

*На правах рукописи*

**Кириченко Евгения Юрьевна**

**РОЛЬ ЩЕЛЕВЫХ КОНТАКТОВ  
И БЕЛКОВ-КОННЕКСИНОВ В НЕЙРО-ГЛИАЛЬНЫХ  
И НЕЙРО-ГЛИО-ВАСКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ  
В ТАЛАМОКОРТИКАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ МОЗГА КРЫС**

06.02.01 – диагностика болезней и терапия животных,  
патология, онкология и морфология животных

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Ставрополь – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Южный федеральный университет» (ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет»)

**Научный консультант:** **Ермаков Алексей Михайлович**  
доктор биологических наук, профессор, профессор РАО, декан факультета «Биоинженерия и ветеринарная медицина» Донского государственного технического университета

**Официальные оппоненты:** **Зеленевский Николай Вячеславович**  
доктор ветеринарных наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский университет ветеринарной медицины», профессор кафедры анатомии животных

**Конорова Ирина Львовна**  
доктор биологических наук, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры морфологии человека

**Лосева Елена Владимировна**  
доктор биологических наук, федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, главный научный сотрудник лаборатории функциональной нейрцитологии

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный аграрный университет им. П. А. Столыпина»

Защита состоится 13 мая 2021 года в 10 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 220.062.02 на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ставропольский государственный аграрный университет» по адресу: 355017, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 12, тел/факс: 8 (8652) 35-22-82, e-mail: inf@stgau.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ставропольский государственный аграрный университет».

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г. и размещен на сайтах: ВАК Министерства науки и высшего образования РФ <http://www.vak.minobrnauki.gov.ru> «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.; ФГБОУ ВО «Ставропольский ГАУ» <https://www.stgau.ru> «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета



Дьяченко Юлия Васильевна

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность избранной темы и степень ее разработанности.** Щелевые контакты (ЩК) занимают особое место среди различных типов межклеточных соединений, поскольку обеспечивают единственный путь прямого обмена биологически активными молекулами и продуктами метаболизма между цитоплазмами соседних клеток разных тканей. В центральной нервной системе (ЦНС) млекопитающих все отделы, от глазной сетчатки и обонятельной луковицы до спинного и головного мозга, содержат клетки, соединенные щелевыми контактами (Deans M. R. et al., 2001; Galaretta M., Hestrin S., 2001; Fukuda, T., Kosaka T., 2003; Nagy J. I. et al., 2004; Zang X. L. et al., 2004; Connors B. W., Long M. A., 2004; Gibson J. R. et al., 2005; Fukuda T. et al., 2006 и др.). Щелевой контакт представлен системой плотно упакованных каналов, пронизывающих билипидные слои мембран двух контактирующих клеток. Каждый такой канал состоит из двух состыкованных полуканалов, называемых коннексаонами, при этом субъединицей каждого коннексаона является трансмембранный белок коннексин. К настоящему времени семейство коннексинов насчитывает около 20 видов белков, отличающихся друг от друга по молекулярному весу и по спектру тканевой экспрессии (Belluardo N. et al., 1999; Sohl G., Willecke K. et al., 2002; Willecke K., 2004). Для ЦНС млекопитающих основными коннексинами являются коннексины 43 и 30, входящие в состав щелевых контактов между глиальными клетками, а также коннексин 36, являющийся субъединицей коннексонов щелевых контактов нейронов (Condorelli D. F. et al., 1998; Condorelli D. F. et al., 2000; Rash J. E. et al., 2001; Nagy J. I., Rash J. E., 2003; Nagy J. I. et al., 2004).

Существование глия-глиальных и нейро-нейрональных щелевых контактов имеет критическое значение как для развития ЦНС млекопитающих, так и для ее нормального функционирования (Nagy J. I., Rash J. E. 2000; Bennett M. V., Zukin R. S., 2004; Dere E., Zlomuzica A., 2012; Hamdan R. et al., 2013). При этом нейрональные и глиальные щелевые контакты при схожих морфологических характеристиках имеют различное функциональное назначение. На раннем постнатальном этапе развития ЦНС нейро-нейрональные щелевые контакты наиболее многочисленны. Действуя как электрические синапсы, они способны обеспечивать синхронное вовлечение в активность всех элементов развивающегося коркового модуля (Liu X. B., Jones E. G., 2003). Во взрослом мозге электрические синапсы имеют избирательный характер формирования и соединяют тормозные нейроны одного и того же типа (Fukuda T., Kosaka T., 2003). При этом они вовлечены в процессы электрогенической синхронизации ритмических осцилляций больших и малых нейронных ансамблей (Ylinen A. et al., 1995; Draguhn A. et al., 2000; Hormuzdi S. G. et al., 2004; Fukuda T. et al., 2006). Благодаря формированию межклеточных глия-глиальных щелевых контактов астроглия может приобретать функцию пространственного буфера для регуляции экстраклеточной концентрации калия и других ионов, регулируя внутриклеточный и внеклеточный ионный гомеостаз (Yamamotoi F., Nakomori S., 1990). В этом случае активность глиальных клеток отражает активность нейронных

структур через реакции внеклеточного поглощения нейроактивных субстанций, например глутамата и ионов калия. Кроме того, щелевые контакты астроцитов способствуют проведению метаболических субстратов (Tonkin R. S. et al., 2015), регулируют объем сомы клетки астроцита (Scemes E. et al., 1998; Chever O. et al., 2014), распространяют сигналы клеточной гибели (Blanc E. M. et al., 1998) и являются нейропротекторами в случае окислительного стресса (Eugenin E. A. et al., 2012).

Щелевые контакты рассматривают в качестве важного элемента развития различных патологических процессов в ЦНС. Белки коннексины являются потенциальными терапевтическими мишенями при лечении ряда нейродегенеративных заболеваний в ветеринарии. Активно обсуждают возможную роль коннексинов и щелевых контактов в патогенезе фатальных инфекционных прионных болезней ЦНС: скрепи инфекций у овец и коз, губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота, трансмиссивной энцефалопатии норок. Выдвинута гипотеза о существовании нового регуляторного пути передачи сигналов, который опосредован экспрессией коннексина 43, а также имеются данные об обеспечении межклеточного переноса патологического белка PrPSc с участием щелевых контактов и полуканалов астроцитов (Geon-Hwi Lee, 2016; Ariazi J. et al., 2017; Нее-Jun Kim et al., 2020). Кроме того, ЩК и полуканалы играют критическую роль при различных паразитарных инфекциях ЦНС позвоночных: токсоплазмозов, шистосомозов, случной болезни непарнокопытных и су-ауру верблюдов, лошадей, ослов, мулов и собак. Обсуждается ключевая роль ЩК и полуканалов в индуцированной паразитами повышенной проницаемости плазматической мембраны, в процессах клеточной дегенерации, а также в необходимом для инвазии паразитов росте концентрации внутриклеточного  $Ca^{2+}$  в организме хозяина (Vega J. L. et al., 2013). Более того, ЩК способствуют обеспечению быстрого внутриклеточного и межклеточного распространения и персистенции в астроцитах вируса чумы собак при демиелинизирующем энцефалите (Wyss-Fluehmann G. et al., 2010). Показано участие нейро-нейрональных ЩК в распространении вируса псевдобешенства и развитии болезни Ауески у свиней (Kelly M. McCarthy et al., 2009), а также при распространении патологических ритмов мозга при эпилепсии (Mylvaganam S. et al., 2014). Отдельно следует отметить, что альтерации ЩК и коннексинов в настоящее время рассматривают в качестве важного патогенетического механизма образования, злокачественного роста и метастазирования глиальных опухолей головного мозга млекопитающих (Oliveira R. et al., 2005; Tabernero A., 2016).

