-298.

134. Distribution of Neuroglobin in Pericytes is Associated with Blood-Brain Barrier Leakage against Cerebral Ischemia in Mice / Y. Kim // *Exp Neurobiol*. – 2022. – Vol. 31, №5. – P. 289-298.

135. Neuroglobin is up-regulated in the cerebellum of pups exposed to maternal epileptic seizures / D. C. Lima [et al.] // *International Journal of Developmental Neuroscience*. – 2011. – Vol. 29, № 8. – P. 891-897.

136. Neuroglobin involvement in respiratory chain function and retinal ganglion cell integrity / C. Lechauve [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2012. – Vol. 1823, № 12. – P. 2261-2273.

137. A rare natural lipid induces neuroglobin expression to prevent amyloid oligomers toxicity and retinal neurodegeneration / H. P. Oamen [et al.] // *Aging Cell*. 2022. – Vol. 21, № 7. – e13645.

138. Barreto, G. E. Role of Neuroglobin in the Neuroprotective Actions of Estradiol and Estrogenic Compounds / G. E. Barreto, A. J. McGovern, L. M. Garcia-Segura // *Cells*. – 2021. – Vol. 10, № 8. – e1907.

139. Neuroglobin deficiency increases seizure susceptibility but does not affect basal behavior in mice / C.R. Gøtzsche [et al.] // *Journal of Neuroscience Research*. – 2022. – Vol. 100. – P. 1921–1932.

140. Neuroglobin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by suppressing mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress-mediated neuronal apoptosis through synaptotagmin-1 / L. Zhang [et al.] // *Environ Toxicol*. – 2023. – Vol. 38, № 8. – P. 1891-1904.

141. Neuroglobin overexpression inhibits AMPK signaling and promotes cell anabolism / B. Cai [et al.] // *Molecular Neurobiology*. – 2016. – Vol. 53, № 2. – P. 1254-1265.

142. Neuroglobin deficiency increases seizure susceptibility but does not affect basal behavior in mice / C.R. Gøtzsche [et al.] // *Journal of Neuroscience Research*. – 2022. – Vol. 100. – P. 1921–1932.

143. Neuroglobin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by suppressing mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress-mediated neuronal apoptosis through synaptotagmin-1 / L. Zhang [et al.] // *Environ Toxicol*. – 2023. – Vol. 38, № 8. – P. 1891-1904.

144. Sleep Recovery Restored Neuroglobin Immunoreactivity in Rat LDTg-PPTg Nuclei / M. Melgarejo-Gutiérrez [et al.] // *Sleep Disord*. – 2020. – Vol. 2020. – e8353854.

145. Neuroglobin of seals and whales: evidence for a divergent role in the diving brain / M. Schneuer [et al.] // *Neuroscience*. – 2012. – Vol. 606. – P. 194-199.

146. Effects of neuroglobin overexpression on acute brain injury and long-term outcomes after focal cerebral ischemia / X. Wang [et al.] // *Stroke*. – 2008. – Vol. 39, № 6. – P. 1869-1874.

147. Neuroglobin-deficiency exacerbates Hif1A and c-FOS response, but does not affect neuronal survival during severe hypoxia in vivo / C. A. Hundahl [et al.] // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6, № 12. – e28160.

148. Reduced infarct size in neuroglobin-null mice after experimental stroke in vivo / Z. Raida [et al.] // *Exp. Transl. Stroke. Med*. – 2012. – Vol. 4, № 1. – e15.

149. 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.

150. Григорьев, И. П. Распределение нейроглобина в структурах переднего мозга крыс после транзиторной ишемии / И. П. Григорьев, Е. Г. Гилерович, О. В. Кирик, Т. Д. Власов, Д. Э. Коржевский // *Асимметрия*. – 2013. – Т.7, № 1. – С. 15-21.

151. Zhu, Y. Hemin induces neuroglobin expression in neural cells / Y. Zhu [et al.] // *Blood*. – 2002. – Vol. 100, № 7. – P. 2494-2498.

152. A rare natural lipid induces neuroglobin expression to prevent amyloid oligomers toxicity and retinal neurodegeneration / H.P. Oamen [et al.] // *Aging Cell*. – 2022. – Vol. 21, № 7. – e13645.

153. Hemin offers neuroprotection through inducing exogenous neuroglobin in focal cerebral hypoxic-ischemia in rats / X. Song [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2014. – Vol. 7, № 5. – P. 2163-2171.

154. Xie, F. Joint protective effect of exogenous neuroglobin and hemin in rat focal ischemic brain tissues / F. Xie [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2014. – Vol. 7, № 8. – P. 2009-2016.

155. Neuroglobin mediates neuroprotection of hypoxic post-conditioning against transient global cerebral ischemia in rats through preserving the activity of Na⁺/K⁺ ATPases / H. Wen [et al.] // *Cell Death. Dis.* – 2018. – Vol. 9, № 6. – e635.

156. A rare natural lipid induces neuroglobin expression to prevent amyloid oligomers toxicity and retinal neurodegeneration / H. P. Oamen [et al.] // *Aging Cell.* – 2022. – Vol. 21, № 7. – e13645.

157. Conley, K. E. Deciphering the mysteries of myoglobin in striated muscle / K. E. Conley, G. A. Ordway, R. S. Richardson // *Acta. Physiol. Scand.* – 2000. – Vol. 168, № 4. – P. 623-634.

158. 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.

159. Oxygen binding properties of non-mammalian nerve globins / C. Hundahl [et al.] // *FEBS J.* – 2006. – Vol. 273, № 6. – P. 1323-1329.

160. Intracellular delivery of Neuroglobin using HIV-1 TAT protein transduction domain fails to protect against oxygen and glucose deprivation / D. Peroni [et al.] // *Neurosci. Lett.* – 2007. – V. 421. – P. 110–114.

161. Translocation and neuroprotective properties of transactivator-of-transcription protein-transduction domain–neuroglobin fusion protein in primary cultured cortical neurons / G.Y. Zhou [et al.] // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 2008. – V. 49. – P. 25–33.

162. New Strategies for Stroke Therapy: Nanoencapsulated Neuroglobin / S. Blanco [et al.] // *Pharmaceutics.* – 2022. – V. 14. – e1737.

163. Trent J. T. 3rd. Human neuroglobin, a hexacoordinate hemoglobin that reversibly binds oxygen / J. T. 3rd Trent, R. A. Watts., M. S. Hargrove // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, № 32. – P. 30106-30110.

164. Neuroglobin plays as tumor suppressor by disrupting the stability of GPR35 in colorectal cancer / Q. Xiang [et al.] // *Clin Epigenetics.* – 2023. – Vol. 15, № 1. – e57.

165. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and Council of the European Union of 22 Sept 2010 on animal protection, used in the scientific purposes. – <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/2019-06-26>.

166. Каркищенко, Н. Н. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях / Н. Н. Каркищенко, С. В. Грачев. – М. : Профиль-2С, 2010. – 358 с.

167. Узлова, Е. В. Распределение АТФ-синтазы в структурах мозга крысы / Е.В. Узлова, С.М. Зиматкин // Вестник Смоленской гос. мед. акад. – 2020. – Т.19, №3. – С. 11-16.

168. Узлова Е. В. АТФ-синтаза в нейронах мозга крысы / Е. В. Узлова, С. М. Зиматкин // Экспериментальная биология и биотехнология. – 2021. – №3. – С. 17-27.

169. Yamaguchi, K. Rhythmic discharge of mitral cells in the carp olfactory bulb / K. Yamaguchi, K. Ueda // Brain Res. – 1984. – Vol. 322, №2. – P. 378-381.

