

## MORPHOLOGICAL CHANGES AND SERINE RACEMASE EXPRESSION IN RAT HIPPOCAMPUS UNDER COMBINED STRESS CONDITION

A. V. Smirnov<sup>1,3</sup>, N. V. Grigorieva<sup>1</sup>, M. R. Ekova<sup>1</sup>, M. V. Schmidt<sup>1,3</sup>, D. S. Mednikov<sup>1</sup>, I. N. Tyurenkov<sup>2</sup>, D. V. Kurkin<sup>2</sup>, Ye. V. Volotova<sup>2</sup>

Structural changes and serine racemase expression in the ventral hippocampus in response to combined stress were studied in 12- and 24-month-old rats. Four groups of 10 animals each were used: group 1 — control rats aged 12 months; group 2 — control rats aged 24 months; group 3 — rats aged 12 months that underwent 30-minute stress daily during 7 days; group 4 — rats aged 24 months that underwent similar stress. The stress was modeled in a special chamber consisting of 6 isolated compartments of equal volume which allowed combination of different stress-inducing factors (pulsating bright light, noise, vibration).

In experimental animals, the stress resulted in an increase of the proportion of shrunken hyperchromatic neurons in the CA3 area, decreased density of neurons in the ventral hippocampus, as well as pericellular edema, vacuolization of cytoplasm, decreased expression of serine racemase in the neuropil of radial layer of CA1 and CA3. It was concluded that stress produced pronounced changes in pyramidal neurons of CA3 in the ventral hippocampus, combined with reduction of serine racemase expression in the dendrites of radial layers of CA1 and CA3, which is regarded as a sign of disturbance of NMDA-dependent neurotransmission in the hippocampus.

**Key words:** hippocampus, neurons, serine racemase, aging, stress, rat

<sup>1</sup> Department of Pathological Anatomy, <sup>2</sup> Department of Pharmacology and Biopharmaceutics, Faculty for Postgraduate Medical Education, Volgograd State Medical University; <sup>3</sup> laboratory of morphology, immunohistochemistry and carcinogenesis, Volgograd medical scientific center

© Коллектив авторов, 2016  
УДК 611.817.1.018:612.67

*Е. Г. Сухорукова, Е. Г. Гилерович, М. А. Сырцова, А. Д. Новикова, Д. Э. Коржевский*

## РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИПОФУСЦИНА В КОРЕ МОЗЖЕЧКА ЧЕЛОВЕКА

Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (зав. — проф. РАН Д. Э. Коржевский), отдел общей и частной морфологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

Липофусцин является общепризнанным внутриклеточным маркером старения. Цель настоящего исследования состояла в установлении топографических особенностей распределения скоплений гранул липофусцина в коре мозжечка. Пигмент выявляли, используя его свойство автофлуоресцировать, на срезах коры мозжечка у людей (n=25, возраст 20–89 лет) с помощью флуоресцентной микроскопии. Анализ препаратов показал наличие в различных слоях коры мозжечка гранул липофусцина, обладающих преимущественно желто-зеленой автофлуоресценцией. Выявлено, что с возрастом появляется тенденция к увеличению количества этих гранул и их размеров. Обнаружено, что липофусцин накапливается в слоях коры мозжечка неравномерно — заметнее в клетках Пуркинье; при этом с возрастом происходит изменение локализации липофусцина — от перинуклеарного к месту отхождения отростков.

**Ключевые слова:** липофусцин, кора мозжечка, человек, флуоресцентная микроскопия

Мозжечок является центральной структурой головного мозга, ответственной за двигательную активность и когнитивные навыки [12–14]. Известно, что с возрастом происходят нарушения этих важнейших функций, которые сопровождаются гибелью клеток [4, 5, 11], а потому данные о структурных изменениях, происходящих в моз-

жечке при старении, представляют исключительный интерес.