Несмотря на возрастающий интерес к изучению ЩК головного мозга млекопитающих, их распределение и роль в клеточных ансамблях неокортекса и таламуса остаются малоизученными. На настоящий момент нет данных о взаимном расположении химических синапсов и глиальных ЩК внутри корковых и подкорковых таламических модулей, ЩК в составе нейро-глио-сосудистых ансамблей, количественном распределении глиальных и нейрональных щелевых контактов и характеристиках экспрессии коннексинов в корковых и подкорковых структурах. Отсутствуют данные о различных типах электрических синапсов в колонках коры. Вместе с тем исследование особенностей строения

ЩК, а также их локализации является фундаментальной задачей, решение которой открывает новое научное направление для изучения регуляции развития различных патологий ЦНС, в том числе прионных заболеваний и нейроканцерогенеза с помощью воздействия на щелевые контакты.

**Объект исследования.** Объектами исследования являлись корковая и подкорковая области представительства вибриссовой системы в головном мозге крыс. Коровый уровень представительства вибрисс представляет собой морфофункциональные группировки нейронов четвертого слоя соматической коры S1 в виде поля баррелей. Таламический уровень представительства вибрисс включает в себя ядра VPL, RT, PoM, а также VPM, где формируются морфофункциональные клеточные модули – баррелоиды. Отличительными особенностями данных объектов исследования является моносинаптическая связь каждого отдельного барреля на уровне коры S1 и соответствующего ему баррелоида на уровне релейного ядра таламуса.

**Предмет исследования** – щелевые контакты между нервными и глиальными клетками и составляющие эти контакты белки-коннексины.

**Научная гипотеза.** Глиа-глиальные и нейро-нейрональные щелевые контакты имеют критическое значение как для развития, так и для нормального функционирования ЦНС млекопитающих. Щелевые контакты участвуют в функционировании нейронов, взаимодействиях нейронов и глии, а также обеспечивают функционирование комплекса нейрон-глиальная клетка – сосудистый элемент.

**Цель исследования** – изучение роли щелевых контактов и белков-коннексинов в нейро-нейрональных, нейро-глиальных и нейро-глио-васкулярных взаимодействиях в таламокортикальной системе мозга крыс.

**Задачи исследования:**

1. Изучить распределение основных нейрональных и глиальных белков в зонах представительства вибрисс мозга крыс: в баррельной коре S1, в вентральных и ретикулярном таламических ядрах.
2. Получить данные о распределении белков щелевых контактов (коннексинов) глиальных и нервных клеток в коре S1 и в таламических ядрах мозга крыс.
3. Провести исследование локализации, ультраструктуры и типов щелевых контактов нервных и глиальных клеток в баррельной коре и таламических ядрах мозга крыс.
4. Ознакомиться с локализацией коннексинов в щелевых контактах, расположенных вокруг химических синапсов и в нейро-глио-сосудистых комплексах на ультраструктурном уровне.

**Научная новизна работы.** Впервые проведено иммуногистохимическое исследование зон коркового (баррельная кора) и подкоркового (релейные и вентральные ядра таламуса) представительства вибрисс с использованием антител к синаптофизину, миелину, нейрофиламентам, глиальному фибриллярному кислому белку, парвальбумину, соматостатину, которое позволило обнаружить схожую уникальную морфо-структурную организацию исследуемых зон.

Получены оригинальные данные о распределении белков щелевых контактов в нейронах и в глии корковых и подкорковых зон представительства вибрисс. Впер-

вые получены данные о наличии элементарных ансамблей тормозных нейронов, объединенных глиальными и нейрональными щелевыми контактами, которые осуществляют таламокортикальную и кортикоталамическую передачу в мозге.

Впервые продемонстрирована гетерогенность астроцитов по экспрессии белков щелевых контактов коннексина 30 и коннексина 43 в коре и таламусе, а также охарактеризовано их распределение в исследуемых зонах.

Впервые продемонстрировано взаимное пространственное расположение химических синапсов и глиальных щелевых контактов, содержащих коннексин 43, и установлено их участие в регуляции нейрональной активности в составе трехчастного синапса.

Впервые даны подробные ультраструктурные характеристики щелевых контактов, образующих панглиальные сети.

Получены новые оригинальные данные о структуре гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), в состав которого входят щелевые контакты астроглии, содержащие коннексин 43 и коннексин 30.

В процессе исследования были разработаны: оригинальная методика изготовления серийных ультратонких срезов для изучения ультраструктуры нервных и глиальных клеток, а также клеточных компартментов в объеме; собственные протоколы исследования коннексинов и щелевых контактов методами иммунофлюоресцентной конфокальной микроскопии и электронной иммуногистохимии (pre- и post-embedding). Разработанные протоколы позволяют осуществлять визуализацию любых антигенов, специфичных для нервной ткани на светооптическом и ультраструктурном уровнях.

**Теоретическая и практическая значимость.** На основании полученных результатов сформулирована гипотеза, согласно которой щелевые контакты являются важным морфологическим субстратом для обеспечения локальной и дистантной синхронизации ритмической активности при таламокортикальном проведении, синаптическом проведении, для регуляции нейрональной активности на уровне трехчастного синапса и для обеспечения тканевого и клеточного гомеостаза в корковых и подкорковых клеточных ансамблях.

Данные об ультраструктурных характеристиках щелевых контактов, а также составляющих их различных типах коннексинов и коннексонов в составе нейро-глио-сосудистых комплексов дополняют и расширяют имеющиеся знания об их структуре, функциях и о механизмах регуляции работы гематоэнцефалического барьера.

Полученные результаты и разработанные методы настоящего комплексного морфологического исследования могут быть использованы как студентами, аспирантами-физиологами и ветеринарными врачами, так и морфологами при исследовании структурной организации, цито-, вазо- и синаптоархитектоники головного мозга животных.

Полученные результаты о распределении щелевых контактов и коннексинов имеют прикладное значение в рамках разработки новых терапевтических возможностей лечения для ряда дегенеративных заболеваний ЦНС животных, в том числе прионных болезней. Настоящее морфологическое исследование способствует разработке «дорожной карты» для исследования механизмов

блокировки коннексинов или уменьшения коммуникации посредством щелевых контактов в нанотрубочках при развитии ряда нейродегенеративных заболеваний в ветеринарии.

Данные о распределении коннексинов и щелевых контактов в норме могут способствовать пониманию механизмов малигнизации и инвазии клеток астроцитарных опухолей ЦНС, а также разработке различных терапевтических стратегий по управлению коннексинами и щелевыми контактами в опухолях для повышения эффективности противоопухолевой терапии. Кроме того, полученные сведения о гетерогенности астроглии по экспрессии коннексинов вносят новый вклад в существующие представления о биологии глиальных опухолей ЦНС животных.

**Методология и методы исследования.** Методологической основой проведенных исследований является анализ доступных литературных источников, который создает теоретические предпосылки необходимости изучения структуры и функций щелевых контактов и составляющих их белков-коннексинов в корковых и подкорковых модулях тактильного анализатора крыс с целью выяснения роли щелевых контактов и белков-коннексинов в нейро-нейрональных, нейро-глиальных и нейро-глио-васкулярных взаимодействиях. Результаты исследований получены с использованием гистологических, иммуногистохимических, иммунофлуоресцентных, электронномикроскопических, иммуноэлектронномикроскопических и морфометрических методов исследований.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. В пределах таламокортикальной системы в гомологичных зонах представительства вибрисс клеточные ансамбли имеют особую схожую структурную организацию. Выявленные схожие специфические тормозные связи парвальбумин-содержащих нейронов в корковых и таламических зонах представительства вибрисс являются «центрами» таламокортикальной и кортикоталамической передачи в мозге.
2. В исследованных зонах коры и таламуса субпопуляции астроцитов отличаются по способности синтезировать разные типы коннексинов, формировать щелевые контакты и участвовать в нейро-глиальных взаимоотношениях.
3. Нейро-нейрональные щелевые контакты коры и таламуса представлены следующими типами: 1) аксо-дендритические, которые могут обеспечивать локальную синхронизацию активности нейронов одного ансамбля на пресинаптическом уровне; 2) дендро-дендритические, объединяющие однотипные нейронные ансамбли для обеспечения локальной подпороговой синхронизации гиперполяризационного ритма; 3) смешанные синапсы, которые могут участвовать в процессах долговременной потенциации и/или синхронизации высокочастотных колебаний, а также обеспечивать пластичность изменениями нейронных цепей.
4. Щелевые контакты, содержащие коннексин 43, являясь компонентом трехчастного синапса и образуя панглиальные сети, играют ведущую роль в нейро-глиальных взаимоотношениях в коре и таламических ядрах мозга.

