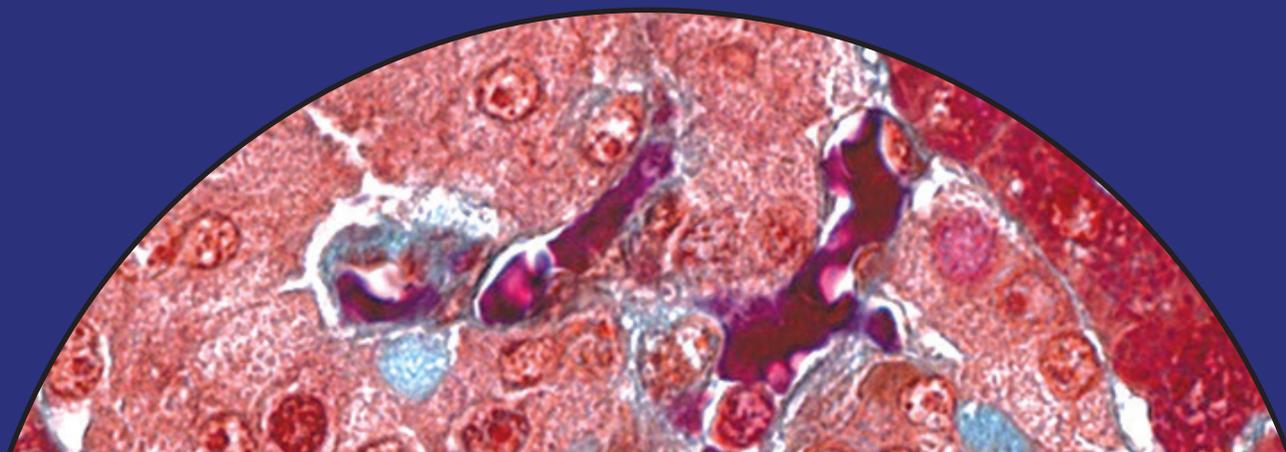


Научно-теоретический
медицинский
журнал

ISSN 1026-3543



МОРФОЛОГИЯ

MORPHOLOGY

УЧРЕДИТЕЛЬ

Российская академия медицинских наук

ИЗДАТЕЛЬ

ООО «Эко-Вектор»

Адрес: 191186, г. Санкт-Петербург, Аптекарский переулок, д. 3, литера А, помещение 1Н
E-mail: info@eco-vector.com
WEB: <https://eco-vector.com>

РЕКЛАМА

Отдел рекламы

Тел.: +7 495 308 83 89
E-mail: adv@eco-vector.com

РЕДАКЦИЯ

Зав. редакцией

Виктор Александрович Гинзбург
E-mail: morphology-spb-msk@eco-vector.com
Тел.: +7 (926) 204-83-26
Адрес: 127349, Москва, Шенкурский пр-д, 3Б, оф. 311

ПОДПИСКА

Подписка на печатную версию через интернет:

- <https://j-morphology.com/>
- <https://www.akc.ru/>
- <https://www.pressa-rf.ru/>

OPEN ACCESS

В электронном виде журнал распространяется бесплатно – в режиме немедленного открытого доступа

ИНДЕКСАЦИЯ

- RSCI (Web of Science)
- РИНЦ
- Google Scholar
- Ulrich's International Periodicals Directory
- WorldCat

Оригинал-макет

подготовлен в издательстве «Эко-Вектор».
Литературный редактор: *М.В. Старицына*
Корректор: *М.В. Старицына*
Верстка: *А.Г. Мальцина*

Сдано в набор 20.02.2022
Подписано в печать 28.02.2022
Формат 60 × 88%. Печать офсетная.
Печ. л. 4. Усл. печ. л. 3,72.
Уч.-изд. л. 2,18. Тираж 500 экз.
Заказ №

ISSN 1026-3543 (Print)

МОРФОЛОГИЯ

Том 159 | Выпуск 1 | 2021

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ

Главный редактор

Банин Виктор Васильевич, чл.-кор.РАН, д.м.н., проф. (Москва, Россия)
ORCID: 0000-0003-0374-0576

Заместители главного редактора

Клочкова Светлана Валерьевна, д.м.н., проф. (Москва, Россия) ORCID: 0000-0003-2041-7607
Обухов Дмитрий Константинович, д.биол.н., проф. (Санкт-Петербург, Россия) ORCID: 0000-0001-7233-0752
Чехонин Владимир Павлович, акад. РАН, д.м.н., проф. (Москва, Россия) ORCID: 0000-0003-4386-7897

Научные редакторы

Вихрук Тамара Ивановна, д.м.н., проф. (Санкт-Петербург, Россия)
Цехмистренко Татьяна Александровна, д.биол.н., проф. (Москва, Россия) ORCID: 0000-0003-2130-9405

Редакционная коллегия

Алексеева Наталия Тимофеевна, д.м.н., проф. (Воронеж, Россия) ORCID: 0000-0003-1510-8543
Баженов Дмитрий Васильевич, д.м.н., проф. (Тверь, Россия) ORCID: 0000-0001-5160-7652
Боголепов Николай Николаевич, д.м.н., проф. (Москва, Россия)
Быков Владимир Лазаревич, д.м.н., проф. (Санкт-Петербург, Россия) ORCID: 0000-0002-4152-9774
Верин Владимир Константинович, д.м.н., проф. (Санкт-Петербург, Россия)
Гайворонский Иван Васильевич, д.м.н., проф. (Санкт-Петербург, Россия) ORCID: 0000-0003-2531-3807
Карелина Наталья Рафаиловна, д.м.н., проф. (Санкт-Петербург, Россия) ORCID: 0000-0001-9409-8819
Киясов Андрей Павлович, д.м.н., проф. (Казань, Россия) ORCID: 0000-0003-4460-4140
Козлов Валентин Иванович, д.м.н., проф. (Москва, Россия) ORCID: 0000-0001-6332-748X
Коржевский Дмитрий Эдуардович, д.м.н., проф. (Санкт-Петербург, Россия) ORCID: 0000-0002-2456-8165
Кузнецов Сергей Львович, д.м.н., проф. (Москва, Россия) ORCID: 0000-0002-0704-1660
Никитюк Дмитрий Борисович, д.м.н., проф. (Москва, Россия) ORCID: 0000-0002-4968-4517
Николенко Владимир Николаевич, д.м.н., проф. (Москва, Россия) ORCID: 0000-0001-9532-9957
Ноздрин Владимир Иванович, д.м.н., проф. (Орёл, Россия) ORCID: 0000-0001-8488-0778
Одинцова Ирина Алексеевна, д.м.н., проф. (Санкт-Петербург, Россия) ORCID: 0000-0002-0143-7402
Отеллин Владимир Александрович, д.м.н., проф. (Санкт-Петербург, Россия) ORCID: 0000-0002-5800-646X
Павлов Алексей Владимирович, д.м.н., проф. (Ярославль, Россия)
Сесорова Ирина Сергеевна, д.биол.н., проф. (Иваново, Россия) ORCID: 0000-0001-8993-9927
Слесаренко Наталья Анатольевна, д.биол.н., проф. (Москва, Россия) ORCID: 0000-0002-8350-5965
Сотников Олег Семёнович, д.биол.н., проф. (Санкт-Петербург, Россия) ORCID: 0000-0001-6065-3757
Чумасов Евгений Иванович, д.биол.н., проф. (Санкт-Петербург, Россия) ORCID: 0000-0003-4859-6766
Удочкина Лариса Альбертовна, д.м.н., проф. (Астрахань, Россия) ORCID: 0000-0001-5016-0633
Шангина Ольга Ратмировна, д.биол.н., проф. (Уфа, Россия) ORCID: 0000-0003-1686-1254

Редакционный совет

Азнаурян Вардан Арташесович, д.м.н., проф. (Ереван, Армения) ORCID: 0000-0001-7787-4046
Безнусенко Галина Владимировна, д.м.н., (Милан, Италия) ORCID: 0000-0002-1876-4098
Николаев Валерий Георгиевич, д.м.н., проф. (Красноярск, Россия) ORCID: 0000-0002-0357-4689
Самусев Рудольф Павлович, д.м.н., проф. (Волгоград, Россия) ORCID: 0000-0002-8934-7793
Дгебуадзе Мая Амбросовна, д.м.н., проф. (Тбилиси, Грузия) ORCID: 0000-0001-7927-7800
Семченко Валерий Васильевич, д.м.н., проф. (Омск, Россия) SCOPUS Author ID: 7005656558
Дубовая Татьяна Клеониковна, д.м.н., проф. (Москва, Россия) ORCID: 0000-0001-7936-180X
Стадников Александр Абрамович, д.биол.н., проф. (Оренбург, Россия) ORCID: 0000-0001-6786-5074
Усович Александр Константинович, д.м.н., проф. (Витебск, Белоруссия) ORCID: 0000-0002-7817-1083
Зашихин Андрей Леонидович, д.м.н., проф. (Архангельск, Россия)
Фомин Николай Федорович, д.м.н., проф. (Санкт-Петербург, Россия) ORCID: 0000-0003-3961-1987
Каган Илья Иосифович, д.м.н., проф. (Оренбург, Россия) ORCID: 0000-0002-7723-7300
Мионов Александр Александрович, д.м.н., проф. (Милан, Италия) ORCID: 0000-0003-2308-1651
Чельшев Юрий Александрович, д.м.н., проф. (Казань, Россия) SCOPUS Author ID: 6603614074
Чучков Виктор Михайлович, д.м.н., проф. (Ижевск, Россия) ORCID: 0000-0002-9959-689X
Шадлинский Вагиф Билас, д.м.н., проф. (Баку, Азербайджан) ORCID: 0000-0002-9296-5963
Логвинов Сергей Валентинович, д.м.н., проф. (Томск, Россия) ORCID: 0000-0002-9876-6957
Мяделец Олег Данилович, (Витебск, Белоруссия) ORCID: 0000-0001-8796-052X

Редакция не несет ответственности за содержание рекламных материалов. Точка зрения авторов может не совпадать с мнением редакции. К публикации принимаются только статьи, подготовленные в соответствии с правилами для авторов. Направляя статью в редакцию, авторы принимают условия договора публичной оферты. С правилами для авторов и договором публичной оферты можно ознакомиться на сайте: <https://j-morphology.com/>. Полное или частичное воспроизведение материалов, опубликованных в журнале, допускается только с письменного разрешения издателя — издательства «Эко-Вектор».



FOUNDERS

Russian Academy of Medical Sciences

PUBLISHER

Eco-Vector

Address: 3 liter A, 1H, Aptekarsky pereulok, 191186, Saint Petersburg, Russian Federation

E-mail: info@eco-vector.com

WEB: <https://eco-vector.com>

ADVERTISE

Adv. department

Phone: +7 (495) 308 83 89

E-mail: adv@eco-vector.com

EDITORIAL

Executive editor

Viktor A. Ginzburg

E-mail: morphology-spb-msk@eco-vector.com

Phone: +7 (926) 204-83-26

Address: off.311, Shenkursky pr, 3B, Moscow, 127349, Russian Federation

SUBSCRIPTION

For print version:

www.journals.eco-vector.com/

PUBLICATION ETHICS

Journal's ethic policies are based on:

- ICMJE
- COPE
- ORE
- CSE
- EASE

OPEN ACCESS

Immediate Open Access is mandatory for all published articles

INDEXATION

- Russian Science Citation Index (Web of Science)
- Google Scholar
- Ulrich's International Periodicals Directory
- WorldCat

TYPESET

complete in Eco-Vector

Copyeditor: *M.V. Staritsyna*

Proofreader: *M.V. Staritsyna*

Layout editor: *A.G. Maltcina*

ISSN 1026-3543 (Print)

MORPHOLOGY

Volume 159 | Issue 1 | 2021

QUARTERLY PEER-REVIEW MEDICAL JOURNAL

Editor-in-Chief

Victor V. Banin, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia) ORCID: 0000-0003-0374-0576.

Deputy Editors-in-Chief

Svetlana V. Klochkova, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia) ORCID: 0000-0003-2041-7607

Dmitry K. Obukhov, MD, Dr. Sci. (Biol.), Prof. (St. Petersburg, Russia) ORCID: 0000-0001-7233-0752

Vladimir P. Chekhonin, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia) ORCID: 0000-0003-4386-7897

Science Editors

Tamara I. Vikhruk, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (St. Petersburg, Russia)

Tatiana A. Tsekhmistrenko, MD, Dr. Sci. (Biol.), Prof. (Moscow, Russia) ORCID: 0000-0003-2130-9405

Editorial Board

Natalia T. Alexeyeva, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Voronezh, Russia) ORCID: 0000-0003-1510-8543

Dmitry V. Bazhenov, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Tver, Russia) ORCID: 0000-0001-5160-7652

Nikolay N. Bogolepov, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)

Vladimir L. Bykov, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (St. Petersburg, Russia) ORCID: 0000-0002-4152-9774

Vladimir K. Verin, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (St. Petersburg, Russia)

Ivan V. Gaivoronskiy, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (St. Petersburg, Russia) ORCID: 0000-0003-2531-3807

Natalia R. Karelina, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (St. Petersburg, Russia) ORCID: 0000-0001-9409-8819

Andrey P. Kiyasov, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Kazan, Russia) ORCID: 0000-0003-4460-4140

Valentin I. Kozlov, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia) ORCID: 0000-0001-6332-748X

Dmitry E. Korzhvinskiy, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (St. Petersburg, Russia) ORCID: 0000-0002-2456-8165

Sergey L. Kuznetsov, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia) ORCID: 0000-0002-0704-1660

Dmitry B. Nikityuk, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia) ORCID: 0000-0002-4968-4517

Vladimir N. Nikolenko, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia) ORCID: 0000-0001-9532-9957

Vladimir I. Nozdrin, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Orel, Russia) ORCID: 0000-0001-8488-0778

Irina A. Odintsova, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (St. Petersburg, Russia) ORCID: 0000-0002-0143-7402

Vladimir A. Otellin, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (St. Petersburg, Russia) ORCID: 0000-0002-5800-646X

Alexey V. Pavlov, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Yaroslavl, Russia)

Irina S. Sesorova, MD, Dr. Sci. (Biol.), Prof. (Ivanovo, Russia) ORCID: 0000-0001-8993-9927

Natalia A. Slesarenko, MD, Dr. Sci. (Biol.), Prof. (Moscow, Russia) ORCID: 0000-0002-8350-5965

Oleg S. Sotnikov, MD, Dr. Sci. (Biol.), Prof. (St. Petersburg, Russia) ORCID: 0000-0001-6065-3757

Yevgeny I. Chumasov, MD, Dr. Sci. (Biol.), Prof. (St. Petersburg, Russia) ORCID: 0000-0003-4859-6766

Larisa A. Udochkina, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Astrakhan, Russia) ORCID: 0000-0001-5016-0633

Olga R. Shangina, MD, Dr. Sci. (Biol.), Prof. (Ufa, Russia) ORCID: 0000-0003-1686-1254

Editorial Council

Vardan A. Aznauryan, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Yerevan, Armenia) ORCID: 0000-0001-7787-4046

Galina V. Beznoussenko, MD, PhD (Milan, Italy) ORCID: 0000-0002-1876-4098

Valerian G. Nikolaev, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Krasnoyarsk, Russia) ORCID: 0000-0002-0357-4689

Rudolf P. Samusev, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Volgograd, Russia) ORCID: 0000-0002-8934-7793

Maia A. Dgebuadze, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Tbilisi, Georgia) ORCID: 0000-0001-7927-7800

Valery V. Semchenko, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Omsk, Russia) SCOPUS Author ID: 7005656558

Tatiana K. Dubovaya, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia) ORCID: 0000-0001-7936-180X

Alexander A. Stadnikov, MD, Dr. Sci. (Biol.), Prof. (Orenburg, Russia) ORCID: 0000-0001-6786-5074

Alexandre Mironov, MD, PhD, Prof. (Milan, Italy) ORCID: 0000-0003-2308-1651

Aleksander K. Usovich, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Vitebsk, Belarus) ORCID: 0000-0002-7817-1083

Andrey L. Zashikhin, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Arkhangelsk, Russia)

Nikolay F. Fomin, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Saint Petersburg, Russia) ORCID: 0000-0003-3961-1987

Ilia I. Kagan, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Orenburg, Russia) ORCID: 0000-0002-7723-7300

Yuriy A. Chelyshev, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Kazan, Russia) SCOPUS Author ID: 6603614074

Vicnor N. Chuchkov, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Izhevsk, Russia) ORCID: 0000-0002-9959-689X

Vaqif B. Shadlinskiy, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Baku, Azerbaijan) ORCID: 0000-0002-9296-5963

Sergey V. Logvinov, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Tomsk, Russia) ORCID: 0000-0002-9876-6957

Oleg D. Miadelets, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Vitebsk, Belarus) ORCID: 0000-0001-8796-052X

The editors are not responsible for the content of advertising materials. The point of view of the authors may not coincide with the opinion of the editors. Only articles prepared in accordance with the guidelines are accepted for publication. By sending the article to the editor, the authors accept the terms of the public offer agreement. The guidelines for authors and the public offer agreement can be found on the website: <https://j-morphology.com/>. Full or partial reproduction of materials published in the journal is allowed only with the written permission of the publisher — the Eco-Vector publishing house.

