

Д.Э.Коржевский, Е.Г.Сухорукова, В.В.Гусельникова, О.В.Кирик, И.П.Григорьев

ВНУТРИЯДЕРНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЖЕЛЕЗА В КЛЕТКАХ ПУРКИНЬЕ МОЗЖЕЧКА ЧЕЛОВЕКА

Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (зав. — д-р мед. наук Д.Э.Коржевский), отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург

Исследовано распределение ионов железа в мозжечке людей ($n=15$) в возрасте 20–89 лет с помощью высокочувствительного варианта гистохимического метода Перлса. Повышенное содержание железа выявлено в белом веществе и клетках Пуркинье. В 10 из 15 исследованных случаев железо было обнаружено в ядрах клеток Пуркинье, причём в некоторых случаях железо наблюдалось в ядрышке.

Ключевые слова: мозжечок, клетки Пуркинье, ядро клетки, ядрышко, железо

Железо в головном мозгу является самым распространённым микроэлементом. Ионы железа участвуют в синтезе ряда нейромедиаторов, включая гамма-аминомасляную кислоту, катехоламины и серотонин, а также липиды, используемые для образования миелиновой оболочки нервных волокон. В то же время, несвязанное железо катализирует образование свободных радикалов, что может быть причиной патологических изменений, лежащих в основе нейродегенеративных заболеваний [8]. Вследствие этого выявление распределения железа в структурах мозга очень важно для понимания функций железа и механизмов поддержания его гомеостаза в нервной системе. Мозжечок хорошо известен как центр контроля регуляции движений, но установлено также участие этой структуры в когнитивных, аффективных и поведенческих функциях [2, 6, 7]. Поэтому целью настоящего исследования было изучение распределения железа именно в нейронах коры мозжечка человека.

Материал и методы. Материалом для исследования служили фрагменты коры мозжечка ($n=15$) людей 20–89 лет из архива отдела общей и частной морфологии Научно-исследовательского института экспериментальной медицины (НИИЭМ). Программа исследований имеет положительное заключение локального этического комитета НИИЭМ. Материал был фиксирован в этаноле и цинк-этанол-формальдегиде, обезвожен и залит в парафин по общепринятой методике. Из архивных блоков готовили срезы толщиной 5 мкм. Выявление железа (Fe^{3+}) осуществляли при помощи реакции Перлса. Для повышения чувстви-

тельности реакции применяли метод усиления диаминобензидином (DAB) [4]. Рабочий раствор DAB готовили, используя реагенты из наборов Reveal Polyvalent HPR DAB Detection System (SpringBioscience, США) и DAB+ (Dako, Дания). После проведения гистохимической реакции часть срезов докрашивали либо астровым синим (Merck, Германия), либо основным фуксином (BioOptica, Италия). Анализ полученных препаратов и фотосъёмку выполняли, используя микроскоп Leica DM750 и цифровую фотокамеру ICC50 (Leica, Германия).