5. Щелевые контакты, содержащие коннексин 43 и коннексин 30, играют ведущую роль в нейро-глио-васкулярных взаимодействиях в коре и таламических ядрах мозга, входя в состав ГЭБ.

**Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора.** Достоверность результатов работы, правомочность основных положений и выводов обоснованы достаточным числом животных, использованных в экспериментах, детальным изучением литературы по теме исследования, использованием современных морфологических и иммуногистохимических методов исследования на светооптическом и ультраструктурном уровнях с применением сертифицированного модуля интерактивных измерений (LAS Interactive Measurement), лицензионной программы Leica Application Suite 4.3 (Leica, Германия), лицензированной программы Qwin (Leica, Кембридж Англия), глубоким и аргументированным анализом полученных результатов.

Результаты научных исследований вошли в отчеты по гранту РФФИ № 07-04-00424, гранту Минобразования № 2.1.1/1129, грантам РФФИ № 13-04-01012, № 15-04-03035, № 19-015-00325, грантам ЮФУ № 213.01-24/2013-52, № 213.01-07-2014/05ПЧВГ, отчет Госзадания Минобрнауки России № БЧ0110-11/2017-27, отчет Госзадания Министерства науки и высшего образования РФ № 0852-2020-0028.

Основные положения работы представлены и обсуждены на XVI Международной конференции по нейрокибернетике (Ростов-на-Дону, 2012), XXII Съезде физиологического общества им. Павлова (Волгоград, 2013), конференции «Актуальные проблемы современной медицины» (Киев, Украина, 2013), на регулярных международных междисциплинарных конгрессах «Нейронаука для медицины и психологии» (Крым, 2013, 2015, 2020), на IV съезде физиологов СНГ (Сочи – Дагомыс, 2014), 5-м Съезде биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015), VI Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2015), на XXIII Мультидисциплинарной международной конференции нейронаук «Стресс и поведение» (Санкт-Петербург, 2016), на летней школе Brain Facts Summer School, Shanghai, Shanghai Jiao Tong University департамента Life Science (Шанхай, Китай, 2018, 2019), на кафедре Key Laboratory for the Genetics of Development and Neuropsychiatric Disorders (руководитель – профессор Вейдонг Ли), Shanghai Jiao Tong University (Шанхай, Китай, 2019), на заседании Департамента Анатомии и нейробиологии факультета Life Science (руководитель – профессор Фукуда Такаичи) университета Кумамото (Япония, 2019), на заседании лаборатории «Молекулярная нейробиология» (руководитель – профессор А. Б. Узденский) (Ростов-на-Дону, 2020), на Всероссийской научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2020).

Результаты проведенных исследований легли в основу специального курса с практическими занятиями для иностранных студентов-магистров «Современные методы исследования: морфология, гистология, иммуногистохимия», а также используются в учебном процессе на кафедре «Физиология человека и животных» при чтении лекционных и практических курсов по направлениям «Нейробиология» и «Физиология высшей нервной деятельности».

сти» Академии биологии и биотехнологии ФГАУ ВО «Южный федеральный университет» Министерства науки и высшего образования РФ, на летней школе Brain Facts Summer School, Shanghai, Shanghai Jiao Tong University департамента Life Science (Шанхай, Китай, 2018–2023).

Планирование исследований, постановка цели и задач проводились совместно с научным консультантом д-ром биол. наук, профессором А. М. Ермаковым, д-ром мед. наук, академиком РАЕН А. Э. Мационисом, д-ром биол. наук, профессором А. Б. Узденским.

Разработка протоколов для иммуногистохимического, иммунофлюоресцентного и электронноиммуногистохимического исследований проводилась совместно с сотрудниками отделения высокотехнологичных методов диагностики государственного бюджетного учреждения Ростовской области «Патологоанатомическое бюро» д-ром мед. наук, академиком РАМН А. Э. Мационисом, канд. биол. наук П. Е. Повилайтите, а также руководителем Департамента анатомии и нейробиологии факультета Life Science университета Кумамото, Япония, профессором Фукуда Такаичи. Процедуры фиксации головного мозга методом транскардиальной перфузии и иммуногистохимические исследования – совместно с сотрудниками Академии биологии и биотехнологии им. Д. И. Ивановского Южного федерального университета д-ром биол. наук, профессором А. Г. Суховым, канд. биол. наук Т. С. Сердюк, аспирантом А. О. Гранкиной (Ситковской), аспирантом С. Ю. Филипповой, Л. А. Беличенко, Г. А. Чурюмовой, М. Ю. Могилевской, а также совместно с аспирантом и сотрудником Ростовского государственного медицинского университета М. А. Акименко; иммунофлюоресцентные исследования в конфокальном двухфотонном микроскопе проводились совместно с сотрудниками Научно-исследовательского технологического центра нейротехнологий ЮФУ д-ром биол. наук, профессором В. Н. Кироем, канд. биол. наук Л. В. Лысенко, В. Г. Семьиной, электронномикроскопические исследования проводились при участии сотрудников центра коллективного пользования «Современная микроскопия» ЮФУ д-ром биол. наук Г. М. Федоренко, канд. биол. наук А. Г. Федоренко, а также с сотрудниками патологоанатомического отделения государственного бюджетного учреждения Ростовской области «Областная клиническая больница № 2» канд. мед. наук Д. Г. Пасечником, канд. биол. наук А. К. Логвиновым и Е. А. Синельник.

Автор выражает искреннюю благодарность вышеуказанным коллективам и сотрудникам.

Выбор методологии исследования, поиск, анализ и обобщение научной информации, литературных данных, выполнение экспериментов, анализ и интерпретация результатов исследования, подготовка научных публикаций, написание и оформление рукописи осуществлены лично автором. Доля участия соискателя при выполнении диссертации составляет 95 %.

**Конкурсная поддержка.** Работа поддержана грантом РФФИ № 07-04-00424 (руководитель – профессор А. Г. Сухов), грантом Минобразования № 2.1.1/1129 (руководитель – профессор А. Г. Сухов), грантом РФФИ № 13-04-01012 (руководитель – Е. Ю. Кириченко), грантом РФФИ № 15-04-03035

(руководитель – Е. Ю. Кириченко), грантом РФФИ № 19-015-00325 (руководитель – Е. Ю. Кириченко), внутренним грантом ЮФУ № 213.01-24/2013-52, внутренним грантом ЮФУ № 213.01-07-2014/05ПЧВГ (руководитель – Е. Ю. Кириченко), базовой частью государственного задания Минобрнауки России № БЧ0110-11/2017-27 (руководитель – Е. Ю. Кириченко), Госзаданием Министерства науки и высшего образования РФ № 0852-2020-0028 (руководитель – профессор А. Б. Узденский).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 54 печатные работы в отечественных и зарубежных изданиях, из которых 25 статей – в изданиях, включенных ВАК России в перечень, рекомендуемый для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук, из них 21 – публикации в изданиях, включенных в базы данных Scopus, Web of Science.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 210 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, включающих в себя материалы и методы исследования, полученных результатов и их обсуждения, заключения и выводов, списка литературы, включающего 338 отечественных и зарубежных источников. Работа иллюстрирована 47 рисунками и тремя таблицами.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе «Обзор литературы» представлены результаты анализа отечественной и зарубежной литературы относительно современных представлений о структуре щелевых контактов и составляющих их белков-коннексинов в центральной нервной системе, о молекулярной структуре коннексинов, о характеристике основных видов белков-коннексинов, представленных в ЦНС и их функциях, об организации коркового и таламического уровней организации тактильного анализатора крыс.