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Н.П. Бгатова, Р.С. Досымбекова, Ю.С. Таскаева, С.М. Мирошниченко, Р.А. Князев, А.О. Соловьева,
К.О. Шарипов, З.Б. Тунгушбаева*

Аутофагия как маркер жизнеобеспечения изолированных гепатоцитов 5

С.М. Зиматкин, А.В. Заерко

Моноаминоксидаза Б в развивающихся гистаминергических нейронах мозга крысы. 13

А.В. Смирнов, М.Р. Экова, И.Н. Тюренков, Е.В. Волотова

Имунофенотипическая характеристика экспрессии индуцибельной NO-синтазы
в зубчатой извилине крыс зрелого возраста при моделировании депрессии
и её фармакологической коррекции. 21

В.Н. Манских

Фиксация цинк-формалином как адекватная замена ценкер-формола
при гистохимическом выявлении островковых клеток поджелудочной железы 29

CONTENTS

ORIGINAL STUDY ARTICLES

*N.P. Bgatova, R.S. Dosymbekova, Ju.S. Taskaeva, S.M. Miroshnichenko, R.A. Knyazev,
A.O. Solovieva, K.O. Sharipov, Z.B. Tungushbaeva*

Autophagy as a life support marker of isolated hepatocytes 5

S.M. Zimatkin, A.V. Zaerko

Monoamine oxidase B in developing histaminergic neurons of the rat brain. 13

A.V. Smirnov, M.R. Ekova, I.N. Tyurenkov, E.V. Volotova

Immunophenotypic characteristics of inducible NO synthase expression
in dentate gyrus of mature rats in modeling depression and its pharmacological correction 21

V.N. Manskikh

Fixation with zinc-formalin as an adequate substitution of Zenker-formol
for the histochemical staining of the pancreatic islet cells 29

DOI: <https://doi.org/10.17816/1026-3543-2021-159-1-5-12>

Аутофагия как маркер жизнеобеспечения изолированных гепатоцитов

Н.П. Бгатова¹, Р.С. Досымбекова², Ю.С. Таскаева¹, С.М. Мирошниченко³, Р.А. Князев³,
А.О. Соловьева¹, К.О. Шарипов², З.Б. Тунгушбаева⁴

¹Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Российская Федерация;

²Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова, Алматы, Казахстан;

³Научно-исследовательский институт биохимии Федерального Исследовательского центра Фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Российская Федерация;

⁴Казахский национальный педагогический университет им. Абая, Алматы Казахстан

АННОТАЦИЯ

Цель. Выявить структурные признаки аутофагии в цитоплазме изолированных гепатоцитов в динамике их культивирования.

Материал и методы. Для анализа клеточного цикла культивированных гепатоцитов использовали метод точной цитофлуориметрии. Клетки культивировали в течение 1, 24 и 48 ч. Морфометрический анализ проводили с помощью компьютерной программы Image J. Определяли диаметры ядер и цитоплазмы гепатоцитов, объёмы ядер и цитоплазмы, ядерно-цитоплазматическое соотношение. Концентрацию внутриклеточных органелл и аутофагию оценивали при увеличении $\times 30000$.

Результаты. Выявлена остановка клеточного цикла в стадии G_0/G_1 через 24 ч культивирования гепатоцитов и сохранение их жизнеспособности к 48 ч эксперимента без повышения процента клеток в стадии апоптоза. Показано уменьшение абсолютного объёма клеток, возрастание ядерно-цитоплазматического соотношения, отражающее снижение доли цитоплазмы гепатоцитов в динамике культивирования. Через 24 ч культивирования выявлено наличие в цитоплазме клеток аутофагосом с фрагментами цитоплазмы, розеток гликогена и аутолизосом с частично деградированным материалом. К 48 ч исследования отмечено достоверное снижение объёмной плотности гликогена и митохондрий, а также повышение базальной аутофагии в гепатоцитах, с преобладанием гликофагии и митофагии.

Выводы. Аутофагия способствует поддержанию клеточного гомеостаза изолированных гепатоцитов при стандартных условиях культивирования, что подтверждается снижением объёмной плотности гликогена и митохондрий, и возрастанием базальной аутофагии в цитоплазме гепатоцитов. Полученные данные свидетельствуют о вкладе аутофагии в процесс выживания первичной культуры гепатоцитов и могут быть использованы как показатель адекватности условий культивирования.

Ключевые слова: изолированные гепатоциты; клеточный цикл; базальная аутофагия.

Как цитировать:

Бгатова Н.П., Досымбекова Р.С., Таскаева Ю.С., Мирошниченко С.М., Князев Р.А., Соловьева А.О., Шарипов К.О., Тунгушбаева З.Б. Аутофагия как маркер жизнеобеспечения изолированных гепатоцитов // Морфология. 2021. Т.159, №1 С. 5–12.

DOI: <https://doi.org/10.17816/1026-3543-2021-159-1-5-12>

DOI: <https://doi.org/10.17816/1026-3543-2021-159-1-5-12>

Autophagy as a life support marker of isolated hepatocytes

Natalya P. Bgatova¹, Raushan S. Dosymbekova², Juliia S. Taskaeva¹, Svetlana M. Miroshnichenko³, Roman A. Knyazev³, Anastasia O. Solovieva¹, Kamalidin O. Sharipov², Zina B. Tungushbaeva⁴

¹Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia;

²Kazakh National Medical University named after S.D. Asfendiyarov, Almaty, Kazakhstan;

³Research Institute of Biochemistry Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia;

⁴Kazakh National Pedagogical University named after Abai, Almaty, Kazakhstan

ABSTRACT

AIM: The work aimed to reveal structural signs of autophagy in the cytoplasm of isolated hepatocytes in the dynamics of their cultivation.

MATERIALS AND METHODS: The cultivated hepatocyte culture cell cycle was studied by flow cytometry. The cells were cultured for 1, 24, and 48 hours. Morphometric analysis was performed using the computer program Image J. The diameters of the nuclei and cytoplasm of hepatocytes, the volumes of nuclei and cytoplasm, and the nuclear-cytoplasmic ratio were determined. The concentration of intracellular organelles and autophagy was evaluated with magnification by 30000 times.

RESULTS: The cell cycle arrest in the G₀/G₁ stage after 24 hours of hepatocyte cultivation and the preservation of their viability by hour 48 of the experiment without increase in the percentage of cells in the apoptosis stage were revealed. The decrease in the absolute count of cells was registered, as well as an increase in the nuclear-cytoplasmic ratio indicating a decrease in the proportion of hepatocyte cytoplasm in the course of cultivation. After 24 hours of cultivation, autophagosomes with fragments of cytoplasm, glycogen rosettes, and autolysosomes with partially degraded material were revealed in the cell cytoplasm. By hour 48 of the study, a significant decrease in the volume density of glycogen and mitochondria was noted, as well as an increase in basal autophagy in hepatocytes, with a prevalence of glycophy and mitophagy.

CONCLUSIONS: Autophagy maintains cellular homeostasis of isolated hepatocytes under standard culture conditions, as evidenced by a decrease in the volume density of glycogen and mitochondria, and an increase in basal autophagy in the hepatocyte cytoplasm. The findings indicate the contribution of autophagy to the survival of the primary culture of hepatocytes and can be used as an indicator of the adequacy of culturing conditions.

Keywords: isolated hepatocytes; cell cycle; basal autophagy.

To cite this article:

Bgatova NP, Dosymbekova RS, Taskaeva JS, Miroshnichenko SM, Knyazev RA, Solovieva AO, Sharipov KO, Tungushbaeva ZB. Autophagy as a life support marker of isolated hepatocytes. *Morphology*. 2021;159(1):5–12. DOI: <https://doi.org/10.17816/1026-3543-2021-159-1-5-12>

Received: 19.08.2021

Accepted: 10.12.2021

Published: 04.03.2022

В последнее время клеточные культуры гепатоцитов рассматривают как возможный источник для трансплантации при лечении наследственных или терминальных заболеваний печени [1]. Имеются данные, демонстрирующие терапевтический потенциал трансплантированных зрелых гепатоцитов в лечении наследственного метаболического заболевания печени [2] и острой печёночной недостаточности [3]. В связи с тем что печень является центральным органом метаболизма и детоксикации, изолированные гепатоциты используются в качестве модели для выявления фармакологических и токсикологических реакций лекарственных препаратов [4]. Модели первичной культуры гепатоцитов применяют для изучения метаболизма, секреции и регенерации печени [5].

В то же время сохраняются проблемы определения оптимальной методологии и эффективности культивирования первичных гепатоцитов [6]. Особое внимание уделяется фенотипическим характеристикам изолированных гепатоцитов, которые должны соответствовать состоянию клеток *in vivo* [7].

Известно, что механизмом сохранения гомеостаза клеток в условиях изменения внутриклеточной или внеклеточной микросреды является аутофагия. Аутофагия присутствует во всех эукариотических клетках на базальном уровне, и может быть селективной, нацеленной на определённый субклеточный компартмент, или не-селективной [8]. Аутофагический механизм чрезвычайно чувствителен к метаболическим изменениям внеклеточной микросреды, и адаптивный аутофагический ответ важен для преодоления стрессовых условий [9].

Целью работы было выявление структурных признаков аутофагии в цитоплазме изолированных гепатоцитов в динамике их культивирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Гепатоциты крыс-самцов линии Вистар массой 180–200 г выделяли методом рециркуляторной ферментативной перфузии с использованием 0,03% раствора коллагеназы («ICN Biomedicals, Inc», США) и отделяли от непаренхимных клеток с помощью дифференциального центрифугирования. Жизнеспособность клеток оценивали методом исключения трипанового синего («Serva», Германия). В эксперимент брали клетки с жизнеспособностью не менее 90%. Полученные клетки были посажены на 6-луночные планшеты (Corning), покрытые коллагеном в концентрации 10×10^4 клеток/лунок. Гепатоциты культивировались в питательной среде RPMI-1640 (Gibco, США), pH 7.4, содержащей 10% эмбриональной сыворотки коров (Gibco, США), 100 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл гентамицина при стандартных условиях (5% CO₂, при температуре 37 °C и влажности 95%). На проведение исследования получено разрешение Комитета по Биомедицинской этике Федерального исследовательского центра

фундаментальной и трансляционной медицины (протокол № 7 от 10.03.2020 г.).

Для анализа клеточного цикла культивированных гепатоцитов был использован метод проточной цитофлуориметрии, с применением ДНК интеркалирующего флуоресцентного красителя Пропидий йодида (PI). Клетки культивировали в течение 1, 24 и 48 ч. Для снятия клеток с пластика использовали TrypLE реагент (Gibco, США), клетки осаждали центрифугированием, отмывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и фиксировали ледяным 70% этанолом. После инкубации с буфером для экстракции ДНК клетки повторно центрифугировали и промывали PBS. Окрашенные пропидий йодидом клетки анализировали на проточном цитофлуориметре CytoFlexS (Beckman Coulter, США).

Для изучения ультраструктурной организации гепатоцитов взвесь клеток фиксировали в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на среде Хенкса, дофиксировали в течение 1 ч в 1% растворе OsO₄ на фосфатном буфере (pH=7,4), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон (Serva, Германия). Полутонкие срезы толщиной 1 мкм получали на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Leica Microsystems, Германия), окрашивали толуидиновым синим и изучали под световым микроскопом «LEICA DME» (Leica Microsystems, Германия). Ультратонкие срезы толщиной 70–100 нм контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали под электронным микроскопом JEM 1400 (JEOL, Япония).

Морфометрический анализ проводили с помощью компьютерной программы Image J (Wayne Rasband, США). Определяли диаметры ядер и цитоплазмы гепатоцитов, объёмы ядер и цитоплазмы, ядерно-цитоплазматическое соотношение. Концентрацию внутриклеточных органелл оценивали при увеличении $\times 30000$ при использовании закрытой тестовой системы из 500 точек. Среднее значение (M) и стандартное отклонение (SD) вычисляли с помощью программного обеспечения Microsoft Excel (Microsoft, США). Достоверность различий между исследуемыми параметрами определяли с помощью программного обеспечения Statistica 6.0 (StatSoft, США) с использованием U-критерия Манна-Уитни при уровне достоверности 95% ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При культивировании изолированных гепатоцитов в течение 48 ч отмечали последовательное снижение абсолютного объёма клеток. Через 24 ч объём клеток снизился на 57%, а через 48 ч – на 76%, по сравнению с объёмом гепатоцитов через 1 ч после культивирования. При этом абсолютные объёмы ядер гепатоцитов достоверно не изменялись. Ядерно-цитоплазматическое соотношение через 24 ч увеличилось в 2 раза, через 48 ч – в 6 раз (рис. 1а–с, табл.). Следовательно, снижение объёмов гепатоцитов в процессе культивирования

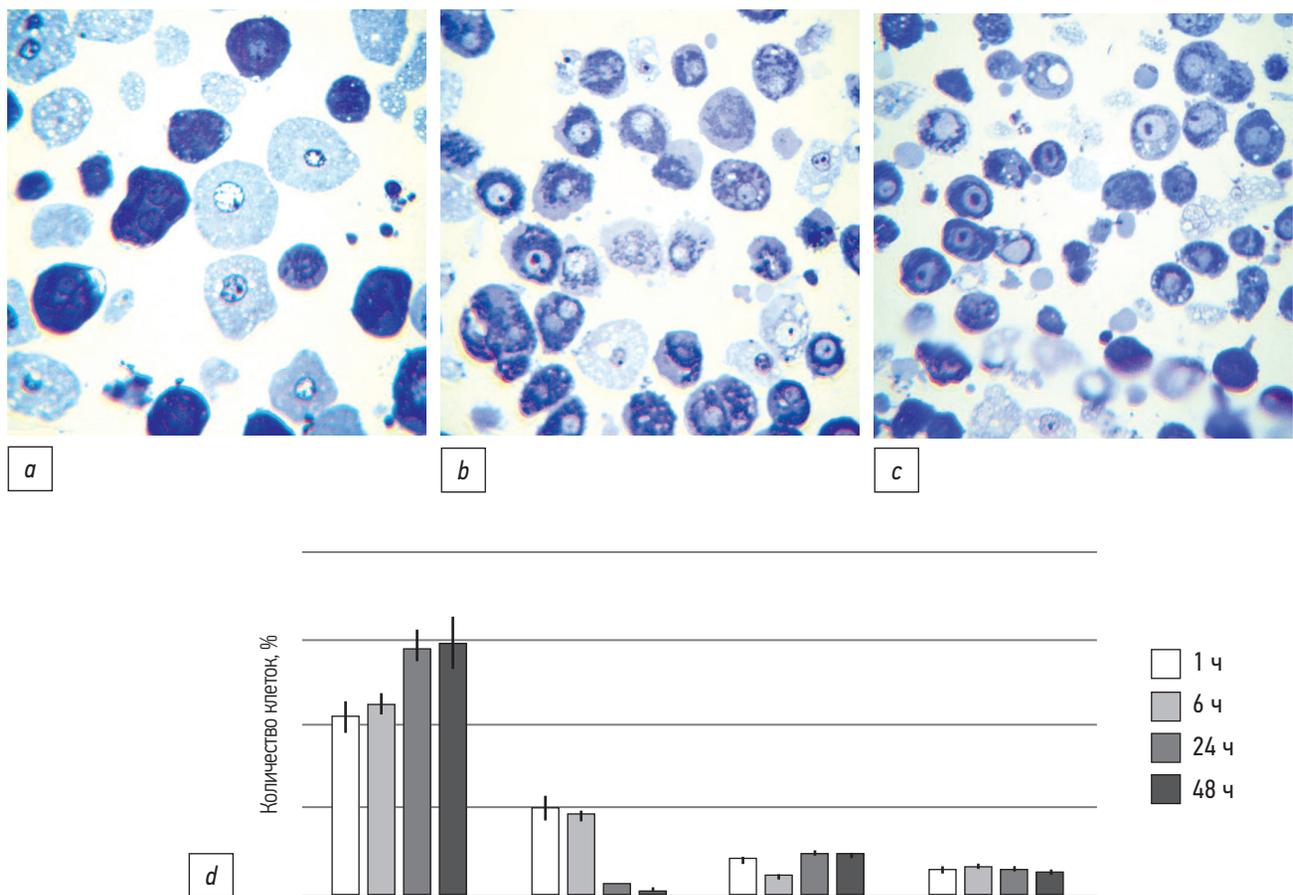


Рис. 1. Морфология и клеточный цикл изолированных гепатоцитов в динамике культивирования: *a, b, c* – гепатоциты в динамике культивирования через 1, 24 и 48 ч соответственно. Окраска толуидиновым синим. Увеличение $\times 400$. *d* – распределения гепатоцитов по фазам клеточного цикла при их культивировании в стандартной питательной среде. G₀/G₁, S, G₂/M – стадии клеточного цикла

