

Министерство здравоохранения Республики Беларусь

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ГРОДНЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

С. М. Зиматкин

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПОСТНАТАЛЬНОГО
РАЗВИТИЯ НЕЙРОНОВ МОЗГА**

Монография

Гродно
ГрГМУ
2026

УДК 611.81.018.8:612.65
ББК 28.706
3-62

Рекомендовано Редакционно-издательским советом ГрГМУ
(протокол № 2 от 12.01.2026 г.).

Автор: зав. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии
д-р биол. наук, проф. С. М. Зиматкин.

Рецензенты: зав. каф. патологической физиологии
имени 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 вет. наук, проф. В. В. Малашко.

Зиматкин, С. М.
3-62 Закономерности постнатального развития нейронов мозга : монография
/ С. М. Зиматкин. – Гродно : ГрГМУ, 2026. – 176 с.
ISBN 978-985-36-0059-9.

В монографии обобщен многолетний опыт работы сотрудников кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГрГМУ, связанный с изучением морфологического обеспечения развивающихся нейронов мозга в постнатальном онтогенезе.

Издание предназначено для научных сотрудников, преподавателей, студентов медицинского и биологического профиля, магистрантов, аспирантов, врачей-педиатров, психиатров и неврологов, всех, кто интересуется нейробиологией и биомедицинскими исследованиями развития головного мозга.

УДК 611.81.018.8:612.65
ББК 28.706

ISBN 978-985-36-0059-9

© Зиматкин С. М., 2026
© ГрГМУ, 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

Перечень условных обозначений	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1 ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ОНТОГЕНЕЗЕ НЕЙРОНОВ МОЗГА КРЫСЫ	7
ГЛАВА 2 ПРОЛИФЕРАЦИЯ И МИГРАЦИЯ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ НЕЙРОНОВ МОЗГА	39
ГЛАВА 3 СОЗРЕВАНИЕ НЕЙРОНОВ МОЗГА (МАРКЕРЫ NEUN И КАЛЬБИНДИН)	48
ГЛАВА 4 РАЗВИТИЕ ТЕЛ, ЯДЕР И ЯДРЫШЕК НЕЙРОНОВ МОЗГА	57
ГЛАВА 5 РАЗВИТИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА НЕЙРОНОВ	77
ГЛАВА 6 РАЗВИТИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА НЕЙРОНОВ	99
ГЛАВА 7 РАЗВИТИЕ АППАРАТА ПЕРЕВАРИВАНИЯ И ЗАЩИТЫ	113
ГЛАВА 8 РАЗВИТИЕ МЕДИАТОРНОГО АППАРАТА НЕЙРОНОВ	122
ГЛАВА 9 РОСТ НЕЙРОПИЛЯ И СИНАПТОГЕНЕЗ	129
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	144
Приложение	146
Литература	154

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТФ-синтаза	– маркер крист митохондрий
ВЗ	– вентрикулярная зона
ВЗС	– внутренний зернистый слой
ГАМК	– гамма-аминомасляная кислота
ГДК	– гистидиндекарбоксилаза
ГрЭС	– гранулярная эндоплазматическая сеть
ед. опт. пл.	– условная единица оптической плотности
ЗН	– зернистые нейроны
КГ	– комплекс Гольджи
КП	– клетки Пуркинье
ЛДГ	– лактатдегидрогеназа
МС	– молекулярный слой
НАДН-ДГ	– дегидрогеназа восстановленного НАД
НЗС	– наружный зернистый слой
РНП	– рибонуклеопротеины
СДГ	– сукцинатдегидрогеназа
СФ	– синаптофизин
Ув.	– увеличение
ЯПТ	– ядрышкоподобные тельца
ЯЦО	– ядерно-цитоплазматическое отношение
DCX	– даблкортин (doublecortin)
IQR	– интерквартильный диапазон
Me	– медиана
n	– количество животных в эксперименте
NeuN	– нейрональный ядерный антиген
Ngb	– нейроглобин
SYN	– синаптофизин

ВВЕДЕНИЕ

Для нормального функционирования каждого типа нейронов мозга необходимо их достаточное количество и специфическое расположение в мозге, определенные размеры и форма их тел (перикарионов), ядер и ядрышек, а также ряд развитых функциональных аппаратов, присущих всем животным клеткам: синтетический, энергетический, переваривания и защиты, цитоскелет. Кроме того, нейронам мозга для взаимосвязей между собой нужны развитые отростки (аксон и дендриты) и терминали, межнейрональные синапсы, специфический медиаторный аппарат (ферменты синтеза и деградации, системы обратного захвата медиаторов). Эти параметры формируются в процессе внутриутробного и, особенно, постнатального развития нейронов мозга. Цель монографии – описание закономерностей постнатального развития нейронов мозга.

В настоящей работе проведен анализ и обобщение данных, полученных нами от потомства крыс на 2, 7–10, 15–20, 45, 90 сутки после рождения с использованием современных микроскопических методов исследования. В качестве маркерных типов нейронов головного мозга были выбраны внутренние пирамидные нейроны новой (лобной и теменной) коры мозга (холинергические), клетки Пуркинье (ГАМК-ергические) и зернистые нейроны (глутаматергические) коры мозжечка, нейроны ядер мозжечка (преимущественно глутамат- и глицинергические), а также гистаминергические нейроны гипоталамуса. При этом зернистые нейроны являются самыми мелкими и многочисленными нейронами мозга, предшественники которых до 20-го дня постнатального онтогенеза размножаются в наружном зернистом слое и мигрируют во внутренний зернистый слой, в место своего постоянного расположения и функционирования. Остальные – это большие (ганглиозные) нейроны, завершившие миграцию еще в эмбриогенезе и в постнатальном онтогенезе проходящие только дифференцировку. Было интересно проследить общие закономерности и особенности микроскопических изменений этих типов нейронов в постнатальном онтогенезе, а также выяснить насколько разные методы исследования могут отражать процесс становления этих нейронов.

С целью светооптического микроскопического исследования образцы соответствующих отделов мозга фиксировали в жидкости Карнуа и цинк-формалине и заключали в парафин (для гистологии и иммуногистохимии), фиксировали в 1 % четырехоксида осмия, заключали в эпоксидную смолу и готовили полутонкие и ультратонкие срезы (для электронной микроскопии), а также замораживали в жидком азоте и готовили криостатные срезы (для гистохимического исследования). Изучение гистологических и гистохимических препаратов, их микрофотографирование и морфометрию проводили с помощью микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры Leica DFC 320 (Leica Microsystems GmbH, Германия) и программы компьютерного анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США). Ультраструктуру нейронов изучали с помощью электронного микроскопа JEM-1011 (JEOL, Япония) и фотографировали цифровой камерой Olympus Mega View III. Ультраструктурную морфометрию проводили с помощью программы для обработки изображения iTEV 1011 (JEOL, Япония). Для анализа цифровых данных использовали методы непараметрической статистики.

В монографии обобщен многолетний опыт работы сотрудников кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет» и моих учеников (Бонь Е. И., Карнюшко О. А., Заерко А. В.), связанный с микроскопическим исследованием постнатального развития разных типов нейронов мозга.

Глава 1

ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ОНТОГЕНЕЗЕ НЕЙРОНОВ МОЗГА КРЫСЫ

Развитие нейронов коры головного мозга крысы

В онтогенезе коры больших полушарий головного мозга крысы выделяют четыре периода. *Первый период* длится до рождения и представляет собой этап закладки коры и интенсивной клеточной пролиферации.

В основе образования неокортекса лежат два важнейших процесса – образование предшественников нейронов в вентрикулярной зоне стенки мозгового пузыря и миграция постмитотических предшественников. Нейроны, формирующие корковую пластинку, мигрируют в зону конечного мозга, расположенную между вентрикулярной зоной и базальной мембраной, выстилающей стенку мозгового пузыря, обращенную к тонкой мозговой оболочке [Максимова Е. В., 1990, 1985; Оленев С. Н., 1978].

Продолжающаяся генерация предшественников нейронов и выход их из вентрикулярной зоны на 13–14-е сутки внутриутробного развития приводят к появлению в этой зоне принципиально иной популяции клеток, располагающейся в ней в виде радиально ориентированной первоначально однослойной колонки. Первичную единую плексиморфную зону теперь разделяет корковая пластинка. Одна из них, расположенная над корковой пластинкой, образует маргинальный плексиморфный слой, а другая, расположенная под корковой пластинкой, – промежуточный слой [Максимова Е. В., 1990, 1985].

Постмитотические нейроны выходят из вентрикулярной зоны, теряют свой радиальный отросток и становятся полиморфными. Некоторые из клеток, находящихся в промежуточной зоне, вытянуты в тангенциальном направлении. Нейроны, входящие в корковую пластинку, имеют 1 или 2 радиальных отростка и 2–3 базальных, один из которых аксон. Некоторые клетки, мигрирующие в корковую пластинку, лишаются аксона, растущего в промежуточную зону.

Ширина корковой пластинки в данный период развития невелика, размеры ее не превышают 1–2 длины находящихся в ней нейронов. Апикальный отросток нейронов, находящихся в корковой пластинке, входит в маргинальную зону. Нейроны, находящиеся в маргинальной зоне, так же, как и их отростки, вытянуты в тангенциальном направлении. Как в маргинальной, так и в промежуточной зоне имеется свободное внеклеточное пространство [Максимова Е. В., 1990, 1985; Оленев С. Н., 1978].

К 15-м суткам внутриутробного развития происходит выделение коры из переднего мозгового пузыря конечного мозга. При этом закладка коры представлена 16–20 рядами клеток разной степени дифференцировки с преобладанием нейробластов (рисунок 1.1).

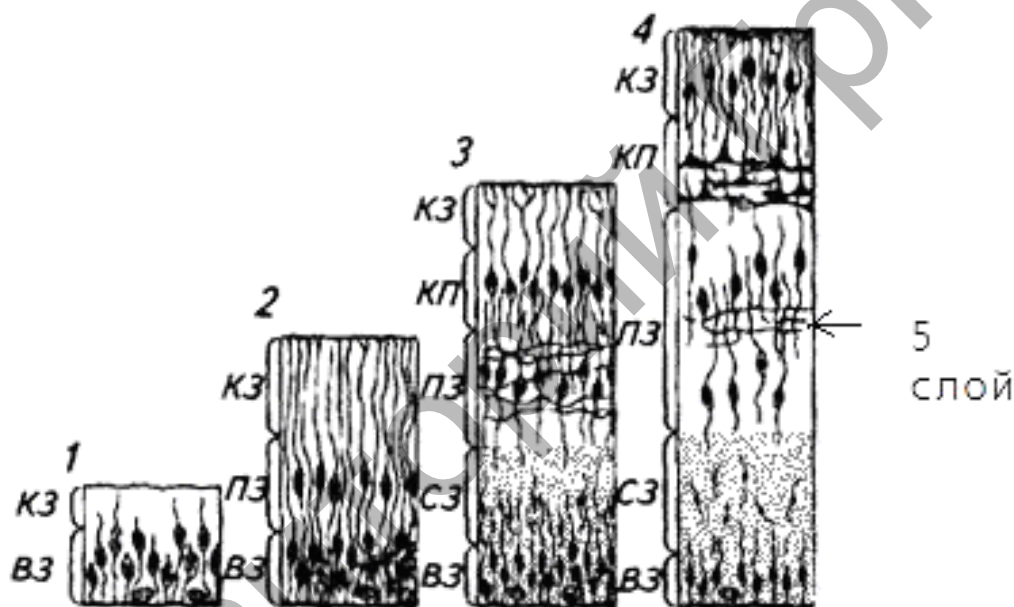


Рисунок 1.1 – Развитие корковой пластинки

1 – 15 сутки эмбриогенеза, 2 – 19 сутки эмбриогенеза, 3 – период новорожденности, 4 – 2 сутки после рождения; ВЗ – вентрикулярная зона;

СЗ – субвентрикулярная зона; ПЗ – промежуточная зона;

КП – корковая пластинка; КЗ – краевая зона [Дубровинская Н. В., 2000]

На 16-й день пренатального онтогенеза по сравнению с предыдущим днем, толщина закладки неокортекса возрастает на 86 %, в последнем насчитывается 25–30 слоев клеток. Между закладкой коры и клетками, расположенными вблизи полостей желудочков, отмечается появление нервных волокон. На 17-е сутки толщина стенки возрастает еще на 83 %. В коре полушарий отмечается дифференцировка клеток молекулярного и наружного зернистого слоев.

На 18-е сутки эмбриогенеза стенка конечного мозга белой крысы утолщается еще на 18 %, что объясняется увеличением числа нейронов в коре, особенно в наружных зернистом и пирамидных слоях. На 19-е сутки внутриутробной жизни толщина неокортекса у белой крысы увеличивается на 11 %, что связано с нарастанием числа нейронов во всех слоях коры и обособлением ее внутреннего зернистого слоя. При этом клетки наружного и внутреннего пирамидных слоев находятся на разных стадиях дифференцировки. Слой полиморфных клеток выражен слабо, в нем выявляются единичные фигуры митоза. На 20-е сутки эмбриогенеза клетки пирамидных слоев находятся на разных стадиях дифференцировки, среди них наблюдается нарастание зрелых форм, что характерно в эти сроки для всех слоев. На внутренней поверхности полиморфного слоя определяется пластинка белого вещества. В связи с нарастанием процесса дифференцировки структурных элементов коры полушарий мозга толщина неокортекса увеличивается на 4 % по сравнению с эмбрионами 19-х суток [Дмитриева Н. И., 1981; Brizzee K. R., 1959; Globus A., 1967].

Второй период онтогенеза коры головного мозга крысы занимает первые 10 дней после рождения [Дмитриева Н. И., 1981], его обычно называют *ростовым* периодом. На протяжении первых 10 дней постнатального развития мозг крысы интенсивно растет в орально-каудальном направлении, а в высоту и ширину – в меньшей степени. Толщина коры головного мозга новорожденной крысы равна 0,59–0,74 мм. Увеличение толщины коры происходит как за счет роста тел нейронов, так и нейропилия. Цитоархитектонически кора мозга новорожденных крыс крайне незрелая: в соматосенсорной области новой коры можно различить комплекс 2–6-го слоев и 7-й слой. Пирамидные нейроны слабо дифференцированы, они имеют лишь верхушечные дендриты, базальные – лишь в виде зачатков, а их аксоны не имеют коллатералей [Brizzee K. R., 1959].

У двухдневной крысы в коре мозга выделяются все слои, имеющиеся у взрослого животного, но в верхнем этаже коры клетки еще тесно прилежат друг к другу. Нейроны имеют узкий ободок цитоплазмы, их ядра округлой или овальной формы, мало отличаются по размерам в разных слоях коры. К 7-дневному возрасту величина ядер и клеточных тел более вариабельна, особенно в 5-м и 3-м слоях. Форма ядер округлая или овальная. В цитоплазме четко выделяется эндоплазматическая сеть, в которой возрастает количество цистерн [Попова Э. Н., 1976].

С 6-го по 10-й день постнатального развития происходят интенсивные процессы дифференцировки в коре головного мозга крысы: в цитоплазме нейронов появляются отчетливо выраженные глыбки хроматофильного вещества, растут дендриты и шипики на них. К 7-му дню образуются первые синапсы, что можно наблюдать при электронной микроскопии [Дмитриева Н. И., 1969; Brizzee K. R., 1959].

Третий период (с 11-го по 20-й день) является периодом *продолжающегося роста* мозга [Дмитриева Н. И., 1981]. В этот период завершается рост дендритов и тел нейронов. Усложняется структура нейронов и межнейрональных связей. На 14-е сутки в коре цитоархитектонически определяются все слои, которые имеются в мозге взрослого животного, однако ширина слоев продолжает возрастать, преимущественно за счет верхних слоев. К 14-м суткам отмечается значительное уменьшение плотности расположения нейронов. Они имеют выраженное хроматофильное вещество в цитоплазме. Увеличивается число и протяженность дендритов. Количество синапсов возрастает, усложняются ветвления дендритов, а их субмикроскопическая структура становится похожей на таковую у взрослой крысы [Попова Э. Н., 1976].

Основная масса дендритов к 18–22 дню по своей протяженности и разветвленности достигает показателей взрослых животных [Globus A., 1967]. Быстрое увеличение количества дендритов в коре совпадает с резким возрастанием содержания калия в мозге. Это происходит на 15–25-е сутки постнатального развития. Количество синапсов особо возрастает к концу второй недели в зрительной коре, что связано с созреванием крыс и увеличением зрительной афферентации. После 20-го дня постнатального развития содержание ДНК в коре головного мозга крысы практически не изменяется. РНК на протяжении третьего периода продолжает интенсивно накапливаться. Причем ее метаболизм крайне чувствителен к разным внешним воздействиям. Обмен гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), более всего ассоциирующийся с метаболизмом в дендритах и аксонах нейронов, на данном этапе развития особенно высок. При этом скорость образования ГАМК превышает интенсивность ее использования. Условные рефлексы у крысы становятся устойчивыми с 23–24 дня [Дмитриева Н. И., 1969].

Четвертый период приходится на 21–40-е сутки постнатального развития. В этом периоде увеличение массы мозга проходит крайне медленно. Основным процессом является интенсивная миелинизация отростков нейронов в коре мозга, откуда и его название – *период миелогенеза* [Мак-Ильвейн Г., 1962]. Миелинизация – один из важных физиологических процессов, которые происходят во время созревания головного мозга. Начало миелинизации совпадает с ростом активности ферментов сфингомиелиназы и цереброзидазы. Сфингомиелин, цереброзиды и сульфатиды – это основные липиды, входящие в состав миелина и являющиеся его маркерами [Satomi D., 1981]. Результаты ряда исследований подчеркивают важнейшую функцию эндогенной опиоидной системы в контроле развития олигодендроцитов и сроков миелинизации. Вмешательство в эти регуляторные системы могут нарушить нормальный процесс созревания мозга в критические этапы формирования миелина [Vestal-Laborde A. A., 2014].

К началу данного периода достигается максимум числа нейронов в коре мозга крысы, толщина коры становится в 2,6 раза больше, чем у новорожденных крыс. Количество синапсов продолжает расти, но еще не достигает уровня, присущего взрослому животному [Попова Э. Н., 1976]. Вплоть до 45 суток происходит постоянное накопление цереброзидов в мозге, максимальная их концентрация достигается к концу 1-го года после рождения [Дмитриева Н. И., 1969].

Половозрелыми животные становятся к двум месяцам жизни. Однако развитие мозга крысы полностью завершается только к 90-м суткам после рождения [Дмитриева Н. И., 1981], когда в коре головного мозга в целом завершается процесс миелинизации [Дмитриева Н. И., 1969].

Таким образом, в постнатальном развитии коры головного мозга крысы можно выделить несколько ключевых моментов, доступных для исследования и несущих информацию о нормальном развитии: 7-е сутки после рождения, когда образуются первые синапсы, что можно наблюдать при электронной микроскопии [Дмитриева Н. И., 1969]; 14-е сутки, когда в коре цитоархитектонически определяются все слои, которые имеются в мозге взрослого животного [Дмитриева Н. И., 1981]; 40-е сутки, когда в основном завершается миелинизация; 90-е сутки, когда полностью завершается рост головного мозга и его коры [Дмитриева Н. И., 1969; Зиматкин С. М., Бонь Е. И., 2014].

Молекулярно-генетические механизмы развития нейронов коры головного мозга

В процессе гистогенеза нервной ткани – стадии пролиферации и дивергентной дифференцировки (то есть развитие клеток в определенном направлении) нейроэпителиальных предшественников – медуллобластов и их превращение в нейробласты и глиобласты – преимущественное значение имеют генетические факторы и позиционная информация (специализация клетки, которая определяется контактными взаимосвязями с соседними низкодифференцированными предшественниками). Генетически и фенотипически детерминированные предшественники нейронов оказывают выраженное взаимное трофическое влияние (то есть влияние с помощью выделения таких веществ, как цитокины или кейлоны) в процессе своего развития [Воронова Н. В., 2005].

Сложностью структуры коры головного мозга и упорядоченностью в ней межклеточных связей обусловлены особенности генной регуляции ее онтогенеза. Гены не содержат точных инструкций процесса образования коры, а обеспечивают скорее общие направления развития. Сначала в клетках, из которых в будущем образуется кора, активируется ген *Emx1*. В момент, когда стволовые клетки начинают свое деление, выстраиваясь в несколько еще одинаковых слоев, начинается экспрессия гена *Lhx2*. Он задает дальнейшее направление их развития – превращение в те или иные типы нейронов. Кодированный им белок при этом синтезируется в разных количествах, а ранее однородные слои с этого момента начинают приобретать специфические черты. Количество этого белка, выработанного клеткой, определяет дальнейшую ее специализацию, в каждом из слоев запускается своя цепочка биохимических реакций, зависящая от изначальной активности гена *Lhx2*. Для расслоения одинаковых клеток используется показатель количества белка, кодируемого одним геном, в зависимости от чего клетка направляется по тому или иному пути развития. Задержка экспрессии гена *Lhx2* приводит к тому, что вместо неокортекса развивается обонятельная, трехслойная и более примитивная кора [Воронова Н. В., 2005; Горелов А. А., 2016; Козлов В. И., 2016].

Важную роль в процессе развития коры головного мозга играет микроРНК. Это – малые некодирующие молекулы РНК длиной

18–25 нуклеотидов (в среднем 22), принимающие участие в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, участвующих в гистогенезе коры головного мозга крысы путем РНК-интерференции [Аппель Б. И., 2013; Chen K., 2007; Finch M. L., 2014]. МикроРНК кодируются ядерной ДНК и участвуют в подавлении активности генов, чья экспрессия нежелательна для нормальной дифференцировки нервных клеток: они комплементарно спариваются с участками мРНК, которые угнетают их трансляцию. Имеются данные, указывающие на возможность взаимодействия микроРНК непосредственно с ДНК в процессе РНК-зависимого метилирования ДНК, которое является одним из ключевых механизмов репрессии генов, аллельного исключения и предотвращения активности транспозонов [Place R. F., 2008; O'Carroll D., 2013; Pratt A. J., 2009].

МикроРНК играют центральную роль в координации транскрипции матричной РНК и стабильности почти всех известных биологических процессов, включая развитие центральной нервной системы. Разнообразные формы микроРНК обеспечивают гибкий контроль экспрессии мРНК развивающихся клеток мозга, что является необходимым условием функциональной специализации нейронов, так как постоянный поток информации требует адаптации нейронов к сигналам окружающей среды [O'Carroll D., 2013]. МикроРНК, управляющие созреванием клеток коры головного мозга крыс, действуют на разные наборы генов. Известно, что двуцепочечные молекулы РНК (дцРНК) могут активировать гены. Мишенями дцРНК являются промоторы генов, которые потенциально могут увеличить транскрипцию связанных генов [Place R. F., 2008]. Выделен ряд микроРНК-кодирующих генов, вовлеченных в процессы миграции, дифференцировки и созревания нейронов. Экспрессия данных генов имеет значительные последствия для развития нейронных структур [Mukhopadhyay P., 2011; Hollins S. L., 2014].

Нейронные микроРНК вовлечены в разные этапы формирования нейронных связей, включая дендритогенез (miR-132, miR-134 и miR-124), образование синапсов и их созревание (в эти процессы вовлечены miR-134 и miR-138) на втором этапе онтогенеза коры головного мозга крысы. Исследования показали, что некоторые микроРНК экспрессируются на протяжении дифференцировки нервных клеток, а другие – только в зрелых нейронах или синапсах.

Таким образом, с помощью микроРНК происходит регуляция развития и функционирования нервной системы, начиная от ее закладки и пролиферации стволовых нервных клеток на протяжении всего онтогенеза. Нарушения экспрессии микроРНК лежат в основе нейродегенеративных заболеваний [Trivedi S., 2009].

Молекулярные маркеры развития нейронов мозга

Для оценки дифференцировки стволовых клеток мозга в настоящее время широко используются методы иммуноцитохимического выявления синтезируемых ими маркерных белков, синтез которых также управляется микроРНК. К таким нейромаркерам относятся: даблкортин, ядерный белок нервных клеток NeuN, β -тубулин III, ассоциированный с микротрубочками белок MAP2, белки нейрофиламентов, нейрон-специфическая енолаза, синаптофизин и связанная с полисиаловой кислотой молекула адгезии нервных клеток CPSA-NCAM [Коржевский Д. Э., 2005. Иммуноцитохимическое; Коржевский Д. Э., 2015. Молекулярная; Коржевский Д. Э., 2017. Маркирование].

Даблкортин (Doublecortin, DCX) – это белок, ассоциированный с микротрубочками, используется для определения степени зрелости нейронов; он экспрессируется почти исключительно незрелыми нейронами коры мозга. Нейрональные клетки-предшественники в эмбриогенезе начинают производить DCX вскоре после входа в клеточный цикл с затуханием экспрессии через 2–3 недели, ко времени окончательного превращения в развитые нейроны, что соответствует второму этапу онтогенеза коры мозга крысы. Даблкортин необходим для стабилизации микротрубочек и нормальной радиальной и тангенциальной миграции дифференцирующихся нейробластов в развивающейся коре головного мозга. Даблкортин экспрессируется при миграции нейронов в соответствующие слои коры. При нарушении экспрессии даблкортина возникают гетеротопии нейронов. Однако в исследованиях получены и противоречащие этому данные о том, что даблкортин синтезируется в нейронах и после завершения их миграции может использоваться как маркер для идентификации нейрогенной активности мозга взрослого животного. Экспрессия даблкортина в дифференцированных

нейронах может быть связана со способностью нервных клеток к реорганизации микротрубочек, ростом и регенерацией отростков нейронов. Даблкортин локализуется в перикарионе нейрона (ассоциированный с полирибосомами), дендритах и начальном сегменте аксона и обеспечивает морфологическую стабильность нейронов, рост и ветвление дендритов [Коржевский Д. Э., 2005. Иммуноцитохимическое; Friocourt G., 2003].

Белок NeuN (neuronal nuclear antigen) располагается в ядрах и перинуклеарной цитоплазме только зрелых нейронов мозга. Считается, что NeuN появляется на ранних этапах эмбрионального развития в постмитотических нейробластах, нарастает в дифференцирующихся нейронах и достигает максимума в терминально дифференцированных нейронах на протяжении всего последующего онтогенеза. Связывание антител к белку NeuN приурочено преимущественно к ядрам клеток и в меньшей степени к области перинуклеарной цитоплазмы. В ядре NeuN располагается преимущественно в областях с низкой плотностью хроматина и отсутствует в местах с плотной упаковкой ДНК. Большая часть внутриядерного NeuN связана с ядерным матриксом. Данные хроматографии ядерных белков мозга свидетельствуют о способности белка NeuN связываться с ДНК. Тот факт, что экспрессия NeuN связана с нейрональной дифференцировкой и сохраняется в течение всей жизни клетки, может указывать на NeuN как на постоянный регулятор общих проявлений нейронального фенотипа [Гусельникова В. В., 2015; Mullen R. J., 1992].

Синаптофизин – гликопротеин, находящийся в синаптических пузырьках нейронов мозга, сетчатке глаза, мозговом веществе надпочечников. Синаптофизин обеспечивает контакт синаптического пузырька с плазмолеммой и участвует в процессе экзо- и эндоцитоза медиатора при синаптической передаче. Используется как специфический маркер синапсов. С помощью иммуногистохимической реакции на синаптофизин оценивается синаптогенез, плотность расположения синапсов, изучается иннервация внутренних органов. Мутация синаптофизина в гене белка приводит к тому, что нейроны теряют способность упаковывать и транспортировать нейромедиаторы и перестают эффективно передавать нервный импульс. Без синаптофизина везикулы с сигнальными молекулами свободно выбрасывают содержимое в синаптическую щель, но при этом

запас пузырьков в нейроне не возобновляется. Нервная клетка в отсутствие этого белка может передать нервный импульс только ограниченное число раз, пока не исчерпается весь запас синаптических пузырьков. Мутации в гене синаптофизина часто выявляются при задержках умственного развития, так как в основе когнитивных процессов лежит многократное повторное проведение нервного импульса. В созревающих нейронах крысы с 7-х суток после рождения в период формирования синапсов активно образуется синаптофизин; его выработка продолжается и на протяжении всей жизни животного [Колос Е. А., 2015].

Онтогенез нейронов мозжечка крысы

Зачаток мозжечка у крыс образуется к 14-м суткам эмбрионального развития [Suckow M., 2005]. При этом, формируются две самостоятельные первичные нейрогенные (герминативные) зоны: ромбическая губа (РГ) [Yeung J., 2017] и вентрикулярная зона (ВЗ). Ромбическая губа генерирует глутаматергические нейроны [Wingate R. J., 2001], а вентрикулярная зона – ГАМК-ергические нейроны и клетки глии мозжечка [Leto K. et al., 2012].

Образование и миграция предшественников нейронов мозжечка. Ромбическая губа сначала образует субпопуляцию предшественников нейронов ядер мозжечка, образуя ядерную транзиторную зону, где предшественники нейронов экспрессируют *Rax6*, *Tbr1* и *Tbr2*. Позднее эти клетки становятся частью нейронов ядер мозжечка [Fink A. J. et al., 2006]. Затем ромбическая губа в основном генерирует предшественники зернистых нейронов, покрывающие поверхность мозжечка путем образования наружного зернистого слоя. Они экспрессируют *Rax6*, *Atoh1*, *Zic1* и *Cux2*, пролиферируют в раннем постнатальном периоде, а затем мигрируют и дифференцируются в зернистые нейроны мозжечка, расположенные в дефинитивном зернистом слое коры мозжечка [Capaldo E., 2016; Aruga J., 1998; Swanson D. J., 2011; Machold R., 2011]. В поздний эмбриональный и ранний постнатальный периоды образуются униполярные кисточковые нейроны, экспрессируя специфический транскрипционный фактор *Tbr2/Eomes* [Englund C., 2006].

После образования зачатка мозжечка первые волны нейрогенеза начинаются и в вентрикулярной зоне. Нейрогенез ГАМК-ергических нейронов мозжечка также происходит в зависимости от скоординированного влияния нескольких транскрипционных факторов. *Ptf1a* необходим для спецификации ГАМК-ергических предшественников нейронов мозжечка. В вентрикулярной зоне сначала образуются предшественники субпопуляции нейронов ядер мозжечка, экспрессирующие факторы транскрипции *Lhx2/9*, *Meis1/2* и *Irx3*, затем – *Lhx1/5*-позитивные клетки Пуркинье [Morales D., 2006]. *Lhx1/5* гены контролируют эмбриональное развитие, но их экспрессия в КП сохраняется в раннем постнатальном и взрослом периоде жизни. Далее образуются предшественники интернейронов коры мозжечка, которые являются *Par2*-позитивными (корзинчатые, звездчатые нейроны и клетки Гольджи) [Consensus. Leto K. et al. 2015]. Затем происходит переключение с нейрогенеза на глиогенез [Kita Y. et al. 2013], и в дополнение к ГАМК-ергическим нейронам мозжечка образуются предшественники клеток глии Бергмана, экспрессирующие фактор роста и дифференцировки 10 (Growth differentiation factor – *Gdf10*), также известный как *Bmp3b*, который является членом семейства трансформирующих факторов роста (TGF) [Mecklenburg N., 2014].

Для превращения тонкого зачатка мозжечка в трехмерную слоистую структуру происходят морфогенетические перемещения предшественников нейронов. Производные РГ мигрируют кпереди, ниже поверхности мягкой мозговой оболочки. Нейроны транзитерной ядерной зоны позднее мигрирует внутрь и вниз. Эта клеточная популяция затем образует три пары ядер мозжечка вместе с происходящими из вентрикулярной зоны ГАМК-ергическими нейронами ядер мозжечка [Fink A. J. et al., 2006]. Клетки Пуркинье, генерируемые в ВЗ начинают миграцию, направляемые глией к пиальной поверхности мозжечка, чтобы сформировать слой клеток Пуркинье под НЗС [Miyata T. et al., 2010]. Примерно в то же самое время предшественники ЗН в НЗС продолжают пролиферацию, которая приводит к увеличению его толщины и размера мозжечка. Предшественники клеток глии Бергмана мигрируют к пиальной поверхности и затем внутрь слоя КП и занимают дефинитивное положение. Затем происходят инвагинации определенных областей поверхности мозжечка, образуя листки мозжечка (фолиация) [Altman J., 1997].

К концу эмбрионального периода развития (22-е сутки) у крыс начинают образовываться в области червя четыре первые борозды, разделяющие кору мозжечка на пять основных листков мозжечка, к 14-м суткам после рождения фоллиация завершается и мозжечок представляет собой сложную слоистую структуру с десятью долями [Оленев С. Н., 1978] (рисунок 1.2).

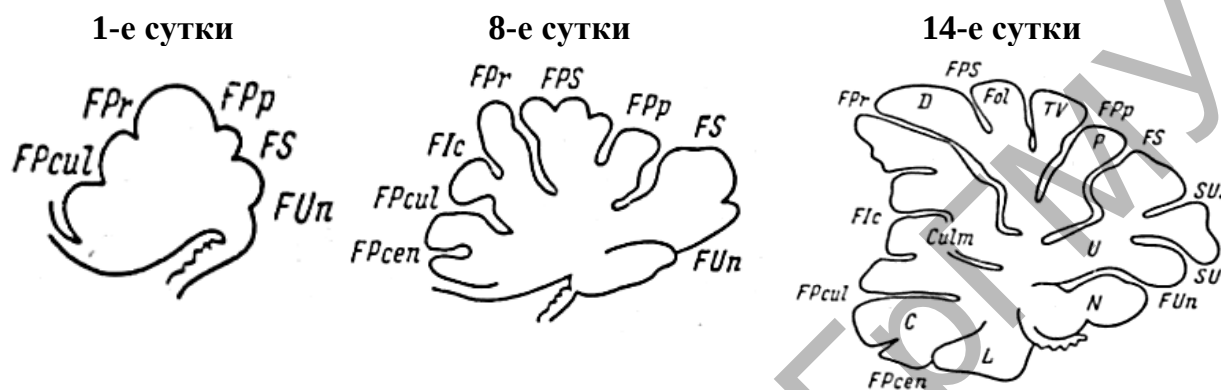


Рисунок 1.2 – Схема постнатального развития коры мозжечка крысы (по С. Н. Оленеву). Сагиттальный разрез

Доли мозжечка (I–X): L – lingula (I); C – centralis (II); Culm – culmen (IV–V); D – declive (VI); Fol – folium (VI); TV – tubervermis (VII); P – pyramis (VIII); U – uvula (IX); N – nodulus (X); FPcen – fis. precentralis; FPcul – fis. preculminata; FPr – fis. prima; FPS – fis. posteriorsuperior; FPP – fis. prepyramidalis; FS – fis. secunda; SU 1–2 – sulcusuvularis; Fun – fis. uvulonodularis (латинские названия соответствуют цифровым обозначениям в атласе [Paxinos G., 2007])

Масса мозжечка крысы к моменту рождения составляет 10 мг. В его коре имеется только 10 % от взрослого количества клеток [Дмитриева Н. И., 1981]. Со вторых по 17-е сутки жизни объем мозжечка увеличивается особенно быстро – с 15 до 180 мм³, средний его объем у взрослой крысы равняется 225 мм³ [Heinsen H., 1977], а масса – 230–240 мг. По размерам этот отдел мозга уступает только большим полушариям и составляет 11–13 % от массы головного мозга [Рыжавский Б. Я., 2003].

В коре мозжечка в раннем постнатальном онтогенезе выделяют четыре слоя: наружный зернистый слой, который к 20-м суткам у крыс исчезает, молекулярный, слой клеток Пуркинье и зернистый [Geurts F. J., 2003].

Корзинчатые и звездчатые нейроны молекулярного слоя. Предшественники этих нейронов образуются из нейроэпителия четвертого желудочка. Большинство нейронов этого слоя появляется

после рождения: корзинчатые нейроны у крыс образуются со вторых по 17-е сутки постнатального развития, звездчатые нейроны – с четвертых по 19-е сутки. Их особенностью является способность к делению в формирующемся белом веществе мозжечка во время миграции по направлению к молекулярному слою. При этом они морфологически неразличимы и экспрессируют Pax2 во время миграции, вплоть до момента их окончательного разделения на корзинчатые и звездчатые и начала их синаптического созревания. Достигнув молекулярного слоя, они продолжают мигрировать еще 2–3 дня.

Различают четыре фазы в развитии этих нейронов. Фаза I – радиальная миграции вертикально ориентированных нейронов по направлению к поверхности молекулярного слоя. Предполагают, что этому способствуют их контакты с аксонами зернистых нейронов. Затем они останавливаются рядом с предшественниками зернистых нейронов в НЗС, не проникая вглубь этого слоя. Это обеспечивается отталкивающим сигналом в виде Netrin1 и изменяет направление их миграции от радиального к тангенциальному. Фаза II – предшественники нейронов меняют свою ориентацию с вертикальной на горизонтальную, мигрируя тангенциально в rostrocaudальном направлении в верхней части МС, перпендикулярно направлению удлинения параллельных волокон (аксонов зернистых нейронов). Затем клетки меняют направление миграции от горизонтальной к вертикальной, и начинается III фаза – радиальная миграция в пределах молекулярного слоя. Фаза IV представляет собой новую тангенциальную миграцию в rostrocaudальном направлении, как и в фазе II, но вместо того чтобы проходить в верхней части молекулярного слоя, нейроны мигрируют в середине слоя, при этом скорость их миграции низкая и происходит рост их отростков [Cerebellar. Cameron D. B., 2009]. Они, достигнув конечного пункта назначения, дифференцируются в течение первых 3–4 недель постнатального развития [Altman J., 1972; Consensus. Leto K., 2015; Henrique R. M., 2001; Zhang L., 1996]. При этом происходит созревание их синаптических контактов с КП [Pouzat C., 1997].

Корзинчатые нейроны расположены в нижней трети МС, афферентные возбуждающие сигналы они получают от большого количества параллельных волокон и редкие от лазающих волокон (Scheibel коллатерали), ингибирующие входы от нейронов молекулярного слоя, коллатералей аксонов КП, аксонов клеток Лугаро.

Корзинчатые нейроны формируют характерное сплетение в начальном сегменте аксона КП. Однако вначале аксоны корзинчатых нейронов образуют синаптические контакты на теле КП. Затем они перемещаются непосредственно в начальный сегмент аксона, достигая дефинитивного положения. Аксо-аксональные синапсы корзинчатые нейроны на КП устанавливают в конце первой постнатальной недели. Для правильного их образования существуют ориентиры – мембранно-ассоциированный адаптерный белок анкирин-G и нейрофасцин 186. В конце первой постнатальной недели распределение NF186 на поверхности КП становится выше в начальном сегменте аксона, чем верхней части тела КП и их дендритах [Ango F. et al., 2004; Kano M., 2013].

ГАМК-ергические нейроны мозжечка обладают способностью к обратному захвату гамма-аминомасляной кислоты после синаптической передачи, для повторного использования этого нейромедиатора. Определение постнатальной экспрессии переносчика ГАМК, GAT-1 в коре мозжечка показало, что GAT-1-иммунореактивные нейроны выявляются на 8–9-е сутки после рождения в нижней части молекулярного слоя и слое клеток Пуркинье, что совпадает с началом функционирования тормозных синапсов на КП [Rosina A., 1999; Yan X. X. 1998].

Звездчатые клетки расположены более поверхностно, получают афферентные сигналы от параллельных волокон и аксонов других звездчатых нейронов. Эфферентные связи эти нейроны устанавливают преимущественно на теле и проксимальных ветвлениях дендритов КП. Правильное установление синапсов аксонами звездчатых нейронов на дендритах КП, опосредовано каркасом глиальных волокон Бергмана. Глиальные волокна Бергмана растут среди дендритов клеток Пуркинье и экспрессируют CHL1 на их поверхности. В отсутствие CHL1 звездчатые нейроны не способны должным образом иннервировать дендриты клеток Пуркинье [Ango F. et al., 2008; Williams M. E., 2010]. Корзинчатые и звездчатые клетки в молекулярном слое взаимно связаны не только через тормозные (химические) синапсы, но и с помощью электрических синапсов [Kim J., 2014].

Рост отростков КП, зернистых, звездчатых и корзинчатых нейронов способствует расширению молекулярного слоя, толщина

которого к 6-м суткам в среднем составляет 21 мкм, к 21-м суткам – 120–130 мкм [Asari M. A., 2010; Patro N., 1997, Зиматкин С. М., 2016. Синаптогенез] и продолжает увеличиваться до 30-х суток. У крыс это сопровождается развитием исследовательского поведения [Altman J., 1975; Anderson B., 1994]. Измерения молекулярного слоя в 3-, 9-, 18- и 27-месячном возрасте у крыс показали уменьшение его объема при старении [Dlugos C. A., 1994]. В корзинчатых нейронах мозжечка крысы с возрастом снижается ГрЭС и скорость синтеза белка [Henrique R. M., 2001].

Клетки Пуркинье (КП). КП – высокодифференцированные ГАМК-ергические нейроны, расположенные в коре мозжечка монослоем. Они получают возбуждающие сигналы непосредственно по афферентным лазающим волокнам (ЛВ) и опосредованно – по афферентным моховидным волокнам (МВ), через зернистые нейроны. КП угнетают нейроны ядер мозжечка. Кроме того, КП непосредственно ингибируют ЗН и такая обратная связь специфична в дольках, которые регулируют движения глаз и обрабатывают вестибулярную информацию [Guo C., 2016]. Количество КП на 1 мм длины извилины у 40-суточных крыс составляет 17–19. Общее число КП у крысы равно 340 тыс., площадь дендритного поля составляет 2 631 632 мкм² [Рыжавский Б. Я., 2003].

Предшественники КП формируются на 13–16-е сутки эмбриогенеза в вентрикулярном слое крыши четвертого желудочка, а затем, после последнего митоза, мигрируют в радиальном направлении, сначала образуют многорядный слой и только к 3–4-м суткам постнатального развития слой КП становится однорядным. Выравнивание КП в монослой обеспечивается механическими факторами: давлением расширяющегося зернистого слоя и барьером, образованным параллельными волокнами, препятствующими проникновению перикарионов КП в молекулярный слой. Клетки НЗС секретирует *reelin* и другие факторы, способствующие формированию монослоя КП. Затем расстояние между перикарионами быстро увеличивается до 12-х суток, что связано с формированием вокруг них корзиночек, образованных аксонами корзинчатых нейронов и глиальными клетками. Увеличение размеров самих перикарионов и рост дендритов продолжаются до 30-х суток [Altman J., 1977].

У новорожденных крысят в узком ободке цитоплазмы вокруг ядер КП содержится большое количество свободных рибосом,

комплекс Гольджи, в аксонах определяются микротрубочки, синапсы на теле КП отсутствуют и небольшое их количество появляется только к третьим суткам. У 10-суточных крыс в перикарионе содержится много митохондрий, гладкая эндоплазматическая сеть, тело КП окружено глией. У 15-суточных крыс перикарион КП обычно имеет круглую или грушевидную форму и заполнен цистернами гранулярной эндоплазматической сети [Altman J., 1972, 1977, Зиматкин С. М., Карнюшко О. А., 2019].

Увеличение горизонтального диаметра КП в первые три недели постнатальной жизни опережает увеличение вертикального диаметра, что способствует формированию дефинитивной грушевидной формы этих клеток [Олейник Т. Л., 1998]. У крысы площадь перикариона КП составляет 190–212 мкм² [Рыжавский Б. Я., 2003; Зиматкин С. М., Карнюшко О. А., 2019].

Постмиграционные КП мозжечка с 19-х суток эмбрионального развития по 6-е сутки после рождения осуществляют ремоделирование дендритов и проходят несколько этапов в своем развитии. В результате роста многочисленных новых первичных дендритов к первым суткам постнатальной жизни формируется сложная веретеновидная форма КП, на третьи сутки постнатального развития происходит ретракция дендритов – этап КП с регрессивно-атрофическими отростками, к пятым суткам КП приобретают звездчатую форму – имеют многочисленные перисоматические отростки [Armengol J. A., 1991; McKay B. E., 2005]. Путем использования молекулярного маркера микротрубочек MAP2 были выявлены различия в сроках роста дендритов КП для разных долек червя в развивающемся мозжечке. КП с более ранним развитием дендритов находились в филогенетически старых дольках I, II, IX, X, вдоль *fis. prima*, а области с более поздним созреванием – в VI, VII и VIII дольках – в филогенетически молодых [Goodlett C. R., 1990; Huber G., 1991].

При окраске крезилвиолетом в коре мозжечка встречаются светлые и темные КП, причем количество темных нейронов увеличивается с возрастом, а также при пост- и пренатальном патологическом воздействии [Емельянчик С. В., 2011; Рыжавский Б. Я., 2003]. При окраске нейронов по методу Бэкера (гистохимическое выявление фосфолипидов) установлено, что у 21-суточных крыс количество темных КП составляет 49,5 %, промежуточных – 17,7 %, светлых – 32,8 %. Изменение тинкториальных свойств цитоплазмы

КП отражает уровень их функциональной активности и связано в этот период с процессом миелинизации [Топорова С. Н., 1978].

Созревание КП исследовалось путем использования уникального маркера специфического гексапептидаocerebellina, локализуемого в дендритах и перикарионах КП. Cerebellin появляется в КП на 4–5-е сутки постнатального развития, а затем его уровень быстро увеличивается между 8 и 25-ми сутками. Появление данного маркера коррелирует с вступлением лазающих волокон в мозжечок и образованием синапсов с КП, а также увеличением числа синапсов дендритов КП с параллельными волокнами. Возможно, зернистые нейроны играют некоторую роль в регуляции биосинтеза данного маркера в КП, так как увеличение содержания cerebellina наблюдается параллельно формированию зернистого слоя [Slemmon J. R., 1985].

Аксоны КП могут устанавливать синаптические контакты с клетками-мишенями (нейронами ядер) уже на 20-е сутки эмбрионального развития [Eisenman L. M., 1991], а затем их количество прогрессивно увеличивается.

Нейроны зернистого слоя. Этот слой образован главным образом возбуждающими глутаматергическими *зернистыми нейронами* (ЗН), посредством которых моховидные волокна передают сенсорную информацию к КП. Это самые многочисленные нейроны мозга, их общее количество у крысы приблизительно 10^8 . Несмотря на то что в зернистом слое находятся другие ГАМК-ергические нейроны, ЗН угнетаются только клетками Гольджи [Farrant M., 2003].

Зернистые нейроны образуются из предшественников, находящихся на поверхности коры – *наружный зернистый слой* (НЗС), где пролиферация продолжается постнатально. НЗС образуется еще у 17-суточного эмбриона в результате миграции предшественников к наружной поверхности развивающегося мозжечка из ромбовидной губы. НЗС является герминативной зоной, состоящей из 5–6 рядов плотно прилежащих предшественников зернистых нейронов. Под мозговой оболочкой 1–2 ряда – это пролиферирующие клетки, которые после последнего митоза спускаются ниже и начинают тангенциальное движение; формируются два горизонтальных отростка, которые станут аксонами (параллельными нервными волокнами). На границе с молекулярным слоем клетки формируют ведущий вертикальный отросток, инициирующий переход к радиальной

миграции в еще тонкий внутренний зернистый слой. После завершения радиальной миграции вертикальный отросток ЗН дифференцируется в один из дендритов.

В коре проводниками мигрирующих ЗН через молекулярный слой и слой КП являются отростки радиальных астроцитов мозжечка (Бергманновской глии) [Altman J., 1972]. Изучение этих клеток мозжечка с помощью метода Гольджи показало, что незрелые глиальные клетки имеют неправильные контуры тела, несколько перпендикулярных тонких волокон, которые идут в НЗС и заканчиваются на пиальной поверхности, тела самих клеток залегают в глубокой части слоя КП. После 6-х суток расстояние между пиальной поверхностью и телами глиальных клеток и одновременно длина их волокон постепенно увеличивается в соответствии с утолщением молекулярного слоя. Количество волокон, выходящих из каждой глиальной клетки и входящих в НЗС, постепенно увеличивается, достигая максимума на 8-е сутки, а затем постепенно уменьшается. Эти изменения в количестве глиальных волокон соответствуют изменению количества клеток в НЗС, еще раз подтверждая тесное взаимодействие между этими двумя типами клеток в процессе развития мозжечка [Shiga T., 1983]. Экспрессируемый ЗН белок Neuregulin опосредует взаимодействие между нейронами и клетками глии [Rio C. et al., 1997]. Схожей функцией обладает астротактин [Astn2. Wilson P. M., 2010].

В ряде исследований было установлено, что миграционное поведение зернистых нейронов обусловлено генетической программой [Yasubova E., 2002], а также влиянием микроокружения, активацией специфических рецепторов (NMDA), Ca^{2+} каналов, изменением содержания внутриклеточного Ca^{2+} , полимеризацией и распадом микротрубочек, создающих тянущую и толкающую силу для перемещения ядра и цитоплазмы [Kumada T., 2004; Rakis P., 1996]. Миграция, дифференцировка и созревание ЗН регулируются различными факторами, которые включают гены, участвующие в регуляции клеточного цикла.

SDF-1 α (stromal-cell-derived factor) играет две важные роли в процессе развития мозжечка: способствует хемотаксису предшественников ЗН, в результате чего они локализуются в НЗС, а также совместно с Sonic hedgehog [Lewis P. M., 2004]) регулируют пролиферацию этих клеток. Фактор роста фибробластов, эпидермальный

и инсулиноподобный факторы роста также способствуют пролиферации предшественников ЗН [Hatten M. E., 1988]. Нейротрофический фактор BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) необходим для инициирования миграции этих клеток из НЗС во внутренний зернистый слой [Borghesani P. R., 2002], нейротрофин-3 способствует дифференцировке постмитотических, премиграционных предшественников ЗН, ускоряя их выход из НЗС [Doughty M. L., 1998]. Циклин D2, экспрессируемый предшественниками ЗН в постнатальном периоде, требуется для их пролиферации и формирования листков мозжечка [Huard J. M., 1999]. Негативные факторы (алкоголь, свинец, радиационное излучение и др.) влияют на рецепторы и сигнальные пути, в результате чего ЗН не могут мигрировать из НЗС и подвергаются апоптотической гибели.

Предполагали, что сигналом к прекращению миграции во ВЗС является «встреча» ЗН с моховидными волокнами [Будко К. П., 1985]. В настоящее время установлено, что соматостатин служит важным сигналом для прекращения движения на поздней фазе миграции.

Кроме того, протеолитические ферменты, разрушающие внеклеточный матрикс, облегчают миграцию нейронов. К ним относят матричные металлопротеиназы (ММР), которые способны ремоделировать межклеточную среду и регулировать сигнальные пути [Vaillant C., 1999; Van Hove I., 2012]. Тканевой активатор плазминогена (tPA) также облегчает миграцию ЗН, корзинчатых и звездчатых нейронов на уровне их пересечения в МС посредством разрушения внеклеточного матрикса [Raoult E., 2014].

Скорость миграции ЗН в формирующейся коре мозжечка меняется: наибольшая она в НЗС и МС, затем резко уменьшается в слое КП, при этом форма ЗН изменяется из веретеновидной в шаровидную. Вероятно, временная остановка ЗН в слое КП может быть необходима для начала программы дифференцировки или для правильного установления синаптических контактов во ВЗС. Известно, что во время эмбрионального и раннего постнатального развития моховидные волокна устанавливают прямые контакты с клетками Пуркинье. Предшественники зернистых нейронов, мигрируя мимо клеток Пуркинье, соединяются с моховидными волокнами, переключая их с клеток Пуркинье на себя. Механизм этого переключения пока неизвестен. В исследованиях установлено, что ЗН необходимы и для сокращения количества контактирующих лазающих волокон

с клетками Пуркинье. Поэтому ЗН играют важную роль в процессах установления структуры мозжечка и на более тонком уровне для обеспечения правильного формирования нейронных цепей [Laskey E. P., 2018]. Показано, что сигнал к остановке ЗН связан с высвобождением гипофизарного активирующего аденилатциклазу полипептида (РАСАР), экспрессируемого КП [Galas L., 2017]. Десенсibilизация рецепторов РАСАР позволяет ЗН ускорять миграцию в ВЗС [Cameron D. B., 2007; Raoult E., 2014].

Большинство ЗН формируется между 7–15-ми сутками постнатального развития. К 20–21-м суткам НЗС исчезает, и созревают возбуждающие синапсы параллельных волокон на дендритах КП. Диаметр зрелых ЗН составляет 4–6 мкм. Длина их аксонов – параллельных волокон – равна 4,2–4,7 мм, они формируют большинство синапсов на дендритах КП. Во ВЗС синаптические контакты дендритов ЗН с моховидными волокнами образуют клубочки мозжечка [Фанарджян В. В., 1992]. Гистохимические и электронно-микроскопические исследования показали, что созревание клубочков происходит в течение первых трех недель постнатального развития крысы [Jakab R. L., 1988; Зиматкин С. М., 2016. Синаптогенез]. В ходе дифференцировки клубочков различают два этапа. Первый этап (протогломерулярный) проходит у крыс в течение первых двух недель постнатального развития. Характеризуется быстрым расширением розеток моховидных нервных волокон, а также интенсивным расширением постсинаптических дендритов. Второй этап (гломерулярный) – развитие и стабилизация клубочков – проходит с 15-х по 45-е сутки [Natori J., 1983].

Клетки Гольджи (большие звездчатые нейроны) по размеру перикарионов – самые крупные нейроны зернистого слоя. Путем использования антител против метаботропного глутаматного рецептора 2 (mGluR₂) и нейрогранина (кальмодулин-связывающий белок) в качестве маркеров выделено пять подтипов этих клеток. В зернистом слое клетки Гольджи получают возбуждающие импульсы от моховидных волокон [Kanichay R. T., 2008], в молекулярном слое – от параллельных волокон (аксонов зернистых нейронов) [Euge M., 2016]. Аксоны клеток Гольджи ветвятся в зернистом слое, входят в состав клубочков мозжечка и обеспечивают отрицательную обратную связь с ЗН, угнетая их активность путем высвобождения ингибирующего нейромедиатора ГАМК [Hull C., 2012; D'Angelo E., 2013].

Ингибирующие входы в клетки Гольджи ГАМК-ергические. Несмотря на то что дендриты этих клеток находятся в молекулярном слое, есть работы, указывающие, что они не угнетаются нейронами молекулярного слоя [Hull C., 2012]. Другие исследователи не исключают такую возможность [Eyre M., 2016]. Кроме того, клетки Гольджи обеспечивают ГАМК-ергическую иннервацию друг друга – КГ-КГ) [Hull C., 2012]. В вестибулоцеребеллуме клетки Гольджи кроме ЗН ингибируют также униполярные кисточковые нейроны [Dugué G. P., 2005].

Клетки Гольджи образуются в вентрикулярной зоне на 14–18-е сутки эмбрионального развития. Между 5 и 7-ми сутками после рождения они имеют несколько спускающихся в зернистый слой аксонов и созревающих дендритов, к 15-м суткам клетки Гольджи имеют конфигурацию взрослых клеток. У 15- и 21-суточных крысят они имеют дольчатое ядро, развитый комплекс Гольджи, цитоплазму, богатую ГрЭС, митохондриями, и редкое глиальное окружение. На 12-е сутки терминали аксонов клеток Гольджи определяются на дендритах ЗН и становятся более частыми у взрослых животных [Altman J., 1972]. Морфологическое созревание этих нейронов завершается к 21–28-м суткам постнатальной жизни.

Клетки Люгаро (веретенovidные горизонтальные нейроны) – единственные нейроны коры мозжечка, которые возбуждаются серотонинергическими афферентными волокнами [Dieudonne S., 2000]. Клетки Люгаро по их расположению, форме и размеру перикарионов разделяют на четыре подтипа: большие клетки Люгаро, [Мелик-Мусян А. Б., 2003], малые клетки Люгаро веретенovidной и шаровидной формы (глобулярные клетки) локализуются непосредственно под слоем клеток Пуркинье [Hirono M. et al., 2012; Lainé J., 2002; Lainé J., 1998]. Они образуют тормозные ГАМК-ергические и глицинергические синапсы на клетках Гольджи, ГАМК-ергические синапсы на корзинчатых, звездчатых нейронах [Dumoulin A., 2001; Lainé J., 1998] и КП [Dean I., 2003].

В электрофизиологических экспериментах продемонстрировано, что КП устанавливают прямые ингибирующие синаптические контакты на глобулярных клетках Люгаро, а возбуждающие импульсы последние получают от моховидных волокон [Hirono M. et al., 2012]. Возбуждение глобулярных клеток от моховидных волокон приводит к активации КП двумя путями: через ингибирование

тормозных нейронов молекулярного слоя (звездчатых и корзинчатых) и облегчение передачи импульса от зернистых нейронов за счет угнетения клеток Гольджи. Обратная ГАМК-ергическая связь от КП поступает по коллатералям их аксонов [Hirono M. et al., 2012].

Имеются данные, что клетки Люгаро образуются на 14–15-е сутки эмбрионального развития. По всей вероятности, они возникают вместе с другими нейронами коры мозжечка из нейроэпителлия четвертого желудочка. Клетки Люгаро приобретают морфологические черты, характерные для зрелых клеток с середины первой постнатальной недели [Laine J., 1998]. Клетки Люгаро мигрируют через белое вещество к своему окончательному местоположению под клетки Пуркинье к 5-м суткам после рождения.

Униполярные кисточковые нейроны (УКН) расположены в зернистом слое и являются возбуждающими глутаматергическими нейронами. По современной гистологической номенклатуре их называют **щеточными нейронами**. Они имеют один относительно толстый дендрит разной длины, который заканчивается как кисть, состоящая из нескольких коротких веточек-дендриолей [Consalez G., 2013; Mugnaini E., 1994]. Кисточки образуют гигантские глутаматергические синапсы с терминалями моховидных волокон [Anelli R., 2001; Dino M. R. et al., 2000; Harris J., 1993]. УКН получают возбуждающие синаптические входы от моховидных волокон, а их аксоны образуют асимметричные синапсы с дендритами не только ЗН, но и других УКН, передающих возбуждение другим ЗН. Таким образом, они играют определенную роль в усилении сигналов от поступающих в кору моховидных волокон. Эти клетки имеют ключевое значение в осуществлении таких сенсомоторных процессов, как регуляция положения тела, головы и глаз [Степаненко А. Ю., 2009; Mugnaini E., 2011; Englund C., 2006]. УКН локализуются преимущественно в черве и флокулонодулярной доле, реже – в полушариях мозжечка [Mugnaini E., 2011; Dino M. R. et al., 2000]. Эти нейроны по размеру промежуточные между ЗН и большими звездчатыми нейронами. От тела УКН вблизи дендрита отходит аксон, не покрытый миелином, который ветвится и образует несколько коллатералей, заканчивающихся в клубочках внутреннего зернистого слоя, формирует асимметричные синапсы с дендритами ЗН и дендритами других УКН, передающих возбуждение на ЗН, создавая таким образом внутрикорковую систему моховидных волокон [Berthie B., 1994; Nunzi M. C., 2000].

Предшественники УКН мигрируют из ромбической губы двумя клеточными потоками: дорсальный путь в развивающееся белое вещество мозжечка, где они проникают во внутренний зернистый слой; большинство УКН достигают ВЗС после рождения и начинают созревание в течение первого постнатального месяца, и роstralный путь – в направлении ствола мозга.

Путем использования антител против ионотропного рецептора глутамата GluR2 и кальцийсвязывающего белка кальренина были найдены две популяции УКН. Около 30 % УКН были кальренин- и GluR2-положительными, в то время как остальные – кальренин-отрицательными и GluR2-положительными. У крыс УКН образуются из предшественников, пролиферирующих между 16–21-ми сутками эмбрионального развития. Пик образования кальренин-иммунореактивных УКН приходится на 17–18-е сутки эмбрионального развития. УКН GluR2-положительные, но кальренин-отрицательные образуются с 19 по 21-е сутки эмбрионального развития, также часть GluR2-положительных УКН – до и после 22-х суток. Митотическое деление этих клеток завершается перед созреванием ЗН и совпадает с дифференцировкой первых больших звездчатых нейронов [Sekerova G., 2004].

В течение постнатального развития происходит созревание кисти дендрита УКН в четыре этапа: со 2 по 12-е сутки – протодендритические УКН, характеризующиеся наличием коротких толстых ветвящихся дендритов и отходящих от них тонких филоподий; с 12 по 16-е сутки – филоподиевая кисть – растущие отростки превращаются в первичные дендриоли, на вершине которых формируются конусы роста, дающие одну или несколько филоподий; с 16 по 21-е – промежуточная кисть, характеризующаяся ретракцией филоподий и увеличением ветвления кисточки; завершающий этап совпадает с периодом, когда основная масса МВ проникла в мозжечок; с 21 по 28-е сутки – дендриолярная кисть [Morin F., 2001].

Нейроны ядер мозжечка. В толще белого вещества расположены парные ядра мозжечка – фастигиальное, промежуточное и латеральное (зубчатое). Наиболее филогенетически древним является фастигиальное ядро, наиболее молодым – зубчатое. Они интегрируют афферентную информацию от коры мозжечка и коллатералей моховидных и лазающих волокон и формируют эфферентные пути от мозжечка к другим отделам мозга [Teune T. M. et al., 2000].

Наиболее многочисленными синапсами на нейронах ядер мозжечка являются ГАМК-ергические, которые образованы аксонами клеток Пуркинье от червя, окологермальной и латеральной части полушария мозжечка соответственно [Habas C., 2010]. По электрофизиологическим, морфологическим и биохимическим свойствам различают несколько типов нейронов ядер мозжечка: 1) большие глутаматергические нейроны, 2) мелкие ГАМК-ергические; 3) большие глицинергические; 4) мелкие ГАМК/глицинергические; 5) мелкие неГАМК-ергические [Uusisaari M., 2011, 2007].

В эмбриогенезе нейроны ядер проходят сложный путь миграции. Так, нейроны филогенетически наиболее старого медиального ядра закладываются на 16-е сутки эмбрионального развития рострально на дорсальной поверхности мозжечка и являются биполярными. На 18-е сутки нейроны мигрируют в ростокаудальном и дорсовентральном направлении, принимая при этом косую или вертикальную ориентацию. На 19–20-е сутки они занимают дефинитивное положение. В этот же период происходит развитие дендритов [Bourrat F., 1986]. То есть миграция нейронов медиального ядра проходит в две фазы. В течение первой фазы миграции нейроны достигают так называемой транзитной ядерной зоны [Altman J., 1977], где они дифференцируются и удлиняют аксоны, которые пересекают среднюю линию. Во вторую фазу миграции происходит перемещение нейронов ядер мозжечка в вентральном направлении, которое, возможно, является пассивным процессом в результате миграции КП [Altman J., 1972].

Афферентные волокна. Афферентные волокна, проникая в кору мозжечка преимущественно в составе ножек мозжечка, отдают коллатерали и на нейроны ядер мозжечка. Активность *лазющих волокон* (ЛВ) – один из показателей зрелости мозжечка, опережает созревание афферентного входа моховидных волокон. Основным источником происхождения ЛВ считается нижняя олива. Каждое ЛВ образует прямой, большой по площади моносинаптический контакт (медиаторы – аспартат [Vollenweider F. X., 1990] и глутамат [Zhang, N., 1993]) на проксимальной части дендритного дерева КП. ЛВ достигают коры развивающегося мозжечка на 17-е сутки эмбрионального развития, устанавливают синаптические контакты с КП к 18–19-м суткам и функционально активны с третьих суток после рождения [Millen K. J., 2008]. В онтогенезе контакты между ЛВ и КП вначале образуются на уровне тела, затем перемещаются вверх к дендриту.

КП проходят синаптическую перестройку от множественной иннервации ЛВ к моменту рождения максимум от 3 до 6, а затем избыточные ЛВ элиминируются к 15-м суткам и КП становятся моноиннервированными [Hashimoto K., 2013].

Моховидные волокна (МВ) образуют большинство афферентных волокон коры мозжечка. Источником МВ являются аксоны нейронов ствола мозга (клиновидное, вестибулярное, ретикулярное, красное ядро и переднее ядро моста) и спинного мозга. Терминали МВ в зернистом слое коры мозжечка образуют возбуждающие синаптические контакты (медиатор – глутамат [Garthwaite J., 1990]) на дендритах зернистых нейронов. Первые моховидные волокна из вестибулярного ядра, которые направляются в мозжечок крысы, присутствуют в его зачатке на 13-е сутки эмбрионального развития. Следующие моховидные афферентные волокна, идущие из вестибулярного ядра и спинного мозга проникают в мозжечок на 15–22-е сутки эмбрионального развития крысы. Наконец, моховидные волокна из латерального ретикулярного ядра и моста достигают мозжечка у новорожденных крыс [Zhang, 1993].