## 2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Материал и методы исследований

Работа выполнена на базе лаборатории функциональной геномики и морфологии Академии биологии и биотехнологии им. Д. И. Ивановского Южного федерального университета, а также на базе кафедры «Биология и общая патология» факультета «Биоинженерия и ветеринарная медицина» Донского государственного технического университета в период с 2005 по 2020 г. Исследование проведено на лабораторных крысах линии Вистар. В экспериментах использованы 74 лабораторные крысы (самцы) весом 150–200 граммов (таблица 1). Животные находились в стандартных условиях вивария на сбалансированном питании при свободном доступе к корму и воде. Содержание животных и экспериментальные исследования осуществлялись в соответствии с протоколом, утвержденным Комиссией по биоэтике Южного федерального университета 18 апреля 2012 года.

Таблица 1 – Объем исследованного материала

Метод исследования	Количество использованных животных	Количество полученных вибротомных срезов мозга	Количество стекол с парафиновыми срезами мозга	Количество ультратонких срезов
Иммуногистохимия	30	–	120	–
Иммунофлюоресценция и конфокальная микроскопия	9	27	–	–
Электронная микроскопия	25	100	–	400
Электронная иммуногистохимия	10	30	–	120

*Фиксация мозга животных, изготовление вибротомных и микротомных срезов.* После взвешивания животных анестезировали путем введения нембутала в дозе 60 мг/кг и проводили перфузию вначале изотоническим раствором фосфатного буфера, pH 7,4 (Sigma-Aldrich, США), а затем охлажденным фиксирующим раствором. В зависимости от последующего метода исследования использовались два варианта фиксирующих растворов: 1) 10 % формальдегид (Sigma, США) на фосфатном буфере (pH 7,4) для иммуногистохимического исследования; 2) 4 % параформальдегид (Sigma, EMS, США) на фосфатном буфере (pH 7,4) для иммунофлюоресцентного и иммуноэлектронномикроскопического исследований. После перфузии головной мозг извлекали, дофиксировали в течение ночи и изготавливали фронтальные и тангенциальные вибротомные срезы толщиной 100 мкм, содержащие баррельную кору и ядра таламуса, с помощью вибратома VT 1000E (Leica, Германия). Часть образцов мозга, содержащих исследовательские структуры, заливали в парафиновые блоки, с которых изготавливали 4 мкм срезы на микротоме HM 340E Thermo Scientific (Micom, Германия).

*Иммуногистохимические методы исследования.* Иммуногистохимию на парафиновых срезах проводили в аппарате Autostainer Plus (Dako, Германия). Использовали первичные мышинные моно- и поликлональные антитела против нейрофиламентов (Neurofilaments), синаптофизина (Synaptophysin), основного белка миелина (Myelin Basic Protein), глиального фибриллярного кислого белка (Glial fibrillar Acidic Protein), парвальбумина (Anti-Parvalbumin), соматостатина (Anti-Somatostatin), коннексина 36 (Anti-Connexin 36), коннексина 43 (Anti-Connexin 43), коннексина 30 (Anti-Connexin 30), произведенные фирмами Dako (Дания), Sigma-Aldrich (США), Invitrogen (США), Spring Bioscience (США). В качестве вторичных использовали антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена RTU EnVision/HRP anti-mouse, anti-rabbit (Dako, Дания). Проявление иммунных комплексов проводили в свежеприготовленном буферном растворе с субстрат-хромогеном – 3,3-диаминобензидинтетрахлоридом (ДАБ)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Светооптическое исследование проводили при помощи микроскопа DM 2500 (Leica, Германия) со встроенной камерой DFC 495 (Leica, Германия).

*Метод флуоресцентной конфокальной микроскопии.* Часть срезов головного мозга крыс были использованы для иммунофлуоресцентного исследования под конфокальным микроскопом. Для этого 40 мкм вибраторные срезы были разделены на две группы для инкубации с первичными антителами в течение семи суток: 1 – мышинные моноклональные антитела к ГФКБ и кроличьи поликлональные антитела к коннексину 43; 2 – мышинные антитела к ГФКБ и кроличьи антитела к коннексину 30. Затем срезы промывали в фосфатном буфере и инкубировали в течение суток в смеси вторичных антител, конъюгированных с флуоресцентной меткой: козы антитела anti-Rabbit CF488A (Sigma-Aldrich, США) и козы антитела anti-mouse CF555 (Sigma-Aldrich, США). Далее срезы монтировали на стекла в среде, препятствующей выцветанию флуоресцентных сигналов Fluorescence Mounting Medium (Dako, Дания), накрывали покровным стеклом и исследовали с использованием лазерного сканирующего двухфотонного микроскопа (Zeiss LSM880, Германия).

*Электронная микроскопия.* Для стандартного электронномикроскопического исследования головной мозг животных фиксировался методом перфузии, в качестве фиксатора использовался 4 % параформальдегид. Из секции головного мозга крыс изготавливали фронтальные вибраторные срезы толщиной 60 микрон, отбирали срезы, содержащие колонки соматической коры и исследуемые ядра таламуса. Обработку материала для электронной микроскопии проводили по общепринятой методике (Robenson G., Gray T., 1990; Bozzola J. J., Russell L. D., 1992). Одиночные и серийные ультратонкие срезы изготавливали с помощью ультрамикротомы EM UC 7 (Leica, Германия) и алмазного ножа ultra 45° (Diatome, Швейцария), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали в электронных микроскопах Jeol 1011 (Jem, Япония) и Tecnai G2 Spirit BioTWIN (FEI, Голландия) с ускоряющим напряжением 80–100 кВ.

*Электронная иммуногистохимия.* Иммуногистохимия на ультраструктурном уровне проводилась на срезах головного мозга крыс по собственным разработанным протоколам pre-embedding (перед заливкой в эпоксидную смолу) и post-embedding (после заливки, на сеточках для электронной микроскопии). В соответствии с протоколом pre-embedding 60 мкм срезы помещали в растворы для криопротекции, замораживали и размораживали над парами жидкого азота и инкубировали в первичных антителах к глиальному фибриллярному кислому белку, парвальбумину, коннексину 36, коннексину 43, коннексину 30 в течение четырех суток при температуре 20 °С. Далее срезы инкубировали во вторичных антителах RTU EnVision/HRP+Peroxidase и обрабатывали стандартными для электронномикроскопического исследования методами. В соответствии с протоколом post-embedding приготовленные обычным путем ультратонкие срезы монтировали на никелевые сетки 300 меш (EMS, США), которые последовательно перемещали из одной капли необходимого раствора в другую объемом 25 мкл: 1 % метапериодат натрия (7 минут), натрий-фосфатный буфер с БСА (7 минут), блокирующий раствор для вторичных антител (60 минут),

раствор первичных антител к коннексину 43 (24 часа), раствор вторичных антител, конъюгированных с коллоидным золотом размером 10 нм (2 часа). Далее сетки фиксировали в 2 % глютаровом альдегиде, подсушивали, контрастировали и просматривали в электронном микроскопе.

*Морфометрические методы исследования.* Морфометрический анализ структур и продуктов реакции на светооптическом уровне проводили при помощи модуля интерактивных измерений (LAS Interactive Measurement) лицензионной программы Leica Application Suite 4.3 (Leica, Германия). Для морфометрического анализа ультраструктуры исследуемых структур с помощью цифровой камеры Erlangshen ES500W (Gatan, США, Канада) производили ввод и анализ изображений в графическом формате tiff. Морфометрию проводили с использованием лицензированной программы Qwin (Leica, Кембридж Англия). Запись электроннограмм производили с увеличениями от  $\times 40\,000$ . Результаты получены в абсолютных единицах измерения – микронах и нанометрах. Цифровая камера электронного микроскопа, оснащенная программным обеспечением Digital Micrograph (Gatan, США), позволяла осуществить коррекцию изображения методами цифровой фильтрации.