Fig. 1. Morphology and cell cycle of isolated hepatocytes in the course of cultivation: *a, b, c* – hepatocytes in the course of cultivation after 1, 24, and 48 hours, respectively. Staining with toluidine blue. Magnification $\times 400$. *d* – distribution of hepatocytes by phases of the cell cycle during their cultivation in a standard nutrient medium. G₀/G₁, S, G₂/M – the cell cycle stages

Таблица. Результаты морфометрии гепатоцитов в динамике культивирования (M \pm SD)

Table. Results of hepatocyte morphometry in the course of cultivation (M \pm SD)

Параметр	1 ч	24 ч	48 ч
Гепатоциты, V (мкм ³)	17089,77 \pm 10465,86	7322,782 \pm 3682,01*	4154,77 \pm 1904,82*
Ядра гепатоцитов, V (мкм ³)	423,04 \pm 379,21	427,73 \pm 278,91	514,83 \pm 242,8
ЯЦИ	0,03 \pm 0,02	0,07 \pm 0,05*	0,18 \pm 0,03*
Митохондрии, Vv (%)	14,2 \pm 2,72	14,7 \pm 1,78	10,4 \pm 2,38*
ЭПР, Vv (%)	1,41 \pm 0,43	3,92 \pm 1,04	2,02 \pm 0,56
Аутофагосомы, Vv (%)	5,87 \pm 1,45	21,2 \pm 5,13*	8,78 \pm 3,56*#
Аутолизосомы, Vv (%)	0,94 \pm 1,22	2,65 \pm 2,51*	6,88 \pm 2,21*#
Гликоген, Vv (%)	5,41 \pm 1,14	1,42 \pm 1,08*	0,86 \pm 0,84*

Примечание: Vv – объёмная плотность структур; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; ЯЦИ – ядерно-цитоплазматический индекс (Vv ядра/Vv цитоплазмы). 1, 24, 48 ч – время культивирования гепатоцитов; * – отличие от соответствующих величин через 1 ч культивирования, # – отличие от соответствующих величин через 24 ч культивирования ($p \leq 0,05$).

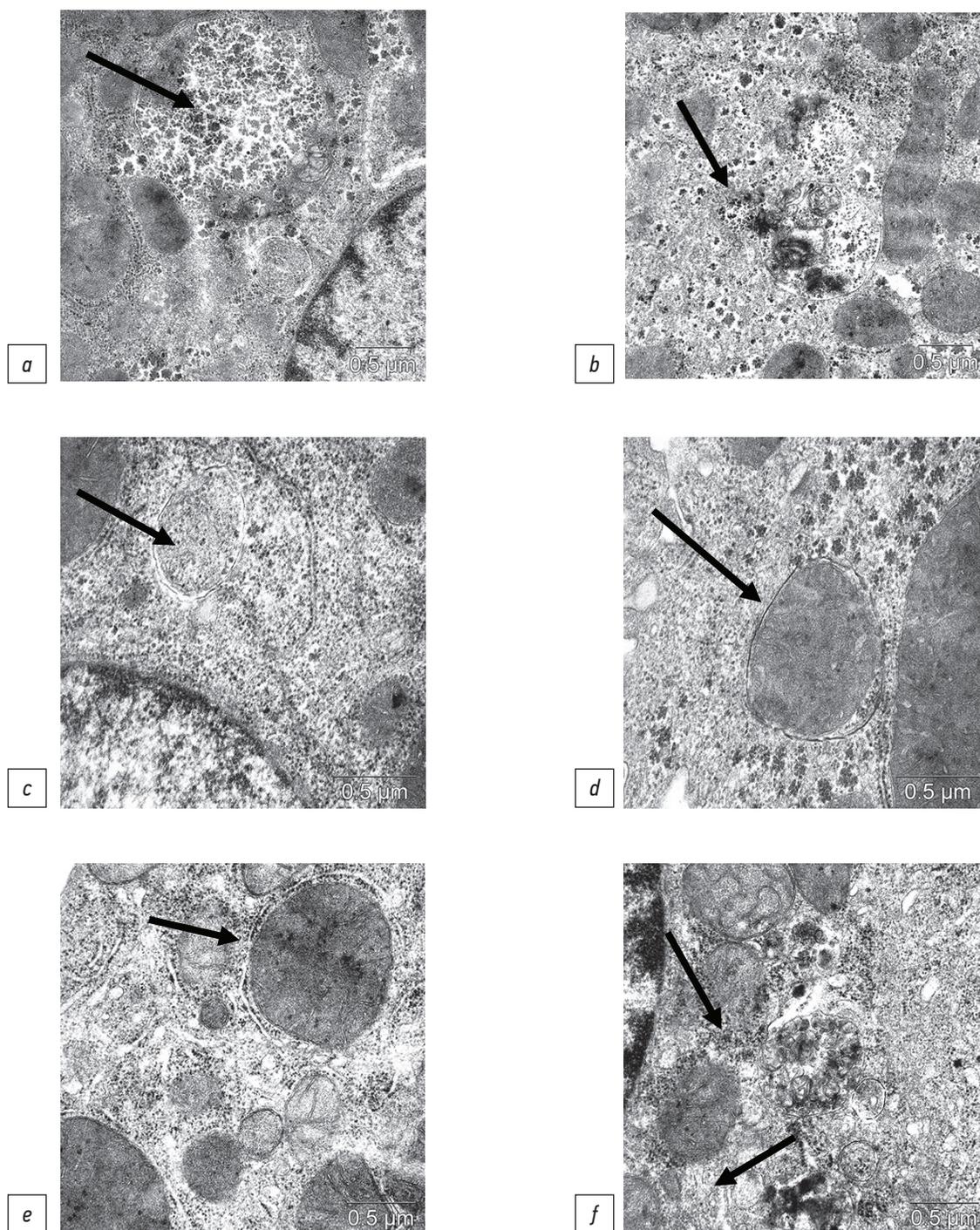


Рис. 2. Ультраструктурная организация гепатоцитов в процессе культивирования. а – аутофагосома с розетками гликогена через 24 ч культивирования (стрелка); б – аутолизосома с частично деградированным материалом через 24 ч культивирования (стрелка); с – аутофагосома с фрагментом цитоплазмы через 48 ч культивирования (стрелка); д – аутофагосома с митохондрией через 48 ч культивирования (стрелка); е – отсутствие гликогена в цитоплазме и образование колец эндоплазматического ретикулума вокруг митохондрий через 48 ч культивирования (стрелка); ф – повышенное количество аутолизосом с включениями мембранных структур, находящихся на разной стадии деградации через 48 ч культивирования (стрелки). Увеличение $\times 30000$

Fig. 2. Ultrastructural organization of hepatocytes during cultivation. а – autophagosome with glycogen rosettes after 24 h of cultivation (arrow); б – autolysosome with partially degraded material after 24 h of cultivation (arrow); с – autophagosome with a fragment of cytoplasm after 48 h of cultivation (arrow); д – autophagosome with mitochondria after 48 h of cultivation (arrow); е – the absence of glycogen in the cytoplasm and the formation of endoplasmic reticulum rings around mitochondria after 48 h of cultivation (arrow); ф – increased amount of autolysosomes with inclusions of membrane structures at different stages of degradation after 48 h of cultivation (arrows). Magnification $\times 30000$

происходило за счёт снижения объёмной доли цитоплазмы клеток.

Оценка клеточного цикла продемонстрировала накопление гепатоцитов в G_0/G_1 через 24 ч культивирования. В течение исследованных 48 ч гепатоциты сохраняли свою жизнеспособность без повышения процента клеток в стадии апоптоза (рис. 1d).

Исследование ультраструктурной организации гепатоцитов через 24 ч культивирования выявило наличие в цитоплазме клеток аутофагосом с фрагментами цитоплазмы и розеток гликогена (рис. 2a) и аутолизосом с частично деградированным материалом (рис. 2b).

Если через 24 ч культивирования в составе аутофагосом наблюдали преимущественно гранулы гликогена, то при изучении ультраструктуры гепатоцитов через 48 ч культивирования были выявлены аутофагосомы с фрагментами цитоплазмы и митохондриями (рис. 2c, d). Митохондрии часто были окружены цистернами гранулярного эндоплазматического ретикулума (рис. 2e). Кроме того, наблюдали митохондрии с нарушением строения крист и повышенное количество аутолизосом с включениями мембранных структур, находящихся на разной стадии деградации (рис. 2f).

Морфометрическое исследование ультраструктурной организации гепатоцитов выявило, что к 48 ч культивирования в гепатоцитах достоверно снижались объёмные плотности гликогена и митохондрий на 84 и 27% ($p < 0,05$) соответственно (см. табл.). При этом возрастали на 50% и в 7 раз соответственно ($p < 0,05$) объёмные плотности аутофагосом и аутолизосом (см. табл.).

ОБСУЖДЕНИЕ

Аутофагия является катаболической программой, нацеленной на элиминацию и деградацию макромолекулярных белковых агрегатов, субклеточных органелл и запасных питательных веществ (гликогена и липидов), для поддержания клеточного гомеостаза и активируется в условиях стресса. Метаболиты, образующиеся в лизосомах в результате аутофагии, повторно используются в качестве источников энергии или строительных блоков для синтеза макромолекул [10].

Известно, что гепатоциты играют жизненно важную, ключевую роль в хранении и образовании энергетического ресурса – гликогена [5]. Данные литературы свидетельствуют о взаимодействии между аутофагией и углеводным обменом и наличием динамической обратной связи между аутофагией и клеточным энергетическим балансом [10]. Гликоген может распознаваться и поглощаться аутофагосомами, а затем переноситься в лизосомы для разложения. Этот процесс называется «гликофагия» [11]. В нашем исследовании через 24 ч культивирования гепатоцитов наблюдали преимущественно аутофагосомы с гликогеном, а через 48 ч появлялись аутофагосомы с митохондриями. На этот период

отмечали наименьшее число клеток в S-фазе клеточного цикла и наличие высокого процента клеток в стадии G_0/G_1 . Известно, что в условиях дефицита аминокислот прекращаются синтез белка и митоз, и аутофагический сигнальный путь активируется для высвобождения аминокислот путём расщепления белков с целью поддержания доступности аминокислотного пула для синтеза жизненно важных белков [11].

Одной из проблем, ограничивающей использование в медицине клеточных культур гепатоцитов, является потеря митотической активности клеток при их культивировании [12]. Остановка клеточного цикла была показана и в нашем исследовании. При этом на протяжении 48 ч культивирования возрастал уровень базальной аутофагии гепатоцитов и не увеличивалось число клеток в состоянии апоптоза. Аутофагия в данном случае, по-видимому, поддерживала уровень дифференцированности гепатоцитов и являлась эффективным способом сохранения клеточного гомеостаза [7].

Полученные нами данные свидетельствуют, что при культивировании изолированных гепатоцитов в стандартной питательной среде происходит возрастание базальной аутофагии в цитоплазме клеток. Через 24 ч эксперимента развивалась гликофагия, т. к. аутофагосомы содержали преимущественно материал, являющийся источником энергии для клетки – гранулы гликогена. В дополнение к гликофагии через 48 ч наблюдалась митофагия, в связи с потребностью клетки в аминокислотах и деградацией белковых комплексов. Полученные данные свидетельствуют о вкладе аутофагии в процесс выживания первичной культуры гепатоцитов и могут быть использованы как показатель адекватности условий культивирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, методами проточной цитофлуориметрии, световой и электронной микроскопии охарактеризована первичная культура гепатоцитов в динамике культивирования в стандартной питательной среде. Выявлены остановка клеточного цикла в G_0/G_1 стадии через 24 ч культивирования гепатоцитов и сохранение их жизнеспособности без повышения процента клеток в стадии апоптоза. Возрастание базальной аутофагии в цитоплазме клеток – преобладание гликофагии и митофагии, по-видимому, является механизмом поддержания клеточного гомеостаза в процессе культивирования гепатоцитов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFO

Источник финансирования. Работа выполнена за счет бюджетного финансирования в рамках государственного задания № NFWNR-2022-00120045.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Концепция и дизайн исследования: Н.П. Бгатова, А.О. Соловьева, Ю.С. Таскаева. Сбор и обработка материала: Р.С. Досымбекова, С.М. Мирошниченко, Р.А. Князев, А.О. Соловьева. Анализ и интерпретация данных: Н.П. Бгатова, К.О. Шарипов, З.Б.Тунгшубаева. Написание текста: Н.П. Бгатова, Ю.С. Таскаева.