На протяжении многих лет одним из важнейших морфологических признаков старения клеток человека считается накопление в их цитоплазме гранул липофусцина [15]. Этот липо пигмент, впервые описанный Р. Вирховым еще в 1847 г.,

### Сведения об авторах:

Гилерович Елена Георгиевна, Сухорукова Елена Геннадьевна (e-mail: [len48@inbox.ru](mailto:len48@inbox.ru)), Сырцова Марина Александровна, Новикова Анастасия Дмитриевна, Коржевский Дмитрий Эдуардович (e-mail: [dek2@yandex.ru](mailto:dek2@yandex.ru)), лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдел общей и частной морфологии, Институт экспериментальной медицины, 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12

до настоящего времени привлекает внимание многих исследователей, так как сохраняются противоречия в данных о химическом составе, источниках и механизмах его образования, неоднозначны и сведения о роли липофусцина в процессах внутриклеточного обмена. Наличие незначительного числа исследований липофусцина, выполненных на мозжечке человека с помощью современных методических подходов, отсутствие системного анализа как в возрастном аспекте, так и при патологии, обуславливают необходимость проведения дальнейших исследований накопления этого пигмента в нейронах головного мозга человека.

Цель настоящего исследования — установление топографических особенностей распределения скоплений гранул липофусцина в коре мозжечка человека.

Материал и методы. В работе использованы блоки с фрагментами коры мозжечка человека ( $n=25$ , возраст 20–89 лет) из архива лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Института экспериментальной медицины. Причиной смерти были: черепно-мозговая травма различной давности (от 6 сут до 3,5 мес,  $n=13$ ), сердечно-сосудистые заболевания ( $n=6$ ), острая массивная кровопотеря ( $n=4$ ), другие причины ( $n=2$ ). Материал был фиксирован в цинк-этанол-формальдегиде [2], обезвожен и залит в парафин по общепринятой методике. Из полученных блоков готовили срезы толщиной 7 мкм. Для лучшей ориентации в структурах коры мозжечка срезы докрашивали ядерным флюоресцентным красителем 4',6-диамидино-2-фенилиндола дигидрохлоридом (DAPI) в разведении 1:100 из набора SelectFX<sup>®</sup> Nuclear Labeling Kit (Invitrogen, США). Препараты исследовали под микроскопом Leica DM2500, оснащенным системой фильтров флюоресценции от 340 до 560 нм; фотосъемку выполняли с помощью фотокамеры Leica DFC420 (Германия). В комплект блок-системы фильтров входили: возбуждающий фильтр BP=340–380 нм (первый — «А»); возбуждающий фильтр BP=450–490 нм (второй — «I3»); возбуждающий фильтр BP=515–560 нм (третий — «N2,1»). Изображения получали путем совмещения исходных фотографий, снятых при использовании первого («А») и второго («I3») фильтров с подавлением фоновой автофлюоресценции в зеленом диапазоне видимого света. Измерение гранул липофусцина проводили с использованием программы LASEZ (Leica, Германия).

Для подтверждения принадлежности регистрируемой автофлюоресценции липофусцину проводили контрольную окраску суданом черным (Chemapol, Чехия) по Герксгеймеру [3]. Корреляцию между возрастом и количеством липофусцина (выраженном в баллах) определяли с помощью вычисления коэффициента корреляции, используя программы BioStat Professional 2009 (США), различия считали значимыми при  $P<0,05$ .

Результаты исследования. Анализ препаратов, исследованных с применением всех трех фильтров, показал наличие в различных слоях коры мозжечка гранул, обладающих преимущественно желто-зеленой автофлюоресценцией (*рисунки*), размером 0,3–1,7 мкм.

При этом свечение окрашенных DAPI ядер клеток наблюдалось только в сине-фиолетовом диапазоне видимого света. Окраска препаратов суданом черным выявила подавление автофлюоресценции обнаруженных гранул. В срезах головного мозга у людей молодого возраста эти гранулы встречались редко. Они располагались небольшими скоплениями на границе молекулярного слоя и слоя клеток Пуркинье (КП), в периваскулярных клетках около мелких кровеносных сосудов в зернистом слое и белом веществе, в единичных КП в виде мелкогранулярных скоплений в перинуклеарной части цитоплазмы. С возрастом была обнаружена тенденция к увеличению количества этих гранул и их размеров ( $r=0,97$ ,  $P<0,05$ ). Они располагались диффузно в виде многочисленных крупных скоплений в зернистом слое, на границе молекулярного и слоя КП, в белом веществе как периваскулярно, так и между нервными волокнами. Практически во всех КП они заполняли большую часть перинуклеарной цитоплазмы, а также зачастую обнаруживались у мест отхождения отростков. При этом светло-желтая автофлюоресценция пигмента у людей старшего возраста приобретала оранжево-желтую окраску.