## **2.2. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

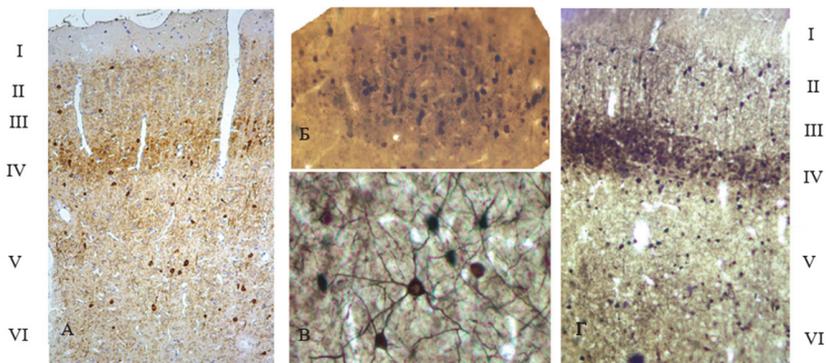
### **2.2.1. Распределение нейрональных и глиальных антигенов в колонках соматосенсорной коры, вентральных и ретикулярном ядрах таламуса крысы**

Традиционно при исследовании головного мозга мышей и крыс большое внимание привлекало развитие таламокортикальных и кортикоталамических связей на примере вибрисковой системы у грызунов. Коровый уровень представительства вибрисс был открыт при изучении морфологических особенностей колончатой организации соматической коры S1 грызунов и представляет собой группировки клеток в форме бочонков, или баррелей, в дальнейшем эти поля сгруппированных нейронов были названы баррельной корой (Woolsey T. A., Van der Loos H., 1970). Таламический уровень обработки тактильной информации располагается в вентробазальном комплексе или в вентральном ядре VPM таламуса, где описаны так называемые баррелоиды. Вентральное ядро таламуса является основным источником поступления специфической информации в соматическую кору и реципрочно связано с нею двусторонними топическими организованными связями как на уровне таламуса, так и коры (Сухов А. Г., Лапенко Т. Л., 1978). Несмотря на то, что баррельная кора и баррелоиды таламуса были изучены в мельчайших деталях с использованием электрофизиологических и морфологических методов, в этих структурах не было изучено распределение белков нейронов и глии.

Как правило, баррельная кора идентифицируется в виде плотных компактных ячеистых структур на толстых вибраторных срезах толщиной от 50 мкм. Результаты проведенного морфологического исследования показали,

что эти структуры невозможно выявить на тонких срезах, применяя стандартные гистологические методы, такие как окраску гематоксилином и эозином. Однако при иммуногистохимическом исследовании области коркового представительства вибрис установлено, что распределение белка синаптических везикул синаптофизина позволяет выявить баррели коры на тонких 4 мкм тангенциальных срезах. При этом более интенсивная экспрессия этого белка отмечена в стенках баррелей. По-видимому, количество химических синапсов и/или содержание в них синаптических везикул значительно больше в стенках баррелей, чем в их центральной части. Изучение распределения белков цитоскелета нейронов нейрофиламентов также позволило четко идентифицировать стенки и полость отдельных баррелей на тонких тангенциальных срезах. В пределах фронтального среза на уровне IV внутреннего зернистого слоя были выявлены группировки вертикально ориентированных пучков нейрофиламентов в тяжи, проходящие преимущественно через септу и стенку баррелей. Описанный результат исследования экспрессии нейрофиламентов позволяет предположить, что крупные отростки нервных клеток, расположенных в пределах отдельных баррелей, в основном направлены по глубине колонок – вверх или вниз, что может говорить о преимущественно вертикальном расположении данных отростков в соматической коре S1 крыс. Исследование ГФКБ показало, что распределение этого белка в баррельной коре не гомогенно. В центральной части каждого барреля располагается скопление астроцитов и их отростков, благодаря чему баррели легко идентифицировать. Выявленные в нашем исследовании особенности расположения глиальных клеток в баррельной коре свидетельствуют об особом значении астроглии для обеспечения структурно-функциональной организации колонок, а формирование щелевых контактов в астроглиальных группировках может обеспечивать регуляцию клеточного и тканевого гомеостаза в этих структурах. Иммуногистохимическое исследование парвальбумина было проведено нами как на фронтальных вибротомных 60 микронных, так и на тонких 4 мкм срезах соматической коры. Как показало исследование, практически во всех слоях соматической коры локализовано множество интенсивно окрашенных клеток с разнонаправленными отростками, экспрессирующими антиген парвальбумин ( $PV^+$  нейроны). При этом четвертый слой коры (область формирования баррелей) является зоной с наиболее плотным содержанием нейропептида (47 % клеток) (рисунок 1).

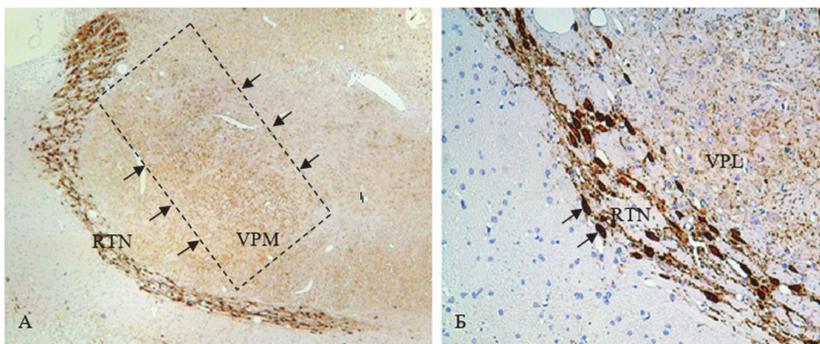
На уровне баррелей наибольшее количество тел  $PV^+$  нейронов плотно располагалось в септах и стенках этих структур, а экспрессия парвальбумина в нейропиле позволила четко выявить их полости. Преобладание количества  $PV^+$  нейронов в септах баррелей может быть связано с направлением хода дендритов  $PV^+$  нейронов во внутренней части бочонка и возможным формированием дендро-дендритных щелевых контактов (электрических синапсов), что, в свою очередь, наравне с глиальными щелевыми контактами астроцитов может являться морфологической основой индивидуального локального пейсмекерного ритмогенеза и регуляции функционального состояния корковых колонок.



**Рисунок 1** – Послойное распределение и морфологические характеристики парвальбумин-содержащих нейронов соматической коры крысы: А, Г – распределение иммунопозитивных PV<sup>+</sup> нейронов на фронтальном 4 мкм срезе (А) и на фронтальном 60 мкм эпоновом срезе (Г) соматической коры. Четвёртый слой коры визуализируется в виде темной плотной линии; Б – локализация парвальбумина в барреле, размером 300 мкм<sup>2</sup>, четвёртого слоя коры; В – звездчатый нейрон четвёртого слоя, содержащий парвальбумин. Увеличение: А – х 100, Б – х 400, В – х 1000, Г – х 100

Анализ результатов изучения экспрессии нейро-глиальных антигенов в вентральных и ретикулярном ядрах таламуса показал, что миелинизированные и немиелинизированные отростки нейронов имеют горизонтально ориентированное параллельное расположение в ядрах VPM, VPL и формируют крупные пучки, которые расположены между баррелоидами в VPM ядре. Наибольшая интенсивность экспрессии основного белка миелина и нейрофиламентов была обнаружена в RT ядре. В исследуемых ядрах таламуса была отмечена умеренная равномерная экспрессия синаптофизина в нейронах и в нейропиле с усилением интенсивности экспрессии в области VPL ядра на границе с RTN ядром. Сетчатая структура баррелоидов в VPM при этом не была выявлена. Зона RT ядра таламуса при отмеченной ранее позитивной реакции на нейрофиламенты и основной белок миелина была отрицательной к белку синаптофизину. Иммуногистохимическое исследование распределения ГФКБ в области ядер VPL и VPM показало наличие группировок астроглиальных элементов в зонах проекции вибрисс. Судя по экспрессии нейроглиальных антигенов, баррелоиды таламуса имеют схожее с баррелями строение: на уровне IV слоя наблюдалась группировка пучков нейрофиламентов в тяжи, проходящие преимущественно через септу и стенку баррелей. Схожее расположение астроглиальных элементов во втором (баррелоиды таламуса) и в третьем (баррели коры) уровнях организации тактильного анализатора может свидетельствовать об особом значении астроцитов для их модульной структуры. При этом регуляция нейрональной активности в этих корковых и подкорковых клеточных ансамблях может обеспечиваться посредством астроглиальных щелевых контактов и полуканалов вокруг аксо-шипииковых химических синапсов через реакцию абсорбции внеклеточных ионов (Glaume C. B. et al., 2020).

В доступной литературе отсутствуют сведения о наличии в баррелоидах таламуса мелких коротко-аксонных интернейронов, имеющих предположительно тормозную функцию. Между тем проведенное нами исследование вентральных ядер таламуса выявило клетки и отростки, экспрессирующие кальций-связывающий белок парвальбумин и гормон-подавляющий нейропептид соматостатин (Som), являющиеся специфическими маркерами тормозных интернейронов. Наибольшая экспрессия PV и Som была выражена, прежде всего, в RT ядре, а также в зоне VPM ядра (рисунок 2). В зоне RT ядра продукты реакции были отмечены в цитоплазме клеток, в аксонах и дендритах PV<sup>+</sup> ГАМК-ергических нейронов, формирующих цепочки и группы (рисунок 2). В зоне VPL интенсивность и характер реакции на PV<sup>+</sup> существенно менялись: многочисленные окрашенные PV<sup>+</sup> отростки, срезанные вдоль и поперек, в нейропиле располагались между негативно окрашенными телами нервных клеток. Очевидно, что эта зона характеризуется присутствием исключительно PV<sup>+</sup> проекций и отсутствием самих PV<sup>+</sup> нейронов. По сравнению с VPL зоной, в VPM ядре была отмечена отчетливая слабopоложительная реакция не только в отростках, но и в соме клеток. При этом расположение PV<sup>+</sup> структур в VPM ядре позволило выявить баррелоиды таламуса на тонких 4 мкм срезах (рисунок 2). В соответствии с полученными данными об экспрессии парвальбумина в баррелях коры, в VPM и RT ядрах таламуса PV<sup>+</sup> клеточные группировки являются центрами таламо-кортикальных проекций, что обеспечивает уникальность организации гомологичных зон представительства вибрисс в мозге. При этом важную роль в формировании элементарного ансамбля тормозных PV<sup>+</sup> нейронов внутри этих структур могут играть щелевые контакты, способствующие локальной эндогенной синхронизации нейрональной активности.

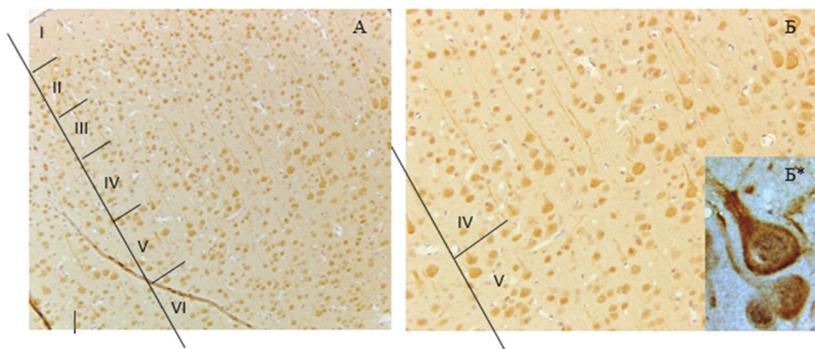


**Рисунок 2** – Экспрессия парвальбумина в VPM, VPL и RT ядрах таламуса: А – экспрессия PV выявляет четкие границы ядра RT, а также контуры баррелоидов таламуса ядра VPM. Пунктирной линией обозначено баррелоидное поле, стрелками – отсутствие экспрессии между баррелоидами; Б – PV<sup>+</sup>-содержащие нейроны RT ядра (стрелки) таламуса и умеренная PV<sup>+</sup> реакция нейропилы VPL ядра.  
Увеличение: А – х 40, Б – х 200

### 2.2.2. Распределение коннексинов в соматической коре, в вентральных и ретикулярном ядрах таламуса крысы

Исследование распределения белков коннексинов нейронов и глиальных клеток проводилось методами иммуногистохимии и иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии с использованием антител к коннексину 36 (Сх36), коннексину 43 (Сх43), коннексину 30 (Сх30).

Изучение результатов иммуногистохимических реакций с антителом к Сх36 на фронтальных парафиновых срезах соматической коры выявлено значительное количество клеток, синтезирующих этот белок и потенциально способных формировать электрические синапсы во всех слоях коры. Показано, что реакция на Сх36 проявляется в виде цитоплазматического и мембранного окрашивания клеток и их отростков, особо выражена в радиально направленных восходящих коллатералях, длина которых достигала 260 мкм. Экспрессия данного антигена наблюдалась на нейронах и их отростках в областях наружного зернистого (II), пирамидного (III), внутреннего зернистого (IV), ганглионарного (V) и полиморфного (VI) слоев (рисунок 3А). В апикальном молекулярном (I) слое при отсутствии тел клеток визуализируются скопления многочисленных ярко окрашенных срезанных мелких отростков – аксонов и дендритов с высоким уровнем содержания Сх36. При большем увеличении отмечен ярко окрашенный ободок крупных клеток IV–V слоев (рисунок 3Б, Б\*), бледная мембранная реакция вокруг тел некоторых нейронов и пунктирное окрашивание нейропиля. При этом исследование экспрессии Сх36 не позволило выявить структуры бочонков четвертого слоя, что наблюдалось при изучении распределения нейрофиламентов и синаптофизина.



**Рисунок 3** – Иммуногистохимическое исследование соматической коры с использованием антител к коннексину 36:

А – положительная цитоплазматическая реакция на Сх36 в клетках I–VI слоев коры;

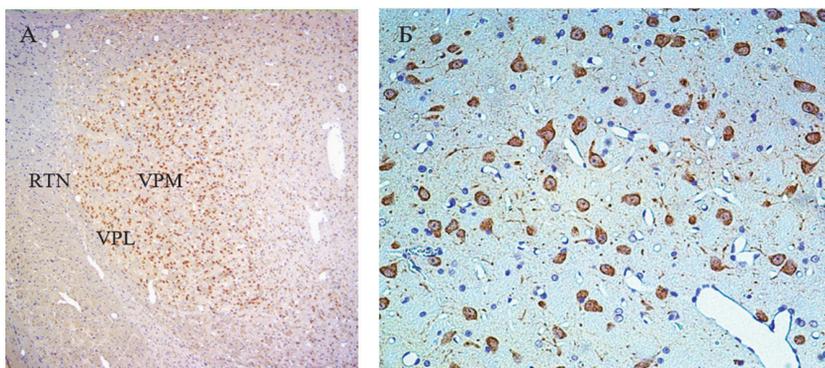
Б – цитоплазматическая и мембранная Сх36+ реакция на нейронах IV–V слоев коры;

Б\* – локализация коннексина 36 в нейроне IV слоя коры.

Увеличение: А –  $\times 200$ , Б –  $\times 400$ , Б\* –  $\times 1000$

Детекция экспрессии белка Сх36 в таламусе проводилась на тонких парафиновых срезах, содержащих VPM, VPL и RT ядра, проекции которых связа-

ны с баррелями четвертого слоя коры. Следует отметить, что полученная при иммуногистохимическом исследовании реакция с использованием антител к коннексинам (Cx36, Cx43) в исследуемых ядрах таламуса является наиболее выраженной по сравнению с другими основными структурами мозга, располагающимися в плоскости среза, – корой, гиппокампом, гипоталамусом, другими ядрами таламуса. По-видимому, белки-коннексины играют особую роль для образования и функционирования этих структур. Выраженная экспрессия белка Cx36 в областях VPM и VPL ядер в основном была отмечена в цитоплазме нервных клеток, при этом отличий в интенсивности окрашивания между этими зонами не было выявлено. Слабо выраженная экспрессия Cx36 в нейропиле исследуемых структур при большем увеличении выявляла нейронные отростки, локализованные как в VPM и VPL ядрах, так и в RT ядре, при отсутствии Cx36 в клетках (рисунок 4).



**Рисунок 4** – Иммуногистохимическое исследование таламуса с использованием антител к коннексину 36:

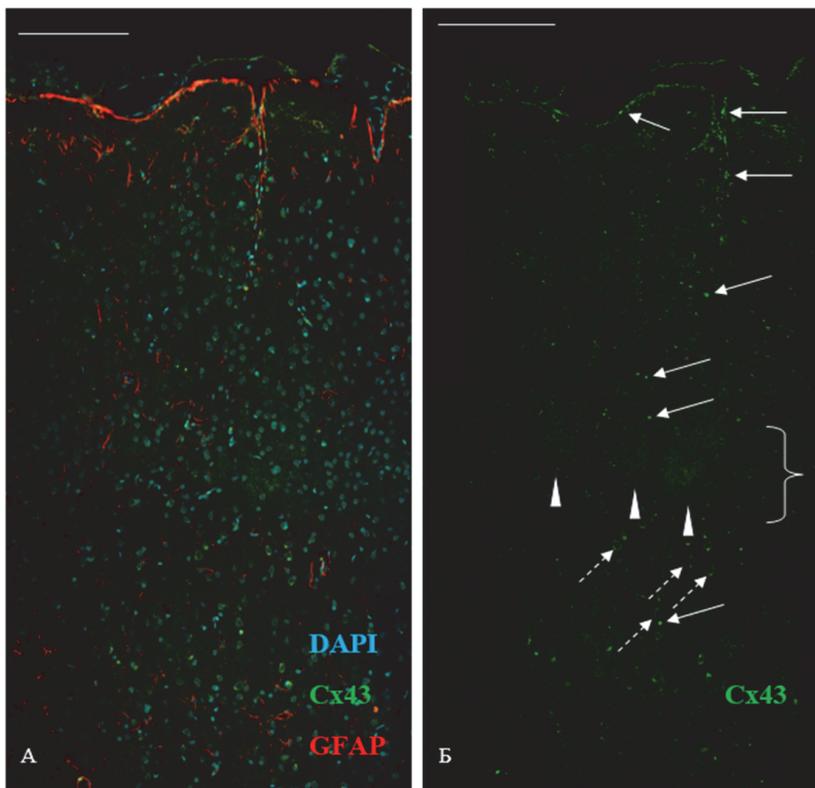
А – экспрессия Cx36, выявляющая ядра VPM, VPL таламуса, слабо выраженная экспрессия в RT ядре; Б – цитоплазматическая экспрессия Cx36 нейронов VPM ядра таламуса. Увеличение: А –  $\times 40$ , Б –  $\times 400$

Полученные результаты о распределении Cx36 в коре и таламусе демонстрируют не столько локализацию ЩК (электрических синапсов) между нейронами и их отростками в этих структурах, сколько количество синтезируемого клетками белка и наличие его в отростках. Данное заключение не лишено оснований, поскольку обнаружение ЩК с типичной ультраструктурой и содержанием Cx36 в нексусах между нейронами является достаточно редким явлением в структурах мозга (Sloper J. J., Powell T. P. S., 1978; Tamas G. et al., 2000). Отсутствие данных о наличии ЩК нейронов связано прежде всего с размерами нексусов этих контактов, предназначенных для синхронизации электрических сигналов в небольших нейронных ансамблях. Не исключено, что ЩК нейронов, как правило, слишком малы для исследования методом иммуноэлектронной микроскопии с коллоидным золотом.

Выявление таких контактов возможно при использовании комбинированных методов иммунофлюоресценции и электронной микроскопии, изучении реплик методом замораживания/скальвания, просмотре изображений посредством микроскопов с высоким разрешением со встроенным гониометром (Fukuda T., Kosaka T., 2000, Liu X. B., Jones E. G., 2003). Выявленная экспрессия Cx36 в клетках и отростках различных слоев коры и ядрах таламуса может быть связана с необходимостью постоянного синтеза этого белка. Поскольку скорость оборота коннексинов и период их полураспада составляет не более 1,5 часа, для клетки формирование функционально активного щелевого контакта является достаточно динамичным процессом (Gaietta G. et al., 2002). Накопление Cx36 в цитоплазме и отростках клеток, продемонстрированное в наших исследованиях, может быть связано с активацией постраницсионных процессов, таких как фосфорилирование, сборка молекул белка в активные коннексоны, встраивание коннексонов в мембрану.

Сравнительный анализ экспрессии PV и Cx36 в слоях коры показал, что оба этих белка содержатся в нейронах с одинаковой морфологией: в мелких округлых клетках верхних слоев, а также в крупных треугольных клетках IV–V слоев коры. При этом PV<sup>+</sup> нейроны отличались друг от друга уровнем экспрессии парвальбумина (высокое содержание PV, среднее содержание PV), но не уровнем экспрессии Cx36. Эти результаты свидетельствуют о том, что все подтипы ГАМК-ергических интернейронов в неокортексе образуют щелевые контакты и содержат одинаковый уровень Cx36. В таламусе экспрессия Cx36 была выражена в тех же участках ядер VPM/VPL, в которых ранее отмечена экспрессия парвальбумина. Полученные данные свидетельствуют о новой структурно-функциональной особенности гомологичных зон представительства вибрисс в мозге. Баррели коры и вентральные ядра таламуса отличаются наличием специфических тормозных парвальбуминсодержащих связей, объединенных Cx36-содержащими ЦК. Существование подобных сетей может играть ведущую роль в контроле возбуждающих связей, регулировании таламокортикального проведения, синхронизации как локальной импульсной, так и ритмической активности крупных и малых нейронных ансамблей в неокортексе и таламусе.

Исследование локализации белка щелевых контактов глии Cx43 в соматической коре и таламусе проводили как с помощью стандартной иммуногистохимии и иммунопероксидазной реакции, так и посредством иммунофлюоресценции с применением тройного мечения с антителами к ядерному маркеру DAPI, ГФКБ и Cx43. В соматической коре экспрессия Cx43 была показана в виде крупных скоплений коллоидов хромогена на отростках астроцитов пиальной оболочки, в виде мембранной реакции на клетках и восходящих коллатералах V и IV слоев, а также диффузной реакции нейропиля всех слоев, наиболее выраженной в IV и в VI слоях коры. При этом экспрессия Cx43 позволила идентифицировать баррели четвертого слоя (рисунок 5). Подробное изучение срезов коры при большем увеличении проводили с использованием конфокального лазерного микроскопа.



**Рисунок 5** – Иммунофлюоресцентное исследование фронтального среза коры головного мозга с применением антител к коннексину 43 и ГФКБ.

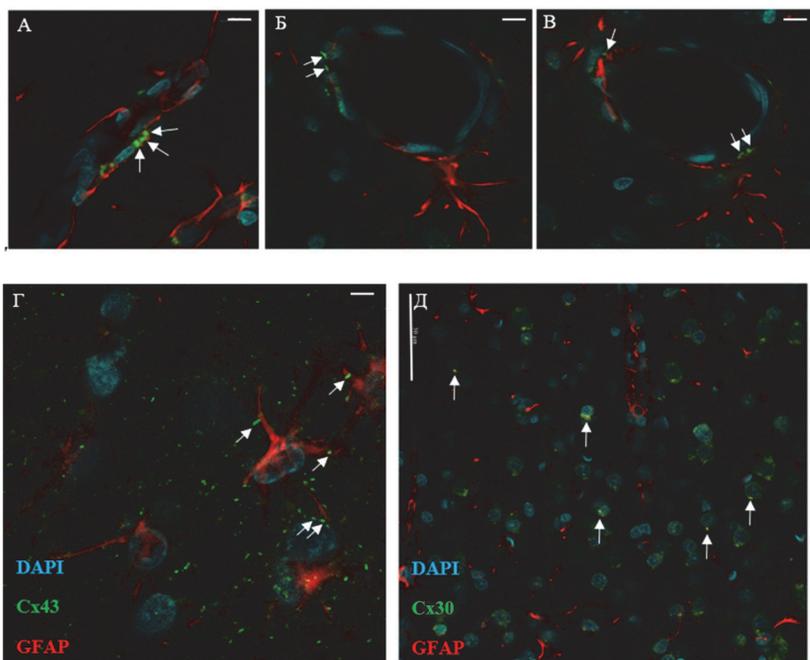
Ядра подкрашены DAPI:

А – общий вид локализации Сх43 и ГФКБ; Б – сигналы только белка коннексина 43.