170. Bayer, S. A. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life / S. A. Bayer, J. W. Yackel, P. S. Puri // Science. – 1982. – Vol. 216, №4548. – P. 890-892.

171. Neurons within the trigeminal mesencephalic nucleus encode for the kinematic parameters of the whisker pad macrovibrissae / O. Mamei [et al.] // Physiological Reports. – 2017. – V. 5, № 10. – e13206.

172. Baker, R. Electrotonic coupling between neurones in the rat mesencephalic nucleus / R. Baker, R. Llinás // The Journal of Physiology. – 1971. – V. 212, № 1. – P. 45-63.

173. Carricondo, F. The Cochlear Spiral Ganglion Neurons: The Auditory Portion of the VIII Nerve / F. Carricondo, B. Romero-Gómez // The Anatomical Record. – 2019. – V. 302, № 3. – P. 463-471.

174. Узлова, Е. В. Распределение нейроглобина в структурах мозга крысы / Е. В. Узлова, С. М. Зиматкин // Новости мед.-биол. наук. – 2019. – Т.19, № 4. – С. 43-47.

175. Узлова, Е. В. Нейроглобин в нейронах мозга крысы / Е.В. Узлова, С.М. Зиматкин // Сибирский науч. мед. журн. – 2021. – Т. 41, № 4. – С. 30-39.

176. Critical re-evaluation of neuroglobin expression reveals conserved patterns among mammals / A. Fabrizius [et al.] // Neuroscience. – 2016. – Vol. 337. – P. 339-354.

177. Узлова Е. В. Ко-локализация АТФ-синтазы и нейроглобина в нейронах мозга крысы / Е. В. Узлова, С. М. Зиматкин // Журн. Гродн. гос. мед. ун-та. – 2022. – Т. 20, № 4. – С. 433-439.

178. Neuroglobin Protection in Retinal Ischemia / A. S. Y. Chan [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2012. – V. 53, № 2. – P. 704-711.

179. Prevalence, incidence, and mortality of stroke in China: results from a nationwide population-based survey of 480 687 adults / W. Wang [et al.] // Circulation 2017. – V. 135. – P. 759-771.

180. Norrving, B. The global burden of stroke and need for a continuum of care / B. Norrving, B. Kissela // Neurology. – 2013. – V. 80. – P. 5-12.

181. Barthels, D. Current advances in ischemic stroke research and therapies / D. Barthels, H. Das // Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. – 2020. – V. 1866(4). – e165260.

182. Патологическая физиология нервной системы: учебное пособие / А. В. Дергунов [и др.]; под ред. О. В. Леонтьева. – СПб : СпецЛит, 2019. – 94 с.

183. Neuroprotective effect of human placental extract on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats / J. Y. Park [et. al.] // Brain Dev. – 2013. – V. 35, № 1. – P. 68-74.

184. Multiplex immunoassay characterization and species comparison of inflammation in acute and non-acute ischemic infarcts in human and mouse brain tissue / T. V. Nguyen [et al.] // Acta Neuropathol Commun. – 2016. – Vol. 4, № 1. – P. 100.

185. Clinical and morphological correlations in acute ischemic stroke / A.M. Slujitoru [et al.] // Rom J Morphol Embryol. – 2012. – Vol. 53, № 4. – P. 917-926.

186. Kirino, T. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia / T. Kirino, K. Sano // Acta neuropathological. – 1984. – V. 62, № 3. – P. 201-208.

187. Kuroiwa, T. Prevention of postischemic hyperthermia prevents ischemic injury of CA1 neurons in gerbils / T. Kuroiwa, P. Bonnekoh, K.-A. Hossmann // Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 1990. – V. 10. – P. 550-556.

188. Survival of parvalbumin-immunoreactive neurons in the gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia does not depend on HSP-70 protein induction / I. Ferrer [et al.] // Brain Research. – 1995. – V. 692. – P. 41-46.

189. 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. – V. 20, № 1 – P. 51-57.

190. Challenges and Improvements of Developing an Ischemia Mouse Model Through Bilateral Common Carotid Artery Occlusion / L. C. León-Moreno [et al.] // J. Stroke Cerebrovasc. Dis. – 2020. – Vol. 29, № 5. – e104773.

191. Иммуногистохимическое исследование головного мозга / Д. Э. Коржевский [и др.]; под ред. Д. Э. Коржевского. – СПб. : СпецЛит, 2016. – 143 с.

192. Paxinos, G. The rat brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, C. Watson. – 6th ed. – London : Acad. Press, 2007. – 448 p.

193. Жаботинский, Ю. М. Нормальная и патологическая морфология нейрона / Ю. М. Жаботинский. – Ленинград : Издательство «Медицина», 1965. – 323 с.

194. Калимуллина, Л. Б. К вопросу о «темных» и «светлых» клетках / Л. Б. Калимуллина // Морфология. – 2002. – № 4. – С. 75-80.

195. Victorov, I. V. Improved selective, simple, and contrast staining of acidophilic neurons with vanadium acid fuchsin / I. V. Victorov, K. Prass, U. Dirnagl // Brain Res. Protoc. – 2000. – Vol. 5, № 2. – P. 135-139.

196. Узлова, Е. В. Изменения хроматофилии цитоплазмы, содержания АТФ-синтазы и нейроглобина в нейронах разных отделов мозга крысы при субтотальной церебральной ишемии / Е. В. Узлова, С. М. Зиматкин // Новости мед.-биол. наук. – 2022. – Т. 22, № 3. – С. 219-226.

197. Uzlova, L.V. ATP Synthase and Neuroglobin as Factors Determining the Path of Neuronal Destruction in Cerebral Ischemia / L.V. Uzlova, S.M. Zimatkin, L.I. Bon // Biomedical Journal of Scientific & Technical Research. – 2022. – V. 46, № 3. – P. 37521-37533.

198. Horn, M. Delayed neuronal death and delayed neuronal recovery in the human brain following global ischemia / M. Horn, W. Schlote // Acta Neuropathol. – 1992. – Vol. 85, № 1. – P. 79-87.

199. Brisson, C. D. A neuronal population in hypothalamus that dramatically resists acute ischemic injury compared to neocortex

/ C. D. Brisson, R. D. Andrew // Journal of Neurophysiology. – 2012. – V. 108, №2. – P. 419-430.

200. Fonnum, F. Cerebellum as a target for toxic substances / F. Fonnum, E. A. Lock // Toxicology Letters. – 2000. – V. 112-113. – P. 9-16.

201. The AMPA antagonist NBQX provides partial protection of rat cerebellar Purkinje cells after cardiac arrest and resuscitation / J. Brasko [et al.] // Brain Research. – 1995. – V. 699. – P. 133-138.

202. Yoshida, S. Different sensitivity to hypoxia in neuronal activities of lateral vestibular and spinal trigeminal nuclei / S. Yoshida, M. Sasa, S. Takaori // Stroke. – 1988. – Vol. 19, №3. – P. 357-364.

203. Effect of lidocaine on contracture, intracellular sodium, and pH in ischemic rat hearts / N. B. Butwell [et al.] // Am. J. Physiol. – 1993. – Vol. 264, №6, pt. 2. – P. 1884-1889.

204. Intracellular sodium accumulation during ischemia as the substrate for reperfusion injury / K. Imahashi [et al.] // Circ. Res. – 1999 – Vol. 84, №12. – P. 1401-1406.

205. Pike, M. M. ²³Na-NMR measurements of intracellular sodium in intact perfused ferret hearts during ischemia and reperfusion / M. M. Pike, M. Kitakaze, E. Marban // Am. J. Physiol. – 1990. – Vol. 259, №6, pt. 2. – P. 1767-1773.