Обсуждение полученных данных. Проведение флюоресцентной микроскопии позволило установить, что обнаруженные в различных слоях коры мозжечка гранулы состоят из липофусцина, поскольку они обладают автофлюоресценцией, индуцируемой как ультрафиолетовой, так и коротковолновой частью видимого света. Несмотря на то, что автофлюоресценция регистрируется в большей части видимого диапазона, максимальная флюоресценция отмечается в желто-зеленой части спектра. Ширина спектра эмиссии, а также большая интенсивность излучения в желтой области видимого света подтверждают, что эти гранулы являются липофусцином, а не формалиновым пигментом, меланином или гемосидерином, которые не обладают подобной автофлюоресценцией [7]. Результаты окраски суданом черным показали, что автофлюоресценция после окраски подавляется. Этот факт свидетельствует о липофильности выявляемого пигмента, которая свойственна именно липофусцину.

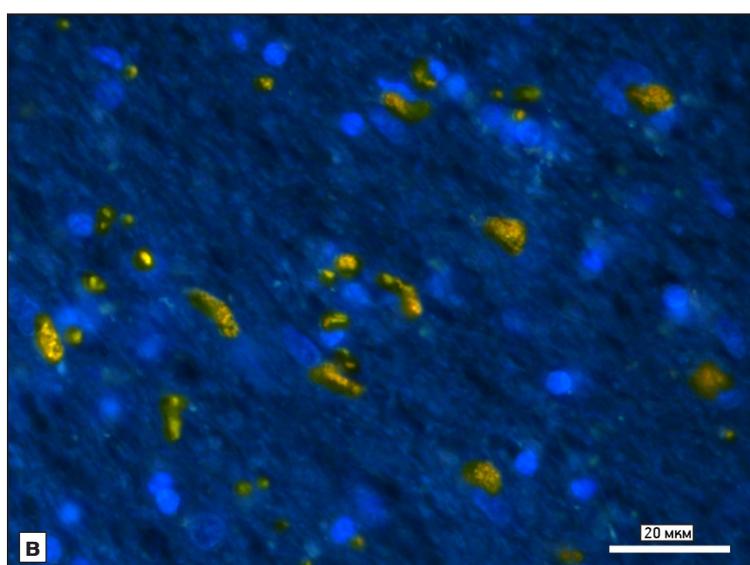
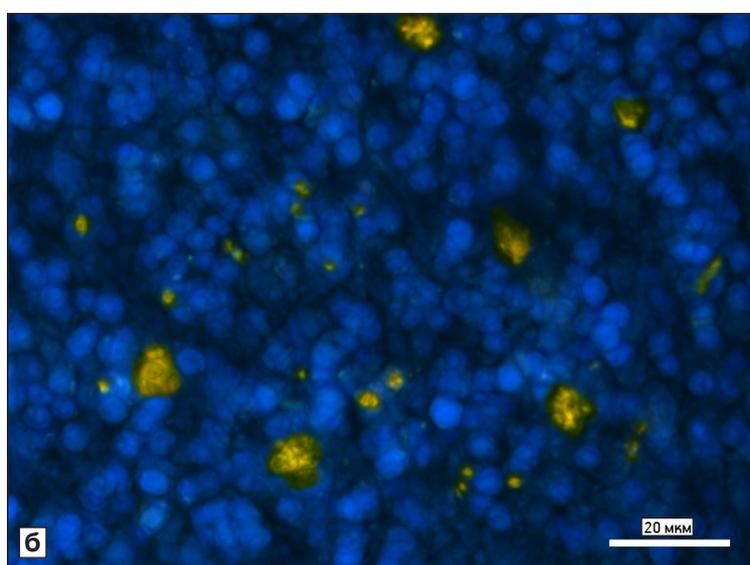
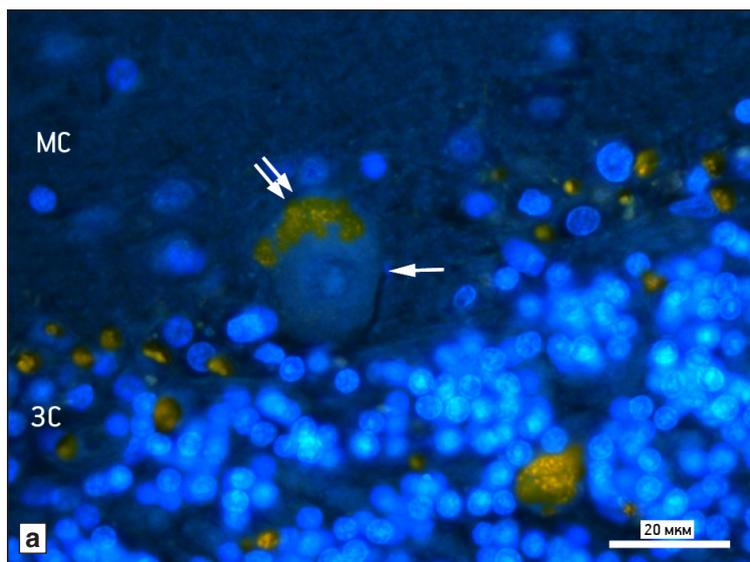
В ходе настоящего исследования обнаружено, что липофусцин накапливается в слоях коры мозжечка неравномерно, что, скорее всего, связано с функциональными и метаболическими особенностями различных клеточных популяций данной структуры головного мозга. При этом наиболее заметным оказалось накопление липофусцина с возрастом в КП, что можно объяснить высоким