Многослойные афферентные нервные волокна делят на пять групп на основе медиаторов, используемых для связи. Нейромодулирующие афферентные нервные волокна оканчиваются во всех трех слоях коры мозжечка и ядрах мозжечка [Saitow F., 2009]. *Серотонинергические* нервные волокна являются третьим основным афферентным входом (от ретикулярной формации), проникают в кору мозжечка постнатально. Предполагают, что серотонин в развивающемся мозжечке модулирует морфологическое и физиологическое созревание клеток Пуркинье, рост дендритов, а затем образование и стабилизацию синапсов [Oostland M., 2013].

Второй по величине нейромодулирующий вход в мозжечок образуют *норадренергические* афферентные нервные волокна от *locus coeruleus* моста. Норадренергические волокна обнаруживаются вокруг дендритов клеток Пуркинье, клубочков, дендритов зернистых нейронов и ядер мозжечка [Berridge C. W., 2003]. Вестибулярные афферентные волокна в коре мозжечка являются холинергическими. *Холинергические* афферентные волокна мозжечка крысы возникают в *nucleus tegmentalis pedunculopontinus*, латеральном парагигантоклеточном ядре и в меньшей степени – в разных ядрах шва.

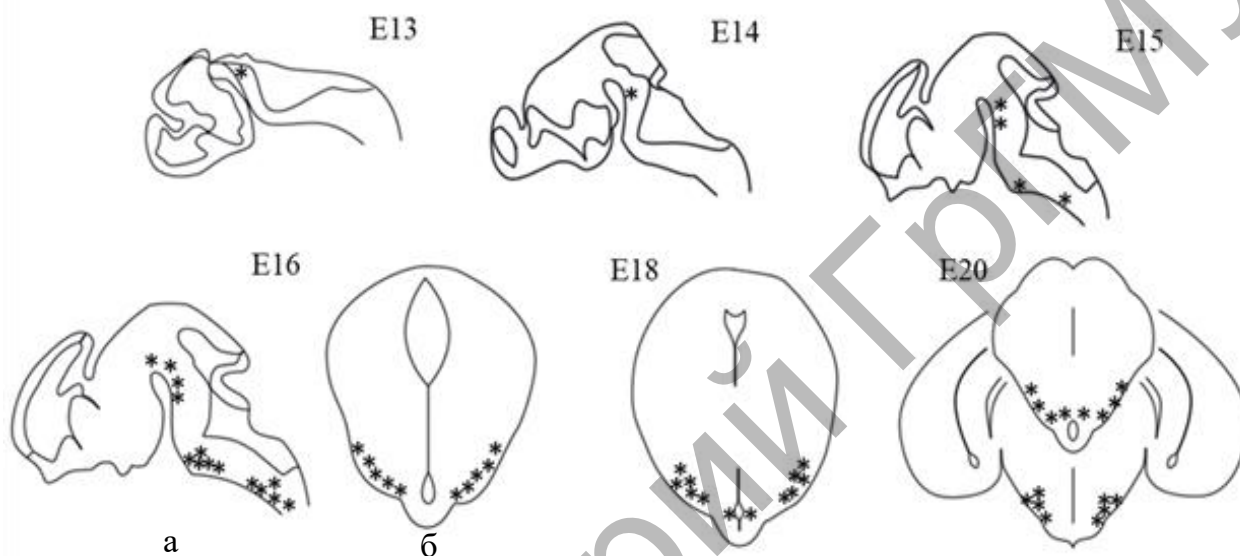
Холинергические афференты оканчиваются в зернистом и молекулярном слоях мозжечка у крысы [Jaarsma D. et al., 1997]. *Дофаминергические* афферентные нервные волокна редкие, приходят в кору и ядра мозжечка, главным образом из вентральной тегментальной области [Ikai Y. et al., 1992]. Показано, что дофамин может влиять на пластичность клеток Пуркинье. *Гистаминергические* афференты от гипоталамуса присутствуют в мозжечке крысы [Zhang X. Y., 2016], который также вовлечен в регуляцию висцеральных функций.

Гистаминергические нейроны мозга

У крысы гистаминергические нейроны впервые обнаруживаются в головном мозге 13-дневных эмбрионов на границе среднего и заднего мозга (рисунок 1.3). Время появления этих нейронов хорошо коррелирует с онтогенезом других аминергических систем мозга [Auvinen S., Panula P., 1988]. На 14-й день пренатального развития гистаминиммунореактивные нейроны ограничены той же областью, что и в предыдущий день: они располагаются вентрально от силвиева водопровода по обеим сторонам вентральной части нервной трубки [Auvinen S., Panula P., 1988; Ugrumov M. V., 1997]. Там же можно увидеть гистаминиммунореактивные волокна, собранные в два нервных пучка, расходящихся в ростральном и каудальном направлениях [Ugrumov M. V., 1997]. При этом в варолиевом мосту, таламусе, желудочковом нейроэпителии и кортикальной пластинке отмечается высокий уровень экспрессии H1-гистаминовых рецепторов [Kinnunen A. et al., 1998].

На 15-й день эмбриогенеза гистаминиммунореактивные нейроны обнаруживаются также в области среднемозгового изгиба задней части вентрального отдела среднего мозга, в заднем мозге и на каудальной стороне мостового изгиба продолговатого мозга (рисунок 1.3). Эти клетки посылают гистаминиммунореактивные волокна в ростральном направлении вокруг теменного изгиба, расположенного в области среднего мозга, на мамиллярные тела заднего отдела гипоталамуса и в лобные доли коры больших полушарий, а также в каудальном направлении к продолговатому мозгу, на дорсальной поверхности которого появляются толстые пучки этих волокон [Auvinen S., Panula P., 1988]. Полученные данные в целом

согласуются с результатами ранее проведенных исследований, которые указывают на то, что для аминергических нейронов существует систематическая каудально-ростральная волна нейрогенеза [Altman J., Bayer S. A., 1980, 1981]. В этот же период в развивающихся кортикальной пластинке и варолиевом мосту головного мозга крысы обнаруживается мРНК гистаминовых H2-рецепторов, а в эпителии желудочка среднего мозга и спинном мозге появляется экспрессия H3- рецепторов [Panula P. et al., 1992].



* – расположение групп гистаминергических нейронов;

E13–E15 – сагиттальные срезы головного мозга крысы на 13–15-й дни эмбриогенеза [66]; E16 – (а) сагиттальный срез головного мозга крысы [130], (б) – фронтальный срез головного мозга крысы (гипоталамическая область) на 16-й день эмбриогенеза; E18–E20 – фронтальные срезы головного мозга крысы (гипоталамическая область) на 18–20-й дни эмбриогенеза [142]

Рисунок 1.3 – Расположение групп гистаминергических нейронов в срезах головного мозга крысы на 13–20-й дни эмбриогенеза

На 16-й день эмбрионального развития (рисунок 1.3) гистамин-иммунореактивные нейроны, кроме того, замечены по обе стороны от срединной линии на вентральной стороне сильвиева водопровода, на каудальной и вентральной сторонах варолиева моста. Волокна среднего мозга, моста и продолговатого мозга похожи на те, которые выявляются на 15-й день эмбрионального развития, но восходящие волокна, проходящие через латеральный гипоталамус, теперь иннервируют более обширные области коры, включая лобную и теменную доли. Отмечена высокая экспрессия гистамина в нервных окончаниях

латеральной части базального гипоталамуса [Auvinen S., Panula P., 1988]. Кроме того, экспрессия H3-рецепторов отмечается уже во всех основных отделах мозга [Héron A. et al., 2001]. На 17-й день внутриутробного развития гистаминиммунореактивные нейроны ограничены областью, описанной ранее, но их гистаминиммунореактивность становится менее выраженной. Кроме того, иммунореактивность к гистамину уменьшается в нервных волокнах варолиева моста, среднего и продолговатого мозга. При этом восходящие волокна обнаруживаются в тех же областях, что и на 16-й день эмбриогенеза. Гистаминиммунореактивность в латеральной части базального гипоталамуса несколько увеличивается [Auvinen S., Panula P., 1988].

Указанные выше нейроны между 14 и 16-м днями эмбрионального развития у крыс и мышей формируют временную переходную гистаминергическую систему [Crespo D. et al., 1988]. Она локализуется в ядрах шва, представляющих собой скопление нейронов в средней части ретикулярной формации. Совместное присутствие ГДК и ее мРНК указывает на то, что в этих нейронах образуется гистамин [Panula P., Lintunen M., Karlstedt K., 2002], сосуществующий с серотонином в пределах одной и той же популяции клеток [Panula P., Lintunen M., Karlstedt K., 2002; Ugrumov M. V., 1997]. Нейроны переходной системы формируют два продольных пучка по обеим сторонам вентральной пластинки нервной трубки, которые простираются от дорсального ядра шва через срединный шов по направлению к большому ядру шва, и посылают свои аксоны как в передний, так и в задний мозг [Auvinen S., Panula P., 1988]. Эта переходная система анатомически полностью отличается от зрелой гистаминергической нейронной системы заднего гипоталамуса, которая развивается позже [Auvinen S., Panula P., 1988; Matsuzaki K. et al., 2009]. Наличие такой переходной гистаминергической системы в варолиевом мосту на 16-й день эмбриогенеза у крыс подтверждается и в более поздних исследованиях [Moriwaki C. et al., 2015].

В этой переходной системе гистамин- и серотониниммунореактивные нейроны формируют одну обособленную популяцию клеток. Эксперименты с двойным окрашиванием демонстрируют, что, по крайней мере, в некоторых нейронах шва оба амина локализуются совместно. С 18-го дня эмбрионального развития иммунореактивность к гистамину в описываемой области начинает исчезать, а серотонинергические нейроны мигрируют к своему конечному

положению в ядрах шва [Parnavelas J. G., Lieberman A. R., 1979]. В это время в телах клеток, расположенных ближе к середине вентральной пластинки нервной трубки, нарастает содержание серотонина, что соответствует локализации группы нейронов зрелой серотонинергической системы, формирующей скопление В9, где обнаруживаются только следы гистаминиммунореактивности. Анализ на клеточную гибель не выявил апоптоза серотониновых и гистаминовых ко-экспрессирующих нейронов [A. Kinnunen et al., 1998]. При этом миграция гистаминиммунореактивных нейронов из ромбовидного мозга в сторону туберомамиллярного ядра между 14 и 20-м днями эмбрионального развития также не обнаружена [Ugrumov M. V., 1997]. Поэтому вполне возможно, что данные нейроны подвергаются фенотипическому переключению, чтобы прекратить производство гистамина. Такое явление наблюдалось и в некоторых других типах нейронов в гипоталамусе грызунов [Onodera K. et al., 1994].

Наличие переходной гистаминергической системы предполагает тесную связь между гистамином и серотонином во время развития головного мозга крыс, причем гистамин, возможно, действует как тонкий регулятор развития серотонинергической системы, берущей начало в ромбовидном мозге, поскольку формирование ядер шва совместно с дифференциацией серотонинергических нейронов и развитием их путей иннервации происходит в период временной экспрессии гистамина в данной области. Функциональное значение переходной гистаминергической системы неизвестно, однако предполагается, что она может играть важную роль в развитии мозга, поскольку пики числа переходных гистаминергических нейронов и нейрогенеза совпадают [P. Panula et al., 1992]. Интересно, что у самых примитивных позвоночных, миног, она сохраняется на протяжении всей жизни [Haas H. L., Sergeeva O. A., Selbach O., 2008].

На 18-й день внутриутробного развития иммунореактивность к гистамину значительно снижается в волокнах варолиевого моста, заднего и продолговатого мозга. Это позволяет предположить, что такие каудально направленные проекции волокон образованы нейронами именно переходной гистаминергической системы. Количество гистаминиммунореактивных волокон в переднем мозге, напротив, увеличивается. В это время обонятельный мозг, особенно его центральная часть, содержит плотную сеть гистаминиммунореактивных волокон. Много таких волокон встречается также в септальной,

гипоталамической и перивентрикулярной областях [Auvinen S., Panula P., 1988].

Развитие гипоталамуса – места единственной локализации гистаминергических нейронов во взрослом мозге – инициируется клеточной пролиферацией в вентрикулярной краевой зоне, прилегающей к стенке третьего желудочка, с последующим образованием нейробластов или постмитотических клеточных популяций снаружи от герминативного слоя во время второй половины беременности у крыс, в середине беременности – у кошек, в первой четверти беременности – у макаков-резусов. Интересно, что у австралийского сумчатого животного, тамнара (*Macropus eugenii*, небольшое млекопитающее семейства кенгуровых), на 12-й день после рождения развивающийся гипоталамус в основном состоит из вентрикулярной краевой зоны с тонким маргинальным слоем, но к 25-му дню постнатального периода большинство гипоталамических ядер уже хорошо дифференцированы. Для людей характерен ранний гипоталамический нейрогенез, берущий начало в первом триместре беременности [Kawabata I., 1965].

По результатам проведенного автораддиографического исследования с использованием ^3H -тимидина J. Altman и S. Bayer предположили, что ТМ нейроны появляются из вентрикулярной зоны, окружающей мамиллярное углубление третьего желудочка, а затем мигрируют в латеральном направлении к своему конечному положению, характерному для взрослых [J. Altman, S. A. Bayer, 1986]. Исходя из этого, Р. В. Reiner et al. предположили, что после нейрогенеза в вентрикулярной зоне все нейроны ТМ области могут мигрировать к боковому краю мамиллярного тела, а затем некоторые из этих нейронов могут снова мигрировать в свое конечное положение на дорсолатеральном краю мамиллярного углубления третьего желудочка. Однако градиентов каудально-рострального нейрогенеза для нейронов ТМ области не отмечено. С 13 по 16-й день их количество неуклонно возрастает, что совпадает с пиком их митотической активности, которая к 18-му дню внутриутробного развития затухает. Установлено, что все нейроны ТМ области, независимо от их расположения во взрослом мозге, претерпевают свое окончательное митотическое деление одновременно. При этом ГДК впервые выявляется в них на 16-й день пренатального развития. В это время отдельное скопление ГДК-иммунореактивных нейронов

отмечается в латеральной части ТМ области, а редкие ГДК-положительные нейроны обнаруживаются медиально вблизи мамиллярного углубления третьего желудочка. С 17 по 20-й дни пренатального развития наблюдается постепенное вытягивание скопления латерально залегающих ГДК-позитивных нейронов. Одновременно происходит увеличение количества этих нейронов в клеточном мостике, простирающемся в сторону дорсальной части мамиллярного углубления третьего желудочка.

ГДК-иммунореактивные нейроны гипоталамуса начиная с 16-го дня эмбриогенеза подвергаются существенным морфологическим изменениям. Так, размер перикариона на 16-й день пренатального развития составляет 8,4 мкм, затем он постепенно возрастает в три раза, достигая взрослого значения. Развитие дендритных отростков идет параллельно этому увеличению размеров перикариона: на 16-й день внутриутробного развития практически все ГДК-иммунореактивные нейроны имеют сферическую форму; к 17-му дню эмбрионального развития некоторые ГДК-положительные нейроны протягивают один короткий иммунореактивный отросток; к моменту рождения у большинства ГДК-иммунореактивных нейронов насчитывается два полярных дендрита. Однако развитие дендритов, по-видимому, не происходит одновременно во всех нейронах ТМ, так как еще на 20-й день эмбриогенеза некоторые ГДК-положительные нейроны могут быть сферической формы, без дендритных отростков и малого диаметра, в то время как другие нейроны обладают только одним дендритом [Matsuzaki K. et al., 2009].

Таким образом, возникновение гистаминергических нейронов мозга крысы завершается к 20-му дню эмбриогенеза [Auvinen S., Panula P., 1988; Panula P., Lintunen M., Karlstedt K., 2002; Ugrumov M. V., 1997]. В это время гистаминиммунореактивные нейроны наблюдаются только в каудальном, туберальном и постмамиллярном каудальном крупноклеточных ядрах ТМ области гипоталамуса, а в среднем и продолговатом мозге полностью исчезают. Нейроны туберомамиллярной области подвергаются своему окончательному митотическому делению до экспрессии их фенотипа передатчика [Matsuzaki K. et al., 2009].

Согласно Ch. Moriwaki et al. [C. Moriwaki et al., 2015], первые гистаминергические нейроны, появляющиеся на 13-й день эмбрионального развития на границе среднего и заднего мозга (рисунок 1.3),

постепенно формируют две популяции клеток (одна из них обнаруживается около боковой области заднего гипоталамуса, а вторая на 16-й день эмбриогенеза образует две субпопуляции клеток – по обе стороны срединной линии на вентральной стороне сильвиева водопровода и на каудальной стороне варолиева моста), прежде чем к 20-му дню пренатального развития в заднем отделе гипоталамуса, наконец, сформировать туберомамиллярный комплекс, который в дальнейшем будет содержать пять нейронных скоплений (E1-E5), составляющих гистаминергическую систему взрослых позвоночных.

Первые три скопления E1-E3 развиваются из пограничной области между средним и задним мозгом, а последние два скопления E4-E5 развиваются из области около сильвиева водопровода промежуточного мозга. Это предполагает миграцию гистаминергических нейронов из среднего и заднего мозга в гипоталамус. Субпопуляция клеток, выявленная на 16-й день эмбриогенеза на каудальной стороне варолиева моста, по-видимому, формирует переходную гистаминергическую систему. Способ эмбрионального развития гистаминергических нейронов у крыс и мышей имеет высокую степень сходства, несмотря на более короткий период развития у мышей [M. J. Nissinen et al., 1995].

Таким образом, эмбриональное происхождение гистаминергических нейронов заднего гипоталамуса остается неясным. По одним представлениям [Kinnunen A. et al., 1998; Matsuzaki K. et al., 2009; Ugrumov M. V., 1997], они появляются из перивентрикулярных предшественников сразу в области гипоталамуса уже с 16-х суток эмбриогенеза и способны мигрировать только в пределах этой области. При этом выявляемые на 13–16-е сутки в среднем и заднем мозге гистаминергические нейроны относятся к переходной гистамин-серотонинергической системе и являются временными, не мигрируют в гипоталамус, а теряют способность к синтезу гистамина.

По другим представлениям [Moriwaki C. et al., 2015], гистаминергические нейроны гипоталамуса (по крайней мере, ядра E1-E3) появляются в результате миграции части гистаминергических нейронов среднего и заднего мозга, образующихся там с 13-х суток эмбриогенеза. По нашему мнению, такая отдаленная миграция зрелых нейронов со сформированным медиаторным фенотипом представляется маловероятной.

Глава 2

ПРОЛИФЕРАЦИЯ И МИГРАЦИЯ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ НЕЙРОНОВ МОЗГА

Большинство нейронов мозга образуются антенатально, еще до рождения животных и человека. Сначала путем митотического деления нейробластов, образовавшихся из клеток вентрикулярного слоя нервной трубки, появляются их предшественники. Они мигрируют в области конечного расположения нейронов каждого типа, где они формируют слои (в коре большого мозга и мозжечка) или ядра (скопления нейронов в остальных отделах мозга). При этом предшественники дифференцируются, созревают и приобретают морфофункциональные свойства зрелых нейронов. Это происходит, преимущественно, в постнатальный период.

Известно, что деление нейронов головного мозга обычно завершается в эмбриогенезе – до рождения животных и человека. Во взрослом мозге выявляются единичные нейрогенные стволовые клетки в околожелудочковой области, зубчатой извилине и обонятельных луковицах, которые способны к делению. Развитие мозжечка в онтогенезе сопровождается пролиферацией, миграцией, дифференцировкой нейронов, формированием между ними синаптических связей. Предшественники клеток Пуркинье формируются на 13–16 дни эмбриогенеза крысы в вентрикулярном слое крыши четвертого желудочка, а затем мигрируют в радиальном направлении, сначала образуя в будущей коре мозжечка многорядный слой и только к 3–4 дню постнатального развития – однорядный.

Кроме того, в раннем постнатальном онтогенезе, во временном, наружном зернистом слое (НЗС), выявляются митотически делящиеся предшественники зернистых нейронов коры мозжечка. Интересно, что последние появляются только после рождения и являются самыми мелкими и многочисленными нейронами мозга.

НЗС является герминативной зоной, состоящей из 3–6 рядов предшественников зернистых нейронов. При этом 1–3 наружные ряда образуют пролиферирующие клетки, которые после последнего

митоза вытесняются во внутренние ряды НЗС, готовятся к миграции, принимают веретеновидную форму и начинают радиальную миграцию в область будущего внутреннего зернистого слоя (ВЗС). У крыс НЗС наибольшего развития достигает к 7 суткам, и между 7–15-ми сутками постнатального развития образуется большинство зернистых нейронов, формирующих ВЗС. К 20–21-м суткам постнатальной жизни у крыс НЗС исчезает и новообразование зернистых нейронов прекращается.

В делящихся предшественниках зернистых нейронов экспрессируется пептид **Ki-67**, который иммуногистохимически выявляется в ядрах этих клеток. Точнее, Ki-67 присутствует только в ядрах клеток в фазах G^1 , S, G^2 и особенно во время митоза. При переходе клеток в фазу G_0 , пептид Ki-67 быстро подвергается катаболизму и не обнаруживается в ядрах интерфазных клеток.

Используя данный маркер, мы избирательно выявляли делящиеся клетки в НЗС коры развивающегося мозжечка на 2–20 дни после рождения. Установлено, что в наружном зернистом слое (НЗС) коры мозжечка, который является источником предшественников зернистых нейронов, Ki-иммунопозитивные клетки определялись на 2–15-е сутки после рождения (рисунок 2.1).

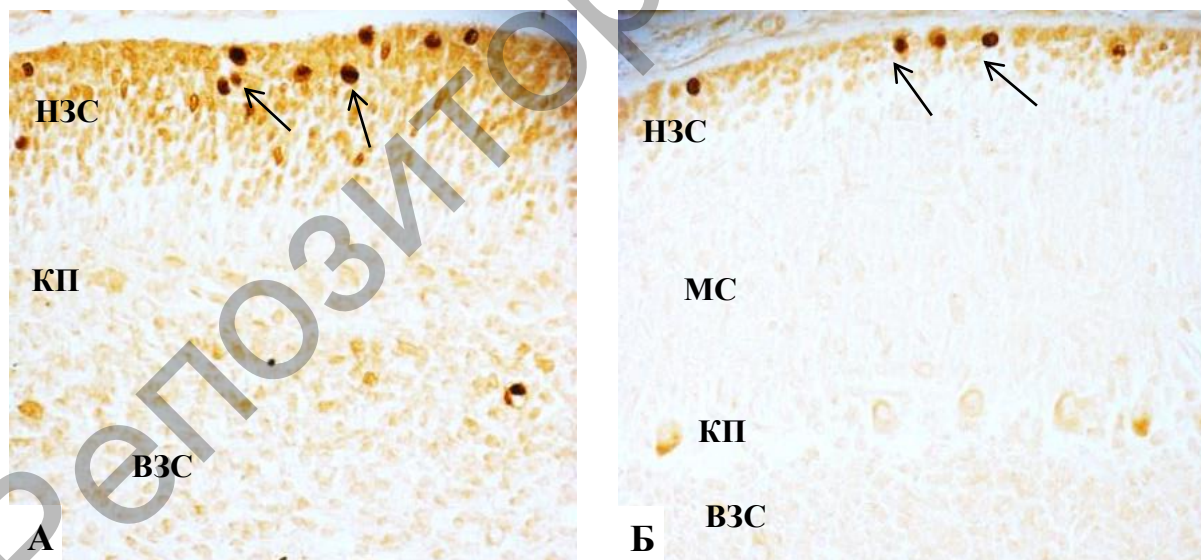


Рисунок 2.1 – Экспрессия Ki-67 в делящихся предшественниках зернистых нейронов (показаны стрелками) развивающейся коры мозжечка крыс: 7-е сутки (А), 15-е сутки (Б) после рождения

НЗС – наружный зернистый слой; КП – клетки Пуркинье;

ВЗС – внутренний зернистый слой.

Иммуноцитохимическая реакция на Ki-67. Ув. 200

Показано, что, хотя визуально количество Ki-иммунопозитивных нейронов в НЗС максимально на 7-й день (рисунок 2.1), плотность их расположения со 2-го дня уменьшается. У 15-суточных крыс их количество на единицу площади НЗС в 2 раза меньше, чем у 2-суточных (рисунок 2.2). Это свидетельствует о постепенном уменьшении митотической активности предшественников зернистых нейронов в НЗС. Она полностью исчезает после 20-го дня, при исчезновении этого слоя, когда все предшественники зернистых нейронов заканчивают миграцию в дефинитивный, внутренний зернистый слой и переходят в Go фазу [Зиматкин С. М., Карнюшко О. А., 2016].

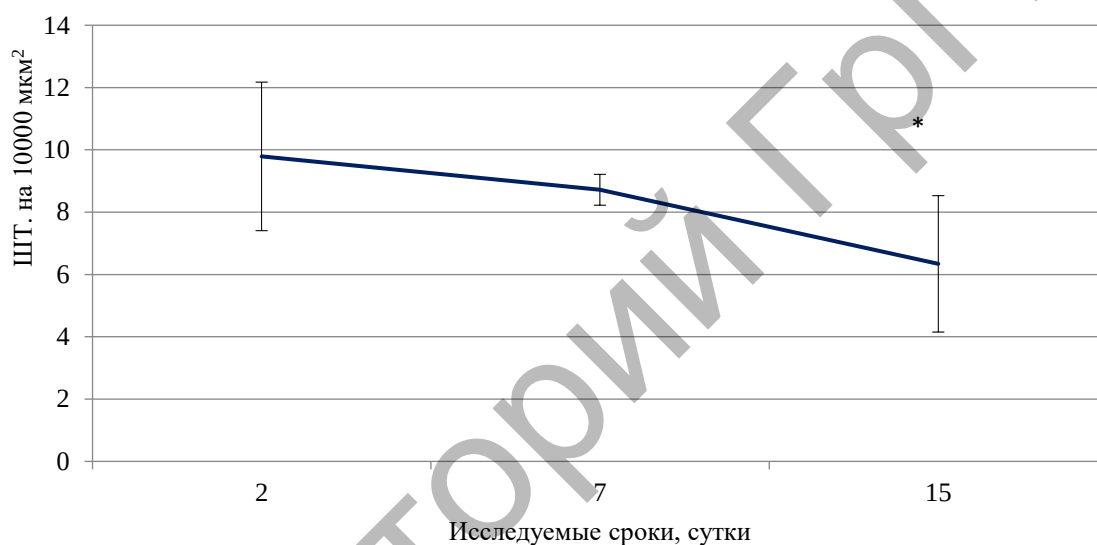


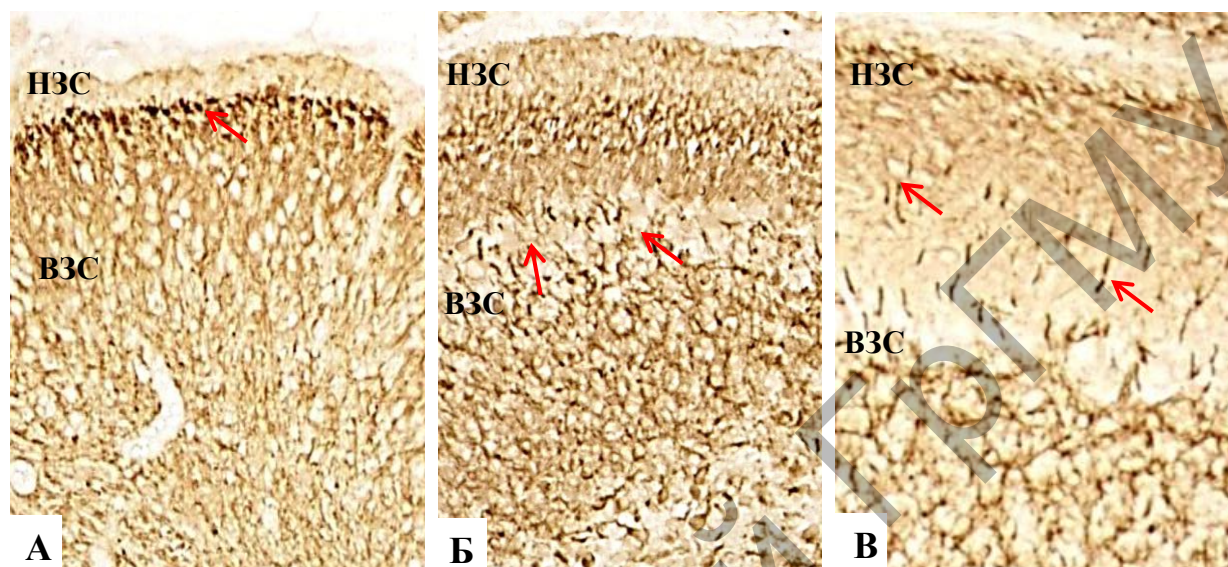
Рисунок 2.2 – Количество (в шт.) Ki-67-иммунопозитивных нейронов на 10000 мкм² наружного зернистого слоя (Me+IQR)

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

Мигрирующие предшественники нейронов можно выявить по белку, стабилизирующему микротрубочки, необходимые для миграции этих клеток, – **даблкортину (DCX)** [Friocourt et al., 2003. Doublecortin]. Мы успешно использовали этот маркер для выявления предшественников зернистых нейронов, мигрирующих из наружного зернистого слоя в постоянный, внутренний зернистый слой (ВЗС) развивающегося мозжечка крысы [Зиматкин С. М., Карнюшко О. А., 2016].

В двух-трех наружных рядах НЗС коры мозжечка, где находятся делящиеся клетки, иммунопозитивная окраска на DCX отсутствует

(рисунок 2.3). Интенсивная экспрессия DCX определяется в двух-трех внутренних рядах клеток НЗС, на границе с молекулярным слоем, где располагаются постмитотические предшественники зернистых нейронов, готовые к радиальной миграции (рисунок 2.3).



**Рисунок 2.3 – Экспрессия даблкортина в коре мозжечка крыс
в постнатальном онтогенезе:**

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

НЗС – наружный зернистый слой; ВЗС – внутренний зернистый слой.
Стрелками показаны мигрирующие предшественники зернистых нейронов.

Иммуногистохимическая реакция на даблкортин.

Цифровая микрофотография. Ув. 100

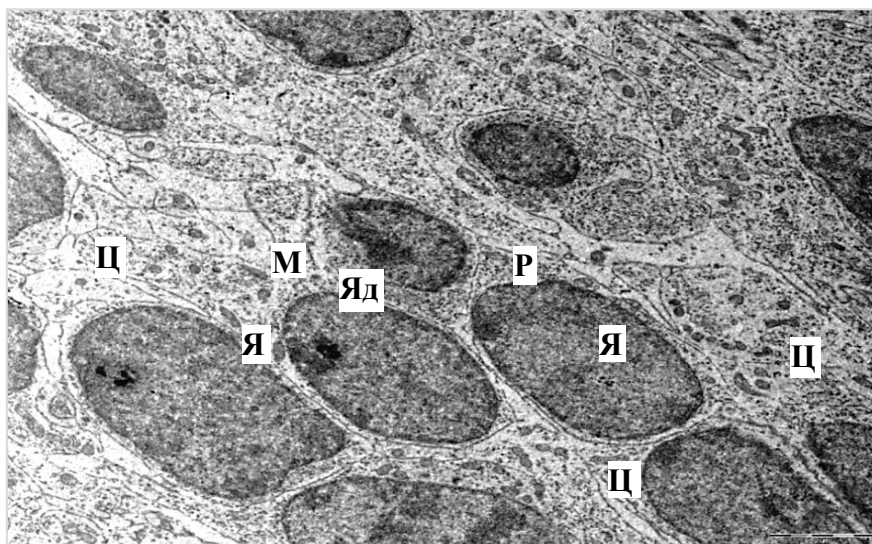
На 7-е сутки постнатального онтогенеза, когда НЗС достигает максимальной толщины, в его постмитотических нейронах, готовящихся к миграции, иммунореактивность DCX снижается. Экспрессия DCX возрастает в мигрирующих нейронах, количество которых в этот период достигает максимума (рисунок 2.3).

На 15-е сутки после рождения толщина наружного зернистого слоя становится в 2 раза меньше, чем на 7-е сутки. В этот период в нейронах, готовящихся к миграции, окрашивание на DCX снижается. Оно выявляется в мигрирующих зернистых нейронах, но уже отсутствует в телах нейронов внутреннего зернистого слоя. Однако в его нейропиле (в растущих отростках зернистых нейронов) иммунореактивность на DCX довольно высока (рисунок 2.3).

Таким образом, экспрессия DCX в мигрирующих нейронах наружного зернистого слоя в старой и новой коре мозжечка постепенно снижается со 2-х по 15-е сутки постнатального онтогенеза. Интересно, что в неocerebellуме 2- и 7-суточных крысят экспрессия DCX была больше, чем в paleocerebellуме, но уже к 15-м суткам достигала уровня старой коры. Это указывает, что филогенетически более молодая кора мозжечка в своем постнатальном развитии несколько отстает от старой.

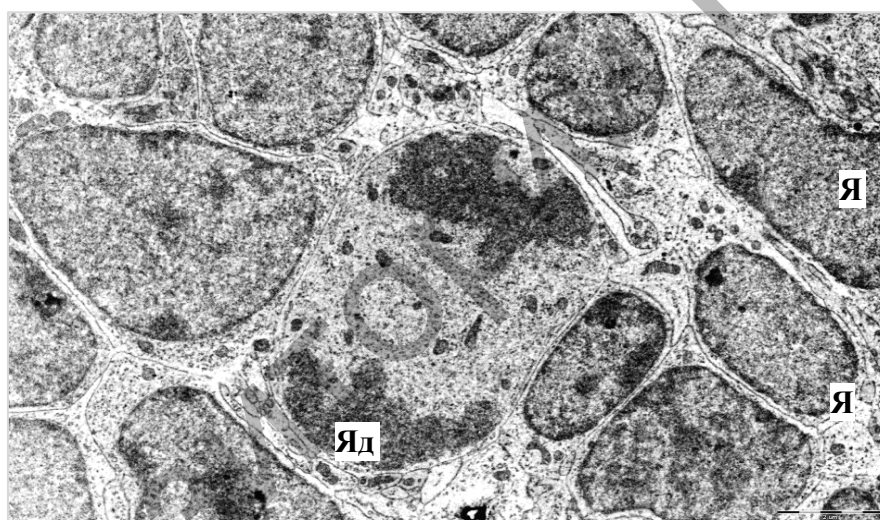
Таким образом, DCX отсутствует в митотически делящихся клетках НЗС, экспрессируется в постмитотических нейронах, готовящихся к миграции и мигрирующих, и исчезает в телах нейронов, завершивших миграцию и дифференцирующихся (но усиливается в их растущих аксонах). Это соответствует и данным литературы о появлении DCX в нейронах, готовящихся к миграции, и исчезновении его в телах зрелых нейронов [Takács, 2008]. DCX участвует в стабилизации микротрубочек необходимых для миграции нейронов [Gleeson et al., 1999. Doublecortin], а также для формирования отростков зернистых нейронов. Возрастание DCX в нейропиле зернистого слоя на 7–15 сутки совпадает с периодом интенсивного роста отростков нейронов и синаптогенеза в коре мозжечка [Hashimoto, Kano, 2013]. Интересно, что в других отделах, например в ядрах мозжечка, где миграция нейронов закончилась еще до рождения, даблкортин после рождения не выявляется совсем [Зиматкин С. М., Карнюшко О. А., 2016; Zimatkin S. M., Karnyushko O. A., 2017].

При электронно-микроскопическом исследовании наружного зернистого слоя установлено, что на 2–15-е сутки зернистые нейроны имеют высокое ядерно-цитоплазматическое отношение. В ядре равномерно расположен эухроматин, слегка конденсированный у ядерной оболочки, ядрышко расположено эксцентрично, нередко прижато к ядерной оболочке, перинуклеарное пространство узкое. В цитоплазме находится преимущественно свободные рибосомы и полисомы, единичные небольшие митохондрии с малым количеством крист и матриксом умеренной плотности (рисунок 2.4). Среди предшественников зернистых нейронов видны митотически делящиеся клетки (рисунок 2.5).



**Рисунок 2.4 – Наружный зернистый слой палеocereбеллюма
7-суточных крыс**

Ядро (Я), ядрышко (Ядр), цитоплазма (Ц), рибосомы (Р), митохондрии (Мх).
Электронная микрофотография. Ув. 8000



**Рисунок 2.5 – Митоз (анафаза) в наружном зернистом слое
палеocereбеллюма 15-суточных крыс**

Ядро (Я), ядрышко (Ядр), цитоплазма (Ц).
Электронная микрофотография. Ув. 8000

В поверхностной зоне наружного зернистого слоя тела нейронов имеют округлую форму. На границе с молекулярным слоем у мигрирующих зернистых нейронов тела становятся более вытянутыми, ядро смещено в нижний полюс клетки. ЗН, перемещаясь между ранее сформированными параллельными волокнами, ориентированы вертикально в молекулярном слое (рисунок 2.6). Достигнув внутреннего зернистого слоя, их тела снова становятся округлой формы.

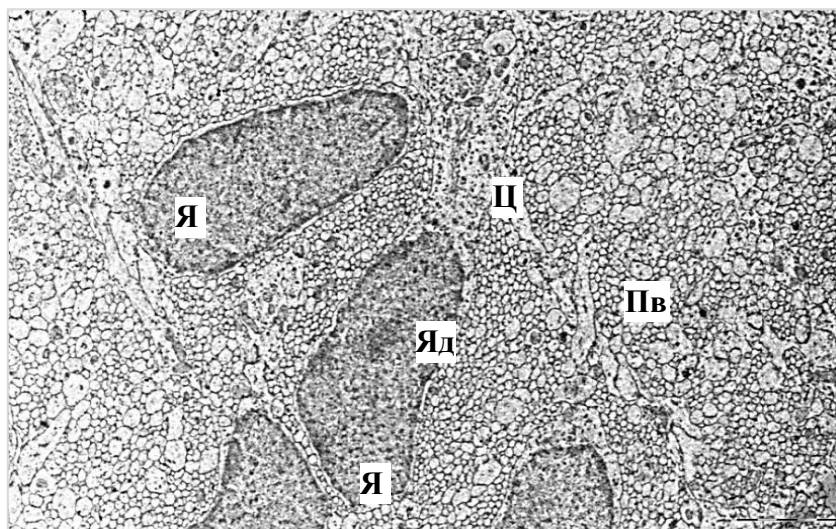


Рисунок 2.6 – Зернистый нейрон, мигрирующий в молекулярном слое палеocereбеллума 15-суточных крыс

Ядро (Я), ядрышко (Ядр), цитоплазма (Ц), параллельные волокна (Пв).
Электронная микрофотография. Ув. 8000

Со вторых по 45-е сутки во внутреннем зернистом слое увеличивается плотность расположения зернистых нейронов [Зиматкин С. М., Карнюшко О. А., 2016]. В этот период в узком ободке цитоплазмы располагаются свободные рибосомы, увеличивается количество митохондрий, появляются отдельные канальца гранулярной эндоплазматической сети, комплекс Гольджи, представлен вакуолями или короткими цистернами, появляются единичные лизосомы (рисунки 2.7, 2.8).

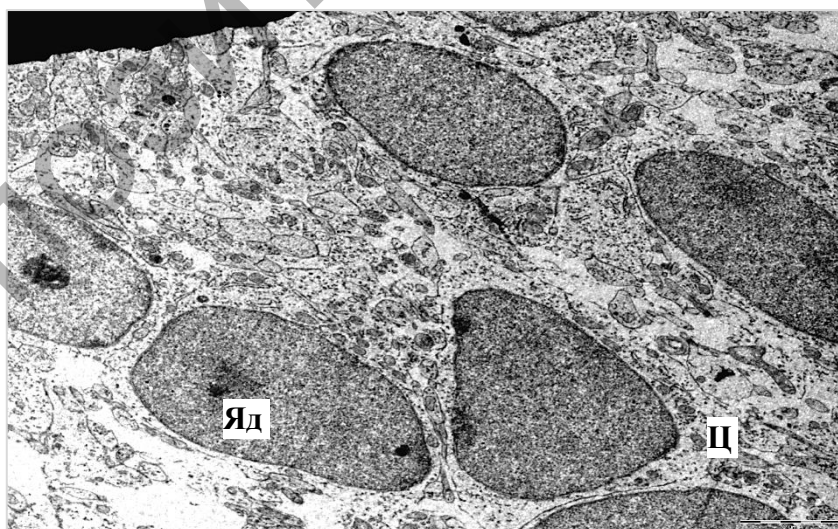
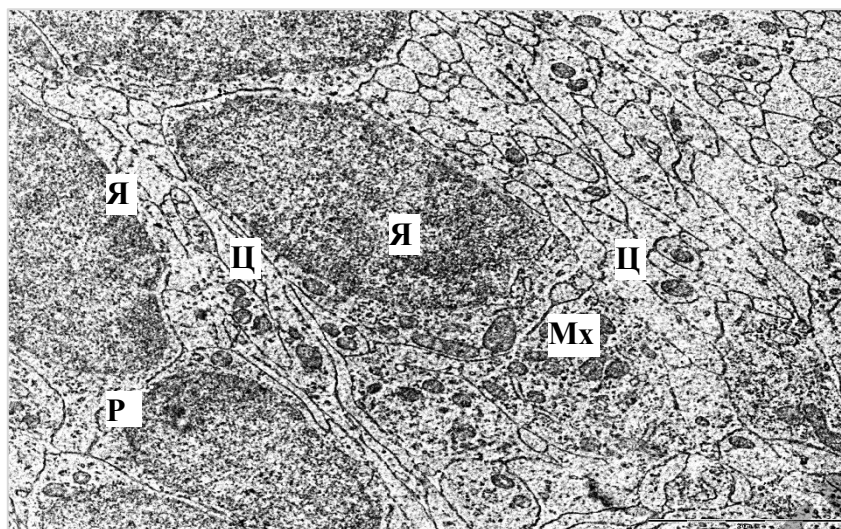


Рисунок 2.7 – Внутренний зернистый слой палеocereбеллума 7-суточных крыс

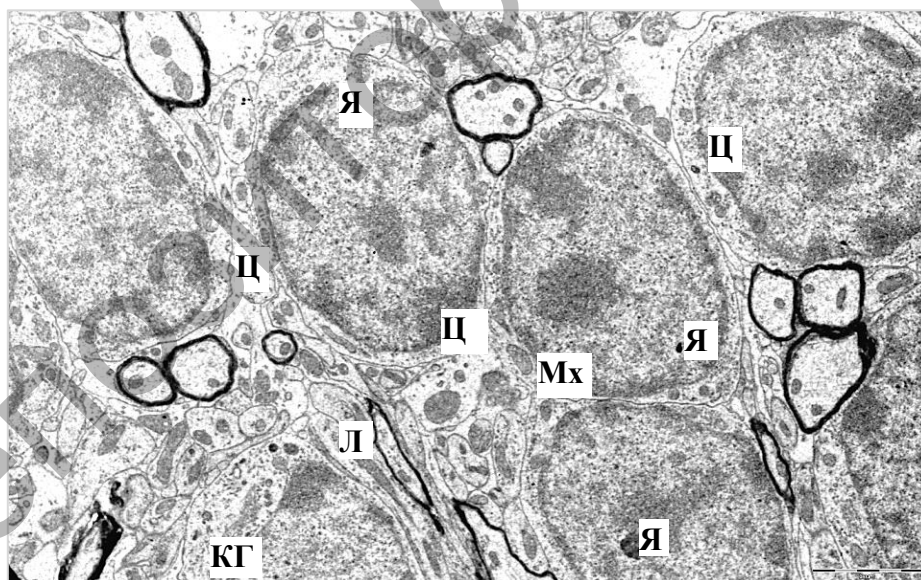
Ядро (Я), ядрышко (Ядр), цитоплазма (Ц)
Электронная микрофотография. Ув. 8000



**Рисунок 2.8 – Внутренний зернистый слой палеocerebellума
15-суточных крыс**

Ядро (Я), цитоплазма (Ц), митохондрии (Мх), рибосомы (Р).
Электронная микрофотография. Ув. 15000

На 45-е сутки в ядре зернистых нейронов выявляется конденсированный хроматин у ядерной оболочки. На 45-е сутки зернистые нейроны располагаются группами, между которыми находятся сформированные клубочки мозжечка (рисунок 2.9).



**Рисунок 2.9 – Внутренний зернистый слой палеocerebellума
45-суточных крыс**

Ядро (Я), цитоплазма (Ц), комплекс Гольджи (КГ), лизосомы (Л), митохондрии (Мх). Электронная микрофотография. Ув. 8000

На 15-е сутки в нейропиле ВЗС четко определяются розетки моховидных волокон, в центре которых располагаются митохондрии и небольшое количество синаптических пузырьков, по периферии выявляются контактирующие с ними дендриты зернистых нейронов (рисунок 2.10 А).

На 45-е сутки в терминалях моховидных волокон происходит увеличение синаптических пузырьков и митохондрий, числа контактов с дендритами ЗН. В дендритах ЗН, в области синаптических контактов появляются митохондрии и цистерны эндоплазматической сети (рисунок 2.10 Б).

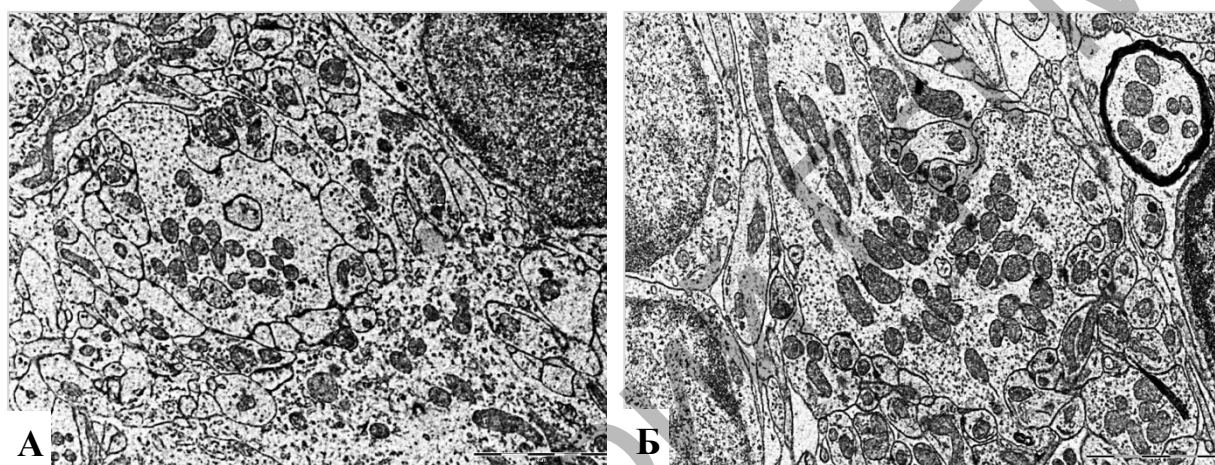


Рисунок 2.10 – Клубочки мозжечка 15-е сутки (А), 45-е сутки (Б)
Электронная микрофотография. Ув. 15000

Таким образом, на примере зернистых нейронов мозжечка мы показали пролиферацию предшественников нейронов, миграцию дочерних клеток в область постоянного расположения, а затем их дифференцировку, которая для разных нейронов будет описана в следующей главе.

Глава 3

СОЗРЕВАНИЕ НЕЙРОНОВ МОЗГА (МАРКЕРЫ NEUN И КАЛЬБИНДИН)

После завершения миграции предшественников нейронов, происходит их созревание, дифференцировка, приобретение признаков, характерных для данного типа нейронов. К ним относятся специфические размеры и форма тел нейронов (перикарионов), ядер и ядрышек, образование в их цитоплазме необходимого числа органелл, образование и накопление специфических белков и пептидов, например, участвующий в сплайсинге, *NeuN* (neuronal nuclear antigen). Этот белок выявляется только в зрелых нейронах, появляется в постмитотических нейробластах, увеличивается в созревающих и достигает максимума в терминально дифференцированных нейронах, сохраняясь на протяжении всего последующего онтогенеза. Данный белок играет роль в нейроспецифическом сплайсинге нейронов [Mullen, 1992]. NeuN экспрессируется в ядрах и перинуклеарной цитоплазме большинства зрелых нейронов ЦНС и не определяется в их незрелых предшественниках. NeuN не экспрессируется в клетках Пуркинье мозжечка, а также в глиальных клетках [Mullen et al., 1992].

Нейроны мозжечка

В предшественниках зернистых нейронов, готовящихся к миграции и мигрирующих, экспрессия NeuN минимальна; она возрастает по мере созревания нейронов во ВЗС (рисунок 3.1). Так, с 2-го по 45-й день после рождения экспрессия в них NeuN прогрессивно нарастает (рисунки 3.1, 3.2).

Со 2-го по 15-й день постнатального онтогенеза крыс плотность расположения иммунопозитивных по NeuN нейронов во внутреннем зернистом слое прогрессивно увеличивается (в 3–4 раза), при этом в них возрастает (в 2–2,5 раза) экспрессия NeuN (рисунки 3.3, 3.4) [Zimatkin S. M., Karnyushko O. A., 2017].

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

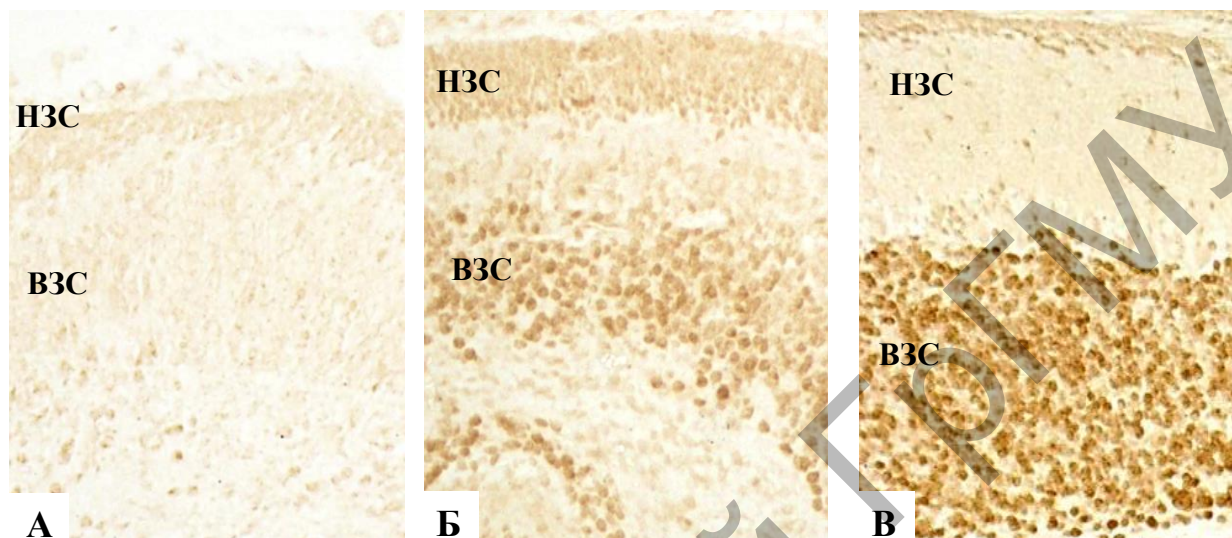


Рисунок 3.1 – Экспрессия NeuN в коре мозжечка крыс в постнатальном онтогенезе:
2-е (А); 7-е (Б); 15-е (В) сутки после рождения
 НЗС –наружный зернистый слой; ВЗС – внутренний зернистый слой.
 Иммуногистохимическая реакция на NeuN.
 Цифровая микрофотография. Ув. 100

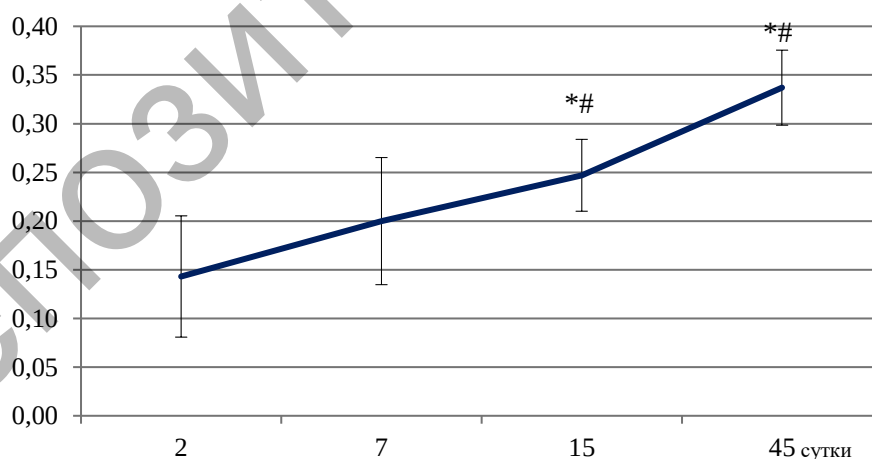


Рисунок 3.2 – Экспрессия NeuN (в ед. опт. пл.) в нейронах внутреннего зернистого слоя в постнатальном онтогенезе коры мозжечка крыс (Me+IQR)

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению со 2-ми сутками, # – $p < 0,05$ по сравнению с 7-ми сутками.

В нейронах промежуточного ядра в постнатальном онтогенезе иммунореактивность NeuN также возрастает (рисунки 3.3, 3.4). Это свидетельствует о дифференцировке, созревании данных нейронов.

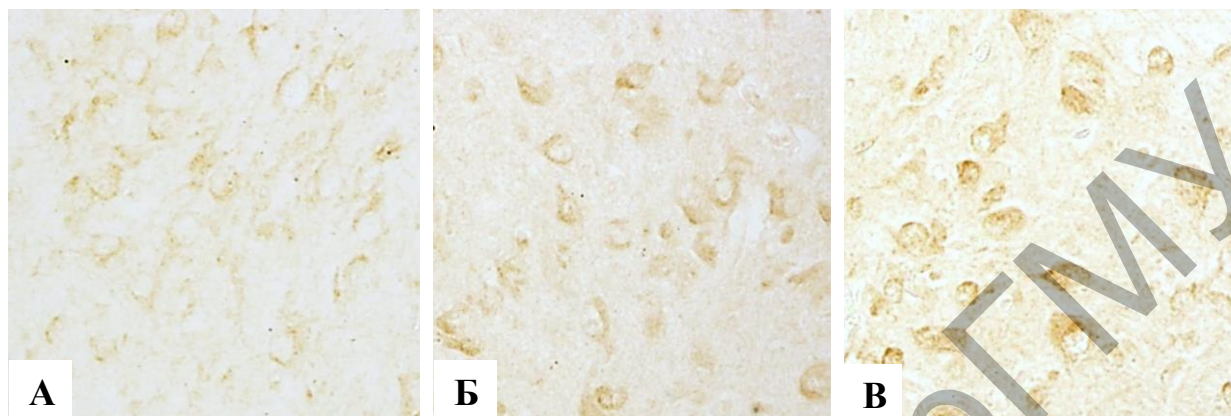


Рисунок 3.3 – Экспрессия NeuN в нейронах промежуточного ядра мозжечка крыс: 2-е (А), 7-е (Б), 15-е (В) в постнатальном онтогенезе
Иммуногистохимическая реакция на NeuN.
Цифровая микрофотография. Ув. 400

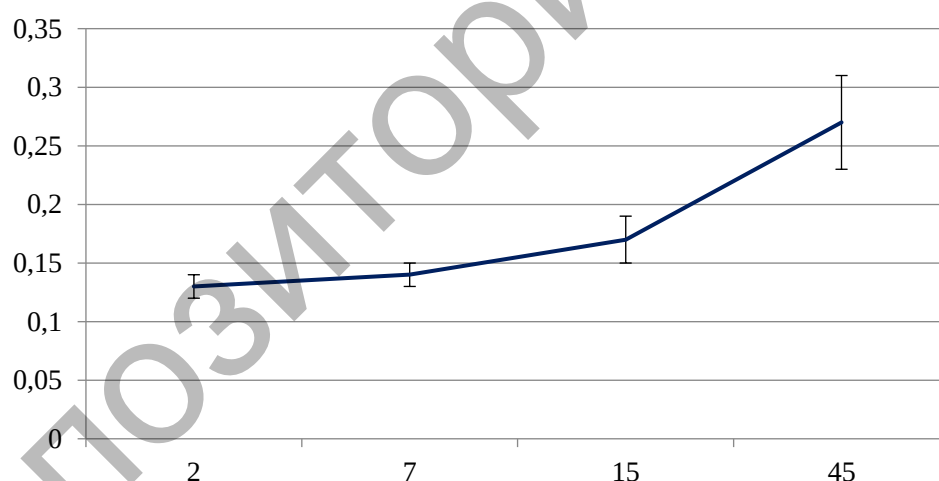


Рисунок 3.4 – Иммунореактивность NeuN (в ед. опт. пл.) в нейронах промежуточного ядра мозжечка в постнатальном онтогенезе крыс (Me+IQR)

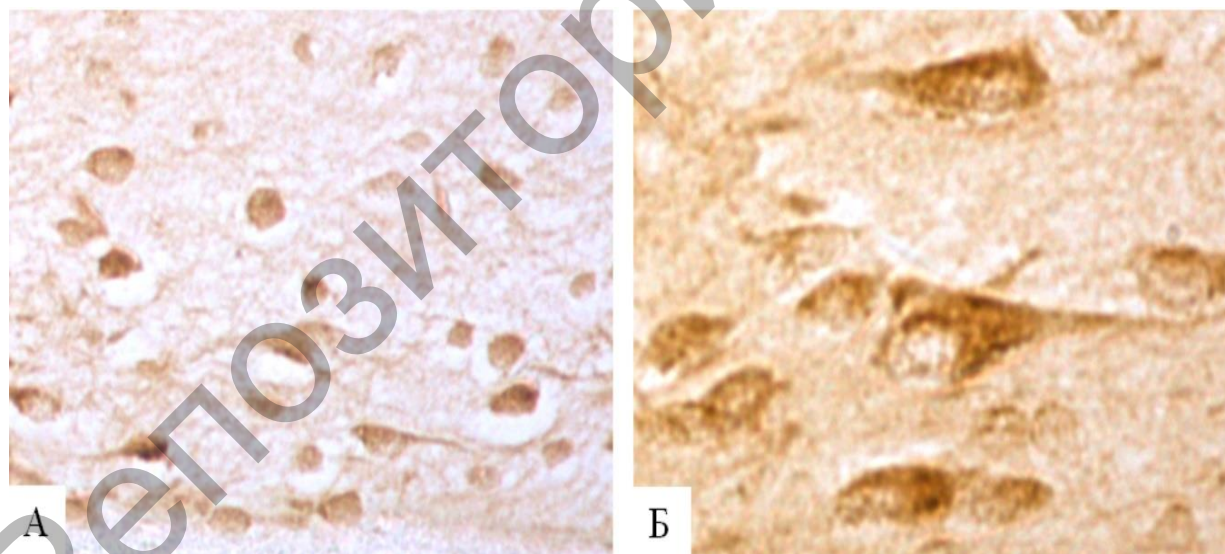
Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению со 2-ми сутками; # – $p < 0,05$ по сравнению с 7-ми сутками.

Экспрессия DCX в нейронах промежуточного ядра мозжечка на 2-е, 7-е и 15-е сутки постнатального развития не выявляется.

Это свидетельствует, что к вторым сутки постнатального онтогенеза миграция этих нейронов уже завершена и идет процесс их дифференцировки, что сопровождается прогрессивным возрастанием в них экспрессии NeuN.

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

В гистаминергических нейронах гипоталамуса крыс сразу после рождения NeuN не выявляется, на 5-е сутки его содержание мало, а затем постепенно возрастает, достигая максимума на 90-е сутки (рисунок 3.5). Иммунореактивность нейронального ядерного белка NeuN (маркер зрелых нейронов) с пятых по 90-е сутки постнатального развития возрастает в 1,4 раза ($p < 0,001$) (рисунок 3.4). При этом с пятых по 10-е сутки, с 10-х по 20-е и с 20-х по 45-е сутки иммунореактивность данного маркера увеличивается в 1,1 раза ($p < 0,001$) соответственно, а с 45-х по 90-е сутки не претерпевает значительных изменений (рисунки 3.5, 3.6) [Зиматкин С. М. и соавт., 2020].



**Рисунок 3.5 – Иммунореактивность NeuN
в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса
5-суточных (А) и 90-суточных (Б) крыс**
Иммуноцитохимическая реакция.
Цифровая микрофотография. Ув. 800

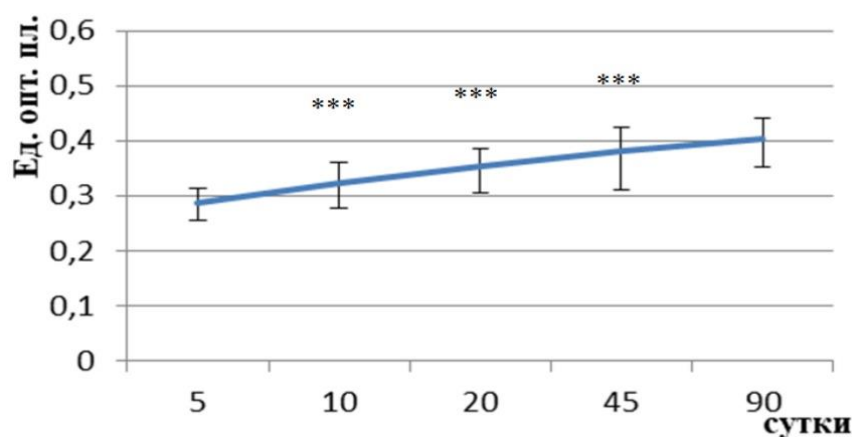


Рисунок 3.6 – Иммунореактивность NeuN в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса крыс в динамике постнатального онтогенеза (Me (LQ; UQ))

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

Содержание кальбиндина в развивающихся нейронах мозжечка крысы

Кальцийсвязывающие белки широко экспрессируются во многих отделах головного мозга, включая мозжечок. Они поддерживают кальциевый гомеостаз для нормального функционирования нейронов. В нейронах кальций регулирует нейротрансмиссию, синаптическую пластичность, лежащую в основе обучения, памяти, модулирует возбудимость и транскрипцию генов [Brini, et al., 2014. Neuronal]. При избытке кальций оказывает цитотоксическое действие. Считается, что кальцийсвязывающие белки важны для развития головного мозга, поскольку такие процессы, как деление клеток, рост отростков и миграция клеток, тесно связаны с внутриклеточной концентрацией кальция [Tsai et al., 2015. Ca^{2+}]. Одним из таких кальцийсвязывающих белков является кальбиндин.

Известно, что в мозжечке крыс уже на 15-е сутки эмбрионального развития клетки Пуркинье становятся кальбиндин-положительными, а нейроны ядер мозжечка в процессе развития также временно экспрессируют кальбиндин [Enderlin, 1987]. Биохимически было установлено, что к моменту рождения у крыс экспрессия кальбиндина в клетках Пуркинье гетерогенна [Wassef et al., 1985. Transient]. В мозжечке взрослых крыс кальбиндин экспрессируется

равномерно всеми клетками Пуркинье. Тенденция к снижению иммунореактивности кальбиндина в этих нейронах наблюдается при старении крыс [Amenta et al., 1994. Calbindin].

Показано, что в мозжечке кальбиндин участвует в поддержании долгосрочной депрессии, необходимой для функционирования клеток Пуркинье, и, следовательно, нормальной двигательной координации и сенсорной интеграции [Barski et al., 2003. Calbindin]. В дегенерирующих клетках Пуркинье с признаками апоптоза, экспрессия казпазы-3 сопоставима с экспрессией кальбиндина [Enderlin, 1987].

У экспериментальных животных и человека кальбиндин используют в качестве специфического маркера клеток Пуркинье коры мозжечка. При этом у человека низкая иммунореактивность выявлялась в развивающихся зернистых нейронах, а также интернейронах зернистого слоя во взрослом мозжечке [Flace et al., 2014. Calbindin-D28k]. Однако динамика иммунореактивности кальбиндина в КП и других нейронах мозжечка в постнатальном онтогенезе крысы детально в литературе не описана.

Наше исследование выполнено на 16 беспородных белых крысах. Установлено, что на вторые сутки после рождения у крыс на поверхности коры мозжечка находится тонкий наружный зернистый слой, где располагаются нейроны с низкой кальбиндин-иммунореактивностью. Клетки Пуркинье располагаются в несколько рядов. В узком ободке цитоплазмы КП определяется высокая кальбиндин-иммунореактивность, а в их ядрах – более низкая. Мигрирующие предшественники зернистых нейронов, а также зернистые нейроны формирующегося внутреннего зернистого слоя имеют высокую иммунореактивность кальбиндина в их цитоплазме (рисунок 3.7А).

На 7-е сутки толщина наружного зернистого слоя увеличивается в два раза; его нейроны становятся иммунонегативными. В КП увеличиваются размеры перикарионов в апикальной части, где выявляется гомогенная равномерная иммунореактивность кальбиндина, а в их ядрах – в виде крупных гранул с высокой иммунореактивностью. В этот срок также обнаружено сильное иммунопозитивное окрашивание синапсов в виде единичных точек на растущих дендритах и перикарионах КП. В формирующемся зернистом слое и белом веществе, по сравнению со вторыми сутками, количество нервных клеток с высокой иммунореактивностью кальбиндина увеличивается (рисунок 3.7Б).

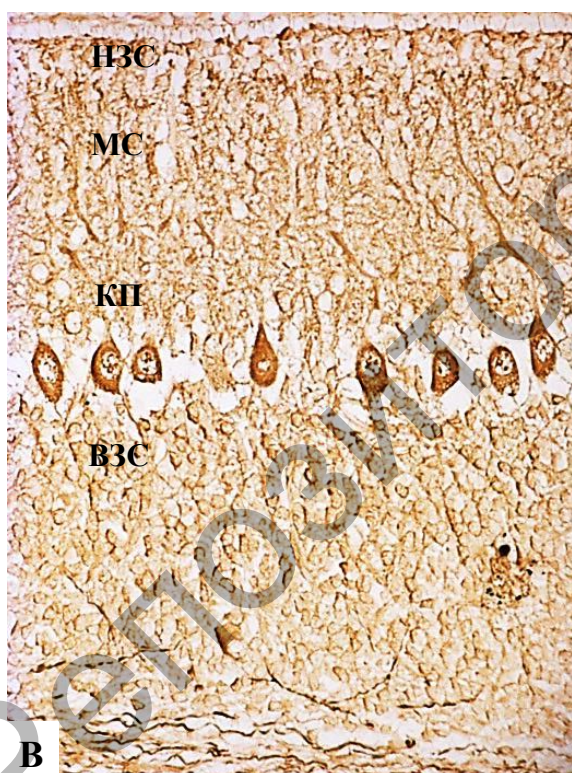
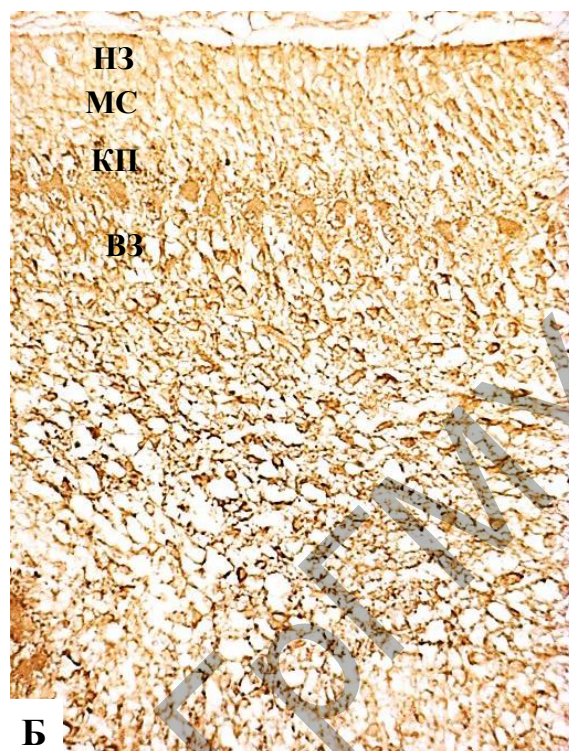
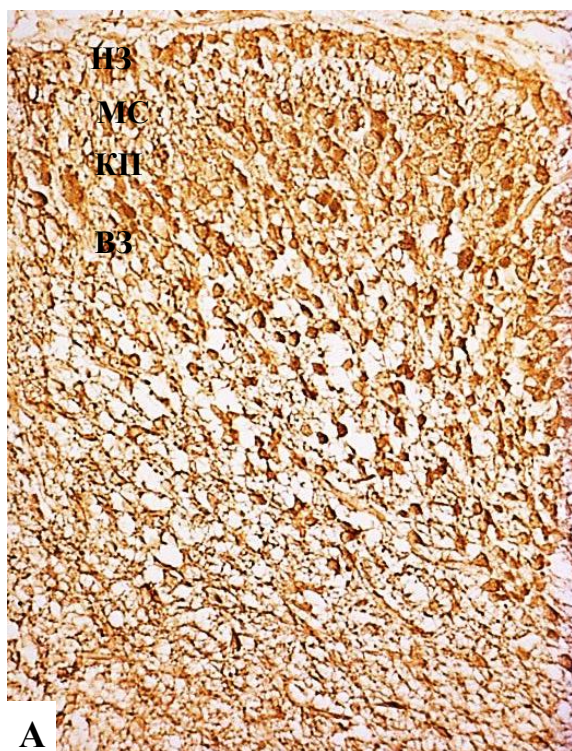


Рисунок 3.7 – Иммунореактивность кальбиндина в палеocerebellуме крыс на 2-е (а), 7-е (б), 15-е (в) и 45-е (г) сутки после рождения:

НЗС – наружный зернистый слой, МС – молекулярный слой,

КП – клетки Пуркинье; ВЗС – внутренний зернистый слой.

Иммуногистохимическая реакция на кальбиндин.

Цифровая микрофотография. Ув. 200

На 15-е сутки после рождения у крыс высокое кальбиндин-иммунопозитивное окрашивание выявляется в цитоплазме всех КП и отходящих от перикарионов проксимальных частях дендритов, вплоть до их более тонких концевых ветвлений, которые четко определяются на фоне светлого нейропиля молекулярного слоя. На границе с иммунонегативным наружным зернистым слоем на терминальных ветвлениях дендритов КП наблюдались синапсы в виде точек с высокой кальбиндин-иммунореактивностью. Иммунореактивность нейронов внутреннего зернистого слоя снижается, а некоторые из них становятся иммунонегативными. На этом фоне становятся отчетливо видны кальбиндин-иммунореактивные волокна с варикозными расширениями, проходящие через зернистый слой. В белом веществе наблюдаются многочисленные интенсивно окрашенные пучки нервных волокон и единичные кальбиндин-иммунореактивные клетки (рисунок 3.7В).

На 45-е сутки после рождения у крыс высокая кальбиндин-иммунореактивность сохраняется во всех перикарионах, ядрах и дендритах КП. В молекулярном слое все нейроны остаются иммунонегативными. На дендритах КП в молекулярном слое размеры и иммунореактивность кальбиндин-позитивных синапсов уменьшается. В зернистом слое умеренная иммунореактивность сохраняется в некоторых нейронах, располагающихся группами (рисунок 3.7Г). Визуально не выявлено существенных отличий распределения кальбиндина между долями мозжечка разного филогенетического возраста (палео- и неocerebellum).

Таким образом, в нашем исследовании подтверждено отсутствие иммунореактивности кальбиндина в нейронах молекулярного слоя у крыс в постнатальном онтогенезе. Полагают, что в этих нейронах основным кальцийсвязывающим белком является парвальбумин [Bastianelli, 2003]. Высокая иммунореактивность кальбиндина выявлялась в перикарионах клеток Пуркинье уже на 2-е сутки после рождения, а к 15-м суткам она появлялась в дендритах и не изменялась к 45-м суткам. При этом во все сроки исследования в КП она выявлялась не только в цитоплазме, но и в ядре.

Ранняя экспрессия кальбиндина обусловлена активным процессом дифференцировки нейронов и синаптогенезом. Сохранение экспрессии на протяжении всего постнатального онтогенеза, обусловлено важностью регуляции внутриклеточного содержания

кальция в клетках Пуркинье для обеспечения их функциональной активности. Наличие иммунореактивности кальбиндина в ядре клеток Пуркинье связано с тем, что этот кальций-связывающий белок участвует и в регуляции экспрессии генов.

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

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

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

Таким образом, учитывая, что экспрессия Calbindin-D28k выявляется на протяжении всего периода развития клеток Пуркинье, а также его физиологическую роль в поддержание функции и гомеостаза кальция в них, Calbindin-D28k является ценным маркером для морфофункциональной характеристики КП в развивающемся и взрослом мозжечке крыс в норме и при патологии [Карнюшко О. А., Зиматкин С. М., 2020].

Глава 4

РАЗВИТИЕ ТЕЛ, ЯДЕР И ЯДРЫШЕК НЕЙРОНОВ МОЗГА

Пирамидные нейроны изокортекса

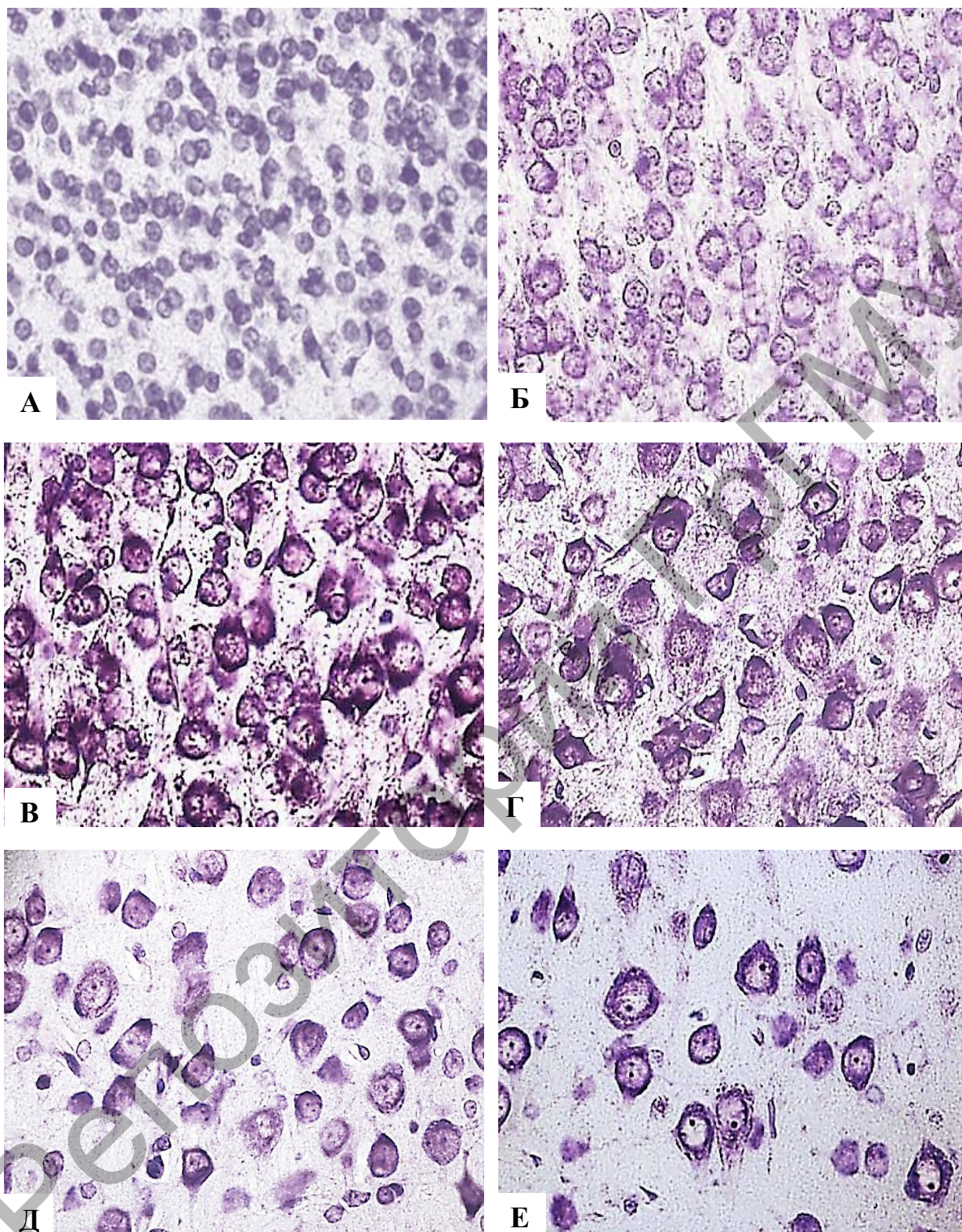
В постнатальном онтогенезе изокортекса крыс происходит прогрессивный рост размеров перикарионов нейронов, особенно в период с 2-х по 10-е сутки (площадь сечения перикарионов парietальной коры возросла на 60 %) и с 20-х по 90-е сутки – на 28 % ($p < 0,05$). С 10-х по 20-е и с 45-х по 90-е сутки увеличение площади было менее выраженным. За весь изученный период постнатального онтогенеза площадь перикарионов возросла в 4 раза (таблица 4.1; рисунки 4.1, 4.2).

Таблица 4.1 – Площадь перикарионов нейронов
5-го слоя парietальной коры мозга крыс (Me (LQ; UQ))

Сроки после рождения	Площадь, мкм ²
2-е сутки	23 (22; 24)
5-е сутки	45 (29; 48)*
10-е сутки	58 (53; 63) ⁺
20-е сутки	68 (65; 73) [#]
45-е сутки	82 (78; 86) ^α
90-е сутки	95 (86; 104) ^β

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с 2-ми сутками; + – $p < 0,05$ по сравнению с 5-ми сутками; # – $p < 0,05$ по сравнению с 10-ми сутками; α – $p < 0,05$ по сравнению с 20-ми сутками; β – $p < 0,05$ по сравнению с 45-ми сутками.

Таким образом, в постнатальном онтогенезе происходит прогрессивный рост перикарионов пирамидных нейронов новой коры мозга [Бонь Е. И., Зиматкин С. М., 2015, 2015а, 2016, 2019; Зиматкин С. М., Бонь Е. И., 2016; Бонь Е. И. и соавт., 2019].



**Рисунок 4.1 – Нейроны 5-го слоя парietальной коры крыс
на 2-е (А), 5-е (Б), 10-е (В), 20-е (Г), 45-е (Д) и 90-е (Е) сутки
после рождения**

Окраска по Нисслю. Цифровая микрофотография. Ув. 400

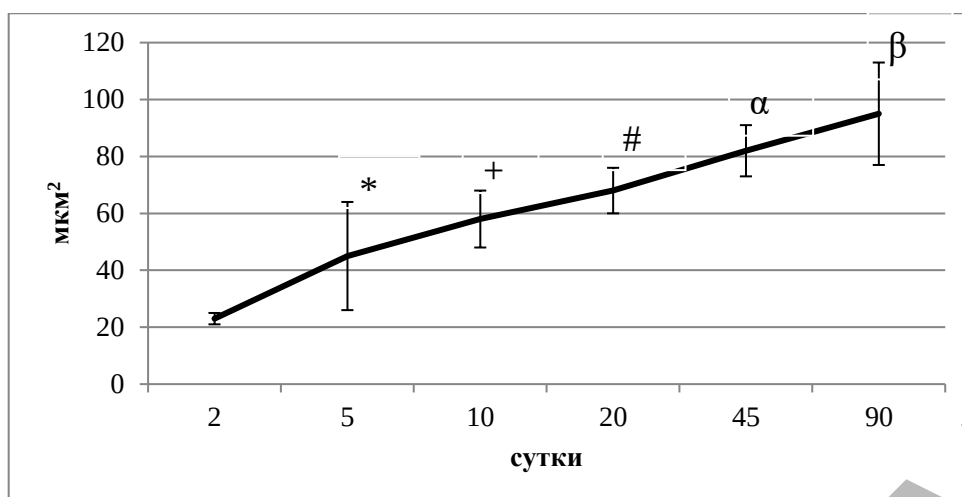


Рисунок 4.2 – Динамика площади перикарионов нейронов пятого слоя парietальной коры мозга крыс в постнатальном онтогенезе

Примечание – $Me \pm IQR$; * – $p < 0,05$ по сравнению с 2-ми сутками, + – $p < 0,05$ по сравнению с 5-ми сутками, # – $p < 0,05$ по сравнению с 10-ми сутками, α – $p < 0,05$ по сравнению с 20-ми сутками, β – $p < 0,05$ по сравнению с 45-ми сутками.

Клетки Пуркинье мозжечка

Размеры перикарионов КП мозжечка со 2-х по 45-е сутки постнатального развития прогрессивно увеличиваются (рисунок 4.3). Площадь ядер прогрессивно возрастает с 7-х по 15-е сутки, тогда как на 45–90-е сутки в палеocerebellum несколько уменьшается (рисунки 4.3, 4.4).

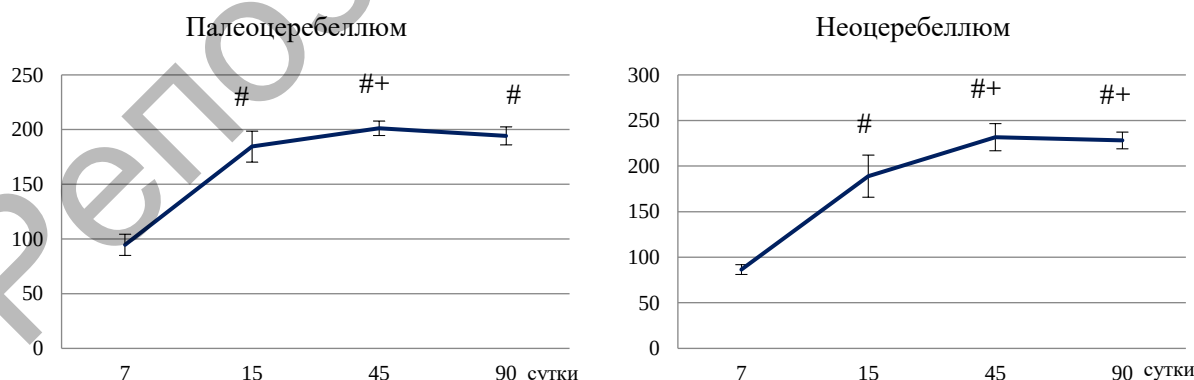


Рисунок 4.3 – Динамика площади (в мкм²) перикарионов клеток Пуркинье в мозжечке крыс в постнатальном онтогенезе ($Me \pm IQR$)

Примечание – # – $p < 0,05$ по сравнению с 7-ми сутками; + – $p < 0,05$ по сравнению с 15-ми сутками.

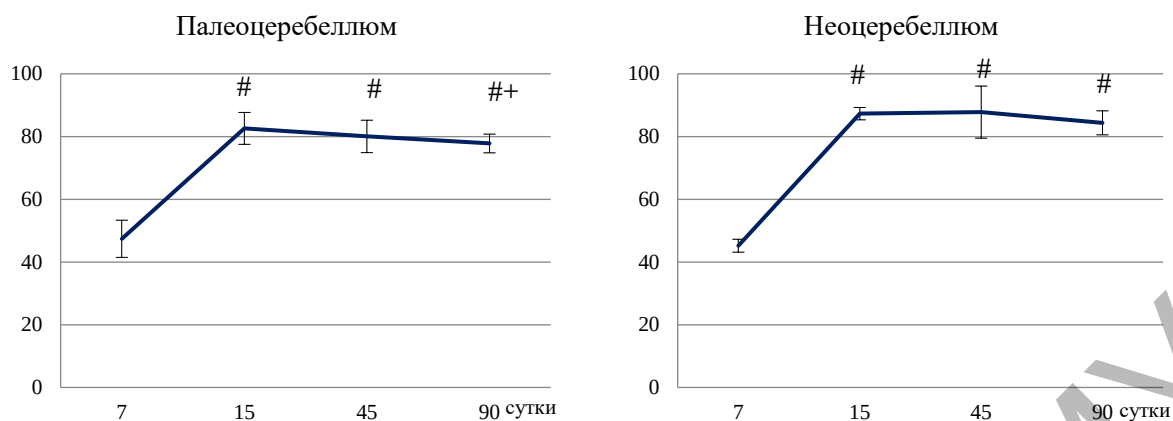


Рисунок 4.4 – Динамика площади (в мкм²) ядер клеток Пуркинье в мозжечке крыс в постнатальном онтогенезе (Me+IQR)

Примечание – # – $p < 0,05$ по сравнению с 7-ми сутками; + – $p < 0,05$ по сравнению с 15-ми сутками.

У крыс со вторых по 90-е сутки постнатального развития в промежуточном ядре мозжечка прогрессивно увеличиваются размеры перикарионов нейронов (рисунки 4.5, 4.6). Этот рост завершается к 45 суткам [Zimatkin S. M., Karnyushko O. A., 2018].

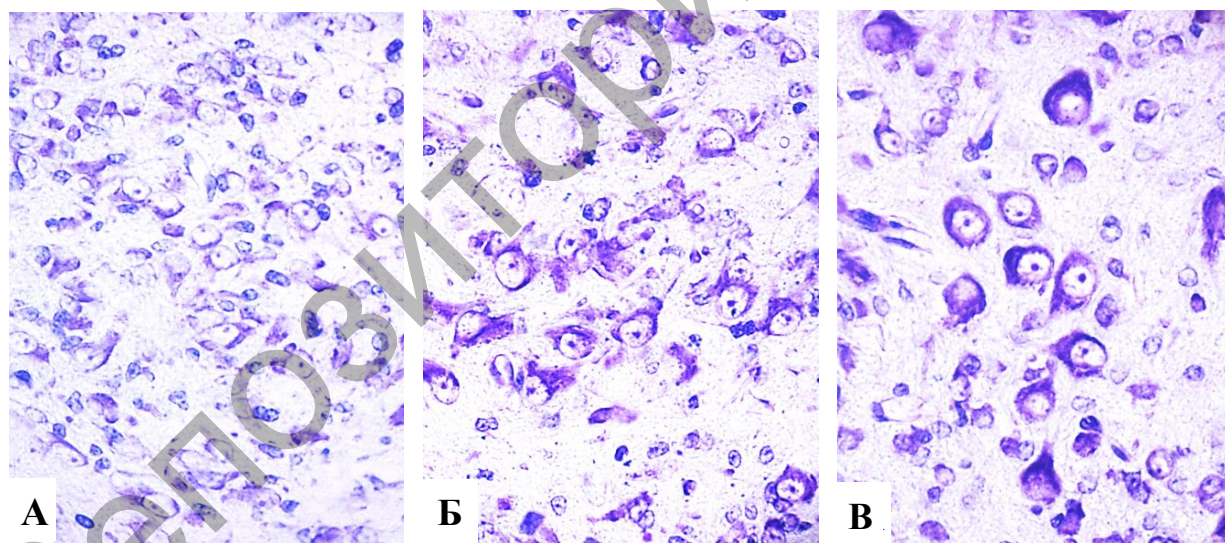


Рисунок 4.5 – Нейроны промежуточного ядра мозжечка крыс в постнатальном онтогенезе:

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

Окраска по методу Ниссля.

Цифровая микрофотография. Ув. 400

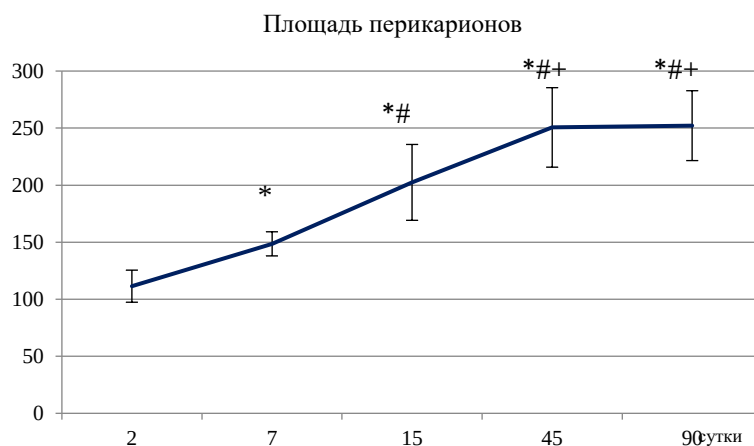


Рисунок 4.6 – Динамика площади (в $\mu\text{м}^2$) перикарионов нейронов промежуточного ядра мозжечка крыс в постнатальном онтогенезе (Me+IQR)

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению со 2-ми сутками; # – $p < 0,05$ по сравнению с 7-ми сутками; + – $p < 0,05$ по сравнению с 15-ми сутками.

Особенно хорошо возрастные изменения размеров и формы нейронов видны при электронной микроскопии (рисунки 4.7 4.8).

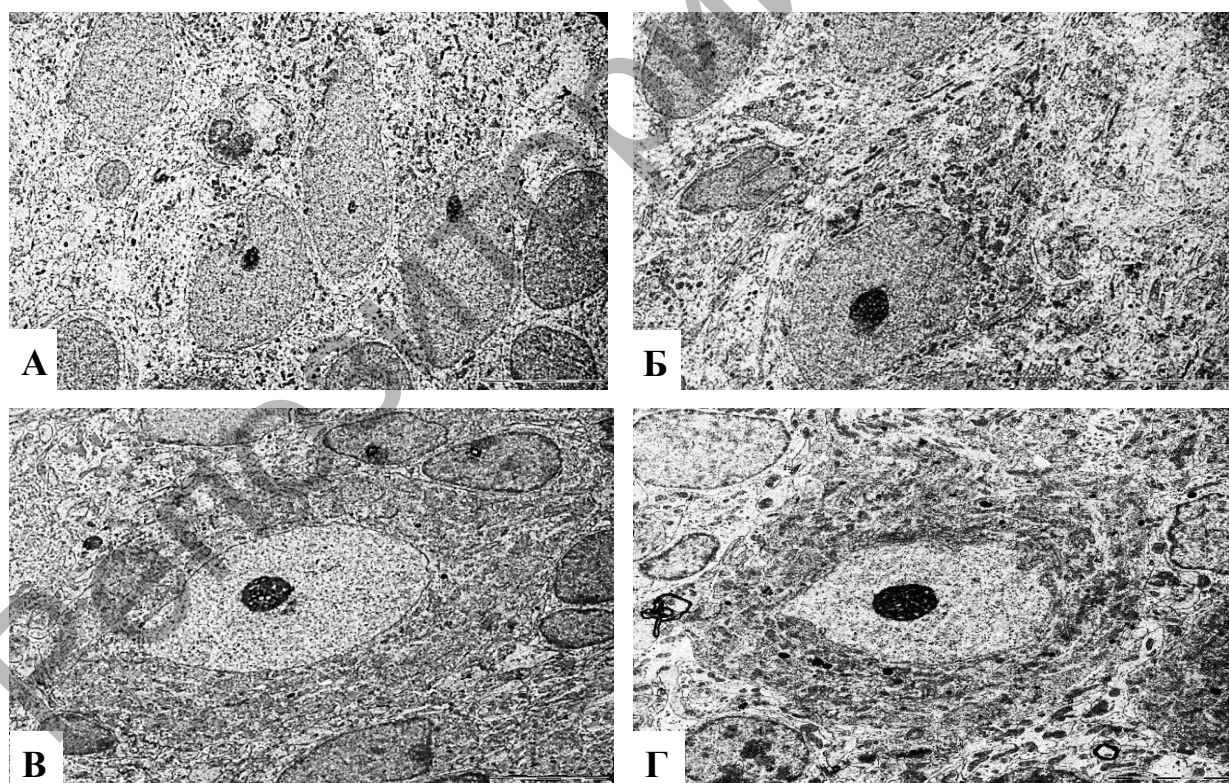


Рисунок 4.7 – Клетки Пуркинье мозжечка крыс в постнатальном онтогенезе: 2-е (А), 7-е (Б), 15-е (В), 45-е (Г) сутки после рождения

Масштабный отрезок равен 5 $\mu\text{м}$. Электронограмма. Ув. 5000

У крыс в постнатальном онтогенезе (со 2-х по 15-е сутки) по мере дифференцировки КП происходит прогрессивное увеличение размеров перикарионов и ядер. К 45-м суткам размеры перикарионов уже не возрастают, а размеры ядер даже уменьшаются. При этом происходит трехкратное уменьшение ядерно-цитоплазматического отношения. Ядрышки клеток Пуркинье со 2-х по 45-е сутки прогрессивно увеличиваются в размерах. На 45-е сутки после рождения их индивидуальная площадь в 4 раза больше, чем на 2-е сутки (рисунок 4.8) [Карнюшко О. А., Зиматкин С. М., 2015].

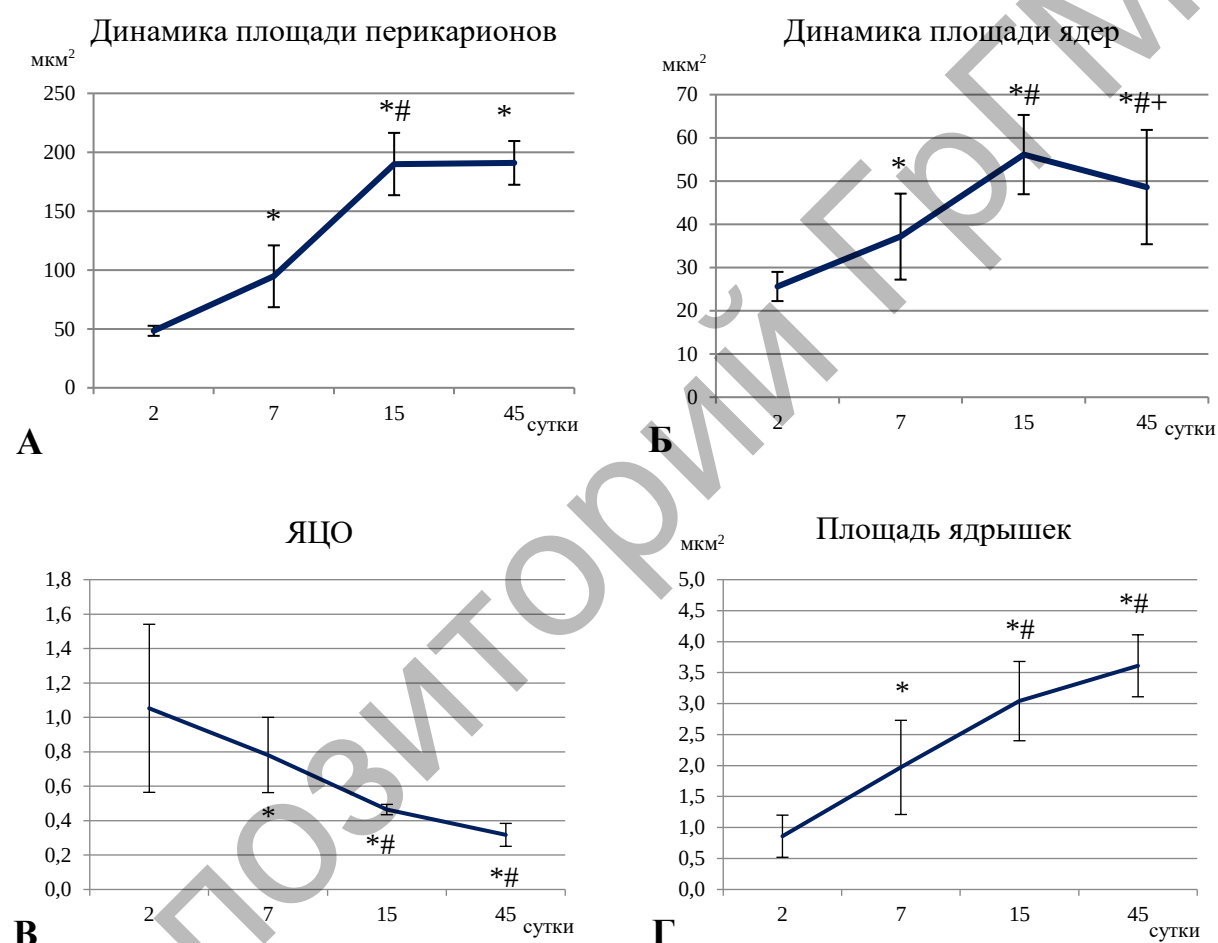


Рисунок 4.8 – Морфометрические показатели клеток Пуркинье палеocereбеллюма крыс в постнатальном онтогенезе (Me+IQR)

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с 2-ми сутками; # – $p < 0,05$ по сравнению с 7-ми сутками; + – $p < 0,05$ по сравнению с 15-ми сутками.

Гистаминергические нейроны гипоталамуса крысы

В первый день постнатального развития гистаминергические нейроны расположены во всех трех крупноклеточных ядрах заднего гипоталамуса. Некоторые из них обнаруживаются около вентромедиального и дорсомедиального ядер гипоталамуса. В течение первой послеродовой недели активность фермента синтеза гистамина, гистидиндекарбоксилазы (ГДК) в гистаминергических нейронах гипоталамуса постепенно увеличивается [Auvinen, S., Panula P., 1988]. Описанный выше период в развитии мозга крысы характеризуется интенсивным ростом. Так, в гипоталамической области наблюдается значительное (почти в 8 раз) увеличение числа синапсов, хотя первые аксодендритические и аксосоматические синапсы здесь обнаруживаются на пятые сутки после рождения [Дмитриева Н. И., 1981]. К десятому дню постнатального развития ГДК-иммунореактивные нейроны проявляют морфологические свойства зрелых клеток, хотя они все еще не достигают размеров, характерных для взрослых нейронов данного вида [Matsuzaki, et al., 2009].

На 14-й день постнатального развития распределение гистаминергических нейронов в гипоталамусе крысы соответствует таковому у взрослых животных [Auvinen S., Panula P., 1988]. К концу первого месяца жизни в гипоталамических ядрах нейроны приобретают вид и размеры, типичные для зрелого животного [Дмитриева Н. И., 1981].

По нашим данным, с пятых по 90-е сутки после рождения у крыс в ядре E2 гипоталамуса наблюдается значительное увеличение (в 4 раза) размеров перикарионов гистаминергических нейронов (рисунок 4.9). Так, за указанный период постнатального онтогенеза минимальный диаметр перикарионов гистаминергических нейронов увеличивается в 1,9 раза ($p=0,0004$): с пятых по 10-е сутки – в 1,5 раза ($p=0,0004$), с 10 по 20-е сутки, с 20 по 45-е сутки и с 45 по 90-е сутки достоверных изменений не отмечается (рисунок 4.10).

С пятых по 90-е сутки постнатального развития крыс площадь и объем перикарионов гистаминергических нейронов увеличивается в 3,5 и 6,3 раза соответственно ($p=0,0004$): с пятых по 10-е сутки в 2 и 2,9 раза, соответственно ($p=0,0004$), с 10 по 20-е сутки и с 20 по 45-е сутки достоверных изменений не выявлено, с 45 по 90-е сутки – в 1,4 и 1,6 раза соответственно ($p=0,02$) (рисунки 4.10, 4.11).

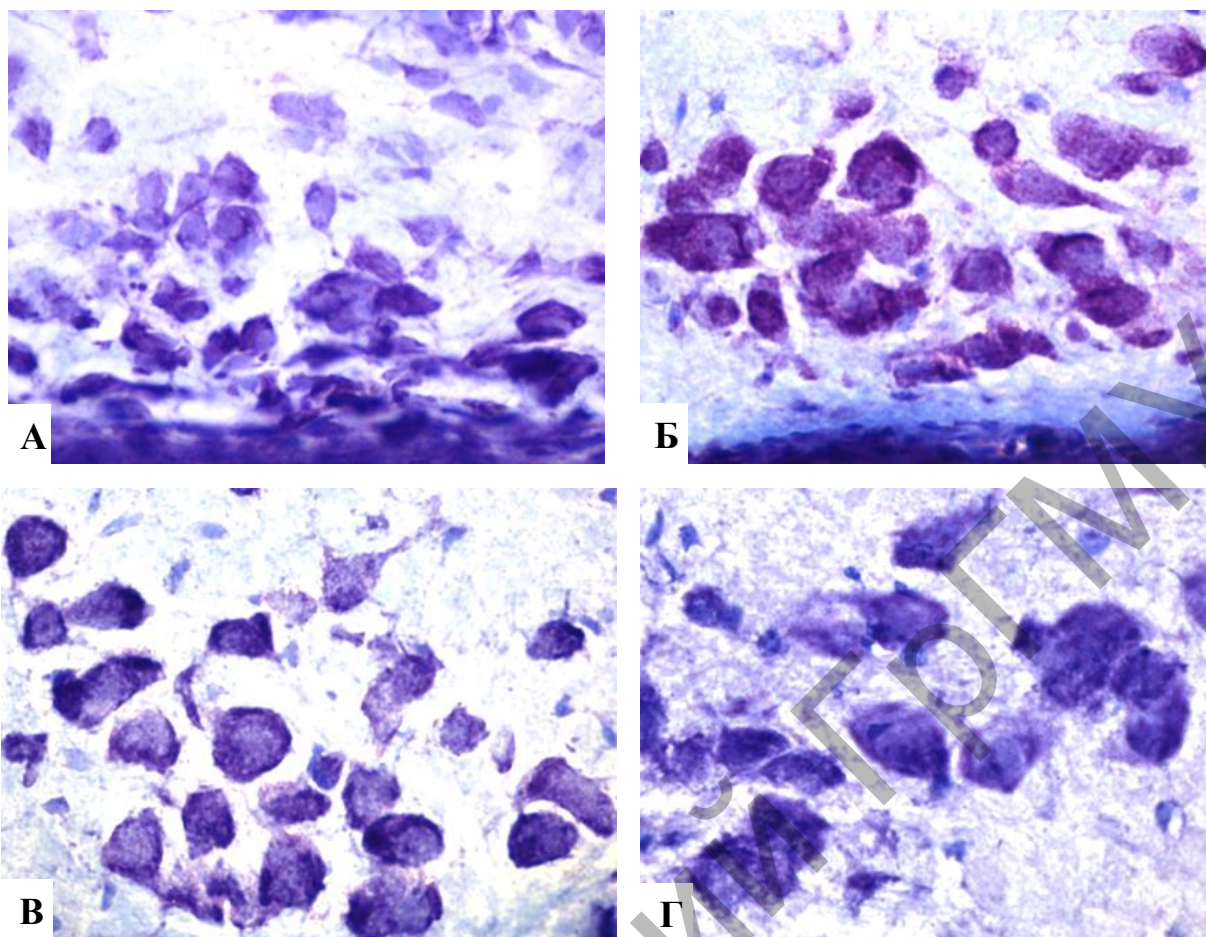


Рисунок 4.9 – Гистаминергические нейроны ядра E2 гипоталамуса на пятые (А), 20 (Б), 45 (В) и 90-е (Г) сутки постнатального онтогенеза

Окраска по методу Ниссля. Цифровая микрофотография. Ув. 400

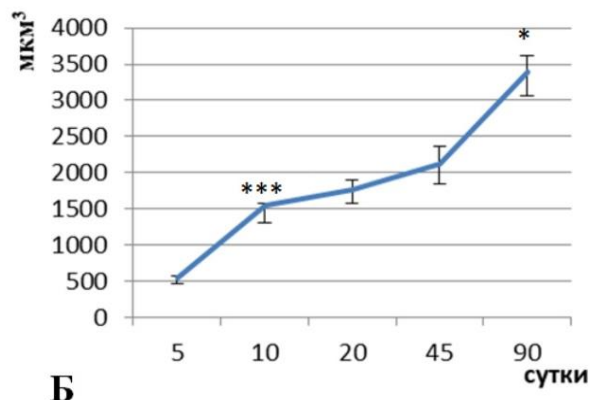
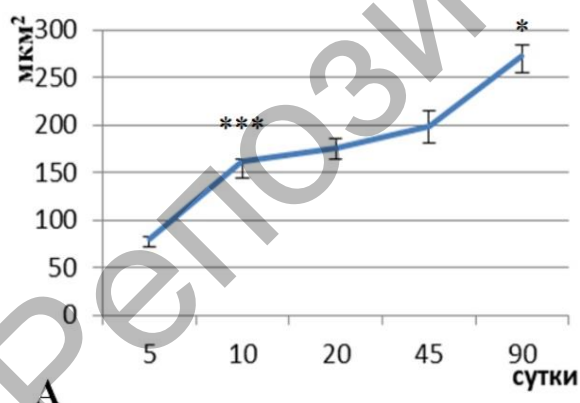


Рисунок 4.10 – Динамика изменений площади (А) и объема (Б) перикарионов гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса в постнатальном онтогенезе (Me (LQ; UQ))

Примечание – * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$; при сравнении показателей каждый последующий срок сопоставляли с предыдущим.

В ранний период постнатального онтогенеза крыс (5-е сутки) у гистаминергических нейронов преобладает округлая форма их перикарионов. На 10 и 20-е сутки после рождения существенных изменений их формы не наблюдается. К 45-м суткам клетки становятся менее сферичными, что подтверждается уменьшением форм-фактора в 1,1 раза ($p=0,008$). К 90-м суткам постнатального развития форма нейронов снова становится более округлой (рисунок 4.7) [Заерко А. В. и соавт., 2019. 2020].

Результаты электронно-микроскопического исследования показали, что размеры и ультраструктура ядер и ядрышек гистаминергических нейронов гипоталамуса крысы в постнатальном онтогенезе значительно меняется (рисунок 4.11).

Ядра гистаминергических нейронов пятисуточных животных отличаются крупными размерами и неровным контуром. Они занимают большую часть площади клетки и располагаются преимущественно в центре, однако в некоторых нейронах смещены на периферию. Многие ядра имеют неровный контур с выпячиваниями или углублениями (рисунки 4.11, 4.12).

Кариолемма характеризуется обилием ядерных пор, наружная мембрана извилистая, на ней единично либо группами расположены рибосомы, внутренняя мембрана с более ровным контуром. В перинуклеарном пространстве наблюдаются локальные расширения. Преобладает эухроматин, за счет чего ядра клеток выглядят светлыми (рисунок 4.11А).

У нейронов двадцатисуточных крысят ядра располагаются, как правило, на периферии клеток и обладают более четкими и ровными контурами кариолеммы. Глубокие складки, присущие ядерной оболочке гистаминергических нейронов пятисуточных животных, встречаются лишь в единичных случаях. Локальные расширения перинуклеарного пространства становятся менее выраженными. В структуре ядра преобладает мелкозернистый хроматин, при этом ядра клеток выглядят светлее, чем на пятые сутки (рисунок 4.11Б).

У нейронов 45-суточных животных ядра располагаются ближе к центру перикарионов и характеризуются неровным контуром кариолеммы. Локальные расширения перинуклеарного пространства отмечаются реже, по-прежнему преобладает мелкозернистый хроматин, при этом ядро выглядит светлым, как и в описанном ранее сроке исследования (рисунок 4.11В).

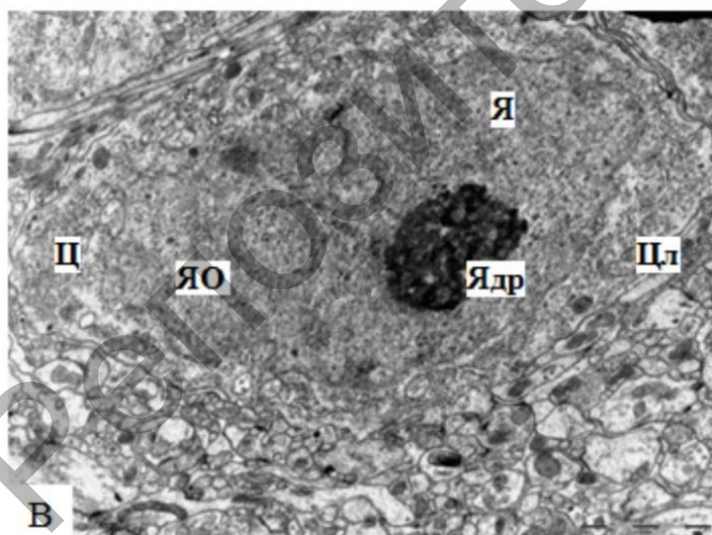
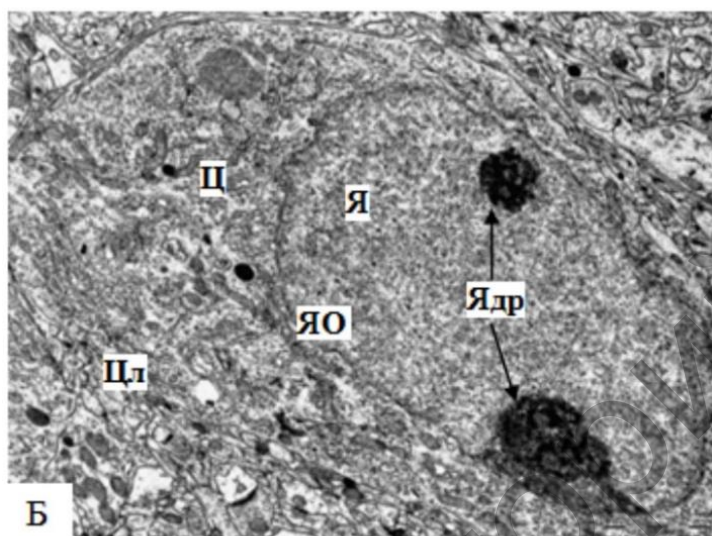
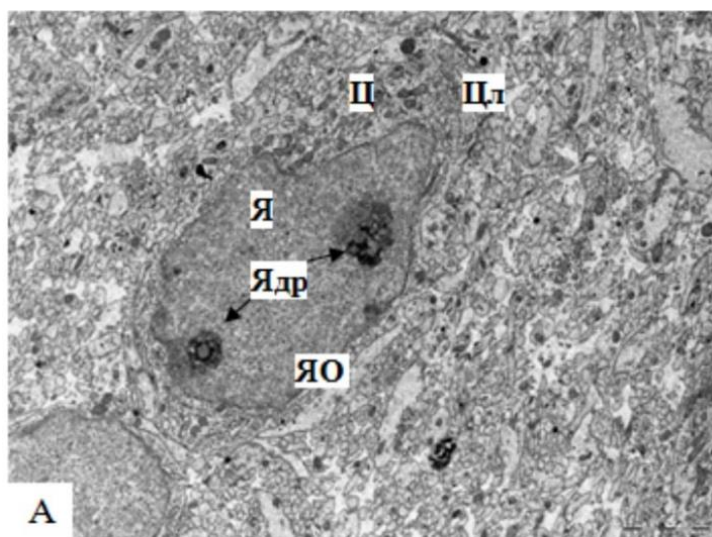


Рисунок 4.11 – Гистаминергические нейроны ядра E2 гипоталамуса на пятые (А), 20 (Б), 45-е (В) сутки постнатального онтогенеза

Цитолемма (Цл), цитоплазма (Ц), ядерная оболочка (ЯО), ядро (Я), ядрышко (Ядр). Электронограммы.

Масштабный отрезок равен 2 мкм. Ув. 8000

Площадь перикарионов гистаминергических нейронов динамично изменяется, увеличиваясь с пятых по 45-е сутки в 2,3 раза. С пятых по 20-е сутки прирост составляет 1,8 раза ($p < 0,0001$), с 20 по 45-е сутки – 1,2 раза ($p = 0,03$) (рисунок 4.12А).

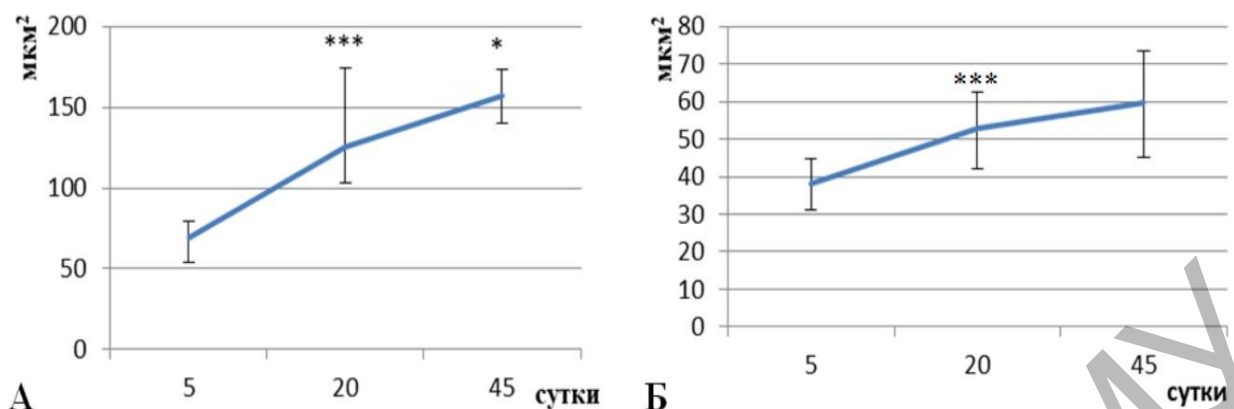


Рисунок 4.12 – Динамика изменений площади тел (А) и площади ядер (Б) гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса в постнатальном онтогенезе (Me (LQ; UQ))

Примечание – * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$; при сравнении показателей каждый последующий срок сопоставляли с предыдущим.

Площадь ядер гистаминергических нейронов возрастает в 1,6 раза с наибольшим приростом с пятых по 20-е сутки – в 1,4 раза ($p < 0,001$) (рисунок 4.10Б), в связи с чем ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) прогрессивно снижается (в 1,9 раза): с пятых по 20-е сутки – в 1,7 раза ($p = 0,0002$), с 20 по 45-е сутки – в 1,2 раза ($p = 0,04$) (рисунки 4.13А, 4.14).

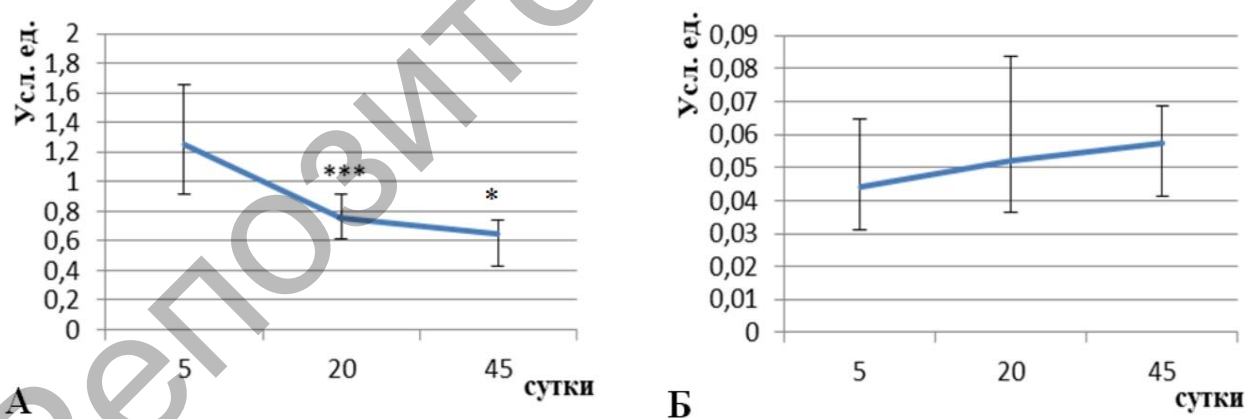


Рисунок 4.13 – Динамика изменений ядерно-цитоплазматического (А) и ядрышко-ядерного (Б) отношений в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса в постнатальном онтогенезе (Me (LQ; UQ))

Примечание – * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$; при сравнении показателей каждый последующий срок сопоставляли с предыдущим.

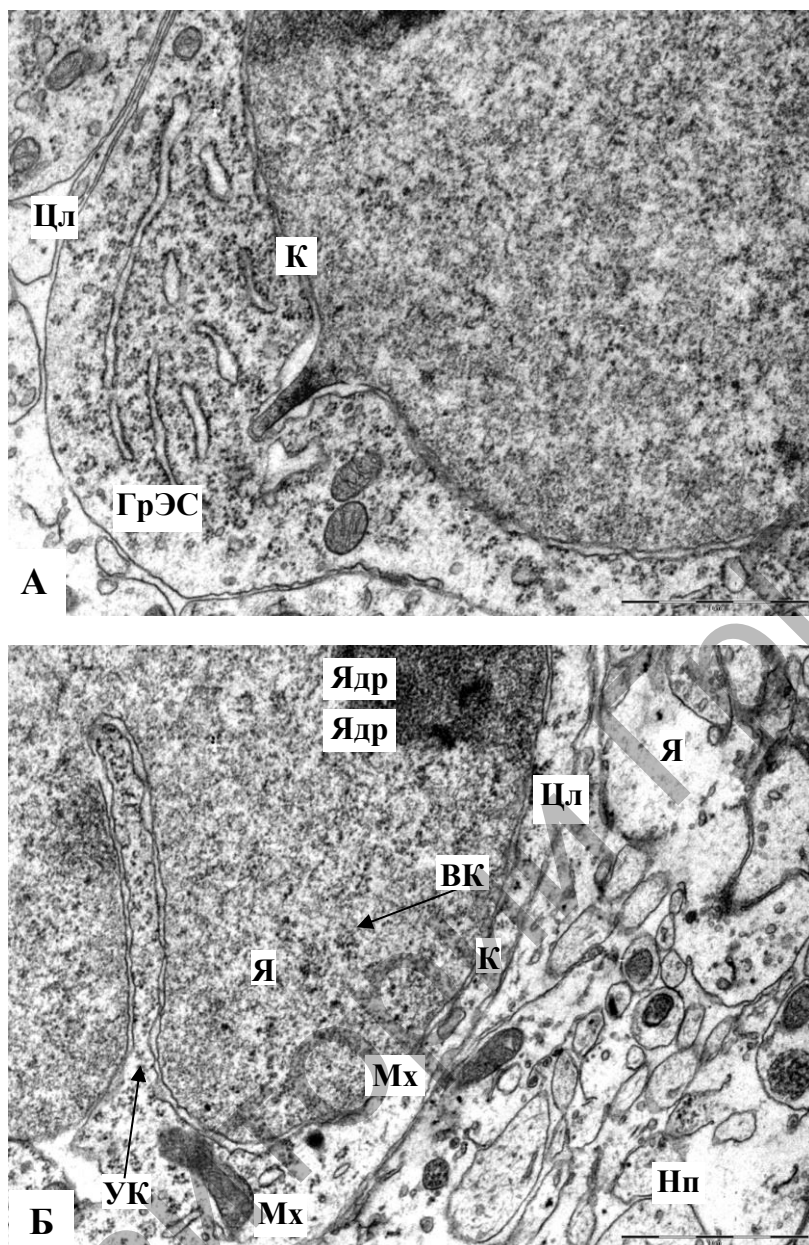
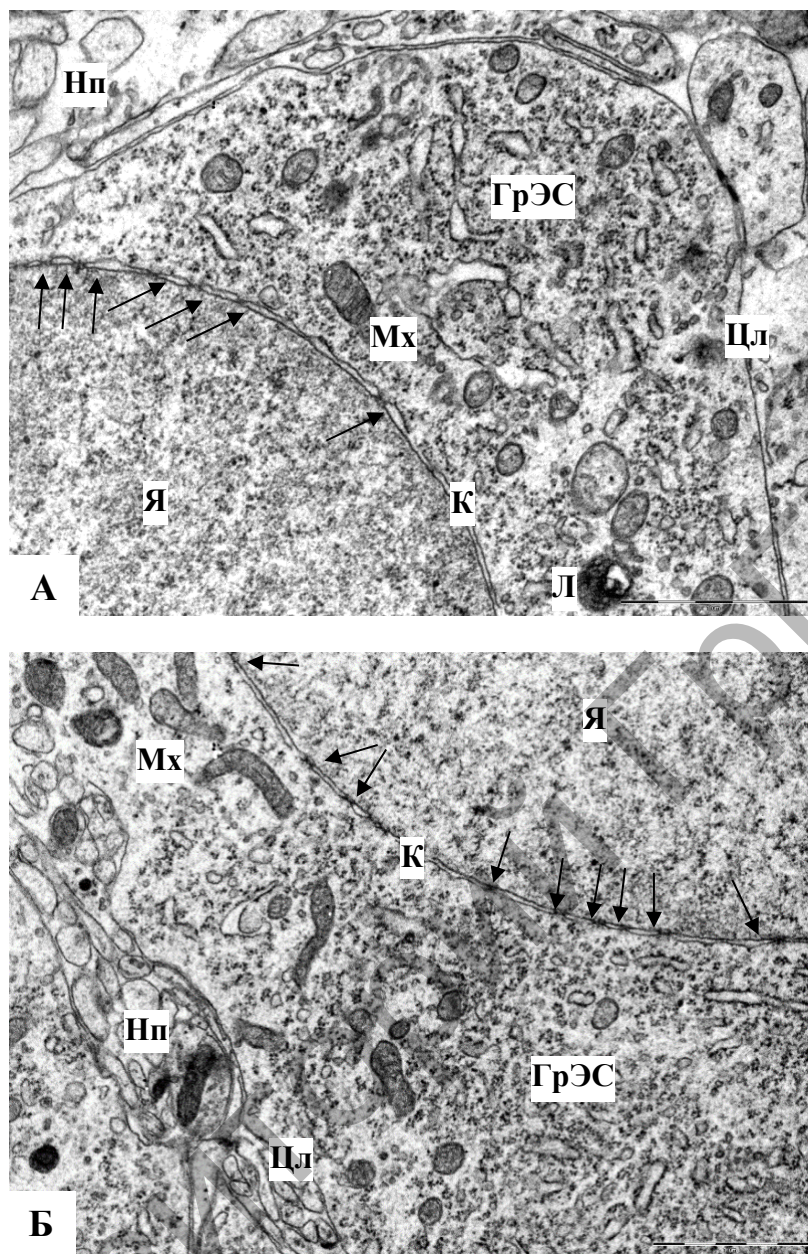


Рисунок 4.14 – Выпячивание (А) и углубление (Б) кариолеммы гистаминергических нейронов гипоталамуса на пятые сутки постнатального развития крыс

Выпячивание кариолеммы (ВК), гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС), кариолемма (К), митохондрии (Мх), нейропиль (Нп), углубление кариолеммы (УК), цитолемма (Цл), ядро (Я), ядрышко (Ядр). Электронограммы. Масштабный отрезок равен 1 мкм. Ув. 30000

Количество ядерных пор с пятых по 20-е сутки после рождения увеличивается в 1,4 раза ($p < 0,0001$), на 45-е сутки достоверно не изменяется по сравнению с 20-ми сутками (рисунки 4.15, 4.16).



Гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС), кариолемма (К), лизосома (Л), митохондрии (Мх), нейропил (Нп), цитолемма (Цл), ядро (Я).

Стрелками обозначены ядерные поры в кариолемме.

Электроннограммы. Масштабный отрезок равен 1 мкм.

Ув.: А – 30000, Б – 25000

Рисунок 4.15 – Ядерные поры в ядрах гистаминергических нейронов гипоталамуса крысят пятисуточного (А) и 20-суточного (Б) возраста

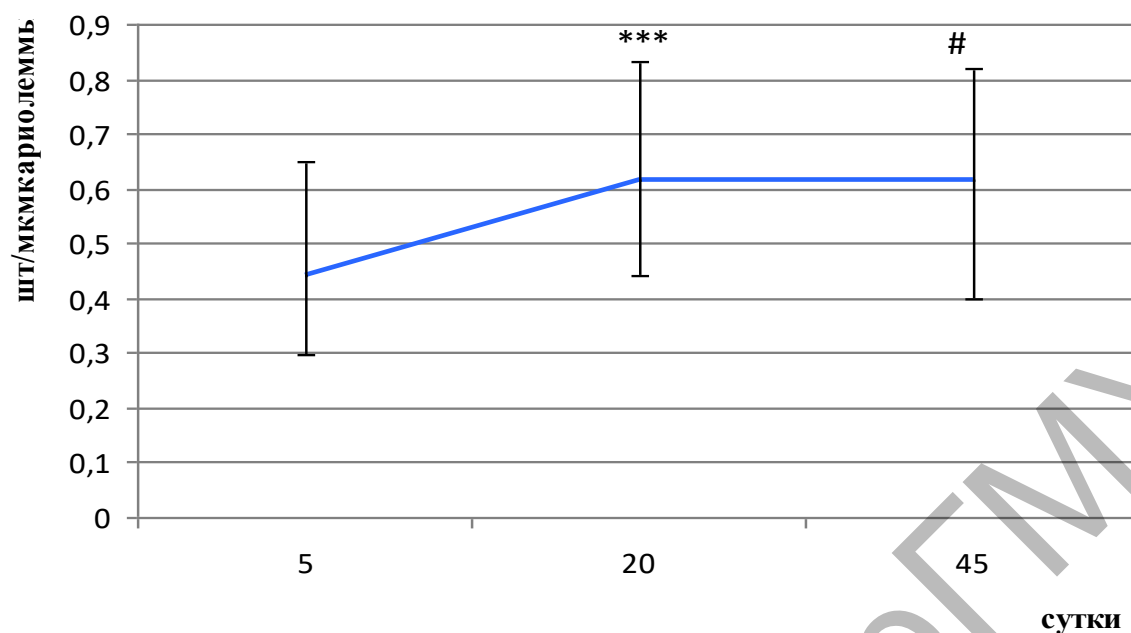


Рисунок 4.16 – Динамика изменений количества ядерных пор у гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса в постнатальном онтогенезе (Me (LQ; UQ))

Примечание – # – $p < 0,05$; сравнение клеточных показателей гистаминергических нейронов между пятыми и 45-ми сутками; *** – $p < 0,001$; при сравнении показателей каждый последующий срок сопоставляли с предыдущим.

Расположение, размеры и строение **ядрышек** в ядрах гистаминергических нейронов в постнатальном онтогенезе значительно меняются (рисунок 4.17).

В ядрах гистаминергических нейронов пятисуточных животных встречается от 1 до 3 ядрышек, их среднее количество на ядро равняется 1,63. Большинство составляют клетки с двумя ядрышками (52 %). Через 20 дней после рождения в ядрах гистаминергических нейронов встречаются 1–3 ядрышка (среднее количество на площадь ядра – 1,50). При этом преобладают клетки с одним ядрышком (53 %). На 45-е сутки постнатального развития количество ядрышек по сравнению с пятыми сутками достоверно уменьшается (до 1,46 ($p < 0,05$)), на клетки с одним ядрышком приходится 73 % (рисунок 4.18).

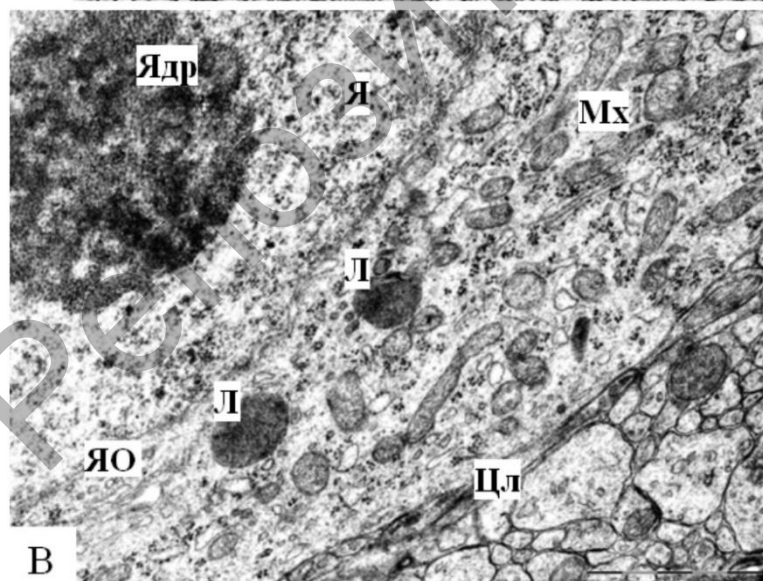
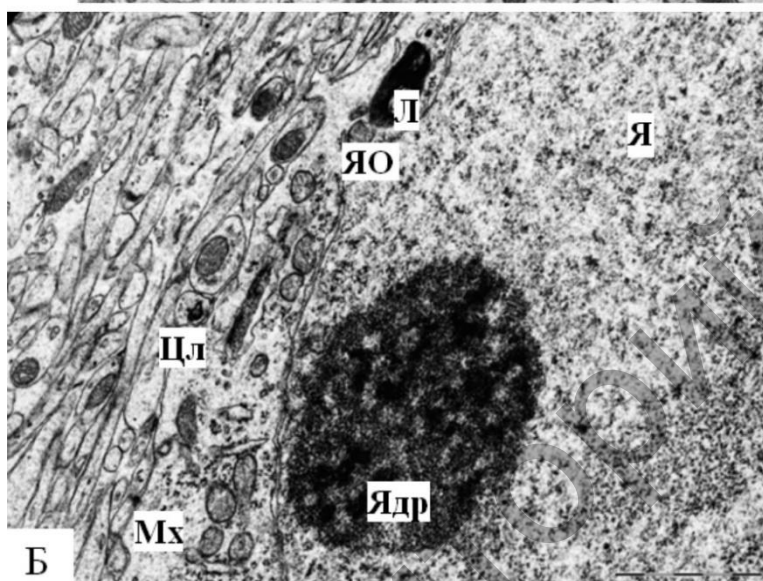
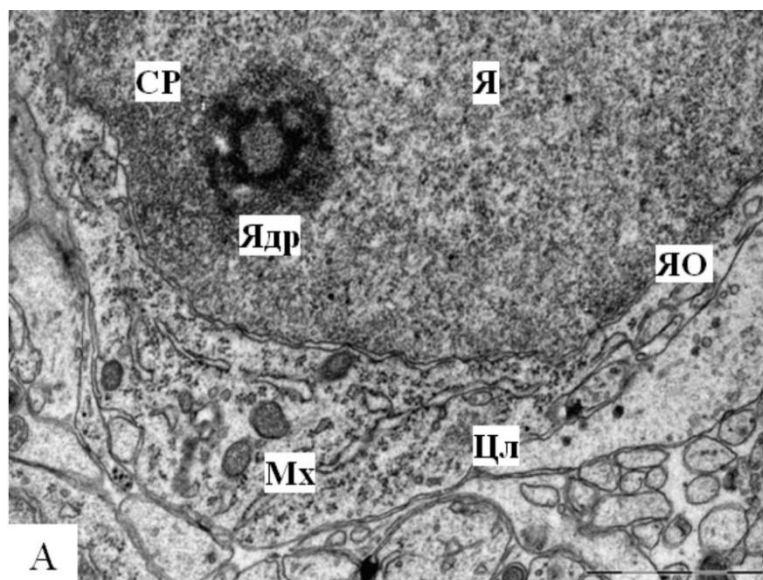


Рисунок 4.17 – Динамика развития ядрышек гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса на пятые (А), 20 (Б) и 45-е (В) сутки постнатального онтогенеза

Лизосомы (Л), митохондрии (Мх), субъединицы рибосом (СР), цитолемма (Цл), ядерная оболочка (ЯО), ядро (Я), ядрышко (Ядр).

Электроннограммы. Масштабный отрезок равен 1 мкм. Ув. 30000

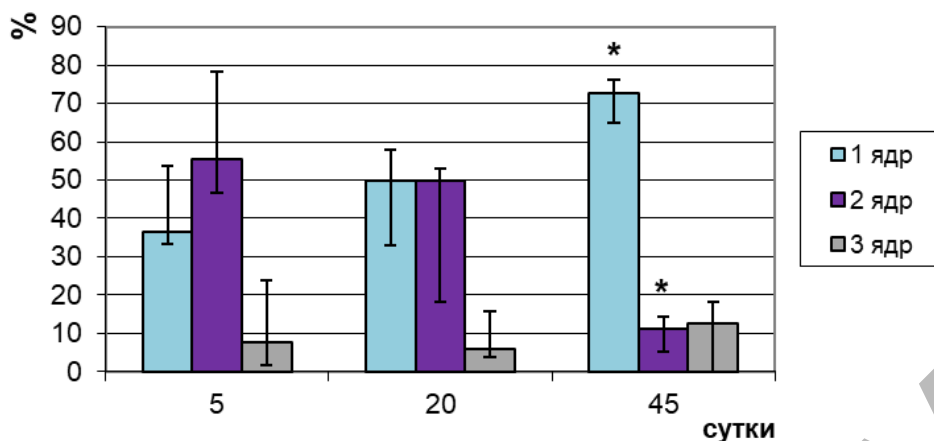


Рисунок 4.18 – Изменение количества ядрышек в гистаминергических нейронах в динамике постнатального онтогенеза (Me (LQ; UQ))

С пятых по 45-е сутки после рождения ядрышки в ядрах гистаминергических нейронов располагаются преимущественно эксцентрично (до 85 % случаев на пятые сутки и до 75 % – на 20 и 45-е сутки) (рисунок 4.15). При этом отмечены два варианта их размещения: вплотную к кариолемме и на некотором удалении от нее. Как правило, у нейронов с несколькими ядрышками последние размещены по разным полюсам ядра. Следует отметить, что в ходе постнатального развития постепенно увеличивается количество клеток с ядрышками, занимающими центральное местоположение. Кроме того, среди эксцентрично расположенных ядрышек нарастает число неконтактирующих напрямую с кариолеммой.

На 5-е сутки постнатального развития большинство ядрышек гистаминергических нейронов – компактного типа. Они состоят преимущественно из гранулярного компонента, немногочисленных скоплений плотного фибриллярного компонента и небольшого количества светлых нуклеолярных промежутков – лакун. Кроме того, на этой стадии развития встречаются ядрышки, которые обладают одним или несколькими довольно крупными фибриллярными центрами, расположенными преимущественно на периферии либо, гораздо реже, в центральной его части. В нескольких случаях обнаружены частично сегрегированные ядрышки с заметным разделением их гранулярного и фибриллярного компонентов, а также ядрышки, содержащие лишь единичные вкрапления плотного фибриллярного компонента в большом облаке зернистой массы.

Вместе с тем отмечены также клетки с ядрышками ретикулярного типа, которые имеют нуклеолонемное строение с хорошо развитым преобладающим гранулярным компонентом и плотным фибриллярным компонентом, окружающим фибриллярные центры. Следует сказать, что нейроны пятисуточных крысят проявляют ядрышко-вую асинхронность, то есть некоторые клетки могут обладать несколькими типами ядрышек в одном и том же ядре. С возрастом такая гетерогенность в дифференцировке данной органеллы исчезает. Между ядрышком и кариолеммой часто наблюдается четкое скопление субъединиц рибосом наподобие «облака» или «тени» (рисунок 4.19А).

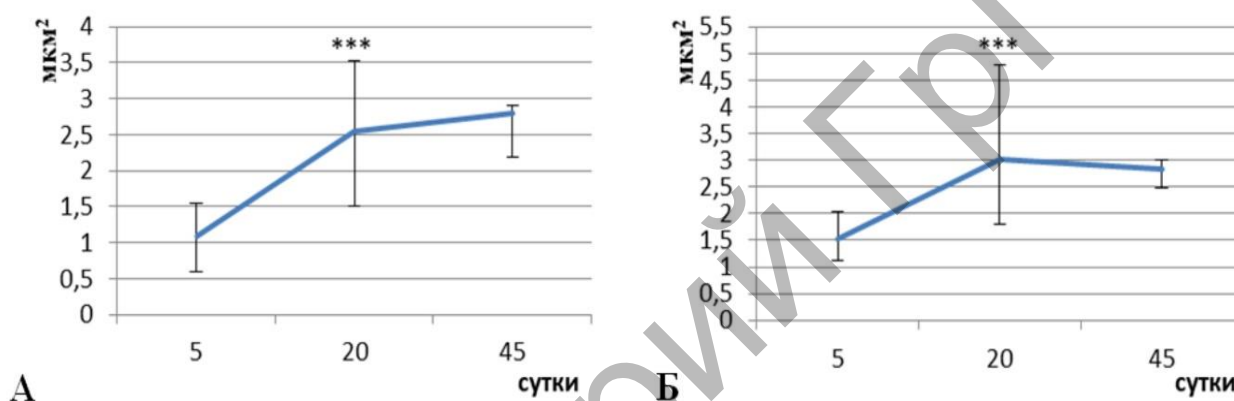


Рисунок 4.19 – Динамика изменений индивидуальной площади ядрышек (А) и суммарной площади ядрышек (Б) гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса в постнатальном онтогенезе (Me (LQ; UQ))

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

В ядрышках гистаминергических нейронов 20-суточных животных наблюдается увеличение относительной доли плотного фибриллярного компонента, который приобретает более упорядоченное расположение в постепенно формирующихся нуклеолонемных нитях. Одновременно происходит возрастание числа мелких фибриллярных центров и ядрышковых вакуолей, что приводит к появлению типичной ретикулярной конфигурации ядрышка. Ядрышки ретикулярного типа в этот период составляют большинство. В некоторых случаях гранулярный компонент занимает преимущественно центральную часть ядрышка, оттесняя фибриллярные центры и плотный фибриллярный компонент на периферию.

Кроме того, по-прежнему встречаются ядрышки со значительным преобладанием зернистого компонента, а также ядрышки, которые обладают несколькими довольно крупными фибриллярными центрами, расположенными на периферии. Скопления субъединиц рибосом между ядрышком и кариолеммой наблюдаются реже, чем у пятисуточных крысят (рисунок 4.19Б).

У 45-суточных крысят в ядрышках фибриллярный и гранулярный компоненты равномерно располагаются в нитях, которые образуют нуклеолонему, количество мелких фибриллярных центров становится больше. Распределяются они более упорядоченно, чем на предыдущих этапах развития. Ядрышки ретикулярного типа в этот период составляют абсолютное большинство. Также встречаются ядрышки, которые обладают несколькими более крупными фибриллярными центрами, занимающими преимущественно периферическое местоположение. Скопления субъединиц рибосом между ядрышком и кариолеммой практически не наблюдаются (рисунок 4.20В).

За исследуемый промежуток времени индивидуальная площадь ядрышек гистаминергических нейронов увеличивается в 2,5 раза, причем с пятых по 20-е сутки она возрастает в 2,3 раза ($p < 0,001$), с 20 по 45-е сутки увеличивается незначительно (рисунок 3.17А). При этом суммарная площадь ядрышек в ядре с пятых по 20-е сутки возрастает в 2,0 раза ($p < 0,001$), а с 20 по 45-е сутки существенно не меняется (рисунок 4.17Б). Ядрышко – ядерное отношение (ЯЯО) не претерпевает существенных изменений (рисунок 4.19Б) [Зиматкин С. М. и соавт., 2020].

С пятых по 45-е сутки постнатального периода в ядрах гистаминергических нейронов выявляются преимущественно контактирующие с ядрышком или лежащие свободно **тельца Кахаля (ТК)** (структуры, имеющие преимущественно овальную или сферическую форму, не ограниченные мембраной и состоящие из гранул, плотных спиральных нитей и промежуточной матрицы более низкой осмиофильной плотности) (рисунок 4.20). Размеры данных структур варьируют от 0,15 до 0,32 мкм².

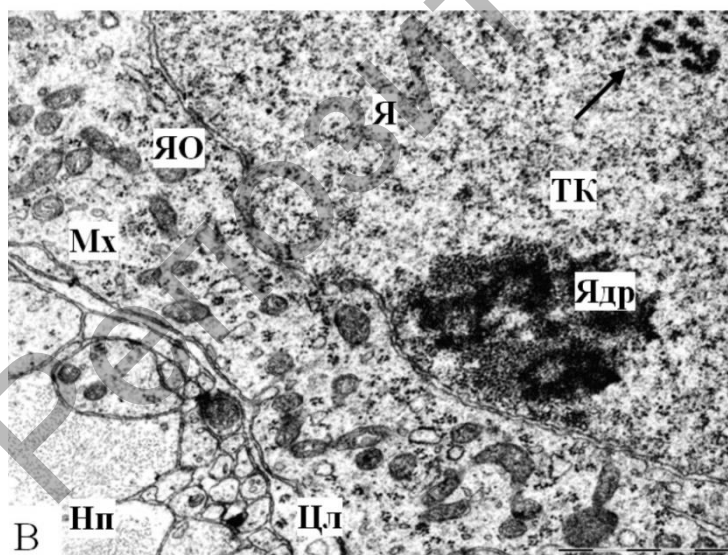
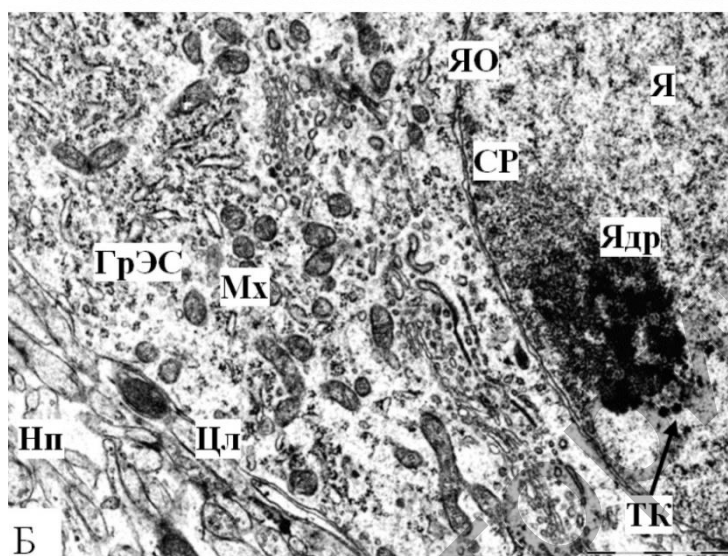
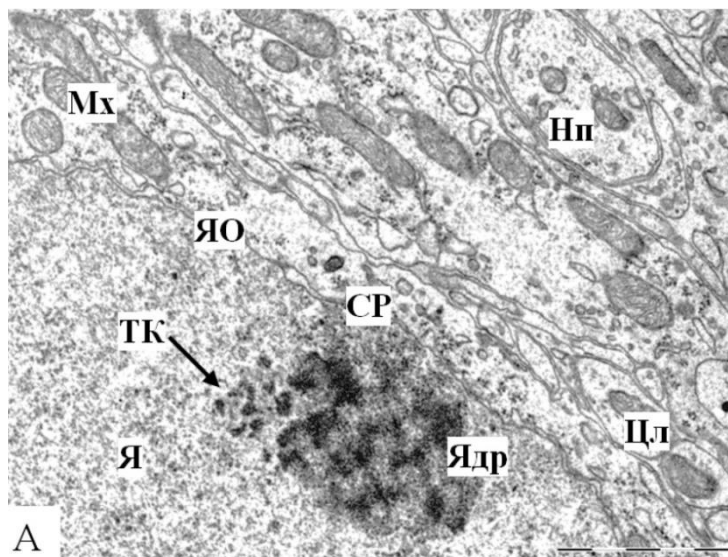


Рисунок 4.20 – Тельца Кахаля в гистаминергических нейронах ядра Е2 гипоталамуса на пятые (А), 20 (Б) и 45-е (В) сутки постнатального онтогенеза Гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС), митохондрии (Мх), нейропил (Нп), субъединицы рибосом (СР), тельца Кахаля (ТК), цитолемма (Цл), ядерная оболочка (ЯО), ядро (Я), ядрышко (Ядр). Электронограммы. Масштабный отрезок равен 1 мкм. Ув. 30000

Известно, что тельце Кахаля включает малые ядерные и ядрышковые рибонуклеопротеины, участвующие в сплайсинге пре-мРНК и созревании пре-рРНК, а также содержит специфический

маркер – белок р80-коилин и белок выживания мотонейронов (survival motor neuron protein), играющие важнейшую роль в поддержании структурной целостности данного образования. Кроме того, ТК разделяет с ядрышком белки фибрилларин, Nopp140, NAR57 и ДНК-топоизомеразу I, что обуславливает функциональный диалог между ними. В настоящее время тельце Кахаля интерпретируется как многофункциональная структура, вовлеченная в биогенез, транспорт и рециркуляцию малых ядерных и ядрышковых РНК [Lafarga M. et al., 2017. Cajal].

У пятисуточных крысят в ядрах у половины исследованных гистаминергических нейронов встречается от 1 до 3 ТК, преимущественно контактирующих с ядрышками (78 %) либо лежащих свободно на некотором удалении от них (22 %). Их среднее число в ядре – 1,1. В процессе установления тесной ассоциации с ядрышком эти структуры крепятся к нему, образуя на его поверхности единичный «колпачок». Отмечено и попарное расположение ТК, связанных с одним и тем же ядрышком (5 % случаев). Прикрепление данных образований осуществляется чаще в области расположения плотного фибриллярного компонента ядрышка (рисунок 4.20А).

На 20-е сутки постнатального развития крыс количество гистаминергических нейронов, в ядрах которых замечены тельца Кахаля, уменьшается до 27 %. Все выявляемые ТК связаны с ядрышками. Среднее число ТК составляет 1,33 (рисунок 4.20). Их количество, приходящееся на одно и то же ядрышко, увеличивается в среднем до 3, характер крепления к нему не меняется, то есть оно осуществляется через плотный фибриллярный компонент последнего (рисунок 4.20Б). В единичных случаях в нейронах встречается до пяти таких структур, формирующих при прикреплении к ядрышку перинуклеоларные кольцевые скопления – розетки.

К 45-м суткам постнатального онтогенеза количество гистаминергических нейронов с тельцами Кахаля уменьшается до 17 %. Вновь обнаруживаются как ассоциированные с ядрышками (70 %), так и свободно лежащие в нуклеоплазме (30 %) ТК. Их среднее число составляет 1. Количество ТК, связанных с одним и тем же ядрышком, колеблется от 1 до 3. При этом частота встречаемости данных структур (по сравнению с пятыми сутками) уменьшается почти в 2,6 раза, однако их размеры и внешний вид не претерпевают существенных изменений (рисунок 4.18) [Федина Е. М. и соавт., 2019].

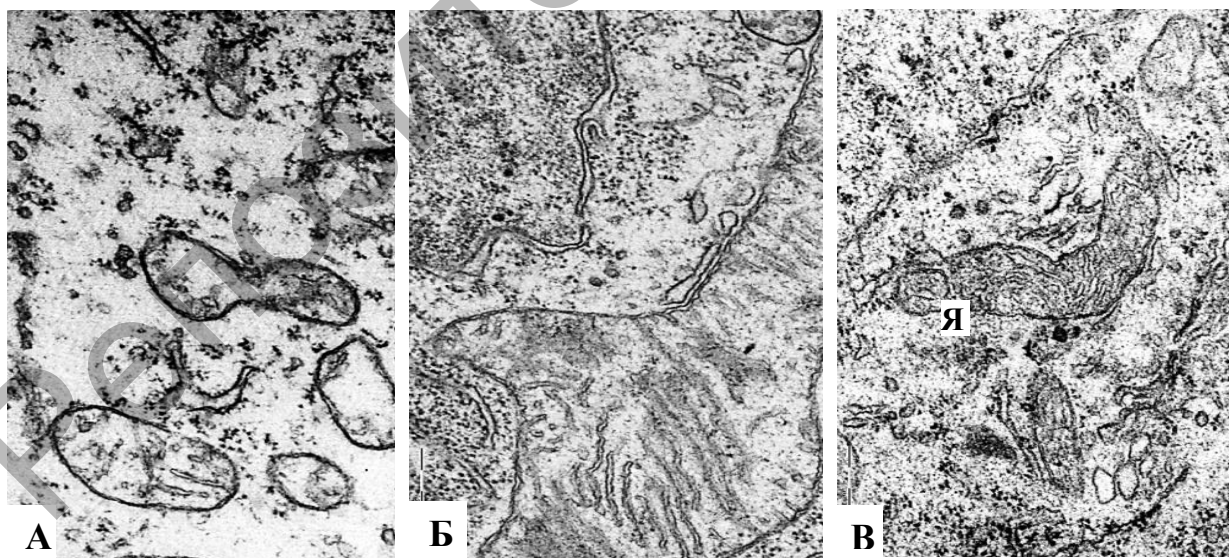
Глава 5

РАЗВИТИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА НЕЙРОНОВ

Энергетический аппарат нейронов представлен митохондриями. Именно в них образуется большая часть АТФ клетки, необходимая для ее функционирования.

Пирамидные нейроны изокортекса

Установлено, что у крысы в постнатальном онтогенезе во внутренних пирамидных нейронах коры мозга происходит прогрессивное нарастание относительного количества митохондрий на единицу площади цитоплазмы (в 2,5 раза). Их площадь с пятых по 20-е сутки после рождения увеличивается в 5 раз, а затем снижается в 2 раза ($p < 0,05$). При этом они становятся менее сферичными и более вытянутыми (особенно на 20-е сутки) (рисунок 5.1).



**Рисунок 5.1 – Митохондрии нейронов внутреннего
пирамидного слоя изокортекса крыс:**

А – 5-е сутки, Б – 20-е сутки, В – 45 сутки

Я – ядро. Электроннограммы. Ув. 50000

В митохондриях прогрессивно нарастает количество и длина крист (в 5–7 раз). При пересчете на площадь митохондрии количество крист на 20-е сутки несколько снижается, а на 45-е сутки резко возрастает (рисунок 5.2; таблица 5.1) [Бонь Е. И., Зиматкин С. М., 2017, 2019; Zimatkin S. M., Bon E. I. 2018].

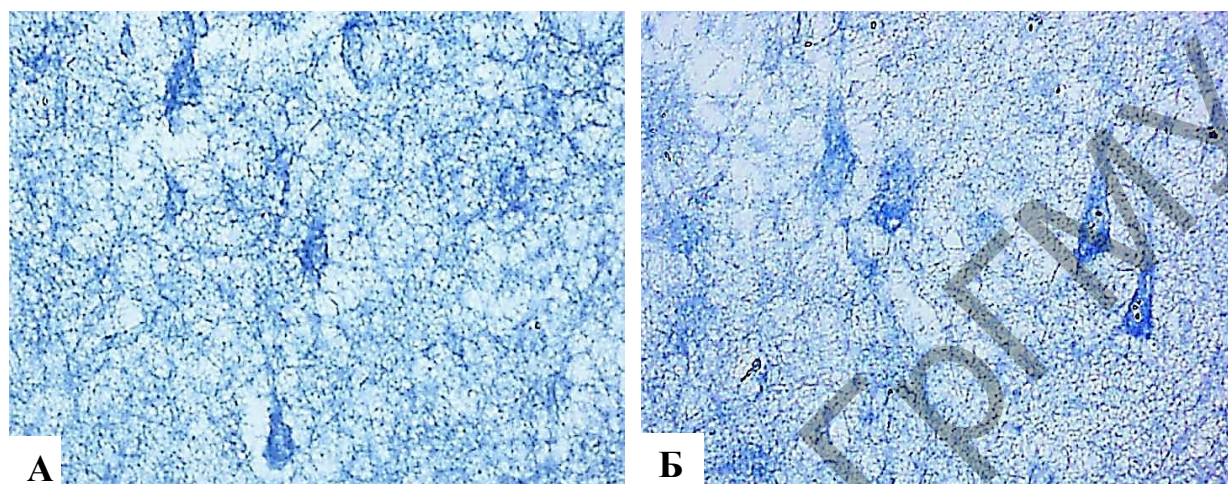


Рисунок 5.2 – Активность НАДН-ДГ в нейронах пятого слоя изокортекса крыс на 20-е (А) и 45-е (Б) сутки после рождения
Окраска по Нахласу, Уокеру, Зелигману. Цифровая микрофотография. Ув. 400

Таблица 5.1 – Показатели ультрамикроскопической морфометрии органелл нейронов пятого слоя изокортекса крыс (Me (LQ; UQ))

	Показатель	5-е сутки	20-е сутки	45-е сутки
Митохондрии	Количество на 1 мкм ²	0,8 (0,6; 0,8)	1,4 (1,4; 1,6)*	1,9 (1,6; 2,2)*
	Площадь, мкм ²	0,075 (0,073; 0,08)	0,345 (0,34; 0,35)*	0,16 (0,15; 0,2)*+
	Форм-фактор, ед.	0,88 (0,87; 0,89)	0,64 (0,6; 0,66)*	0,62 (0,6; 0,64)*
	Фактор элонгации, ед.	1,37 (1,26; 1,5)	4 (3; 4,5)*	2,8 (2,76; 2,82)*+
	Количество крист в митохондрии	4 (3; 4)	13,5 (12; 14)*	24,5 (24; 25)*+
	Общая длинна крист на митохондрию, мкм	0,6 (0,45; 0,64)	3,3 (2,9; 3,6)*	4,4 (3,8; 5)*+
	Количество крист в митохондрии на 1 мкм ²	53 (41;53)	39 (35;40)	153 (125; 160)*+
	Общая длинна крист в митохондрии на 1 мкм ²	8 (6; 8)	9,6 (8,8; 10)*	25 (25; 25)*+

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с 5 сутками; + – $p < 0,05$ по сравнению с 20 сутками.

В цитоплазме этих нейронов в постнатальном онтогенезе повышается активность маркерных ферментов митохондрий СДГ и НАДН-дегидрогеназ. Активность НАДФН-ДГ также возрастает, отражая уровень обеспечения процессов синтеза в цитоплазматическом матриксе и мембранах эндоплазматической сети. Значительно повышается активность фермента пентозофосфатного пути Г-6-Ф-ДГ с 20-х по 45-е сутки, в то время как активность ЛДГ практически не изменяется в динамике постнатального онтогенеза (рисунки 5.2–5.9).

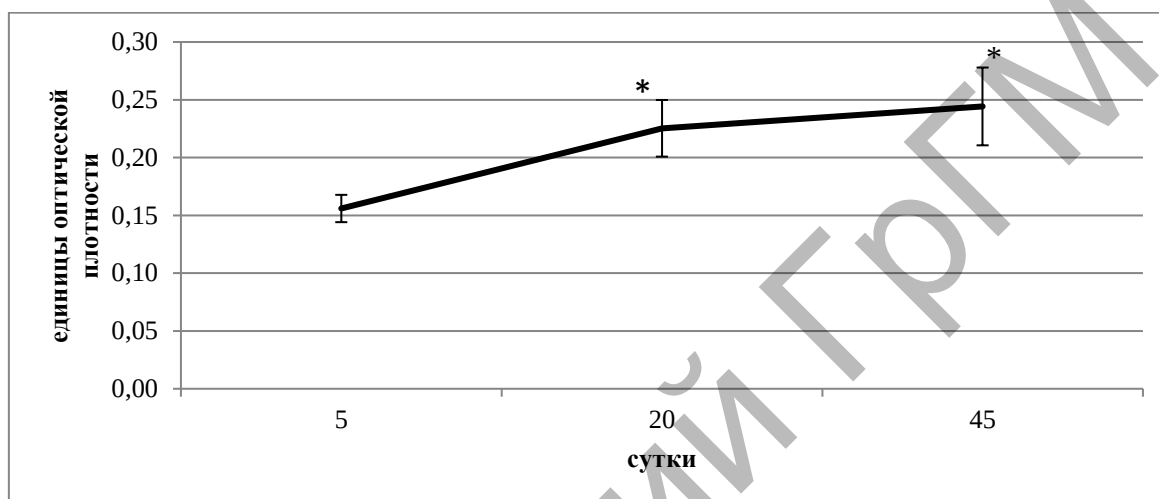


Рисунок 5.3 – Изменение активности НАДН-ДГ в нейронах пятого слоя изокортекса крыс в постнатальном онтогенезе

Примечание – $\text{Me} \pm \text{IQR}$; * – $p < 0,05$ по сравнению с 5 сутками.

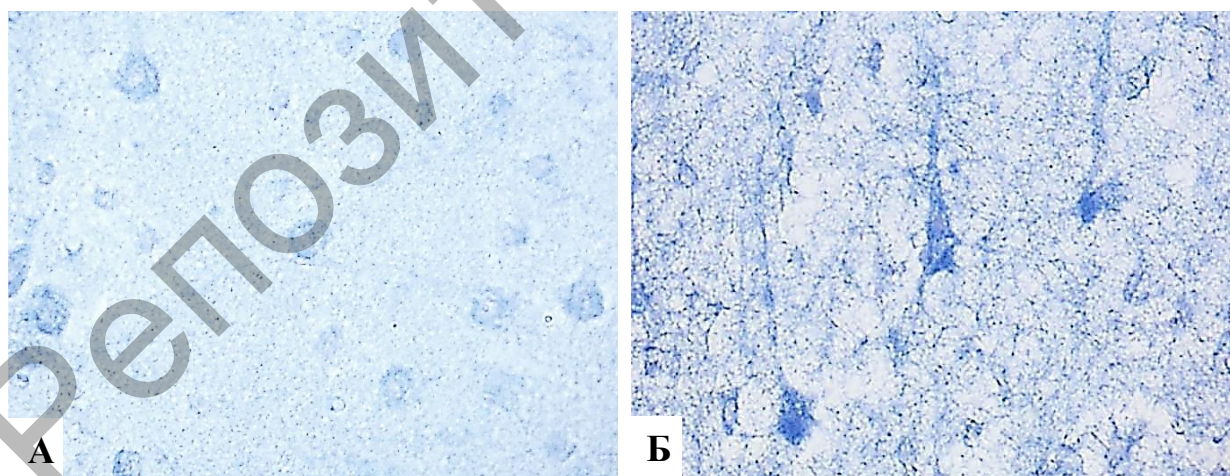


Рисунок 5.4 – Активность СДГ в нейронах пятого слоя изокортекса крыс на 20-е (А) и 45-е (Б) сутки после рождения

Окраска по Нахласу и др.

Цифровая микрофотография. Ув. 400

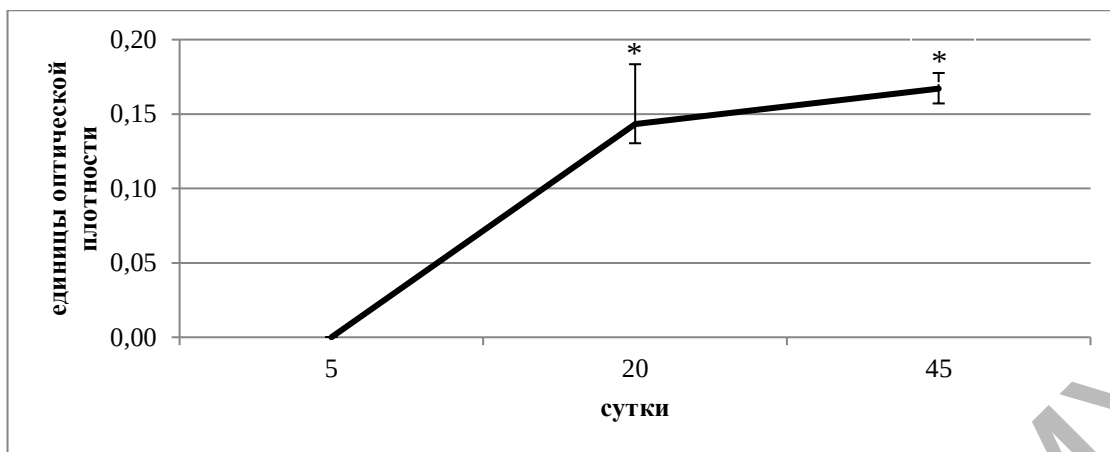


Рисунок 5.5 – Изменение активности СДГ в нейронах пятого слоя изокортекса крыс в постнатальном онтогенезе

Примечание – $\text{Me} \pm \text{IQR}$; * – $p < 0,05$ по сравнению с 5 сутками.

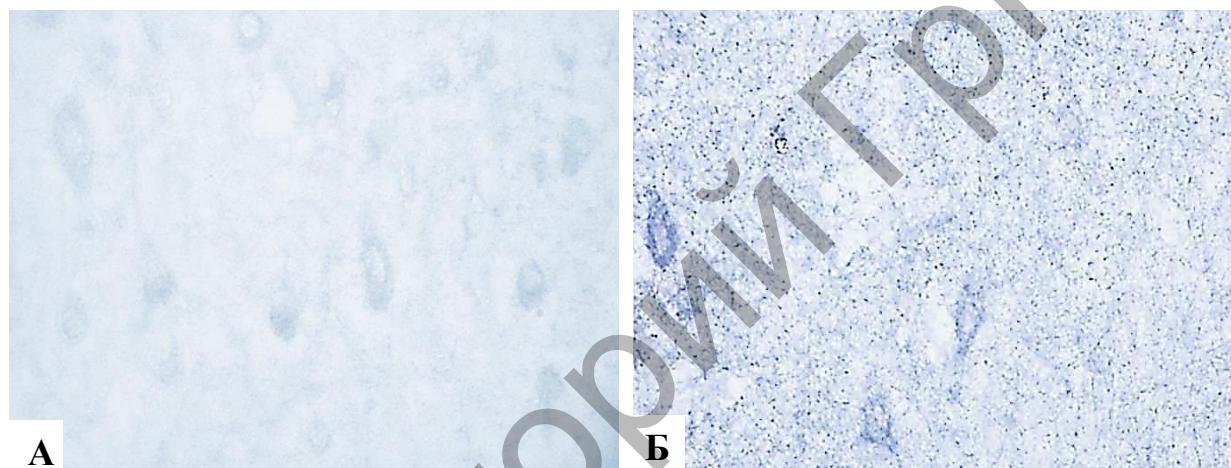


Рисунок 5.6 – Активность НАДФН-ДГ в нейронах пятого слоя изокортекса крыс на 20-е (А) и 45-е (Б) сутки после рождения

Окраска по Гесс, Скарпели, Пирсу. Цифровая микрофотография. Ув. 400

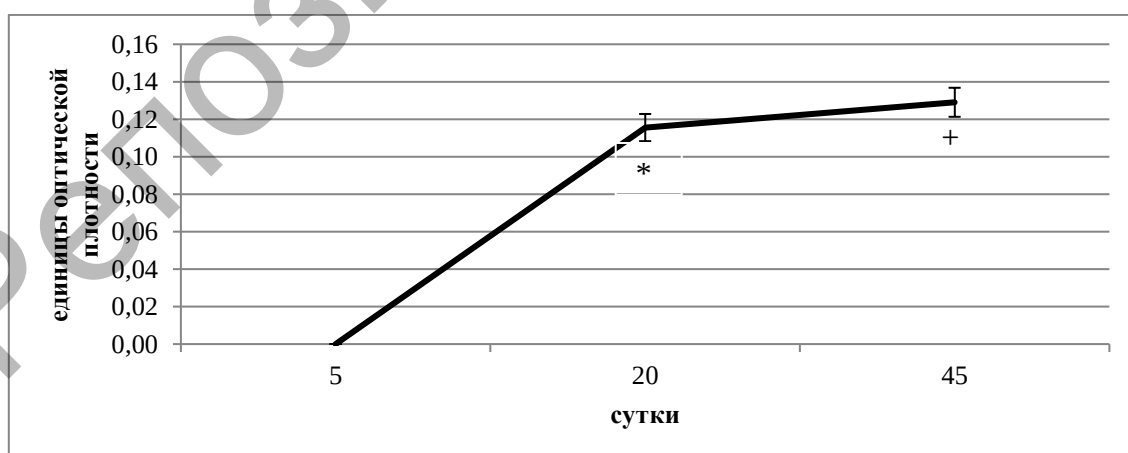


Рисунок 5.7 – Изменение активности НАДФН-ДГ в нейронах пятого слоя изокортекса крыс в постнатальном онтогенезе

Примечание – $\text{Me} \pm \text{IQR}$; * – $p < 0,05$ по сравнению с 5 сутками, + – $p < 0,05$ по сравнению с 20 сутками.

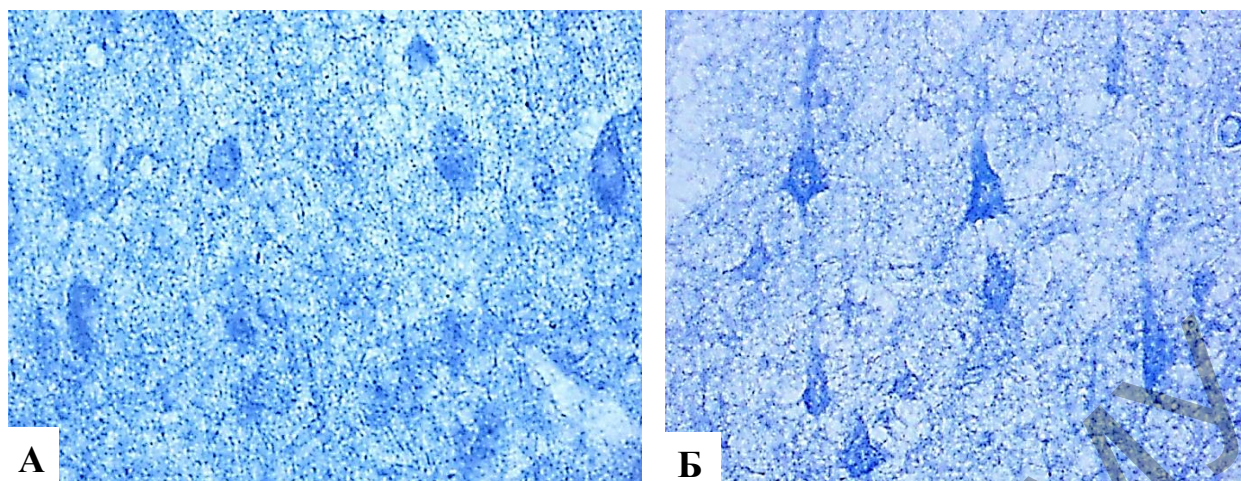


Рисунок 5.8 – Активность Г-6-Ф-ДГ в нейронах пятого слоя изокортекса крыс на 20-е (А) и 45-е (Б) сутки после рождения
Окраска по Гесс, Скарпели, Пирсу. Цифровая микрофотография. Ув. 400

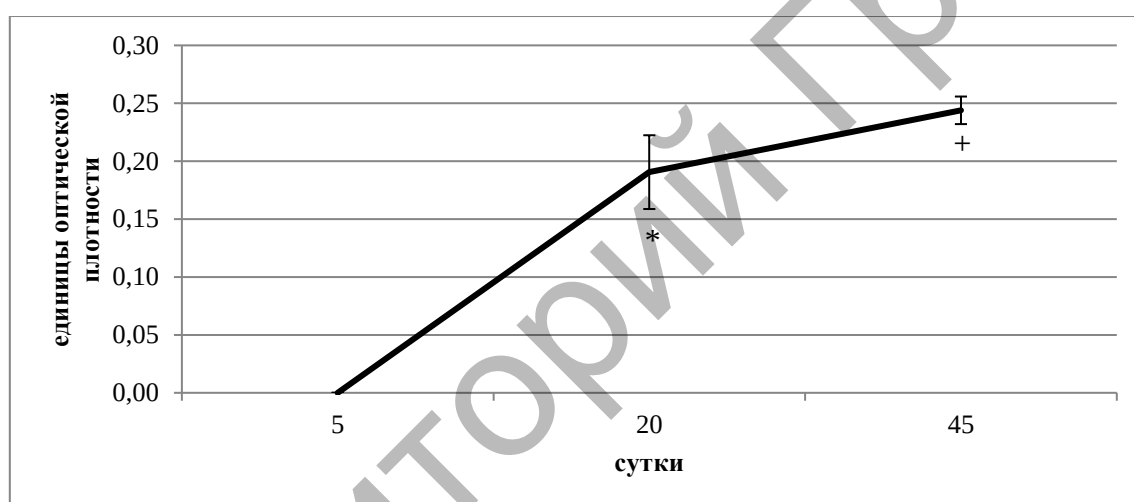


Рисунок 5.9 – Изменение активности Г-6-Ф-ДГ в нейронах 5-го слоя изокортекса крыс в постнатальном онтогенезе

Примечание – $\text{Me} \pm \text{IQR}$; * – $p < 0,05$ по сравнению с 5-ми сутками, + – $p < 0,05$ по сравнению с 20-ми сутками.

Клетки Пуркинье мозжечка

На 2-е сутки постнатального онтогенеза количество митохондрий на единицу площади цитоплазмы наибольшая (рисунки 4.1, 4.2), а по мере роста перикарионов к 45-м суткам – снижается в два раза, но прогрессивно увеличиваются (на 2–45-е сутки) их размеры (рисунок 4.1, 4.2). При этом площадь, занимаемая митохондриями в цитоплазме КП, варьирует в разные сроки от 6 до 10 % (рисунок 4.2).

Округлая форма этих органелл характерна для раннего периода постнатального онтогенеза (2–15-е сутки), затем она меняется на более удлиненную (45-е сутки) (рисунок 4.1). Со вторых по 45-е сутки относительное количество крист на 1 $\mu\text{м}^2$ площади митохондрии почти не изменяется, но при этом к 45-м суткам в 1,5 раза увеличивается их длина (рисунки 5.10, 5.11) [Карнюшко О. А. и соавт., 2020].

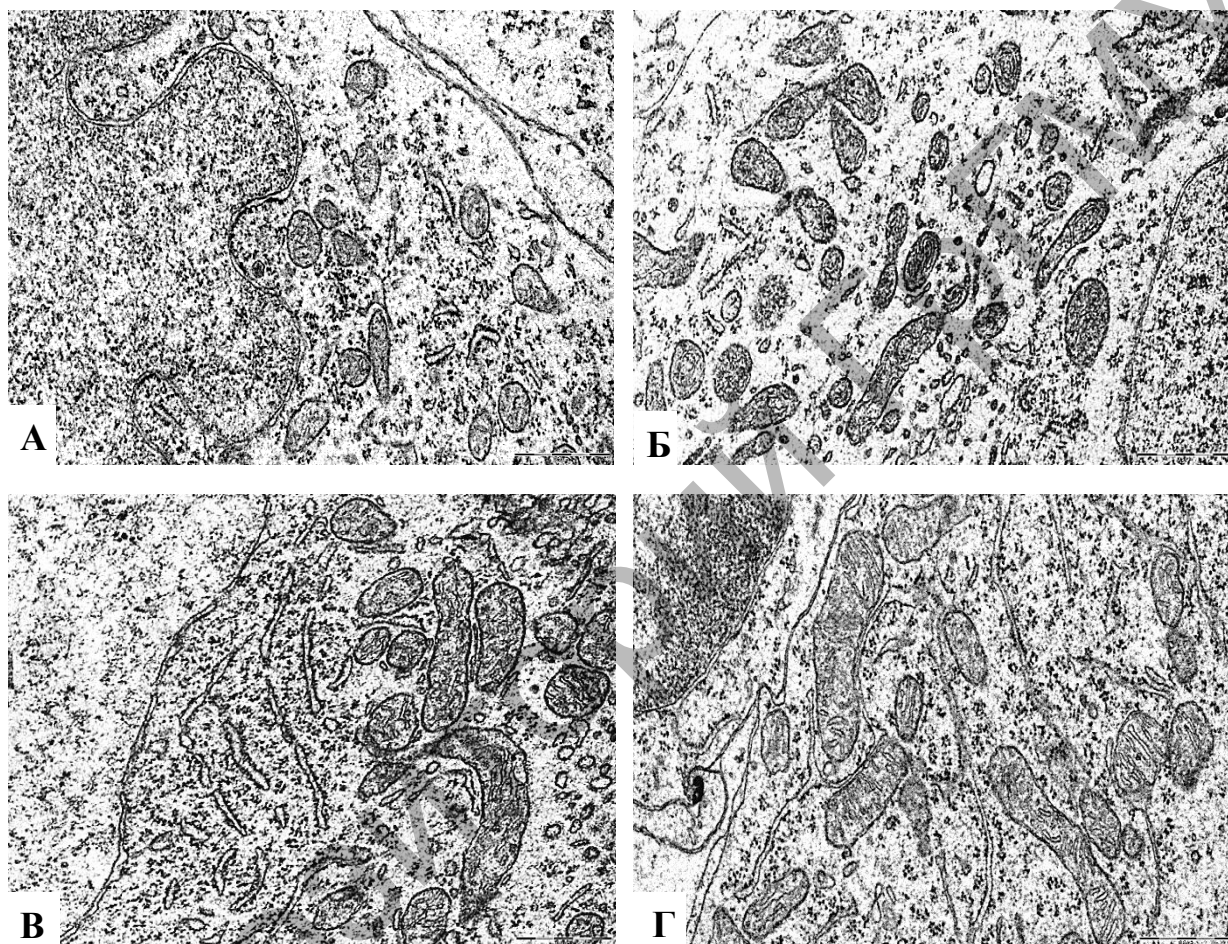


Рисунок 5.10 – Митохондрии клеток Пуркинье палеocerebellума крыс в постнатальном онтогенезе:

2-е (А), 7-е (Б), 15-е (В), 45-е (Г) сутки после рождения

Масштабный отрезок равен 0,5 мкм.

Электроннограмма. Ув. 40000

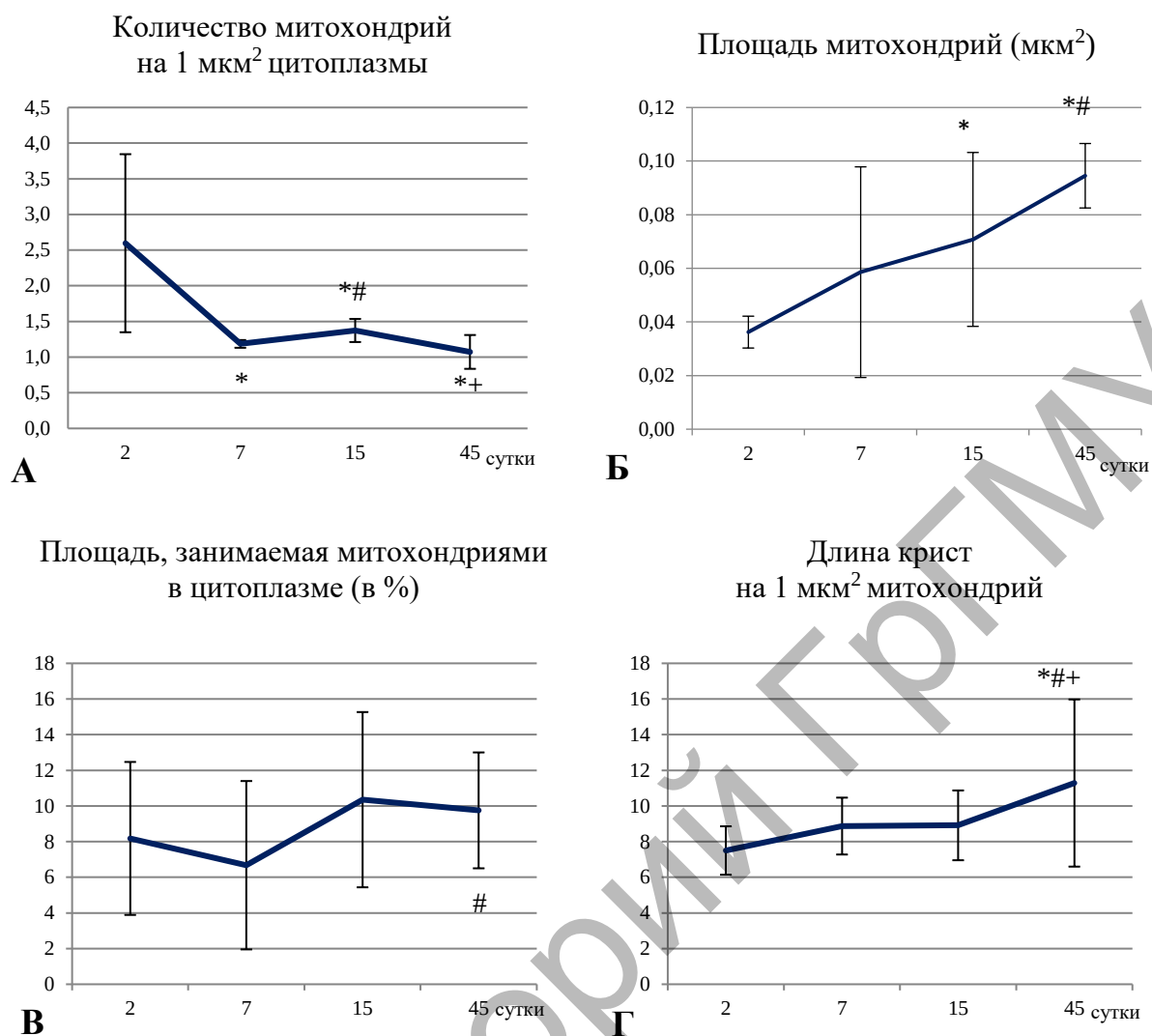


Рисунок 5.11 – Морфометрические показатели митохондрий клеток Пуркинье палеocereбеллюма крыс в постнатальном онтогенезе (Me+IQR)

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению со 2-ми сутками, # – $p < 0,05$ по сравнению с 7-ми сутками, + – $p < 0,05$ по сравнению с 15-ми сутками.

Активность маркерных ферментов митохондрий СДГ и НАДН-ДГ в клетках Пуркинье мозжечка крыс выявляется по темносинему осадку продукта гистохимической реакции – диформаза (рисунок 5.12). Установлено, что активность СДГ в клетках Пуркинье крысы имеет отличия в разные возрастные периоды. Наиболее интенсивный рост активности фермента обнаружен в раннем постнатальном периоде, и к 7-м суткам активность этого фермента достигает уровня взрослых животных (рисунки 5.12–5.16).

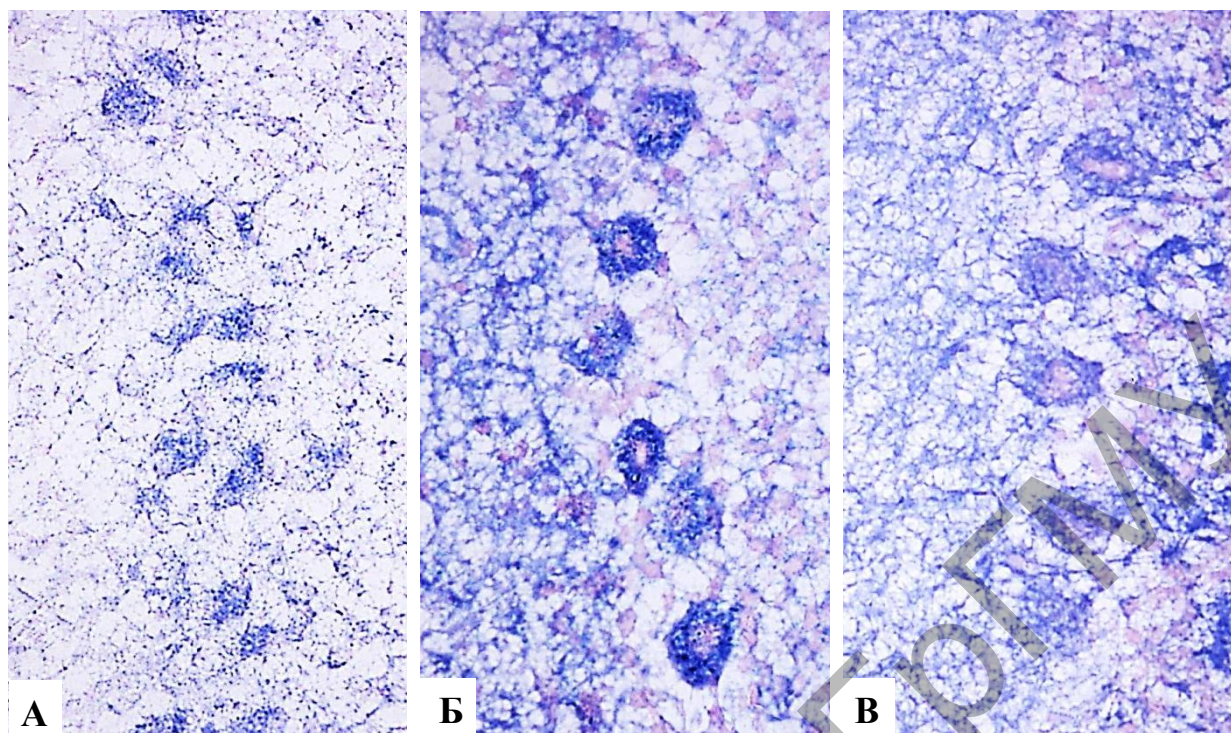


Рисунок 5.12 – Активность и локализация СДГ в цитоплазме клеток Пуркинье в постнатальном онтогенезе: 7-е (А), 15-е (Б), 45-е (В) сутки после рождения

Окраска по Нахласу и др.

Цифровая микрофотография. Ув. 200

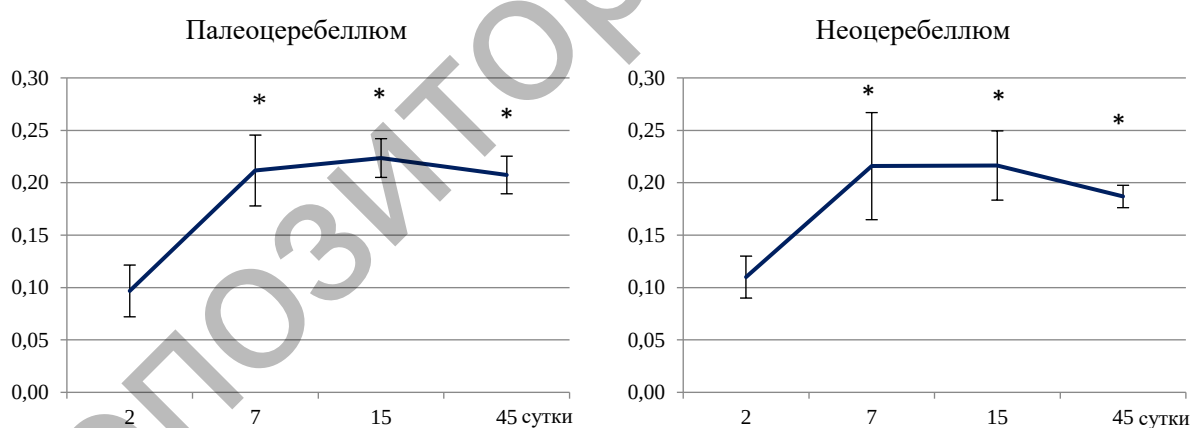


Рисунок 5.13 – Динамика активности СДГ в цитоплазме клеток Пуркинье у крыс в постнатальном онтогенезе (Me±IQR)

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с 2-ми сутками.

Активность СДГ возрастала в цитоплазме нейронов промежуточного ядра со вторых по 15-е сутки после рождения (рисунок 5.14).

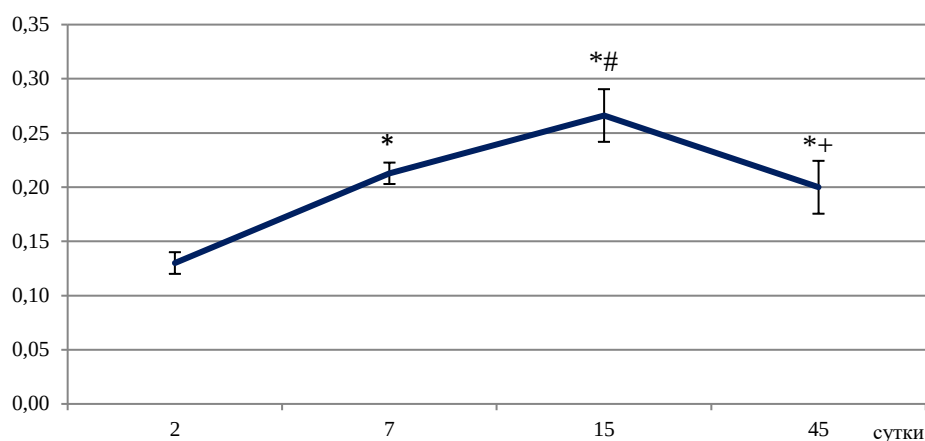
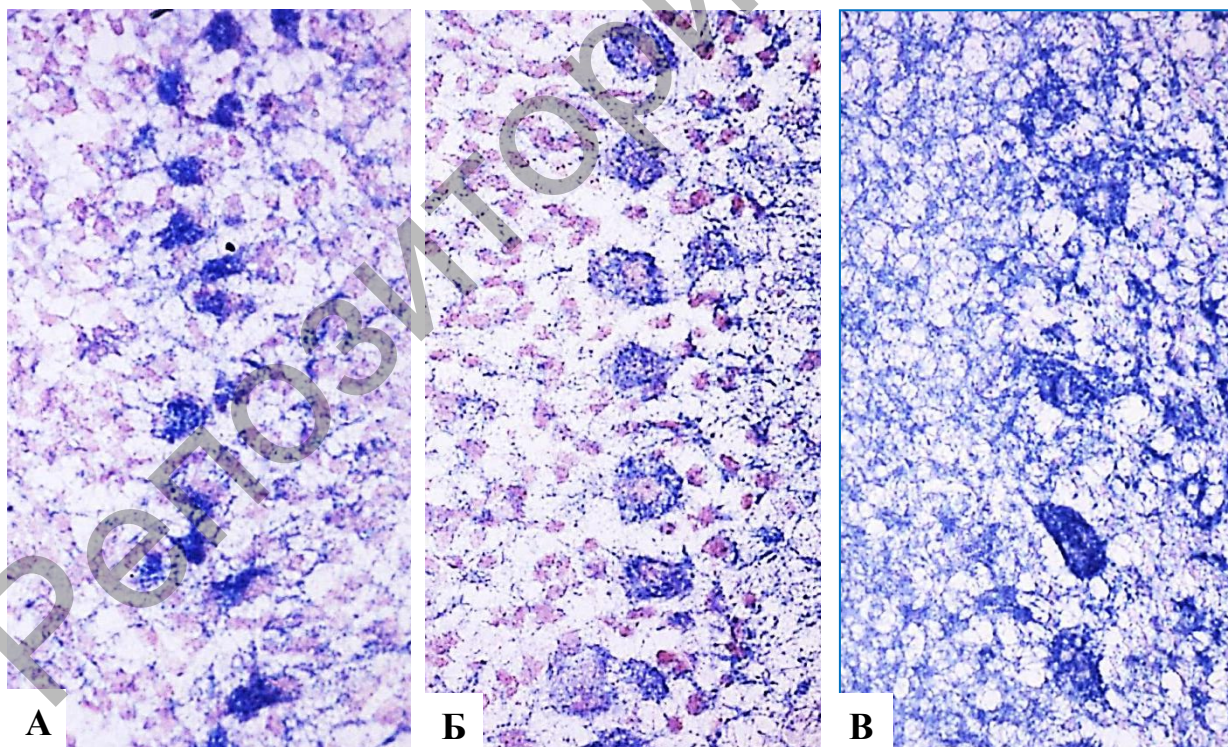


Рисунок 5.14 – Изменение активности СДГ в цитоплазме нейронов промежуточного ядра крыс в постнатальном онтогенезе (Me±IQR)

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с 2-ми сутками, # – $p < 0,05$ по сравнению с 7-ми сутками, + – $p < 0,05$ по сравнению с 15-ми сутками.

Активность НАДН-ДГ в цитоплазме клеток Пуркинье в постнатальном онтогенезе изменялось волнообразно: возрастала со вторых по 7-е сутки, а затем несколько снижалась к 15-м суткам (рисунки 5.15, 5.16).



А

Б

В

Рисунок 5.15 – Активность и локализация НАДН-ДГ в цитоплазме клеток Пуркинье в постнатальном онтогенезе: 7-е (А), 15-е (Б), 45-е (В) сутки после рождения
Окраска по Гесс, Скарпелли, Пирсу. Цифровая микрофотография. Ув. 200

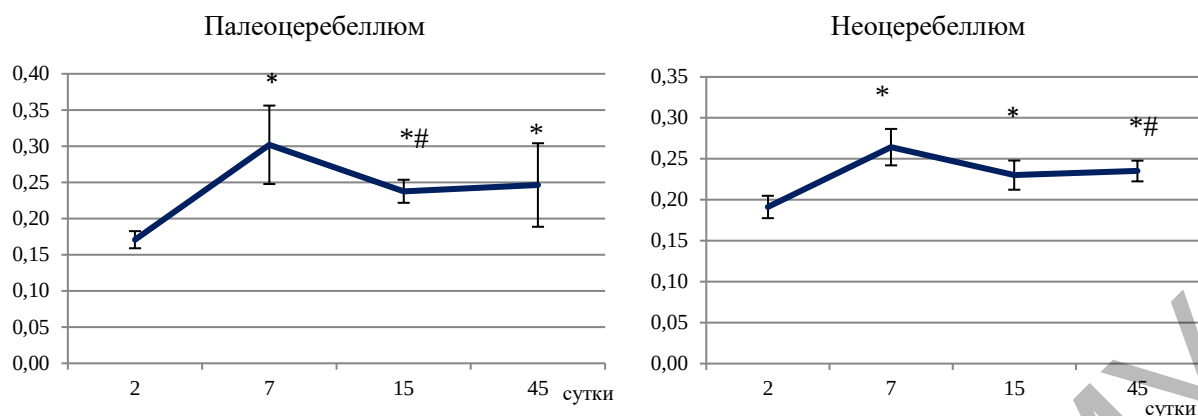


Рисунок 5.16 – Изменение активности НАДН-ДГ в цитоплазме клеток Пуркинье крыс в постнатальном онтогенезе (Me±IQR)

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с 2-ми сутками, # – $p < 0,05$ по сравнению с 7-ми сутками.

В нейронах промежуточного ядра мозжечка активность НАДН-ДГ в постнатальном онтогенезе прогрессивно нарастала (рисунок 5.17).

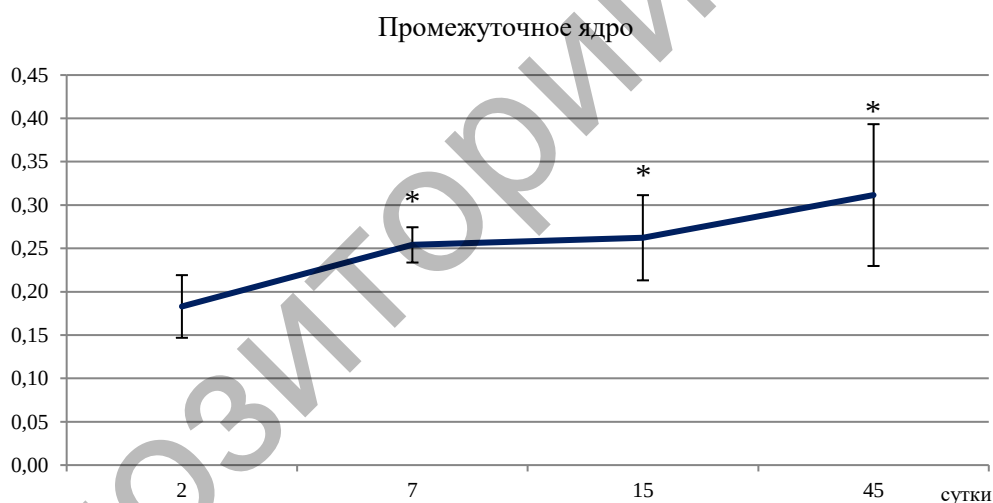


Рисунок 5.17 – Изменение активности НАДН-ДГ в нейронах промежуточного ядра мозжечка крыс в постнатальном онтогенезе (Me±IQR)

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению со 2-ми сутками.

Напротив, активность ЛДГ у животных в цитоплазме КП и нейронах промежуточного ядра со вторых по 45-е сутки после рождения прогрессивно снижается (рисунки 5.18–5.20).

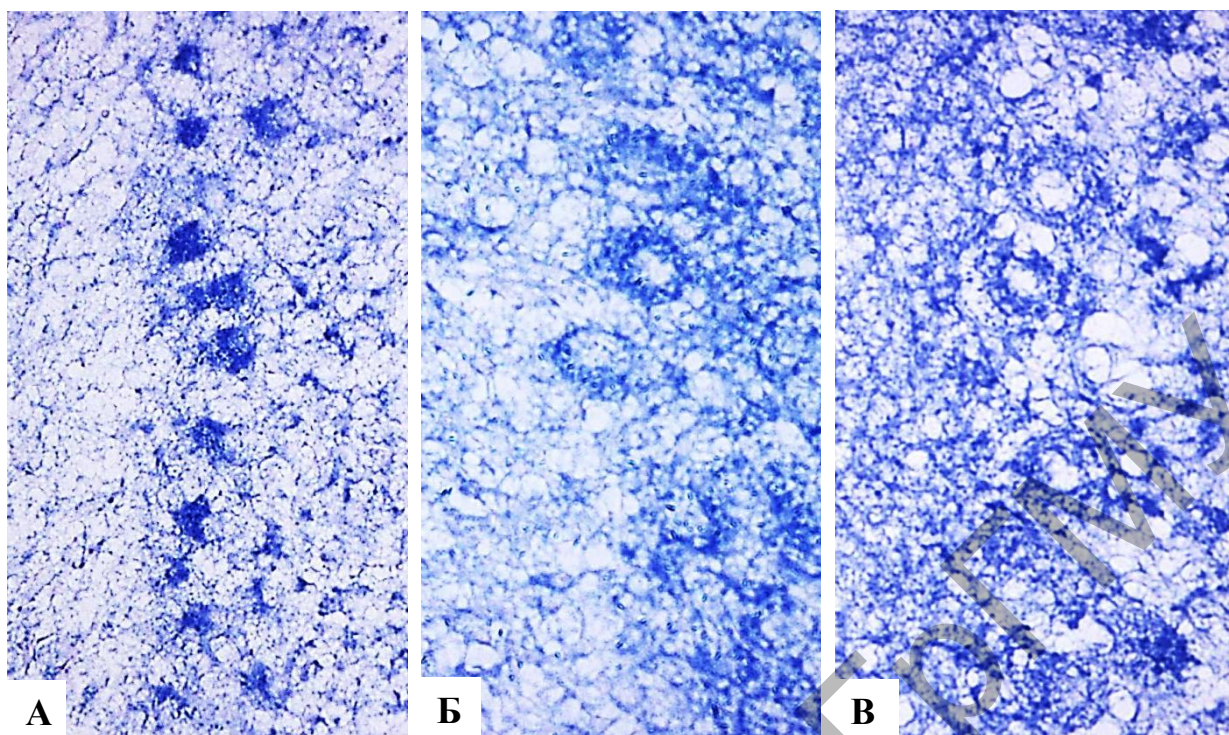


Рисунок 5.18 – Активность и локализация ЛДГ в цитоплазме клеток Пуркинье 7-е (А), 15-е (Б) и 45-е (В) сутки после рождения
Окраска по Гесс, Скарпелли, Пирсу.
Цифровая микрофотография. Ув. 200

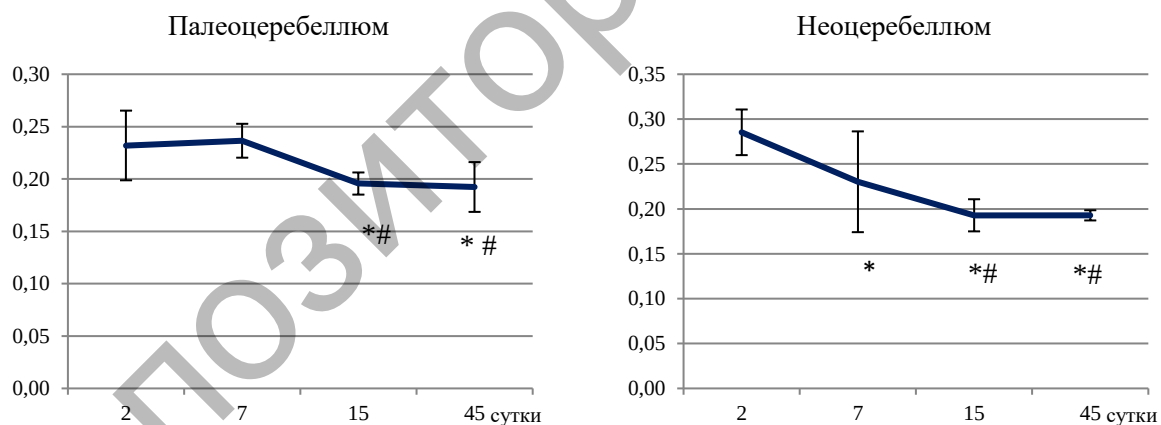
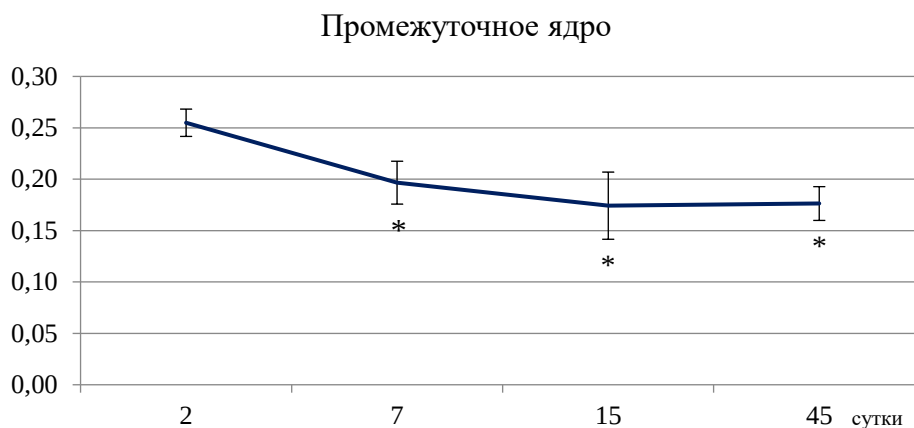


Рисунок 5.19 – Изменение активности ЛДГ в цитоплазме клеток Пуркинье крыс в постнатальном онтогенезе (Me±IQR)

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению со 2-ми сутками, # – $p < 0,05$ по сравнению с 7-ми сутками.



**Рисунок 5.20 – Изменение активности ЛДГ
в цитоплазме нейронов промежуточного ядра крыс
в постнатальном онтогенезе (Me±IQR)**

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению со 2-ми сутками.

Таким образом, у крыс в постнатальном онтогенезе в цитоплазме КП и нейронов промежуточного ядра увеличивается активность НАДН-ДГ и СДГ, а активность цитозольного фермента, ЛДГ прогрессивно уменьшается.

Митохондрии необходимы для жизнедеятельности нервных клеток. Эта органелла отвечает за синтез аденозинтрифосфата (АТФ), гомеостаз кальция, а также продукцию и детоксикацию активных форм кислорода, апоптоз [Srividhya R., 2009]. Митохондрии играют активную роль в регуляции синаптогенеза и синаптической активности. Сукцинатдегидрогеназа связывает трикарбоновый цикл с цепью транспорта электронов в митохондриях, следовательно, активность данного фермента может отражать распределение этих органелл в нейронах [Hajós F., 1969] и их работу по выработке АТФ [Rutter J., 2010]. Лактат является промежуточным метаболитом в энергетическом метаболизме клеток мозга.

Таким образом, разнонаправленное изменение активности ферментов свидетельствует о становлении окислительного метаболизма в КП в постнатальном онтогенезе.

Гистаминергические нейроны

Количество и строение митохондрий в гистаминергических нейронах в постнатальном онтогенезе значительно меняется. В цитоплазме этих нейронов пятисуточных крысят отмечается умеренное количество митохондрий, которые имеют округлую, овальную, продолговатую, изредка неправильную или разветвленную форму и располагаются диффузно (рисунок 5.21А). Иногда наблюдается их деление. Отдельные митохондрии почти вплотную прилегают к ядерной оболочке, цистернам и канальцам эндоплазматической сети или друг к другу, иногда контактируя между собой. Кристы митохондрий не всегда хорошо выражены и располагаются неупорядоченно: как вдоль, так и поперек по отношению к длинной оси органелл. Иногда они изгибаются и не имеют определенной ориентации (рисунок 5.21А).

К 20-м суткам митохондрии приобретают более вытянутую форму, которая сохраняется и на более поздних сроках развития, а по своей локализации данные структуры существенно не отличаются от описанных ранее (рисунок 5.21Б). Разветвленные органеллы отмечаются чаще, чем на пятые сутки. Также встречаются делящиеся органеллы.

На 45-е сутки в цитоплазме гистаминергических нейронов митохондрии по-прежнему контактируют с другими органеллами и друг с другом (рисунок 5.21В). Зачастую отмечаются их местные скопления рядом с ядром или эндоплазматической сетью. Встречаются разветвленные органеллы. Делящиеся митохондрии наблюдаются чаще, чем в ранее описанные сроки постнатального развития.

С пятых по 45-е сутки постнатального развития количество митохондрий в гистаминергических нейронах возрастает в 1,7 раза: с пятых по 20-е, как и с 20 по 45-е сутки – в 1,3 раза ($p < 0,001$) (рисунок 4.24А). При этом их индивидуальная площадь не претерпевает существенных изменений (рисунок 4.24В), в то время как изменение относительной площади данных органелл полностью соответствует изменению их количества (рисунок 4.24Г). Длина крист митохондрий за исследованный промежуток постнатального онтогенеза возрастает в 1,5 раза: с пятых по 20-е сутки – в 1,2 раза ($p < 0,001$), с 20 по 45-е сутки – в 1,3 раза ($p < 0,001$) (рисунок 5.22Б) [Зиматкин С. М. и соавт., 2019, 2020].

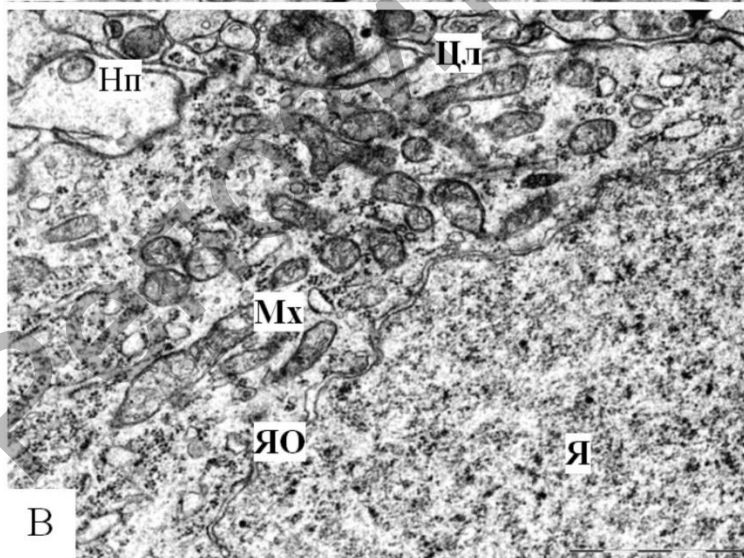
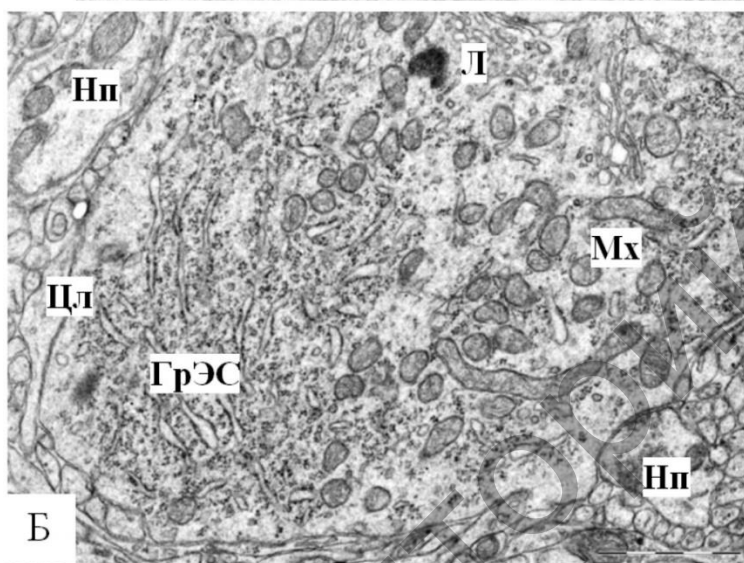
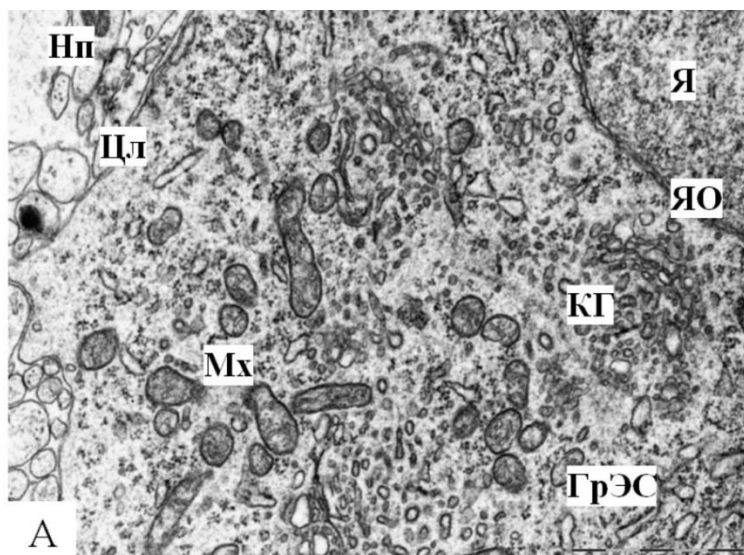


Рисунок 5.21 – Митохондрии в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса на пятые (А), 20 (Б), 45-е (В) сутки постнатального онтогенеза
Гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС), комплекс Гольджи (КГ), лизосома (Л), митохондрии (Мх), нейропил (Нп), цитолемма (Цл), ядерная оболочка (ЯО), ядро (Я).

Электроннограммы.
Масштабный отрезок равен 1 мкм. Ув. 30000

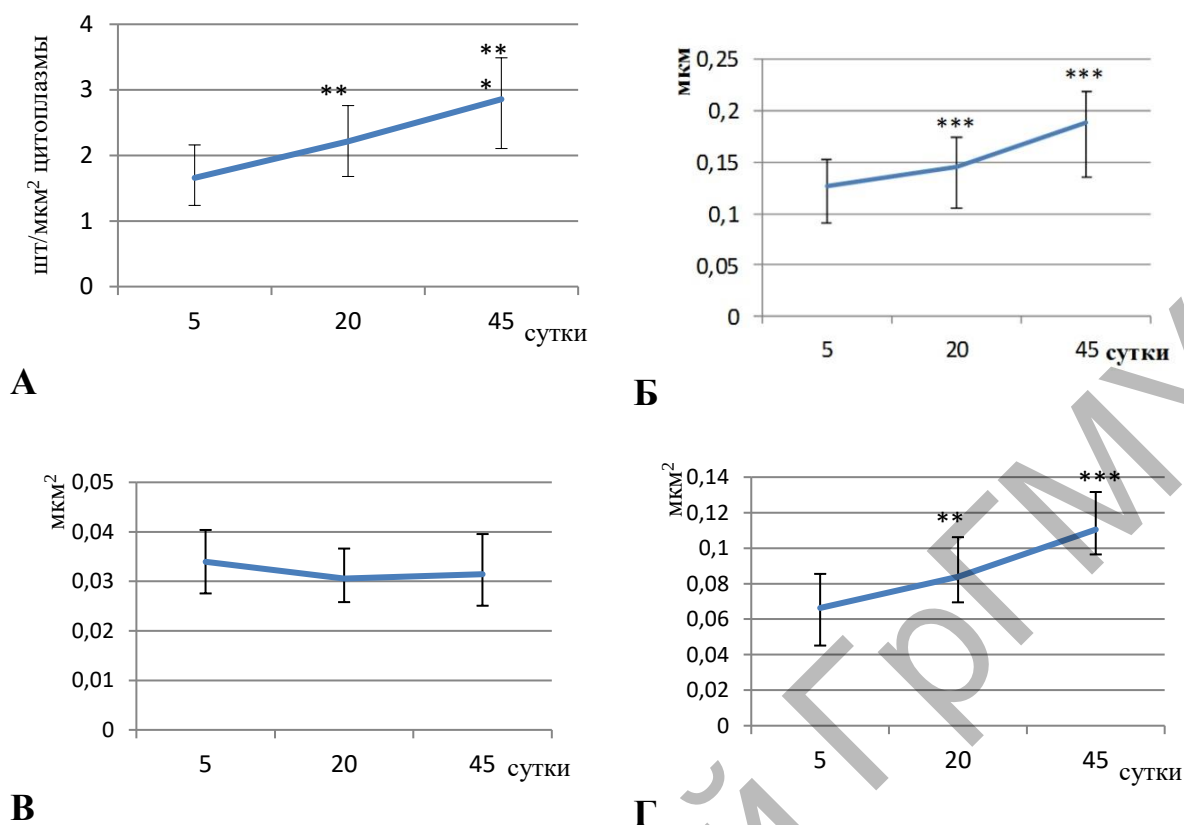


Рисунок 5.22 – Динамика изменений количества митохондрий (А), длины их крист (Б), индивидуальной площади (В) и относительной площади митохондрий (Г) в цитоплазме гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса в постнатальном онтогенезе (Me (LQ; UQ))

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

Активность СДГ – фермента, расположенного на внутренней мембране митохондрий и участвующего в аэробном окислении углеводов в цикле Кребса, – на пятые сутки после рождения максимальная (рисунок 5.23А), затем постепенно снижается до 45-х суток (рисунок 5.23): с пятых по 10-е сутки – в 1,2 раза ($p = 0,01$), с 10 по 20-е сутки – в 1,1 раза ($p = 0,03$), с 20 по 45-е сутки – в 1,2 раза ($p < 0,001$), с 45 по 90-е сутки возрастает в 1,4 раза ($p < 0,001$), не достигая значений у пятисуточных животных (рисунки 5.23, 5.24).

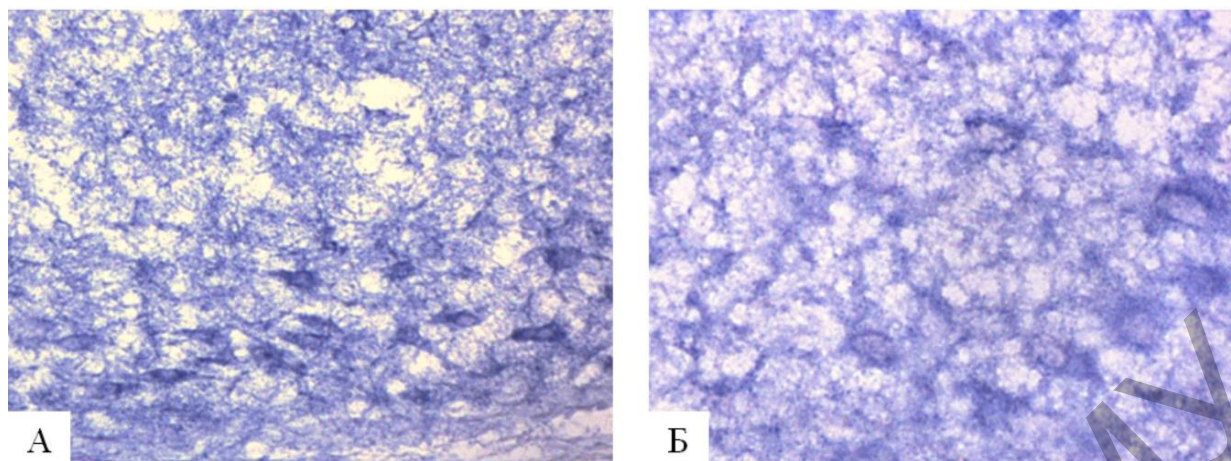


Рисунок 5.23 – Активность СДГ в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса пятисуточных (А) и 45-суточных (Б) крыс
Окраска по Нахласу и др.
Цифровая микрофотография. Ув. 400

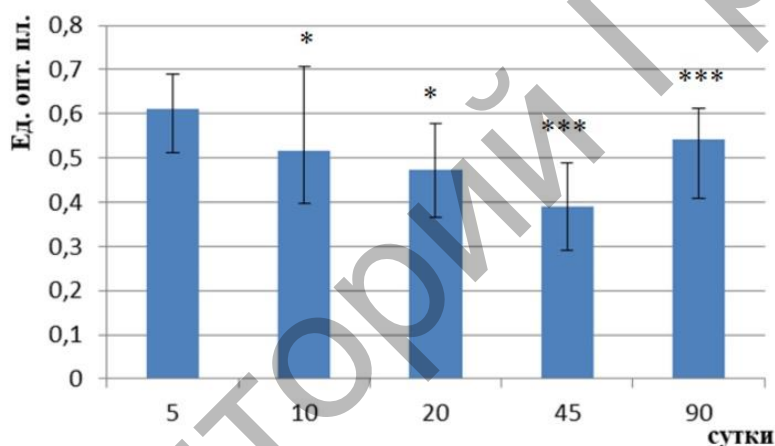


Рисунок 5.24 – Динамика изменений активности СДГ в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса крыс в постнатальном онтогенезе (Me (LQ; UQ))

Примечание – * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$; при сравнении показателей каждый последующий срок сопоставляли с предыдущим

Активность ЛДГ – фермента, участвующего в конечных этапах гликолиза, протекающего в анаэробных условиях, в гистаминергических нейронах в постнатальном онтогенезе с пятых по 90-е сутки – меняется волнообразно: с пятых по 10-е сутки не претерпевает значительных изменений, к 20-м суткам достигает максимума (рисунок 5.25), увеличиваясь по сравнению с 10-ми сутками в 1,6 раза ($p < 0,001$), к 45-м суткам снижается в 1,5 раза ($p < 0,001$) (рисунки 5.25, 5.26), а затем существенно не меняется (рисунки 5.25, 5.26).

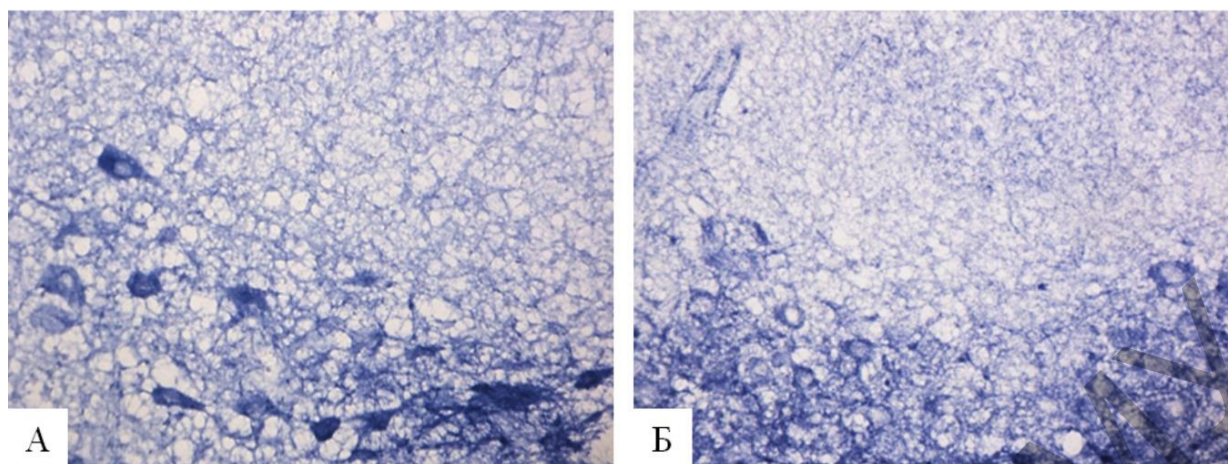


Рисунок 5.25 – Активность ЛДГ в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса 20-суточных (А) и 45-суточных (Б) крыс
Окраска по Гесс, Скарпелли, Пирсу.
Цифровая микрофотография. Ув. 200

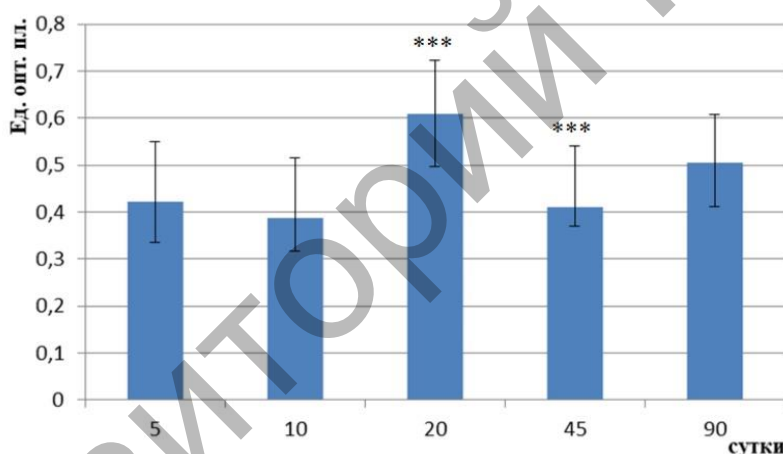
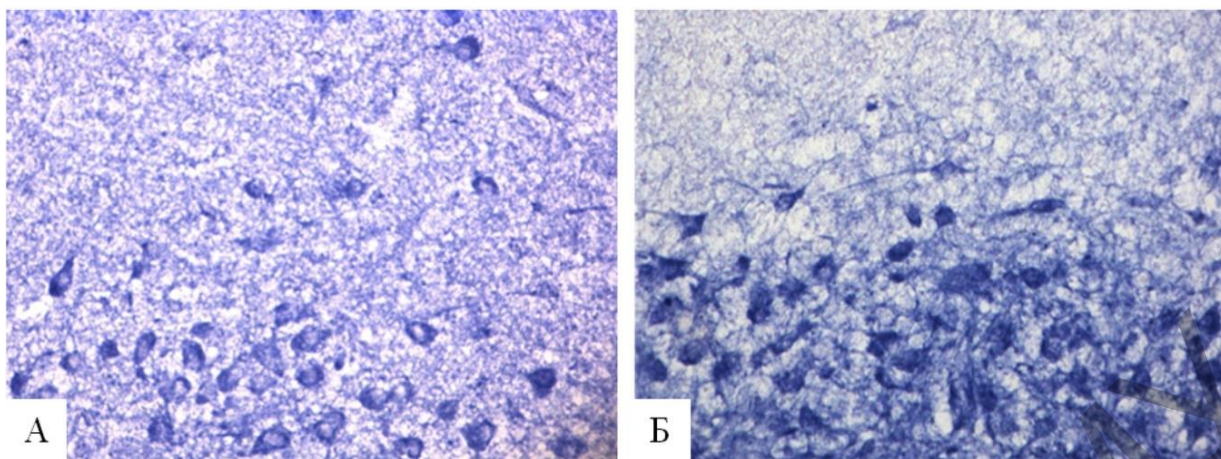


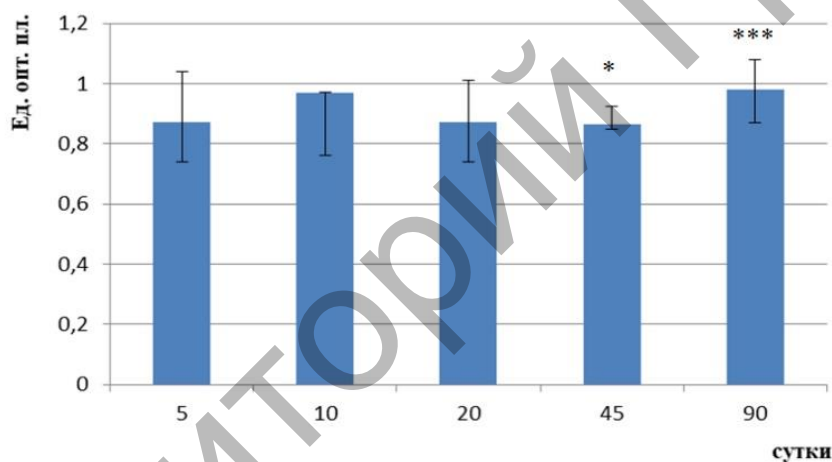
Рисунок 5.26 – Динамика изменений активности ЛДГ в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса крыс в постнатальном онтогенезе (Me (LQ; UQ))

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

Активность **НАДН-ДГ** – маркерного фермента митохондрий, участвующего в процессах клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования с пятых по 20-е сутки постнатального онтогенеза, – незначительно колеблется (рисунки 5.27, 5.28), с 20-х по 45-е сутки несколько снижается ($p=0,02$), а с 45-х по 90-е сутки увеличивается в 1,1 раза ($p < 0,001$) (рисунки 5.27, 5.28).



**Рисунок 5.27 – Активность НАДН-ДГ
в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса
45-суточных (А) и 90-суточных (Б) крыс**
Окраска по Нахласу, Уокеру, Зелигману.
Цифровая микрофотография. Ув. 200



**Рисунок 5.28 – Динамика изменений активности НАДН-ДГ
в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса крыс
в постнатальном онтогенезе (Me (LQ; UQ))**

Примечание – * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$; при сравнении показателей каждый последующий срок сопоставляли с предыдущим.

Изменения АТФ-синтазы в развивающихся гистаминергических нейронах гипоталамуса крыс

Результаты проведенного нами иммуногистохимического исследования показали, что с пятых по 90-е сутки постнатального развития крыс содержание АТФ-синтазы в гистаминергических

нейронах значительно возрастает (рисунок 5.29). На фотографиях видно, что иммунореактивность фермента выявляется в виде мелкой зернистости преимущественно в цитоплазме перикарионов, не выявляется в ядрах нейронов и ее мало в нейропиле, между телами нейроцитов (рисунок 5.29). Содержание АТФ-синтазы в постнатальном онтогенезе возрастает (рисунок 5.30).

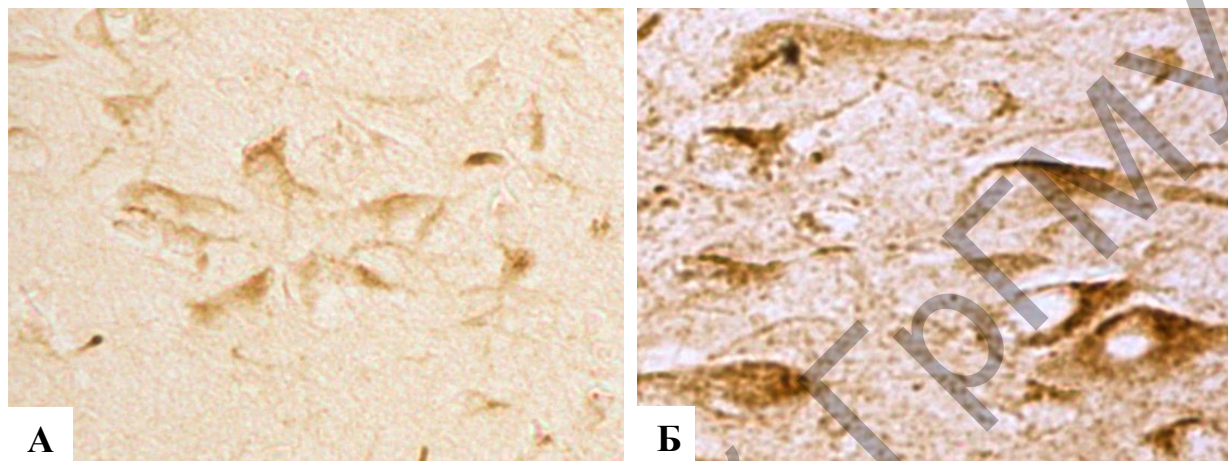


Рисунок 5.29 – АТФ-синтаза в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса крыс на 5-е (А) и 90-е (Б) сутки после рождения
Иммуноцитохимическая реакция.
Цифровая микрофотография. Ув. 800

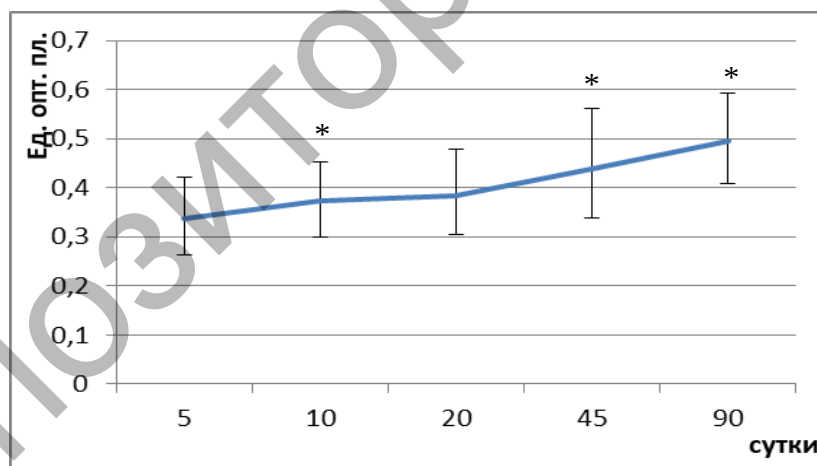


Рисунок 5.30 – Содержание АТФ-синтазы в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса крыс в динамике постнатального онтогенеза (Me+IQR)

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

Активно дифференцирующиеся гистаминергические нейроны нуждаются в значительном количестве энергии, запасаемой в макроэргических связях АТФ, синтез которой является одной из основных

функций митохондрий. Митохондриальная мембранная АТФ-синтаза продуцирует АТФ из АДФ с помощью трансмембранного градиента протонов, который генерируется электрон-транспортными комплексами дыхательной цепи. Энергия трансмембранного градиента используется для синтеза АТФ и для активного транспорта необходимых субстратов через внутреннюю митохондриальную мембрану. Сочетание этих реакций обеспечивает эффективный обмен АТФ–АДФ между митохондрией и цитозолем, что позволяет поддерживать в клетке высокий уровень энергообеспечения. Во время дифференцировки клеток АТФ-синтаза также способствует образованию крист митохондрий. Ранее проведенное нами электронно-микроскопическое исследование показало, что количество митохондрий в цитоплазме гистаминергических нейронов по мере их развития динамично нарастает, происходит развитие их крист [Зиматкин и соавт., 2019]. Поэтому продемонстрированное нами возрастание иммунореактивности АТФ-синтазы с пятых по 90-е сутки постнатального развития гистаминергических нейронов гипоталамуса крыс вполне соответствует нашим электронно-микроскопическим данным [Зиматкин С. М. и соавт., 2020].

В цитоплазме гистаминергических нейронов, окрашенных на выявление АТФ-синтазы, наблюдается преимущественно равномерное распределение иммунопозитивных гранул и глыбок. У части исследуемых нейронов скопление этих агрегатов визуализируется в перинуклеарной области. Поскольку АТФ-синтаза локализуется на внутренней мембране митохондрий, расположение гранул и глыбок в цитоплазме гистаминергических нейронов, по-видимому, соответствует распределению в них этих органелл. Такое расположение митохондрий действительно характерно для гистаминергических нейронов гипоталамуса крыс [Зиматкин С. М. и соавт., 2019]. В ходе дифференцировки гистаминергических нейронов наблюдается контакт митохондрий с ядерной оболочкой [Зиматкин С. М. и соавт., 2019], что соответствует описанному нами в данном исследовании скоплению иммунопозитивных агрегатов в перинуклеарной области нейроцитов, которое указывает на высокий уровень обменных процессов со значительными энергетическими затратами именно в этой зоне.

Мы наблюдали рост иммунореактивности АТФ-синтазы в цитоплазме клеток Пуркинье мозжечка крыс в постнатальном онтогенезе. На 2-е сутки после рождения в цитоплазме клеток Пуркинье

выявляется очень низкое содержание АТФ-синтазы. Оно значительно возрастает на 7-е сутки после рождения, оставаясь на высоком уровне в дальнейшие сроки [Карнюшко О. А. и соавт., 2020].

Нейроглобин в развивающихся гистаминергических нейронах гипоталамуса

Иммунореактивность нейроглобина с пятых по 90-е сутки постнатального развития крысы возрастает в 1,6 раза (рисунки 5.31, 5.32).

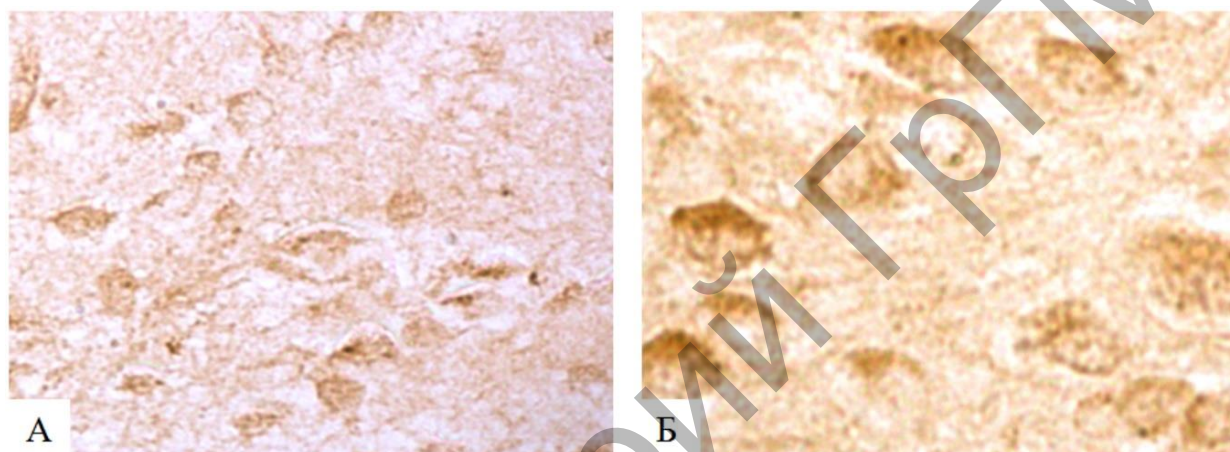


Рисунок 5.31 – Иммунореактивность NgB в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса пятисуточных (А) и 90-суточных (Б) крыс

Иммуноцитохимическая реакция на нейроглобин.

Цифровая микрофотография. Ув. 800

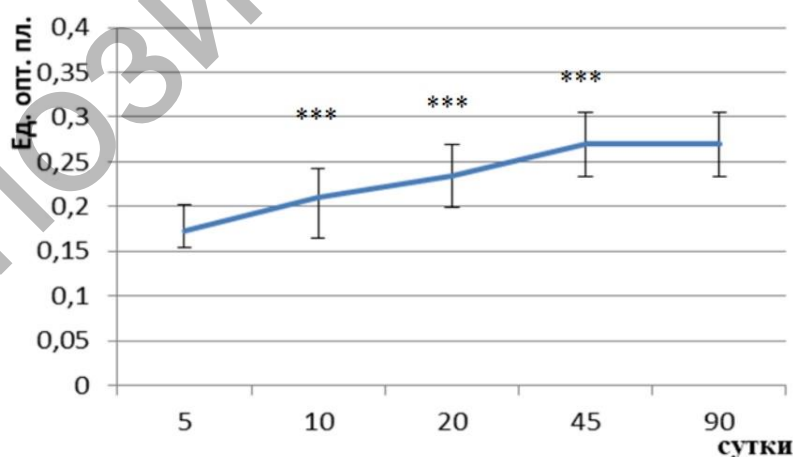


Рисунок 5.32 – Иммунореактивность NgB в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса крыс в динамике постнатального онтогенеза (Me (LQ; UQ))

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

При этом с пятых по 10-е сутки она увеличивается в 1,2 раза ($p < 0,001$), с 10-х по 20-е сутки – в 1,1 раза ($p < 0,001$), с 20-х по 45-е сутки – в 1,2 раза ($p < 0,001$), а с 45-х по 90-е сутки не претерпевает значительных изменений (рисунки 5.31, 5.32).

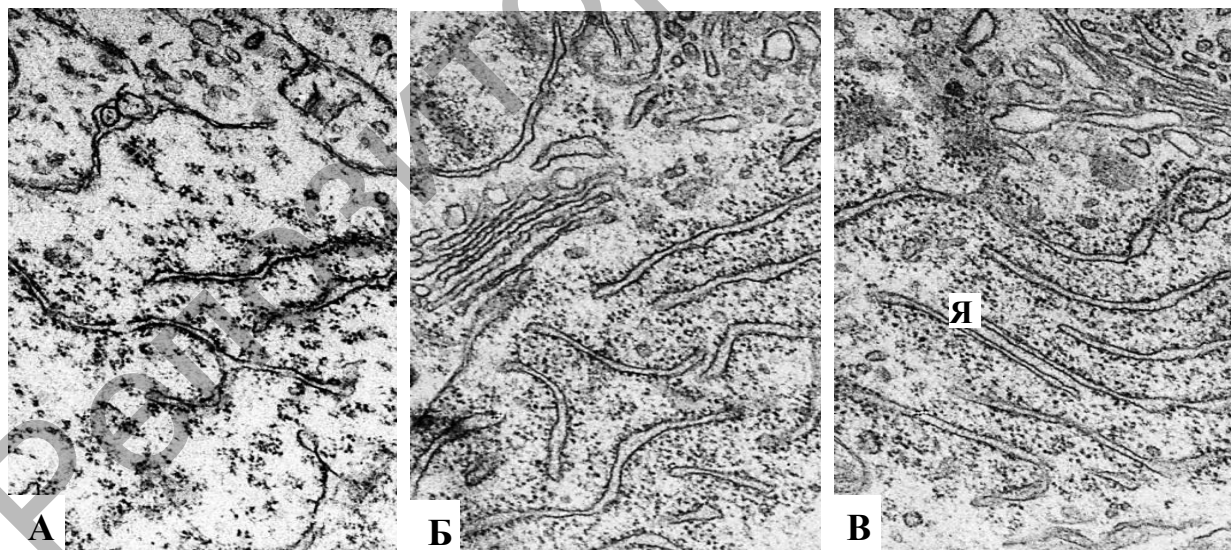
Таким образом, содержание нейроглобина в развивающихся гистаминергических нейронах мозга постепенно возрастает, вплоть до 45-го дня после рождения. Это указывает на повышение кислороддепонирующих возможностей зрелых нейронов и их устойчивости к повреждающему действию свободных радикалов) [Зиматкин С. М. и соавт., 2020].

Глава 6

РАЗВИТИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА НЕЙРОНОВ

Пирамидные нейроны неокортекса

На 5-е сутки после рождения в цитоплазме нейронов преобладают свободные рибосомы (87,5 % от их числа). Затем их количество постепенно снижается (в 2 раза) и происходит прогрессивное возрастание числа рибосом, связанных с эндоплазматической сетью (в 5 раз). На 45-е сутки постнатального развития связанные рибосомы уже преобладают (56 % от их общего количества). При этом протяженность цистерн гранулярной эндоплазматической сети (ГрЭС) на единицу площади цитоплазмы прогрессивно возрастает: с 5-х по 45-е сутки в 5 раз (рисунок 6.1; таблица 6.1). Это отражает переключение биосинтеза белка с собственных нужд перикариона на экспорт – в терминали.



**Рисунок 6.1 – Гранулярная эндоплазматическая сеть нейронов
внутреннего пирамидного слоя изокортекса крыс:**

А – 5-е сутки, Б – 20-е сутки, В – 45-е сутки

Электроннограммы. Ув. 50000

Таблица 6.1 – Показатели ультрамикроскопической морфометрии органелл нейронов пятого слоя изокортекса крыс (Me (LQ; UQ))

Показатель		5-е сутки	20-е сутки	45-е сутки
Рибо- сомы	связанные на 1 мкм ²	1,6 (1,4; 1,8)*	6,8 (6; 7)*	9 (8; 9,2)*+
	свободные на 1 мкм ²	13,8 (13,2; 14)	8,5 (8; 10)*	7 (6; 7,4)*+
	общее количество на 1 мкм ²	15,6 (14,6; 15,8)	15,3 (14; 17)	16 (14;16,6)
ГрЭС	протяженность цистерн, мкм	0,39 (0,38; 0,4)	1,1 (1; 1,1)*	2,2 (2; 2,2)*+
	ширина цистерн, мкм	0,035 (0,03; 0,04)	0,1 (0,08; 0,1)*	0,071 (0,07; 0,074)*+
Комп- лекс Гольджи	ширина цистерн	0,15 (0,13; 0,16)	0,1 (0,08; 0,11)*	0,07 (0,06; 0,08)*

Примечания – * – $p < 0,05$ по сравнению с пятыми сутками, + – $p < 0,05$ по сравнению с 20-ми сутками.

Интересно, что общее количество рибосом в цитоплазме нейронов в постнатальном онтогенезе практически не меняется, что соответствует и неизменному содержанию в ней РНП.

На 5-е сутки после рождения цистерны комплекса Гольджи еще не сформированы и представлены вакуолями. Затем вакуоли преобразуются в плоские цистерны, ширина которых постепенно уменьшается. Уже к 20 суткам характерно изгибаются, образуя цис- и трансповерхности (рисунок 6.2).

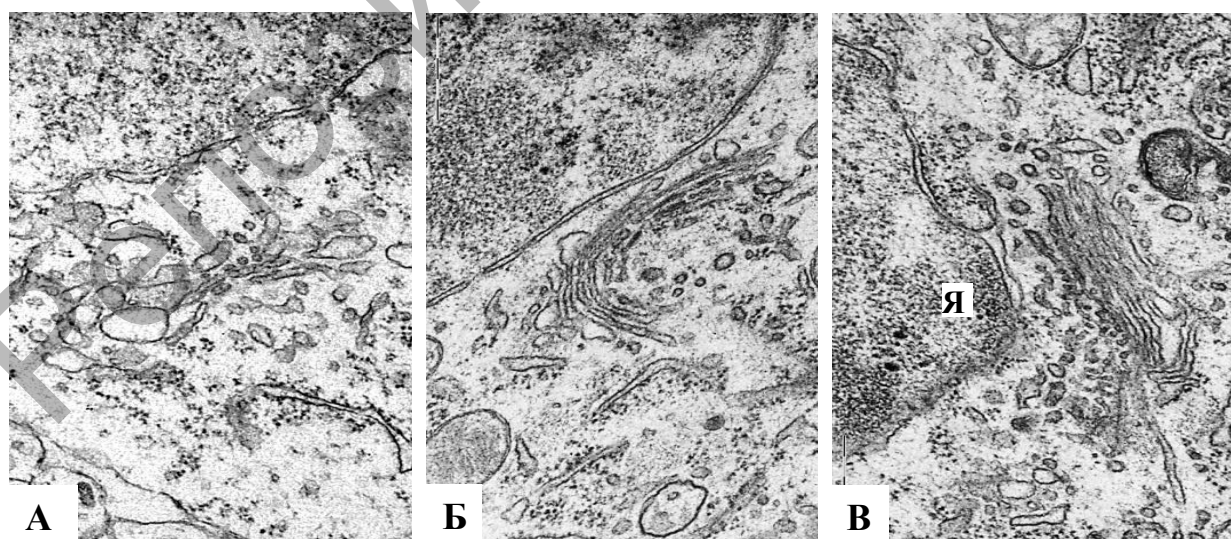
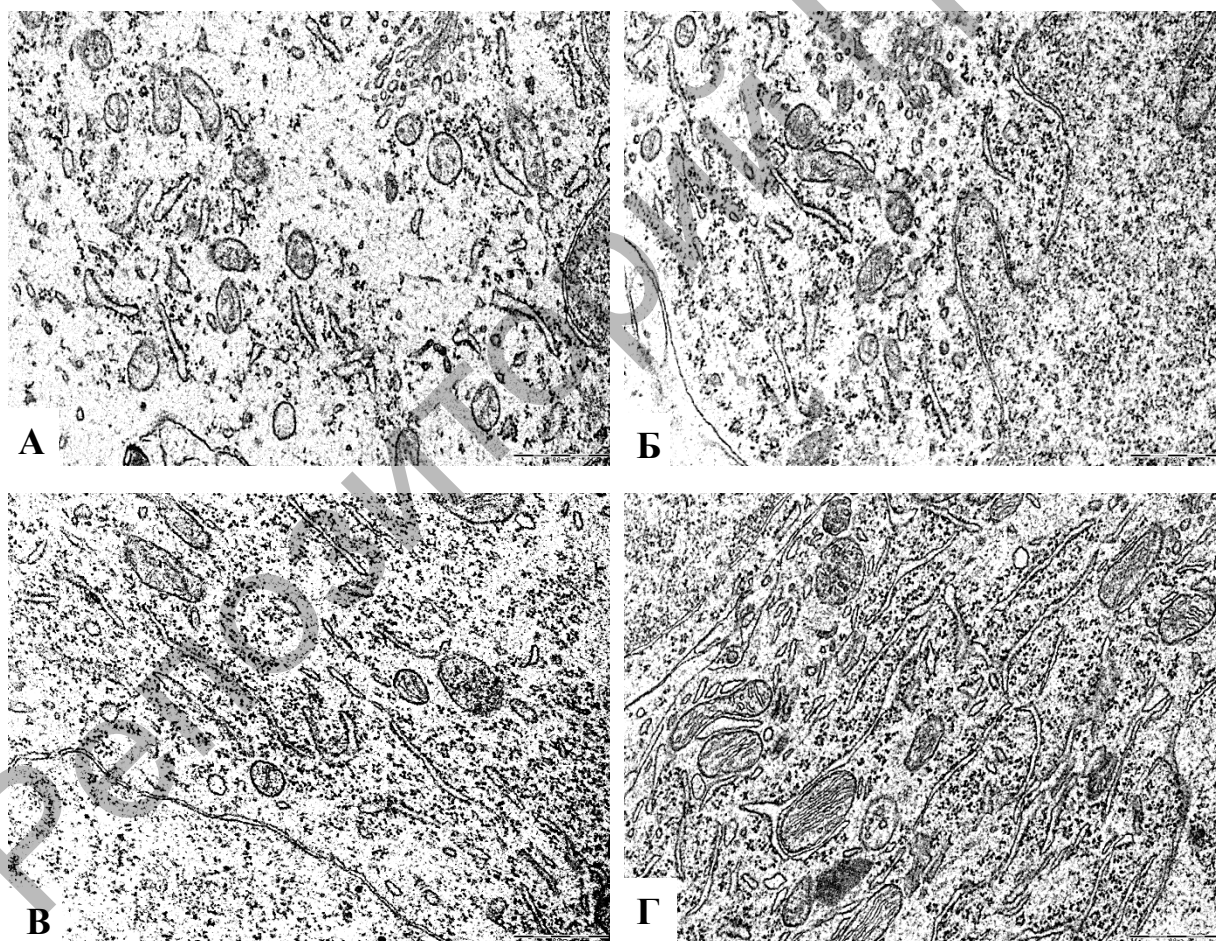


Рисунок 6.2 – Комплекс Гольджи нейронов внутреннего пирамидного слоя изокортекса крыс: А – 5-е сутки, Б – 20-е сутки, В – 45-е сутки Электронограммы. Ув. 50000

Таким образом, постнатальная дифференцировка пирамидных нейронов изокортекса крысы сопровождается значительными и закономерными ультраструктурными изменениями синтетического аппарата в их цитоплазме [Бонь Е. И., Зиматкин С. М., 2017, 2019; Zimatkin S. M., Bon E. I., 2018].

Клетки Пуркинье мозжечка

Со вторых по 45-е сутки в клетках Пуркинье мозжечка количество свободных рибосом существенно не меняется, но прогрессивно увеличивается (в 4 раза) средняя длина цистерн ГрЭС и, соответственно число связанных с мембранами рибосом, хотя их число на 1 мкм длины цистерн ГрЭС не меняется (рисунки 6.3–6.4).



**Рисунок 6.3 – ГрЭС клеток Пуркинье палеocerebellума крыс
в постнатальном онтогенезе:**

2-е (А), 7-е (Б), 15-е (В), 45-е (Г) после рождения

Масштабный отрезок равен 0,5 мкм. Электронограмма. Ув. 40000

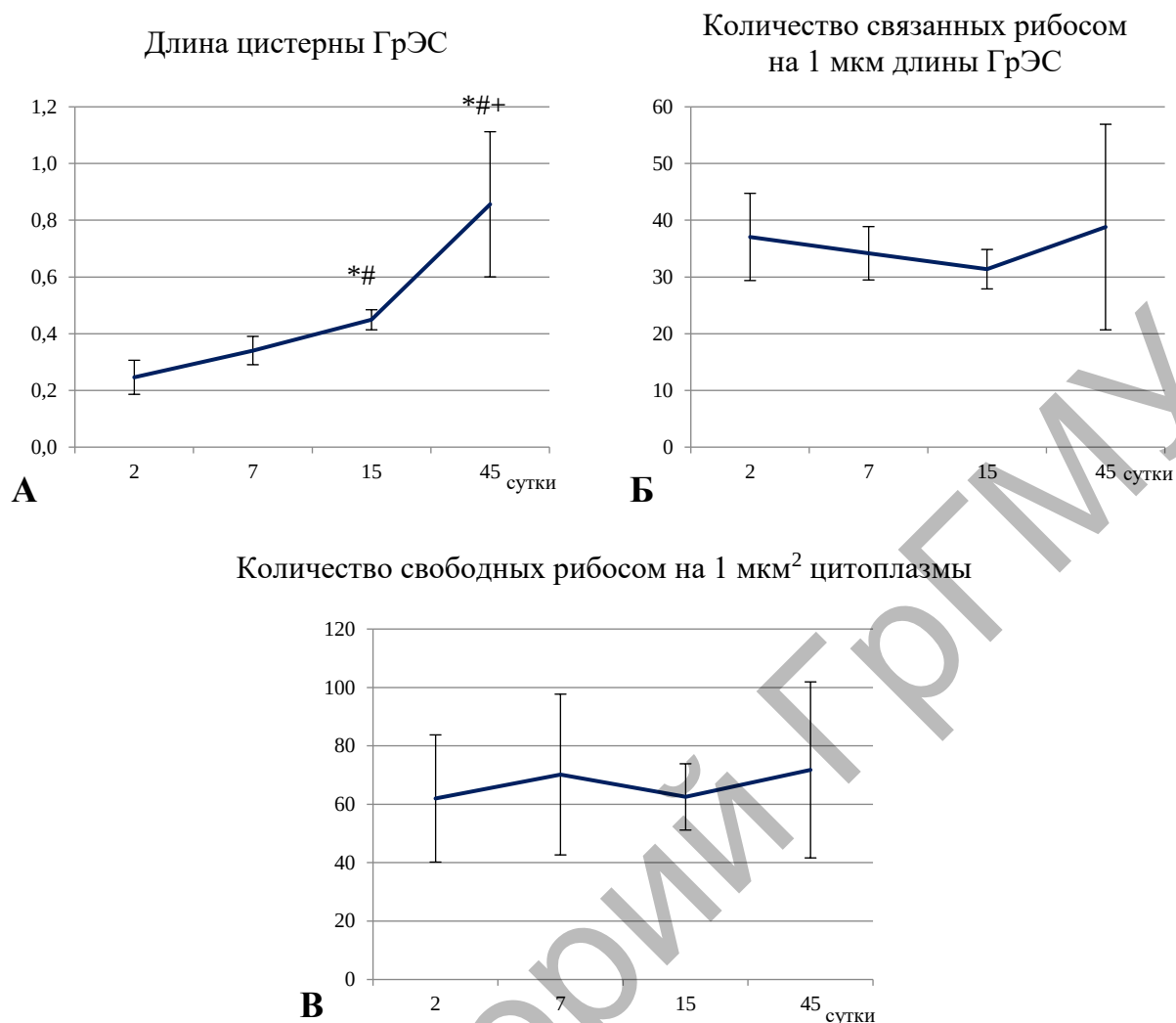


Рисунок 6.4 – Морфометрические показатели ГрЭС и рибосом клеток Пуркинье палеocerebellума крыс в постнатальном онтогенезе (Me+IQR)

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению со 2-ми сутками, # – $p < 0,05$ по сравнению с 7-ми сутками, + – $p < 0,05$ по сравнению с 15-ми сутками.

На 2-е и 7-е сутки в клетках Пуркинье мозжечка крыс комплекс Гольджи представлен скоплениями вакуолей и короткими узкими цистернами (рисунок 6.5), на 15-е и 45-е сутки – параллельно расположенными более протяженными цистернами, количество которых увеличивается (рисунок 6.5). Ширина цистерн комплекса Гольджи со вторых по 45-е сутки постепенно возрастает (рисунок 6.6).

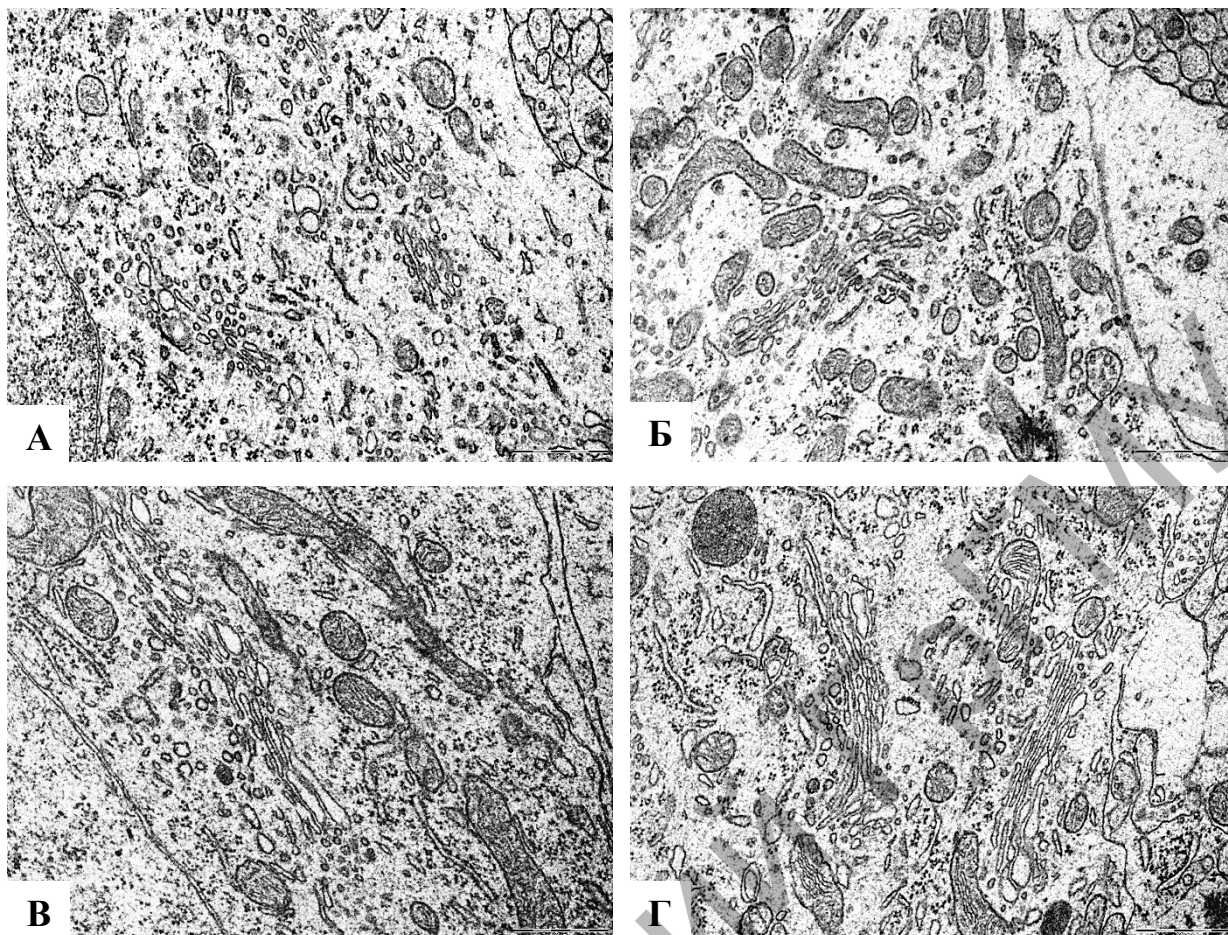


Рисунок 6.5 – Комплекс Гольджи клеток Пуркинье палеocerebellума крыс в постнатальном онтогенезе: 2-е (А), 7-е (Б), 15-е (В), 45-е (Г) сутки после рождения
Масштабный отрезок равен 0,5 мкм. Электронограмма. Ув. 40000

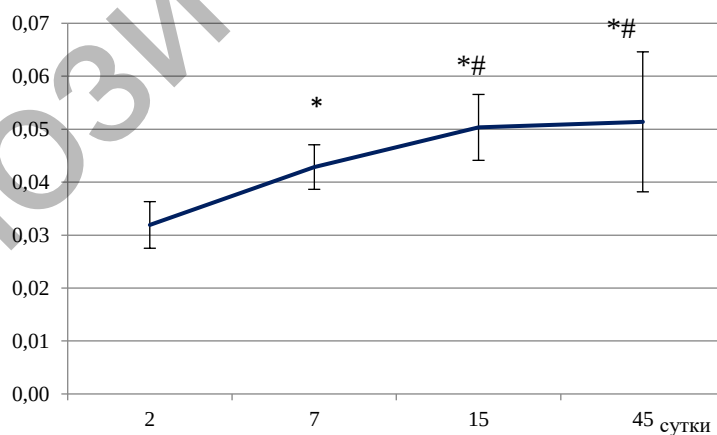


Рисунок 6.6 – Ширина цистерн комплекса Гольджи клеток Пуркинье палеocerebellума крыс в постнатальном онтогенезе (Me+IQR)

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению со 2-ми сутками, # – $p < 0,05$ по сравнению с 7-ми сутками.

Таким образом, на начальном этапе развития клеток Пуркинье преобладание свободных рибосом обусловлено биосинтезом белков «для собственных нужд» перикариона, определяющих морфогенетические процессы, лежащие в основе дифференцировки КП. Основным показателем созревания нейронов – увеличение количества мембраносвязанных рибосом и формирование ГрЭС, что связано с биосинтезом белков «на экспорт», в терминали. Это ферменты синтеза нейромедиаторов, белки ионных каналов пресинаптической части синапсов.

Постнатальное развитие зернистых нейронов сопровождается убылью наружного зернистого слоя и увеличением толщины внутреннего зернистого слоя в результате миграции предшественников зернистых нейронов из наружного зернистого слоя во внутренний, при этом изменяется форма клеток, увеличивается количество цитоплазматических органелл и формируются сложные синапсы дендритов зернистых нейронов с моховидными волокнами – клубочки мозжечка.

Гистаминергические нейроны гипоталамуса

Гранулярная эндоплазматическая сеть в гистаминергических нейронах пятисуточных крысят состоит из многочисленных канальцев и цистерн, разных по длине и извилистых, чаще всего хаотично разбросанных по всей цитоплазме (рисунок 6.7А).

На 20-е сутки постнатального развития ГрЭС более четко выражена, в ней увеличивается количество цистерн и канальцев, приобретающих более правильную параллельную ориентацию (рисунок 6.7Б).

К 45-м суткам сохраняется неупорядоченное расположение цистерн и канальцев, число которых возрастает (рисунок 6.7В). При этом длина канальцев и цистерн гранулярной эндоплазматической сети за исследуемый промежуток времени существенно не изменяется (рисунок 6.8).

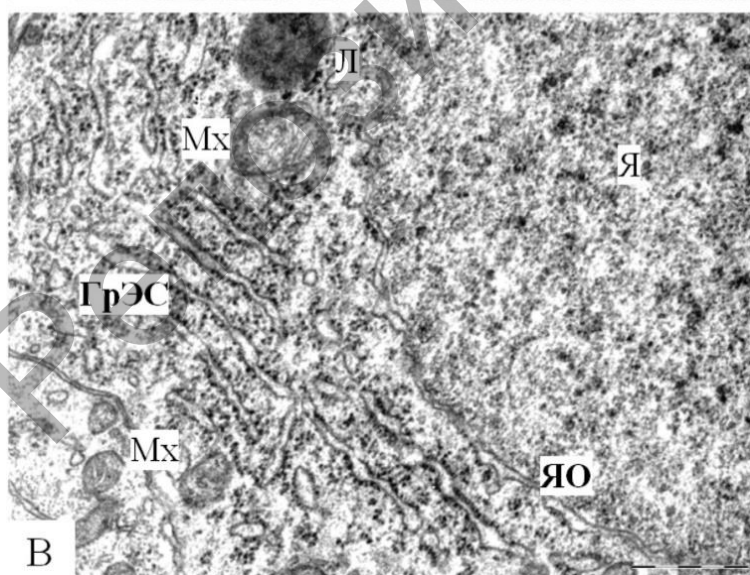
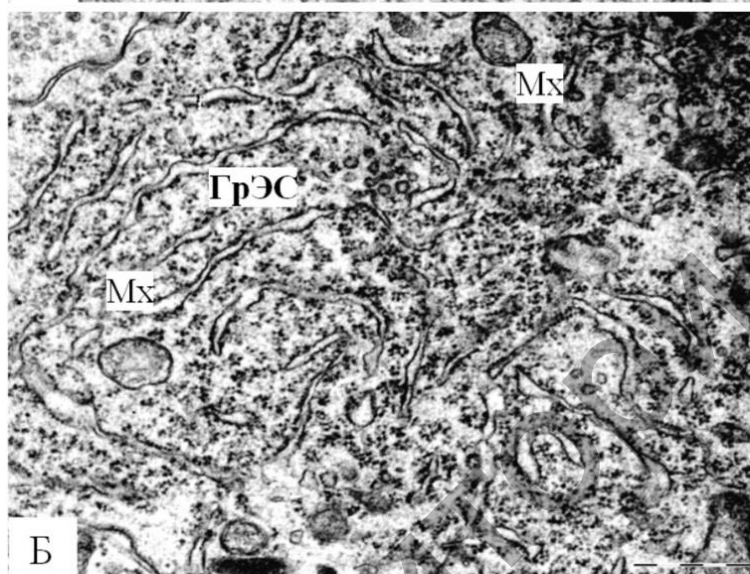
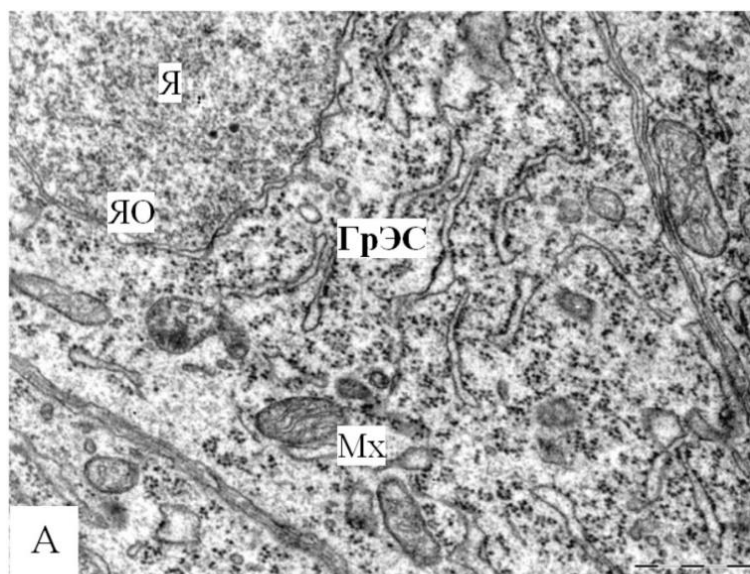


Рисунок 6.7 – Динамика развития ГрЭС в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса на пятые (А), 20 (Б), 45-е (В) сутки постнатального онтогенеза

Гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС), лизосома (Л), митохондрии (Мх), ядерная оболочка (ЯО), ядро (Я).

Электронোগраммы.

Масштабный отрезок равен 0,5 мкм. Ув. 40000

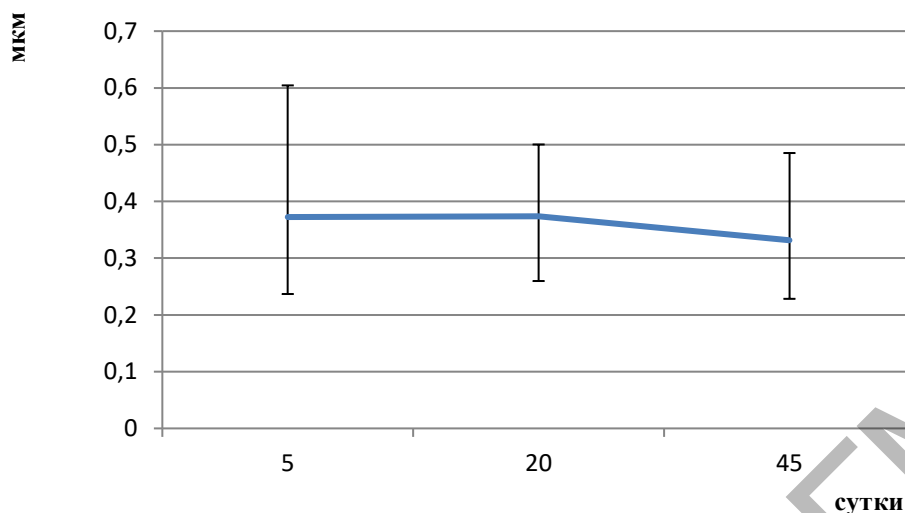


Рисунок 6.8 – Динамика изменений длины цистерн ГрЭС гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса в постнатальном онтогенезе (Me (LQ; UQ))

Наружная поверхность цистерн и канальцев гранулярной эндоплазматической сети несет **рибосомы**, которые располагаются неравномерно, в одиночку или группами, выстраиваясь в линию; другие участки мембран свободны от рибосом. С пятых по 45-е сутки после рождения количество связанных рибосом (на 1 мкм длины канальцев и цистерн ГрЭС) увеличивается в 2,1 раза (рисунок 6.9А).

Помимо связанных рибосом в цитоплазме гистаминергических нейронов в большом количестве встречаются свободные рибосомы, лежащие как поодиночке, так и объединяющиеся в полисомы (в среднем по шесть штук), которые формируют розетки и спирали. Их количество с пятых по 20-е сутки уменьшается (статистически не достоверно), а с 20 по 45-е сутки увеличивается в 1,1 раза ($p=0,045$) (рисунок 6.10).

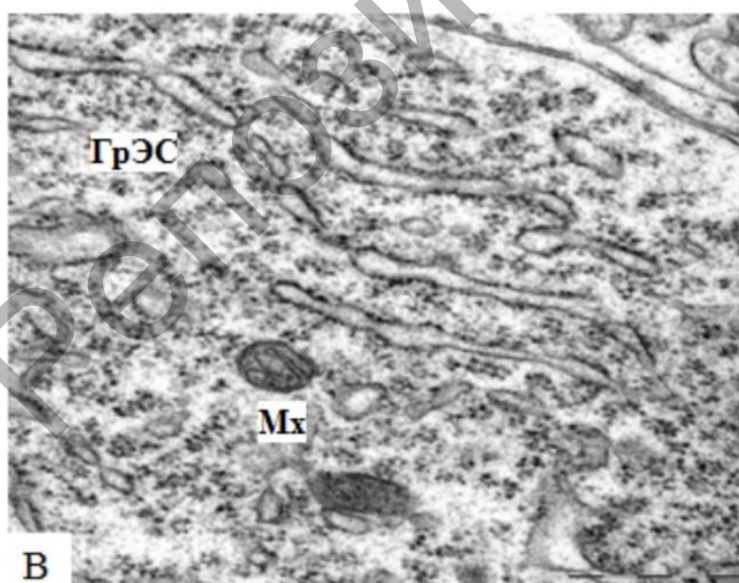
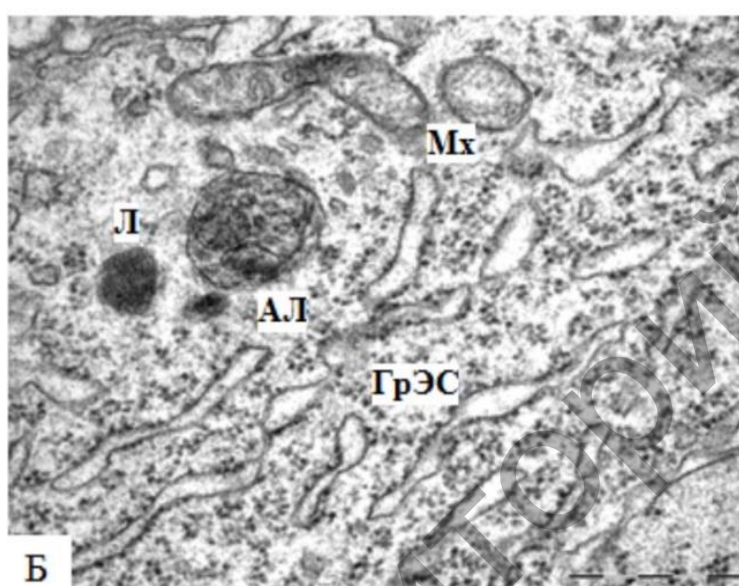
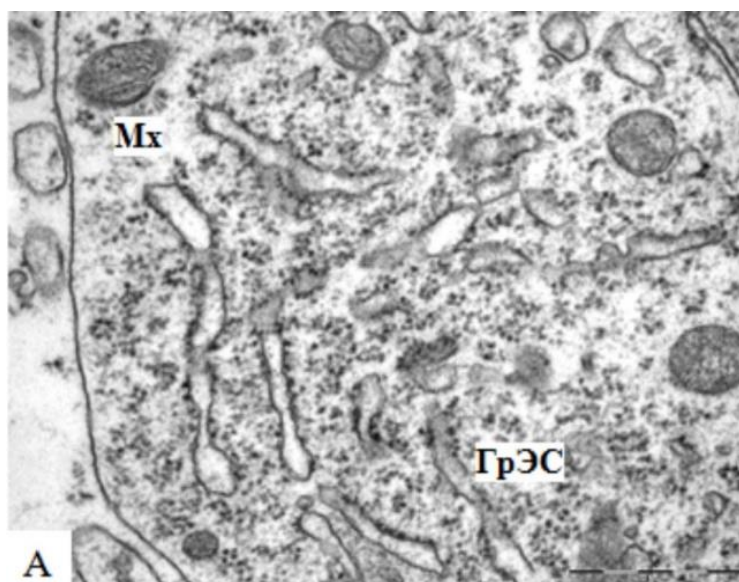


Рисунок 6.9 – Гранулярная эндоплазматическая сеть в цитоплазме гистаминергических нейронов гипоталамуса крыс на пятые (А), 20-е (Б) и 45-е (В) сутки постнатального развития
 Аутофаголизосома (АЛ), гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС), лизосома (Л), митохондрии (Мх).
 Электронограммы.
 Масштабный отрезок равен 0,5 мкм. Ув. 60000

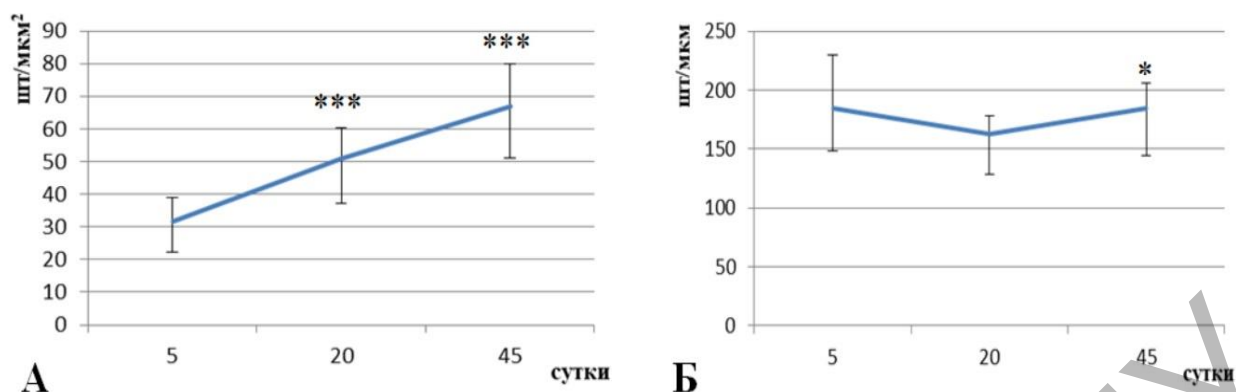


Рисунок 6.10 – Динамика изменений количества связанных (А) и свободных (Б) рибосом в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса в постнатальном онтогенезе (Me (LQ; UQ))

Примечание – * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$; при сравнении показателей каждый последующий срок сопоставляли с предыдущим

Ядрышкоподобные тельца (ЯПТ). С пятых по 45-е сутки постнатального развития крыс в цитоплазме гистаминергических нейронов гипоталамуса выявлено наличие образований круглой или овальной формы размером от 0,3 до 0,8 мкм², состоящих из гранулярного осмиофильного материала (напоминает гранулярный компонент ядрышка) с несколькими участками просветления (рисунок 6.11). Они свободно лежат в цитоплазме, но в единичных случаях (отмечены на пятые и 20-е сутки) ограничены одинарной мембраной, которая покрыта немногочисленными рибосомами (рисунок 6.11). Размеры таких структур с мембраной значительно меньше аналогичных образований, не ограниченных ею. В отдельных случаях хорошо заметна краевая фрагментация гранулярного субстрата данных образований. Часто их окружает светлый ободок цитоплазмы, обедненный органеллами, который по мере взросления животных становится заметнее (рисунок 6.11). ЯПТ присутствуют у 15 % исследованных клеток и встречаются в перикарионе в большинстве случаев единично, в разной степени удаленности от ядра. Однако нами отмечены и случаи попарного расположения данных образований (рисунок 6.11).

Комплекс Гольджи (КГ) на пятые сутки в основном представлен микропузырьками, немногочисленными вакуолями и единичными цистернами. Он располагается в непосредственной близости от ядра. По мере взросления животных происходит усложнение организации комплекса Гольджи, проявляющееся в увеличении

количества цистерн и их протяженности. Однако встречаются фрагменты КГ, состоящие только из двух компонентов – многочисленных мелких пузырьков и более крупных вакуолей. На 45-е сутки КГ располагается исключительно в перинуклеарной области и выявляется в виде нескольких территориально разобщенных зон, которые могут отличаться друг от друга как числом и структурой цистерн, так и количеством и величиной пузырьков (рисунки 6.12. 6.13).

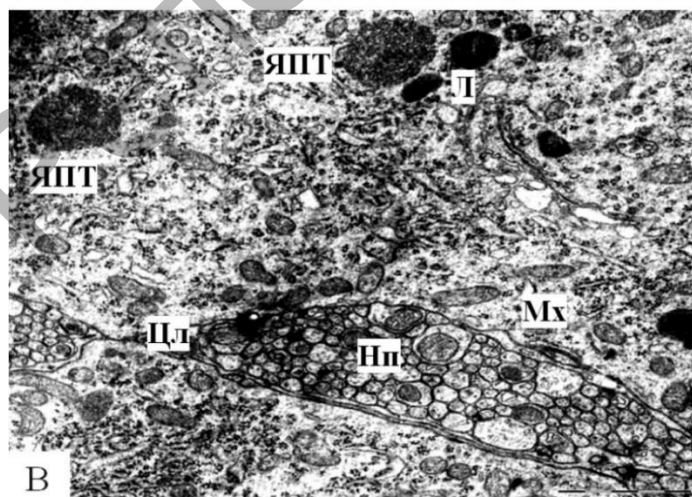
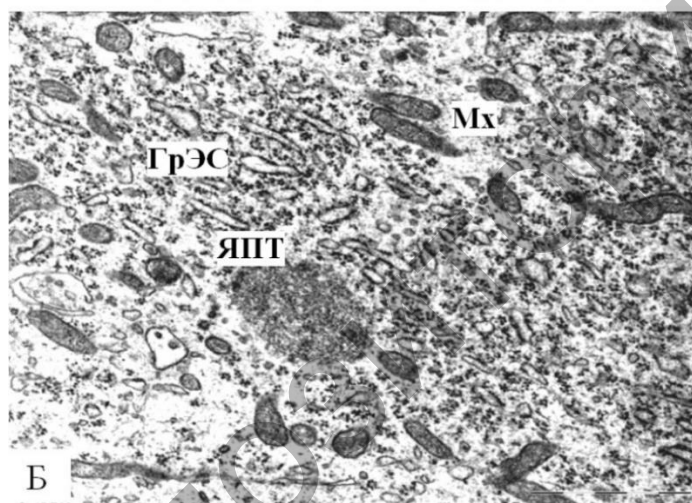
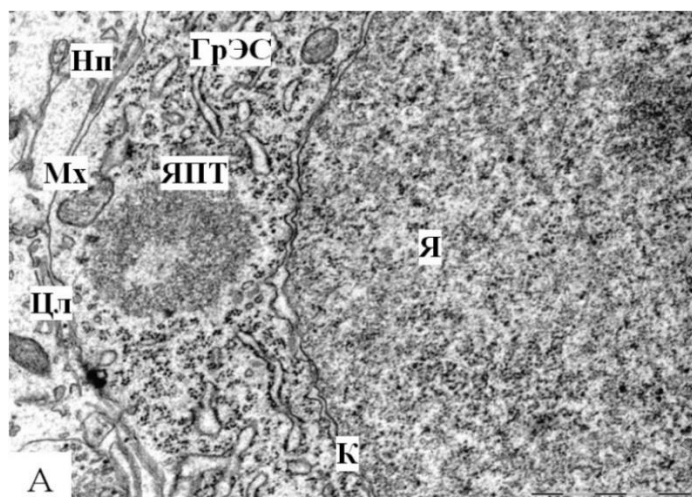


Рисунок 6.11 – Ядрышко-подобные тельца в гистаминергических нейронах гипоталамуса на пятые (А), 20-е (Б), 45-е (В) сутки постнатального онтогенеза
Гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС), кариолемма К), митохондрии (Мх), нейропилль (Нп), цитолемма (Цл), ядро (Я), ядрышко-подобное тельце (ЯПТ).
Электроннограммы.
Масштабный отрезок равен 1 мкм. Ув. 30000

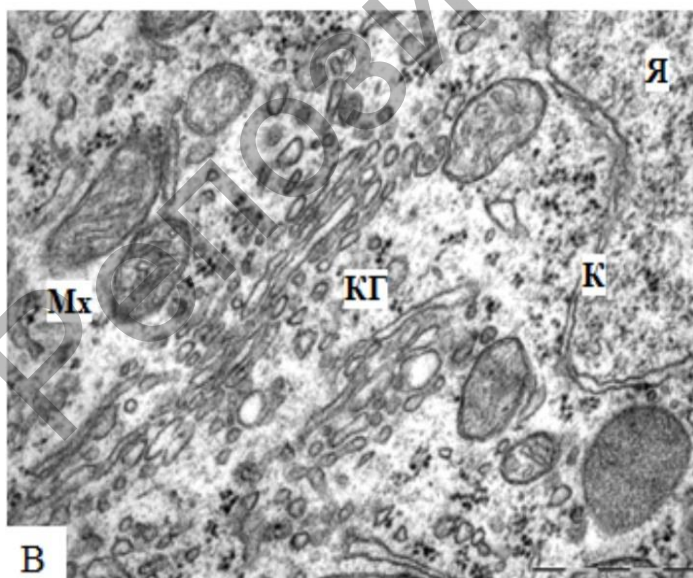
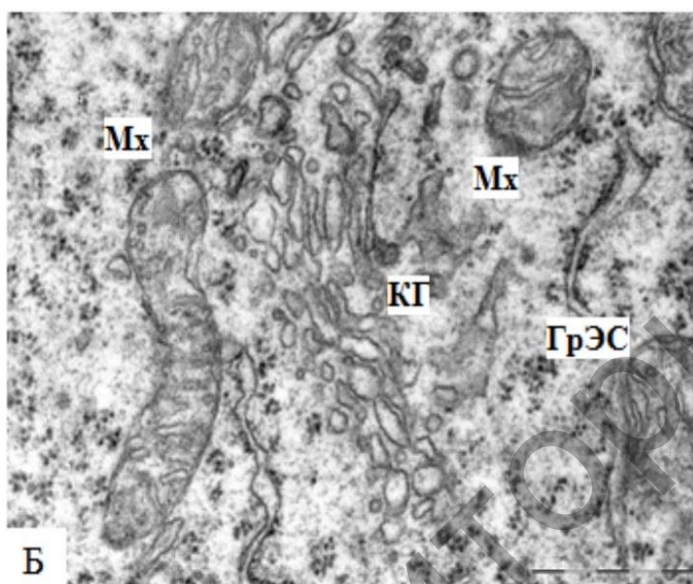
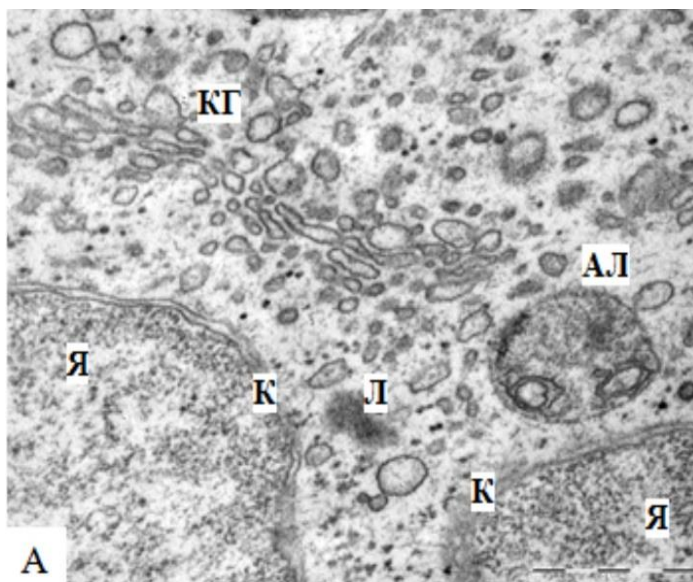


Рисунок 6.12– Комплекс Гольджи в цитоплазме гистаминергических нейронов гипоталамуса крыс на пятые (А), 20-е (Б) и 45-е (В) сутки постнатального развития
 Аутофаголизосома (АЛ), гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС), кариолемма (К), комплекс Гольджи (КГ), лизосома (Л), митохондрии (Мх), ядро (Я).
 Электронограммы.
 Масштабный отрезок равен 0,5 мкм. Ув. 60000

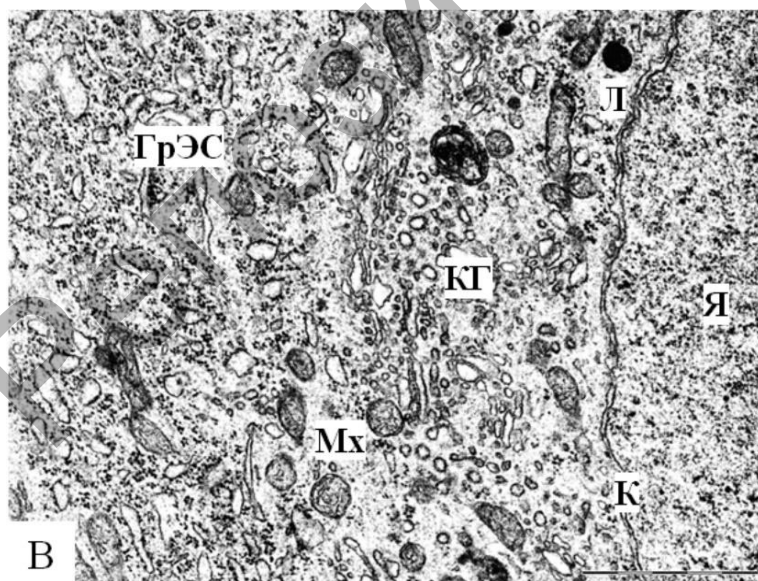
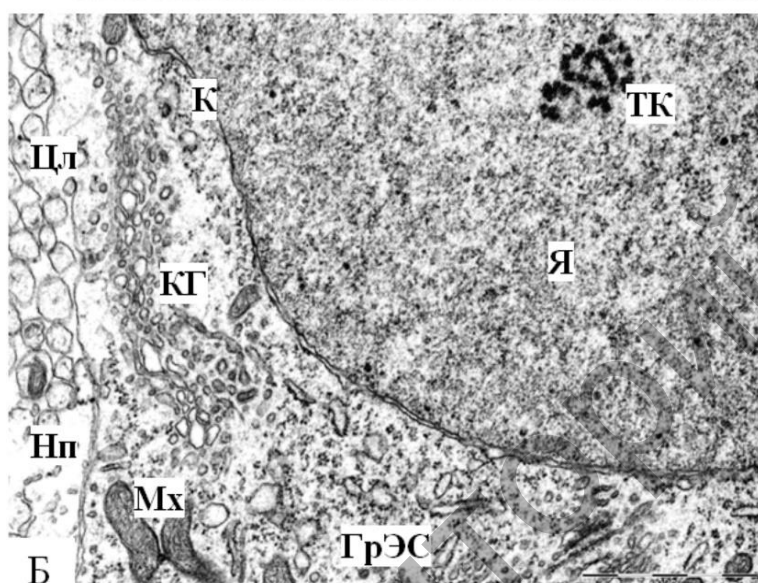
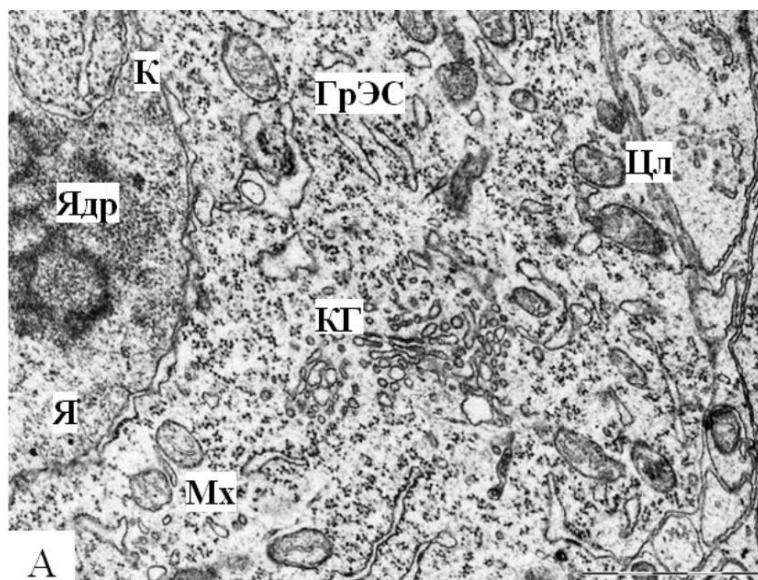


Рисунок 6.13 – Динамика развития КГ в гистаминергических нейронах гипоталамуса на 5-е (А), 20 (Б), 45-е (В) сутки постнатального онтогенеза

Гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС), кариолемма (К), комплекс Гольджи (КГ), лизосома (Л), митохондрии (Мх), нейропил (Нп), тельце Кахаля (ТК), цитолемма (Цл), ядро (Я), ядрышко (Ядр).

Электроннограммы.

Масштабный отрезок равен 1 мкм. Ув. 30000

Таким образом, в постнатальном онтогенезе в нейронах мозга происходит закономерное развитие гранулярной эндоплазматической сети и комплекса Гольджи. При этом к 20 дню происходит разрастание цистерн ГрЭС и количества связанных рибосом, тогда как число свободных рибосом в цитоплазме нейронов не меняется или снижается. Это указывает на перестройку биосинтеза белка: от обеспечения нужд самого перикариона до биосинтеза белка на экспорт – в растущие отростки и терминали. В процессе онтогенеза меняется строение КГ: от вакуолей на пятые сутки до специфически изогнутых цистерн к 20-му дню [Зиматкин С. М. и соавт., 2019, 2020].

Глава 7

РАЗВИТИЕ АППАРАТА ПЕРЕВАРИВАНИЯ И ЗАЩИТЫ

Пирамидные нейроны неокортекса

Относительное количество лизосом на единицу площади цитоплазмы нейронов внутреннего пирамидного слоя изокортекса и их размеры значительно увеличиваются к 20-м суткам постнатального развития (в 3–4 раза), а затем несколько снижаются; при этом электронно-микроскопически лизосомы становятся более вытянутыми (таблица 7.1).

Таблица 7.1 – Показатели ультрамикроскопической морфометрии лизосом нейронов 5-го слоя изокортекса крыс (Me (LQ; UQ))

Показатель		5-е сутки	20-е сутки	45-е сутки
Лизосомы	количество на 1 мкм ²	0,2 (0,2; 0,2)	0,8 (0,6; 0,8)*	0,5 (0,4; 0,6)*
	площадь, мкм ²	0,039 (0,037; 0,04)	0,1 (0,08; 0,12)*	0,1 (0,1; 0,11)*
	форм-фактор, ед.	0,88 (0,86; 0,9)	0,9 (0,87; 0,92)	0,87 (0,85; 0,9)
	фактор элонгации, ед.	1,41 (1,4; 1,43)	1,8 (1,7; 1,9)*	1,75 (1,7; 1,8)*

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с 5 сутками, + – $p < 0,05$ по сравнению с 20 сутками.

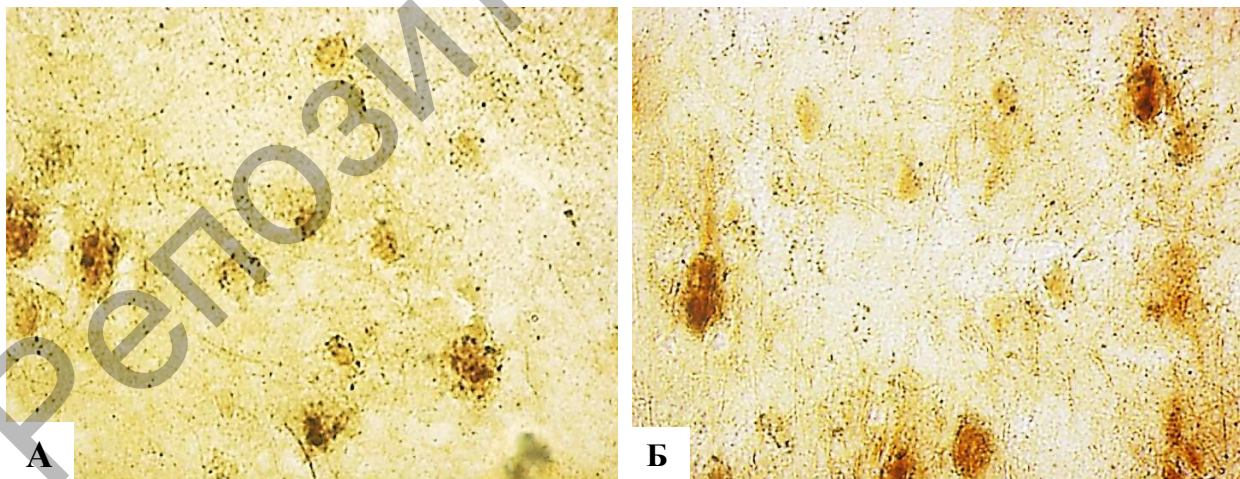
На 2–15-е сутки постнатального развития количество лизосом на единицу площади цитоплазмы и их удельная площадь в цитоплазме остаются крайне небольшими, а к 45-м суткам резко возрастают (рисунки 7.1–7.9). Так, небольшое увеличение площади лизосом в КП наблюдалось у 7-суточных крысят по сравнению с 2-суточными, к 15-м суткам их площадь становилась меньше, а затем возрастала к 45-м суткам почти в два раза по сравнению с 15-ми сутками (рисунок 7.1, таблица 7.1).



**Рисунок 7.1 – Фрагмент нейрона пятого слоя изокортекса
20-суточных крыс**

Ядро нейрона (Я), ядерная оболочка (ЯО), митохондрии (Мх), лизосомы (Л).
Электроннограмма. Масштабный отрезок равен 0,5 мкм. Ув. 50000

Соответственно, изменяется и активность в цитоплазме маркерного фермента лизосом КФ. На 5-е сутки после рождения ее активность крайне мала (ниже уровня чувствительности метода), а на 20-е сутки достигает максимума (рисунки 7.2, 7.3).



**Рисунок 7.2 – Активность КФ в нейронах пятого слоя
изокортекса крыс на 20-е (А) и 45-е (Б) сутки после рождения**
Окраска по Гомори.

Цифровая микрофотография. Ув. 400

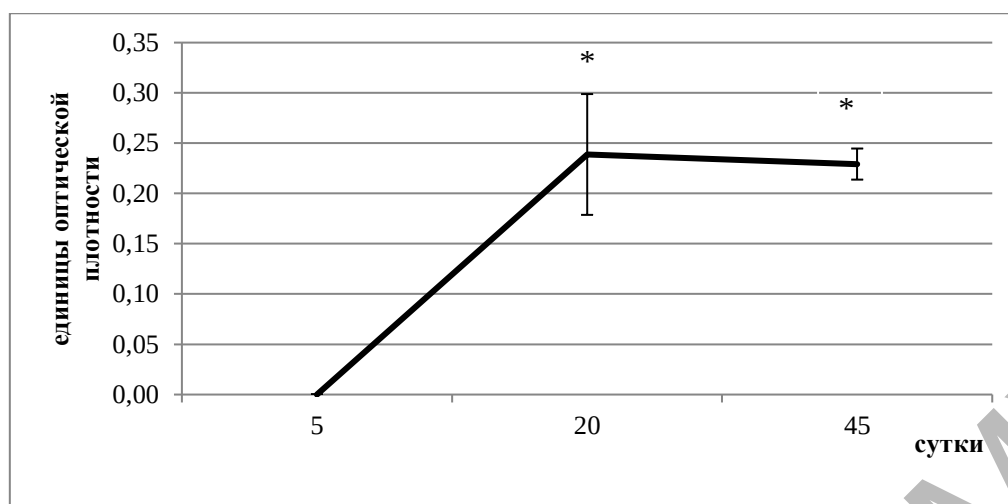


Рисунок 7.3 – Изменение активности КФ в нейронах пятого слоя изокортекса крыс в постнатальном онтогенезе

Примечание – $\text{Me} \pm \text{IQR}$; * – $p < 0,05$ по сравнению с 5-ми сутками.

Клетки Пуркинье мозжечка

К 45-м суткам в 3 раза (по сравнению с 2-суточными крысами) возрастает количество лизосом на 1 мкм^2 цитоплазмы КП, что свидетельствует о формировании внутриклеточного аппарата переваривания и защиты, необходимого для удаления (путем аутофагии) поврежденных мембран и органелл. Возрастает и размер лизосом (рисунки 7.4, 7.5).

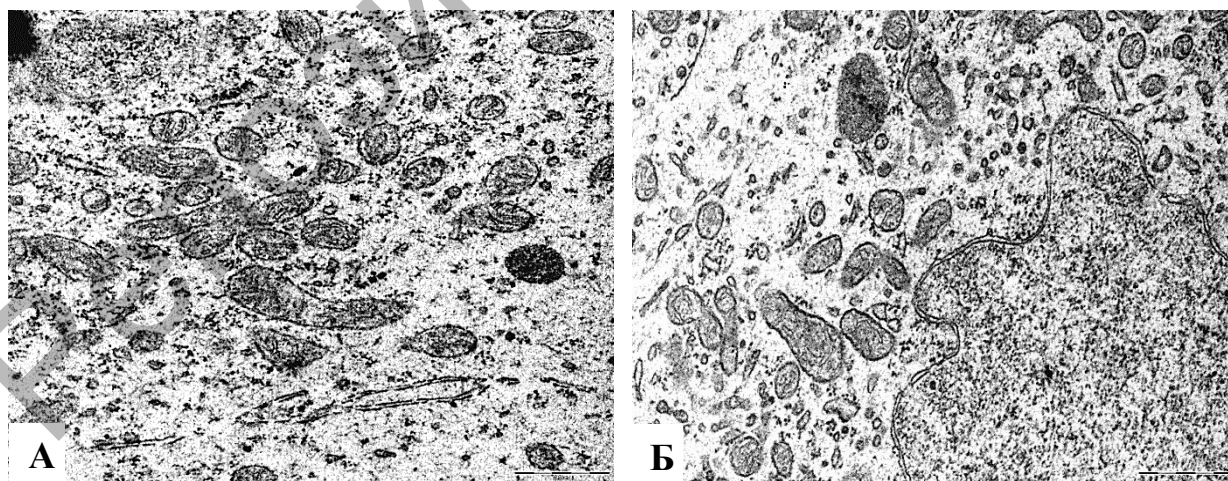


Рисунок 7.4 – Лизосомы клеток Пуркинье мозжечка крыс в постнатальном онтогенезе: 2-е (А), 7-е (Б), 15-е (В), 45-е (Г) сутки после рождения

Электроннограмма. Масштабный отрезок равен 0,5 мкм. Ув. 40000

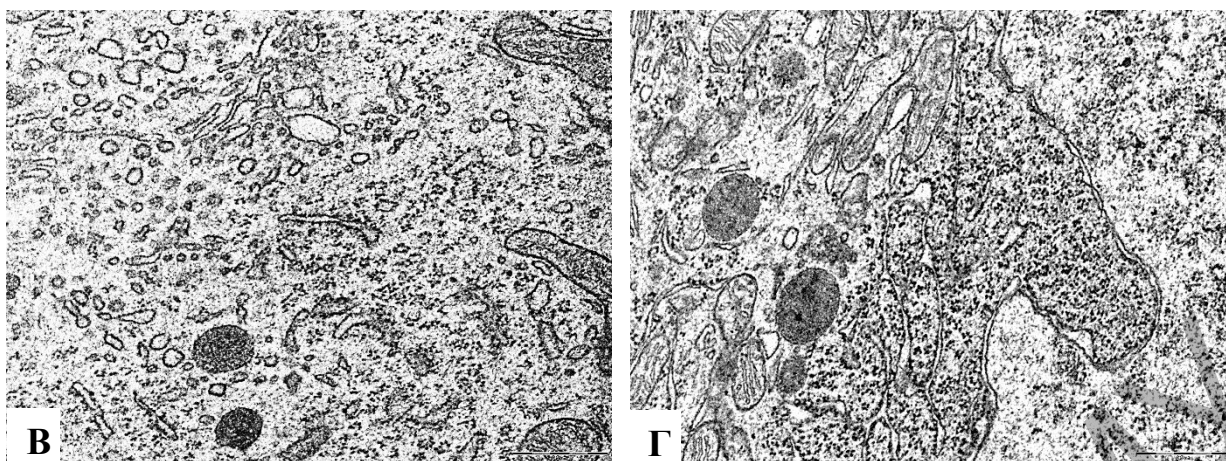


Рисунок 7.4 (продолжение) – Лизосомы клеток Пуркинье мозжечка крыс в постнатальном онтогенезе: 2-е (А), 7-е (Б), 15-е (В), 45-е (Г) сутки после рождения

Электроннограмма. Масштабный отрезок равен 0,5 мкм. Ув. 40000

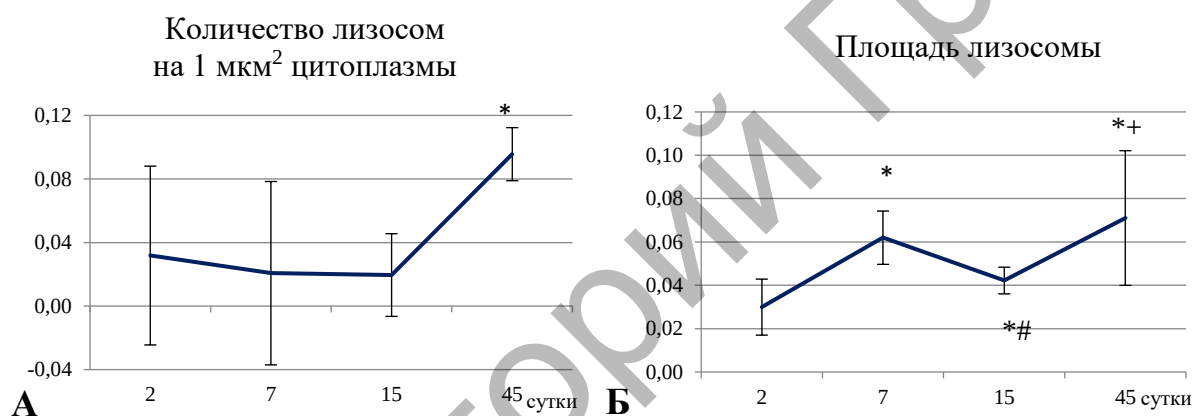


Рисунок 7.5 – Морфометрические показатели лизосом клеток Пуркинье палеocereбеллума крыс в постнатальном онтогенезе (Me+IQR)

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению со 2-ми сутками, # – $p < 0,05$ по сравнению с 7-ми сутками, + – $p < 0,05$ по сравнению с 15-ми сутками.

Гистаминергические нейроны гипоталамуса

В цитоплазме гистаминергических нейронов на пятые сутки встречаются единичные **лизосомы**, которые представляют собой тельца мелких, средних и крупных размеров, заполненные как гомогенным веществом равномерной плотности, так и обладающие гетерогенным содержимым. На 20 и 45-е сутки постнатального развития размеры лизосом достоверно не изменяются. Зачастую данные органеллы располагаются в непосредственной близости от КГ (рисунок 7.6, 7.7).

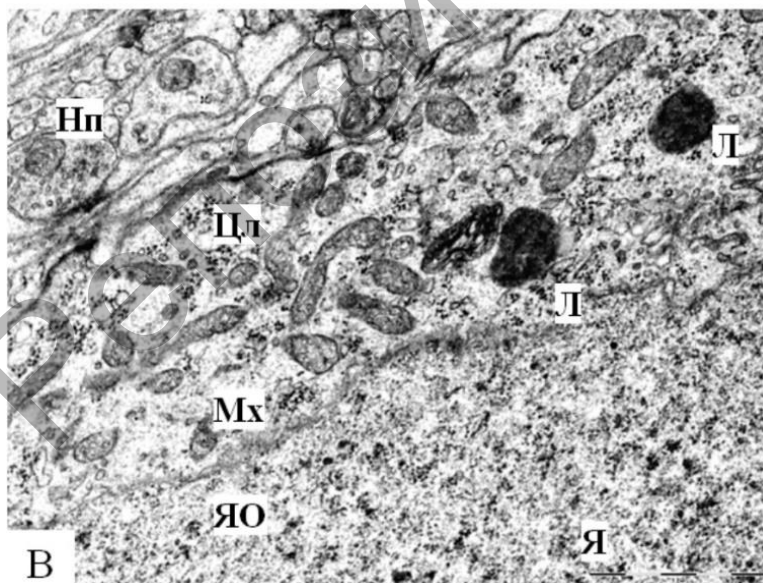
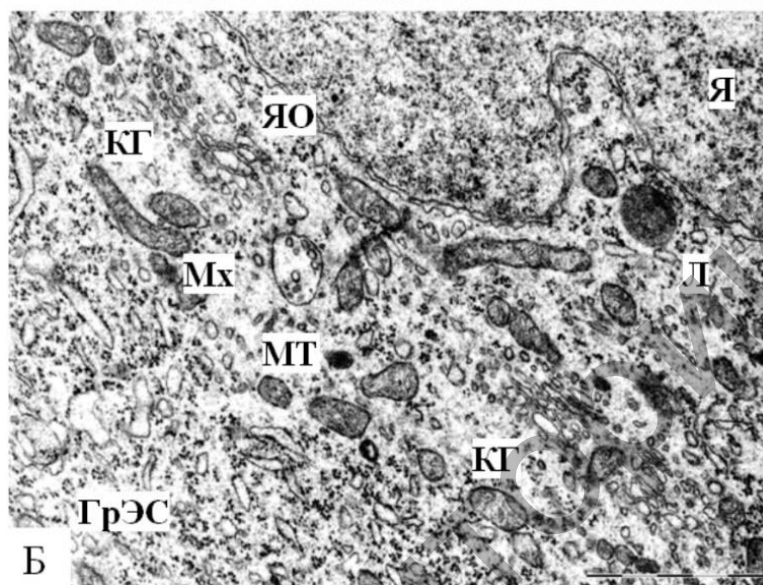
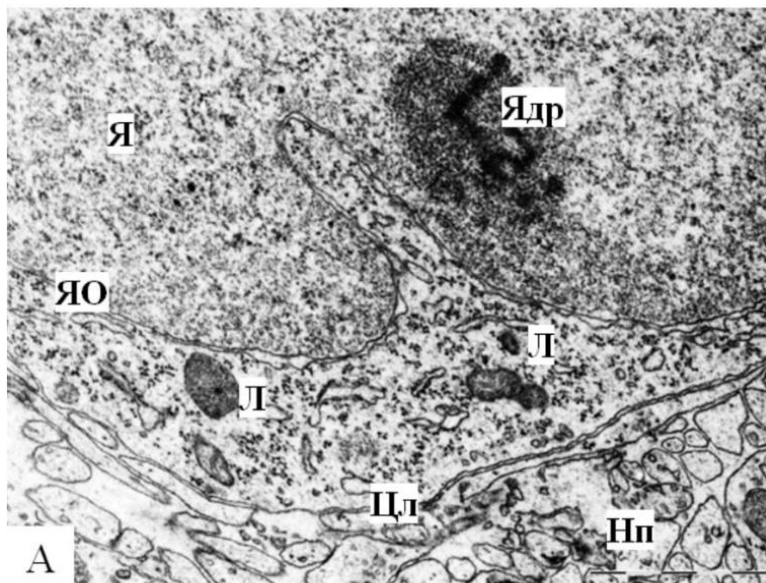


Рисунок 7.6 – Лизосомы в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса на пятые (А), 20 (Б), 45-е (В) сутки постнатального онтогенеза

Гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС), комплекс Гольджи (КГ), лизосомы (Л), митохондрии (Мх), мультивезикулярное тельце (МТ), нейропил (Нп), цитолемма (Цл), ядерная оболочка (ЯО), ядро (Я). Электронограммы. Масштабный отрезок равен 1 мкм. Ув. 30000

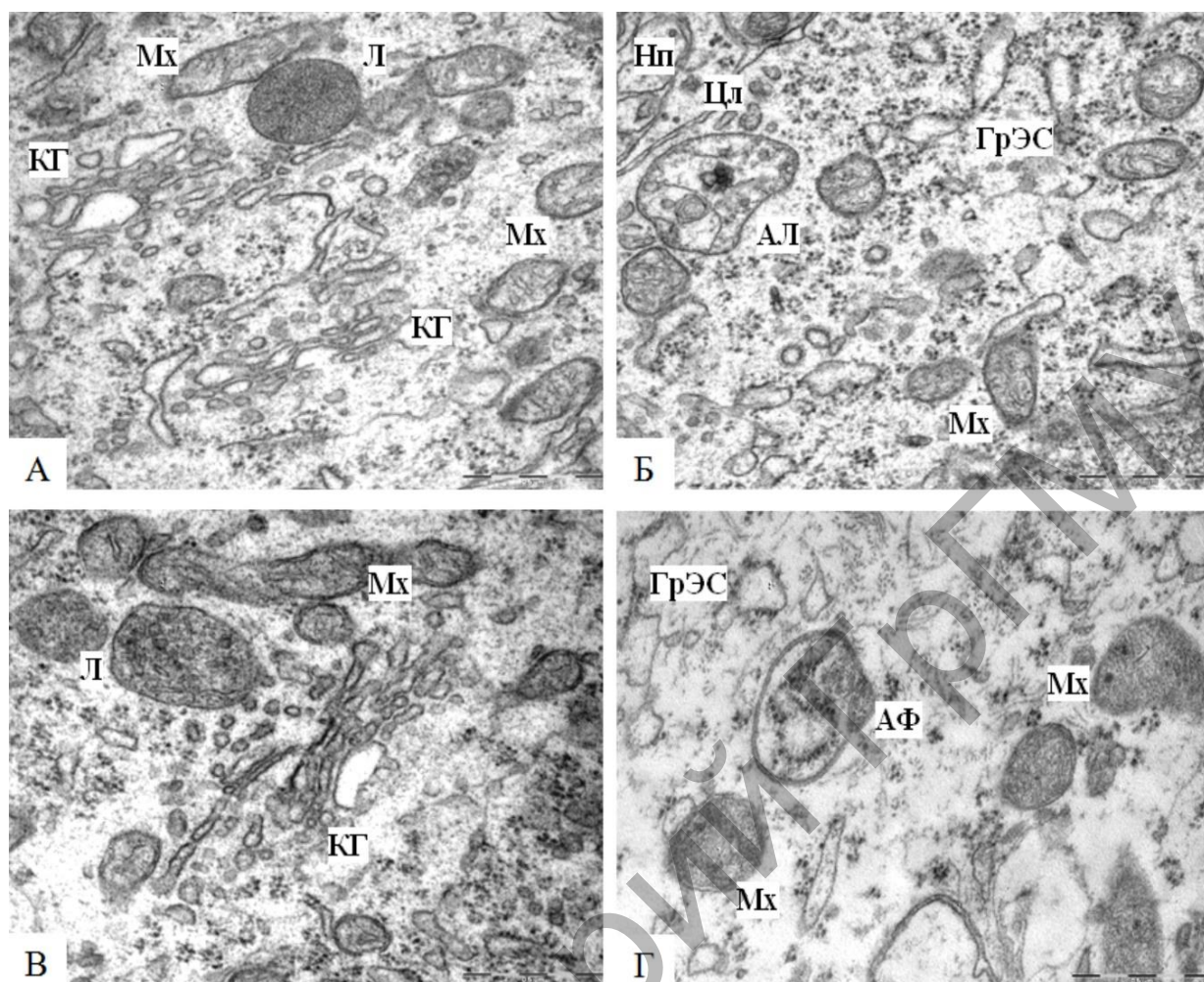


Рисунок 7.7 – Многообразие лизосом в цитоплазме гистаминергических нейронов гипоталамуса крыс на пятые (А, Б) и 45-е (В, Г) сутки постнатального развития

Аутофаголизосома (АЛ), комплекс Гольджи (КТ), лизосома (Л), митохондрии (Мх), нейропиль (Нп), формирующаяся аутофагосома (АФ), цитолемма (Ц).

Электроннограммы. Масштабный отрезок равен 0,5 мкм. Ув. 60000

В постнатальном онтогенезе количество лизосом увеличивается в 2,5 раза: с пятых по 20-е сутки – в 1,6 раза ($p < 0,001$), с 20-х по 45-е сутки – в 1,5 раза ($p = 0,004$) (рисунок 7.8). При этом их индивидуальная площадь не претерпевает существенных изменений (рисунок 7.8), а относительная площадь с пятых по 45-е сутки увеличивается в 2,3 раза (с пятых по 20-е сутки – в 1,3 раза ($p = 0,005$), с 20-х по 45-е сутки – в 1,8 раза ($p = 0,033$)) (рисунок 7.8) [Зиматкин С. М. и соавт., 2019].

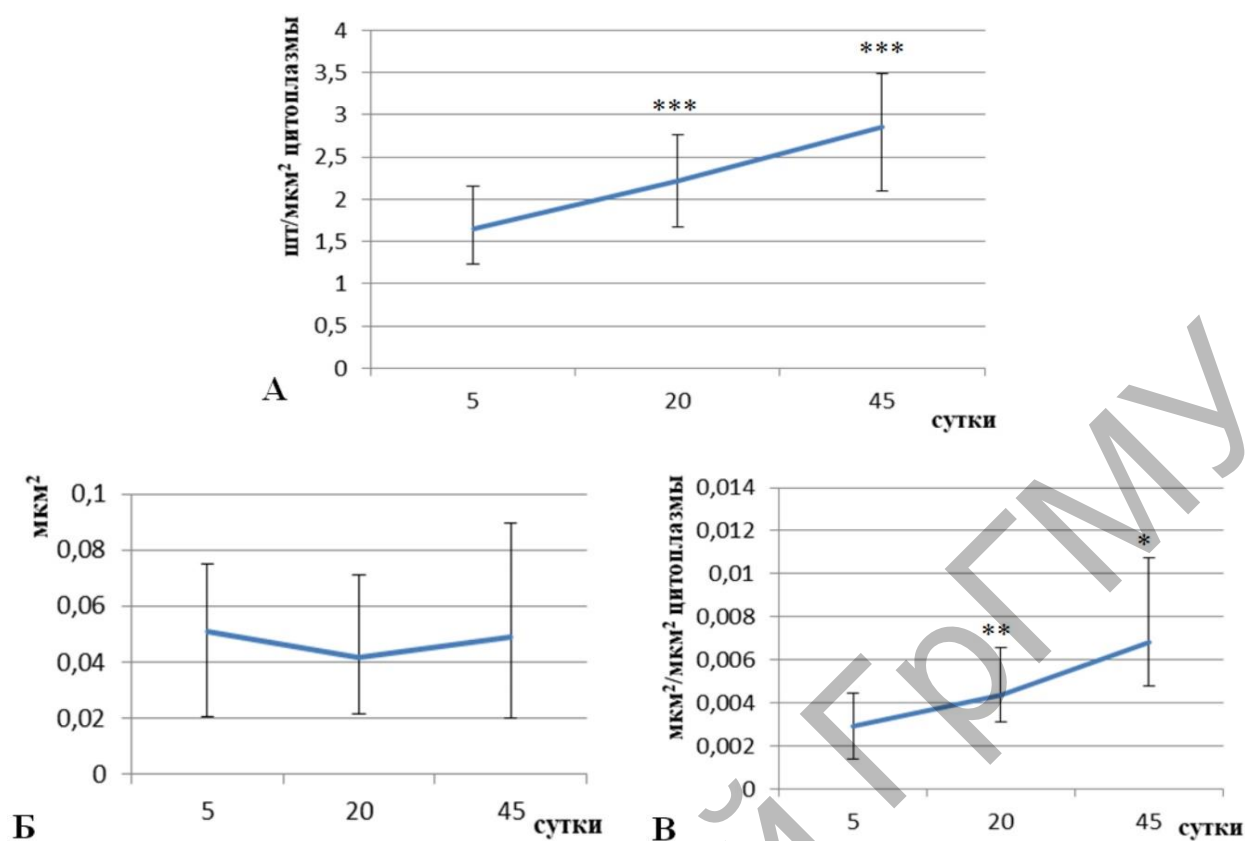


Рисунок 7.8 – Динамика изменений количества лизосом (А), индивидуальной площади (Б) и относительной площади лизосом (В) в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса в постнатальном онтогенезе (Me (LQ; UQ))

Примечание – * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$; при сравнении показателей каждый последующий срок сопоставляли с предыдущим

Наряду с лизосомами в нейронах во все исследованные сроки развития часто встречаются **мультивезикулярные тельца** – образования, располагающиеся преимущественно на периферии клетки, окруженные мембраной и содержащие разное количество мелких пузырьков с разной осмиофильностью (рисунки 7.9, 7.10).

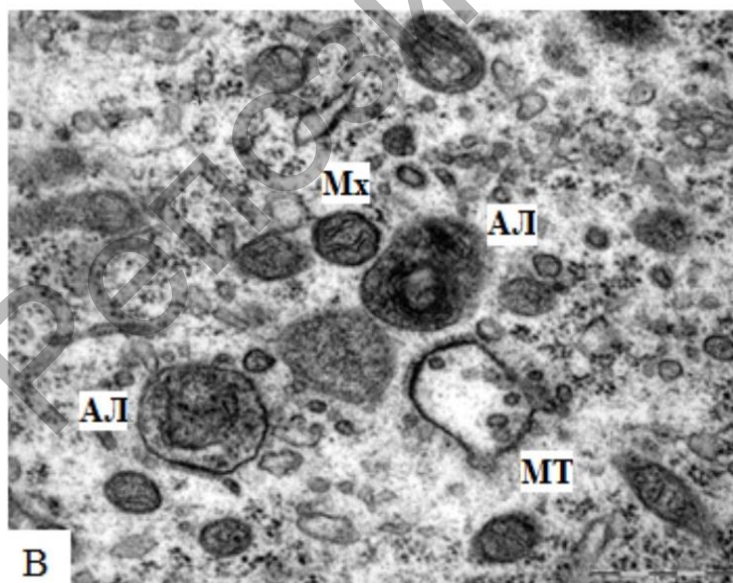
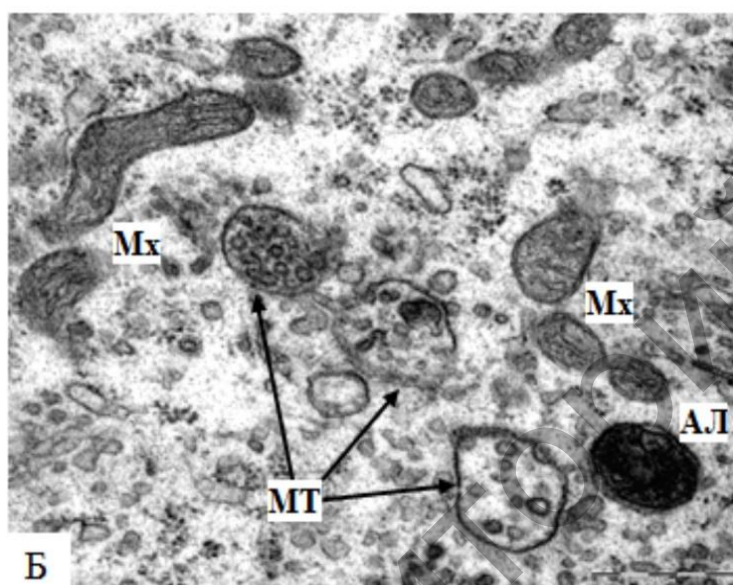
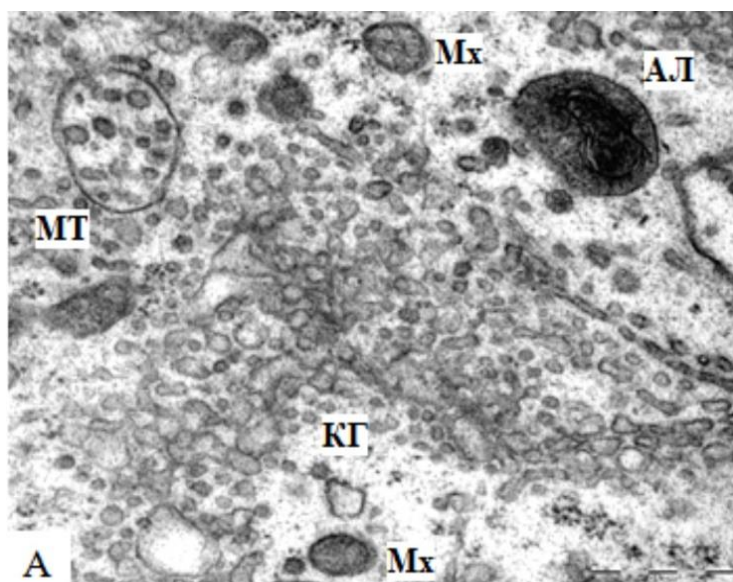


Рисунок 7.9 – Аутофаголизосомы и мультивезикулярные тельца в цитоплазме гистаминергических нейронов гипоталамуса крысят 20-суточного возраста
 Аутофаголизосома (АЛ), комплекс Гольджи (КГ), митохондрии (Мх), мультивезикулярные тельца (МТ).
 Электронограммы.
 Масштабный отрезок равен 0,5 мкм. Ув. 50000

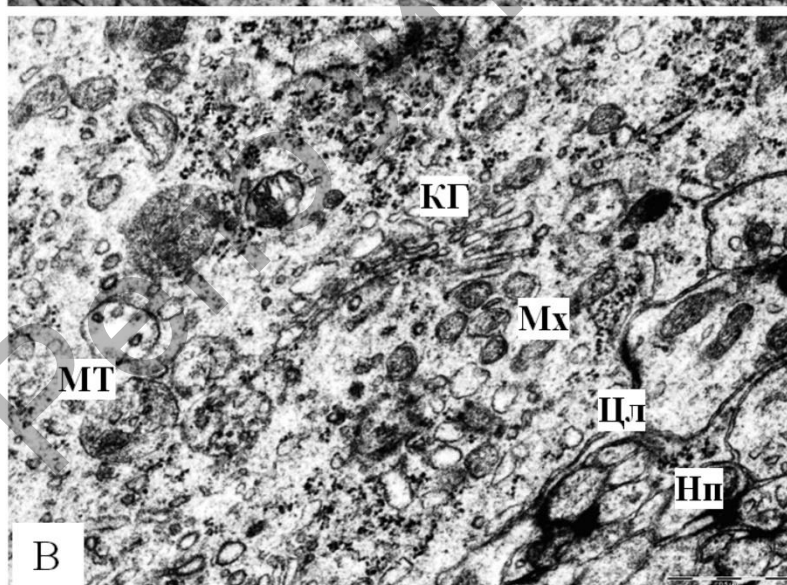
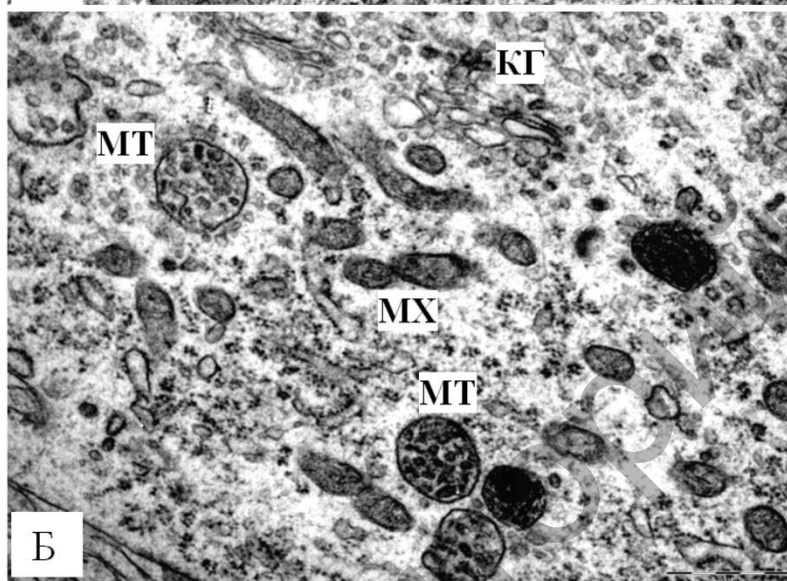
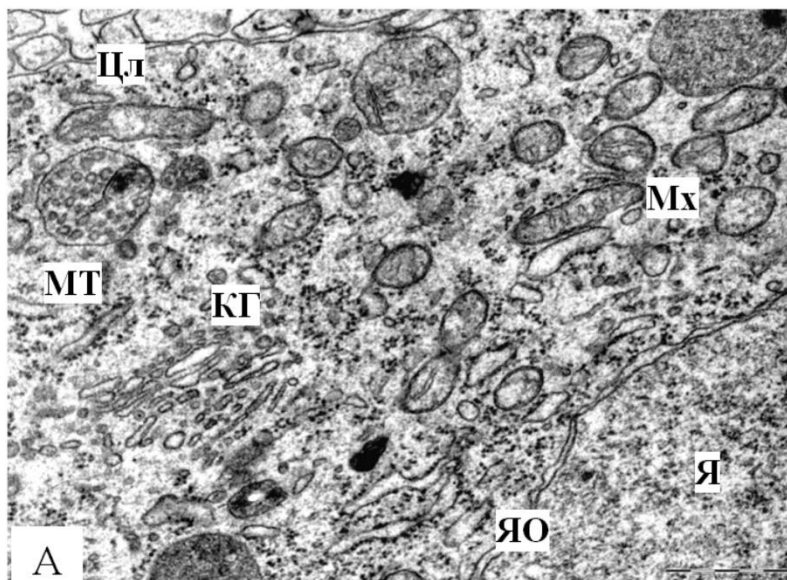


Рисунок 7.10 – Мульти-везикулярные тельца в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса на пятые (А), 20 (Б), 45-е (В) сутки постнатального онтогенеза

Гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС), комплекс Гольджи (КГ), митохондрии (Мх), мультивезикулярные тельца (МТ), нейропиль (Нп), цитолемма (Цл), ядерная оболочка (ЯО), ядро (Я).

Масштабный отрезок равен 0,5 мкм. Ув. 30000

Глава 8

РАЗВИТИЕ МЕДИАТОРНОГО АППАРАТА НЕЙРОНОВ

Развитие медиаторного аппарата ГАМК-ергических нейронов мозжечка

В качестве маркера для оценки постнатального развития медиаторного аппарата ГАМК-ергических нейронов мозжечка нами использован фермент образования ГАМК – глутаматдекарбоксилаза (ГДК). На вторые сутки постнатального развития крысы слои коры мозжечка еще не сформированы. Так, КП располагаются в 3–4 ряда, их тела представляют собой узкий ободок цитоплазмы вокруг ядра, где ГДК-иммунореактивность низка. В молекулярном и зернистом слоях выявляется небольшое количество мелких ГДК-иммунореактивных нейронов. Их перикарионы хорошо выделяются на фоне светлого нейропиля, где количество ГДК-иммунопозитивных мелких точек (аксодендритических синапсов) небольшое (рисунок 8.1).

На 7-е сутки КП располагаются в один ряд, увеличиваются размеры их перикарионов преимущественно в апикальной части клетки, здесь же значительно увеличивается и экспрессия ГДК. На 7-е сутки у контрольных крыс как в палео-, так и неocerebellуме ГДК-иммунопозитивное окрашивание синапсов в виде мелких единичных расположенных точек появляется на некоторых дендритах и перикарионах КП. На 7-е сутки количество ГДК-иммунореактивных нейронов в молекулярном и зернистых слоях увеличивается, но они выявляются хуже на фоне более темного нейропиля с растущей ГДК-иммунореактивностью. На перикарионах нейронов молекулярного слоя в этот срок уже четко определяются мелкие ГДК-иммунореактивные точки – аксосоматические синапсы (рисунок 8.1).

На 15-е сутки равномерное ГДК-иммунопозитивное окрашивание наблюдалось в перикарионах КП вокруг иммунонегативных ядер и в проксимальной части дендритов. Тело и дендриты многих

клеток КП были покрыты переменным количеством ГДК-иммунопозитивных точек – аксосоматических и аксодендритических синапсов. Среди зернистых нейронов определяются иммунопозитивные по ГДК мелкие по размеру точки, расположенные по периферии формирующихся клубочков мозжечка (рисунок 8.1).

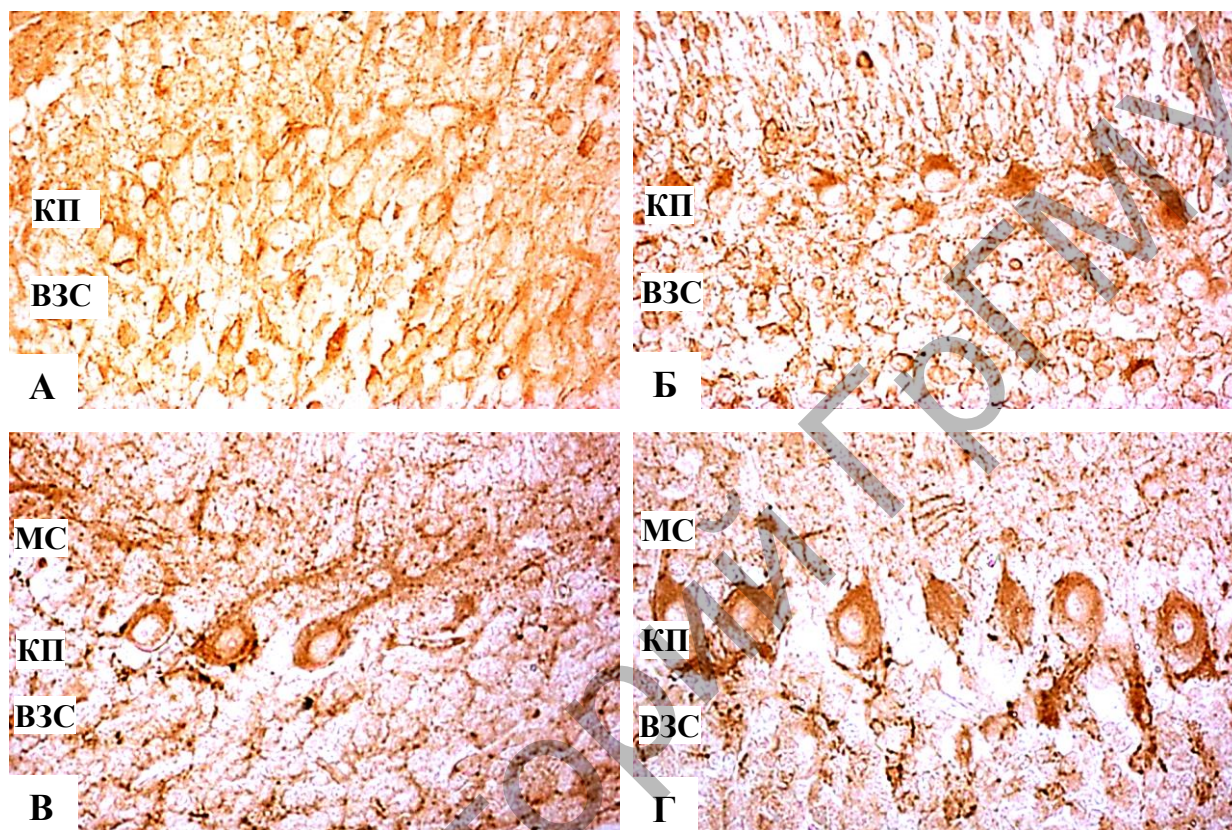


Рисунок 8.1 – Экспрессия глутаматдекарбоксилазы в древней части мозжечка у крыс на 2-е (а), 7-е (б), 15-е (в) и 45-е (г) сутки после рождения

МС – молекулярный слой, КП – клетки Пуркинье;
ВЗС – внутренний зернистый слой.

Иммуногистохимическая реакция на ГДК. Ув. 400

На 45-е сутки ГДК-иммунореактивность выявляется по всей цитоплазме тел клеток Пуркинье, вокруг которых появляются корзинки из ГДК-позитивных нервных волокон. Ширина ГДК-иммунореактивной зоны в молекулярном слое увеличивается по сравнению с 15-суточными крысами, и иммунное окрашивание зоны синаптогенеза становится более гомогенным. При этом иммунопозитивные по ГДК синапсы становятся более мелкими, многочисленными и расположены более равномерно по дендритному дереву КП.

ГДК-иммунореактивность наблюдалась в телах звездчатых и корзинчатых нейронов, но она была значительно выше в аксонах этих нейронов, которые формируют сплетения (корзинки) вокруг перикарионов КП. ГДК-иммунопозитивные точки (аксодендритические синапсы) по периферии сформированных клубочков мозжечка становятся крупнее (рисунок 8.1) [Зиматкин С. М., Карнюшко О. А., 2020].

В зрелом мозге ГАМК функционирует главным образом в качестве тормозного медиатора, а в процессе развития нервной системы может выступать в качестве трофического фактора, оказывая влияние на пролиферацию, миграцию, дифференцировку, созревание синапсов и гибель клеток [Owens D. F., 2002]. Этим можно объяснить экспрессию ГДК в нейронах коры мозжечка уже у двухсуточных крыс, еще в домедиаторный период, до начала синаптогенеза.

Экспрессия (гибридизация *in situ*) мРНК-ГДК в клетках Пуркинье достигала уровня взрослых крыс через неделю, в клетках Гольджи – к 14-м суткам постнатального развития [Willcutts M. D., 1991]. По нашим данным (иммуногистохимия), экспрессия ГДК в КП достигала дефинитивного уровня примерно в эти же сроки. Наблюдаемое увеличение в молекулярном слое количества ГДК-иммунопозитивных нейронов и ГДК-иммунореактивности нейропиля с седьмых по 45-е сутки может быть связано с увеличением количества ГАМК-ергических звездчатых и корзинчатых нейронов, ростом их отростков и образованием синапсов на растущих дендритах КП. По данным гибридизации *in situ* эти нейроны в молекулярном слое достигают конечного содержания мРНК-ГДК к 21-м суткам постнатального развития и позднее [Willcutts M. D., 1991].

Постнатальное увеличение иммунореактивности ГДК в зернистом слое мозжечка связано с растущими ГАМК-ергическими нейронами, клетками Гольджи и Люгаро, а также окончаниями аксонов клеток Гольджи на клубочках мозжечка.

Ядра мозжечка. На вторые сутки постнатального онтогенеза крысы в промежуточном ядре мозжечка в цитоплазме перикарионов некоторых нейронов ГДК-иммунореактивность была умеренной. На телах нейронов и в нейропиле ГДК-иммунореактивные синапсы были единичны (рисунок 8.2).

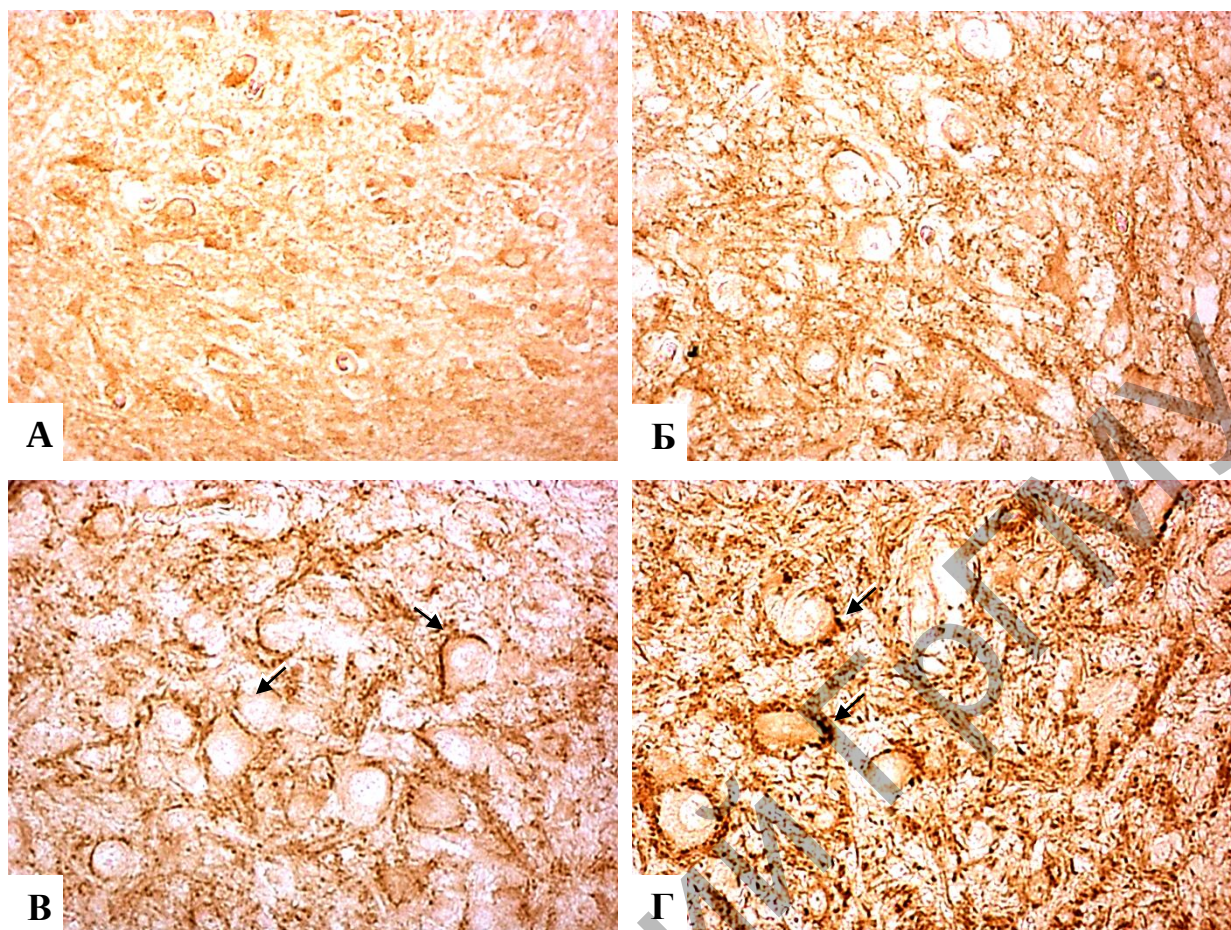


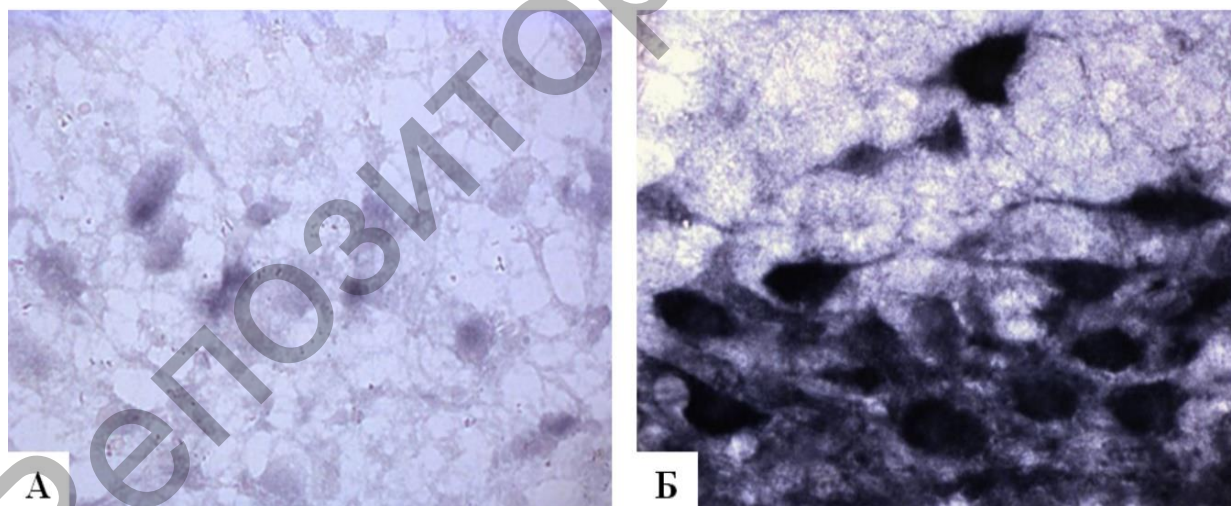
Рисунок 8.2 – ГДК-иммунореактивные синапсы на телах (указаны стрелками) и дендритах нейронов промежуточного ядра мозжечка на 2-е (а), 7-е (б), 15-е (в), 45-е (г) сутки после рождения
Иммуногистохимическая реакция на ГДК. Ув. 400

На седьмые сутки умеренную иммунореактивность приобретают отростки некоторых нейронов, при этом на перикарионах нейронов появляются аксосоматические синапсы, увеличивается количество ГДК-иммунопозитивных точек между телами нейронов – аксодендритических синапсов (рисунок 8.2). На 15-е и особенно на 45-е сутки увеличивается количество аксосоматических синапсов, при этом тела большинства нейронов промежуточного ядра полностью окружены ГДК-иммунопозитивными крупными точками; количество и размеры аксодендритических синапсов увеличиваются и в нейропиле (рисунок 8.2). В формирующихся нейронах ядер мозжечка крысы, которые образуются еще пренатально, экспрессия ГДК наблюдалась нами уже на вторые сутки постнатального онтогенеза, что соответствует литературным данным [Greif K. F. et al., 1991]. Во многих нейронах она сохранялась

на 7–45-е сутки. Очень четко и закономерно в ядрах мозжечка в постнатальном онтогенезе увеличивается количество и размеры аксосоматических и аксодендритических ГАМК-ергических синапсов, очевидно, образованных КП, иммунореактивность аксонов которых отчетливо выявлялась в белом веществе мозжечка.

Развитие медиаторного аппарата гистаминергических нейронов мозга

При гистохимическом исследовании гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса крыс установлено, что активность фермента окислительного дезаминирования гистамина и маркерного фермента гистаминергических нейронов мозга **моноаминооксидазы типа Б (МАОБ)** на пятые сутки после рождения не выявляется, на 10-е сутки она очень низкая (рисунок 8.3), а затем прогрессивно нарастает, становясь на 90-е сутки в 5,9 раза выше ($p < 0,001$) (рисунки 8.3, 8.4). Так, с 10-х по 20-е сутки данный показатель увеличивается в 4,1 раза ($p < 0,001$), с 20-х по 45-е сутки и с 45-х по 90-е сутки – в 1,2 раза ($p < 0,001$) (рисунки 8.3, 8.4).



**Рисунок 8.3 – Активность МАО Б
в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса
10-суточных (А) и 90-суточных (Б) крыс**

Окраска по Зиматкину, Цыдику.
Цифровая микрофотография. Ув. 400

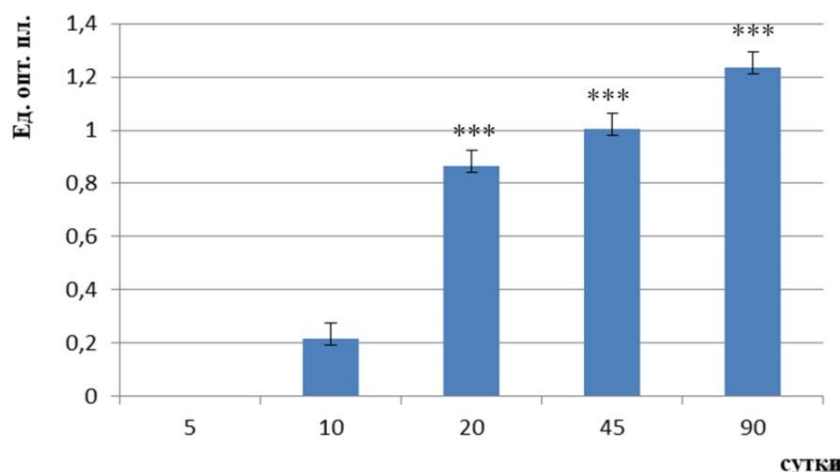


Рисунок 8.4 – Активность MAO Б в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса крыс в постнатальном онтогенезе (Me (LQ; UQ))

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

Установлено, что иммунореактивность **моноаминооксидазы типа Б (MAO Б)** в гистаминергических нейронах гипоталамуса на пятые сутки после рождения не выявляется, а с 10 по 90-е сутки возрастает в 3,7 раза ($p < 0,001$) (рисунки 8.5, 8.6). С 10 по 20-е сутки данный показатель увеличивается в 2 раза ($p < 0,001$), с 20 по 45-е сутки – в 1,4 раза ($p < 0,001$) и с 45 по 90-е сутки – в 1,3 раза ($p < 0,001$) (рисунок 8.6).

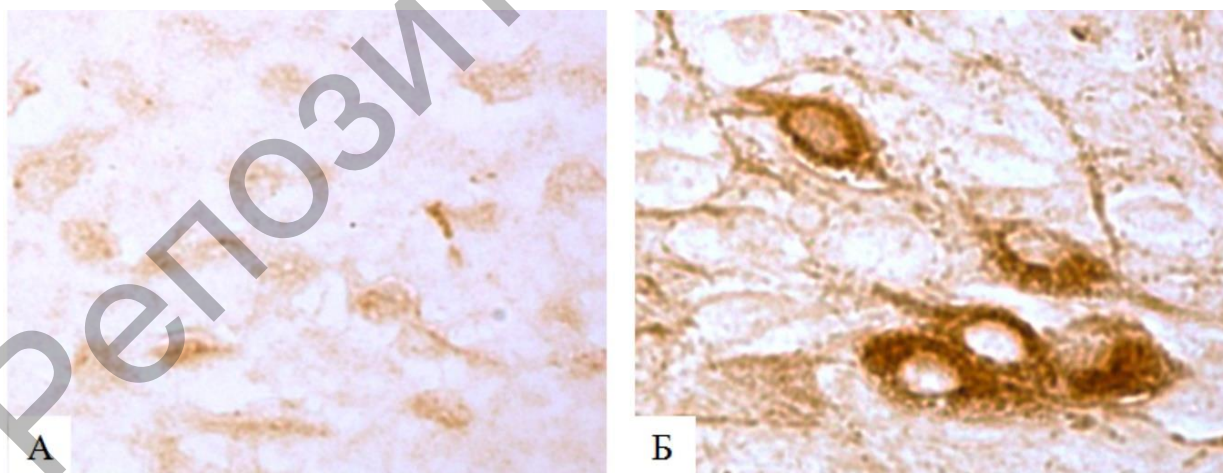


Рисунок 8.5 – Иммунореактивность MAO Б в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса 10-суточных (А) и 90-суточных (Б) крыс

Окраска по Зиматкину, Заерко.
Цифровая микрофотография. Ув. 800

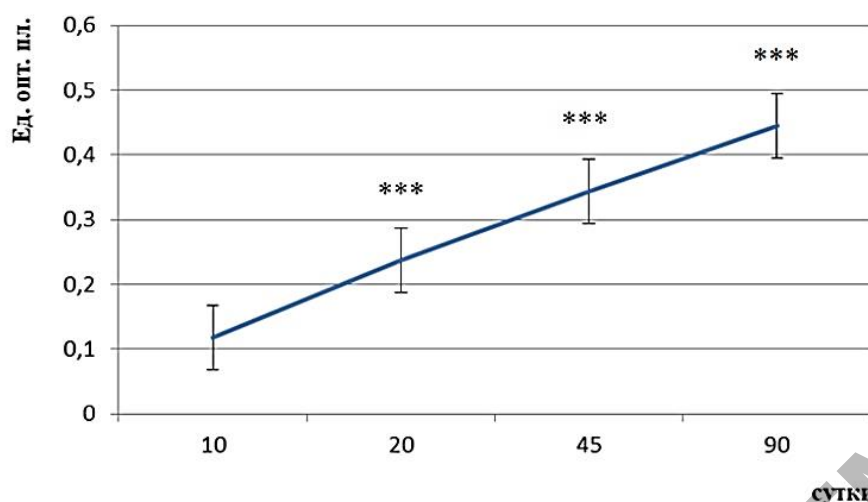


Рисунок 8.6 – Иммунореактивность МАО Б в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса крыс в динамике постнатального онтогенеза (Me (LQ; UQ))

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

Таким образом, в постнатальном онтогенезе в нейронах мозга закономерно развивается медиаторный аппарат, образованный ферментами синтеза, и деградации медиаторов, необходимых для передачи информации между нейронами.

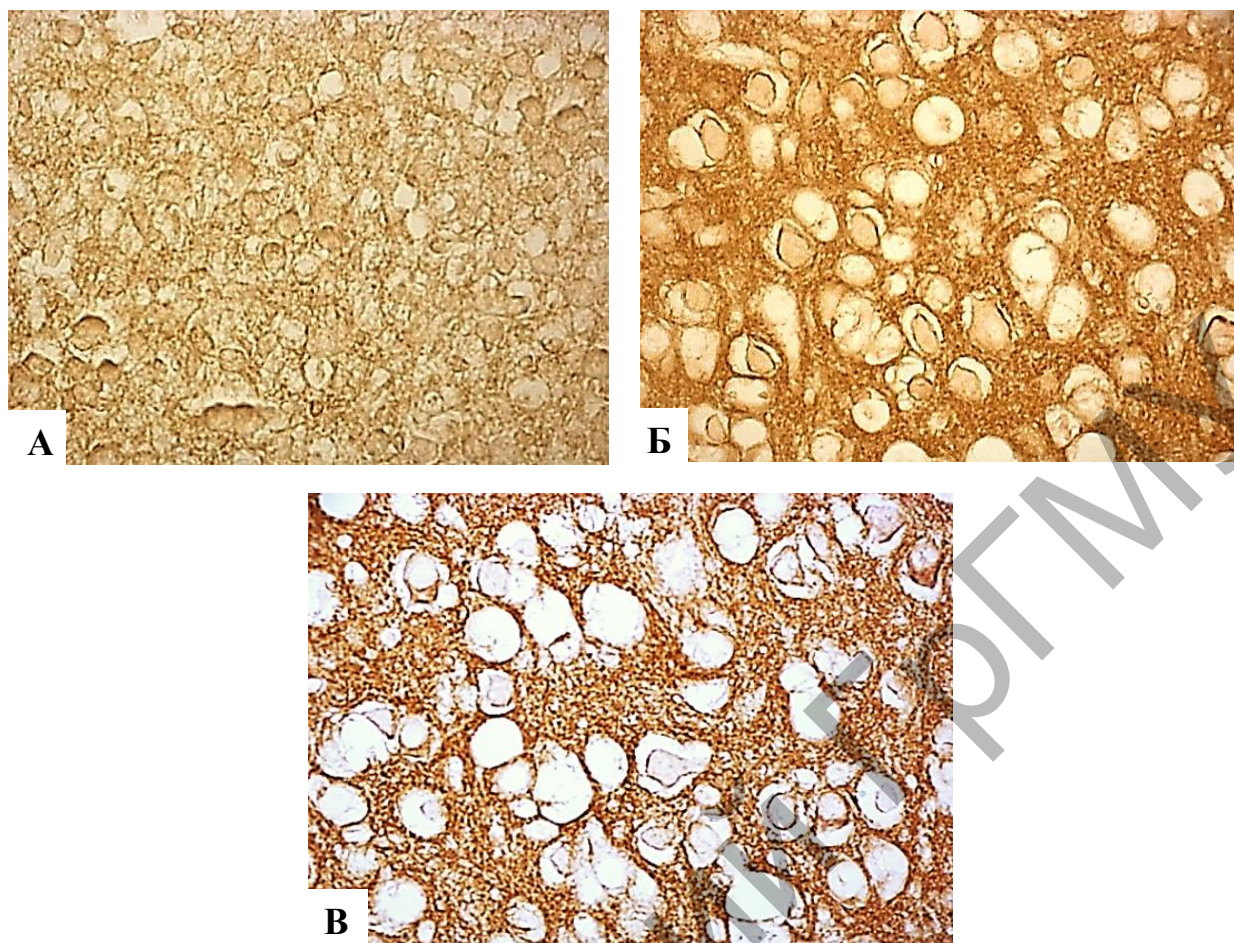
Глава 9

РОСТ НЕЙРОПИЛЯ И СИНАПТОГЕНЕЗ

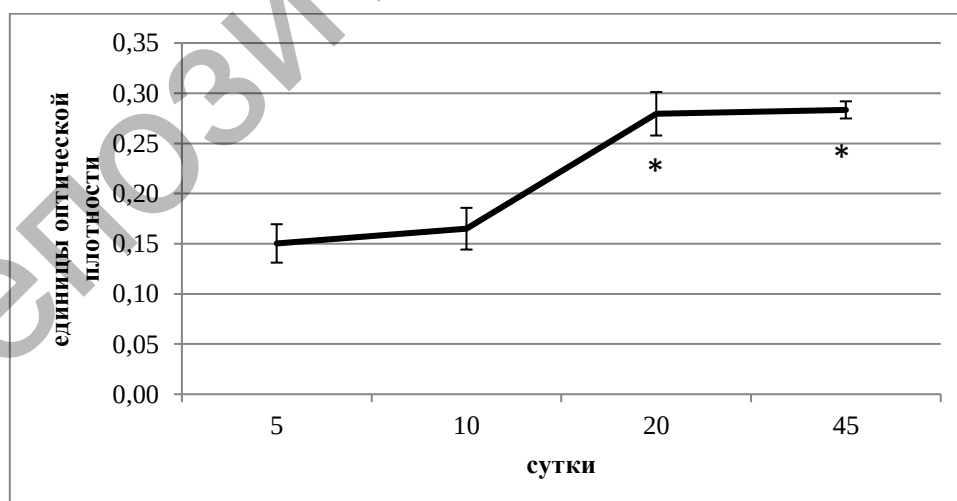
Синаптогенез в изокортексе

Синаптофизин (СФ) – это трансмембранный гликопротеин мелких синаптических пузырьков нейронов и широко применяется для оценки синапсов. С помощью ультраструктурной иммуоцитохимии СФ выявлен во всех малых (не содержащих пептиды) синаптических пузырьках в нервной системе независимо от того, какой медиатор они содержат, но не был обнаружен в мембранах крупных пептид-содержащих пузырьков [Бонь Е. И., Зиматкин С. М., 2017a]. Основные функции СФ связывают с формированием синаптических пузырьков, выделением из них нейромедиаторов и синаптогенезом. Известно, что мембрана синаптических пузырьков обогащена холестерином, в отличие от других мембран нейронов. Показано, что одним из основных холестерин-связывающих белков пузырьков является синаптофизин. На этом факте основывается мнение, что он является одним из ключевых белков, необходимых для биогенеза синаптических пузырьков [Barr A. M., 2005].

В нашем исследовании показано, что в постнатальном онтогенезе происходит прогрессивное нарастание экспрессии маркера синаптических пузырьков синаптофизина. На 5 и 10-е сутки иммунореактивность была низкой, а с 10-х по 20-е сутки наблюдалось значительное ее повышение – на 47 % ($p < 0,05$). Затем, с 20-х по 45-е сутки, экспрессия СФ существенно не менялась (рисунки 9.1, 9.2; таблица 9.1) [Бонь Е. И., Зиматкин С. М., 2017a].



**Рисунок 9.1 – Экспрессия СФ в нейропиле пятого слоя
изокортекса крыс на 5-е (А), 20-е (Б)
и 45-е (В) сутки после рождения**
Экспрессия СФ. Цифровая микрофотография. Ув. 400



**Рисунок 9.2 – Изменение экспрессии СФ в пятом слое
изокортекса крыс в разные сроки после рождения**
Примечание – $Me \pm IQR$; * – $p < 0,05$ по сравнению с 10-ми сутками.

Таблица 9.1 – Экспрессия СФ в нейропиле пятого слоя изокортекса крыс (Me (LQ; UQ)), в единицах оптической плотности

Сроки после рождения	Контроль
5-е сутки	0,15 (0,14; 0,16)
10-е сутки	0,165 (0,15; 0,17)
20-е сутки	0,28 (0,27; 0,3)*
45-е сутки	0,28 (0,27; 0,3)*

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с 10-ми сутками.

На электронно-микроскопическом уровне во внутреннем пирамидном слое в постнатальном онтогенезе наблюдалось повышение плотности расположения синапсов, в них содержалось большее количество синаптических пузырьков, в основном связанных с пресинаптической мембраной (рисунки 9.3–9.6).

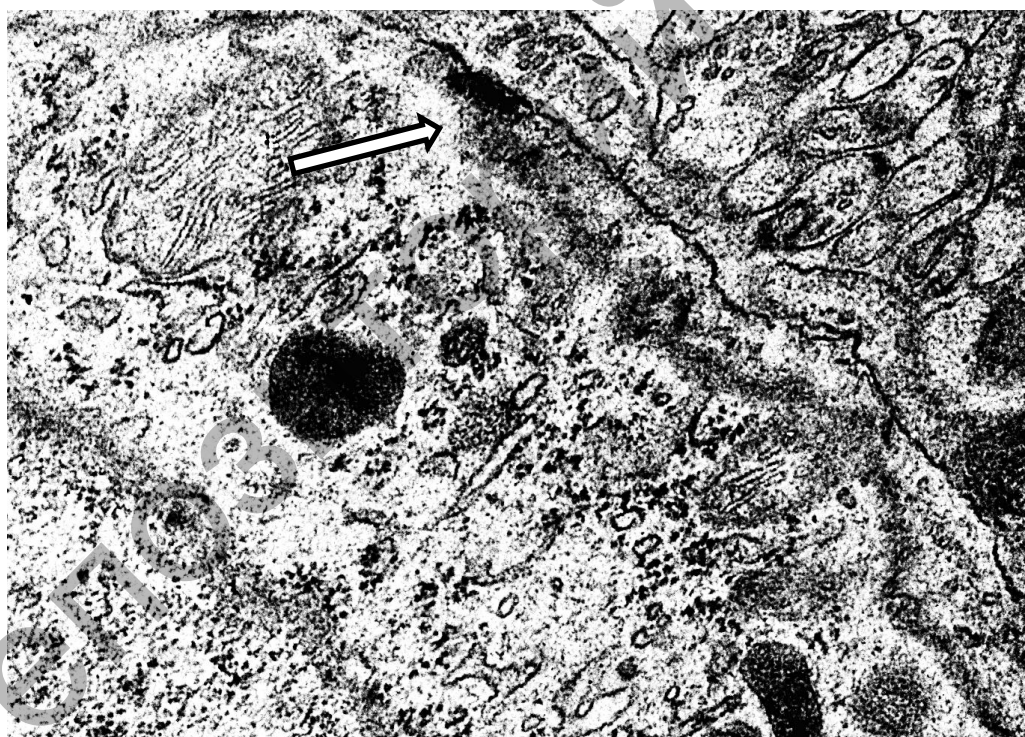


Рисунок 9.3 – Аксосоматические синапсы на внутренних пирамидных нейронах изокортекса 20-суточных крыс
Синапсы показаны стрелками.
Электроннограммы. Ув. 50000



Рисунок 9.4 – Аксодендритические синапсы в нейропиле внутреннего пирамидного слоя изокортекса 20-суточных крыс
 Синапсы показаны стрелками.
 Электронограммы. Ув. 50000

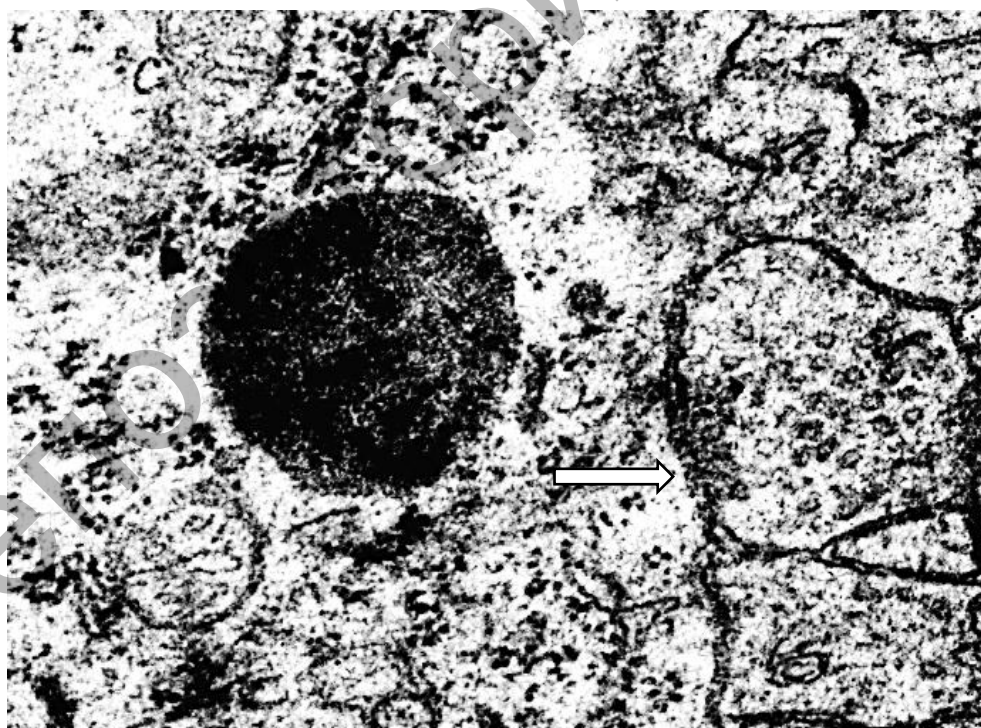


Рисунок 9.5 – Аксосоматические синапсы на внутренних пирамидных нейронах изокортекса 45-суточных крыс.
 Синапсы показаны стрелками.
 Электронограммы. Ув. 50000

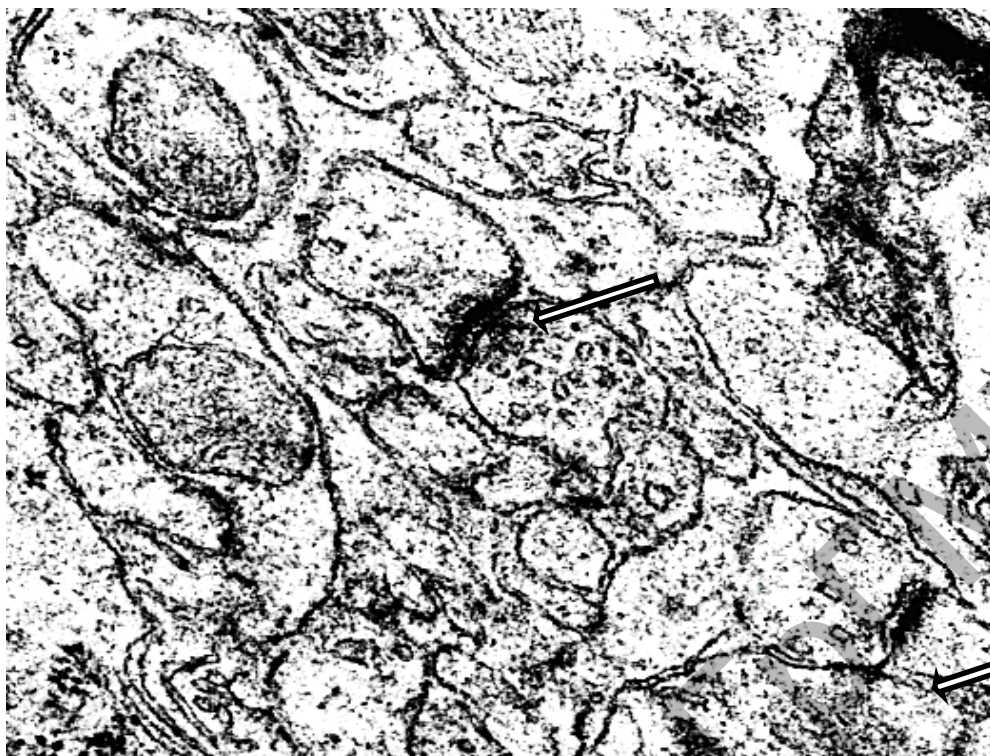


Рисунок 9.6 – Аксодендритические синапсы в нейропиле внутреннего пирамидного слоя изокортекса 45-суточных крыс
Синапсы показаны стрелками.
Электроннограммы. Ув. 50000

Развитие синаптического аппарата коррелирует со становлением ультраструктуры и гистохимических характеристик нейронов изокортекса крыс в динамике постнатального онтогенеза.

Синаптогенез в мозжечке

Образование синапсов между КП и параллельными волокнами (аксонами зернистых нейронов) начинается в глубокой части молекулярного слоя коры мозжечка на 7–9 день постнатального онтогенеза [Fujita M. et al., 1996]. У крыс корзинчатые нейроны образуются со вторых по 17-е сутки постнатального развития, а звездчатые нейроны – с четвертых по 19-е сутки. Затем они дифференцируются и образуют синаптические контакты с КП [Rouzat C., Hestrin S., 1997]. Лазающие волокна (аксоны нейронов нижней оливы) достигают коры развивающегося мозжечка и устанавливают синаптические контакты с КП к 18–19 дню эмбрионального развития.

Затем множественная иннервация лазящими волокнами к моменту рождения сменяется моноиннервацией к 15-м суткам постнатального развития [Andjus P. R. et al., 2003. Выявление]. Моховидные волокна образуют большинство афферентов в мозжечке и формируют гломерулы во внутреннем зернистом слое (ВЗС). Существует несколько источников моховидных волокон: нейроны спинного мозга (спиноцеребеллярный тракт проникает в мозжечок на 15-й день эмбрионального развития), вестибулярные ядра (вестибулоцеребеллярные афференты – на 13–15-й дни), ядра ретикулярной формации (ретикулоцеребеллярные проекции на 16–17-й дни), ядер тройничного нерва (на 22-й эмбриональный день) и моста (понтocereбеллярные афферентные волокна – после рождения) [Rahimi-Balaei M. et al., 2015 Embryonic].

В ходе дифференцировки клубочков мозжечка различают два этапа – протогломерулярный и гломерулярный. Первый этап проходит у крыс в течение первых двух недель постнатального развития и характеризуется быстрым расширением розеток моховидных нервных волокон, содержащих синаптические пузырьки вблизи плазмолеммы. Второй этап (гломерулярный) – формирование и стабилизация клубочков – с 15 по 45-е сутки. В этот период происходит увеличение в терминалях моховидных волокон числа синаптических пузырьков и контактов с дендритами зернистых клеток, которые образуют выпячивания (шипики), содержащие митохондрии и цистерны эндоплазматической сети [Дьячкова Л. Н., Хамори И., 1967]. Афферентные пути мозжечка (образованы аксонами КП) начинают формироваться во время позднего эмбриогенеза и КП устанавливают синаптические контакты с клетками-мишенями (нейронами ядер мозжечка) к 20-му дню эмбрионального развития [Eisenman L. M. et al., 1991].

Охарактеризовать синаптогенез в ходе развития мозжечка позволяет молекулярный маркер синаптических пузырьков синаптофизин (SYN) [Гилерович Е. Г. и соавт., 2014. Выявление; Колос Е. А. и соавт., 2015; West M.J., del Cerro M. et al., 1976]. SYN составляет 10 % от всех белков синаптических пузырьков, обеспечивает их контакт с пресинаптической мембраной, участвует в эндо- и экзоцитозе нейромедиаторов [Kwon S. E., Chapman E. R., 2011]. Присутствие SYN не является обязательным для образования синаптических пузырьков [Eshkind L.G., Leube R.E., 1995].

В настоящее время считают, что при отсутствии SYN не происходит нарушение экзоцитоза медиатора, но после передачи нервного импульса нарушается эндоцитоз и замедляется заполнение синаптических пузырьков медиатором, что ограничивает возможности передачи нервных импульсов нейронами [Eshkind L. G., Leube R. E., 1995]. SYN синтезируется в перикарионах, а затем поступает в аксоны нейронов [Fujita M. et al., 1996]. Экспрессия SYN в молекулярном слое мозжечка главным образом обусловлена синаптическими контактами между дендритами КП и параллельными волокнами, а в зернистом слое – с моховидными волокнами [Leclerc N. et al., 1989. Synaptophysin].

Результаты нашего исследования показали, что в коре мозжечка крыс на вторые и 15-е сутки после рождения в наружных рядах наружного зернистого слоя (НЗС), которые образованы делящимися клетками – предшественниками зернистых нейронов, иммунопозитивная окраска на SYN отсутствует. В цитоплазме готовящихся к миграции и мигрирующих через молекулярный слой будущих зернистых нейронов она выявляется (рисунок 9.6). Иммунореактивность SYN присутствует и в цитоплазме зернистых нейронов ВЗС, но по мере взросления животных (на 15–45-е сутки) она снижается (рисунок 9.6).

На 7-е сутки у контрольных крыс как в палео-, так и неocerebellуме иммунопозитивное по SYN окрашивание синапсов в виде плотно расположенных точек наблюдается между перикарионами КП и в глубокой части молекулярного слоя (рисунок 9.7). На 15-е и особенно 45-е сутки постнатального онтогенеза у крыс по мере утолщения молекулярного слоя как в палео-, так и неocerebellуме ширина зоны синаптогенеза увеличивается (рисунок 9.7, таблица 9.2). При этом иммунопозитивные по SYN синапсы становятся более мелкими и многочисленными, расположены более равномерно на иммунонегативных дендритах КП, чем на 7-е сутки, а иммунное окрашивание зоны синаптогенеза становится более гомогенным и слабым (рисунок 9.7, таблица 9.3), за исключением полосы повышенной иммунореактивности на поверхности молекулярного слоя на 45-е сутки (рисунок 9.7).

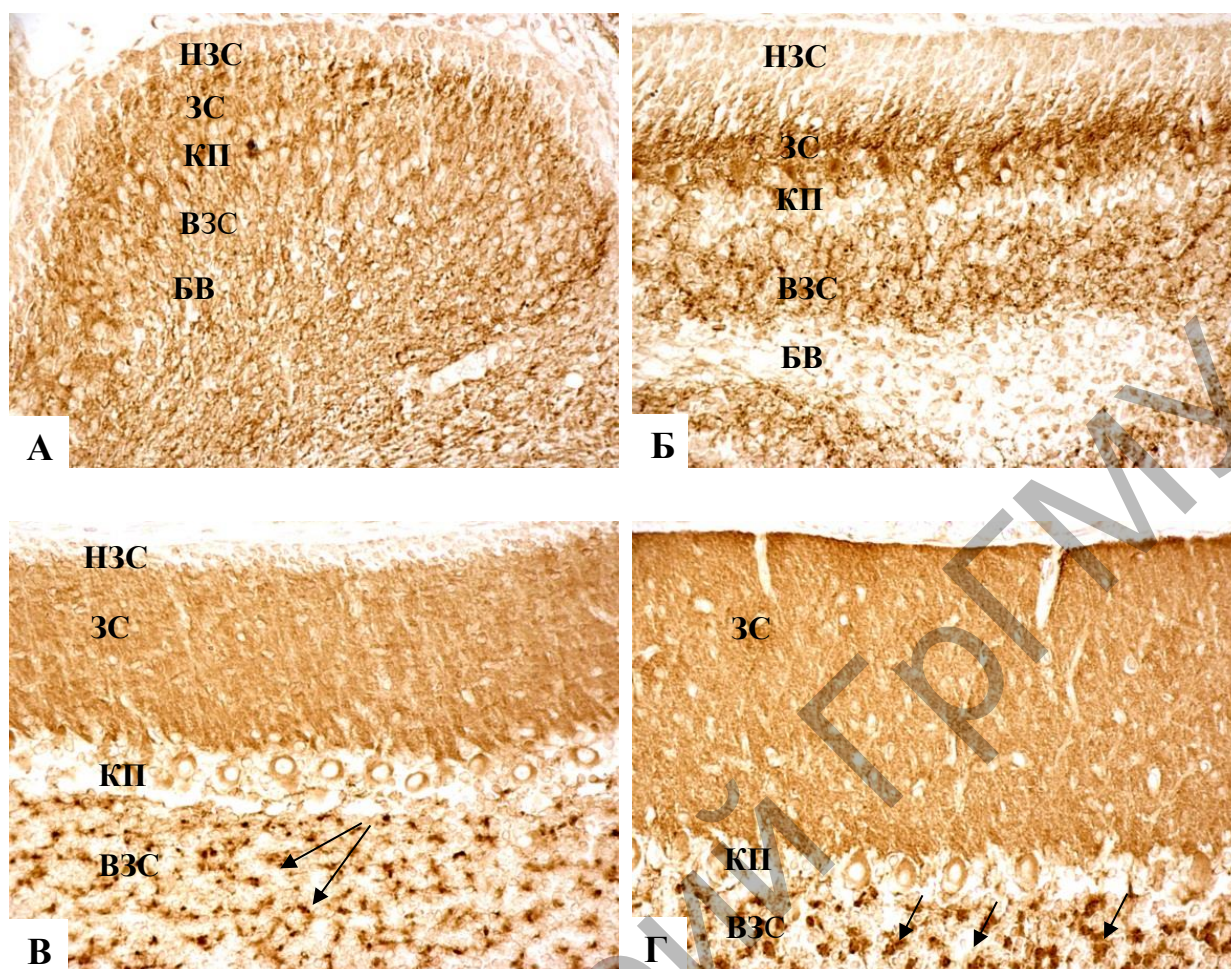


Рисунок 9.7 – Экспрессия синаптофизина в палеocerebellуме крыс в постнатальном онтогенезе на 2-е (А), 7-е (Б), 15-е (В), 45-е (Г) сутки после рождения

НЗС –наружный зернистый слой; ЗС – зона синаптогенеза в молекулярном слое, КП –клетки Пуркинье;
ВЗС – внутренний зернистый слой, БВ – белое вещество.
Стрелками показаны клубочки мозжечка. Ув. 200

Таблица 9.2 – Ширина зоны синаптогенеза в молекулярном слое коры мозжечка крыс разного филогенетического возраста в постнатальном онтогенезе, мкм

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

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с семисуточными крысами.

Таблица 9.3 – Иммунореактивность зоны синаптогенеза в молекулярном слое коры мозжечка крыс разного филогенетического возраста в постнатальном онтогенезе (в единицах оптической плотности)

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

Примечание –* – $p < 0,05$ по сравнению с семисуточными крысами.

На 2 и 7-е сутки после рождения экспрессия SYN наблюдается между перикарионами КП (рисунок 9.7). На 7-е сутки SYN-иммуно-позитивные синапсы в виде многочисленных крупных, интенсивно окрашенных точек наблюдались вокруг перикарионов КП – формирующиеся аксосоматические синапсы. На 15–45-е сутки после рождения количество аксосоматических синапсов на перикарионах КП значительно уменьшается. В эти сроки количество крупных SYN-позитивных синапсов на перикарионах КП в палео- и неocerebellum составляет $2,0 \pm 1,0$ ($Me \pm IQR$). В этот период преобладают мелкие SYN – иммунопозитивные аксосоматические синапсы, дающие мелкую пылевидную зернистость. Иммунореактивность SYN выявляется и в цитоплазме КП: она слабая на 2-е сутки, резко возрастает, достигая максимума на 7-е сутки, а затем постепенно уменьшается. Это хорошо видно при большом увеличении микроскопа. При этом перикарионы КП хорошо выделяются на фоне светлого нейропиля со слабой иммунореактивностью (рисунок 9.7).

На 2-е сутки постнатального онтогенеза крысы в формирующемся ВЗС иммунореактивность SYN слабая, в виде мелкой зернистости, не отличающейся от белого вещества. На 7-е сутки, в формирующемся ВЗС, среди зернистых нейронов равномерно располагаются преимущественно мелкие SYN-иммунопозитивные точки, по-видимому, терминали моховидных волокон, являющихся основой для формирования будущих клубочков мозжечка (рисунок 9.7).

На 15-е сутки равномерно среди зернистых клеток определяются иммунопозитивные по SYN мелкие и средние по размеру формирующиеся клубочки мозжечка (рисунок 9.7).

К 45-м суткам число крупных SYN-позитивных клубочков с очень высокой иммунореактивностью возрастает, а мелких – уменьшается (таблица 9.4). При этом общее количество (плотность расположения) клубочков ВЗС не изменяется (таблица 9.3).

Таблица 9.4 – Плотность расположения клубочков мозжечка на 1 мм² внутреннего зернистого слоя мозжечка 15- и 45-суточных крысят, шт.

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

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

В промежуточном ядре мозжечка на вторые сутки после рождения на перикарионах нейронов наблюдались лишь единичные SYN-иммунопозитивные точки – аксосоматические синапсы. Преобладали нейроны с малым количеством аксосоматических синапсов и единичные нейроны с плотно расположенными синапсами. В нейропиле были равномерно расположены многочисленные мелкие аксодендритические синапсы. На 7–45-е сутки вокруг перикарионов некоторых нейронов промежуточного ядра образуются темные ободки из плотно расположенных аксосоматических синапсов (рисунок 9.8). На 7–45-е сутки в нейропиле размеры аксодендритических синапсов увеличиваются, и они начинают располагаться неравномерно, образуя скопления (рисунок 9.8). При этом общая иммунореактивность нейропиля в промежуточном ядре мозжечка в динамике постнатального онтогенеза не меняется (таблица 9.5).

Иммунореактивность SYN в цитоплазме нейронов этого ядра была умеренной, гомогенной и не менялась на 7–45-е сутки после рождения (рисунок 9.8).

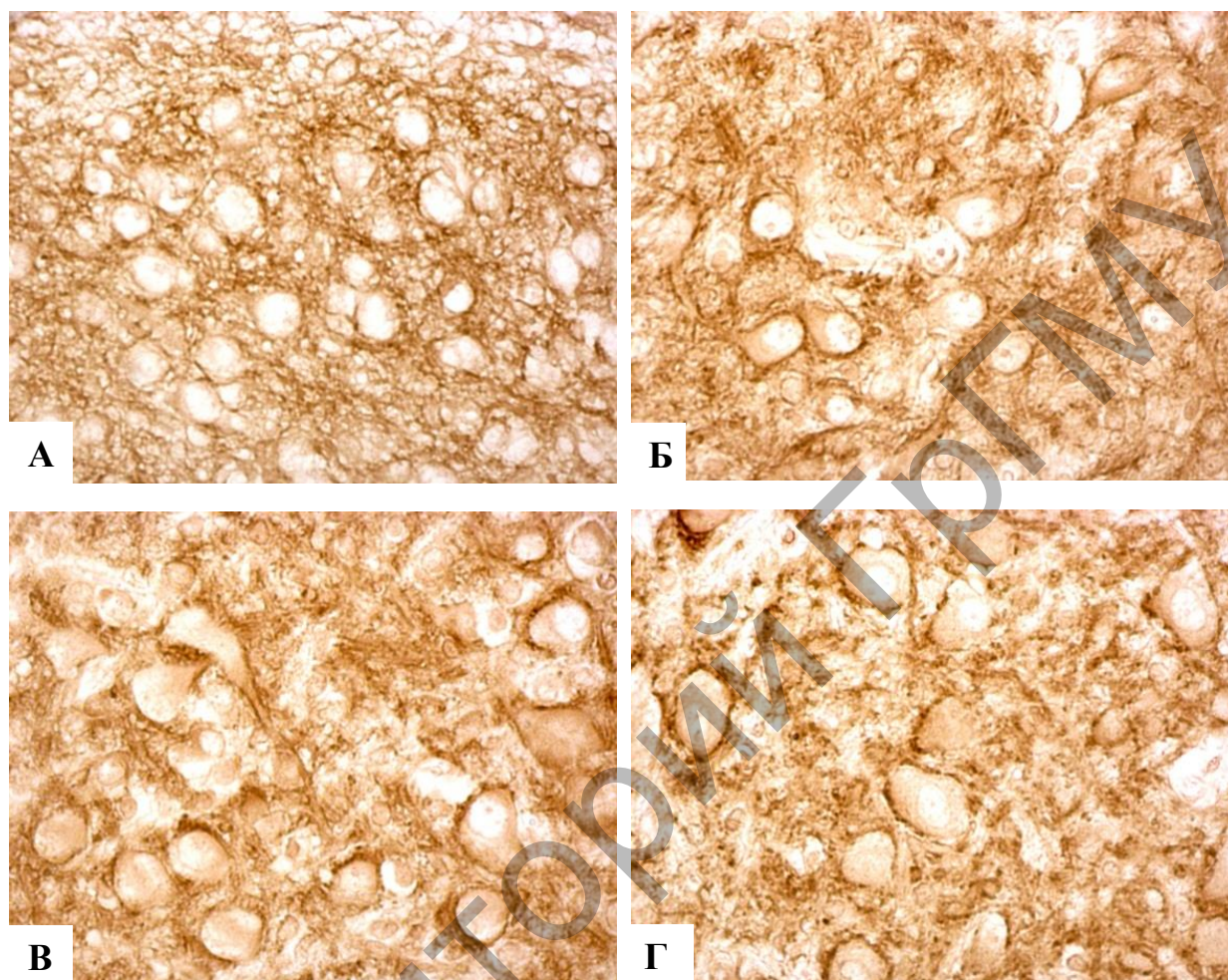


Рисунок 9.8 – Синапсы на телах и дендритах нейронов промежуточного ядра мозжечка на 2-е (А), 7-е (Б), 15-е (В), 45-е (Г) сутки после рождения. Ув. 400

Таблица 9.5 – Экспрессия синаптофизина в нейропиле промежуточного ядра мозжечка крыс в постнатальном онтогенезе (в единицах оптической плотности)

2-е сутки	$0,22 \pm 0,03$
7-е сутки	$0,23 \pm 0,03$
15-е сутки	$0,22 \pm 0,01$
45-е сутки	$0,21 \pm 0,04$

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

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

В нашем исследовании иммунопозитивное окрашивание по SYN было выявлено на вторые сутки постнатального онтогенеза вокруг перикарионов КП и в формирующемся молекулярном слое. В литературе описано, что при электронно-микроскопическом исследовании первые синапсы в молекулярном слое наблюдаются уже на 19-й день эмбрионального развития [West M. J., del Cerro M. et al., 1976]. Возможно, это окончания моховидных волокон на КП, входящих в мозжечок еще до рождения. Контакты с ними являются временными, когда зернистый слой созревает, моховидные волокна вытесняются с КП и устанавливают синапсы с дендритами зернистых нейронов [Rahimi-Balaei M. et al., 2015].

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

Во внутреннем зернистом слое на 2–7-е сутки постнатального онтогенеза мелкозернистая иммунореактивность по SYN, вероятно, обусловлена колбами роста и терминалями моховидных волокон, а на 15–45-е сутки – формирующимися гломерулами мозжечка

[Дьячкова Л. Н., Хамори И., 1967], которые видны в виде более крупных участков высокой иммунореактивности по SYN.

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

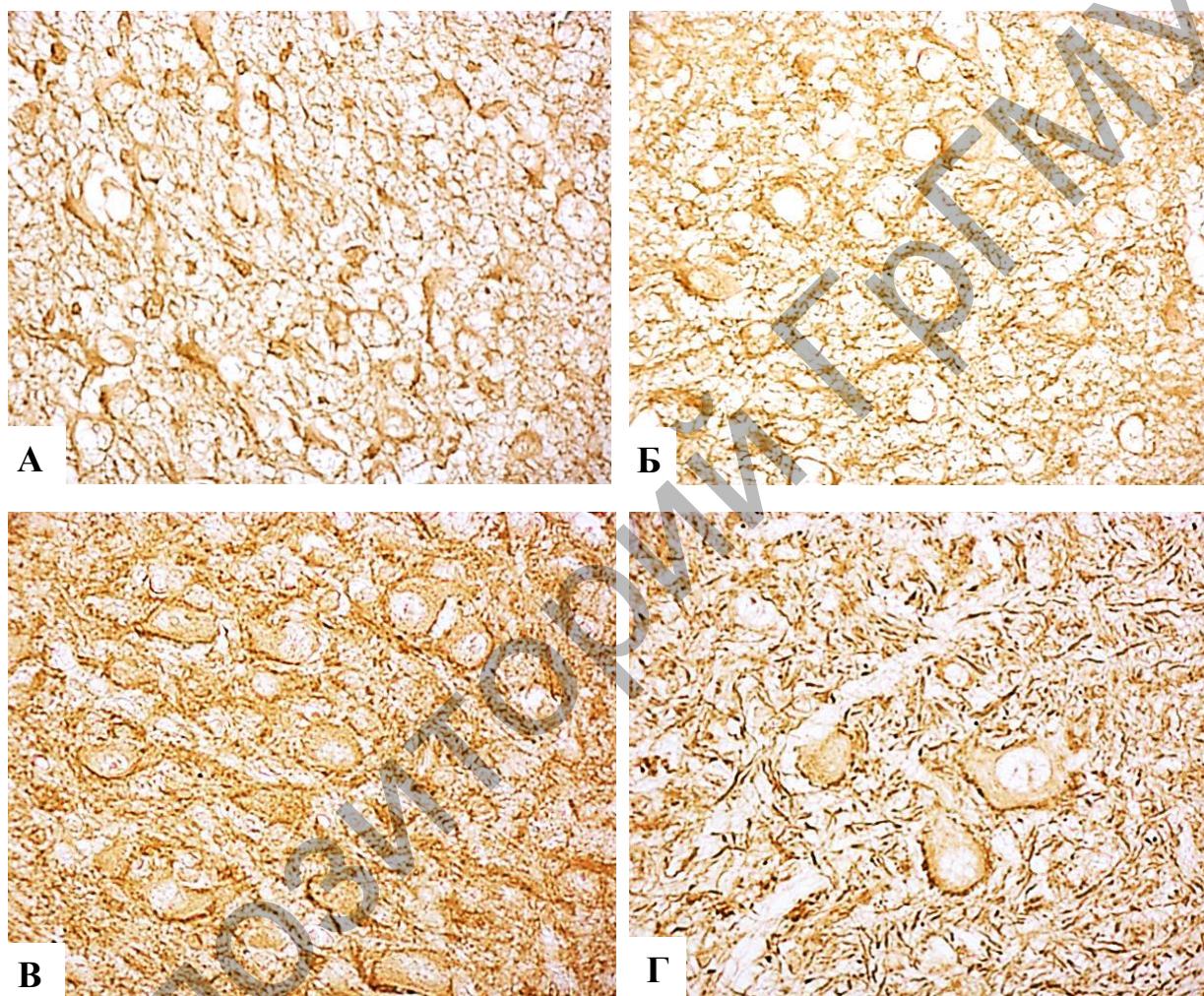
Выявленная иммунореактивность SYN в белом веществе на 2–7-е сутки после рождения, вероятно, обусловлена конусами роста развивающихся афферентных волокон. Известно, что синаптические пузырьки образуются в телах нейронов, транспортируются по растущим аксонам и накапливаются в конусах роста еще до начала синаптогенеза [Fujita M. et al., 1996]. Это объясняет присутствие умеренной иммунореактивности по SYN и в цитоплазме, но не в ядрах перикарионов нейронов мозжечка (клетки Пуркинье, зернистые нейроны, нейроны ядер).

Таким образом, иммуногистохимическое исследование динамики экспрессии синаптофизина является эффективным способом оценки синаптогенеза в мозжечке в раннем постнатальном онтогенезе [Зиматкин С. М., Карнюшко О. А., 2016]. Этот подход может быть использован и при изучении влияния на этот процесс различных экспериментальных воздействий и патологических состояний.

Межнейрональные синапсы также выявляются в динамике постнатального развития и при иммуногистохимической реакции на *кальбиндин*. Это для коры мозжечка подробно описано в главе 3.

На вторые сутки после рождения в цитоплазме нейронов промежуточного ядра выявляется низкая иммунореактивность

кальбиндина, в ядрах она отсутствует. Межнейрональные синапсы еще не видны. На седьмые сутки в перикарионах нейронов иммунореактивность остается низкой, к 15 и 45-м суткам на их телах и в нейропиле определяются единичные мелкие кальбиндин-иммунореактивные точки (синапсы). При этом цитоплазма этих нейронов умеренно гомогенно иммунопозитивная, а ядра иммунонегативны (рисунок 9.9) [Карнюшко О. А., Зиматкин С. М., 2020].



**Рисунок 9.9 – Иммунореактивность кальбиндина
в промежуточном ядре крыс на 2-е (А), 7-е (Б), 15-е (В)
и 45-е (Г) сутки после рождения**

Иммуногистохимическая реакция на кальбиндин.

Цифровая микрофотография. Ув. 400

Развитие нейропиля в гистаминергических нейронах мозга

В процессе постнатального развития наблюдается уменьшение плотности расположения гистаминергических нейронов, при этом расстояние между телами нейронов с пятых по 90-е сутки после рождения увеличивается (в 5,7 раза, $p=0,0001$), наиболее интенсивно – с пятых по 20-е сутки [Зиматкин С. М. и соавт., 2018].

С пятых по 90-е сутки постнатального развития расстояние между телами нейронов увеличивается в 5,7 раза ($p=0,0001$), с пятых по 10-е сутки – в 2,5 раза ($p=0,0001$), с 10-х по 20-е сутки – в 1,8 раза ($p=0,0002$), с 20-х по 45-е сутки наблюдается лишь тенденция к увеличению расстояния между перикарионами ($p=0,055$), с 45-х по 90-е сутки достоверных изменений не выявлено (рисунок 9.10). С пятых по 90-е сутки постнатального онтогенеза наблюдается двукратное уменьшение плотности расположения гистаминергических нейронов (количества нейронов на единицу площади среза) ($p<0,001$). При сравнении плотности расположения нейронов у пяти- и десяти-суточных, 10- и 20-суточных, 20- и 45-суточных, 45- и 90-суточных крыс достоверных изменений не выявлено (рисунок 9.10).

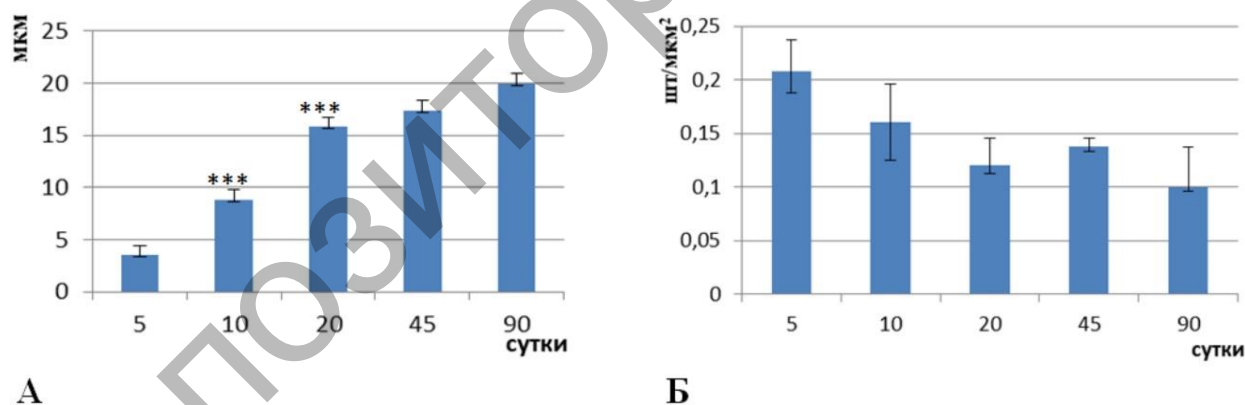


Рисунок 9.10 – Динамика изменений расстояния (А) между перикарионами гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса и плотности расположения гистаминергических нейронов (Б) в постнатальном онтогенезе (Me (LQ; UQ))

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В монографии обобщены наши данные о постнатальном развитии структуры и метаболизма разных типов нейронов головного мозга крысы. Показаны общие закономерности и особенности микроскопических изменений этих нейронов в постнатальном онтогенезе.

Установлено, что в постнатальном онтогенезе происходит появление, рост и исчезновение (к 20 дню) наружного зернистого слоя коры мозжечка, пролиферация в нем предшественников зернистых нейронов (маркер Ki-67), их миграция во внутренний зернистый слой (маркер даблкортин) и дифференцировка (рост экспрессии NeuN). Для других типов нейронов мозга эта пролиферация и миграция предшественников происходит еще до рождения крысы.

Происходит закономерный рост перикарионов, ядер и ядрышек ганглиозных нейронов мозга, перемещение к центру ядра и уменьшение числа ядрышек. В цитоплазме увеличивается число митохондрий и плотности расположения в них крист, активности в них дегидрогеназ и содержания основного фермента синтеза АТФ, АТФ-синтазы, а в цитоплазме меняется активность других дегидрогеназ и возрастает содержание белка нейроглобина, депонирующего и передающего митохондриям кислород. Это свидетельствует о развитии энергетического аппарата нейронов.

Происходит постепенное уменьшение числа свободных рибосом и формирование гранулярной эндоплазматической сети развивающихся нейронов с увеличением длины их цистерн и числа связанных рибосом, формирование комплекса Гольджи, что свидетельствует о формировании синтетического аппарата нейронов и постепенном переключении биосинтеза белка для собственных нужд перикариона на биосинтез белка на экспорт, в терминали.

Выявлено закономерное увеличение в цитоплазме растущих нейронов числа и размеров лизосом и активности их маркерного фермента кислой фосфатазы, свидетельствующих о формировании аппарата переваривания и защиты (для аутофагии).

Происходит увеличение в нейронах экспрессии маркеров их специфического медиаторного метаболизма (глутаматдекарбоксилазы в ГАМК-ергических нейронах и МАОБ в гистаминергических нейронах).

Растет расстояние между нейронами, что свидетельствует о формировании нейропиля (их отростков и синаптических связей). В нейропиле происходит увеличение содержания маркера синаптических пузырьков, синаптофизина, что отражает синаптогенез в разных отделах мозга.

Таким образом, использованные микроскопические методы позволяют визуализировать и документировать основные закономерности постнатального развития нейронов мозга, динамику формирования структур и молекул, обеспечивающих роста и созревание (дифференцировку), основные функции и процессы в развивающихся нейронах мозга. При этом особенно эффективным для постнатального развития нейронов мозга является использованное нами комплексное гистологическое, гистохимическое, иммуногистохимическое и электронно-микроскопическое исследование.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на потомстве беспородных белых крыс на 2, 7, 10, 15, 20, 45 и 90-е сутки после рождения. Для получения потомства самцов и самок животных (с исходной массой 180 ± 20 г) брали из вивария Гродненского государственного медицинского университета.

Все опыты проведены с учетом Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных [Каркищенко Н. Н., 2010], в соответствии с принципами биоэтики и требованиями Директива Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, использующихся для научных целей [Derective, 2010]. На все исследования получены разрешения комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета. Все беременные самки, как и родившееся от них потомство, содержались в стандартных условиях вивария при естественном световом режиме и свободном доступе к воде и пище [Западнюк И. П. и соавт., 1983]. Выбор крыс в качестве экспериментальных животных обусловлен простотой и экономичностью их содержания в условиях вивария [Западнюк И. П. и соавт., 1983], а также сходной организацией мозга крысы и человека [Naas Н., 2003].

Первым днем беременности считался день обнаружения сперматозоидов во влагалищных мазках. Самцов подсаживали к самкам после 18.00 из расчета 1 самец на 3 самки, выявление беременности проводили на следующий день до 9.00. Всех беременных самок, как и родившееся от них потомство, содержали в стандартных условиях вивария при естественном световом режиме и свободном доступе к воде и пище [Западнюк И. П. соавт., 1983].

Для исследования использовали потомство разных возрастных групп: 2–20-суточные (ранний постнатальный период), 45-суточные (пубертатный период) и 90-суточные (половозрелый период) животные [Biran V., 2012]. Для лучшей оценки динамики развития брали

на каждый срок по одному крысенку из каждого помета. Крысят, достигших нужного возраста, выводили из эксперимента в утренние часы декапитацией и забирали кусочки больших полушарий, мозжечка и гипоталамус. Идентификацию структур головного мозга проводили по схемам стереотаксического атласа [Paxinos G., 2007].

В качестве маркерных типов нейронов головного мозга были выбраны внутренние пирамидные нейроны новой (лобной и теменной) коры мозга (холинергические), клетки Пуркинье (ГАМК-ергические) и зернистые нейроны (глутаматергические) коры мозжечка, нейроны ядер мозжечка (преимущественно глутамат- и глицинергические), а также гистаминергические нейроны гипоталамуса. При этом зернистые нейроны являются самыми мелкими и многочисленными нейронами мозга, предшественники которых до 20-го дня постнатального онтогенеза размножаются в наружном зернистом слое, а затем мигрируют во внутренний зернистый слой, в место своего постоянного расположения и функционирования. Остальные – это большие (ганглиозные) нейроны, завершившие миграцию еще в эмбриогенезе и в постнатальном онтогенезе, проходящие только дифференцировку. Было интересно проследить общие закономерности и особенности микроскопических изменений этих типов нейронов в постнатальном онтогенезе, а также выяснить насколько разные методы исследования могут отражать процесс постнатального развития этих нейронов.

Гистологическое исследование. Кусочки лобной и теменной коры мозга, мозжечка и гипоталамуса сразу после забора фиксировали в жидкости Карнуа с последующей стандартной гистологической обработкой в спиртах возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в парафин. С помощью микротомы (Leica RM2125, Германия) изготавливали парафиновые срезы толщиной 5 мкм. Срезы окрашивали гематоксилин – эозином и 0,1 % раствором тионина по методу Ниссля для оценки хроматофилии цитоплазмы и морфометрического исследования. Изучение гистологических препаратов, их микрофотографирование, морфометрию проводили при разных увеличениях 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).

С целью изучения размеров и формы перикарионов КП и нейронов промежуточного ядра измеряли их площадь, фактор формы и фактор элонгации, обводя их изображения курсором на экране монитора компьютера с помощью программы компьютерного анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США).

При окраске по методу Ниссля подсчитывали процент изучаемых типов нейронов с разной хроматофилией цитоплазмы: нормохромные (умеренная интенсивность окраски цитоплазмы), гиперхромные (интенсивная окраска цитоплазмы), гиперхромные сморщенные, гипохромные (со слабой окраской цитоплазмы) и клетки-тени (очень слабое окрашивание) [Калимуллина Л. Б., 2002].

Электронно-микроскопическое исследование. Кусочки теменной и фронтальной коры мозга, коры мозжечка и заднего гипоталамуса сразу после их взятия помещали в 1 % осмиевый фиксатор на буфере Миллонига (pH=7,4) на 2 часа при температуре +4 °C [Millonig G., 1961]. Далее их промывали в смеси буфера Миллонига (20 мл) и сахарозы (900 мг), обезвоживали в 50° и 70° этиловом спирте. Образцы выдерживали 12 часов в 70° этиловом спирте. Затем обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, смеси спирта и ацетона, трех порциях ацетона, проводили через смеси смолы (Araldite M + Araldite M hardener 964 + дибутилфталат + Araldite M accelerator 960) (Sigma-Aldrich) и ацетона, а затем заключали в заливочную смолу в желатиновых капсулах и для полимеризации помещали в термостат при температуре +60 °C на 4 суток. На ультрамикротоме Leica EM UC 7 (Германия) готовили полутонкие срезы толщиной 350 нм и окрашивали метиленовым синим. Препараты просматривали в световом микроскопе с целью уточнения локализации нужного типа клеток. Затем изготавливали ультратонкие срезы толщиной около 35 нм на ультрамикротоме Leica EM UC 7 (Германия), собирали на опорные медные сеточки (Sigma, размер ячейки 300×83), контрастировали уранилацетатом [Watson M. L., 1958] 20 минут под темной крышкой при комнатной температуре, затем промывали в трех порциях бидистиллированной воды по 25 секунд, контрастировали цитратом свинца в течение 8 минут [Reynolds E. S., 1963], промывали в трех порциях бидистиллированной воды по 30 секунд.

Полученные препараты изучали в электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония), фотографировали цифровой камерой Olympus Mega View III (Olympus Soft Imaging Solutions, Германия). Ультраструктурную морфометрию проводили с помощью программы для обработки изображения iTEM (JEOL, Япония). Измеряли площадь перикарионов, ядра, ядрышка, подсчитывали ядерно-цитоплазматическое отношение, оценивали количество, индивидуальную, относительную площадь в цитоплазме, форму митохондрий, лизосом, количество и длину крист на 1 мкм^2 митохондрии, а также ширину цистерн комплекса Гольджи (КГ), длину цистерн гранулярной эндоплазматической сети (ГрЭС), количество связанных рибосом на 1 мкм длины цистерны ГрЭС, количество свободных рибосом на 1 мкм^2 цитоплазмы, количество и размеры лизосом.

Гистохимическое исследование. Для выявления содержания РНП парафиновые срезы мозга окрашивали их галлоцианин-хромовыми квасцами по методу Эйнарсона [Зиматкин С. М. и соавт., 2010].

Для изучения активности ферментов образцы мозга помещали на полоски маркированной фильтровальной бумаги, замораживали и хранили в жидком азоте. В криостате Leica CM 1850 (Leica Microsystems GmbH, Германия) при температуре -14°C готовили срезы соответствующих отделов мозга толщиной 10 мкм , монтировали на предметные стекла и подсушивали на протяжении 1 часа при комнатной температуре. Для изучения окислительного метаболизма нейронов криостатные срезы обрабатывали на выявление активности оксидоредуктаз, связанных с циклом Кребса: сукцинат-дегидрогеназы (СДГ, сукцинат: акцептор – оксидоредуктаза; КФ 1.3.99.1; по Нахласу и соавт., 1957); с гликолизом – лактатдегидрогеназы (ЛДГ, L-лактат: НАД-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.27; по Гесс, Скарпелли, Пирсу, 1958); с транспортом электронов – НАДН-дегидрогеназы (НАДН-ДГ, НАДН: акцептор – оксидоредуктаза; КФ 1.6.99.3; по Нахласу, Уокеру и Зелигману, 1958). Гистаминергические нейроны гипоталамуса окрашивали также на выявление активности моноаминоксидазы типа Б (МАО Б, моноамин: O_2 -оксидоредуктаза (дезаминирующая) типа Б; КФ 1.4.3.4) – ключевого фермента метаболизма гистамина и маркера гистаминергических нейронов мозга [Зиматкин С. М., 1994]. Окрашенные срезы

промывали в дистиллированной воде, далее фиксировали в течение 30 минут в 10 % нейтральном формалине, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в полистирол. Все гистохимические реакции сопровождались бессубстратным контролем [Пирс Э., 1962; Луппа Х., 1980].

Количественную оценку активности СДГ, ЛДГ, НАДН-ДГ и МАО Б проводили, определяя оптическую плотность полученного осадка хромогена в цитоплазме нейронов, на максимуме поглощения окрашенных продуктов реакций. Относительную активность ферментов выражали в единицах оптической плотности.

Иммуногистохимическое исследование. С целью определения дифференцирующихся и зрелых нейронов в развивающемся мозжечке использовались даблкортин (DCX, маркер незрелых нейронов) и нейрональный ядерный белок (NeuN, маркер зрелых нейронов) [Коржевский Д. Э. и соавт., 2014; Коржевский Д. Э. и соавт., 2015]. Образцы мозга фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [Коржевский Д. Э., 2006] при +4 °С (на ночь), затем заключали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью микротомы (LeicaRM 2125 RTS, Германия), монтировали на предметные стекла. Препараты обрабатывали согласно протоколу иммуноцитохимической реакции для световой микроскопии, исключаяющей процедуру теплового демаскирования антигенов.

Для иммуногистохимического выявления *даблкортина* DCX [Коржевский Д. Э., 2011; Коржевский Д. Э. и соавт., 2008] применяли первичные поликлональные кроличьи антитела фирмы Abcam (Великобритания) ab.18723. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit ab.80437 Abcam (Великобритания) [Коржевский Д. Э. и соавт., 2005].

Для иммуногистохимического выявления *NeuN* применяли первичные поликлональные кроличьи антитела фирмы Abcam (Великобритания) – ab.128886 (в разведении 1:400, при температуре +4 °С, 20 часов, во влажной камере). Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit ab.80437 Abcam (Великобритания) [Коржевский Д. Э. и соавт., 2005; Коржевский Д. Э., 2011].

Для определения иммунореактивности молекулярного маркера митохондрий **АТФ-синтазы** (комплекс V, образующий АТФ из АДФ, расположенный на кристах внутренней мембраны митохондрий [Sundvik M., 2012]) применяли первичные моноклональные мышинные антитела Anti-ATP5A antibody фирмы Abcam (Великобритания, ab. 14748) в разведении 1:2400 при температуре +4 °С, экспозиция 20 часов, во влажной камере. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (Великобритания, ab. 80436).

Для иммуногистохимического выявления **нейроглобина** (Ngb), белка, вовлеченного в поддержание газового гомеостаза клетки [Узлова Е. В., 2019], применяли первичные моноклональные мышинные антитела Anti-Ngb antibody фирмы Abcam (Великобритания, ab. 14748) в разведении 1:600 при температуре +4 °С, экспозиция 20 часов, во влажной камере. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (Великобритания, ab. 80436).

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

Для оценки синаптогенеза использовался молекулярный маркер синаптических пузырьков **синаптофизин** (SYN) [Гилерович Е. Г. и соавт., 2014; Колос, Е. А., 2015, Д. Э. Коржевский и соавт., 2015]. Для иммуногистохимического выявления SYN применяли первичные поликлональные кроличьи антитела фирмы Thermo Scientific (США) Synaptophysin Antibody (PA5-27286) (в разведении 1:400). Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор Thermo Scientific (США) Super Picture™ Polymer Detection Kit.

Для иммуногистохимического выявления **МАО Б** – ключевого фермента метаболизма гистамина в мозге и маркера гистаминергических нейронов гипоталамуса – применяли первичные поликлональные кроличьи антитела против МАО Б фирмы Elabscience (cat. No. EPP15673, Китай) в разведении 1:100, при температуре

+4 °C, 20 часов, во влажной камере. Связавшиеся первичные антитела выявляли с помощью набора детекции фирмы Elabscience (cat. No. E-IR-R213, Китай).

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

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

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

Изучение гистохимических и иммуногистохимических препаратов, их микрофотографирование и цитофотометрию проводили при разных увеличениях 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).

Статистическая обработка цифровых данных. В результате морфометрических и цитофотометрических исследований получены количественные непрерывные данные. Их обрабатывали с помощью лицензионной компьютерной программы Statistica 6.0

для Windows (StatSoft, Inc., США, серийный номер 31415926535897) с применением описательной статистики. В описательной статистике для каждого показателя определяли значения медианы (Me) и интерквартильного диапазона (IQR) [Лакин Г. Ф., 1990; Реброва О. Ю., 2003]. Так как в эксперименте нами использовались малые выборки, которые не всегда имели нормальное распределение, анализ проводили методами непараметрической статистики [Батин Н. В., 2008]. Объекты исследования набирали в группы независимо друг от друга, поэтому сравнение групп по одному признаку проводили с помощью критерия Манна–Уитни для независимых выборок (Mann–Whitney U-test) [Реброва О. Ю., 2003]. Различия между группами считали статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5 % ($p < 0,05$).

ЛИТЕРАТУРА

Аппель, Б. И. Нуклеиновые кислоты: от А до Я / Б. И. Аппель. – М. : Бином. Лаб. знаний, 2013. – 413 с.

Батин, Н. В. Компьютерный статистический анализ данных : учеб.-метод. пособие / Н. В. Батин. – Минск : Ин-т подгот. науч. кадров НАН Беларуси, 2008. – 160 с.

Бонь, Е. И. Нарушения синаптогенеза в коре мозга крыс, подвергавшихся антенатальному воздействию алкоголя / Е. И. Бонь, С. М. Зиматкин // Журнал Гродненского медицинского университета. – 2017. – № 15(5). – С. 538–542.

Бонь, Е. И. Динамика гистологических изменений в париетальной коре мозга крыс, подвергавшихся антенатальному воздействию алкоголя / Е. И. Бонь, С. М. Зиматкин // Новости медико-биологических наук. – 2015. – № 2. – С. 146–151.

Бонь, Е. И. Изменения хроматофилии цитоплазмы больших пирамидных нейронов новой коры мозга крысы в постнатальном онтогенезе / Е. И. Бонь, С. М. Зиматкин // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2019. – Т. 18(1). – С. 10–15.

Бонь, Е. И. Инволюция нейронов коры головного мозга потомства крыс, потребляющих алкоголь во время беременности / Е.И. Бонь, С.М. Зиматкин // Весці Нацыянальнай Акадэміі навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2016. – № 1. – С. 59–64.

Бонь, Е. И. Морфологические особенности нейронов коры головного мозга крыс в поздние периоды постнатального развития / Е. И. Бонь, С. М. Зиматкин, Т. Л. Аладьева // Оренбургский медицинский вестник. – 2019. – № 4. – С. 42–45.

Бонь, Е. И. Нарушение развития нейронов фронтальной коры мозга крыс после воздействия алкоголя в антенатальном периоде / Е. И. Бонь, С. М. Зиматкин // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук. – 2015а. – № 3. – С. 125–128.

Бонь, Е. И. Нарушение синаптогенеза в коре мозга крыс, подвергавшихся антенатальному воздействию алкоголя / Е. И. Бонь, С. М. Зиматкин // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2017а. – № 5. – С. 538–543.

Бонь, Е. И. Особенности органеллогенеза в нейронах мозга крыс после пренатальной алкоголизации / Е. И. Бонь, С. М. Зиматкин // Весці

Нацыянальнай Акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук. – 2017. – № 1. – С. 123–128.

Бонь, Е. И. Постнатальный морфогенез внутренних пирамидных нейронов неокортекса крысы / Е. И. Бонь, С. М. Зиматкин // Тюменский медицинский журнал. – 2019. – Т. 21(1). – С. 44–49.

Воронова, Н. В. Анатомия центральной нервной системы : учеб. пособие / Н. В. Воронова, Н. М. Климова, А. М. Менджерицкий. – М. : Аспект Пресс, 2005. – 128 с.

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

Горелов, А. А. Концепции современного естествознания [Электронный ресурс] : учеб. пособие / А. А. Горелов. – 5-е изд., перераб. и доп. – М. : Академия, 2010. – 512 с. – Режим доступа: http://inpo.svf.ru/distant/pluginfile.php/2083/mod_resource/content.1.pdf. – Дата доступа: 17.05.2016.

Гусельникова, В. В. NeuN – нейрональный ядерный антиген и маркер дифференцировки нервных клеток / В. В. Гусельникова, Д. Э. Коржевский // Acta Naturae. – 2015. – Т. 7, № 2 (25). – С. 46–51.

Дмитриева, Н. И. Рост головного и спинного мозга в постнатальном онтогенезе у белых крыс / Н. И. Дмитриева // Развитие головного мозга животных / ред. кол.: И. М. Вавилова [и др.] ; АН СССР, Ибн-т физиологии им. И. П. Павлова. – Л. : Наука, Ленингр. отд-ние, 1969. – С. 132–144.

Дмитриева, Н. И. О периодах развития структур головного мозга в онтогенезе крысы / Н. И. Дмитриева // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. – 1981. – Т. 17, № 3. – С. 287–293.

Дубровинская, Н. В. Психофизиология ребенка: Психофизиологические основы детской психологии / Н. В. Дубровинская, Д. А. Фарбер, М. М. Безруких. – Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений. – М.: Гуманит. изд. центр ВЛАДОС, 2000. – 144 с.

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

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

Ещенко, Н. Д. Биохимия психических и нервных болезней. Избранные разделы : учеб. пособие / Н. Д. Ещенко. – СПб. : Из-во С.-Петерб. гос. ун-та, 2004. – 198 с.

Заерко, А. В. Динамика гистологических изменений гистаминергических нейронов гипоталамуса крысы в постнатальном онтогенезе / А. В. Заерко, Е. М. Федина, С. М. Зиматкин // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2020. – Т. 65 (4). – С. 489–496.

Заерко, А. В. Развитие гистаминергических нейронов гипоталамуса крысы в постнатальном онтогенезе / А. В. Заерко, С. М. Зиматкин, Е. М. Федина, А. Э. Конончик // Новости медико-биологических наук. – 2018. – № 4. – С. 69–74

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

Зиматкин, С. М. Мозжечок крысы: строение, функции, онтогенез: монография / С. М. Зиматкин, О. А. Карнюшко. – Гродно: ГрГМУ, 2019. – 132 с.

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

Зиматкин, С. М. Динамика гистологических изменений во фронтальной коре мозга крыс, подвергавшихся антенатальному воздействию алкоголя / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь // Морфология. – 2016. – № 2. – С. 11–15.

Зиматкин, С. М. Закономерности постнатального развития нейронов мозга / С. М. Зиматкин // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2021. – Т. 19 (1). – С. 106–111.

Зиматкин, С. М. Иммунореактивность NEUN, нейроглобина и АТФ-синтазы в развивающихся гистаминергических нейронов гипоталамуса крысы / С. М. Зиматкин, А. В. Заерко, Е. М. Федина // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2020. – Т. 18(4). – С. 389–395.

Зиматкин, С. М. Онтогенез гистаминергической нейронной системы головного мозга / С. М. Зиматкин, Е. М. Федина, А. В. Заерко // Морфология. – 2018. – № 5. – С. 70–77.

Зиматкин, С. М. Онтогенез коры головного мозга крысы / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь // Новости медико-биологических наук. – 2014. – № 4. – С. 238–244.

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

Зиматкин, С. М. Постнатальное развитие ультраструктуры гистаминергических нейронов мозга крыс / С. М. Зиматкин, А. В. Заерко, Е. М. Федина, О. Б. Островская, А. Э. Конончик // Тюменский медицинский журнал. – 2019. – Т. 21(1). – С. 50–54.

Зиматкин, С. М. Постнатальный органеллогенез в гистаминергических нейронах мозга крысы / С. М. Зиматкин, А. В. Заерко, Е. М. Федина // Новости медико-биологических наук. – 2020. – Т. 20 (3). – С. 101–107.

Зиматкин, С. М. Постнатальный органеллогенез в пирамидных нейронах коры большого мозга крыс / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь // Морфология. – 2017. – № 2. – С. 20–23.

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

Зиматкин, С. М. Ядрышки в развивающихся гистаминергических нейронах мозга крысы / С. М. Зиматкин, А. В. Заерко, Е. М. Федина // Морфология. – 2020. – Т. 158 (4–5). – С. 7–13.

Зиматкин, С. М. Гистохимический метод исследования активности моноаминоксидазы А и В в мозге / С. М. Зиматкин, В. Ф. Цыдик // Морфология. – 1994. – Т. 106, № 4–6. – С. 157–161.

Иммуноцитохимическое выявление нейронов головного мозга с помощью селективного маркера NeuN / Д. Э. Коржевский [и др.] // Морфология. – 2005. – Т. 128, № 5. – С. 76–78.

Калимуллина, Л. Б. К вопросу о «темных» и «светлых» клетках / Л. Б. Калимуллина // Морфология. – 2002. – Т. 122, № 4. – С. 75–80.

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.

Карнюшко, О. А. Иммуногистохимическое исследование кальбинина в развивающемся мозжечке крысы / О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2020. – Т. 18 (6). – С. 692–697.

Карнюшко, О. А. Нарушения развития нейронов мозжечка у потомства крыс с холестазом и их коррекция урсодезоксихолевой кислотой / О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // Новости медико-биологических наук. – 2015. – № 4. – С. 185–190.

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

Козлов, В. И. Анатомия нервной системы и органов чувств : учеб. пособие / В. И. Козлов. – М. : Практ. медицина, 2016. – 255 с.

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

Коржевский, Д. Э. Белки, ассоциированные с микротрубочками, как показатели дифференцировки функционального состояния нервных клеток / Д. Э. Коржевский, М. Н. Карпенко, О. В. Кирик // Морфология. – 2011. – Т. 139, № 1. – С. 13–21.

Коржевский, Д. Э. Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрогистологических исследованиях / Д. Э. Коржевский, И. П. Григорьев, В. А. Отеллин // Морфология. – 2006. – Т. 129, № 1. – С. 85–86.

Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И. П. Западнюк [и др.]. – 3-е изд., перераб. и доп. – Киев : Вища шк. Голов. изд-во, 1983. – 382 с.

Лакин, Г. Ф. Биометрия : учеб. пособие для биол. специальностей вузов / Г. Ф. Лакин. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : Высш. шк., 1990. – 352 с.

Луппа, Х. Основы гистохимии / Х. Луппа ; под ред. Н. Т. Райхлина ; пер. с нем. И. Б. Бухвалова, Е. Д. Вальтер. – М. : Мир, 1980. – 343 с.

Мак-Ильвейн, Г. Биохимия и центральная нервная система / Г. Мак-Ильвейн ; пер. с англ.: С. В. Гастевой, Л. Ф. Помазанской, И. Н. Улыбиной. – М. : Изд-во иностр. лит., 1962. – 143 с.

Максимова, Е. В. Онтогенез коры больших полушарий / Е. В. Максимова. – М.: Наука, 1990. – 184 с.

Максимова, Е. В. основные этапы дифференцировки нервных клеток / Е. В. Максимова // Нейроонтогенез. – М.: Наука, 1985. – С. 6–77.

Маркирование дифференцирующихся нервных клеток при изучении развития и патологии головного мозга [Электронный ресурс] / Д. Э. Коржевский [и др.] // Вопросы морфологии XXI века : сб. науч. тр. – СПб. : ДЕАН, 2015. – Вып. 4 : Учение о тканях. Гистогенез и регенерация / под ред. И. А. Одинцовой, С. В. Костюкевича. – С. 34–36. – Режим доступа: <http://biomed.szgmu.ru/morphology/v4/34-36.pdf>. – Дата доступа: 22.02.2017.

Мелик-Мусян, А. Б. Морфологические особенности клеток Лугоу коры мозжечка / А. Б. Мелик-Мусян, В. В. Фанарджян // Морфология. – 2003. – Т. 123, № 2. – С. 42–47.

Методы исследования в гистологии : учеб.-метод. пособие / С. М. Зиматкин [и др.] ; под ред. С. М. Зиматкина. – Гродно : Гродн. гос. мед. ун-т, 2010. – 153 с.

Молекулярная нейроморфология. Нейродегенерация и оценка реакции нервных клеток на повреждение / [Д. Э. Коржевский и др.] ; под ред. Д. Э. Коржевского. – СПб. : СпецЛит, 2015. – 110 с.

Нейроонтогенез / К. П. Будко [и др.]. – М. : Наука, 1985. – 270 с.

Олейник, Т. Л. Морфометрическое изучение клеток Пуркинье мозжечка в постнатальном онтогенезе крыс / Т. Л. Олейник, Р. А. Григорьян // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. – 1998. – Т. 34, № 4. – С. 480–484.

Оленев, С. Н. Развивающийся мозг: клеточные, молекулярные и генетические аспекты нейроэмбриологии / С. Н. Оленев; ред. А. Г. Кнорре. – Л. : Наука, 1978. – 221 с.

Оценка дифференцировки нейронов в эмбриогенезе крысы с использованием иммуноцитохимического выявления даблкортина / Д. Э. Коржевский [и др.] // Морфология. – 2008. – Т. 133, № 4. – С. 7–10.

Пирс, Э. Гистохимия теоретическая и прикладная / Э. Пирс. – М. : Издательство иностранной литературы, 1962. – 962 с.

Попова, Э. Н. Морфология приспособительных изменений нервных структур: монография / Э. Н. Попова, С. К. Лапин, Г. Н. Кривицкая // Москва. Изд. Медицина. – 1976. – С. 62–82.

Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М. : Медиа Сфера, 2003. – 312 с.

Рыжавский, Б. Я. Морфологические особенности мозжечка потомства крыс-самок, подвергавшихся перед беременностью длительному эмоциональному стрессу / Б. Я. Рыжавский, Е. В. Васильева, Т. В. Соколова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. – Т. 135, № 2. – С. 235–238.

Степаненко, А. Ю. Крупные интернейроны зернистого слоя мозжечка / А. Ю. Степаненко // Морфология. – 2009. – Т. 3, № 4. – С. 5–13.

Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии : руководство / Д. Э. Коржевский [и др.] ; под ред. Д. Э. Коржевского. – 2-е изд., испр. и доп. – СПб. : СпецЛит, 2014. – 119 с.

Топорова, С. Н. Изменение тинкториальных свойств клеток Пуркинье мозжечка в онтогенезе крыс / С. Н. Топорова, И. Н. Улыбина // Морфологические основы функциональной эволюции : сб. ст. / АН СССР; ред. Е. М. Крепс. – Л. : Наука, Ленингр. отд-ние, 1978. – С. 101–103.

Узлова, Е. В. Нейроглобин: строение, функции, локализация в мозге в норме и при патологии / Е. В. Узлова, С. М. Зиматкин // Новости мед.-биол. наук. – 2019. – Т. 19, № 1. – С. 91–96.

Фанарджян, В. В. Тормозные механизмы мозжечка. Структурные основы / В. В. Фанарджян // Успехи физиол. наук. – 1992. – Т. 23, № 4. – С. 30–39.

Федина, Е. М. Тельца Кахаля в развивающихся в гистаминергических нейронах мозга крысы / Е. М. Федина, А. В. Заерко, С. М. Зиматкин // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2019. – Т. 18(4). – С. 23–27.

A change in the pattern of activity affects the developmental regression of the Purkinje cell polyinnervation by climbing fibers in the rat cerebellum / Andjus P.R. [et al.] // Neuroscience. 2003. Vol. 121, № 3. P. 563-572.

Altman, J. Development of the brain stem in the rat. IV. Thymidine-radiographic study of the time of origin of neurons in the pontine region / J. Altman, S. A. Bayer // The J. of Comparative Neurology. – 1980. – Vol. 194, № 4. – P. 905–929.

Altman, J. Development of the brain stem in the rat. V. Thymidine-radiographic study of the time of origin of neurons in the midbrain tegmentum / J. Altman, S. A. Bayer // The J. of Comparative Neurology. – 1981. – Vol. 198, № 4. – P. 677–716.

Altman, J. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat / J. Altman, K. Sudarshan // Anim. Behave. – 1975. – Vol. 23, № 4. – P. 896–920.

Altman, J. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. I : The external germinal layer and the transitional molecular layer / J. Altman // J. Comp. Neurol. – 1972. – Vol. 145, № 3. – P. 353–397.

Altman, J. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. V : Spatial organization of Purkinje cell perikarya / J. Altman, A. T. Winfree // J. Comp. Neurol. – 1977. – Vol. 171, № 1. – P. 1–16.

Altman, J. The development of the rat hypothalamus / J. Altman, S. A. Bayer // Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology. – 1986. – Vol. 100. – P. 1–178.

An aberrant cerebellar development in mice lacking matrix metalloproteinase-3 / I. Van Hove [et al.] // Mol. Neurobiol. – 2012. – Vol. 45, № 1. – P. 17–29. doi: 10.1007/s12035-011-8215-z. Epub 2011 Nov 23.

Anderson, B. The volume of the cerebellar molecular layer predicts attention to novelty in rats / B. Anderson // Brain. Res. – 1994. – Vol. 641, № 1. – P. 160–162.

Anelli, R. Enrichment of unipolar brush cell-like neurons in primary rat cerebellar cultures / R. Anelli, E. Mugnani // *Anat. Embryol. (Berl)*. – 2001. – Vol. 203, № 4. – P. 283–292.

Ankyrin-based subcellular gradient of neurofascin, an immunoglobulin family protein, directs GABAergic innervation at purkinje axon initial segment / F. Ango [et al.] // *Cell*. – 2004. – Vol. 119, № 2. – P. 257–272.

Armengol, J. A. Early dendritic development of Purkinje cells in the rat cerebellum. A light and electron microscopic study using axonal tracing in 'in vitro' slices / J. A. Armengol, C. Sotelo // *Brain Res. Dev. Brain Res.* – 1991. – Vol. 64, № 1/2. – P. 95–114.

Asari, M. A. Histomorphometric study on the effect of low dose deltamethrin on the developing cerebellar cortex / M. A. Asari, M. S. Abdullan, Z. I. Ismail // *Turk. J. Med. Sci.* – 2010. – Vol. 40, № 6. – P. 943–948.

Astn2, A novel member of the astrotactin gene family, regulates the trafficking of ASTN1 during glial-guided neuronal migration / P. M. Wilson [et al.] // *J. Neurosci.* – 2010. – Vol. 30, № 25. – P. 8529–8540.

Auvinen, S. Development of histamine-immunoreactive neurons in the rat brain / S. Auvinen, P. Panula // *The J. of Comparative Neurology*. – 1988. – Vol. 276, № 2. – P. 289–303.

Bastianelli E. Distribution of calcium-binding proteins in the cerebellum // *Cerebellum*. – 2003. – V.2, N4. – P. 242–262.

BDNF stimulates migration of cerebellar granule cells / P. R. Borghe-
sani [et al.] // *Development*. – 2002. – Vol. 129, № 6. – P. 1435–1442.

Bergmann glia and the recognition molecule CHL1 organize GABAergic axons and direct innervation of Purkinje cell dendrites / F. Ango [et al.] // *PLoS Biol.* – 2008. – Vol. 6, № 4. – P. 103.

Berridge, C. W. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes / C. W. Berridge, B. D. Waterhouse // *Brain Res. Brain Res. Rev.* – 2003. – Vol. 42, № 1. – P. 33–84.

Berthie, B. Granular layer collaterals of the unipolar brush cell axon display rosette-like excrescences. A Golgi study in the rat cerebellar cortex / B. Berthie, H. Axelrad // *Neurosci. Lett.* – 1994. – Vol. 167, № 1/2. – P. 161–165.

Biran, V. Perinatal cerebellar injury in human and animal models / V. Bi-ran, C. Verney, D. M. Ferriero // *Neurology Research Intern.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–9.

Bourrat, F. Neuronal migration and dendritic maturation of the medial cerebellar nucleus in rat embryos: an HRP in vitro study using cerebellar slabs / F. Bourrat, C. Sotelo // *Brain Res.* – 1986. – Vol. 378, № 1. – P. 69–85.

Brizzee, K. R. Early postnatal changes in neuron packing density and volumetric relationships in the cerebral cortex of the white rats / K. R. Brizzee, J. Vogt, X. Kharechko // *Growth*. – 1959. – V. 23. – P. 337–347.

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

Cajal bodies in neurons / M. Lafarga [et al.] // *RNA Biology*. – 2017. – V.14, N6. – P. 712-725. DOI:10.1080/15476286.2016.1231360.

Calbindin D-28k immunoreactivity in the rat cerebellar cortex: age-related changes / F. Amenta [et. al.] // *Neurosci Lett.* – 1994. – Vol. 178, № 1. – P. 131-134. – doi: 10.1016/0304-3940(94)90307-7.

Calbindin in cerebellar Purkinje cells is a determinant of the precision of motor coordination / J. J. Barski [et. al.] // *J. Neurosci.* – 2003. – Vol. 23, №8. – P. 3469-3477. – doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-08-03469/2003.

Calbindin-D28k immunoreactivity in the human cerebellar cortex / P. Flace [et. al.] // *Anat. Rec. (Hoboken)*. – 2014. – Vol. 297, №7. – P. 1306–1315. – doi: 10.1002/ar. 22921.

Capaldo, E. Cux2 serves as a novel lineage marker of granule cell layer neurons from the rhombic lip in mouse and chick embryos / E. Capaldo, A. Iulianella // *Dev. Dyn.* – 2016. – Vol. 245, № 8. – P. 881–896. doi: 10.1002/dvdy.24418. Epub 2016 Jun 13.

Cerebellar cortical-layer-specific control of neuronal migration by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide / D. B. Cameron [et al.] // *Neuroscience*. – 2007. – Vol. 146, № 2. – P. 697–712.

Cerebellar globular cells receive monoaminergic excitation and monosynaptic inhibition from Purkinje cells / M. Hirono [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, № 1. – :e29663. doi: 10.1371/journal.pone.0029663. Epub 2012 Jan 3.

Cerebellar histogenesis is disturbed in mice lacking cyclin D2 / J. M. Huard [et al.] // *Development*. – 1999. – Vol. 126, № 9. – P. 1927–1935.

Cerebellin: A quantifiable marker for Purkinje cell maturation / J. R. Slemmon [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1985. – Vol. 82, № 20. – P. 7145–7148.

Chen, K. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs / K. Chen, N. Rajewsky // *Nat. Rev. Genet.* – 2007. – Vol. 8 (2). – P. 93–103.

Cholinergic innervation and receptors in the cerebellum / D. Jaarsma [et al.] // *Prog. Brain Res.* – 1997. – № 114. – P. 67–96.

Consalez, G. The compartmental restriction of cerebella interneurons / G. Consalez, R. Hawkes // *Front. Neural. Circuits.* – 2013. – Vol. 123, № 6. – P. 1–14.

Consensus Paper: Cerebellar Development / K. Leto [et al.] // *Cerebellum.* – 2015. – Vol. 15, № 6. – P. 789–828.

Cortical-layer-specific effects of PACAP and tPA on interneuron migration during post-natal development of the cerebellum / E. Raoult [et al.] // *J. Neurochem.* – 2014. – Vol. 130, № 2. – P. 241–254. doi: 10.1111/jnc.12714. Epub 2014 Apr 19.

Dean, I. Serotonin drives a novel GABAergic synaptic current recorded in rat cerebellar Purkinje cells: a Lugaro cell to Purkinje cell synapse / I. Dean, S. J. Robertson, F. A. Edwards // *J. Neurosci.* – 2003. – Vol. 23, №11. – P. 4457–4469.

Development of cerebellar neurons and glia revealed by in utero electroporation: Golgi-like labeling of cerebellar neurons and glia / Y. Kita, K. Kawakami, Y. Takahashi, F. Murakami // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, № 7:e70091, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0070091.

Development of the cerebellar system : in relation to its evolution, structure, and functions / Joseph Altman, Shirley A. Bayer. – Boca Raton : CRC Press, c1997. – 783 p.,

Development of the deep cerebellar nuclei: transcription factors and cell migration from the rhombic lip / A. J. Fink [et al.] // *J. Neurosci.* – 2006. – Vol. 26, № 11. – P. 3066–3076.

Dieudonne, S. Serotonin-driven long-range inhibitory connections in the cerebellar cortex / S. Dieudonne, A. Dumoulin // *J. Neurosci.* – 2000. – Vol. 20, № 5. – P. 1837–1848.

Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes : text with EEA relevance 20.10.2010. – Strasbourg : Official Journal of the European Union, 2010. – 46 p.

Distribution of histaminergic neuronal cluster in the rat and mouse hypothalamus / C. Moriwaki [et al.] // *J. of Chem. Neuroanatomy.* – 2015. – Vol. 68. – P. 1–13.

Dlugos, C. A. Morphometric analyses of Purkinje and granule cells in aging F344 rats / C. A. Dlugos, R. J. Pentney // *Neurobiol. Aging.* – 1994. – Vol. 15, № 4. – P. 435–440.

Dopaminergic and non-dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of the rat project, respectively, to the cerebellar cortex and deep cerebellar nuclei / Y. Ikai [et al.] // *Neuroscience.* – 1992. – № 51. – P. 719–728.

Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes / G. Friocourt [et al. // *Cereb. Cortex.* – 2003. – Vol. 13, № 6. – P. 620–626.

Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons / J.G. Gleeson et al. // *Neuron.* – 1999. – № 23 – P. 257–271.

Dumoulin, A. IPSC kinetics at identified GABAergic and mixed GABAergic and glycinergic synapses onto cerebellar Golgi cells / A. Dumoulin, A. Triller, S. Dieudonné. // *J. Neurosci.* – 2001. – Vol. 21, № 16. – P. 6045–6057.

Eisenman, L. M. Development of the cerebellar cortical efferent projection: an in-vitro anterograde tracing study in rat brain slices / L. M. Eisenman, M. P. Schalekamp, J. Voogd // *Brain Res. Dev. Brain Res.* – 1991. – Vol. 60, № 2. – P. 261–266.

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

Enderlin, S. Ontogeny of the calcium binding protein calbindin D-28k in the rat nervous system / S. Enderlin, A. W. Norman, M. R. Celio // *Anat. Embryol. (Berl.)*. – 1987. – Vol. 177, №1. – P. 15-28. – doi: 10.1007/bf00325286.

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

Expression analysis of the histamine H₃ receptor in developing rat tissues / A. Héron [et al.] // *Mechanisms of Development.* – 2001. – Vol. 105, № 1–2. – P. 167–173.

Expression of histidine decarboxylase and cellular histamine-like immunoreactivity in rat embryogenesis / M. J. Nissinen [et al.] // *The J. of Histochemistry and Cytochemistry : Offic. J. of the Histochemistry Soc.* – 1995. – № 43, № 12. – P. 1241–1252.

Eyre, M. D. Only a minority of the inhibitory inputs to cerebellar Golgi cells originates from local GABAergic cells / M. D. Eyre, Z. Nusser // *eNeuro.* – 2016. – Vol. 3, № 3. – eneuro.0055-16.2016. doi:10.1523/eneuro.0055-16.2016.

Farrant, M. Properties of GABA(A) receptor-mediated transmission at newly formed Golgi-granule cell synapses in the cerebellum / M. Farrant, S. G. Brickley // *Neuropharmacology.* – 2003. – Vol. 44, № 2. – P. 181–189.

Fujita M. Developmental profiles of synaptophysin in granule cells of rat cerebellum: an immunohistochemical study / M. Fujita, T. Kadota, T. Sato // *J Electron. Microsc. (Tokyo)*. 1996. Vol. 45, № 3. P. 185–94.

Garthwaite, J. Glutamate as the principal mossy fibre transmitter in rat cerebellum: pharmacological evidence / J. Garthwaite, A. R. Brodbelt // *Eur. J. Neurosci.* – 1990. – Vol. 2, № 2. – P. 177–180.

Geurts, F. J. Unraveling the cerebellar cortex: cytology and cellular physiology of large-sized interneurons in the granular layer / F. J. Geurts, E. De Schutter, S. Dieudonné // *Cerebellum*. – 2003. – Vol. 2, № 4. – P. 290–299.

Globus, A. Synaptic loci on visual cortical neurons of the rabbit: the specific afferent radiation / A. Globus, A. Scheibel // *Exp. Neurol.* – 1967. – V. 18. – P. 116–120.

Goodlett, C. R. Regional differences in the timing of dendritic outgrowth of Purkinje cells in the vermal cerebellum demonstrated by MAP2 immunocytochemistry / C. R. Goodlett, K. M. Hamre, J. R. West // *Brain Res. Dev. Res.* – 1990. – Vol. 53, № 1. – P. 131–134.

Growth and differentiation factor 10 (Gdf10) is involved in Bergmann glial cell development under Shh regulation / N. Mecklenburg [et al.] // *Glia*. – 2014. – Vol. 62, № 10. – P. 1713–1723. doi: 10.1002/glia.22710.

Haas, H. L. Histamine in the nervous system / H. L. Haas, O. A. Sergeeva, O. Selbach // *Physiol. Rev.* – 2008. – Vol. 88, № 3. – P. 1183–1241.

Haas, H. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system / H. Haas, P. Panula // *Nature Rev. Neuroscience*. – 2003. – Vol. 4, № 2. – P. 121–130.

Habas, C. Functional imaging of the deep cerebellar nuclei: a review / C. Habas // *Cerebellum*. – 2010. – № 1. – P. 22–8. doi: 10.1007/s12311-009-0119-3.

Hajós F., Electron histochemical observation of succinic dehydrogenase activity in various parts of neurons / F. Hajós, S. Kerpel-Fronius // *Experimental Brain Research*. – 1969. – Vol. 8, Is 1. – P. 66–78.

Hamori, J. Differentiation of cerebellar mossy fiber synapses in the rat: a quantitative electron microscope study / J. Hamori, J. Somogyi // *J. Comp. Neurol.* – 1983. – Vol. 220, № 4. – P. 365–377.

Hashimoto, K. Synapse elimination in the developing cerebellum / K. Hashimoto, M. Kano // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2013. – Vol. 70, № 24. – P. 4667–4680.

Heinsen, H. Quantitative anatomical studies on the postnatal development of the cerebellum of the albino rat / H. Heinsen // *Anat. Embryol.* – 1977. – Vol. 151, № 2. – P. 201–218.

Henrique, R. M. Age-related changes in rat cerebellar basket cells: a quantitative study using unbiased stereological methods / R. M. Henrique, E. Rocha, A. F. Reis // *J. Anat.* – 2001. – Vol. 198, № 6. – P. 727–736.

Huber, G. Characterization of a new 120 kDa microtubule-associated protein (MAP) of rat brain / G. Huber, A. Schuler // *Neurosci. Lett.* – 1991. – Vol. 128, № 2. – P. 221–225.

Hull, C. Identification of an inhibitory circuit that regulates cerebellar Golgi cell activity / C. Hull, W.G Regehr // *Neuron.* – 2012 – Vol. 73, № 1. – P.149–158.

In situ detection of H₁-receptor mRNA and absence of apoptosis in the transient histamine system of the embryonic rat brain / A. Kinnunen [et al.] // *The J. of Comparative Neurology.* – 1998. – Vol. 394, № 1. – P. 127–137.

In vitro neurite extension by granule neurons is dependent upon astroglial-derived fibroblast growth factor / M. E. Hatten [et al.] // *Dev. Biol.* – 1988. – Vol. 125, № 2. – P. 280–289.

Jakab, R. L. Quantitative morphology and synaptology of cerebellar glomeruli in the rat / R. L. Jakab, J. Hamori // *Anat. Embryol.* – 1988. – Vol. 179, № 1. – P. 81–88.

Kanichay, R. T. Synaptic and cellular properties of the feed forward inhibitory circuit within the input layer of the cerebellar cortex / R. T. Kanichay, R. A. Silver // *J. Neurosci.* – 2008. – Vol. 28, № 36. – P. 8955–8967.

Kano M., Watanabe M., Cerebellar circuits. In: *Comprehensive Developmental Neuroscience: Neural Circuit Development and Function in the Healthy and Diseased Brain*, volume 3 (eds, Rubenstein JL, Rakic P), 2013. – Elsevier, Amsterdam. – 75–93 p.

Kawabata, I. Electron microscopy of the rat hypothalamic neurosecretory system. II. Nucleolus-like inclusion bodies in the cytoplasm of neurosecretory cells / I. Kawabata // *Arch. Histol. Jpn.* – 1965. – Vol. 26, № 2. – P. 101–113.

Kumada, T. Completion of neuronal migration regulated by loss of Ca²⁺ transients / T. Kumada, H. Komuro // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101, № 22. – P. 8479–8484.

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

Lackey, E. P. Recent advances in understanding the mechanisms of cerebellar granule cell development and function and their contribution to behavior. / E. P. Lackey, D. H. Heck, R. V. Sillitoe // *F1000Research.* – 2018; 7:. doi:10.12688/f1000research.15021.1.

Lainé, J. Extending the cerebellar Lugaro cell class / J. Lainé, H. Axelrad // *Neuroscience.* – 2002. – Vol. 115, № 2. – P. 363–374.

Lainé, J. Lugaro cells target basket and stellate cells in the cerebellar cortex / J. Lainé, H. Axelrad // *Neuroreport*. – 1998. – Vol. 9, № 10. – P. 2399–2403.

Leto, K. The genesis of cerebellar GABAergic neurons: fate potential and specification mechanisms / K. Leto, C. Rolando, F. Rossi // *Front Neuroanat*. – 2012. – Vol. 6, № 6. – 2012. doi:10.3389/fnana.2012.00006.

Machold, R. Genes expressed in Atoh1 neuronal lineages arising from the r1/isthmus rhombic lip / R. Machold, C. Klein, G. Fishell // *Gene Expr. Patterns*. – 2011. – Vol. 11, № 5–6. – P. 349–359. doi: 10.1016/j.gep.2011.03.007. Epub 2011 Apr 2.

McKay, B. E. Physiological and morphological development of the rat cerebellar Purkinje cell / B. E. McKay, R. W. Turner // *J. Physiol*. – 2005. – Vol. 567, № 3. – P. 829–850.

MicroRNA gene expression signatures in the developing neural tube / P. Mukhopadhyay [et al.] // *Birth Defects Res. Part A: Clin. Mol. Teratol*. – 2011. – Vol. 91 (8). – P. 744–762. – DOI: 10.1002/bdra.20819.

MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences / Place R. F. [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA = PNAS USA*. – 2008. – Vol. 105 (5). – P. 1608–1613. – DOI: 10.1073/pnas.0707594105.

Migration, early axonogenesis, and Reelin-dependent layer-forming behavior of early/posterior-born Purkinje cells in the developing mouse lateral cerebellum / T. Miyata [et al.] // *Neural Dev*. – 2010. – № 5. – P. 23. doi: 10.1186/1749-8104-5-23.

Millen, K. J. Cerebellar Development and Disease / K. J. Millen, J. G. Gleeson // *Curr. Opin. Neurobiol*. – 2008. – Vol. 18, № 1. – P. 12–19.

Millonig, G. Advantages of a phosphate buffer for OsO₄ solutions in fixation / G. Millonig // *J. Appl. Physics*. – 1961. – Vol. 32. – P. 1637–1643.

Morales, D. Molecular markers of neuronal progenitors in the embryonic cerebellar anlage / D. Morales, M. E. Hatten // *J. Neurosci*. – 2006. – Vol. 26, № 47. – P. 12226–12236

Morin, F. Postnatal differentiation of unipolar brush cells and mossy fiber-unipolar brush cell synapses in rat cerebellum / F. Morin, M. R. Dino, E. Mugnaini // *Neuroscience*. – 2001. – Vol. 104, № 4. – P. 1127–1139.

Mouse *Zic1* is involved in cerebellar development / J. Aruga [et al.] // *J. Neurosci*. – 1998. – Vol. 18, № 1. – P. 284–293.

Mugnaini, E. Extraordinary synapses of the unipolar brush cell: An electron microscopic study in the rat cerebellum / E. Mugnaini, A. Floris, M. Wright-Goss // *Synapse*. – 1994. – Vol. 16, № 4. – P. 284–311.

Mugnaini, E. The unipolar brush cell: a remarkable neuron finally receiving deserved attention / E. Mugnaini, G. Sekerková, M. Martina // *Brain Res Rev.* – 2011. – Vol. 66, № 1. – P. 220–245.

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

Neuregulin and erbB receptors play a critical role in neuronal migration / C. Rio [et al.] // *Neuron.* – 1997. – Vol. 19, № 1. – P. 39–50.

Neuronal calcium signaling: function and dysfunction / M. Brini [et al.] // *Cell Mol. Life Sci.* – 2014. – Vol. 71, № 15. – P. 2787–2814. – doi: 10.1007/s00018-013-1550-7.

Neuropharmacology of the histaminergic neuron system in the brain and its relationship with behavioral disorders / K. Onodera [et al.] // *Prog. Neurobiol.* – 1994. – Vol. 42. – P. 685–702.

Neurotrophin-3 promotes cerebellar granule cell exit from the EGL / M. L. Doughty [et al.] // *Eur. J. Neurosci.* – 1998. – Vol. 10, № 9. – P. 3007–3011.

Nucleoli numbers and neuronal growth in supraoptic nucleus neurons during postnatal development in the rat / D. Crespo [et al.] // *Brain Research. Developmental Brain Research.* – 1988. – Vol. 44, № 1. – P. 151–155.

Nunzi, M. C. Unipolar brush cell axons form a large system of intrinsic mossy fibers in the postnatal vestibulocerebellum / M. C. Nunzi, E. J. Mugnani // *Comp. Neurol.* – 2000. – Vol. 422, № 1. – P. 55–65.

O'Carroll, D. General principals of miRNA biogenesis and regulation in the brain / D. O'Carroll, A. Schaefer // *Neuropsychopharmacology.* – 2013. – V. 38. – P. 39–54. – DOI: 10.1038/npp.2012.87.

Ontogeny of histamine-immunoreactive neurons in the CNS / P. Panula [et al.] // *Ontogeny of transmitters and peptides in the CNS.* – Amsterdam, 1992. – P. 157–176.

Ontogeny of small RNA in the regulation of mammalian brain development / Hollins S. L. [et al.] // *BMC Genomics.* – 2014. – V. 15. – P. 777–781. – DOI: 10.1186/1471-2164-15-777.

Oostland, M. The role of serotonin in cerebellar development / M. Oostland, J. A. Hooft // *Neuroscience.* – 2013. – № 248. – P. 201–212. – doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.05.029. Epub 2013 May 27.

Optogenetic mapping of cerebellar inhibitory circuitry reveals spatially biased coordination of interneurons via electrical synapses / J. Kim [et al.] // *Cell Rep.* – 2014. – Vol. 7, № 5. – P. 1601–1613.

Owens D. F., Kriegstein A. R. Is there more to GABA than synaptic inhibition? // *Nat Rev Neurosci.* 2002. Vol. 9, № 3. P. 715–727.

Panula, P. Histamine in brain development and tumors / P. Panula, M. Lintunen, K. Karlstedt // *Seminars in Cancer Biology*. – 2002. – Vol. 10, № 1. – P. 11–14.

Parnavelas, J. G. An ultrastructural study of the maturation of neuronal somata in the visual cortex of the rat / J. G. Parnavelas, A. R. Lieberman // *Anatomy and Embryology*. – 1979. – Vol. 157, № 3. – P. 311–328.

Patro, N. Neurotoxicological effects of deltamethrin on the postnatal development of cerebellum of rat / N. Patro // *J. Biosci.* – 1997. – Vol. 22, № 2. – P. 117–130.

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

Postnatal expression of glutamate decarboxylases in developing rat cerebellum / K. F. Greif [et al.] // *Neurochemical Research*. – 1991. – Vol. 16, № 3. – P. 235–242.

Postnatal Migration of Cerebellar Interneurons / L. Galas [et al.] // *Brain Sciences*. – 2017. – Vol. 7, № 6. – P. 62; /doi:10.3390/brainsci7060062

Pouzat, C. Developmental regulation of basket/stellate cells – Purkinje cell synapses in the cerebellum / C. Pouzat, S. Hestrin // *J. Neurosci.* – 1997. – Vol. 17, № 23. – P. 9104–9112.

Pratt, A. J. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine / A. J. Pratt, I. J. MacRae // *J. Biol. Chem.* – 2009. – V. 284 (27). – P. 17897–17901. – DOI: 10.1074/jbc.R900012200.

Proliferation of neuronal progenitor cells and neuronal differentiation in the hypothalamus are enhanced in heat-acclimated rats / K. Matsuzaki [et al.] // *Pflügers Arch. : Europ. J. of Physiology*. – 2009. – Vol. 458, № 4. – P. 661–673.

Purkinje cells directly inhibit granule cells in specialized regions of the cerebellar cortex / C. Guo [et al.] // *Neuron*. – 2016. – Vol. 91, № 6. – P. 1330–1341.

Rakis, P. Polarity of microtubule assemblies during neuronal cell migration / P. Rakis, E. Knyihar-Csillik, E. Csillik // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 1996. – Vol. 93, № 17. – P. 9218–9222.

Regulation of microRNAs and their role in liver development, regeneration and disease / Finch M. L. [et al.] // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2014. – Vol. 24. – P. 56–62. – DOI: 10.1016/j.biocel.2014.04.002.

Reynolds, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy / E. S. Reynolds // *J. Cell Biol.* – 1963. – Vol. 17, № 1 – P. 208–212.

Rosina, A. GAT-1 developmental expression in the rat cerebellar cortex: basket and pinceau formation / A. Rosina, S. Morara, L. Provini // *Neuroreport*. – 1999. – Vol. 10, № 1. – P. 27–32.

Rutter, J. Succinate dehydrogenase – Assembly, regulation and role in human disease / J. Rutter, D. R. Winge, J. D. Schiffman // *Mitochondrion*. – 2010. – Vol. 10, № 4. – P. 393–401.

Saitow, F. Modulatory effects of serotonin on GABAergic synaptic transmission and membrane properties in the deep cerebellar nuclei / F. Saitow, M. Murano, H. Suzuki // *J. Neurophysiol.* – 2009. – Vol. 101, № 3 – P. 1361–1374.

Satomi D. Change of galactolipids and metabolism of fatty acids in the organotypic culture of myelinating mouse brain / D. Satomi, Y. Kishimoto // *Biochem. Biophys. Acta*. – 1981. – Vol. 666 (3). – P. 446–454.

Scotti A.L. Calbindin D28k in the olivocerebellar projection. A light and electron microscope study // *Journal of Anatomy*. – 1995. – V. 187, N 3. – P. 649–659.

Sekerkova, G. Time of origin of unipolar brush cells in the rat cerebellum as observed by prenatal bromodeoxyuridine labeling / G. Sekerkova, E. Ilijic, E. Mugnaini // *Neuroscience*. – 2004. – Vol. 127, № 4. – P. 845–858.

Shiga, T. Spatial and temporal pattern of postnatal proliferation of Bergmann glial cells in rat cerebellum: an autoradiographic study / T. Shiga, M. Ichikawa, Y. A. Hirata // *Anat. Embryol. (Berl)*. – 1983. – Vol. 167, № 2. – P. 203–211.

Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum / P. M. Lewis [et al.] // *Dev. Biol.* – 2004. – Vol. 270, № 2. – P. 393–410.

Spatiotemporal expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in the postnatal developing rat cerebellum / C. Vaillant [et al.] // *J. Neurosci.* – 1999. – Vol. 19, № 12. – P. 4994–5004.

Srividhya R., Zarkovic K., Stroser M., Waeg G., Zarkovic N., Kalaiselvi P. Mitochondrial alterations in aging rat brain: effective role of (-)-epigallocatechin gallate // *Int J Dev Neurosci.* – 2009. – Vol. 27, № 3. – P. 223–231. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2009.01.003. Epub 2009 Jan 20.

Suckow, M. *The Laboratory Rat 2nd Edition*, Editors / M. Suckow, S. Weisbroth, C. Franklin. – Academic Press, 2005 – 928 p.

Sundvik, M. Organization of the histaminergic system in adult zebrafish (*Danio rerio*) brain: neuron number, location and cotransmitters / M. Sundvik, P. Panula // *The J. of Comparative Neurology*. – 2012. – Vol. 520, № 17. – P. 3827–3845.

Swanson, D.J. Experimental Sey mouse chimeras reveal the developmental deficiencies of Pax6-null granule cells in the postnatal cerebellum / D.J. Swanson, D. Goldowitz // *Dev. Biol.* – 2011. – Vol. 351, № 1. – P. 1–12. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.11.018. Epub 2010 Nov 29.

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

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

Target-dependent use of co-released inhibitory transmitters at central synapses / G. P. Dugué [et al.] // *J. Neurosci.* – 2005. – Vol. 25, № 28. – P. 6490–6498.

The cerebellar Golgi cell and spatiotemporal organization of granular layer activity / E. D'Angelo [et al.] // *Front Neural Circuits.* – 2013 – Vol. 93, № 7. – 10.3389.

The opioid system and brain development: effects of methadone on the oligodendrocyte lineage and the early stages of myelination / A. A. Vestal-Laborde [et al.] // *Dev. Neurosci.* – 2014. – Vol. 36 (5). – P. 409–421. – DOI: 10.1159/000365074.

Topography of cerebellar nuclear projections to the brain stem in the rat/ T. M. Teune [et al.] // *Prog. Brain Res.* – 2000. – Vol. 124. – P. 141–172.

Transient biochemical compartmentalization of Purkinje cells during early cerebellar development / M. Wassef [et al.] // *Dev. Biol.* – 1985. – Vol. 111, iss. 1. – P. 129–137, - doi: 10.1016/0012-1606(85)90441-5.

Trivedi, S. miRNA and neurons / S. Trivedi, G. Ramakrishna // *Int. J. Neurosci.* – 2009. – Vol. 119 (11). – P. 1995–2016.

Ugrumov, M. V. Hypothalamic monoaminergic systems in ontogenesis: development and functional significance / M. V. Ugrumov // *The Intern. J. of Developmental Biology.* – 1997 – Vol. 41, № 6. – P. 809–816.

Unipolar brush cell: a potential feed forward excitatory interneuron of the cerebellum / M. R. Dino [et al.] // *Neuroscience.* – 2000. – Vol. 98, № 4. – P. 625–636.

Unipolar brush cells of the cerebellum are produced in the rhombic lip and migrate through developing white matter / C. Englund [et al.] // *J. Neurosci.* – 2006. – Vol. 26, №36. – P. 9184–9195.

Unusual neurofilament composition in cerebellar unipolar brush neurons / J. Harris [et al.] // *J. Neurocytol.* – 1993. – Vol. 22, № 12. – P. 1039–1059.

Uusisaari, M. Functional classification of neurons in the mouse lateral cerebellar nuclei / Uusisaari M, Knöpfel T. // *Cerebellum* (London, England). – 2011. – Vol. 10, № 4. – P. 637–646.

Uusisaari, M. Morphological and electrophysiological properties of GABAergic and non-GABAergic cells in the deep cerebellar nuclei / M. Uusisaari, K. Obata, T. Knöpfel // *J. Neurophysiol.* – 2007. – Vol. 97, № 1.–P. 901–911.

Vollenweider, F. X. Effect of climbing fiber deprivation on release of endogenous aspartate, glutamate, and homocysteate in slices of rat cerebellar hemispheres and vermis / F. X. Vollenweider, M. Cuénod, K. Q. Do // *J. Neurochem.* 1990. – Vol. 54, № 5. – P. 1533–1540.

Watson, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals / M. L. Watson // *J. Biophys. Biochem. Cyt.* – 1958. – Vol. 4. – P. 475–478.

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

Willcutts, M. D. Quantitative in situ hybridization analysis of glutamic acid decarboxylase messenger RNA in developing rat cerebellum / M. D. Willcutts, M. Morrison-Bogorad // *Brain Res Dev Brain Res.* – 1991. – Vol. 63, № 1–2. – P. 253–264.

Williams, M. E. Molecular mechanisms of synaptic specificity in developing neural circuits / M. E. Williams, J. de Wit, A. Ghosh // *Neuron.* – 2010. – Vol. 68, № 1. – P. 9–18. doi: 10.1016/j.neuron.2010.09.007.

Wingate, R. J. The rhombic lip and early cerebellar development / R. J. Wingate // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2001. – Vol. 11, № 1. – P. 82–88.

Yacubova, E. Intrinsic program for migration of cerebellar granule cells in vitro / E. Yacubova, H. Komuro // *J. Neurosci.* – 2002. – Vol. 22, № 14. – P. 5966–5981.

Yan, X. X. Developmental expression of gamma-aminobutyric acid transporters (GAT-1 and GAT-3) in the rat cerebellum: evidence for a transient presence of GAT-1 in Purkinje cells / X.X. Yan, C.E. Ribak // *Brain Res. Dev. Brain Res.* – 1998. – Vol. 111, № 2. – P. 253–269.

Yeung, J. Wls expression in the rhombic lip orchestrates the embryonic development of the mouse cerebellum / J. Yeung, D. Goldowitz // *Neuroscience.* – 2017. – № 354. – P. 30–42. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.04.020. Epub 2017 Apr 24.

Zhang, L. Developmental fates and migratory pathways of dividing progenitors in the postnatal rat cerebellum / L. Zhang, J. E. Goldman // *J. Comp. Neurol.* – 1996. – Vol. 370, № 4. – P. 536–550.

Zhang, N. In search of the identity of the cerebellar climbing fiber transmitter: immunocytochemical studies in rats / N. Zhang, O. P. Ottersen // *Can. J. Neurol. Sci.* – 1993. – Vol. 20, № 3. – P. 36–42.

Zhang, X. Y. Cerebellar fastigial nucleus: from anatomic construction to physiological functions / X. Y. Zhang, J. J. Wang, J. N. Zhu // *Cerebellum & Ataxias*. – 2016. – № 3 – :9. doi:10.1186/s40673-016-0047-1.

Zimatkin, S. M. Expression of Doublecortin and NeuN in Developing Neurons in the Rat Cerebellum / S. M. Zimatkin, O. A. Karnyushko // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2017. – № 2. – C. 122–126.

Zimatkin, S. M. Postnatal Morphogenesis of Purkinje Cell in the Rat Cerebellum / S. M. Zimatkin, O. A. Karnyushko // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2018. – Vol. 48(6). – C. 779–783.

Zimatkin, S. M. Postnatal Organellogenesis in Pyramidal Neurons in the Cerebral Cortex in Rats / S. M. Zimatkin, E. I. Bon // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2018. – Vol. 48 (3). – C. 377–381.

SUMMARY

Zimatkin, S.M.

Patterns of postnatal development of brain neurons
/ S. M. Zimatkin. Grodno, GrSMU, 2026, 176 p.

The monograph summarizes our data on the postnatal development of the structure and metabolism of different types of neurons in the rat brain. The general patterns and features of microscopic changes of these neurons in postnatal ontogenesis are shown. It has been established that in postnatal ontogenesis, the appearance, growth and disappearance (by day 20) of the outer granular layer of the cerebellar cortex, proliferation of granular neuron precursors in it (marker Ki-67), their migration to the inner granular layer (marker doublecortin), and their differentiation there (increased NeuN expression) occur. For other types of brain neurons, this proliferation and migration of precursors occurs even before the rat is born. It shows a regular growth of pericaryons, nuclei, and nucleoli of ganglionic neurons in the brain, a movement to the center of the nucleus, and a decrease in the number of nucleoli. In the cytoplasm, the number of mitochondria and the density of the location of crystals in them increases, the activity of dehydrogenases in them and the content of the main enzyme of ATP synthesis, ATP synthase, in the cytoplasm, the activity of other dehydrogenases changes and the content of the protein neuroglobin increases, depositing and transferring oxygen to the mitochondria. This indicates the development of the energy apparatus of neurons. It shows a gradual decrease in the number of free ribosomes and the formation of a granular endoplasmic reticulum of developing neurons with an increase in the length of their cisterns and the number of connected ribosomes, the formation of the Golgi complex. This indicates the formation of a synthetic neuron apparatus and the gradual transfer of protein biosynthesis for the pericaryon's own needs to protein biosynthesis for export to terminals. A regular increase in the number and size of lysosomes and the activity of their marker enzyme acid phosphatase in the cytoplasm of growing neurons was revealed, indicating the formation of an apparatus for digestion and protection (for autophagy). There is an increase in the expression of markers of their specific mediator metabolism in neurons (glutamate decarboxylase in GABAergic neurons and MAOB in histaminergic neurons).

The distance between neurons is growing, which indicates the formation of a neuropile (their processes and synaptic connections). In the neuropile, there is an increase in the content of a marker of synaptic vesicles, synaptophysin, which reflects synaptogenesis in different parts of the brain [Zimatkin S. M., 2021]. Thus, the microscopic methods used make it possible to visualize and document the basic patterns of postnatal development of brain neurons, the dynamics of the formation of structures and molecules that ensure growth and maturation (differentiation), the main functions and processes in developing brain neurons. At the same time, the complex histological, histochemical, immunohistochemical and electron microscopic examination used by us is particularly effective for the postnatal development of brain neurons.

The book includes 239 references and illustrated by 111 figures and 9 tables.

Научное издание

Зиматкин Сергей Михайлович

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПОСТНАТАЛЬНОГО
РАЗВИТИЯ НЕЙРОНОВ МОЗГА**

Монография

Ответственный за выпуск М. Н. Курбат

Технический редактор М. Я. Милевская
Корректор М. Я. Милевская

Подписано в печать 16.06.2026.
Формат 60х84/16. Бумага офсетная.
Гарнитура Times New Roman. Цифровая печать.
Усл. печ. л. 10,23. Уч.-изд. л. 6,35. Тираж 20 экз. Заказ 16.

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