Funding. The work was financed from budget under the state assignment No. NFWNR-2022-00120045.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Author contributions. N.P. Bgatova, A.O. Solovieva, and Yu.S. Taskaeva created the research concept and design; R.S. Dosymbekova, S.M. Miroshnichenko, R.A. Knyazev, and A.O. Solovieva collected and processed the material; N.P. Bgatova, K.O. Sharipov, Z.B. Tungshbaeva analyzed and interpreted the data; N.P. Bgatova and Yu.S. Taskaeva wrote the text.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ogoke O., Oluwole J., Parashurama N. Bioengineering considerations in liver regenerative medicine // *J. Biol. Eng.* 2017. Vol. 11, № 6. doi: 10.1186/s13036-017-0081-4
2. Meyburg J., Hoffmann G.F. Liver cell transplantation for the treatment of inborn errors of metabolism // *J. Inherit. Metab. Dis.* 2008. Vol. 31, N 2. P. 164–172. doi: 10.1007/s10545-008-0829-6
3. Baccarani U., Adani G.L., Sainz M., et al. Human hepatocyte transplantation for acute liver failure: state of the art and analysis of cell sources // *Transplant. Proc.* 2005. Vol. 37, N 6. P. 2702–04. doi: 10.1016/j.transproceed.2005.06.027
4. Akbari S., Sevinç G.G., Ersoy N., et al. Robust, long-term culture of endoderm-derived hepatic organoids for disease modeling // *Stem Cell Reports.* 2019. Vol. 13, N 4. P. 627–641. doi: 10.1016/j.stemcr.2019.08.007
5. Cao L., Wang J., Bo L., et al. Effects of hypoxia on the growth and development of the fetal ovine hepatocytes in primary culture // *Biomed. Environ. Sci.* 2019. Vol. 32, N 8. P. 592–601. doi: 10.3967/bes2019.077
6. Nicolas C.T., Hickey R.D., Chen H.S., et al. Concise review: liver regenerative medicine: from hepatocyte transplantation to bioarti-

1. ficial livers and bioengineered grafts // *Stem Cells.* 2017. Vol. 35, N 1. P. 42–50. doi: 10.1002/stem.2500
7. Olsavsky Goyak K.M., Laurenzana E.M., Omiecinski C.J. Hepatocyte differentiation // *Methods Mol. Biol.* 2010. Vol. 640. P. 115–38. doi: 10.1007/978-1-60761-688-7_6
8. Sica V., Galluzzi L., Bravo-San Pedro J.M., et al. Organelle-specific initiation of autophagy // *Mol. Cell.* 2015. Vol. 59, N 4. P. 522–39. doi: 10.1016/j.molcel.2015.07.021
9. Kroemer G., Jäättelä M. Lysosomes and autophagy in cell death control // *Nat. Rev. Cancer.* 2005. Vol. 5, N 11. P. 886–97. doi: 10.1038/nrc1738
10. Ha J., Guan K.L., Kim J. AMPK and autophagy in glucose/glycogen metabolism // *Mol. Aspects Med.* 2015. Vol. 46. P. 46–62. doi: 10.1016/j.mam.2015.08.002
11. He L., Zhang J., Zhao J., et al. Autophagy: the last defense against cellular nutritional stress. *Adv. Nutr.* 2018. Vol. 9, N 4. P. 493–504. doi: 10.1093/advances/nmy011
12. Krause P., Unthan-Fechner K., Probst I., Koenig S. Cultured hepatocytes adopt progenitor characteristics and display bipotent capacity to repopulate the liver // *Cell Transplant.* 2014. Vol. 23, N 7. P. 805–17. doi: 10.3727/096368913X664856

REFERENCES

1. Ogoke O, Oluwole J, Parashurama N. Bioengineering considerations in liver regenerative medicine. *J. Biol. Eng.* 2017;11:6. doi: 10.1186/s13036-017-0081-4
2. Meyburg J, Hoffmann GF. Liver cell transplantation for the treatment of inborn errors of metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2008; 31(2):164–172. doi: 10.1007/s10545-008-0829-6
3. Baccarani U, Adani GL, Sainz M, et al. Human hepatocyte transplantation for acute liver failure: state of the art and analysis of cell sources. *Transplant. Proc.* 2005;37(6):2702–04. doi: 10.1016/j.transproceed.2005.06.027
4. Akbari S, Sevinç GG, Ersoy N, et al. Robust, long-term culture of endoderm-derived hepatic organoids for disease modeling. *Stem Cell Reports.* 2019;13(4):627–641. doi: 10.1016/j.stemcr.2019.08.007
5. Cao L, Wang J, Bo L, et al. Effects of hypoxia on the growth and development of the fetal ovine hepatocytes in primary culture. *Biomed. Environ. Sci.* 2019;32(8):592–601. doi: 10.3967/bes2019.077
6. Nicolas CT, Hickey RD, Chen HS, et al. Concise review: liver regenerative medicine: from hepatocyte transplantation to bioartificial livers and bioengineered grafts. *Stem Cells.* 2017;35(1):42–50. doi: 10.1002/stem.2500
7. Olsavsky Goyak KM, Laurenzana EM, Omiecinski CJ. Hepatocyte differentiation. *Methods Mol. Biol.* 2010;640:115–38. doi: 10.1007/978-1-60761-688-7_6
8. Sica V, Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, et al. Organelle-specific initiation of autophagy. *Mol. Cell.* 2015;59(4):522–39. doi: 10.1016/j.molcel.2015.07.021
9. Kroemer G, Jäättelä M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat. Rev. Cancer.* 2005;5(11):886–97. doi: 10.1038/nrc1738
10. Ha J, Guan KL, Kim J. AMPK and autophagy in glucose/glycogen metabolism. *Mol. Aspects Med.* 2015;46:46–62. doi: 10.1016/j.mam.2015.08.002
11. He L, Zhang J, Zhao J, et al. Autophagy: the last defense against cellular nutritional stress. *Adv. Nutr.* 2018;9(4):493–504. doi: 10.1093/advances/nmy011
12. Krause P, Unthan-Fechner K, Probst I, Koenig S. Cultured hepatocytes adopt progenitor characteristics and display bipotent capacity to repopulate the liver. *Cell Transplant.* 2014;23(7):805–17. doi: 10.3727/096368913X664856

ОБ АВТОРАХ

***Бгатова Наталия Петровна**, д.биол.н.; профессор;
адрес: 630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4507-093X>;
eLibrary SPIN: 3723-1316; e-mail: nataliya.bgatova@yandex.ru

Досымбекова Раушан Сарсенбаевна, д.биол.н.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5241-1926>;
eLibrary SPIN: 3723-1316; e-mail: dos.raushan@mail.ru

Таскаева Юлия Сергеевна, к.м.н.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2812-2574>;
eLibrary SPIN: 7154-4540; e-mail: inabrite@yandex.ru

Мирошниченко Светлана Михайловна;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6740-8241>;
eLibrary SPIN: 6147-2989; e-mail: svmiro@yandex.ru

Князев Роман Александрович, к. биол. н.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2678-8783>;
eLibrary SPIN: 7401-5637;
e-mail: knjazev_roman@mail.ru

Соловьёва Анастасия Олеговна, к. биол. н.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7740-8456>;
eLibrary SPIN: 5351-2406;
e-mail: solovevaao@gmail.com

Шарипов Камалидин Орынбаевич, д. биол. н., профессор;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5946-5521>;
eLibrary SPIN: 1085-4647;
e-mail: skamalidin@mail.ru

Тунгушбаева Зина Байбагусовна, д. биол. н., профессор;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4432-0658>;
eLibrary SPIN: 6045-6416;
e-mail: alua2002@yandex.kz

AUTHORS INFO:

***Nataliya P. Bgatova**, MD, Dr. Sci. (Biol.), Prof.;
Adress: 2, Timakova str., 630060, Novosibirsk, Russia;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4507-093X>;
eLibrary SPIN: 3723-1316; e-mail: nataliya.bgatova@yandex.ru

Raushan S. Dossymbekova, MD, Dr. Sci. (Biol.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5241-1926>;
eLibrary SPIN: 3723-1316;
e-mail: dos.raushan@mail.ru

Julia S. Taskaeva, MD, Cand. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2812-2574>;
eLibrary SPIN: 7154-4540; e-mail: inabrite@yandex.ru

Svetlana M. Miroshnichenko;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6740-8241>;
eLibrary SPIN: 6147-2989; e-mail: svmiro@yandex.ru

Roman A. Knyazev, MD, Cand. Sci. (Biol.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2678-8783>;
eLibrary SPIN: 7401-5637;
e-mail: knjazev_roman@mail.ru

Anastasia O. Solovieva, MD, Cand. Sci. (Biol.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7740-8456>;
eLibrary SPIN: 5351-2406;
e-mail: solovevaao@gmail.com

Kamalidin O. Sharipov, MD, Dr. Sci. (Biol.), Prof.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5946-5521>;
eLibrary SPIN: 1085-4647;
E-mail: skamalidin@mail.ru

Zina B. Tungushbaeva, MD, Dr. Sci. (Biol.), Prof.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4432-0658>;
eLibrary SPIN: 6045-6416;
e-mail: alua2002@yandex.kz

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

DOI: <https://doi.org/10.17816/1026-3543-2021-159-1-13-19>

Моноаминоксидаза Б в развивающихся гистаминергических нейронах мозга крысы

С.М. Зиматкин, А.В. Заерко

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Гистаминергические нейроны мозга играют важную роль в регуляции многих функций, систем и реакций организма, а также в патогенезе многих патологических состояний и заболеваний. В головном мозге гистамин выполняет функции нейромедиатора и локализуется главным образом в гистаминергических нейронах. Все гистаминергические нейроны гипоталамуса, в отличие от других типов нейронов, имеют высокую активность моноаминоксидазы типа Б (МАО Б), которая является ключевым ферментом метаболизма гистамина в мозге.

Цель. Параллельная оценка активности и иммунореактивности МАО Б в гистаминергических нейронах гипоталамуса крыс в динамике постнатального онтогенеза.

Материал и методы. Исследование проведено на образцах гипоталамуса 5-, 10-, 20-, 45- и 90-суточного потомства беспородных белых крыс (45 крысят) с учётом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Срезы гипоталамуса обрабатывали гистохимически на выявление активности МАО Б и иммуногистохимически с использованием антител к МАО Б.

Результаты. Установлено, что активность и иммунореактивность фермента окислительного дезаминирования гистамина и маркерного фермента гистаминергических нейронов гипоталамуса МАО Б в цитоплазме гистаминергических нейронов на 5-е сут после рождения не выявляются, а затем с 10-х по 90-е сут постнатального онтогенеза параллельно нарастают.

Выводы. Синхронность постнатального развития активности и иммунореактивности МАО Б в гистаминергических нейронах мозга свидетельствует о параллельном накоплении в них белка МАО Б и росте его ферментативной активности, отражающих становление их специфического, медиаторного метаболизма.

Ключевые слова: моноаминоксидаза Б; гистаминергические нейроны; головной мозг; гипоталамус.

Как цитировать:

Зиматкин С.М., Заерко А.В. Моноаминоксидаза Б в развивающихся гистаминергических нейронах мозга крысы // Морфология. 2021. Т. 159, №1. С. 13–19. DOI: <http://doi.org/10.17816/1026-3543-2021-159-1-13-19>

DOI: <https://doi.org/10.17816/1026-3543-2021-159-1-13-19>

Monoamine oxidase B in developing histaminergic neurons of the rat brain

Sergei M. Zimatkin, Anastasia V. Zaerko

Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

ABSTRACT

BACKGROUND: Histaminergic neurons of the brain play an important role in the regulation of many functions, systems, and reactions of the body, as well as in the pathogenesis of many pathological conditions and diseases. In the brain, histamine acts as a neurotransmitter and is localized mainly in histaminergic neurons. All histaminergic neurons of the hypothalamus, unlike other types of neurons, have high activity of monoamine oxidase type B (MAO B) which is a key enzyme of histamine metabolism in the brain.

AIM: The work aimed to perform parallel assessment of MAO B activity and immunoreactivity in rat hypothalamus histaminergic neurons in the process of postnatal ontogenesis.

MATERIALS AND METHODS: The study was conducted on samples of the hypothalamus of 5, 10, 20, 45, and 90 days old offspring of outbred white rats (45 rats), conforming to the "Guidelines for the Use of Animals in Research". Sections of the hypothalamus were processed histochemically to detect MAO B activity and immunohistochemically using antibodies to MAO B.

RESULTS: It was revealed that the activity and immunoreactivity of the enzyme of histamine oxidative deamination and the marker enzyme of the hypothalamic histaminergic neurons, monoamine oxidase type B were not detected in cytoplasm of histaminergic neurons on the day 5 after birth. Then these indicators were simultaneously increasing from the day 10 to the day 90 of postnatal ontogenesis.

CONCLUSIONS: The synchronism of the postnatal development of MAO B activity and immunoreactivity in histaminergic neurons of the brain indicates a parallel accumulation of MAO B protein and its enzymatic activity, reflecting the formation of their specific, mediator metabolism.

Keywords: monoamine oxidase B; histaminergic neurons; brain, hypothalamus.

To cite this article:

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

DOI: <http://doi.org/10.17816/1026-3543-2021-159-1-13-19>

Received: 19.01.2021

Accepted: 10.12.2021

Published: 04.03.2022

Гистаминергические нейроны мозга играют важную роль в регуляции многих функций, систем и реакций организма: нейроэндокринной и сердечно-сосудистой, кровотока мозга, температуры тела, сна и бодрствования, пищевого и питьевого поведения, памяти и обучения, а также в патогенезе многих патологических состояний и заболеваний [1–5]. В головном мозге гистамин выполняет функции нейромедиатора и локализуется главным образом в гистаминергических нейронах; небольшое количество гистамина находится в тучных клетках оболочек мозга и прослоек рыхлой соединительной ткани [2, 4]. Тела гистаминергических нейронов мозга млекопитающих локализируются только в заднем гипоталамусе, где образуют пять скоплений – ядер (E1–E5) [1, 6]. При этом аксоны гистаминергических нейронов распространяются во все отделы мозга, где могут координировать другие нейронные системы [7–9].

Моноаминоксидаза типа Б (МАО Б) является ключевым ферментом метаболизма гистамина в мозге, где отсутствует гистаминоксидаза (гистаминаза), окисляющая до 40% гистамина на периферии. Метаболизм – единственный способ удаления гистамина после завершения нейротрансдачи гистаминергическими нейронами мозга, поскольку система обратного захвата гистамина в них отсутствует, в отличие от других типов аминергических нейронов, имеющих специфические транспортёры своих медиаторов для их обратного захвата [1, 5]. Гистамин метаболизируется ферментом гистамин-N-метилтрансферазой до теле-метилгистамина, который затем превращается с помощью МАО Б (окислительное дезаминирование) в N-теле-метилимидазолацетальдегид. Установлено, что все гистаминергические нейроны гипоталамуса, в отличие от других типов нейронов, имеют высокую активность МАО Б [1]. Другие типы нейронов гипоталамуса МАО Б не содержат, что послужило основанием для разработки нами гистохимического и иммуногистохимического методов выявления гистаминергических нейронов гипоталамуса, соответственно, в криостатных и парафиновых срезах [1, 10]. Представляло интерес сочетанное применение этих двух методов для параллельного выявления содержания ферментного белка и активности МАО Б для оценки становления специфического, медиаторного метаболизма в развивающихся гистаминергических нейронах мозга крысы.

Цель. Параллельная оценка активности и иммунореактивности МАО Б в гистаминергических нейронах гипоталамуса крыс в динамике постнатального онтогенеза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Опыты выполнены на 12 самках беспородных белых крыс с начальной массой 230 ± 20 г и их потомстве

(всего 45 крысят). Все опыты проведены с учётом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». На данное исследование получено разрешение комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета (протокол №1 от 30.01.2018). Декапитация крысят осуществлялась на 5-е, 10-е, 20-е, 45-е и 90-е сут после рождения. При этом быстро извлекали головной мозг, вырезали гипоталамус и замораживали его в жидком азоте. С помощью криостата CM 1850 (Leica Microsystems GmbH, Германия) готовили серийные криостатные срезы толщиной 12 мкм, которые обрабатывали гистохимически на выявление активности МАО Б [Зиматкин С.М., 2015]. Другие кусочки гипоталамуса фиксировали в цинк-этанол-формалине при +4 °С (на ночь), а затем заключали в парафин. С помощью микротомы (LeicaRM 2125 RTS, Германия) изготавливали серийные парафиновые срезы толщиной 5 мкм и монтировали их на предметные стёкла. Затем их обрабатывали первичными поликлональными кроличьими антителами против МАО Б (Elabscience, cat.No.EPP15673, Китай) в разведении 1:100, при +4 °С, 20 ч, во влажной камере. Связавшиеся первичные антитела выявляли с помощью набора детекции (Elabscience cat.No. E-IR-R213, Китай). Гистологические и гистохимические препараты изучали, фотографировали и анализировали с помощью микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), встроенной цифровой видеокамеры Leica (DFC 320, Германия) при увеличении объектива микроскопа $\times 40$, а также программы компьютерного анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США). Полученные данные обрабатывали методами непараметрической статистики с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., США). Сравнение групп по одному признаку проводили с помощью критерия Манна-Уитни для независимых выборок (Mann-Whitney U-test). Различия между группами считали статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5% ($p < 0,05$, где p – критическое значение уровня значимости).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При гистохимическом исследовании установлено, что активность маркерного фермента гистаминергических нейронов гипоталамуса МАО Б на 5-е сут после рождения не выявляется, на 10-е сут она очень низка, а затем прогрессивно нарастает, становясь на 90-е сут в 6 раз выше 10-суточной. Аналогичные данные получены и при иммуногистохимическом исследовании: с 10-х по 90-е сут постнатального развития иммунореактивность МАО Б в гистаминергических нейронах возрастает в 4 раза (рис. 1, 2).