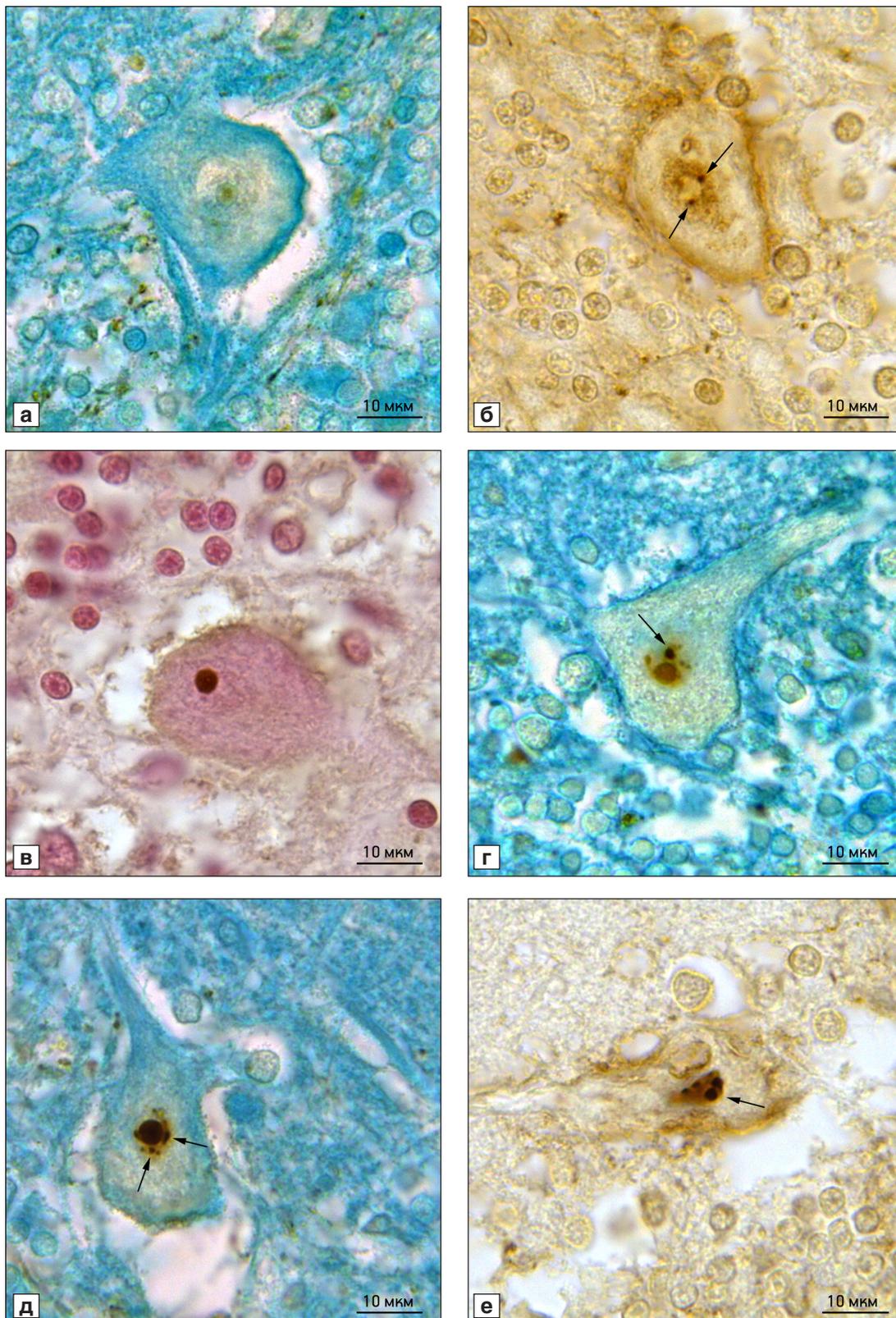
Результаты исследования. Проведение гистохимической реакции на железо позволило выявить в мозжечке зону с повышенным содержанием этого микроэлемента. Она соответствует его белому веществу. В этой области наблюдается мелкогранулярное распределение продукта гистохимической реакции по ходу волокон. Цитоплазматическое окрашивание отмечается в отдельных олигодендронитах.

В слое грушевидных нейронов коры мозжечка в отдельных случаях наблюдается слабая положительная реакция в нейропиле вокруг клеток Пуркинье (КП). В двух случаях отмечена усиленная реакция корзинок нервных волокон, расположенных по периметру тел КП. В 10 из 15 исследованных случаев в ядрах КП был обнаружен крупногранулярный продукт гистохимической реакции (рисунки).

В части исследованных нервных клеток реакцию на железо давало только ядрышко, однако таких нейронов было немного. В остальных КП

Сведения об авторах:

Коржевский Дмитрий Эдуардович (e-mail: dek2@yandex.ru), *Сухорукова Елена Геннадьевна* (e-mail: len48@inbox.ru), *Гусельникова Валерия Владимировна* (e-mail: guselnicova.valeriia@yandex.ru), *Кирик Ольга Викторовна* (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), *Григорьев Игорь Павлович* (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12



Клетки Пуркинье мозжечка человека.

а — реакция на железо в клетке Пуркинье отсутствует; б — интенсивная реакция на железо в двух внутриядерных гранулах, ассоциированных с ядрышком (стрелки), не содержащим железо; в — интенсивная реакция на железо только в ядрышке клетки Пуркинье; г — слабая реакция на железо в ядрышке клетки Пуркинье, более интенсивная реакция — во внутриядерной грануле (стрелка); д — интенсивная реакция на железо в ядрышке и внутриядерных гранулах (стрелки); е — сморщенная клетка Пуркинье, ядро которой уменьшено в объеме, деформировано (стрелка) и содержит интенсивно окрашенные крупные гранулы. Гистохимическая реакция на железо (Fe^{3+}) с усилением диаминобензидином и докраской астровым синим (а, г, д), прочным красным (в), без докраски (б, е)

не имелось никаких скоплений железа, выявляемых использованным методом. Анализ различных вариантов накопления железа в ядрах КП позволил выделить 5 вариантов клеток (см. рисунок): это — нейроны, не содержащие железа ни в ядре, ни в цитоплазме; нейроны с положительной мелкогранулярной реакцией в ядре, имеющие неокрашенное ядрышко; нейроны, в которых железо присутствует только в ядрышке; нейроны, в которых отмечается наличие железа как в ядрышке, так и в виде более мелких гранул, расположенных в ядре клетки; сморщенные нейроны с многочисленными крупными внутриядерными гранулами.

Обсуждение полученных данных. В ходе проведенной работы впервые изучен характер распределения железа в ядрах КП в мозжечке и установлено, что, как и в нейронах черного вещества [1], в этих клетках у человека присутствует нуклеолярное железо. Ранее железо было выявлено в ядрышках клеток растительных организмов [5]. В настоящем исследовании показано, что железо в случае его накопления в ядре нервной клетки не обязательно локализовано только в ядрышке. Внутриядерные гранулы, содержащие железо, которые ассоциированы с ядрышком, могут быть парануклеолярными тельцами. Белки, которые принимают участие в метаболизме железа в нейронах и способствуют накоплению негемовой формы этого микроэлемента в ядре клетки, в настоящее время неизвестны. Можно предполагать, что среди этих белков могут быть гемоксигеназа-1 [3] и специфические ядрышковые белки, для функционирования которых необходимо негемовое железо [9]. Накопление железа в ядрах погибающих нейронов указывает на вероятную взаимосвязь внутриядерной концентрации этого металла с нейродегенерацией.

Таким образом, в ядрах КП коры мозжечка у человека обнаружено негемовое железо, которое может присутствовать как в ядрышке клетки (нуклеолярное железо), так и вне этой структуры. Скопление железа в ядрах сморщенных нейронов может быть косвенным свидетельством того, что избыточное накопление этого микроэлемента в ядре клетки может способствовать ее повреждению.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-00014).

ЛИТЕРАТУРА

1. Сухорукова Е. Г., Григорьев И. П., Колос Е. А., Коржевский Д. Э. Ядрышко клетки — место накопления железа в нейронах черного вещества головного мозга человека // *Морфология*. 2012. Т. 142, вып. 6. С. 61–62.
2. Bower J. M., Parsons L. M. Rethinking the lesser brain // *Sci. Amer.* 2003. Vol. 289, № 2. P. 51–57.
3. Li Volti G., Ientile R., Abraham N. G. et al. Immunocytochemical localization and expression of heme oxygenase-1 in primary astroglial Cell. cultures during differentiation: effect of glutamate // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. Vol. 315, № 2. P. 517–524.
4. Meguro R., Asano Y., Odagiri S. et al. Nonheme-iron histochemistry for light and electron microscopy: a historical, theoretical and technical review // *Arch. Histol. Cytol.* 2007. Vol. 70, № 1. P. 1–19.
5. Roschztardt H., Grillet L., Isaure M.-P. et al. Plant Cell nucleolus as a hot spot for iron // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286, № 32. P. 27863–27866.
6. Schmahmann J. D. Cerebrocerebellar system: anatomic substrates of the cerebellar contribution to cognition and emotion // *Int. Rev. Psychiatry.* 2001. Vol. 13, № 2. P. 247–260.
7. Schmahmann J. D., Caplan D. Cognition, emotion and cerebellum // *Brain.* 2006. Vol. 129, Pt. 2. P. 290–292.
8. Youdim M. B., Stephenson G., Ben Shachar D. Ironing iron out in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases with iron chelators: a lesson from 6-hydroxydopamine and iron chelators, desferal and VK-28 // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004. Vol. 1012. P. 306–325.
9. Yung B. Y., Yang Y. H., Bor A. M. Nucleolar protein B23 translocation after deferoxamine treatment in a human leukemia Cell line // *Int. J. Cancer.* 1991. Vol. 48, № 5. P. 779–784.

Поступила в редакцию 20.11.2014

INTRANUCLEAR IRON DISTRIBUTION IN THE PURKINJE CELLS OF HUMAN CEREBELLUM

*D. E. Korzhevskiy, Ye. G. Sukhorukova, V. V. Gusel'nikova,
O. V. Kirik, I. P. Grigoriyev*

The distribution of iron ions in the cerebellum of 15 human subjects aged 20–89-years was studied using highly-sensitive variant of Perls' histochemical technique. Increased iron content was found in the white matter and in Purkinje cells. In 10 out of 15 cases examined iron was detected in the nuclei of Purkinje cells, while in some cases iron was found in the nucleolus.

Key words: *cerebellum, Purkinje cells, cell nucleus, nucleolus, iron*

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