206. Sodium channel blockade reduces hypoxic sodium loading and sodium-dependent calcium loading / M. C. Haigney [et al.] // Circulation. – 1994. – Vol. 90, №1. – P. 391-399.

207. Mitochondrial damage during ischemia determines post-ischemic contractile dysfunction in perfused rat heart / T. Iwai [et al.] // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2002. – Vol. 34, № 7. – P. 725-738.

208. Rapid Na⁺ accumulation by a sustained action potential impairs mitochondria function and induces apoptosis in HEK293 cells expressing non-inactivating Na⁺ channels / K. Kawasaki [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2019. – Vol. 513, № 1. – P. 269-274.

209. Neuroglobin expression and oxidant/antioxidant balance after graded traumatic brain injury in the rat / V. Di Pietro [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2014. – Vol. 69. – P. 258-264.

210. Узлова, Е. В. Изменения содержания АТФ-синтазы в нейронах мозга при экспериментальной церебральной ишемии

/ Е. В. Узлова, С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2023. – Т. 12. – № 1. – С. 68-76.

211. Бонь, Е. И. Гистологические изменения в париетальной коре и гиппокампе мозга крыс после субтотальной церебральной ишемии / Е. И. Бонь, Н. Е. Максимович, С. М. Зиматкин // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2018. – Т. 16, № 4. – С. 419-423.

212. Бонь, Е. И. Морфологические нарушения нейронов теменной коры и гиппокампа крыс в динамике субтотальной церебральной ишемии / Е. И. Бонь, Н. Е. Максимович, С. М. Зиматкин, Н. А. Валько // Оренбургский медицинский вестник. – 2019. – Т. 2, № 26. – С. 36-41.

213. 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.

214. Dynamics of cerebral tissue injury and perfusion after temporary hypoxia-ischemia in the rat: evidence for region-specific sensitivity and delayed damage / R. M. Dijkhuizen [et al.] // Stroke. – 1998. – Vol. 29, № 3. – P. 695-704.

215. Emphasized selective vulnerability after repeated nonlethal cerebral ischemic insults in rats / T. Inoue et al. // Stroke. – 1992. – Vol. 23, № 5. – P. 739-745.

216. Кузнецова, В. Б. Особенности ультраструктуры нейронов гистаминергического ядра E2 гипоталамуса крысы после субтотальной тридцатиминутной ишемии головного мозга и реперфузии / В. Б. Кузнецова, Е. И. Криштофик, О. О. Козляковская // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2015. – № 1 – С. 44-48.

217. Cell type-specific gene expression of midbrain dopaminergic neurons reveals molecules involved in their vulnerability and protection / C. Y. Chung [et al.] // Hum. Mol. Genet. – 2005. – Vol. 14, № 13. – P. 1709-1725.

218. Mitochondria mass is low in mouse substantia nigra dopamine neurons: implications for Parkinson's disease / C. L. Liang [et al.] // Exp. Neurol. – 2007. – Vol. 203, № 2. – P. 370-380.

219. Узлова, Е. В. Содержание нейроглобина в структурах головного мозга крысы при субтотальной ишемии / Е. В. Узлова,

С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь // Ученые записки Казанского университета. Сер. Естественные науки. – 2023. – Т. 165. – № 2. – С. 204-215.

220. Increased neuroglobin levels in the cerebral cortex and serum after ischemia-reperfusion insults / A. Shang [et al.] // Brain Res. – 2006. – Vol. 1078, № 1. – P. 219-226.

221. Differential vulnerability of immature murine neurons to oxygen-glucose deprivation / X. Jiang [et al.] // Exp. Neurol. – 2004. – Vol. 190, № 1. – P. 224-232.

222. Changes in the Content of Neuroglobin in the Neurons of the Cerebral Cortex of Rats with Ischemia / L. I. Bon [et al.] // J. Cytol. & Histol. Res. – 2022. – V. 1, № 1. – P. 1-5.

223. Gerle, C. On the structural possibility of pore-forming mitochondrial FoF1 ATP synthase / C. Gerle // Biochim Biophys Acta. – 2016. – Vol. 1857, № 8. – P. 1191-1196.

224. Mnatsakanyan, N. The new role of F₁F₀ ATP synthase in mitochondria-mediated neurodegeneration and neuroprotection / N. Mnatsakanyan, E. A. Jonas // Exp Neurol. – 2020 – Vol. 332. – e113400.

225. Yu, Z. Mitochondrial mechanisms of neuroglobin's neuroprotection / Z. Yu, J. L. Poppe, X. Wang // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2013. – e756989.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблицы

Таблица П.1 – Содержание АТФ-синтазы и нейроглобина в нейронах структур мозга крысы (в единицах оптической плотности $\times 10^3$)

Название структур	АТФ-синтаза (Me (LQ; HQ))	Ngb (Me (LQ; HQ))	АТФ- синтаза/Ngb
Конечный мозг			
Митральные клетки обонятельной луковицы	163,3 (117,7; 225,0)	164,1 (137,1; 201,1)	1,0
Латеральная передняя обонятельная кора, II слой	287,4 (266,6; 318,2)	280,8 (251,6; 321,8)	1,0
Пириформная кора, II слой	313,2 (274,4; 364,8)	215,0 (229,2; 291,5)	1,5
Гиппокамп, II слой			
CA1 поле	255,8 (223,0; 272,2)	196,0 (167,7; 245,4)	1,3
CA2 поле	314,8 (247,8; 385,3)	275,9 (235,9; 311,0)	1,1
CA3 поле	344,4 (280,3; 390,3)	223,0 (151,5; 307,8)	1,5
Пресубикулум			
II	323,2 (293,3; 367,2)	201,9 (176,5; 229,2)	1,6
III	324,2 (291,6; 344,3)	208,9 (190,3; 227,3)	1,6
IV	334,0 (240,1; 427,0)	207,1 (175,0; 227,8)	1,6
V	344,0 (312,7; 380,3)	209,0 (183,8; 226,8)	1,7
VI	341,0 (300,8; 394,3)	217,8 (193,7; 245,5)	1,6
Зубчатая извилина, II слой	309,3 (226,6; 374,7)	184,5 (141,5; 248,3)	1,7
Скорлупа	271,8 (241,9; 302,0)	215,5 (198,2; 250,5)	1,3

Продолжение таблицы П.1

Название структур	АТФ-синтаза (Me (LQ; HQ))	Ngb (Me (LQ; HQ))	АТФ- синтаза/Ngb
Париетальная кора			
II	209,3 (170,5; 234,4)	176,6 (141,2; 208,3)	1,2
III	238,5 (196,2; 293,7)	190,9 (150,1; 200,1)	1,3
V	295,5 (267,7; 336,2)	272,6 (219,3; 317,0)	1,1
VI	297,4 (256,0; 309,2)	208,8 (146,9; 301,2)	1,4
Поясная (цингулярная) кора			
II	255,4 (200,7; 317,1)	154,0 (134,1; 174,9)	1,7
III	297,2 (255,3; 350,1)	178,6 (144,2; 199,1)	1,7
V	373,3 (348,0; 419,6)	224,5 (181,7; 285,9)	1,7
VI	344,2 (311,0; 392,4)	198,8 (174,6; 222,6)	1,7
Фронтальная кора			
II	245,2 (193,4; 289,3)	173,8 (159,5; 207,9)	1,4
III	248,1 (209,4; 276,2)	169,7 (142,4; 190,8)	1,5
IV	245,0 (213,0; 290,6)	190,6 (165,2; 223,8)	1,3
V	331,1 (255,8; 373,9)	235,0 (202,5; 286,3)	1,4
VI	287,0 (246,5; 335,1)	258,2 (228,3; 308,2)	1,1
Височная (энторинальная) кора			
II	267,0 (204,4; 317,4)	150,9 (115,0; 184,7)	1,8
III	309,2 (269,5; 330,0)	150,4 (121,8; 177,5)	2,1
IV	310,3 (262,1; 365,6)	157,2 (134,1; 176,2)	2,0