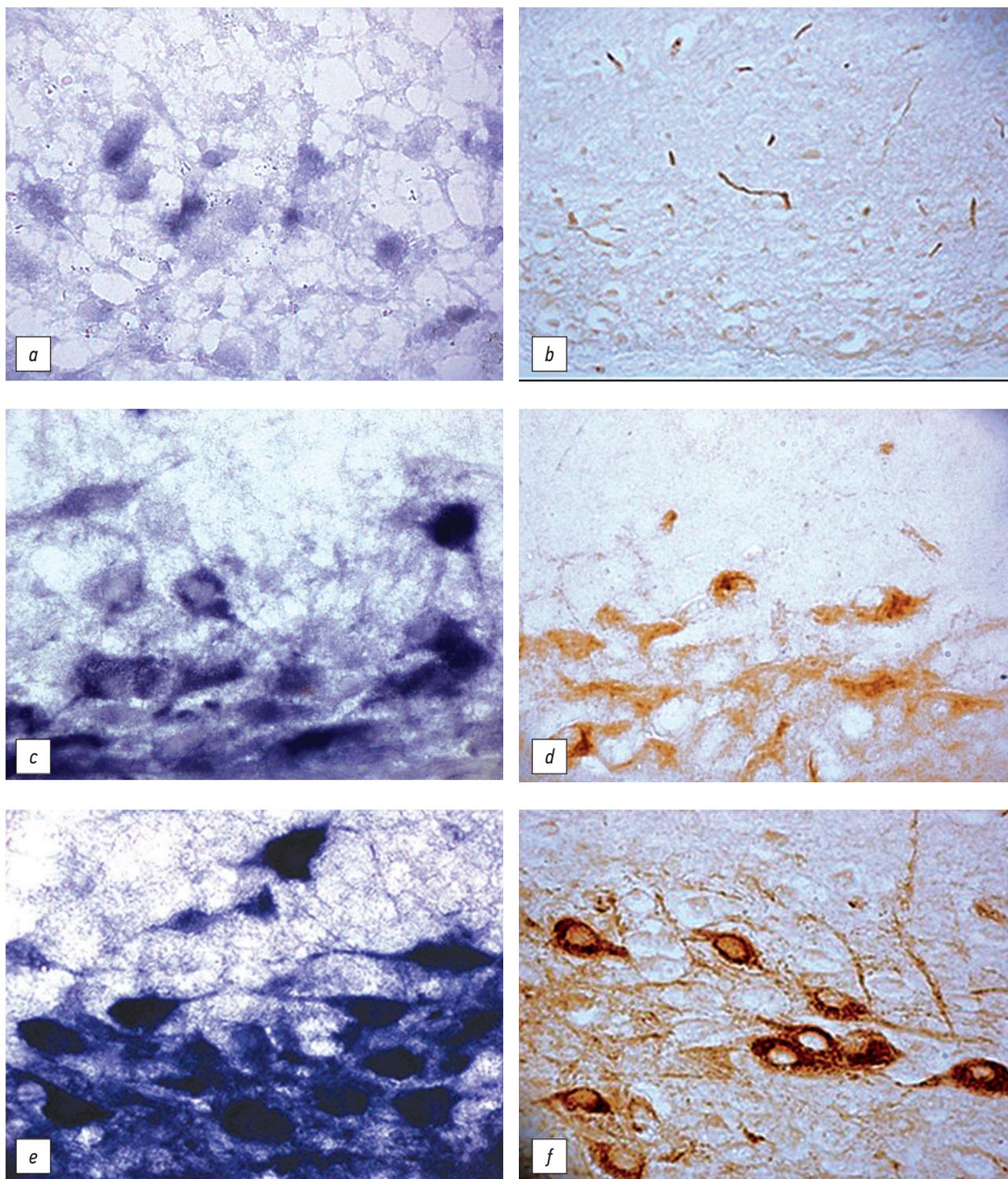


Рис. 1. MAO B в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса крыс в постнатальном онтогенезе: (a, c, e – гистохимический метод выявления активности MAO B (по Зиматкину, Цыдику); b, d, f – иммуногистохимический метод выявления белка MAO B (по Зиматкину, Заерко); a, b – 10-е сут, c, d – 20-е сут; e, f – 90-е сут постнатального развития. Цифровая микрофотография. Ув. 400)

Fig. 1. MAO B in histaminergic neurons of the nucleus E2 of the rat hypothalamus in postnatal ontogenesis: (a, c, e – histochemical method for detecting MAO B activity (according to Zimatkin, Tsydik); b, d, f – immunohistochemical method for detecting protein MAO B (according to Zimatkin, Zaerko); a, b – day 10; c, d – day 20; e, f – day 90 of postnatal development. Digital micrograph. Magnification by 400)

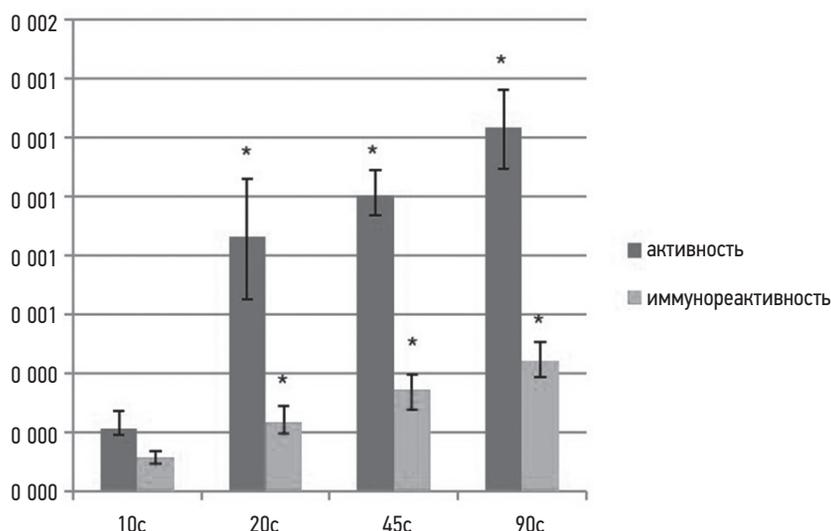


Рис. 2. Активность и иммунореактивность MAO B в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса крыс в динамике постнатального онтогенеза. Оптическая плотность цитоплазмы нейронов при гистохимическом и иммуногистохимическом методе выявления MAO B. * $p < 0,05$ при сравнении каждого срока с предыдущим

Fig. 2. Activity and immunoreactivity of MAO B in histaminergic neurons of the nucleus E2 of the rat hypothalamus in the process of postnatal ontogenesis. The optical density of the neuron cytoplasm in the histochemical and immunohistochemical method for detection of MAO B. * $p < 0.05$ when comparing each term with the previous one

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами данные согласуются с результатами Leung и др. (1993), которые измеряли различия в региональной активности MAO A и MAO B во время постнатального развития у крыс линии Вистар и установили, что активность MAO B в гипоталамусе, полосатом теле, среднем мозге и коре больших полушарий была низкой на 5-й день, а затем, по мере развития мозга, заметно возрастала [11]. Таким образом, MAO B, фермент метаболизма гистамина и маркер гистаминергических нейронов, на 5-е сут постнатального развития не выявляется, что может свидетельствовать о низком окислительном дезаминировании гистамина в исследуемых нейронах. Однако в это время в головном мозге наблюдается пик концентрации гистамина [12], который объясняется резким увеличением числа тучных клеток [5, 13] в промежуточном парусе между развивающимися таламусом и гиппокампом [13]. Роль гистамина мастоцитов в головном мозге неясна, хотя в раннем постнатальном онтогенезе эти клетки ответственны за формирование значительной части общего пула данного биогенного амина в мозге [5]. Общее содержание гистамина, вырабатываемого тучными клетками, в возрасте примерно 2 нед. постнатального развития постепенно снижается до уровня, характерного для взрослых

особей. Снижение синтеза гистамина в тучных клетках обусловлено созреванием гистаминергических нейронов туберомамиллярной области, которые также начинают его вырабатывать [14]. Это согласуется с нашими данными о прогрессивном нарастании в этих нейронах MAO B в период с 10-х по 90-е сут постнатального развития крысы. Это отражает становление медиаторной активности развивающихся гистаминергических нейронов мозга. Синхронность постнатального развития активности и иммунореактивности MAO B в гистаминергических нейронах мозга свидетельствует о параллельном накоплении в нейронах белка MAO B и росте его ферментативной активности. При наличии разработанных гистохимических и иммуногистохимических методов такой подход можно использовать и при исследованиях других ферментов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С 5-х по 90-е сут постнатального онтогенеза в цитоплазме гистаминергических нейронов гипоталамуса крысы параллельно нарастает активность и иммунореактивность фермента окислительного дезаминирования гистамина MAO B, что отражает становление в них специфического, медиаторного метаболизма.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFO

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Концепция и дизайн исследования: Зиматкин С.М. Сбор и обработка материала, статистическая

обработка данных: Заерко А.В. Анализ и интерпретация данных, написание текста: Зиматкин С.М., Заерко А.В.

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

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Author contribution. Research concept and design: Zimatkin S.M. Collection and processing of material, statistical processing of data: Zaerko A.V. Data analysis and interpretation, text writing: Zimatkin S.M., Zaerko A.V.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зиматкин С.М. Гистаминергические нейроны мозга. Мн.: Новое знание, 2015. 319 с.
2. Brown R.E., Stevens D.R., Haas H.L. The physiology of brain histamine // *Prog. Neurobiol.* 2001. Vol. 63. P. 637–672.
3. Haas H.L., Sergeeva O.A., Selbach O. Histamine in the nervous system // *Physiol. Rev.* 2008. Vol. 88. P. 1183–1241.
4. Haas H., Panula P. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system // *Nat. Rev. Neurosci.* 2003. Vol. 4. P. 121–130. doi: 10.1038/nrn1034
5. Panula P., Nuutinen S. The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease // *Nat. Rev. Neurosci.* 2013. Vol. 14. P. 472–487. doi: 10.1038/nrn3526
6. Inagaki N., Toda K., Taniuchi I., et al. The five subgroups of the tuberomammillary nucleus of the rat: an analysis of the histaminergic efferent projections to the medial preoptic area and inferior colliculus // *Exp. Brain Res.* 1990. Vol. 80. P. 374–380.
7. Airaksinen M.S., Flügge G., Fuchs E., Panula P. Histaminergic system in the tree shrew brain // *J. Comp. Neurol.* 1989. Vol. 286. P. 289–310.
8. Inagaki N., Yamatodani A., Shinoda K., et al. Histaminergic nerve fibers in the median eminence and hypophysis of rats demonstrated

immunocytochemically with antibodies against histidine decarboxylase and histamine // *Brain Res.* 1988. Vol. 439. P. 402–405.

9. Panula P., Yang H.Y., Costa E. Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1984. Vol. 81. P. 2572–76.

10. Зиматкин С.М., Заерко А.В. Методика выявления гистаминергических нейронов гипоталамуса // *Морфология.* 2019. Т. 156, № 4. С. 102–105.

11. Leung T.K., Lim L., Lai J.C. Brain Regional Distributions of Monoamine Oxidase Activities in Postnatal Development in Normal and Chronically Manganese-Treated Rats // *Metab Brain Dis.* 1993. Vol. 8, № 3. P. 137–149.

12. Karlstedt K., Senkas A., Ahman M., Panula P. Regional expression of the histamine H-2 receptor in adult and developing rat brain // *Neuroscience.* 2001. Vol. 102. P. 201–208.

13. Auvinen S., Panula P. Development of histamine-immunoreactive neurons in the rat brain // *J. Comp. Neurol.* 1988. № 276. P. 289–303.

14. Panula P., Sundvik M., Karlstedt K. Developmental roles of brain histamine // *Trends in neuroscience.* 2014. Vol. 37. P. 159–168. doi: 10.1016/j.tins.2014.01.001

REFERENCES

1. Zimatkin SM. Histaminergic brain neurons. Mn.: Novoe znanie, 2015. 319 p. (In Russ).
2. Brown RE, Stevens DR, Haas HL. The physiology of brain histamine. *Prog. Neurobiol.* 2001;63:637–672.
3. Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O. Histamine in the nervous system. *Physiol. Rev.* 2008;88:1183–1241.
4. Haas H, Panula P. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003;4:121–130. doi: 10.1038/nrn1034
5. Panula P, Nuutinen S. The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2013;14:472–487. doi: 10.1038/nrn3526
6. Inagaki N, Toda K, Taniuchi I, et al. The five subgroups of the tuberomammillary nucleus of the rat: an analysis of the histaminergic efferent projections to the medial preoptic area and inferior colliculus. *Exp. Brain Res.* 1990;80:374–380.
7. Airaksinen MS, Flügge G, Fuchs E, Panula P. Histaminergic system in the tree shrew brain. *J. Comp. Neurol.* 1989;286:289–310.
8. Inagaki N, Yamatodani A, Shinoda K, et al. Histaminergic nerve fibers in the median eminence and hypophysis of rats

demonstrated immunocytochemically with antibodies against histidine decarboxylase and histamine. *Brain Res.* 1988;439:402–405.

9. Panula P, Yang HY, Costa E. Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1984;81:2572–76.

10. Zimatkin SM, Zaerko AV. Method for brain histaminergic neurons visualization. *Morfologiya.* 2019;4:102–105 (In Russ).

11. Leung TK, Lim L, Lai JC. Brain Regional Distributions of Monoamine Oxidase Activities in Postnatal Development in Normal and Chronically Manganese-Treated Rats. *Metab Brain Dis.* 1993;8(3):137–149.

12. Karlstedt K, Senkas A, Ahman M, Panula P. Regional expression of the histamine H-2 receptor in adult and developing rat brain. *Neuroscience.* 2001;102:201–208.

13. Auvinen S, Panula P. Development of histamine-immunoreactive neurons in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 1988;276:289–303.

14. Panula P, Sundvik M, Karlstedt K. Developmental roles of brain histamine. *Trends in neuroscience.* 2014;37:159–168. doi: 10.1016/j.tins.2014.01.001

ОБ АВТОРАХ

***Зиматкин Сергей Михайлович**, д. биол. н., проф.;
адрес: 230015, Беларусь, Гродно, ул. Горького, 80;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5728-2588>;
eLibrary SPIN: 3592-5636;
e-mail: smzimatkin@mail.ru

Заерко Анастасия Викторовна;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6155-040X>;
e-mail: wersall_91@mail.ru

AUTHORS INFO

***Sergey M. Zimatkin**, MD., Dr. Sci. (Biol.), Prof.;
address: 80 Gorkogo Street, Grodno, 230015, Belarus;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5728-2588>;
eLibrary SPIN: 3592-5636;
e-mail: smzimatkin@mail.ru

Anastasiya V. Zaerko;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6155-040X>;
e-mail: wersall_91@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Онлайн Академия «Эко-Вектор»

Расскажем всё, что нужно знать о публикациях в научных журналах!
Мы мотивируем ученого на подвиги!

Приглашаем авторов научных статей, рецензентов, членов редакционных коллегий и всех, кто заинтересован, на онлайн курсы:

1. «Публикации в международных научных журналах»

Преподаватели: Сергей Адонин, Максим Юркин.
5 модулей: онлайн-занятия, тесты, практические задания.
Программа 16 ак.часов.
По итогам сертификат слушателя курса.

2. «Основы академического письма» на английском языке

Преподаватель: Женя Бакин.
4 модуля с практическими онлайн занятиями.
Программа 8 ак.часов.
По итогам сертификат слушателя курса.

3. «Школа научного редактора»

Преподаватели: Руслан Сайгитов, Юрий Филиппов.
5 модулей теории и практики: онлайн-занятия, тесты, практические задания.
Программа 16 ак.часов.
По итогам сертификат слушателя курса.

4. «Статистика в научной публикации»

Преподаватель: Сергей Мыльников.
6 модулей: онлайн-занятия, тесты, практические задания.
Программа 18 ак.часов.
По итогам сертификат слушателя курса.



Ознакомиться с программой курса и записаться можно на сайте: <https://school.ecovector-academy.com/courseacademy> или по QR-коду

DOI: <https://doi.org/10.17816/1026-3543-2021-159-1-21-28>

Имунофенотипическая характеристика экспрессии индуцибельной NO-синтазы в зубчатой извилине крыс зрелого возраста при моделировании депрессии и её фармакологической коррекции

А.В. Смирнов¹, М.Р. Экова¹, И.Н. Тюренков², Е.В. Волотова²¹Волгоградский медицинский научный центр, Волгоград, Российская Федерация;²Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Цель. Выявление особенностей экспрессии индуцибельной NO-синтазы (iNOS) в зубчатой извилине у крыс зрелого возраста при моделировании депрессии, а также установление возможности фармакологической коррекции выявленных изменений фенибутом и соединениями под лабораторными шифрами РГПУ-189, РГПУ-135.

Материал и методы. Депрессивноподобное поведение у животных моделировали путём сочетания таких видов стрессового воздействия, как громкий звук, пульсирующий яркий свет, вибрация, которые действовали на фоне постоянного ограничения подвижности и колебания температуры среды в течение 7 дней (ежедневно по 30 мин). Оценка изменений уровня экспрессии iNOS в зубчатой извилине определяли путём подсчёта относительной площади иммунореактивного материала (ИРМ) и интенсивности окрашивания в баллах от 0 до 3.

Результаты. У крыс с экспериментальной депрессией, по сравнению с контрольной группой, отмечалось увеличение степени экспрессии iNOS-ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов гранулярного слоя зубчатой извилины, а также увеличение относительной площади iNOS-ИРМ в нейропиле и нервных клетках. Применение соединения РГПУ-189 (салифен) в большей степени продемонстрировало корректирующее действие, поскольку у крыс в цитоплазме перикарионов нейронов гранулярного слоя зубчатой извилины наблюдалось снижение степени экспрессии iNOS-ИРМ, а также снижение относительной площади iNOS-ИРМ в нейропиле и нервных клетках, что соответствовало значениям данных параметров в контрольной группе животных.

Выводы. При экспериментальном моделировании депрессии у крыс зрелого возраста в зубчатой извилине обнаружено увеличение уровня экспрессии iNOS-ИРМ, снижение которого отмечалось при фармакологической коррекции соединением РГПУ-189 (салифен), что может свидетельствовать о преобладающем нейропротективном влиянии данного соединения на ГАМК-ергические механизмы нейротрансмиссии.

Ключевые слова: депрессия; зубчатая извилина; iNOS, крыса.

Как цитировать:

Смирнов А.В., Экова М.Р., Тюренков И.Н., Волотова Е.В. Имунофенотипическая характеристика экспрессии индуцибельной NO-синтазы в зубчатой извилине крыс зрелого возраста при моделировании депрессии и её фармакологической коррекции // Морфология. 2021. Т. 159, №1 С. 21–28.

DOI: <https://doi.org/10.17816/1026-3543-2021-159-1-21-28>

DOI: <https://doi.org/10.17816/1026-3542-2021-159-1-21-28>

Immunophenotypic characteristics of inducible NO synthase expression in dentate gyrus of mature rats in modeling depression and its pharmacological correction

Alexey V. Smirnov¹, Maria R. Ekova¹, Ivan N. Tyurenkov², Elena V. Volotova²

¹Volgograd Medical Research Center, Volgograd, Russian Federation;

²Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

ABSTRACT

AIM: The work aimed to investigate inducible NO synthase (iNOS) expression in dentate gyrus in mature rats when modeling depression, as well as to establish the pharmacological correction possibility of detected changes with Phenibut and compounds under laboratory codes of RSPU-189, RSPU-135.

MATERIALS AND METHODS: Depressive-like behavior in animals was modeled by combining stressful stimuli such as loud sound, pulsating bright light, and vibration simultaneous with constant restriction of mobility and fluctuations in temperature of environment for 7 days (daily for 30 minutes). Changes in level of iNOS expression in dentate gyrus were assessed by calculating relative area of immunoreactive material (IRM) and staining intensity in points from 0 to 3.

RESULTS: Compared with the control group, rats with experimental depression showed an increase in expression of iNOS-IRM in cytoplasm of neuronal perikarya in granular layer of dentate gyrus, as well as an increase in relative area of iNOS-IRM in neuropil and nerve cells. The use of the compound RSPU-189 (salifen) demonstrated to a greater extent the corrective effect, since in the cytoplasm of neuronal perikarya in granular layer of dentate gyrus of rats, there was a decrease in the expression of iNOS-IRM, as well as a decrease in the relative area of iNOS-IRM in neuropil and nerve cells, which corresponded to values of these parameters in the control group of animals.

CONCLUSIONS: An experimental modeling of depression in dentate gyrus of mature rats revealed an increase of iNOS-IRM expression, the decrease of which was noted in its pharmacological correction with the compound RSPU-189 (salifen), which may indicate the predominant neuroprotective effect of this compound on GABAergic neurotransmission mechanisms.

Keywords: depression; dentate gyrus; iNOS, rat.

To cite this article:

Smirnov AV, Ekova MR, Tyurenkov IN, Volotova EV. Immunophenotypic characteristics of inducible NO synthase expression in dentate gyrus of mature rats in modeling depression and its pharmacological correction. *Morphology*. 2021;159(1):21–28.

DOI: <https://doi.org/10.17816/1026-3543-2021-159-1-21-28>

Received: 19.01.2021

Accepted: 10.11.2021

Published: 04.03.2022

Депрессия привлекает всё больше внимания, поскольку не только усложняет прогноз многих хронических заболеваний, но и рассматривается в качестве одной из наиболее распространённых причин снижения трудоспособности населения [1, 2]. Формирование депрессивного состояния [3] наблюдается при смешанных тревожно-депрессивных расстройствах, деменциях различного генеза, болезни Паркинсона, эпилепсии, соматической патологии, реакциях на тяжёлый стресс, расстройствах адаптации, старении [2]. Наряду с генетическими факторами (около 40%) внешние факторы окружающей среды, такие как, например, стрессовые события, считаются вовлечёнными в начало депрессии [1]. Стрессовые события в свою очередь могут вызывать ряд психологических и физиологических изменений, включая активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и симпатической нервной системы, которые можно назвать реакциями на психологический стресс [2].

Хронический стресс вызывает снижение экспрессии нейротрофических факторов в головном мозге, ингибирует нейрогенез и ведёт к уменьшению общего количества нейронов в зубчатой извилине [2, 4]. Снижение уровня нейрогенеза в зубчатой извилине может оказывать влияние на уменьшение объёма гиппокампа, которое наблюдается у пациентов с большим депрессивным расстройством, что в свою очередь приводит к снижению гиппокампозависимых функций головного мозга [5].

Доклинические исследования продемонстрировали, что вызванное стрессом и глюкокортикоидами подавление нейрогенеза в зубчатой извилине может быть предотвращено или отменено антидепрессантами, которые также обладают прямыми нейрогенными эффектами [5, 6]. Кроме того, было показано, что сигнальный путь синтеза оксида азота (NO) играет решающую роль в нейробиологии стресса и депрессии [7, 8]. NO синтезируется из L-аргинина посредством фермента NO-синтазы (NOS). Существует 3 изоформы NOS: нейрональная NOS (nNOS), индуцибельная NOS (iNOS) и эндотелиальная NOS (eNOS). Ингибиторы NOS, например L-NAME (неспецифический ингибитор NOS), амингуанидин (специфический ингибитор iNOS), 7-нитроиндазол (специфический ингибитор nNOS) оказывают антидепрессивное и анксиолитическое действие, некоторые антидепрессанты, такие как пароксетин, ингибируют активность NOS [8]. Таким образом, исследование морфофункциональных изменений в ЦНС при депрессии и её фармакологической коррекции, препаратами, модулирующими пути синтеза NO, может способствовать формированию новых терапевтических стратегий лечения депрессии.

Целью исследования явилось выявить особенности экспрессии индуцибельной NO-синтазы в зубчатой извилине у крыс зрелого возраста при моделировании депрессии, а также установить возможность фармакологической коррекции выявленных изменений фенибутом и соединениями под лабораторными шифрами РГПУ-189, РГПУ-135.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 50 нелинейных белых крысах-самцах в возрасте 12 мес (ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово»» РАМН, Ленинградская область) с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных», Хельсинкской декларации (1975, 2000 г.). Депрессивноподобное поведение у животных моделировали путём сочетания таких видов стрессового воздействия, как громкий звук, пульсирующий яркий свет, вибрация, которые действовали на фоне постоянного ограничения подвижности и колебания температуры среды в течение 7 дней (ежедневно по 30 мин). Стрессоры были непредсказуемыми для животных, а моделирование депрессии у животных осуществлялось в специальной камере, содержащей 6 изолированных отсеков. При использовании данной модели у животных наблюдались симптомы депрессивноподобного поведения, имеющие выраженное феноменологическое сходство с клинической картиной депрессии: тревожность, поведенческие корреляты отчаяния, гиподинамия, ангедония, аналогичные описанным ранее [9].

Животные были разделены на 5 групп:

- 1-я группа ($n=10$) – контрольные крысы,
- 2-я группа ($n=10$) – крысы с экспериментальной депрессией,
- 3-я группа ($n=10$) – крысы с экспериментальной депрессией, получавшие фенибут,
- 4-я группа – крысы с экспериментальной депрессией, получавшие соединение с лабораторным шифром РГПУ-189 (салифен – производное гамма-аминоасляной кислоты (ГАМК), композиция фенибута с салициловой кислотой),
- 5-я группа – крысы с экспериментальной депрессией, получавшие соединение с лабораторным шифром РГПУ-135 (нейроглутам – β -фенильное производное глутаминовой кислоты).

Исследуемые вещества вводили внутривентрикулярно за 1 ч до моделирования депрессивного состояния в следующих дозах: фенибут 25 мг/кг, РГПУ-189 30 мг/кг, РГПУ-135 26 мг/кг. 1-я и 2-я группы животных получали соответственно массу эквивалентный объём физиологического раствора. Эвтаназию животных проводили с использованием «Гильотины для крыс» (AE0702, производитель «Open Science», Россия). Головной мозг фиксировали в нейтральном забуференном 10% формалине. Для иммуногистохимического исследования во фронтальной плоскости изготавливали серийные парафиновые срезы толщиной 4 мкм, которые изучали на уровне от -2,40 до -3,96 мм относительно брегмы [10]. Для иммуногистохимического исследования использовали первичные поликлональные кроличьи антитела против iNOS (разведение 1:100; GeneTex, Inc., США). Для визуализации применяли полимерную систему

N-Histofine Simple Stain MAX PO (Nichirei Biosciences, Inc., Япония). В качестве хромогена использовали субстратную систему N-Histofine DAB-3S kit (Nichirei Biosciences, Inc., Япония). Оценку изменений уровня экспрессии iNOS в зубчатой извилине определяли путём подсчёта относительной площади иммунореактивного материала (ИРМ) с использованием модуля Image Analysis программы ZEN 1.1.2.0 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия), а также интенсивности окрашивания в баллах от 0 до 3 (0 – иммунонегативная реакция; 1 – слабо выраженное окрашивание; 2 – умеренно выраженное окрашивание; 3 – максимально выраженное окрашивание). Исследование микропрепаратов проводили с помощью микроскопа «Axio Lab. A1» (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия), фотодокументирование осуществляли камерой «AxioCam 105 color» (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Статистическую обработку данных проводили с использованием пакетов программ Statistica 6.0 (StatSoft, USA). Обобщённые данные представляли в виде медианы

(Me) с указанием интерквартильного интервала (Q1-Q3), где Q1 – 25 процентиль, Q3 – 75 процентиль. Различия между группами оценивали по критерию Краскела-Уоллиса с последующим множественным сравнением групп между собой с использованием критерия Дана и считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При оценке результатов иммуногистохимического исследования в гранулярном слое зубчатой извилины у крыс с экспериментальной депрессией, по сравнению с контрольной группой животных, в цитоплазме перикарионов нейронов отмечалось увеличение степени экспрессии iNOS-ИРМ до умеренно-выраженной (2 балла, см. рис.).

При этом в единичных нейронах наблюдалась выраженная степень цитоплазматической экспрессии iNOS-ИРМ, в том числе на границе гранулярного

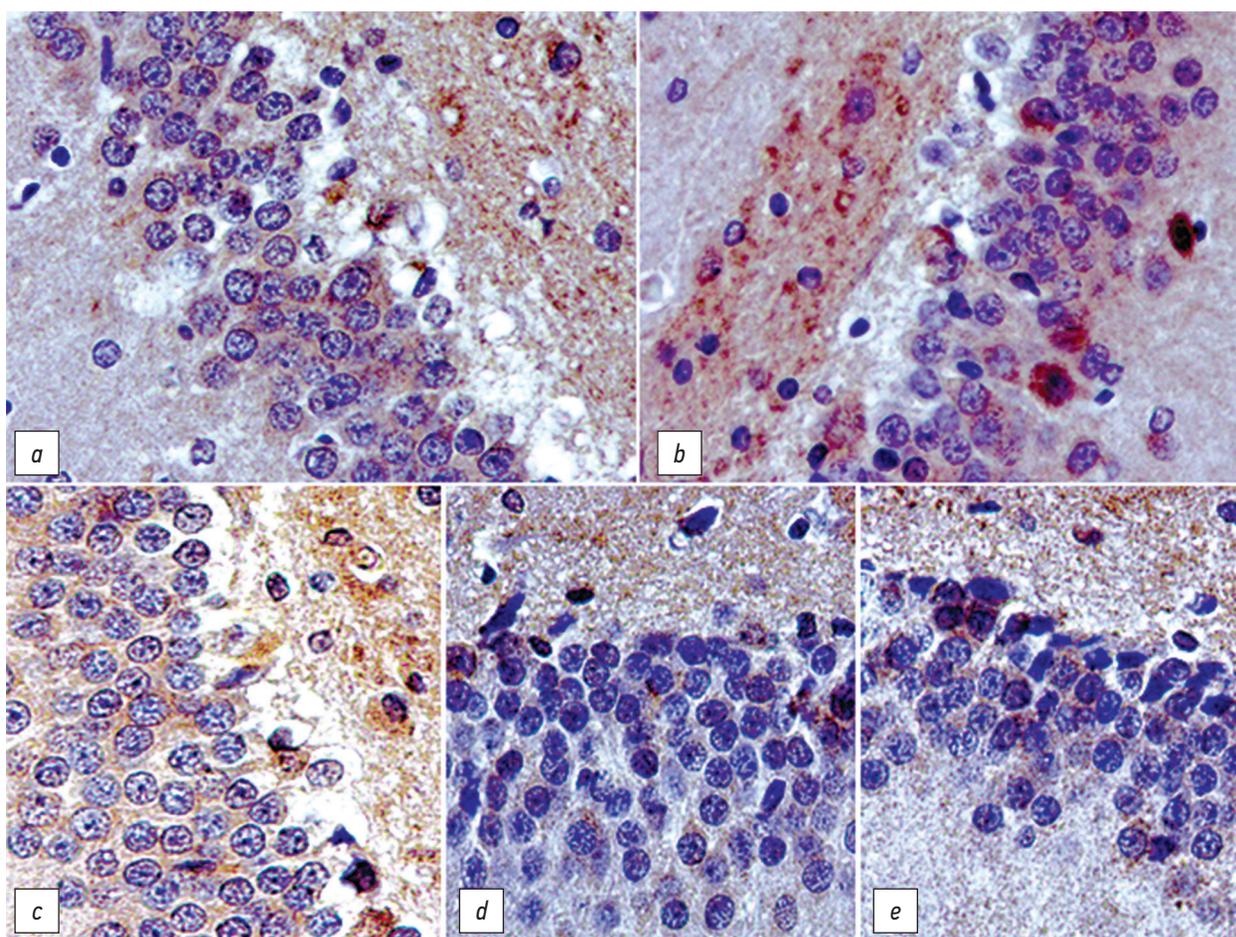


Рис. Патоморфологические изменения в зубчатой извилине крыс при экспериментальной депрессии: *a* – 1-я группа, контроль. *b* – 2-я группа, депрессия. *c* – 3-я группа, депрессия+фенибут. *d* – 4-я группа, депрессия+РГПУ-189. *e* – 5-я группа, депрессия+РГПУ-135. Иммуногистохимическое исследование с использованием первичных антител против iNOS. Ув. $\times 400$.

Fig. Pathomorphological changes in the dentate gyrus of rats in experimental depression: *a* – group 1, control. *b* – group 2, depression; *c* – group 3, depression + Phenibut. *d* – group 4, depression + RSPU-189. *e* – group 5, depression + RSPU-135. Immunohistochemical study using primary antibodies against iNOS. Magnification $\times 400$.

Таблица. Изменение относительной площади iNOS-IPM в зубчатой извилине крыс зрелого возраста при фармакологической коррекции, депрессии, Me (Q₁-Q₂), %

Table. Change in the relative area of iNOS-IRM in the dentate gyrus of mature rats during pharmacological correction, depression, Me (Q₁-Q₂), %

Контроль	Депрессия	Депрессия+фенибут	Депрессия+РГПУ-189	Депрессия+РГПУ-135
8,2 (7,1–9,9)	16,7* (10,5–22,1)	16,0* (14,2–20,1)	8,0# (7,2–8,9)	12,2 (3,1–20,6)

Примечания. Различия достоверны при $p < 0,05$: * по сравнению с животными группы контроль, # по сравнению с животными группы депрессия (критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Дана).

и субгранулярного слоёв. В нейропиле субгранулярного слоя, а также в цитоплазме нервных клеток зубчатой извилины как у животных контрольной группы, так и у животных с экспериментальной депрессией преобладала умеренновыраженная экспрессия iNOS-IPM (2 балла). В молекулярном слое зубчатой извилины у крыс с экспериментальной депрессией встречались нейроны с умеренновыраженной цитоплазматической экспрессией (2 балла), нейропил, как и у контрольной группы животных, характеризовался слабовыраженной экспрессией iNOS-IPM (1 балл). При оценке результатов морфометрического исследования наблюдалось увеличение относительной площади iNOS-IPM в зубчатой извилине у крыс с депрессией на 8,5% ($p < 0,05$), по сравнению с контролем (см. табл.).

При фармакологической коррекции экспериментальной депрессии у крыс фенибутом и соединениями с лабораторными шифрами РГПУ-189, РГПУ-135 в зубчатой извилине при иммуногистохимическом окрашивании с применением антител к iNOS отмечалось преобладание морфологических признаков обратимых изменений в нейронах. В цитоплазме перикарионов нейронов гранулярного слоя зубчатой извилины крыс при применении фенибута и РГПУ-135, как и у животных с экспериментальной депрессией, отмечалась умеренная экспрессия iNOS-IPM (2 балла), которая носила гранулярный характер. Напротив, применение соединения РГПУ-189 продемонстрировало у животных слабовыраженную экспрессию iNOS-IPM (1 балл) в цитоплазме перикарионов нейронов гранулярного слоя зубчатой извилины, что соответствует экспрессии в контрольной группе животных (см. рис.). На границе гранулярного и субгранулярного слоёв при фармакологической коррекции фенибутом и соединением с лабораторным шифром РГПУ-135 в соответствующих группах животных встречались нейроны с выраженной цитоплазматической экспрессией (3 балла), а при коррекции соединением РГПУ-189 – с умеренно-выраженной цитоплазматической экспрессией (2 балла). У групп животных с экспериментальной депрессией, получавших исследуемые соединения и фенибут, в нейропиле и нервных клетках субгранулярного слоя зубчатой извилины наблюдался схожий с контрольной группой животных характер экспрессии iNOS-IPM: умеренная гранулярная экспрессия в нейропиле (2 балла), отсутствие экспрессии в нервных клетках

(0 баллов), либо наличие умеренно-выраженной экспрессии в единичных нервных клетках (2 балла). Экспрессия iNOS-IPM в молекулярном слое зубчатой извилины у групп животных, получавших фармакокоррекцию, соответствовала экспрессии наблюдаемой у животных контрольной группы и группы с экспериментальной депрессией. Морфометрическая оценка относительной площади iNOS-IPM в зубчатой извилине у животных с фармакокоррекцией продемонстрировала достоверное снижение данного параметра, по сравнению с животными с экспериментальной депрессией, только в группе животных, получавших соединение с лабораторным шифром РГПУ-189, наблюдалось уменьшение относительной площади iNOS-IPM на 8,7% ($p < 0,05$) (см. табл.).

ОБСУЖДЕНИЕ

При моделировании депрессии индуцированной действием комбинированного стресса у крыс зрелого возраста в зубчатой извилине нами было обнаружено увеличение степени экспрессии и относительной площади iNOS-IPM в цитоплазме перикарионов нейронов, что может быть вызвано гиперактивацией пути L-аргинин/NOS/NO, с последующим увеличением выработки NO и его метаболитов, обеспечивающих активацию процессов нейровоспаления, что является основной причиной нейродегенеративных, психических и поведенческих расстройств в экспериментальных исследованиях на животных [8, 11]. Так, острый иммобилизационный стресс в течение 6 ч вызывал повышенную экспрессию iNOS в коре головного мозга, которая опосредуется через N-метил-D-аспартатные (NMDA) рецепторы с последующей активацией транскрипционного фактора NF-κB [12]. Данный факт также подтверждается в исследовании Shirakawa et al. [13], где вызванное острым стрессом увеличение метаболитов NO было связано с глутаматергической активацией нейронов паравентрикулярного ядра гипоталамуса. В другом исследовании депрессивноподобное поведение у животных, вызванное хроническим непредсказуемым мягким стрессом, приводило к повышению уровня нитритов в плазме крови и экспрессии мРНК iNOS в коре головного мозга. Эти эффекты могут быть ослаблены или предотвращены с помощью ингибиторов NOS, что было продемонстрировано внутригиппокампальной инъекцией селективного

ингибитора iNOS, аминоксидина и приводило к подавлению депрессивного поведения у крыс [12]. Фармакологическая коррекция салифеном (производное ГАМК, РГПУ-189) при моделировании перинатальной гипоксии приводила к увеличению количества глюкокортикоидных рецепторов в дорсальном отделе гиппокампа, но не в зубчатой извилине у новорождённых крысят [14]. Обнаруженное в нашем исследовании значимое увеличение уровня iNOS-ИРМ в зубчатой извилине крыс зрелого возраста при моделировании депрессии, а также снижение данного параметра при фармакологической коррекции РГПУ-189 (салифеном) и РГПУ-135 (нейроглютамом) может свидетельствовать о преобладающем нейротропном влиянии соединения РГПУ-189, индуцирующего ГАМК-ергическую нейротрансмиссию с участием ГАМК-опосредованных рецепторных механизмов, также лежащих в основе регуляции нейрогенеза в зубчатой извилине у взрослых [5]. Снижение относительной площади экспрессии iNOS-ИРМ в зубчатой извилине крыс при фармакологической коррекции депрессивного состояния РГПУ-135 (нейроглютамом) не характеризовалось достоверными отличиями от группы депрессии что, вероятно, свидетельствует о меньшем вкладе РГПУ-135 в процессы модуляции глутаматергической нейротрансмиссии [14] с возможным вовлечением различных видов глутаматных рецепторов [9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при экспериментальном моделировании депрессии у крыс зрелого возраста в зубчатой извилине обнаружено увеличение уровня экспрессии iNOS-иммунореактивного материала, что рассматривается как признак увеличения выработки NO и его метаболитов, способствующих реализации процессов повреждения нейронов и активации нейровоспаления. Снижение уровня экспрессии iNOS-иммунореактивного

материала в зубчатой извилине крыс зрелого возраста при фармакологической коррекции депрессивного состояния РГПУ-189 (салифеном) может свидетельствовать о преобладающем нейротропном влиянии данного соединения на ГАМК-ергические механизмы нейротрансмиссии.

Необходимо дальнейшее изучение роли индуцибельной NO-синтазы и NO в процессах модуляции глутаматергической и ГАМК-ергической нейротрансмиссии в зубчатой извилине при депрессии и под влиянием фармакологической коррекции.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFO

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Волгоградской области в рамках научного проекта № 19-415-340004\19.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Концепция и дизайн исследования – И.Н. Тюренков, А.В. Смирнов; сбор и обработка материала – М.Р. Экова., Е.В. Волотова; статистическая обработка данных – М.Р. Экова; анализ и интерпретация данных – А.В. Смирнов, И.Н. Тюренков, М.Р. Экова; написание и редактирование текста – М.Р. Экова, А.В. Смирнов, И.Н. Тюренков.

Funding. The study was supported by of the Russian Foundation for Basic Research and the Administration of the Volgograd Region within the scientific project No. 19-415-340004\19.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Author contributions. I.N. Tyurenkov, A.V. Smirnov – created the study concept and design; M.R. Ekova., E.V. Volotova – collected and processed the material; M.R. Ekova – performed the statistical data processing; A.V. Smirnov, I.N. Tyurenkov, and M.R. Ekova – performed the data analysis and interpretation; M.R. Ekova, A.V. Smirnov, and I.N. Tyurenkov – wrote and edited the text.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Krishnan V., Nestler E.J. The molecular neurobiology of depression // *Nature*. 2008. Vol. 455, № 7215. P. 894–902. doi: 10.1038/nature07455
 2. Yang L., Zhao Y., Wang Y., et al. The effects of psychological stress on depression // *Current Neuropharmacology*. 2015. Vol. 13. P. 494–504. doi: 10.2174/1570159X1304150831150507
 3. Ressler K.J., Mayberg H.S. Targeting abnormal neural circuits in mood and anxiety disorders: from the laboratory to the clinic // *Nat. Neurosci*. 2007. Vol. 10, № 9. P. 1116–1124. doi: 10.1038/nn1944
 4. Ménard C., Hodes G.E., Russo S.J. Pathogenesis of depression: insights from human and rodent studies // *Neuroscience*. 2016. Vol. 321. P. 138–162. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.05.053
 5. Travis S., Coupland N.J., Silversone P.H., et al. Dentate gyrus volume and memory performance in major nucleus // *Endocrinology*. 2004. Vol. 145. P. 3603–3607. doi: 10.1210/en.2004-0068
 6. Pittenger C., Duman R.S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms // *Neuropsychopharmacology*. 2008. Vol. 33, № 1. P. 88–109. doi: 10.1038/sj.npp.1301574
 7. Perfilova V.N., Prokofiev I.I., Mokrousov I.S., et al. Effect of phenibut and glufimet, a novel glutamic acid derivative, on respiration of heart and brain mitochondria from animals exposed to stress against the background of inducible NO-synthase blockade // *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2017. Vol. 163, № 2. P. 226–229. doi: 10.1007/s10517-017-3772-4
 8. Sahin Ozkartal C., Tuzun E., Kucukali C. I., et al. Antidepressant-like effects of agmatine and NOS inhibitors in chronic unpredictable mild stress model of depression in rats: the involvement of NLRP inflammasomes // *Brain Research*. 2019. 146438. doi: 10.1016/j.brainres.2019.146438
- Tyurenkov I.N., Bagmetova V.V., Chernysheva Y.V., Borodin D.D. A depressive state in rats in chronic combined stress induced by combined stresses of different modalities // *Neurosci-*

ence and behavioral physiology. 2015. Vol. 45, № 5. P. 542–549. doi: 10.1007/s11055-015-0108-6

9. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. New York (NY): Elsevier Academic Press, 2007.

10. Zhou X.Y., Zhang F., Ying C.J., et al. Inhibition of iNOS alleviates cognitive deficits and depression in diabetic mice through downregulating the NO/sGC/cGMP/PKG signal pathway // *Behavioural Brain Research*. 2017. Vol. 322. P. 70–82. doi: 10.1016/j.bbr.2016.12.046

11. Chen H.J., Spiers J.G., Sernia C., Lavidis N.A. Response of the nitrergic system to activation of the neuroendocrine stress axis // *Front Neurosci*. 2015. Vol. 9. doi: 10.3389/fnins.2015.00003 depressive disorder

12. Shirakawa T., Mitome M., Kikuri T., et al. Immobilization in-

duces acute nitric oxide production in the rat hypothalamus: a role of ionotropic glutamate receptors in the paraventricular // *Journal of Affective Disorders*. 2015. Vol. 172. P. 159–164. doi: 10.1016/j.jad.2014.09.048

13. Ордян Н.Э., Пивина С.Г., Ракицкая В.В., и др. Изменение экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе крыс после перинатальной гипоксии и ее коррекция производным ГАМК // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2018. Т. 54, № 6. С. 434–436. doi: 10.1134/S0044452918060104

14. Tyurenkov I.N., Bagmetova V.V., Robertus A.I., et al. A study of the gabaergic mechanisms of the neuropsychotropic action of neuroglutam // *Neurochemical Journal*. 2015. Vol. 9, № 2. С. 116–126. doi: 10.1134/S1819712415010134

REFERENCES

1. Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature*. 2008;455(7215):894–902. doi: 10.1038/nature07455

2. Yang L, Zhao Y, Wang Y, et al. The effects of psychological stress on depression. *Current Neuropharmacology*. 2015;13:494–504. doi: 10.2174/1570159X1304150831150507

3. Ressler KJ, Mayberg HS. Targeting abnormal neural circuits in mood and anxiety disorders: from the laboratory to the clinic. *Nat Neurosci*. 2007;10(9):1116–24. doi: 10.1038/nn1944

4. Ménard C, Hodes GE, Russo SJ. Pathogenesis of depression: insights from human and rodent studies. *Neuroscience*. 2016;321.:138–162. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.05.053

5. Travis S, Coupland NJ, Silversone PH, et al. Dentate gyrus volume and memory performance in major nucleus. *Endocrinology*. 2004;145:3603–07. doi: 10.1210/en.2004-0068

6. Pittenger C, Duman RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33(1):88–109. doi: 10.1038/sj.npp.1301574

7. Perfilova VN, Prokofiev II, Mokrousov IS, et al. Effect of phenibut and glufimet, a novel glutamic acid derivative, on respiration of heart and brain mitochondria from animals exposed to stress against the background of inducible NO-synthase blockade. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2017;163(2):226–229. doi: 10.1007/s10517-017-3772-4

8. Sahin Ozkartal C, Tuzun E, Kucukali CI, et al. Antidepressant-like effects of agmatine and NOS inhibitors in chronic unpredictable mild stress model of depression in rats: the involvement of NLRP inflammasomes. *Brain Research*. 2019;146438. doi: 10.1016/j.brainres.2019.146438

9. Tyurenkov IN, Bagmetova VV, Chernysheva YV, Borodin DD. A depressive state in rats in chronic combined stress induced by combined stresses of different modalities. *Neuroscience and behavioral physiology*. 2015;45(5):542–549. doi: 10.1007/s11055-015-0108-6

10. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. New York (NY): Elsevier Academic Press, 2007.

11. Zhou XY, Zhang F, Ying CJ, et al. Inhibition of iNOS alleviates cognitive deficits and depression in diabetic mice through downregulating the NO/sGC/cGMP/PKG signal pathway. *Behavioural Brain Research*. 2017;322:70–82. doi: 10.1016/j.bbr.2016.12.046

12. Chen HJ, Spiers JG, Sernia C, Lavidis NA. Response of the nitrergic system to activation of the neuroendocrine stress axis. *Front Neurosci*. 2015;9. doi: 10.3389/fnins.2015.00003 depressive disorder

13. Shirakawa T, Mitome M, Kikuri T, et al. Immobilization induces acute nitric oxide production in the rat hypothalamus: a role of ionotropic glutamate receptors in the paraventricular. *Journal of Affective Disorders*. 2015;172:159–164. doi: 10.1016/j.jad.2014.09.048

14. Orдын NE, Пивина SG, Ракицкая VV, et al. Altered expression of glucocorticoid receptors in the rat hippocampus caused by perinatal hypoxia and its correction by a GABA derivative. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2018;54(6):434–436. (In Russ).

15. Tyurenkov IN, Bagmetova VV, Robertus AI, et al. A study of the gabaergic mechanisms of the neuropsychotropic action of neuroglutam. *Neurochemical Journal*. 2015;9(2):116–126. doi: 10.1134/S1819712415010134

ОБ АВТОРАХ

***Экова Мария Рафаэлевна**, к.м.н.;

адрес: 400131, Россия, г. Волгоград, площадь Павших Борцов,
д. 1, тел.: (8442) 375865;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8655-1441>;

eLibrary SPIN: 8345-5503;

e-mail: maria.ekova@mail.ru

Смирнов Алексей Владимирович, д.м.н., проф.;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5351-6105>;

eLibrary SPIN: 8931-7823;

e-mail: alexey-smirnov@rambler.ru

Тюренков Иван Николаевич, д.м.н., проф. член-корр. РАН;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7574-3923>;

eLibrary SPIN: 6195-6378;

e-mail: fibfuv@mail.ru

Волотова Елена Владимировна, д.м.н.;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3916-7249>;

eLibrary SPIN: 1483-0915;

e-mail: evv.md@yandex.ru

AUTHORS INFO

***Maria R. Ekova**, MD, Cand. Sci. (Med.);

address: 1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, 400131, Russian
Federation, tel.: (8442) 375865;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8655-1441>;

eLibrary SPIN: 8345-5503;

e-mail: maria.ekova@mail.ru

Alexey V. Smirnov, MD, Dr. Sci. (Med.), Professor;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5351-6105>;

eLibrary SPIN: 8931-7823;

e-mail: alexey-smirnov@rambler.ru

Ivan N. Tyurenkov, MD, Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding
Member of the Russian Academy of Sciences

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7574-3923>;

eLibrary SPIN: 6195-6378;

e-mail: fibfuv@mail.ru

Elena V. Volotova, PhD;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3916-7249>;

eLibrary SPIN: 1483-0915;

e-mail: evv.md@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

DOI: <https://doi.org/10.17816/1026-3543-2021-159-1-29-32>

Фиксация цинк-формалином как адекватная замена ценкер-формола при гистохимическом выявлении островковых клеток поджелудочной железы

В.Н. Манских

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Цель. Установить возможность использования фиксации цинк-формалином вместо ценкер-формола для избирательного выявления всех основных типов клеток островков Лангерганса поджелудочной железы (А, В, D) с помощью окраски классическими гистохимическими методами, направленными на выявление этих клеток.

Материал и методы. Образцы поджелудочной железы голого землекопа (*Heterocephalus glaber*, Rüppell, 1842) были зафиксированы в течение суток в цинк-формалиновом фиксаторе следующего состава: 37% формальдегид – 300 мл, хлорид цинка – 50 г, ледяная уксусная кислота – 1,9 мл, дистиллированная вода – 2 л. После фиксации следовала стандартная процедура заливки в парафин и окраски азаном Гейденгайна и комбинацией азана и паральдегид-фуксина Гомори по рутинным протоколам.

Результаты. Обнаружено, что отчётливую дифференциальную окраску всех 3 мажорных типов островковых клеток можно получить, если зафиксировать образцы поджелудочной железы в течение суток в цинк-формалиновом фиксаторе. При этом, как и после фиксации ценкер-формолом (но не формалином или жидкостью Буэна), отчётливо выявляются не только А и В, но и D-клетки. Сопоставление с иммуногистохимическими данными картины распределения различных клеток в островке голого землекопа, выявленной гистохимическими окрасками показало их полное совпадение.

Выводы. Цинк-формалин может быть использован как более удобный и безопасный фиксатор для выявления клеток островков Лангерганса (в том числе и D-клеток) с помощью окрасок азаном Гейденгайна и паральдегид-фуксином по Гомори вместо содержащего соль ртути ценкер-формола.

Ключевые слова: цинк-формалин; D-клетки поджелудочной железы; гистохимические методы.

Как цитировать:

Манских В.Н. Фиксация цинк-формалином как адекватная замена ценкер-формола при гистохимическом выявлении островковых клеток поджелудочной железы. Морфология. 2021. Т. 159, №1, С. 29–32. DOI: <https://doi.org/10.17816/1026-3543-2021-159-1-29-32>

DOI: <https://doi.org/10.17816/1026-3543-2021-159-1-29-32>

Fixation with zinc-formalin as an adequate substitution of Zenker-formol for the histochemical staining of the pancreatic islet cells

Vasily N. Manskikh

M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

AIM: The work aimed to determine the possibility of using zinc-formalin fixation instead of Zenker-formol to identify selectively all the main types of cells (A, B, D) of the pancreatic Langerhans islets by staining using classical histochemical methods.

MATERIALS AND METHODS: Pancreatic samples of the naked mole rat (*Heterocephalus glaber*, Rüppell, 1842) were fixed for 24 hours in zinc-formalin fixative containing 300 ml of 37% formaldehyde, 50 g of zinc chloride, 1.9 ml of glacial acetic acid, and 2 L of distilled water. After fixation, the standard procedures for paraffin embedding and staining with Heidenhain's azan and a combination of azan and Gomori's paraldehyde-fuchsin were performed according to routine protocols.

RESULTS: It was revealed that a distinctive differential staining of all three major types of islet cells can be obtained if pancreatic samples are fixed in a zinc-formalin fixative for 24 hours. At the same time, as after fixation with Zenker-formol (but not with formalin solution or Bouin fixative), not only A and B, but also D-cells are clearly identified. Comparison of the immunohistochemical data on the distribution pattern of various cells in the pancreatic islet in a naked mole rat with that detected by histochemical stains showed their complete coincidence.

CONCLUSIONS: Zinc-formalin can be used as a more convenient and safer fixative for detecting Langerhans islet cells (including D cells) by staining with Heidenhain's azan and Gomori's paraldehyde-fuchsin instead of mercury salt-containing Zenker-formol.

Keywords: zinc-formalin; pancreatic D-cells; histochemical methods.

To cite this article:

Manskikh VN. Fixation with zinc-formalin as an adequate substitution of zenker-formol for the histochemical staining of the pancreatic islet cells. *Morphology*. 2021;159(1):29–32. DOI: <https://doi.org/10.17816/1026-3543-2021-159-1-29-32>

Received: 11.04.2021

Accepted: 17.12.2021

Published: 04.03.2022

Для выявления разных типов клеток поджелудочной железы до сих пор остаются вполне валидными гистохимические методы (окраска азаном Гейденгайна, хромовым гематоксилином-флюксиним и паральдегид-фуксиним по Гомори) наряду с электронно-микроскопическими и иммуногистохимическими способами [1–3]. При этом первые имеют некоторые явные преимущества: они многократно дешевле, отличаются экономией времени и, в сравнении с иммуногистохимией, могут быть использованы даже для работы с теми видами животных, для клеток которых нет коммерческих антител.

Для гистохимического окрашивания А- и В-клеток обычно рекомендуют фиксацию образцов смесью Буэна [2]. Эта смесь, однако, не оптимальна, если в дальнейшем потребуется иммуногистохимическое исследование. Кроме того, ещё в 1931 г. W. Bloom обнаружил, что в поджелудочной железе человека и некоторых животных (морских свинок) можно выявить ещё один тип клеток (впоследствии названный D-клетками), если материал зафиксировать центер-формолом по Максимуму и окрасить азаном [4]. Эти клетки совершенно не окрашиваются, если материал зафиксирован другими смесями (Карнуа, Буэна, фосфатно-солевым раствором формалином) [3]. Однако

сегодня центер-формол можно отнести к довольно редко используемым фиксаторам, поскольку он содержит в своём составе очень токсичную соль ртути (сулему), приобретение, хранение и утилизация которой сопряжены со значительными трудностями. Кроме того, он не очень удобен, так как требует дополнительной процедуры удаления из препаратов ртутных осадков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Автором настоящей заметки при исследовании микроскопической анатомии нового лабораторного грызуна, голого землекопа (*Heterocephalus glaber*, Rüppell, 1842), было впервые обнаружено, что отчётливую дифференциальную окраску всех трёх мажорных типов островковых клеток можно получить, если зафиксировать образцы поджелудочной железы в течение суток в цинк-формалиновом фиксаторе следующего состава: 37% формальдегид – 300 мл, хлорид цинка (марки ХЧ) – 50 г, ледяная уксусная кислота – 1,9 мл, дистиллированная вода – 2 л [5].

После заливки в парафин по рутинной процедуре и применении стандартной окраски азаном удалось выявить все 3 типа островковых клеток (рис. а): окрашенные

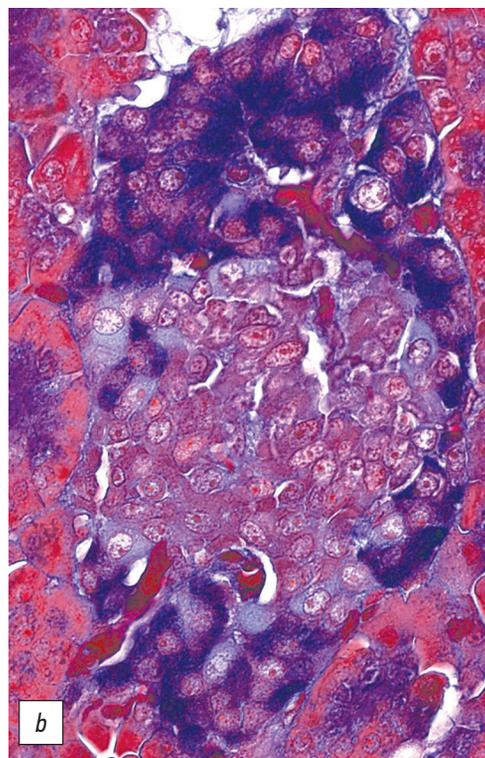
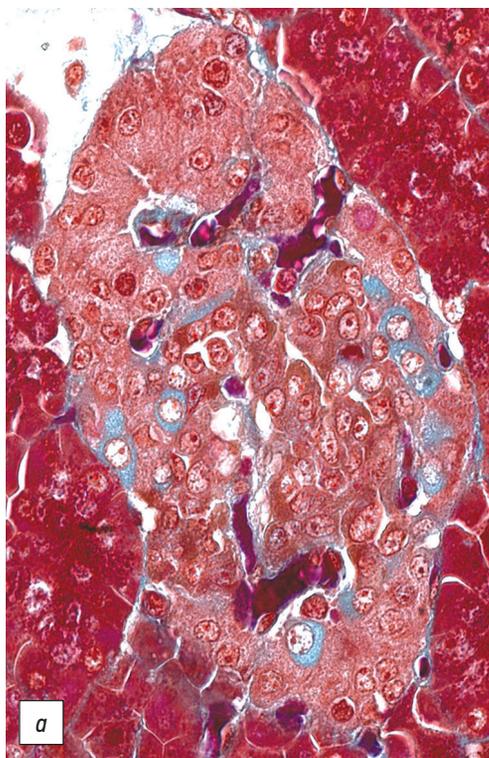


Рис. Островок поджелудочной железы голого землекопа (*Heterocephalus glaber*): *a* – окраска азаном (со световым зелёным в смеси Маллори), цитоплазма А-клеток – красно-коричневая, В-клеток – розовая, D-клеток – нежно-зелёная; *b* – окраска азаном в комбинации с паральдегид-фуксиним по Гомори, цитоплазма А-клеток – тёмно-красная, В-клеток – тёмно-фиолетовая, D-клеток – серо-голубая. В обоих случаях ядра окрашены азокармином в красный цвет. Ок. $\times 10$, об. $\times 100$

Fig. Pancreatic islet of a naked mole rat (*Heterocephalus glaber*): *a* – azan staining (with light green in Mallory's mixture), cytoplasm of A-cells is red-brown, that of B-cells is pink, that of D-cells is pale green; *b* – staining with azan in combination with Gomori's paraldehde-fuchsin, the cytoplasm of A-cells is dark red, that of B-cells is dark purple, that of D-cells is gray-blue. In both cases, the nuclei are stained red with azocarmine. Ocular $\times 10$, lens $\times 100$

в кирпично-красный цвет А-клетки (центр островка), буровато-розовые В-клетки (периферия островка) и светло-зелёные (или голубые, в зависимости от того, добавлен ли в смесь Маллори световой зелёный или анилиновый синий) D-клетки (на границе зон А- и В-клеток). Окраску удалось легко скombинировать с паральдегид-фуксином по Гомори, что дало ещё более контрастное окрашивание В-клеток, приобретших тёмно-фиолетовый цвет (рис. b). Сопоставление с иммуногистохимическими данными [6] картины распределения различных клеток в островке, выявленной гистохимическими окрасками, показало их полное совпадение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, фиксация цинк-формалином позволяет выявлять с помощью классических гистохимических методов все 3 основных типа клеток островков Лангерганса (в том числе и D-клетки). Этот фиксатор хорошо (лучше, чем фосфатно-солевой раствор формалина) сохраняет структуру ткани и не только подходит, но даже рекомендован для фиксации

с иммуногистохимическими целями (если последнее будет необходимо) [5]. Он не содержит солей ртути и потому работа с ним не сопряжена с соответствующими трудностями и опасностями.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFO

Источник финансирования. Автор заявляет об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

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

Вклад авторов. Автор подтверждает соответствие своего авторства международным критериям ICMJE и одобрил финальную версию перед публикацией.

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

Competing interests. The author declare that he have no competing interests.

Author contribution. The author confirms the compliance of his authorship, according to international ICMJE criteria and approved the final version to be published.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Никонова Л.Г. Преобразования а-клеток панкреатических островков после физических нагрузок при нарушении толерантности к глюкозе // Морфология. 2016. Т. 150, № 5. С. 68–70.
2. Торопцев И.В., Ещенко В.А. Экспериментальный дитизоновый диабет. Томск: Издательство Томского университета, 1975.
3. Baskin D.G. A historical perspective on the identification of cell types in pancreatic islets of Langerhans by staining and histochemical techniques // *J. Histochem. Cytochem.* 2015. Vol. 63. P. 543–558. doi: 10.1369/0022155415589119

4. Bloom W. New type of granular cell in islets of Langerhans of man // *Anat. Rec.* 1931. Vol. 49. P. 363–371.
5. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. Санкт-Петербург: СпецЛит, 2010.
6. Kramer B., Buffenstein R. The pancreas of the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*): an ultrastructural and immunocytochemical study of the endocrine component of thermoneutral and cold acclimated animals // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2004. Vol. 139. P. 206–214. doi: 10.1016/j.ygcen.2004.09.006

REFERENCES

1. Nikonova LG. Changes of pancreatic islet a cells after physical loads in glucose tolerance impairment. *Morfologija.* 2016;150(5): 68–70. (In Russ).
2. Toroptsev IV, Eschenko VA. Experimental ditisonian diabetes. Tomsk: Tomsk University Press, 1975. (In Russ).
3. Baskin DG. A historical perspective on the identification of cell types in pancreatic islets of Langerhans by staining and histochemical techniques. *J. Histochem. Cytochem.* 2015;63:543–558. doi: 10.1369/0022155415589119

4. Bloom W. New type of granular cell in islets of Langerhans of man. *Anat. Rec.* 1931;49:363–371.
5. Korzhevskii DE, Giliarov AV. Basic histological techniques. SpecLit Press, 2010. (In Russ).
6. Kramer B, Buffenstein R. The pancreas of the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*): an ultrastructural and immunocytochemical study of the endocrine component of thermoneutral and cold acclimated animals. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2004;139:206–214. doi: 10.1016/j.ygcen.2004.09.006

ОБ АВТОРЕ

Манских Василий Николаевич;

адрес: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.73;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6404-8105>;
eLibrary SPIN: AuthorID: 584731;
e-mail: manskikh@mail.ru

AUTHOR INFO

Manskikh Vasilij Nikolaevich;

Adress: Leninskie Gory, 1, bld. 73, 119991, Moscow, Russian Federation;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6404-8105>;
eLibrary SPIN: author ID: 584731;
e-mail: manskikh@mail.ru