уровнем энергетического обмена, характерного для этих клеток [6].

При проведении данного исследования не была обнаружена зависимость накопления липофусцина от причины смерти (в том числе и в результате черепно-мозговой травмы). Однако во всех исследованных случаях сохранялась возрастная зависимость накопления липофусцина. При этом существенное увеличение количества липофусцина в коре мозжечка происходит в период 45–50 лет.

Примененный в настоящей работе способ выявления липофусцина не позволил достоверно определить типовую принадлежность большинства содержащих его клеток (за исключением КП). Вместе с тем, отчетливые идентифицируемые морфологические особенности ядер и расположение этих клеток свидетельствуют о том, что основная часть из них — глиоциты. Высокое содержание липофусцина в глиальных клетках (микроглиоцитах и астроцитах) может свидетельствовать об их непосредственном участии в катаболизме пигмента, освобождаемого из гибнущих нейронов [9].

Очевидно, что внутриклеточное накопление липофусцина играет большую роль в механизмах старения нервной системы, поскольку скопление больших количеств этого пигмента наносит ощутимый ущерб клетке, оттесняя цитоплазматические органеллы, ухудшая или блокируя диффузионные и транспортные процессы, снижая эффективность метаболизма [8, 10]. В частности, изменение локализации липофусцина с возрастом — от перинуклеарного к полярному расположению в дендритах и аксонных холмиках, а также скопление здесь больших его количеств — затрудняет внутриклеточный транспорт, приводя в итоге к дегенерации и утрате клеточных отростков, что может являться одним из механизмов потери значительного числа КП при старении [1, 16].



Липофусцин в коре мозжечка человека.

а — общий вид коры мозжечка. МС — молекулярный слой коры мозжечка; ЗС — зернистый слой коры мозжечка; клетка Пуркинью (стрелка); скопление гранул липофусцина в её цитоплазме (две стрелки); б — участок зернистого слоя коры мозжечка; в — участок белого вещества. Ядра клеток окрашены селективным ДНК-связывающим красителем 4',6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлоридом (DAPI, синяя флуоресценция); липофусцин — желто-зеленая автофлуоресценция.

Таким образом, настоящее исследование позволило получить новые данные о распределении липофусцина в коре мозжечка человека и подтвердить связь накопления этого пигмента с возрастом. Обнаруженное изменение цвета автофлюоресценции липофусцина у людей старшей возрастной группы требует уточнения с использованием других методических подходов.

*Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 14-15-00014).*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гилерович Е.Г., Федорова Е.А., Григорьев И.П., Коржевский Д.Э. Морфологические основы реорганизации коры мозжечка крыс при старении // Журн. эвол. биохим. 2015. Т. 15, № 5. С. 370–376.
2. Коржевский Д.Э., Сухорукова Е.Г., Гилерович Е.Г. и др. Преимущества и недостатки цинк-этанол-формальдегида как фиксатора для иммуноцитохимических исследований и конфокальной лазерной микроскопии // Морфология. 2013. Т. 143, вып. 2. С. 81–85.
3. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир, 1969.
4. Bennett I.J., Madden D.J. Disconnected aging: cerebral white matter integrity and age-related differences in cognition // Neuroscience. 2014. Vol. 276. P. 187–205.
5. Bernard J.A., Seidler R.D. Moving forward: age effects on the cerebellum underlie cognitive and motor declines // Neurosci. Biobehav. Rev. 2014. № 42. P. 193–207.
6. Bertoni-Freddari C., Fattoretti P., Giorgetti B. et al. Decay of mitochondrial metabolic competence in the aging cerebellum // Ann N Y Acad. Sci. 2004. Vol. 1019. P. 29–32.
7. Brizzee K.R., Cancilla P.A., Sherwood N., Timiras P.S. The amount and distribution of pigments in neurons and glia of the cerebral cortex. Autofluorescent and ultrastructural studies // J. Gerontol. 1969. Vol. 24, № 2. P. 127–135.
8. Brunk U.T., Terman A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function // Free Radic. Biol. Med. 2002. Vol. 33, № 5. P. 611–619.
9. Glees P., Aloj Totaro E., Pisanti F. Possible removal route of osmiophilic material (lipofuscin) from spinal ganglia of *Torpedo marmorata* // J. Hirnforsch. 1986. Vol. 27, № 1. P. 79–86.
10. Goyal V.K. Lipofuscin pigment accumulation in human brain during aging // Exp. Gerontol. 1982. Vol. 17, № 6. P. 481–487.
11. Koppelmans V., Hirsiger S., Mйrillat S. et al. Cerebellar gray and white matter volume and their relation with age and manual motor performance in healthy older adults // Hum. Brain Mapp. 2015. Vol. 36, № 6. P. 2352–2363.
12. Koziol L.F., Budding D., Andreasen N. et al. Consensus paper: the cerebellum's role in movement and cognition // Cerebellum. 2014. Vol. 13, № 1. P. 151–177.
13. Manto M., Bower J.M., Conforto A.B. et al. Consensus paper: roles of the cerebellum in motor control – the diversity of ideas on cerebellar involvement in movement // Cerebellum. 2012. Vol. 11, № 2. P. 457–487.
14. Schmahmann J.D., Caplan D. Cognition, emotion and the cerebellum // Brain. 2006. Vol. 129, № 2. P. 290–292.
15. Terman A., Brunk U.T. Lipofuscin // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2004. Vol. 36, № 8. P. 1400–1404.
16. Zhang C., Zhu Q., Hua T. Aging of cerebellar Purkinje cells // Cell Tissue Res. 2010. Vol. 341, № 3. P. 341–347.

Поступила в редакцию 29.04.2016

#### DISTRIBUTION OF LIPOFUSCIN IN HUMAN CEREBELLAR CORTEX

*Ye. G. Sukhorukova, Ye. G. Gilerovich, M. A. Syrtsova,  
A. D. Novikova, D. E. Korzhevskiy*

Lipofuscin is a recognized intracellular marker of aging. The purpose of this study was to establish the topographic pattern of distribution of lipofuscin granule clusters in the cerebellar cortex. With the use of fluorescence microscopy the pigment was demonstrated due to its property of autofluorescence, in the sections of human cerebellar cortex (n=25, age 20–89 years). The analysis of preparations showed the presence of lipofuscin granules, predominantly with yellow-green autofluorescence, in different layers of the cerebellar cortex. A tendency of these granules to increase in number and sizes with age was detected. Lipofuscin was found to accumulate in the layers of cerebellar cortex unevenly. Most pronounced lipofuscin clusters were seen in the Purkinje cells, where a shift of its intracellular localization from perinuclear to the site of the processes' origin was observed.

**Key words:** *cerebellar cortex, lipofuscin, man, fluorescence microscopy*

Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg