

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.121879>

Методы функциональной нейрогистологии и их практическое применение

С.М. Зиматкин

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь

АННОТАЦИЯ

Функциональная нейрогистология — область морфологических исследований, использующая микроскопические методы для оценки морфологического обеспечения функций структур мозга, нервной ткани и нервных клеток. К этим методам относятся классические гистологические методы, электронная микроскопия, гистохимия и иммуногистохимия в сочетании с морфометрией. Каждый из методических подходов имеет свои преимущества и недостатки. Выбор методов функциональной нейрогистологии определяется конкретными задачами исследования.

Представлены методические подходы, использованные нами для оценки функционального состояния нейронов мозга в норме и при патологии. Обосновываются преимущества и необходимость применения комплекса микроскопических методов для более полной оценки состояния нейронов.

Ключевые слова: функциональная нейрогистология; морфофункциональные взаимосвязи; морфологический эквивалент функций.

Как цитировать:

Зиматкин С.М. Методы функциональной нейрогистологии и их практическое применение // Морфология. 2022. Т. 160, № 2. С. 111–124.

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.121879>

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.121879>

Methods of functional neurohistology and their practical application

Sergey M. Zimatkin

Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

ABSTRACT

Functional neurohistology is a field of morphological research that uses microscopic methods to assess the morphological support of the functions of brain structures, nerve tissue and nerve cells. These include classical histological methods, electron microscopy, histochemistry and immunohistochemistry in combination with morphometry. Each of the methodological approaches has its advantages and disadvantages. The choice of methods of functional neurohistology is determined by the specific objectives of the study.

The review describes the methodological approaches used by us to assess the functional state of brain neurons in normal and pathological conditions. The advantages and necessity of using a complex of microscopic methods for a more complete assessment of the state of neurons are substantiated.

Keywords: functional neurohistology; morphofunctional relationships; morphological equivalent of functions.

To cite this article:

Zimatkin SM. Methods of functional neurohistology and their practical application. *Morphology*. 2022;160(2):111–124.

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.121879>

Received: 16.01.2023

Accepted: 15.02.2023

Published: 02.04.2023

ВВЕДЕНИЕ

Современная гистология и цитология всегда рассматривают структуры в связи с выполняемыми ими функциями, с позиции гистофизиологии и цитофизиологии. Во всех отечественных и международных учебниках и атласах по гистологии и цитологии морфофункциональным корреляциям уделяется большое внимание, иногда они выносятся даже в названия книг [1–3]. Однако эти морфофункциональные взаимосвязи не всегда очевидны и нуждаются в анализе, доказательствах и иллюстрациях, поэтому выяснение взаимосвязей между структурой и функцией, а также определение морфологического эквивалента функции остаётся важной проблемой морфологии. Это в полной мере относится и к оценке морфофункционального состояния структур нервной системы в норме и при патологии, которой занимается функциональная нейрогистология в качестве области или направления морфологических исследований (табл. 1) [4–17]).

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

С помощью классических гистологических методов в сочетании с морфометрией на светооптическом уровне можно оценить размер скоплений нейронов (ядер) и толщину слоёв коры мозга и мозжечка, плотность расположения нейронов в срезах этих структур, а также размер нервных клеток, их ядер и ядрышек, соотношение между ними.

Для этого образцы мозга, как обычно, фиксируют и заключают в парафин, срезы толщиной 5 мкм окрашивают по методу Ниссля или гематоксилином и эозином. Размеры скоплений нейронов, толщину коры, размеры и форму тел нейронов, их ядер и ядрышек измеряют с помощью окуляр-микрометра, но точнее

и быстрее это можно сделать с помощью встроенных в исследовательский микроскоп цифровых видеокамер и компьютерных программ анализа изображений. Мы использовали видеокамеру Leica DFC 320 (Leica Microsystems GmbH, Германия) и программу компьютерного анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США). Контуры структур обводят курсором на экране монитора компьютера.

Для нормального функционирования мозга и его отделов необходимы определённые их размеры и количество нейронов. Размеры перикарионов, ядер и ядрышек, их соотношение и форма отражают функциональное состояние нейронов, их способность выполнять свои функции. Характер и интенсивность хроматофилии цитоплазмы нейронов при окраске по методу Ниссля (процент нормохромных, гиперхромных, гиперхромных сморщенных, гипохромных нейронов и клеток-теней) также косвенно отражают морфофункциональное состояние нейронов, особенно в условиях патологии (рис. 1). Проиллюстрируем возможности этого подхода на нескольких примерах.

Нейроны центров голода и жажды в условиях пищевой и питьевой мотиваций

Известно, что в условиях голода и жажды происходит возбуждение, нарастание электроимпульсной активности нейронов центров голода и жажды соответственно в латеральном гипоталамусе. При моделировании пищевой и питьевой мотивации у крыс путём лишения их пищи или воды в течение 1–3 дней в гистологических срезах соответствующих областей латерального гипоталамуса обнаружено нарастание размеров тел нейронов, их ядер и особенно ядрышек [4, 5]. Это является морфологическим признаком нарастающего возбуждения, повышения функциональной активности этих нейронов.

Таблица 1. Используемые методы функциональной нейрогистологии

Table 1. Used methods of functional neurohistology

Методы	Взятие образцов и их фиксация	Дальнейшая обработка образцов	Изготовление срезов	Окраска	Изучение препаратов
Гистологические, световая микроскопия	Фиксация в формалине, жидкости Карнуа и др.	Заключение в парафин	Парафиновые срезы	По методу Ниссля и др.	Световая микроскопия, морфометрия [4–12]
Трансмиссионная электронная микроскопия	Фиксация в глутаровом альдегиде и осмии	Заключение в эпоксидные смолы	Тонкие и ультратонкие срезы	Контрастирование	Электронная микроскопия, морфометрия [6–9, 11–13]
Гистохимия	Замораживание в жидком азоте	Хранение в жидком азоте	Криостатные срезы	Инкубационные среды и красители	Световая микроскопия, цитофотометрия [6–9, 11–15]
Иммуногистохимия	Фиксация в смеси цинка, этанола, формальдегида	Заключение в парафин	Парафиновые срезы	Обработка антителами, системами детекции	Световая микроскопия, цитофотометрия [6–9, 11, 12, 15–17]

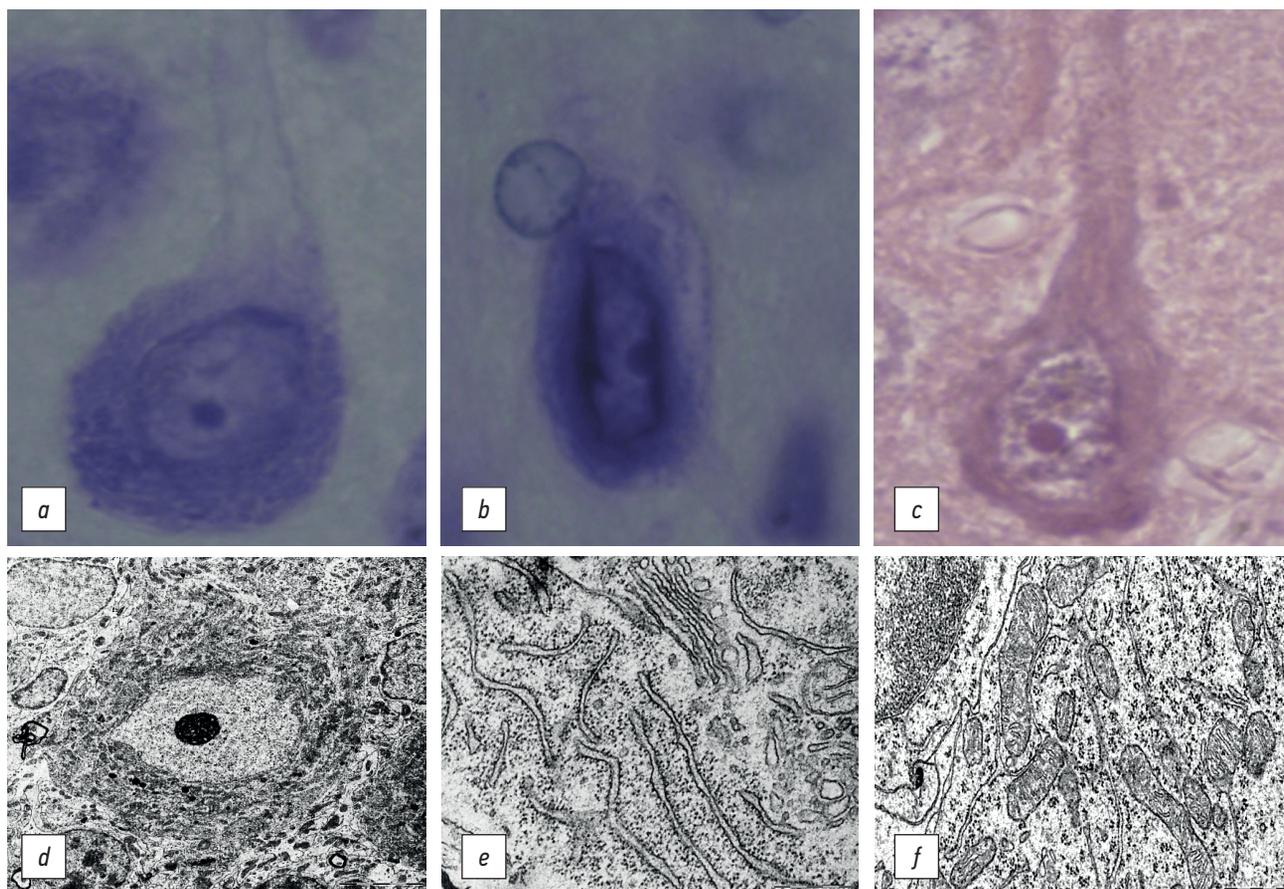


Рис. 1. Нейроны коры головного мозга крысы в норме (*a, d, f*) и при холестазах (*b, c*): *a–c* — световая микроскопия, внутренний пирамидный слой лобной коры (*a, b* — окраска по Нисслю, *c* — окраска гематоксилином и эозином; $\times 1000$); *d–f* — электронная микроскопия, клетки Пуркинье мозжечка (*d* — общий вид, $\times 5000$; *e* — гранулярная эндоплазматическая сеть; *f* — митохондрии и свободные рибосомы, $\times 50\,000$).

Fig. 1. Neurons of the rat brain in normal conditions (*a, d, f*) and with cholestasis (*b, c*): *a–c* — light microscopy, the inner pyramidal layer of the frontal cortex (*a, b* — Nissl staining, *c* — staining with hematoxylin and eosin; $\times 1000$); *d–f* — electron microscopy, Purkinje cells of the cerebellum (*d* — general view, $\times 5000$; *e* — granular endoplasmic reticulum; *f* — mitochondria and free ribosomes, $\times 50\,000$).

Развивающиеся нейроны мозга

Установлено, что в постнатальном онтогенезе происходит прогрессивное увеличение размеров перикарионов нейронов и расстояния между ними, что свидетельствует о прогрессивном росте их тел и отростков, образовании межнейрональных связей. Это хорошо коррелирует с формированием поведенческой активности животных [6, 7].

Гистаминергические нейроны мозга

Целенаправленные изменения функционального состояния гистаминергических нейронов гипоталамуса крыс путём введения предшественника гистамина, гистидина, угнетения синтеза и деградации гистамина, блокады гистаминовых рецепторов, острого и хронического введения алкоголя приводили к их закономерным гистологическим изменениям, отражающим соответствующие функциональные сдвиги этих нейронов [6]. Такой подход может быть эффективным и для установления

морфофункциональных взаимосвязей для других типов нейронов.

Нейроны мозга при холестазах

На 10–20-е сутки холестаза, вызванного перевязкой общего желчного протока, когда биохимические и поведенческие нарушения у животных наибольшие и многие из них погибают, структурные нарушения в нейронах мозга достигают максимума: число гиперхромных, сморщенных нейронов возрастает в 3–6 раз, клеток-теней — в 10–14 раз по сравнению с контролем, наблюдаются сателлитоз и нейронофагия, очаговая гибель нейронов, что свидетельствует о срыве их адаптации к экстремальным нарушениям внутренней среды, вызванным холестазом. Это сопровождается уменьшением общего числа нейронов в разных отделах мозга на 18–27% и увеличением числа клеток нейроглии на 25–49%. При этом перикарионы нейронов и их ядра уменьшаются в размерах и вытягиваются, что соответствует росту числа сморщенных нейронов [8].

ТРАНСМИССИОННАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Демонстративной и убедительной для оценки функционального состояния нервных клеток является качественная и количественная ультраструктурная характеристика нейронов, глиальных клеток и микрососудов мозга. После быстрой стандартной фиксации маленьких образцов мозга в глутаровом альдегиде и осмии их обезвоживают и заливают в эпоксидные смолы, изготавливают и окрашивают полутонкие срезы (для выбора нужного слоя коры или скопления нейронов). Ультратонкие срезы помещают на сеточки и контрастируют солями тяжёлых металлов. Срезы изучают и фотографируют при различных увеличениях трансмиссионного электронного микроскопа (мы использовали JEM-1011 (JEOL, Япония)). Ультраструктурную морфометрию раньше проводили вручную, проецируя изображения с фотопластинок с помощью фотопроектора на разлинованный лист бумаги. Сейчас это делают с помощью цифровых видеокамер и компьютерных программ для обработки изображения (мы использовали iTEV 1011 (JEOL, Япония)) (см. табл. 1).

При этом можно оценить состояние ядерного аппарата нейронов (по размерам и форме ядра, складчатости ядерной оболочки, количеству и размерам ядерных пор, ширине перинуклеарного пространства, плотности хроматина, размерам и положению ядрышек), которое обычно функционально связано с состоянием синтетического аппарата нейронов. Последний хорошо оценивается по строению гладкой и гранулярной эндоплазматической сети, размерам её каналов и цистерн, плотности расположения на её мембранах связанных рибосом, а также по количеству свободных рибосом и строению комплекса Гольджи. При этом число свободных рибосом отражает синтез белка для собственных нужд клетки (перикариона), а длина каналов и цистерн гранулярной эндоплазматической сети (ГрЭС) и число связанных рибосом — биосинтез белка на экспорт, в терминали (см. рис. 1).

Состояние энергетического аппарата нейронов оценивают по количеству, размерам, форме митохондрий, длине и плотности расположения их крист. По количеству и размерам лизосом и фагосом можно оценить процесс аутофагии в нейроне (для удаления его повреждённых мембран и органелл), по количеству и ультраструктуре синапсов — межнейронные связи и их образование в постнатальном онтогенезе (синаптогенез) (см. рис. 1).

Развивающиеся нейроны мозга

В наших опытах в постнатальном онтогенезе в развивающихся нейронах мозга крысы (5–90-е сутки после рождения) формируются основные функциональные аппараты клетки: синтетический, энергетический, переваривания и защиты. Так, в их цитоплазме увеличиваются длина каналов и цистерн гранулярной эндоплазматической сети, а также число

связанных рибосом, формируются гладкая эндоплазматическая сеть и комплекс Гольджи, что в свою очередь отражает формирование синтетического аппарата нейронов. Увеличиваются число и размеры митохондрий, а также плотность расположения в них крист, что свидетельствует о становлении энергетического аппарата нейронов. В развивающихся нейронах увеличиваются число и размеры лизосом, что свидетельствует о возрастании в нейронах процесса аутофагии, необходимой для удаления повреждённых мембран и органелл в растущих нейронах и для развития аппарата переваривания и защиты [6, 7, 9].

Нейроны мозга при холестазах

Установлено, что при холестазах, вызванном перевязкой/перерезкой общего желчного протока у крыс, на ультраструктурном уровне в нейронах наблюдаются признаки компенсаторной активации ядерного аппарата: гипертрофия ядрышек со смещением их к кариолемме и появлением скоплений субъединиц рибосом (в виде «тени, облака»), мигрирующих в цитоплазму; увеличение числа и размеров ядерных пор, складчатости кариолеммы; расширение перинуклеарного пространства. При этом в цитоплазме нейронов разных отделов мозга уменьшается число связанных рибосом (на 40–68%), но увеличивается число свободных рибосом (на 20–47%). Это свидетельствует о перестройке биосинтеза белка и направлении его на собственные нужды перикарионов как проявления адаптации нейронов, способствующей их выживанию в экстремальных условиях. Однако при этом неизбежно страдает биосинтез белка на экспорт, в терминали, что нарушает межнейронные взаимодействия и функции мозга. На пике холестаза в нейронах набухают и разрушаются митохондрии, в них уменьшаются число и длина крист, увеличиваются количество и размеры лизосом. Это свидетельствует о нарушениях функциональных аппаратов нервных клеток [8].

ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

С помощью гистохимических методов в сочетании с цитофотометрией в нервных клетках оценивают активность ферментов (как неспецифических, участвующих, например, в энергетическом обеспечении нейронов, так и специфических, участвующих в синтезе и деградации нейромедиаторов), а также содержание различных веществ (нуклеиновых кислот, белков, углеводов, липидов), связанных с выполнением функций нервных клеток.

Для исследования активности ферментов образцы мозга замораживают и хранят в жидком азоте, с помощью криостата готовят срезы, прикрепляют к предметным или покровным стёклам и помещают в специфический инкубационный раствор, состоящий из буфера, субстрата, кофермента и вещества, которое при взаимодействии с продуктом ферментативной реакции образует нерастворимый окрашенный осадок (рис. 2 *a, b, c*), выявляемый микроскопически в гистохимических препаратах. Содержание

веществ в структурах криостатных или парафиновых срезов выявляют соответствующими красителями. Активность ферментов и содержание веществ в срезах оценивают цитофотометрически по оптической плотности окрашенного продукта гистохимической реакции. Для этого в своих исследованиях мы использовали цитоспектрофотометр МЦФУ-2мп или программу компьютерного анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США) (см. табл. 1).

Возможности количественной гистохимии ферментов мозга проиллюстрируем на примере альдегиддегидрогеназы (АльдДГ) — ключевого фермента, окисляющего альдегиды в мозге. Известно, что биогенные альдегиды являются продуктами метаболизма и высокоактивными

регуляторами функций мозга. Действие этанола в головном мозге опосредуется его первым метаболитом, ацетальдегидом — биологически высокоактивным и токсичным веществом. АльДГ удаляет ацетальдегид, превращая его в менее токсичный метаболит ацетат [18].

Распределение активности альдегиддегидрогеназы в структурах мозга

С помощью разработанного нами гистохимического метода проведено исследование распределения активности АльДГ в 300 микрообластях и типах клеток головного и спинного мозга крысы [19–21]. В результате анализа полученных данных установлены закономерности

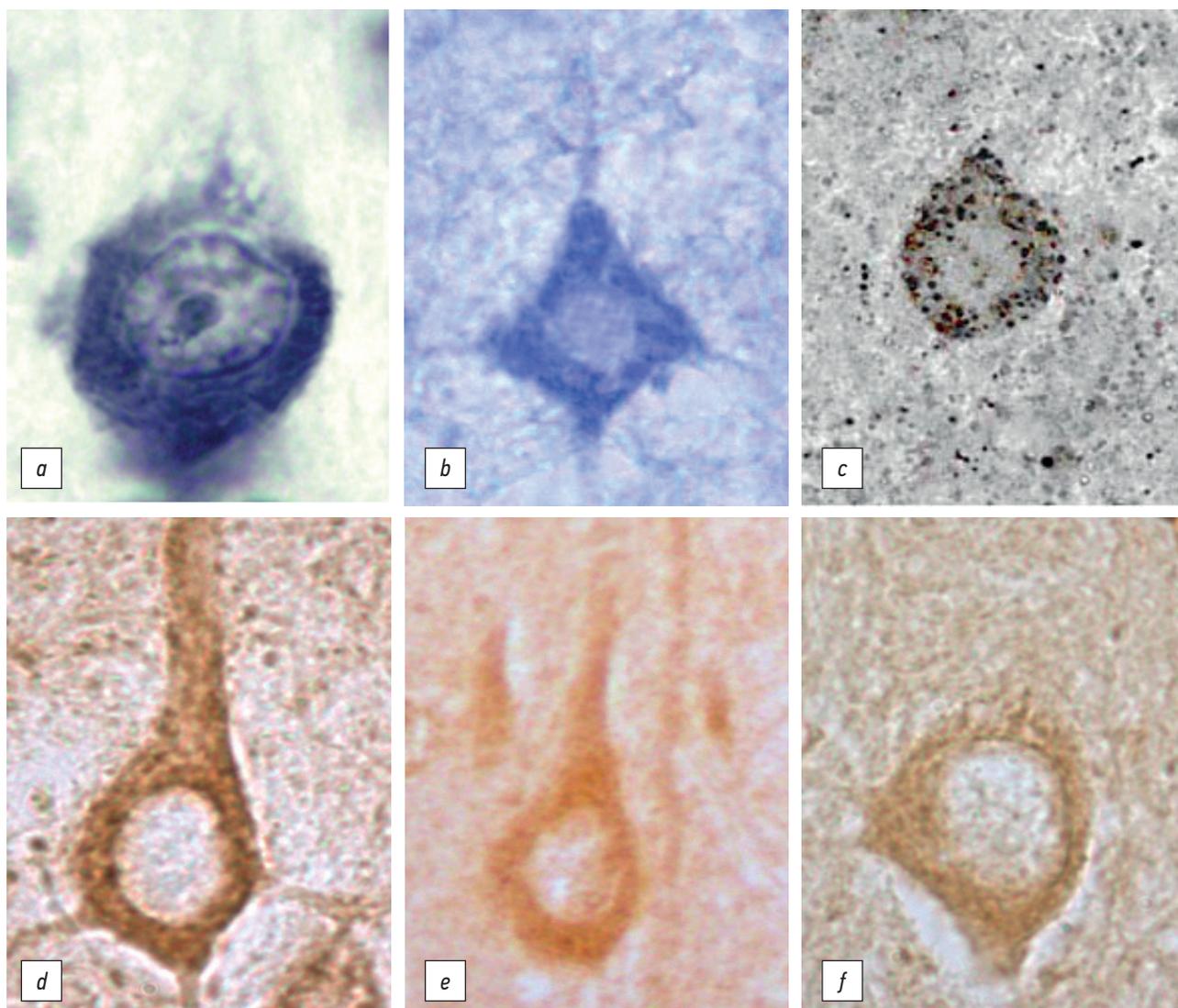


Рис. 2. Нейроны внутренней пирамидной пластинки лобной коры головного мозга крысы в норме: *a–c* — гистохимия (*a* — содержание РНК, окраска по Эйнарсону, *b* — активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, окраска по Гесс, Скарпели, Пирсу, *c* — активность кислой фосфатазы, окраска по Гомори; $\times 1000$); *d–f* — иммуногистохимия, иммунореактивность молекулярных маркёров (*d* — АТФ-синтазы, *e* — нейроглобина, *f* — AMBRA1; $\times 1000$).

Fig. 2. Pyramidal neurons of the internal pyramidal layer (layer V) in normal conditions: *a–c* — histochemistry (*a* — RNA content, Einarson's stain, *b* — activity of g-6-phosphate dehydrogenase, Hess, Skarpeli, Pierce stain, *c* — acid phosphatase activity, coloring according to Gomori; $\times 1000$); *d–f* — immunohistochemistry, immunoreactivity of molecular markers (*d* — ATP synthase, *e* — neuroglobin, *f* — AMBRA1; $\times 1000$).

топографического распределения этого фермента. Интересно, что похожее региональное и клеточное распределение АльДГ обнаружено и в мозге человека [22].

Распределение активности АльДГ пространственно сопряжено с распределением ферментов и метаболитов, связанных с обменом биогенных альдегидов, с дофаминергическими терминалями, моноаминоксидазой, НАДН-дегидрогеназой и областями интенсивного захвата ^{14}C -дезоксиглюкозы, т.е. с зонами повышенного образования биогенных альдегидов различного происхождения, подлежащих дальнейшему окислению [20].

Активность АльДГ указывает на существование нескольких метаболических барьеров для альдегидов: на системном уровне — между кровью и нервной тканью (представлен АльДГ эндотелия кровеносных капилляров и окружающих астроцитов), между кровью и ликвором (АльДГ эндотелиоцитов сосудистых сплетений), ликвором и нервной тканью (АльДГ эндотелиоцитов желудочков мозга); на уровне отдельных микроотделов (двигательные ядра) — между интерстициальной жидкостью и нейронами (АльДГ сателлитных олигодендроцитов) [20].

В физиологических условиях функционирование АльДГ барьерных структур мозга можно рассматривать как механизм, обеспечивающий независимость альдегидных пулов мозга и периферии. В условиях алкоголизации АльДГ, по-видимому, способны защищать мозг от токсических альдегидов, образующихся на периферии при потреблении/введении алкоголя.

Альдегиддегидрогеназы в развивающемся мозге

Гистохимически установлена крайне низкая активность альдегиддегидрогеназы в нейронных и барьерных структурах мозга крысы в эмбриональный и ранний постнатальный периоды развития. Только к 20–40-му дню после рождения она достигает дефинитивного уровня [23]. Это объясняет повышенную чувствительность развивающегося мозга ко всем воздействиям, повышающим образование альдегидов, в том числе к повреждающему действию ацетальдегида, образующегося из потребляемого матерью этанола. Данное явление является одной из причин развития алкогольного синдрома плода [24].

Роль альдегиддегидрогеназы в защите мозга от ацетальдегида

Полученные топографические данные позволяют оценить способность разных микроструктур мозга к окислению ацетальдегида и, соответственно, их потенциально разную чувствительность к этанолу/ацетальдегиду [19, 21]. Такое предположение прямо подтверждено нашими данными о том, что этанол и ацетальдегид на фоне угнетения АльДГ дисульфирамом и особенно цианамидом вызывают более значительное повреждение мозга [25]. Это свидетельствует о важной роли данного фермента в защите мозга от алкогольных (альдегидных) повреждений.

Полученные нами данные указывают на особую опасность для мозга воздействия спиртов и альдегидов на фоне угнетения АльДГ, а также объясняют неблагоприятные последствия для ЦНС сочетанного применения этанола и ингибиторов АльДГ при аверсивной терапии алкоголизма [20].

Связь альдегиддегидрогеназы мозга с врождённой поведенческой устойчивостью и влечением животных к алкоголю

У крыс специальных генетических линий, устойчивых к двигательным нарушениям, вызываемым алкоголем, по сравнению с линейными животными с низкой устойчивостью активность АльДГ значительно выше в нейронах наружного зернистого слоя сенсомоторной коры и латерального гипоталамуса, которые тесно связаны с регуляцией двигательных реакций у животных [26].

У линейных крыс и мышей с высокой врождённой устойчивостью к наркотическому действию алкоголя в клетках Пуркинье мозжечка обнаружена повышенная активность АльДГ, по сравнению с соответствующими линейными животными с низкой устойчивостью к наркотическому действию этанола. Между тем именно эти нейроны участвуют в координации движений и поддержании равновесия, в частности рефлекса переворачивания, по продолжительности отсутствия которого судят о длительности алкогольного наркоза [26].

Таким образом, АльДГ, защищая функционально важные структуры мозга от повреждающего действия альдегидов, обеспечивает, наряду с другими факторами, поведенческую устойчивость (толерантность) животных к алкоголю.

Гистохимически нами обнаружены существенные генетически обусловленные локальные различия в активности АльДГ структур мозга линейных крыс с высоким и низким врождённым влечением к алкоголю [27].

Распределение в структурах мозга активности каталазы

Установлено, что каталаза, маркерный фермент пероксисом, является основным ферментом, окисляющим этанол в мозге до ацетальдегида, который опосредует большинство эффектов этанола [18]. Гистохимическое исследование топографического распределения каталазы выявило её максимальную активность в аминергических нейронах ствола мозга, особенно в телах дофаминергических нейронов, обеспечивающих положительное подкрепляющее действие этанола [28]. Поскольку в этих нейронах происходит максимальное окисление этанола с помощью каталазы и накопление его первого метаболита ацетальдегида, что возбуждает аминергические нейроны и запускает систему положительного подкрепления и влечения к алкоголю, этот механизм признаётся ключевым в патогенезе алкоголизма [18].

Топографическое распределение в мозге активности моноаминоксидазы

Нами разработан гистохимический метод дифференцированного исследования активности изоферментов моноаминоксидазы (МАО) — МАО-А и МАО-Б — в головном мозге [14], которые обеспечивают окислительное дезаминирование биогенных аминов — важнейших нейромедиаторов мозга. Установлено, что МАО-А и МАО-Б в мозге крысы имеют множественную локализацию и закономерное топографическое распределение. Так, адреналин- и норадреналинергические нейроны характеризуются высокой активностью МАО-А, серотонин- и гистаминергические — МАО-Б. МАО-Б располагается в эпендимоцитах, выстилающих желудочки мозга, в эндотелии кровеносных капилляров и астроцитах; отмечена активность обоих изоферментов с преобладанием МАО-Б.

Выявление гистаминергических нейронов в мозге

Гистохимический метод на МАО-Б оказался очень удобным для выявления гистаминергических нейронов в криостатных срезах мозга. С его помощью изучена пространственная организация и морфометрическая характеристика этих нейронов [10].

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Иммуногистохимические методы позволяют выявлять маркёры определённых неспецифических и специфических (нейромаркёры) для нервных клеток структур, клеточных процессов. Они выявляют также специфические белки и пептиды и другие молекулы с антигенными свойствами, против которых удаётся выработать антитела. Для этого образцы мозга фиксируют в 10% нейтральном формалине или смеси его с этанолом и цинком, обезвоживают в спиртах, просветляют в ксилолах и заключают в парафин. После демаскировки антигенов срезы обрабатывают согласно протоколам иммуногистохимических методов для световой микроскопии. Первичные антитела и наборы детекции получают от разных фирм-производителей (мы использовали антитела и наборы производства Abcam, Великобритания и Elabscience, Китай). Подбирают рекомендуемое производителем или подобранное опытным путём разведение антител (мы использовали разведения от 1:50 до 1:2400, выбирая по максимальному соотношению окраски сигнал/шум), выбирают оптимальную температуру и время инкубации (мы инкубировали с первичными антителами при 4 °С во влажной камере в течение 20 ч) (см. табл. 1).

В качестве положительного контроля для каждого из маркёров применяют ткани с известным высоким содержанием исследуемого белка. В качестве отрицательного контроля используют срезы, которые вместо первичных антител обрабатывают нормальной сывороткой (при этом срезы не должны окрашиваться). Дополнительным внутренним отрицательным контролем служат мозговые

оболочки (окраска в них должна отсутствовать). Проиллюстрируем этот подход несколькими примерами из своего опыта (см. рис. 2 *d, e, f*).

Определение нейромедиаторной природы нейронов

В мозге имеются десятки типов нейронов различной нейромедиаторной природы: холинергические, аминергические, ГАМК-ергические, пуринергические и др. При исследовании какой-либо популяции нейронов важно определить их нейромедиаторную природу. Для этого в качестве маркёров чаще используют специфические ферменты синтеза медиатора: например, фермент синтеза ацетилхолина, холинацетилтрансферазу, для выявления холинергических нейронов (только эти нейроны экспрессируют данный белок); фермент синтеза гистамина, гистидиндекарбоксилазу, для выявления гистаминергических нейронов.

В своих исследованиях мы в качестве маркёра ГАМК-ергических нейронов мозжечка использовали фермент синтеза ГАМК, глутаматдекарбоксилазу, а в качестве маркёра гистаминергических нейронов гипоталамуса — фермент деградации гистамина МАО-Б. Экспрессия этих ферментов избирательно возрастала при постнатальном развитии, дифференцировке именно соответствующих типов нейронов [11, 29, 30].

Выявление мигрирующих предшественников нейронов

Образующиеся в эмбриогенезе из нервной трубки нейробласты обычно мигрируют в места постоянной дислокации будущих нейронов в растущем мозге. Эти мигрирующие предшественники нейронов можно определить по белку, стабилизирующему микротрубочки, — даблкортину. Мы успешно использовали данный маркёр для выявления предшественников зернистых нейронов, мигрирующих из наружного во внутренний зернистый слой развивающегося мозжечка [6, 31].

Оценка зрелости нейронов мозга

После завершения миграции предшественников нейронов, по мере их созревания и дифференцировки в них образуются и накапливаются специфические белки и пептиды, например участвующий в сплайсинге NeuN. Этот маркёр зрелых нейронов использовали для оценки созревания зернистых нейронов коры и нейронов ядер мозжечка, а также гистаминергических нейронов гипоталамуса в постнатальный период развития мозга крыс [16, 31].

Оценка энергетического потенциала нейронов

Энергетический аппарат нейронов представлен митохондриями. Именно в них образуется большая часть аденозинтрифосфата (АТФ) клетки, необходимого для функционирования нейронов. Важнейшим

ферментом, образующим АТФ, является АТФ-аза. Этот мультисубъединичный белковый комплекс участвует и в образовании крист внутренней мембраны митохондрий [17], поэтому его содержание в нейронах отражает их энергетическое обеспечение. Данный молекулярный маркер оказался очень удобным для сравнительной оценки энергетического потенциала нейронов разных отделов мозга, для характеристики его становления в развивающихся нейронах мозга и для оценки его нарушений при холестазах и церебральной ишемии [13, 16, 17].

Региональное и клеточное распределение нейроглобина в мозге

Проведено топографическое исследование распределения в мозге нейроглобина — металлопротеина глобинового семейства, способного связывать и переносить кислород, что способствует поддержанию кислородного гомеостаза нервных клеток. Нейроглобин также связывает оксид углерода и активные формы кислорода и азота при ишемии/гипоксии мозга, способствуя предотвращению апоптоза. Показано неравномерное региональное и клеточное распределение нейроглобина в головном и спинном мозге, что может играть роль в резервном снабжении нейронов кислородом и в неодинаковой чувствительности разных структур и типов нейронов мозга к гипоксии/ишемии. Так, обнаружено более высокое содержание нейроглобина в нейронах ствола мозга по сравнению с корой мозга и мозжечка, в филогенетически старых отделах коры мозга по сравнению с неокортексом [32].

Оценка аутофагии

Аутофагия — процесс элиминации в клетках ненужных и повреждённых мембран и органелл, который обеспечивается главным образом лизосомами. Аутофагия естественно усиливается при напряжённой работе нейронов, при неблагоприятных воздействиях и патологических состояниях. Для изучения регуляции этого процесса в нейронах оценивают в них активатор аутофагии AMBRA1. Мы показали возрастание его содержания в нейронах мозга при холестазах [12].

КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ НЕЙРОНОВ

Каждый из описанных выше методических подходов (гистологические методы, электронная микроскопия, гистохимия и иммуногистохимия) имеет свои преимущества и недостатки. Более эффективной и убедительной является комплексная оценка функционального состояния нейронов в норме и при патологии с использованием разных, взаимодополняющих методов. Приведём несколько примеров такого методического подхода.

Функциональная морфология развивающихся нейронов мозга

Удобной моделью для изучения морфологического обеспечения функций нейронов может быть развивающийся мозг. Установлено, что в постнатальном онтогенезе происходит прогрессивное увеличение размеров перикарионов нейронов, их ядер и ядрышек. Увеличивается расстояние между телами нейронов и уменьшается плотность их расположения в срезе, что свидетельствует о прогрессивном росте их отростков, образовании межнейронных связей [6, 7].

При этом в развивающихся нейронах формируются основные функциональные аппараты клетки: синтетический, энергетический, переваривания и защиты. Так, в их цитоплазме увеличивается длина каналов и цистерн гранулярной эндоплазматической сети, число связанных рибосом, формируются гладкая эндоплазматическая сеть и комплекс Гольджи, что отражает формирование синтетического аппарата нейронов. Увеличиваются число и размеры митохондрий и плотность расположения в них крист, что сопровождается возрастанием в цитоплазме активности маркерных ферментов митохондрий (сукцинатдегидрогеназы и НАДН-дегидрогеназы) и содержания маркерного белка крист митохондрий АТФ-синтазы. Это свидетельствует о становлении энергетического аппарата нейронов. В развивающихся нейронах увеличиваются число и размеры лизосом, активность их маркерного фермента, кислой фосфатазы, что свидетельствует о развитии аппарата переваривания и защиты, возрастании в нейронах процесса аутофагии, необходимой для удаления повреждённых мембран и органелл в растущих нейронах [6, 9].

В то же время в постнатальном онтогенезе в нейронах известной нейромедиаторной природы прогрессивно нарастают экспрессия и активность специфических ферментов синтеза и деградации нейромедиаторов, определяемые гистохимическими и иммуногистохимическими методами: например, содержание фермента синтеза ГАМК (глутаматдекарбоксилазы) в развивающихся ГАМК-ергических клетках Пуркиньи мозжечка или активность и содержание фермента деградации гистамина (МАО-Б) в развивающихся гистаминергических нейронах. Это отражает формирование нейромедиаторной системы нейронов. При этом в нейропиле всех типов развивающихся нейронов формируется ультраструктура синапсов и прогрессивно увеличивается содержание маркера синаптических пузырьков, синаптофизина, что отражает формирование межнейронных связей нейронов (синаптогенез) [15, 29].

Морфофункциональные перестройки нейронов мозга при экспериментальном холестазах

У больных желчнокаменной болезнью или при другой патологии, сопровождающейся нарушением оттока желчи, происходит её застой (холестаз), прекращение

поступления желчи в 12-пёрстную кишку и накопление её компонентов в крови. При этом развиваются тяжёлые нарушения функций ЦНС, однако морфологический эквивалент этих нарушений долгое время оставался неизвестным. В связи с этим мы провели экспериментальное исследование изменений в нейронах мозга в динамике холестаза с использованием комплекса гистологических, электронно-микроскопических, гистохимических и иммуногистохимических методов [12]. Обнаружено, что уже на 2-е сутки холестаза в нейронах мозга на 7–21% возрастает содержание белка гена быстрого реагирования *c-fos* и маркёрного белка крист митохондрий — АТФ-синтазы ($p < 0,01$). Однако активность ферментов митохондрий сукцинатдегидрогеназы и НАДН-дегидрогеназы была снижена, что свидетельствует о ранних нарушениях функций митохондрий. Уже в начальный период в цитоплазме нейронов увеличивается содержание белка-активатора аутофагии AMBRA1 и активность маркёрного фермента лизосом — кислой фосфатазы, что указывает на усиление процессов аутофагии для удаления повреждённых мембран и органелл. Снижается и содержание кальций-связывающего белка кальбиндина, что может приводить к перевозбуждению нейронов, а также содержание нейроглобина, что может вызывать нарушение связывания активных форм кислорода и азота в них [12].

На 10–20-е сутки (пик холестаза у крыс) морфофункциональные нарушения в нейронах мозга достигают максимума: число гиперхромных, сморщенных нейронов возрастает в 3–6 раз, а клеток-теней — в 10–14 раз, наблюдаются сателлитоз и нейронофагия, очаговая гибель нейронов, что свидетельствует о срыве их адаптации к экстремальным нарушениям внутренней среды, вызванным холестазом. Это сопровождается уменьшением общего числа нейронов в разных отделах мозга на 18–27% и увеличением числа клеток нейроглии на 25–49%. При этом перикарионы нейронов и их ядра, особенно в 3-м и 5-м слоях теменной коры, уменьшаются в размерах и вытягиваются, что соответствует росту числа сморщенных нейронов. Значительные изменения в нейронах на ультраструктурном уровне в этот период хорошо коррелируют с метаболическими нарушениями в них, выявляемыми гистохимическими и иммуногистохимическими методами. Так набухание митохондрий и разрушение их крист соответствует значительному снижению в цитоплазме нейронов содержания АТФ-синтазы (на 8–25%), активности сукцинатдегидрогеназы (на 21–46%) и НАДН-дегидрогеназы (на 9–43%), а также активности фермента пентозофосфатного пути глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (на 17–52%). Всё это отражает нарушения энергетического обеспечения нейронов. Наблюдаемое повреждение ГрЭС, уменьшение на ней числа связанных рибосом сопровождается снижением содержания РНК в цитоплазме на 16–22%, повреждение комплекса Гольджи отражает нарушения синтетического аппарата нейронов. На 10–20-е сутки

холестаза во всех типах нейронов максимально возрастают содержание белка-активатора аутофагии AMBRA1 (на 40%), число (на 31–50%) и размеры (на 64–69%) лизосом, что сопровождается активацией кислой фосфатазы (на 28–55%). Это свидетельствует об усилении процессов аутофагии в нейронах для удаления повреждённых мембран и органелл [12].

Морфофункциональное состояние нейронов мозга при потере желчи организмом

Известно, что полная потеря желчи организмом вызывает нарастающие нарушения функций ЦНС и смерть крыс на 5–7-е сутки, однако морфологические перестройки в нейронах мозга ранее были совершенно не изучены. Нами установлено, что уже через сутки после начала отведения желчи происходит уменьшение размеров, сморщивание нейронов и угнетение в них окислительных ферментов митохондрий. Через 5 сут потери желчи во всех изученных типах нейронов стереотипно снижается активность сукцинатдегидрогеназы (на 27–53%), НАДН-дегидрогеназы (на 24–51%), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (на 40–58%), содержание РНК (на 32–64%), но возрастает активность лактатдегидрогеназы (на 31–73%) и кислой фосфатазы (на 25–86%). Это свидетельствует о глубоких нарушениях энергетического метаболизма нейронов и усилении аутофагии [12].

При этом ультраструктурные нарушения в нейронах мозга при потере желчи организмом нарастают и характеризуются изменением формы ядер, локальным разрушением кариолеммы, расширением цистерн ГрЭС (на 22–88%), уменьшением количества связанных рибосом (на 40–360%), что свидетельствует о глубоких изменениях белоксинтетического аппарата нейронов. Уменьшаются количество (на 16–46%) и площадь (на 33–53%) митохондрий, их матрикс просветляется, нарастает фрагментация их крист (на 22–41%), что указывает на нарушение энергетического аппарата нейронов. При этом во всех типах нейронов возрастают количество (на 37–70%) и площадь (в 2,4–4,6 раза) лизосом, что свидетельствует о значительном усилении аутофагии для устранения повреждённых мембран и органелл [12]. Выявленные структурные и метаболические изменения в нейронах, вероятно, лежат в основе наблюдаемых нарушений функций мозга и поведения животных.

Морфофункциональные нарушения в нейронах мозга у потомства крыс, потреблявших алкоголь во время беременности

Хорошо известно, что потребление алкоголя во время беременности вызывает у потомства глубокие нарушения функций мозга, входящие в алкогольный синдром плода [33]. Представляло интерес выяснить, какие структурные и метаболические изменения нейронов лежат в основе этих функциональных нарушений.

Установлено, что потребление алкоголя крысами во время беременности вызывает сходные гистологические изменения в коре поясной, лобной и теменной долей больших полушарий головного мозга их потомства. Так, на 10–90-е сутки после рождения у животных выявлено уменьшение толщины коры, снижение в ней плотности расположения нейронов, уменьшение числа нормохромных и увеличение числа патологических форм нейронов (гиперхромные, гиперхромные сморщенные, гипохромные, клетки-тени), уменьшение размеров по сравнению с контрольной группой, остановка роста и прогрессивное сморщивание нейронов коры мозга с 20-го дня постнатального развития [33].

Аntenатальное воздействие алкоголя приводит к значительным качественным и количественным изменениям постнатального развития органелл внутренних пирамидных нейронов фронтальной коры головного мозга крыс по сравнению с контрольной группой. Так, на 20-е и особенно — на 45-е сутки после рождения происходит снижение относительного числа митохондрий, количества и длины их крист, что свидетельствует о нарушении энергетического обеспечения нейронов. Относительное количество свободных рибосом в цитоплазме нейронов коры мозга антенатально алкоголизованных крыс с возрастом не уменьшается, а количество связанных рибосом не нарастает. Это свидетельствует о преобладании биосинтеза белка для собственных нужд перикарионов нейронов в ущерб биосинтезу белка на экспорт, в их отростки и терминали. При этом количество и размеры лизосом увеличиваются, что отражает нарастание процессов аутофагии в нейронах пренатально алкоголизованных крыс [33].

Аntenатальное воздействие алкоголя вызывает изменения окислительного метаболизма нейронов коры головного мозга в постнатальном онтогенезе. На 20-е и 45-е сутки после рождения в их цитоплазме снижена активность маркёрных ферментов митохондрий сукцинатдегидрогеназы и НАДН-дегидрогеназы, что соответствует ультраструктурным нарушениям митохондрий; угнетены глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа и НАДФН-дегидрогеназа, что указывает на торможение пентозофосфатного пути и внемитохондриальных энергетических процессов соответственно. Увеличение активности лактатдегидрогеназы свидетельствует об усилении в нейронах поздних этапов гликолиза. Увеличение активности маркёрного фермента лизосом кислой фосфатазы подтверждает ультраструктурные данные о гиперплазии и гипертрофии этих органелл [33].

Потребление крысами алкоголя во время беременности приводит к замедлению развития пирамидных нейронов коры мозга у их потомства, что проявляется в отставании убыли экспрессии молекулярного маркёра незрелых нейронов даблкортина и отставании нарастания экспрессии маркёра зрелых нейронов NeuN. Иммунореактивность синаптофизина в коре мозга антенатально алкоголизованных крыс значительно снижается, что указывает на замедление в ней синаптогенеза [33]. Эти структурные и метаболические изменения нейронов

мозга могут лежать в основе известных нарушений функций нервной системы у потомства крыс, потреблявших алкоголь во время беременности.

Таким образом, комплексное гистологическое, электронно-микроскопическое, гистохимическое и иммуногистохимическое исследование позволяет буквально увидеть, визуализировать структурные и молекулярные перестройки нейронов мозга, лежащие в основе функционирования структур мозга в норме, в онтогенезе и при различной патологии. В обзоре мы описали только те методы функциональной нейрогистологии, которые использовались в наших собственных экспериментальных исследованиях. Существующий арсенал данных методов гораздо шире и может значительно меняться в зависимости от технических возможностей каждой лаборатории.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Функциональная нейрогистология — область морфологических исследований, использующая гистологические, микроскопические методы для оценки морфологического обеспечения функций мозга, нервной ткани и нервных клеток. Выбор методов функциональной нейрогистологии определяется конкретными задачами исследования. Так, для оценки размеров скоплений нейронов (ядер) и толщины слоёв коры мозга, количества в них нейронов, а также размеров их ядер и ядрышек, соотношения между ними, хроматофилии их цитоплазмы используются классические гистологические методы в сочетании с морфометрией на светооптическом уровне.

Демонстративной и убедительной для оценки функционального состояния нервных клеток является их качественная и количественная ультраструктурная характеристика. При этом можно оценить состояние ядерного аппарата нейронов, которое обычно функционально связано с состоянием их синтетического аппарата. Последний хорошо оценивается по строению гладкой и гранулярной эндоплазматической сети, комплекса Гольджи. При этом число свободных рибосом отражает синтез белка для собственных нужд клетки (перикариона), а длина каналов и цистерн гранулярной эндоплазматической сети и число связанных рибосом — биосинтез белка на экспорт, в терминали. Состояние энергетического аппарата нейронов оценивают по количеству, размерам, форме митохондрий, длине и плотности расположения их крист. По количеству и размерам лизосом и фагосом можно оценить процесс аутофагии в нейроне, по количеству и ультраструктуре синапсов — межнейрональные связи и их образование в постнатальном онтогенезе (синаптогенез).

С помощью гистохимических методов в сочетании с цитофотометрией в нервных клетках оценивают активность ферментов (как неспецифических, участвующих, например, в энергетическом обеспечении нейронов, так и специфических, участвующих в синтезе и деградации нейромедиаторов), а также содержание определённых

веществ (нуклеиновых кислот, белков, углеводов, липидов), связанных с метаболизмом и выполнением функций нервных клеток.

Иммуногистохимические методы позволяют с помощью меченых антител выявлять молекулярные маркёры определённых неспецифических и специфических (нейромаркёры) клеточных структур и процессов, характеризующих принадлежность и функциональное состояние нервных клеток.

Каждый из описанных выше методических подходов имеет свои преимущества и недостатки. Особенно эффективной и убедительной является комплексная оценка функционального состояния нейронов и отделов мозга с использованием разных, взаимодополняющих методов функциональной нейростологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Банин В.В. Цитология. Функциональная ультраструктура клетки. Атлас: учебное пособие. Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2016. 264 с.
2. Cui D., Daley W.P., Fratkin J.D. Atlas of histology: with functional and clinical correlations. Wolters Kluwer/Lippincott Williams Wilkins, 2011. 439 p.
3. Eroshenko V.P. di Filore's atlas of histology: with functional correlations. 12th ed. Philadelphia : Wolters Kluwer/Lippincott Williams Wilkins, 2013. 603 p.
4. Зиматкин С.М. Морфометрия нейроцитов латерального и вентромедиального гипоталамуса при водной депривации и насыщении // Доклады Академии наук Белорусской ССР. 1984. Т. 28, № 9. С. 857–858.
5. Зиматкин С.М., Островский Ю.М. Морфофункциональное состояние нейроцитов пищевых центров гипоталамуса при голодании крыс // Вопросы питания. 1985. № 6. С. 44–46.
6. Зиматкин С.М. Гистаминергические нейроны мозга. Минск : Новое знание, 2015. 319 с.
7. Зиматкин С.М., Карнюшко О.А. Мозжечок крысы: строение, функции, онтогенез: монография. Гродно : Гродненский государственный медицинский университет, 2019. 131 с.
8. Емельяничик С.В., Зиматкин С.М. Мозг при холестазах. Гродно : ГрГУ им. Я. Купалы, 2011. 265 с.
9. Зиматкин С.М., Маслакова Д.А., Бонь Е.И. Строение и развитие коры головного мозга крысы. Гродно : Гродненский государственный медицинский университет, 2019. 156 с.
10. Зиматкин С.М., Кузнецова В.Б., Стрик О.Н. Пространственная организация и морфометрическая характеристика гистаминергических нейронов мозга крысы // Морфология. 2005. Т. 127, № 2. С. 27–30.
11. Зиматкин С.М., Заерко А.В., Федина Е.М. Онтогенез гистаминергических нейронов гипоталамуса. Гродно : Гродненский государственный медицинский университет, 2022. 147 с.
12. Зиматкин С.М., Емельяничик С.В. Нейроны мозга при нарушениях циркуляции желчи. Гродно : Гродненский государственный медицинский университет, 2021. 367 с.
13. Емельяничик С.В., Карнюшко О.А., Зиматкин С.М. Состояние митохондрий в клетках Пуркиньи мозжечка крысы при холестазах // Клиническая и экспериментальная морфология. 2019. Т. 8, № 2. С. 41–47. doi: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-41-47

ДОПОЛНИТЕЛЬНО

Источник финансирования. Автор заявляет об отсутствии внешнего финансирования при проведении поисково-аналитической работы.

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Competing interests. The author declares that he has no competing interests.

14. Зиматкин С.М., Цыдик В.Ф. Гистохимический метод исследования активности моноаминоксидазы А и В в мозге // Морфология. 1994. Т. 106, № 4. С. 157–161.
15. Зиматкин С.М., Заерко А.В. Моноаминоксидаза в развивающихся гистаминергических нейронах мозга крысы // Морфология. 2021. Т. 159, № 1. С. 13–19. doi: 10.17816/1026-3543-2021-159-1-13-19
16. Зиматкин С.М., Заерко А.В., Федина Е.М. Иммунореактивность NeuN, нейроглобина и АТФ-синтазы в развивающихся гистаминергических нейронах гипоталамуса крысы // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2020. Т. 18, № 4. С. 389–395. doi: 10.25298/2221-8785-2020-18-4-389-395
17. Узлова Е.В., Зиматкин С.М. АТФ-синтаза в нейронах мозга крысы // Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2021. № 3. С. 17–27. doi: 10.33581/2521-1722-2021-3-17-27
18. Зиматкин С.М. Окисление алкоголя в мозге. Гродно : Гродненский государственный медицинский университет, 2006. 200 с.
19. Zimatkin S.M. Histochemical study of aldehyde dehydrogenase in rat CNS // J Neurochem. 1991. Vol. 56, N 1. P. 1–11. doi: 10.1111/j.1471-4159.1991.tb02555.x
20. Зиматкин С.М. Альдегиддегидрогеназы мозга и их роль в патогенезе алкоголизма. Гродно : Гродненский государственный медицинский университет, 2008. 308 с.
21. Зиматкин С.М. Активность альдегиддегидрогеназы в нейронных структурах мозга крысы // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. 1989. Т. 96, № 1. С. 35–40.
22. Мотавкин П.А., Охотин В.Е., Коновко О.О., Зиматкин С.М. Локализация алкоголь- и альдегиддегидрогеназы в спинном и головном мозге человека // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. 1988. Т. 94, № 4. С. 32–38.
23. Зиматкин С.М., Лис Р.Е. Активность альдегиддегидрогеназы мозга крысы в онтогенезе // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. 1990. Т. 98, № 5. С. 27–33.
24. Зиматкин С.М., Бонь Е.И. Алкогольный синдром плода // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2014. № 4. С. 5–11.
25. Зиматкин С.М. Структурные изменения в коре мозга крыс, вызываемые алкоголем в сочетании с ингибиторами альдегиддегидрогеназы // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. 1989. Т. 97, № 10. С. 13–20.

26. Zimatkin S.M., Deitrich R.A. Aldehyde dehydrogenase activities in the brains of rats and mice genetically selected for different sensitivity to alcohol // *Alcohol Clin Exp Res.* 1995. Vol. 19, N 5. P. 1300–1306. doi: 10.1111/j.1530-0277.1995.tb01615.x

27. Zimatkin S., Lindros K.O. A histochemical study of the distribution of aldehyde dehydrogenase activity in brain structures of rats with genetically different alcohol-related behavior // *Alcohol.* 1989. Vol. 6, N 4. P. 321–325. doi: 10.1016/0741-8329(89)90090-6

28. Zimatkin S.M., Lindros K.O. Distribution of catalase in rat brain: aminergic neurons as possible targets for ethanol effects // *Alcohol Alcohol.* 1996. Vol. 31, N 2. P. 167–174. doi: 10.1093/oxfordjournals.alcalc.a008128

29. Зиматкин С.М., Карнюшко О.А. Постнатальное развитие ГАМК-ергических нейронов мозжечка крысы // *Морфология.* 2020. Т. 157, № 1. С. 13–17. doi: 10.34922/AE.2020.157.1.002

30. Zimatkin S.M., Zaerko A.V. A method detecting histaminergic neurons in the hypothalamus // *Neurosci Behav Physiol.* 2020. Vol. 50, N 5. P. 655–657. doi: 10.1007/s11055-020-00949-4

31. Zimatkin S.M., Karnyushko O.A. Expression of doublecortin and NeuN in developing neurons in the rat cerebellum // *Neurosci Behav Physiol.* 2017. Vol. 47, N 2. P. 122–126. doi: 10.1007/s11055-016-0374-y

32. Узлова Е.В., Зиматкин С.М. Нейроглобин в нейронах мозга крысы // *Сибирский научный медицинский журнал.* 2021. Т. 41, № 4. С. 30–39. doi: 10.18699/SSMJ2021040

33. Зиматкин С.М., Бонь Е.И. Нарушения в мозге после антенатальной алкоголизации. Гродно: Гродненский государственный медицинский университет, 2017. 192 с.

REFERENCES

1. Banin VV. *Citologija. Funkcional'naja ul'trastruktura kletki. Atlas: uchebnoe posobie.* Moscow: GJeOTAR-Media; 2016. 264 p. (In Russ).

2. Cui D, Daley WP, Fratkin JD. *Atlas of histology: with functional and clinical correlations.* Wolters Kluwer/Lippincott Williams Wilkins; 2011. 439 p.

3. Eroshenko VP. *di Filore's atlas of histology: with functional correlations.* 12th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams Wilkins; 2013. 603 p.

4. Zimatkin SM. Morfometrija nejrocitov lateral'nogo i ventromedial'nogo gipotalamusa pri vodnoj deprivacii i nasysheh-nii. *Doklady Akademii nauk Belorusskoj SSR.* 1984;28(9):857–858. (In Russ).

5. Zimatkin SM, Ostrovskij JuM. Morfofunkcional'noe sostojanie nejrocitov pishhevyh centrov gipotalamusa pri golodanii krysa. *Problems of nutrition.* 1985;(6):44–46. (In Russ).

6. Zimatkin SM. *Histaminergic brain neurons: research monograph.* Minsk: Novoe znanie; 2015. 318 p. (In Russ).

7. Zimatkin SM, Karnyushko OA. *Mozzhechok krysy: stroenie, funkcii, ontogenez.* Grodno: Grodnenskiy gosudarstvennyj medicinskiy universitet; 2019. 131 p. (In Russ).

8. Emel'janichik SV, Zimatkin SM. *Mozg pri holestaze.* Grodno: GrGU im. Ja. Kupaly; 2011. 265 p. (In Russ).

9. Zimatkin SM, Maslakova DA, Bon' El. *Stroenie i razvitie kory golovnogo mozga krysy.* Grodno: Grodnenskiy gosudarstvennyj medicinskiy universitet; 2019. 156 p. (In Russ).

10. Zimatkin SM, Kuznecova VB, Strik ON. Prostranstvennaja organizacija i morfometricheskaja karakteristika gistaminergicheskikh nejronov mozga krysy. *Morphology.* 2005;127(2):27–30. (In Russ).

11. Zimatkin SM, Zaerko AV, Fedina EM. *Ontogenez gistaminergicheskikh nejronov gipotalamusa.* Grodno: Grodnenskiy gosudarstvennyj medicinskiy universitet; 2022. 147 p. (In Russ).

12. Zimatkin S.M., Emel'janichik S.V. *Nejrony mozga pri narushenijah cirkuljacii zhelchi.* Grodno: Grodnenskiy gosudarstvennyj medicinskiy universitet; 2021. 367 p. (In Russ).

13. Emelyanichik SV, Karnyushko OA, Zimatkin SM. The state of mitochondria in cerebellum Purkinje cells of rats with cholestasis. *Clinical and experimental morphology.* 2019;8(2):41–47. (In Russ). doi: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-41-47

14. Zimatkin SM., Cydik VF. Gistohimicheskij metod issledovanija aktivnosti monoaminoksidazy A i B v mozge. *Morfologija.* 1994. T. 106, № 4. S. 157–161. *Morphology.* 1994;106(4):157–161. (In Russ).

15. Zimatkin SM, Zaerko AV. Monoamine oxidase B in developing histaminergic neurons of the rat brain. *Morphology.* 2021;159(1):13–19. (In Russ).

16. Zimatkin SM, Zaerko AV, Phedina EM. Immunoreactivity of NeuN, neuroglobin and ATP synthase in developing histaminergic neurons of rat hypothalamus. *Journal of the Grodno State Medical University.* 2020;18(4):389–395. (In Russ). doi: 10.25298/2221-8785-2020-18-4-389-395

17. Uzlova EV, Zimatkin SM. ATP synthase in rat brain neurons. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2021;(3):17–27. (In Russ). doi: 10.33581/2521-1722-2021-3-17-27

18. Zimatkin SM. *Okislenie alkoholja v mozge.* Grodno: Grodnenskiy gosudarstvennyj medicinskiy universitet; 2006. 200 p. (In Russ).

19. Zimatkin SM. Histochemical study of aldehyde dehydrogenase in rat CNS. *J Neurochem.* 1991;56(1):1–11. doi: 10.1111/j.1471-4159.1991.tb02555.x

20. Zimatkin SM. *Al'degiddegidrogenazy mozga i ih rol' v patogeneze alkoholizma.* Grodno: Grodnenskiy gosudarstvennyj medicinskiy universitet; 2008. 308 p. (In Russ).

21. Zimatkin SM. Aktivnost' al'degiddegidrogenazy v nejronnyh strukturah mozga krysy. *Arhiv anatomii, gistologii i jembriologii.* 1989;96(1):35–40. (In Russ).

22. Motavkin PA, Ohotin VE, Konovko OO, Zimatkin SM. Lokalizacija alkohol'- i al'degiddegidrogenazy v spinnom i golovnom mozge cheloveka. *Arhiv anatomii, gistologii i jembriologii.* 1988;94(4):32–38. (In Russ).

23. Zimatkin SM, Lis RE. Aktivnost' al'degiddegidrogenazy mozga krysy v ontogeneze. *Arhiv anatomii, gistologii i jembriologii.* 1990;98(5):27–33. (In Russ).

24. Zimatkin SM, Bon' El. Fetal alcohol syndrome. *Journal of the Grodno State Medical University.* 2014;4(5–11). (In Russ).

25. Zimatkin SM. Strukturnye izmenenija v kore mozga krysa, vyzyvaemye alkogolem v sochetanii s inhibitorami al'degiddegidrogenazy. *Arhiv anatomii, gistologii i jembriologii.* 1989;97(10):13–20. (In Russ).

26. Zimatkin SM, Deitrich RA. Aldehyde dehydrogenase activities in the brains of rats and mice genetically selected for different sensitivity to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res.* 1995;19(5):1300–1306. doi: 10.1111/j.1530-0277.1995.tb01615.x

27. Zimatkin S, Lindros KO. A histochemical study of the distribution of aldehyde dehydrogenase activity in brain structures of rats with genetically different alcohol-related behavior. *Alcohol.* 1989;6(4):321–325. doi: 10.1016/0741-8329(89)90090-6

28. Zimatkin SM, Lindros KO. Distribution of catalase in rat brain: aminergic neurons as possible targets for ethanol effects. *Alcohol Alcohol.* 1996. 1996;31(2):167–174. doi: 10.1093/oxfordjournals.alcalc.a008128

- 29.** Zimatkin SM, Karniushko OA. Postnatal development of GABA-ergic neurons of the rat cerebellum. *Morphology*. 2020;157(1):13–17. (In Russ). doi: 10.34922/AE.2020.157.1.002
- 30.** Zimatkin SM, Zaerko AV. A method detecting histaminergic neurons in the hypothalamus. *Neurosci Behav Physiol*. 2020;50(5): 655–657. doi: 10.1007/s11055-020-00949-4 2020
- 31.** Zimatkin SM, Karniushko OA. Expression of double-cortin and NeuN in developing neurons in the rat cere-

- bellum. *Neurosci Behav Physiol*. 2017;47(2):122–126. doi: 10.1007/s11055-016-0374-y
- 32.** Uzlova EV, Zimatkin SM. Neuroglobin in rat brain neurons. *The Siberian scientific medical journal*. 2021;41(4):30–39. (In Russ). doi: 10.18699/SSMJ20210404
- 33.** Zimatkin SM, Bon' EI. *Narusheniya v mozge posle antenatal'noj alkogolizacii*. Grodno: Grodnenskiy gosudarstvennyy medicinskiy universitet; 2017. 192 p. (In Russ).

ОБ АВТОРЕ

*** Зиматкин Сергей Михайлович;**

адрес: Республика Беларусь, 230009, Гродно, ул. Горького, д. 80;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5728-2588>;
eLibrary SPIN: 3592-5636;
e-mail: smzimatkin@mail.ru

AUTHOR'S INFO

*** Sergey M. Zimatkin;**

address: 80 Gor'kogo street, 230009 Grodno, Republic of Belarus;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5728-2588>;
eLibrary SPIN: 3592-5636;
e-mail: smzimatkin@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author