Продолжение таблицы П.1

Название структур	АТФ-синтаза (Ме (LQ; HQ))	Ngb (Ме (LQ; HQ))	АТФ- синтаза/Ngb
V	339,5 (286,5; 380,1)	168,4 (145,1; 184,9)	2,0
VI	360,4 (262,1; 411,6)	150,0 (112,2; 206,9)	2,4
Затылочная (зрительная кора)			
II	249,6 (208,1; 339,1)	209,1 (172,7; 234,9)	1,2
III	295,0 (269,5; 323,3)	205,2 (169,5; 221,7)	1,4
IV	299,4 (258,5; 358,0)	186,0 (148,1; 238,9)	1,6
V	363,2 (301,1; 411,0)	203,5 (142,5; 242,1)	1,8
VI	326,3 (277,1; 413,7)	232,6 (205,8; 283,6)	1,4
Ретроспленальная (агранулярная кора)			
II	275,5 (264,4; 312,8)	217,0 (199,2; 243,2)	1,3
III	333,2 (274,1; 389,7)	220,0 (180,0; 247,5)	1,5
V	295,5 (257,0; 340,6)	257,0 (199,4; 345,3)	1,2
VI	300,2 (255,6; 352,8)	263,8 (232,8; 309,4)	1,1
Моторная кора			
II	199,5 (166,3; 208,5)	140,2 (127,5; 158,1)	1,4
III	179,7 (165,1; 241,6)	193,8 (179,1; 217,3)	0,9
V	200,4 (184,3; 220,2)	218,2 (251,3; 222,6)	0,9
VI	200,0 (192,2; 245,5)	191,1 (160,0; 219,9)	1,1
Медиальное ядро миндалины	158,7 (151,0; 176,4)	196,8 (183,0; 227,5)	0,8
Базомедиальное ядро миндалины	193,0 (175,9; 226,4)	182,9 (146,2; 219,4)	1,1

Продолжение таблицы П.1

Название структур	АТФ-синтаза (Ме (LQ; HQ))	Ngb (Ме (LQ; HQ))	АТФ- синтаза/Ngb
Базолатеральное ядро миндалины	176,1 (155,2; 248,4)	185,8 (158,2; 237,7)	1,0
Латеральное ядро миндалины	216,9 (190,4; 258,6)	239,9 (217,4; 297,6)	0,9
Промежуточный мозг			
<i>Таламус</i>			
Паравентрикулярное ядро таламуса	321,8 (272,2; 371,4)	333,9 (256,8; 396,8)	1,0
Медиальное габенулярное ядро	334,4 (313,7; 359,1)	280,9 (245,7; 343,6)	1,2
Латеральное постераль- ное таламическое ядро	320,5 (286,0; 373,5)	280,7 (254,3; 315,6)	1,1
Латеродорсальное вентролатеральное ядро таламуса	307,9 (250,3; 376,9)	320,9 (272,1; 390,0)	1,0
Вентральное постеро- медиальное таламиче- ское ядро	285,9 (250,3; 324,9)	252,5 (219,0; 320,9)	1,1
Вентральное постерола- теральное таламическое ядро	278,9 (256,5; 334,8)	242,2 (222,3; 305,1)	1,2
Ядра задней группы таламуса	255,9 (216,9; 294,2)	242,3 (207,9; 311,6)	1,1
Интермедидорсальное ядро	249,9 (227,3; 278,6)	278,7 (239,1; 308,6)	0,9
Центральное медиаль- ное ядро	348,8 (316,1; 401,0)	279,9 (253,8; 298,3)	1,3
<i>Гипоталамус</i>			
Дугообразное ядро	387,8 (357,3; 414,7)	257,8 (240,2; 286,6)	1,5
Вентромедиальное ядро, вентролатеральное	289,3 (265,1; 310,4)	214,4 (186,6; 235,0)	1,1
Дорсомедиальное ядро	250,6 (221,4; 323,8)	253,4 (229,2; 267,2)	1,0
Вентромедиальное ядро, дорсомедиальное	291,9 (215,7; 350,9)	210,8 (162,9; 253,5)	1,4
Медианное маммиляр- ное ядро	384,2 (351,9; 411,9)	228,4 (194,4; 257,5)	1,7

Продолжение таблицы П.1

Название структур	АТФ-синтаза (Ме (LQ; HQ))	Ngb (Ме (LQ; HQ))	АТФ- синтаза/Ngb
Супрамаммилярное ядро	380,4 (349,9; 432,9)	299,5 (257,5; 341,3)	1,3
Латеральная гипоталамическая область	199,8 (163,7; 237,7)	174,4 (154,1; 197,2)	1,2
Гистаминергическое ядро E2	433,3 (411,5; 476,1)	342,4 (311,1; 408,1)	1,3
Средний мозг			
Компактное вещество черной субстанции	371,4 (324,7; 402,7)	240,1 (202,0; 244,3)	1,6
Ретикулярное вещество черной субстанции	413,0 (370,7; 444,7)	209,0 (173,0; 239,9)	2,0
Верхняя область покрышки	282,9 (242,2; 311,0)	217,0 (192,9; 242,9)	1,3
Интерпедункулярное ядро	345,3 (274,5; 435,7)	304,6 (206,2; 362,0)	1,1
Красное ядро	352,8 (312,6; 391,5)	233,7 (195,0; 265,2)	1,5
Дорсальное ядро шва	300,6 (239,2; 377,7)	305,0 (255,3; 243,9)	1,0
Мезенцефалическое ядро тройничного нерва	379,5 (328,7; 423,1)	293,2 (262,3; 361,3)	1,3
Мозжечок			
Околокочочок: клетки Пуркинье	344,5 (304,1; 393,7)	207,8 (177,4; 262,4)	1,7
Парамедианная долька: клетки Пуркинье	255,7 (211,7; 289,9)	219,1 (194,1; 244,1)	1,7
Пирамида: клетки Пуркинье	364,2 (333,5; 389,6)	246,7 (224,3; 264,9)	1,5
Простая долька: клетки Пуркинье	262,3 (229,2; 283,5)	162,7 (109,7; 215,2)	1,6
Медиальное ядро	312,8 (283,1; 356,5)	252,6 (224,8; 277,2)	1,2
Медиальное ядро, дорсолатеральное	388,7 (345,5; 412,5)	268,2 (251,2; 294,4)	1,5
Латеральное ядро	365,5 (329,0; 416,6)	256,2 (225,7; 305,8)	1,4
Промежуточное ядро	349,6 (319,8; 402,4)	326,3 (270,3; 379,0)	1,1

Продолжение таблицы П.1

Название структур	АТФ-синтаза (Ме (LQ; HQ))	Ngb (Ме (LQ; HQ))	АТФ- синтаза/Ngb
Продолговатый мозг			
Гигантоцеллюлярное ядро	364,6 (318,1; 458,0)	282,4 (260,1; 328,9)	1,3
Ядро лицевого нерва	362,1 (320,3; 388,2)	363,1 (312,9; 446,2)	1,0
Ядро подъязычного нерва	172,0 (157,5; 207,2)	238,8 (200,6; 278,1)	0,7
Ядро блуждающего нерва	422,6 (356,6; 460,1)	267,5 (203,9; 319,0)	1,6
Ядро Голля (ядро тонкого пучка)	409,7 (389,3; 420,2)	244,6 (209,1; 268,9)	1,7
Ядро Бурдаха	361,2 (315,5; 391,9)	234,0 (200,3; 265,4)	1,5
Медуллярное ретикулярное ядро (вентральное)	337,6 (290,1; 389,3)	231,5 (216,6; 269,5)	1,5
Медуллярное ретикулярное поле (дорсальное)	369,8 (350,0; 397,8)	246,5 (230,2; 285,4)	1,5
Медианное добавочное ядро	449,2 (417,3; 486,8)	222,2 (191,7; 266,0)	2,0
Спинальное ядро тройничного нерва	368,2 (323,1; 414,5)	230,1 (216,5; 251,4)	1,6
Вестибулокохлеарный ганглий	518,9 (444,6; 571,6)	497,6 (431,2; 580,9)	1,0
Ретроветролатеральное ретикулярное ядро	349,0 (327,1; 424,3)	275,5 (237,8; 292,2)	1,3
Ядро пучка Пробста	398,5 (373,5; 437,4)	244,5 (212,1; 267,6)	1,6
Большое ядро шва	328,9 (285,9; 373,1)	393,7 (331,1; 455,4)	0,8
Препозитарное подъязычное ядро	291,5 (264,9; 330,5)	254,7 (214,6; 288,2)	1,5
Медиальное вестибулярное ядро	298,1 (274,0; 391,9)	323,5 (271,9; 377,4)	0,9
Адреналинергическое ядро С1	324,6 (300,2; 382,6)	324,4 (278,3; 376,9)	1,0
Латеральное ретикулярное ядро	395,2 (368,5; 463,9)	334,8 (274,9; 367,6)	1,2
Ядро нижней оливы	348,9 (301,5; 340,0)	336,5 (285,0; 419,4)	1,0

Название структур	АТФ-синтаза (Ме (LQ; HQ))	Ngb (Ме (LQ; HQ))	АТФ- синтаза/Ngb
Спинной мозг			
Вставочные нейроны задних рогов	456,0 (419,9; 498,1)	204,1 (180,4; 255,5)	2,2
Добавочное ядро	491,6 (474,4; 516,8)	410,0 (362,9; 487,3)	1,2
Центральное шейное ядро	545,4 (536,3; 561,5)	459,6 (428,8; 554,4)	1,2

Таблица П.2 – Соотношение нейронов с разной хроматофилией цитоплазмы в структурах головного мозга крысы после СИГМ (в %)

Структура, группа	Тип нейронов по степени хроматофилии цитоплазмы					
	нормо- хромные	гипер- хром- ные	гипер- хромные смор- щенные	гипо- хромные	клетки- тени	
Конечный мозг						
Митральные клетки обоня- тельной луко- вицы	к	44,5	37,5	11,1	6,9	0
	30 мин	5,5 ↓*	21,8	39,1 ↑*	23,6 *	10 ↑*
	3 ч	9,6 ↓*	10,8	67,5 ↑***	7,2	4,8
Пириформная кора, II слой	к	35,4	34	22,3	8,3	0
	30 мин	37,2	13,6 ↓*	22,0	21,5	5,7
	3 ч	10,8 ↓*	17,9 ↓*	55,1	10,8	5,4
Гиппокамп CA1, II слой	к	78,1	3,3	1,9	12,6	4,1
	30 мин	8,1 ↓**	28,5 ↑*	49,6 ↑**	6,5	7,3
	3 ч	0 ↓**	11,9 ↑*	72,4 ↑**	10,1	5,6

Продолжение таблицы П.2

Структура, группа		Тип нейронов по степени хроматофилии цитоплазмы				
		нормо- хромные	гипер- хром- ные	гипер- хромные смор- щенные	гипо- хромные	клетки- тени
Гиппокамп СА2, II слой	к	78,4	7	5,9	8	0,7
	30 мин	13,2 ↓**	36 ↑**	44,6 ↑**	5,3	0,9
	3 ч	14,1 ↓**	35,7 ↑*	34,3 ↑**	8,3	7,6
Гиппокамп СА3, II слой	к	39	27,8	24,9	5,3	3
	30 мин	7 ↓**	33,2	51,3 ↑*	3,2	5,3
	3 ч	1,5 ↓**	24,4	63,7 ↑**	8,3	2,1
Зубчатая извилина, II слой	к	57,9	16,8	10,6	12,4	2,3
	30 мин	17,4 ↓**	32,1	34,3 ↑*	10,8	5,4
	3 ч	7,8 ↓**	30,4	41,9 ↑*	11,4	8,5 ↑*
Поясная кора, II слой	к	86,9	0,9	1,9	8,4	1,9
	30 мин	39,1	5,1	9,6 ↑*	30,8 ↑*	15,4 ↑*
	3 ч	6,8 ↓*	44,8 ↑*	17,1 ↑*	13,9 ↑*	17,3 ↑*
Поясная кора, III слой	к	66,4	7,4	5,7	13,1	7,4
	30 мин	39	14,6	13	17,9	15,5
	3 ч	2,4 ↓*	35,4 ↑*	15,1 ↑*	42,8 ↑*	4,2
Поясная кора, V слой	к	68	13	2	10	7
	30 мин	27,9 ↓*	31,4	7	19,8 ↑*	13,9
	3 ч	3,9 ↓*	45,5 ↑*	19,6 ↑*	28,6 ↑*	2,4
Поясная кора, VI слой	к	41,2	8	10,5	22,8	17,5
	30 мин	26,6 ↓*	13,9	24,1	16,5	18,9
	3 ч	0 ↓*	7,4	69,6 ↑*	22	1 ↓*
Ретросплени- альная аграну- лярная кора, II слой	к	56,7	43,0	0,3	0	0
	30 мин	10,4 ↓***	74,9 ↑***	10,6 ↑***	4,2 ↑***	0
	3 ч	0 ↓***	63,3 ↑**	21,8 ↑***	13,9 ↑***	1,0

Продолжение таблицы П.2

Структура, группа		Тип нейронов по степени хромотофилии цитоплазмы				
		нормо- хромные	гипер- хромные	гипер- хромные смор- щенные	гипо- хромные	клетки- тени
Ретросплени- альная аграну- лярная кора, III слой	к	73,6	26,4	0	0	0
	30 мин	10,8 ↓**	75,3 ↑**	9,4 ↑**	3,8	0,7
	3 ч	0 ↓**	48,7 ↑*	33,8 ↑***	14,5 ↑***	3
Ретросплени- альная аграну- лярная кора, V слой	к	54,1	45,9	0	0	0
	30 мин	10,1 ↓**	76,4 ↑**	11,5 ↑**	2	0
	3 ч	0 ↓**	18,2 ↓*	60,6 ↑**	18,5 ↑**	2,7
Ретроспле- ниальная агранулярная кора, VI слой	к	42,9	56	1,1	0	0
	30 мин	0,3 ↓***	76,7 ↑***	13,3 ↑***	8,5 ↑**	1,2
	3 ч	0 ↓***	34	43 ↑***	19,5 ↑***	3,6 ↑**
Височная кора, II слой	к	57,1	41,4	0,9	0,6	0
	30 мин	9,1 ↓***	85,2 ↑***	4,9 ↑**	0,8	0
	3 ч	25,1	7,0 ↓**	5,8 ↑***	47,4 ↑***	14,6 ↑***
Височная кора, III слой	к	37,4	57,3	5,3	0	0
	30 мин	14,6 ↓***	74,5 ↑**	7,2	3,4	0,3
	3 ч	25,6	4,3 ↓***	7,8	54,7 ↑***	7,6 ↑**
Височная кора, IV слой	к	29,4	61,9	8,1	0,6	0
	30 мин	10,3 ↓***	73 ↑*	11,2 ↑*	4,5 ↑*	1
	3 ч	32,4	3,6 ↓***	3,0	53,4 ↑***	7,6 ↑**
Височная кора, V слой	к	27,6	56,4	16	0	0
	30 мин	12,3 ↓**	70,2 ↑**	10,5	5,5 ↑***	1,5
	3 ч	15,3 ↓*	8,1 ↓***	23,6	46,8 ↑***	6,3 ↑**

Продолжение таблицы П.2

Структура, группа		Тип нейронов по степени хроматофилии цитоплазмы				
		нормо- хромные	гипер- хромные	гипер- хромные смор- щенные	гипо- хромные	клетки- тени
Височная кора, VI слой	к	22,8	73,9	3	0,3	0
	30 мин	17,5	66,5 ↓*	8,8 ↑*	6 ↑**	1,2
	3 ч	12,4 ↓**	9,5 ↓****	23,3	51,0 ↑***	3,8 ↑*
Моторная кора, II слой	к	75,6	7	0	15,7	1,7
	30 мин	19,7 ↓*	24,1 ↑*	14,6 ↑*	26,3 ↑*	15,3 ↑*
	3 ч	14,9 ↓*	9	12,4 ↑*	51,1 ↑*	12,6 ↑*
Моторная кора, III слой	к	66,4	17,2	0,8	12,3	3,3
	30 мин	22,6	24,9	11,9 ↑*	23,1 ↑*	17,5 ↑*
	3 ч	18,8	7,2	5,9	51,2 ↑*	17,0 ↑*
Моторная кора, V слой	к	56,7	6	2,4	28,9	6
	30 мин	27,3 ↓*	29,5 ↑*	6,8	28,4	8
	3 ч	13 ↓*	21,6	17,8 ↑*	41,3 ↑*	6,3
Моторная кора, VI слой	к	64,8	7,2	3,2	24,8	0
	30 мин	36,7 ↓*	19,4 ↑*	13,3 ↑*	25,5	5,1
	3 ч	2,7 ↓*	11,1	46,8 ↑*	32,3	7,1 ↑*
Затылочная кора, II слой	к	63,1	3,9	0,4	18,6	14
	30 мин	23,6 ↓**	21,8 ↑*	5,1	28,2	21,3
	3 ч	0 ↓*	15,6	0,5	62,3 ↑*	21,7 ↑*
Затылочная кора, III слой	к	65,3	4,6	0,6	18,6	10,9
	30 мин	24,7 ↓*	24 ↑**	4,9 ↑*	27,6	18,8 ↑*
	3 ч	4,2 ↓*	4,2	0,4	64,6 ↑*	26,6 ↑*
Затылочная кора, IV слой	к	59,8	12,5	2,3	14	11,4
	30 мин	10,2 ↓**	32 ↑**	7,8	35,4 ↑**	14,6
	3 ч	0,5 ↓*	4,4	2	74,9 ↑*	18,2

Продолжение таблицы П.2

Структура, группа		Тип нейронов по степени хромотофилии цитоплазмы				
		нормо- хромные	гипер- хромные	гипер- хромные смор- щенные	гипо- хромные	клетки- тени
Затылочная кора, V слой	к	54,9	23,8	1,8	16,5	3
	30 мин	4,8 ↓**	42,4	30 ↑**	18	4,8
	3 ч	6,3 ↓**	26,3	7	48,9 ↑**	11,5 ↑*
Затылочная кора, VI слой	к	44,7	26,8	10,6	14	3,9
	30 мин	1,4 ↓**	10,6	65 ↑**	20,3	2,7
	3 ч	0 ↓*	6,3	16,0	69,4 ↑*	8,3 ↑*
Промежуточный мозг						
Медиальное габенулярное ядро таламуса	к	12,3	85,3	2,4	0	0
	30 мин	8,2	79,1	11,5 ↑***	1,2	0
	3 ч	0,2 ↓***	1,2 ↓***	65,6 ↑***	28,6 ↑***	4,4 ↑**
Паравентри- кулярное ядро таламус	к	18,3	79,8	1,9	0	0
	30 мин	10	48,8	41,2 ↑**	0	0
	3 ч	0 ↓*	9,9 ↓*	84,7 ↑**	5,4 ↑*	0
Латеральное заднее ядро таламуса	к	27,8	66,2	5,7	0,3	0
	30 мин	19,8 ↓*	28,1 ↓***	47,4 ↑***	4,4 ↑**	0,3
	3 ч	1,6 ↓***	21,2 ↓***	59,5 ↑***	16,1 ↑***	1,6
Латеральная область гипоталамуса	к	48,9	46	5,1	0	0
	30 мин	25,9	58 ↑**	12,1 ↑**	3,8 ↑**	0,2
	3 ч	11,1 ↓***	23,0 ↓**	45,1 ↑***	15,9 ↑***	4,9 ↑*
Медиальное маммилярное ядро	к	26,9	53	8,2	6,8	5,1
	30 мин	10,5	4,2 ↓**	49,7 ↑**	22,9 ↑*	12,7 ↑*
	3 ч	0 ↓**	0 ↓**	12,8	58,9 ↑**	28,3 ↑**

Продолжение таблицы П.2

Структура, группа		Тип нейронов по степени хромотофилии цитоплазмы				
		нормо- хромные	гипер- хромные	гипер- хромные смор- щенные	гипо- хромные	клетки- тени
Супраамми- лярное ядро	к	44,3	39	1,3	14,1	1,3
	30 мин	20,5	5 ↓*	38,3 ↑*	25,6	10,6 ↑*
	3 ч	0 ↓*	1,2 ↓*	42,0 ↑*	48,1	8,6
Гистаминер- гическое ядро E2	к	41,2	54,4	4,4	0	0
	30 мин	29,4	51,4	19,2 ↑**	0	0
	3 ч	0 ↓**	0	61,8 ↑**	37,4 ↑**	0,8
Средний мозг						
Большое ядро шва	к	54,3	43,8	1,9	0	0
	30 мин	14,4 ↓**	83,3 ↑**	2,3	0	0
	3 ч	7,8 ↓**	14,6 ↓**	64,1 ↑**	12,6 ↑*	1
Верхняя область покрышки	к	46,2	6,6	28,5	13,2	5,5
	30 мин	3 ↓**	4	39,4	47,5 ↑*	6,1
	3 ч	0,7 ↓**	2,9	58,7 ↑*	29 ↑*	8,7
Черная субстанция, компактное вещество	к	61,2	23,3	10,7	1,9	2,9
	30 мин	17,7 ↓*	32,6	30,4	16,3	3
	3 ч	7,5 ↓**	12,7	65,9 ↑**	10,4 ↑**	3,5
Черная субстанция, ретикулярное вещество	к	59,5	28,6	11,9	0	0
	30 мин	41,4	9,8 ↓*	29,3	17,1	2,4
	3 ч	0 ↓**	29,8	45,6 ↑*	15,8 ↑**	8,8
Интерпедун- кулярное ядро	к	74,4	4,4	12,3	6,1	2,7
	30 мин	63,8	11,5	6,5	10,0	8,2
	3 ч	1,8 ↓***	4,6	49,5	14,7	29,4 ↑*
Мезенцефа- лическое ядро тройничного нерва	к	45,7	34,4	17,1	2,9	0
	30 мин	4 ↓*	34	48	12	2
	3 ч	2,2 ↓*	48,9	24,4	20	4,4

Структура, группа	Тип нейронов по степени хромотофилии цитоплазмы					
	нормо- хромные	гипер- хромные	гипер- хромные смор- щенные	гипо- хромные	клетки- тени	
Мост и продолговатый мозг						
Адреналинер- гическое ядро С1	к	31,2	56,9	10,1	1,8	0
	30 мин	30,3	11,4 ↓**	44,3	8,9	5,1
	3 ч	5,4 ↓**	24,3 ↓**	45,9	24,3	0
Ядро подъязычного нерва	к	11,1	63	18,5	7,4	0
	30 мин	78,8 ↑*	18,4	3,1	0	0
	3 ч	1,9	5,7 ↓*	63,8 ↑*	26,7 ↑*	1,9
Препозитарное подъязычное ядро	к	56,8	39,2	0	4	0
	30 мин	19,8	67,6	12,6	0	0
	3 ч	0 ↓*	3,5	20,1 ↑***	59,6 ↑***	16,9 ↑***
Спинальное ядро тройничного нерва	к	85,5	11,6	2,9	0	0
	30 мин	53,3 ↓*	42,6 ↑*	4,1	0	0
	3 ч	12,0 ↓***	20,5	33,7 ↑**	30,1 ↑**	3,6
Ядро блуж- дающего нерва	к	32,3	60	7,7	0	0
	30 мин	23,6 ↓*	34,6	38,2 ↑*	3,6	0
	3 ч	0 ↓*	4,3 ↓*	65,7	30 ↑*	0
Медулярное ретикулярное ядро (вентраль- ная часть)	к	61	34,5	4,5	0	0
	30 мин	42,5	45,3 ↑*	11,3	0,9	0
	3 ч	1,5 ↓***	5,3 ↓***	64,9 ↑***	26,7 ↑***	1,5
Медулярное ретикулярное ядро (дор- сальная часть)	к	69,4	23,4	7,2	0	0
	30 мин	46,6	47,9 ↑**	5,5	0	0
	3 ч	1 ↓***	3,1 ↓***	62,9 ↑**	32 ↑**	1

Продолжение таблицы П.2

Структура, группа		Тип нейронов по степени хромотофилии цитоплазмы				
		нормо- хромные	гипер- хромные	гипер- хромные смор- щенные	гипо- хромные	клетки- тени
Ядро лицевого нерва	к	50,9	35,5	11,5	2,1	0
	30 мин	51,1	35,6	9,5	3,5	0,3
	3 ч	14,8 ↓***	19,4	49,1 ↑*	13,0	3,7
Гигантоцел- люлярное ядро	к	58,9	33,5	7,2	0,4	0
	30 мин	14,7 ↓***	69 ↑***	13,6 ↑*	1,9	0,8
	3 ч	6,4 ↓***	15,4 ↓***	62,8 ↑**	11,5 ↑*	3,8
Ядро Голля	к	68,3	29,3	2,4	0	0
	30 мин	17 ↓***	75,4 ↑***	5,9 ↑**	1,1	0,6
	3 ч	0 ↓***	19,4	57 ↑***	23,4 ↑***	0,2
Ядро Бурдаха	к	44,4	40,1	15,5	0	0
	30 мин	16,8 ↓*	52 ↑*	25,2 ↑**	3,2 ↑**	0
	3 ч	0 ↓***	24,8	48,1 ↑** *	26,6 ↑**	0,5
Медиальное вестибуляр- ное ядро	к	33,5	53,1	11,8	1	0,6
	30 мин	8,5 ↓***	82 ↑***	8,4	0,9	0,2
	3 ч	5,6 ↓***	4,7 ↓***	43,0	41,1 ↑**	5,6
Мозжечок						
Околочлокочок, клетки Пуркинье	к	42,9	53,6	3,6	0	0
	30 мин	9,3	30,2	34,9	11,6	14 ↑*
	3 ч	0 ↓*	13,3	52 ↑**	14,7 ↑*	20 ↑*
Простая долька, клет- ки Пуркинье	к	72,7	15,9	9,1	2,3	0
	30 мин	18,9	35,9	17,0	15,1	13,2
	3 ч	0 ↓**	1,2	21	42 ↑***	25,8 ↑**

Структура, группа		Тип нейронов по степени хромотофилии цитоплазмы				
		нормо- хромные	гипер- хромные	гипер- хромные смор- щенные	гипо- хромные	клетки- тени
Парамедиан- ная долька, клетки Пуркинье	к	75	18,8	6,3	0	0
	30 мин	0 ↓**	39,5	47,4 ↑**	10,5	2,6
	3 ч	4,2 ↓*	16,7	50,0 ↑*	25,0 ↑*	4,2
Пирамида, клетки Пуркинье	к	68,8	22,9	4,2	4,2	0
	30 мин	3,4 ↓**	50,9	28,8	11,9	5,1
	3 ч	0 ↓***	1,6	34,9 ↑*	30,2 ↑**	33,3 ↑**
Промежуточ- ное ядро	к	35,8	41,5	17	5,7	0
	30 мин	4,8 ↓*	47,6	38,1	9,5	0
	3 ч	7,5	20 ↓*	17,5	50 ↑*	5
Медиальное ядро	к	56,9	13,6	15,9	13,6	0
	30 мин	3,6 ↓**	45,5	29,1	14,6	7,2
	3 ч	2,4 ↓**	24,4	34,1	26,8	12,2
Латеральное ядро	к	15,5	48,3	32,8	1,7	1,7
	30 мин	14	18,6	51,2	9,3	6,9
	3 ч	12,2	14,3 ↓*	34,7	28,6 ↑*	10,2

Примечание – статистически значимое различие в сравнении с контрольной группой: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Таблица П.3 – Изменение иммунореактивности АТФ-синтазы в нейронах мозга крысы при СИГМ ($\times 10^3$ ед. опт. плотности)

Структура	Содержание АТФ-синтазы (Ме (LQ; UQ))		
	контрольная группа	30 минут СИГМ	3 часа СИГМ
Конечный мозг			
Митральные клетки обонятельной луковицы	188,4 (146,9; 212,7)	284,1 (252,6; 309,5) ***	194,1 (171,2; 226,9) ###
Пириформная кора, II слой	306,2 (241,6; 384,3)	243,1 (214,9; 270,5) ↓***	213,0 (191,1; 237,0) ***, ##
Гиппокамп СА1, II слой	275,0 (229,7; 316,3)	248,8 (208,4; 280,7)*	235,3 (206,5; 255,5)**
Гиппокамп СА2, II слой	298,2 (265,3; 339,0)	321,1 (270,8; 382,0)	281,9 (234,3; 312,6) *, ##
Гиппокамп СА3, II слой	294,5 (270,6; 341,2)	246,8 (207,6; 283,9) ***	205,9 (176,0; 238,0) ***, ##
Зубчатая извилина, II слой	284,9 (250,8; 340,3)	230,1 (187,7; 307,2) ***	178,5 (160,5; 199,6) ***, ###
Ретроспленальная агранулярная кора, II слой	290,8 (261,7; 327,8)	191,6 (159,2; 242,9) ***	196,9 (157,2; 232,5) ***
Ретроспленальная агранулярная кора, V слой	269,7 (250,1; 314,7)	182,7 (141,8; 224,8) ***	227,7 (206,6; 287,6) ***, ###
Ретроспленальная агранулярная кора, VI слой	287,4 (250,1; 308,0)	149,7 (131,1; 258,4) ***	219,6 (186,1; 273,4) ***, ###
Височная кора, III слой	294,6 (249,7; 313,7)	165,7 (89,9; 190,0) ***	202,7 (183,5; 231,7) ***, ###
Височная кора, V слой	314,6 (275,0; 335,4)	194,8 (126,7; 245,0) ***	195,0 (170,6; 240,3) ***
Височная кора, VI слой	283,7 (246,1; 344,3)	198,7 (164,7; 261,5) ***	198,8 (180,9; 241,7) ***

Структура	Содержание АТФ-синтазы (Me (LQ; UQ))		
	контрольная группа	30 минут СИГМ	3 часа СИГМ
Промежуточный мозг			
Задняя группа ядер таламуса	255,9 (218,2; 303,0)	221,3 (190,9; 234,5)***	257,4 (236,6; 286,6)###
Медиальное маммилярное ядро	333,4 (314,7; 360,9)	347,0 (292,4; 387,8)	297,2 (269,5; 341,0)**; #
Медиальное габенулярное ядро таламуса	342,8 (283,0; 381,8)	256,0 (192,4; 289,7)***	207,0 (170,0; 232,5) ***; ###
Гистаминергическое ядро E2	360,7 (315,8; 425,1)	327,0 (276,2; 370,0)**	252,7 (218,2; 294,1) ***; ###
Средний и продолговатый мозг			
Верхняя область покрышки	271,3 (236,6; 292,4)	255,7 (206,8; 318,0)	267,3 (239,0; 302,8)
Черная субстанция, компактное вещество	327,0 (298,2; 349,2)	251,1 (208,1; 304,4) ***	293,4 (270,3; 337,5) **; ##
Латеральное ретикулярное ядро	306,1 (235,3; 355,6)	279,9 (117,6; 324,3)	315,9 (273,2; 328,2)#
Спинальное ядро тройничного нерва	332,4 (282,3; 365,1)	303,8 (270,9; 345,2)	310,3 (277,6; 377,9)
Гигантоцеллюлярное ядро	340,5 (305,2; 381,0)	366,6 (327,5; 431,5)*	309,2 (288,8; 350,3)###
Мозжечок			
Простая долька, клетки Пуркинье	231,7 (219,1; 243,4)	247,0 (216,4; 279,4)	248,0 (234,6; 263,5)*
Околочлочок, клетки Пуркинье	270,3 (246,7; 296,9)	280,8 (259,6; 317,0)	220,0 (184,5; 245,9) ***; ###
Латеральное ядро	325,8 (284,6; 395,9)	308,1 (279,2; 345,9)	249,7 (198,3; 298,4) ***; ###
Промежуточное ядро	348,6 (305,5; 400,2)	324,7 (298,4; 341,7)*	273,3 (230,8; 329,7)**; #

Примечание – статистически значимое различие по сравнению с контрольной группой: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; статистически значимое различие по сравнению с группой 30 минут СИГМ: # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$.

Таблица П.4 – Изменение иммунореактивности нейроглобина в нейронах мозга крысы при СИГМ ($\times 10^3$ ед. опт. плотности)

Структура	Содержание нейроглобина (Ме (LQ; UQ))		
	контрольная группа	30 минут СИГМ	3 часа СИГМ
Конечный мозг			
Митральные клетки обонятельной луковицы	156,7 (138,9; 174,3)	181,0 (170,1; 196,3) ***	173,4 (147,9; 187,8)
Пириформная кора, II слой	185,2 (172,0; 197,0)	151,2 (140,3; 166,9) ***	184,7 (159,2; 206,2) ↑###
Гиппокамп СА1, II слой	209,2 (190,4; 226,9)	164,8 (154,8; 196,1) ***	130,9 (111,5; 154,9) ***, ###
Гиппокамп СА2, II слой	231,3 (217,9; 247,3)	204,8 (174,7; 221,1) ***	174,8 (156,7; 183,2) ***, ##
Гиппокамп СА3, II слой	219,7 (193,2; 243,0)	177,5 (166,1; 198,2) ***	120,9 (109,3; 148,8) ***, ###
Зубчатая извилина, II слой	186,6 (167,1; 213,8)	163,9 (149,8; 176,0) ***	130,8 (120,3; 138,3) ***, ##
Ретроспленальная агранулярная кора, II слой	226,3 (210,9; 244,2)	285,8 (251,8; 323,2) ***	183,2 (173,9; 211,9) ***, ###
Ретроспленальная агранулярная кора, V слой	240,4 (198,8; 259,2)	222,3 (197,9; 243,0)	195,8 (175,4; 214,4) ***, ##
Ретроспленальная агранулярная кора, VI слой	244,6 (232,2; 260,7)	240,2 (219,2; 255,1)	185,8 (175,0; 208,0)
Височная кора, III слой	164,7 (153,1; 180,5)	165,5 (134,3; 206,8)	146,3 (118,5; 158,6) ***, ##
Височная кора, V слой	179,4 (156,1; 191,3)	182,0 (150,4; 207,9)	144,7 (118,5; 152,8) ***, ###
Височная кора, VI слой	167,6 (151,3; 185,2)	174,7 (156,2; 200,2)	111,6 (99,0; 124,2) ***, ###

Структура	Содержание нейrogлобина (Me (LQ; UQ))		
	контрольная группа	30 минут СИГМ	3 часа СИГМ
Промежуточный мозг			
Задняя группа ядер таламуса	229,9 (204,7; 243,3)	174,1 (160,7; 201,6) ***	135,1 (128,3; 153,3) ***, ###
Медиальное маммилярное ядро	217,6 (196,2; 232,3)	204,8 (190,9; 224,8)	163,0 (147,5; 178,1) ***, ###
Медиальное габенулярное ядро таламуса	250,2 (226,7; 266,8)	168,6 (152,6; 180,3) ***	144,1 (130,0; 157,5) ***, ###
Гистаминергическое ядро E2	305,0 (277,7; 317,0)	235,7 (218,2; 247,6) ***	199,5 (176,3; 217,0) ***, ###
Средний и продолговатый мозг			
Верхняя область покрышки	211,7 (188,5; 235,4)	237,6 (188,0; 269,4) *	211,1 (194,9; 235,9)
Черная субстанция, компактное вещество	230,4 (210,0; 246,3)	170,9 (151,2; 184,3) ***	141,4 (133,9; 151,3) ***, ###
Латеральное ретикулярное ядро	291,0 (278,8; 310,4)	198,6 (168,1; 217,7)***	201,8 (179,3; 218,4)***
Спинальное ядро тройничного нерва	202,3 (177,2; 216,7)	190,7 (164,4; 227,8)	189,9 (170,2; 208,7)
Гигантоцеллюлярное ядро	237,0 (215,5; 264,7)	183,9 (170,3; 194,1) ***	191,6 (180,8; 208,7) ***
Мозжечок			
Простая долька, клетки Пуркинье	159,7 (147,6; 168,2)	155,3 (122,4; 169,4)	157,3 (146,7; 189,6)
Околокочок, клетки Пуркинье	171,0 (144,8; 183,7)	163,5 (135,6; 156,5) **	160,2 (134,3; 165,8) ***, ###
Латеральное ядро	247,4 (190,3; 272,5)	214,0 (201,9; 224,1)	189,0 (174,5; 202,2) ***, ###
Промежуточное ядро	292,0 (268,3; 300,6)	224,3 (186,0; 241,4) ***	226,0 (205,2; 237,8) ***

Примечание – статистически значимое различие по сравнению с контрольной группой: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; статистически значимое различие по сравнению с группой 30 минут СИГМ: # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$.

Научное издание

Зиматкин Сергей Михайлович
Узлова Елизавета Валентиновна

**АТФ-СИНТАЗА И НЕЙРОГЛОБИН
В НЕЙРОНАХ МОЗГА КРЫСЫ ПРИ ИШЕМИИ**

Монография

Ответственный за выпуск С. Б. Вольф

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

Подписано в печать 08.08.2024.
Формат 60x84/16. Бумага офсетная.
Гарнитура Times New Roman. Цифровая печать.
Усл. печ. л. 9,53. Уч.-изд. л. 5,02. Тираж 20 экз. Заказ 54.

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