Белыми сплошными стрелками обозначены положительные Сх43 сигналы в виде единичных точек в нейропиле коры, пинальной оболочке и вокруг микрокапилляров, белая пунктирная стрелка – мембранная реакция Сх43 вокруг крупных клеток V слоя коры, треугольная белая стрелка – реакция Сх43, выявляющая баррели IV слоя.

Масштабный отрезок соответствует 200 мкм

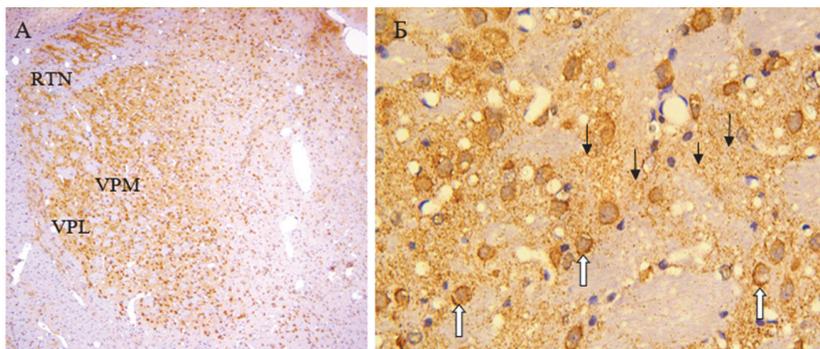
Было показано, что положительная реакция нейропиля на Сх43 при большем увеличении представляла собой характерную зернистость за счет распределения белка в виде позитивных точек различного диаметра как вокруг нейронов, так и в некотором отдалении (рисунок 6 Г). Выявленные положительные сигналы располагались на отростках астроцитов (мелкие точки), содержащих ГФКБ, в нейропиле коры, а также вокруг продольно и поперечно срезанных микрокапилляров (более крупные точки) (рисунок 6 А–В).



**Рисунок 6** – Иммунофлуоресцентное исследование глиальных коннексинов в коре и таламусе крысы:

А – локализация крупных гранул коннексина 43 вокруг микрокапилляров (белые стрелки); Б – поперечно срезанный сосуд. Локализация крупных гранул Сх43 (белые стрелки) на дистальных отростках астроцитов таламуса; В – локализация крупных гранул Сх43 вблизи (белые стрелки) тел астроцитов таламуса; Г – локализация гранул коннексина 43 (белые стрелки) в соматосенсорной коре; Д – диффузная цитоплазматическая и мембранная реакция Сх30 вокруг отдельных клеток, а также в виде точечных сигналов ко-экспрессии коннексина 30 и ГФКБ (белые стрелки). Масштабный отрезок соответствует А – 10, Б – 20, В – 20, Г–В – 20, Д–В – 50  $\mu\text{м}$

Иммуногистохимическое исследование белка Сх43 в ядрах таламуса выявило в большей степени диффузное окрашивание нейропиля в VPL, VPM и RT ядре, которое выглядит как точечное при больших увеличениях. Судя по размерам выявленных гранул хромогена в нейропиле ядер таламуса, щелевые контакты астроцитов имеют большие размеры в этой структуре, чем в неокортексе. Помимо этого, коннексин 43 выявлен в виде мембранной реакции на телах некоторых клеток, по аналогии с экспрессией этого белка в клетках IV и V слоев коры. Также при большем увеличении отмечены клетки с отрицательной реакцией к этому коннексину. Следует отметить, что позитивная мембранная реакция на телах клеток наблюдалась нами только в VPL, VPM зонах таламуса, в ядре RT положительная реакция обнаружена только в виде пунктирного окрашивания нейропиля (рисунок 7).



**Рисунок 7** – Распределение белка-коннексина 43 в релейных и ретикулярном ядрах таламуса:

А – экспрессия Сх43, выявляющая VPM, VPL, RT ядра таламуса; Б – точечная экспрессия Сх43 в нейропиле (тонкие стрелки) и мембранная (толстые стрелки) на нейронах в области VPM ядра таламуса. Увеличение: А – х 40, Б – х 400

Обнаруженная нами положительная мембранная реакция Сх43 на некоторых клетках V и IV слоев коры и в VPM и VPL ядрах таламуса соответствует существующим представлениям о том, что глиальный коннексин может экспрессироваться в популяциях некоторых нейронов, что было показано для клеток Пуркинье мозжечка, нейронов гиппокампа, гранулярных клеток зубчатой извилины и нейронов ядер заднего мозга и др. (Simbürger E. et al., 1997, Priest A. et al., 2001). Поскольку клетки – предшественники нейронов и глии имеют возможность экспрессировать оба типа коннексина (Сх36, Сх43), очевидно, некоторые группы нейронов коры и таламуса сохраняют эту способность и в зрелом мозге. Также подобная картина экспрессии не исключает возможность формирования щелевых контактов между нейронами и глией в исследуемых структурах.

Выявленная в настоящей работе диффузная точечная экспрессия Сх43 в нейропиле коры, демонстрирующая рисунок баррелей четвертого слоя, свидетельствует об особом значении этого белка для таких структур. По-видимому, астроциты четвертого слоя организуют трехмерные глиальные синцитии из ЦК, четко соответствующие границам барреля. Также возможность образования такого астроглиального синцития была показана нами в ядрах VPM, VPL и RT таламуса. По нашему мнению, внутри изолированного модуля коры и таламуса астроциты посредством ЦК могут обеспечивать тесное пространственное взаимодействие с тормозными парвальбуминсодержащими ансамблями нейронов баррельной коры. Такая скооперированная деятельность способствует осуществлению координации нейрональной и метаболической активности нейронных ансамблей таламокортикальной системы, а также физической сегрегации функциональных нейрональных компартов. При этом выявленное нами скопление Сх43 в пиальной оболочке коры головного мозга может свидетельствовать об активном участии ЦК, создаю-

щих панглиальный синцитий, в обеспечении реализации барьерной функции астроцитов в поверхностной пограничной мембране коры мозга.

При подробном анализе микрокапилляров коры и таламуса было установлено, что периваскулярную астроцитарную оболочку формируют несколько астроцитов, расположенных с разных сторон. При этом Сх43 был выявлен как на дистальных, так и на проксимальных отростках, а также рядом с телами этих астроцитов (рисунок 6 А, Б, В). В целом, цепочки положительный сигналов на Сх43 различного диаметра были выявлены по всей окружности астроцитарных периваскулярных муфт во всех исследуемых структурах мозга. По нашему мнению, астроглиальные ЦК в пределах корковых и подкорковых зон представительства вибрисс способствуют осуществлению управляемой астроцитами регуляции местного кровотока в ответ на нейрональную активность и внешние сенсорные стимулы.

Также в работе исследовано распределение глиального Сх30 в коре головного мозга крыс. Обнаружено, что общий уровень экспрессии коннексина 30 в целом ниже, чем Сх43, а его локализация гетерогенна.

Наиболее выраженная положительная реакция на этот белок была выявлена в IV, а также VI слое коры, при этом уровень экспрессии в нейропиле ниже, чем Сх43. Нами установлено преобладание Сх30 в астроцитарных оболочках вокруг отдельных клеточных тел в коре головного мозга – в отличие от коннексина 43 (см. рисунок 6 Д). При больших увеличениях отмечена мембранная реакция на тела отдельных клеток коры в виде желтых сигналов – результат ко-экспрессии ГФКБ и Сх30, а также цитоплазматическая экспрессия Сх30 в виде ободка вокруг отдельных клеток. Полученные результаты впервые демонстрируют гетерогенность астроглии по экспрессии белков-коннексинов (Сх43 и Сх30) в коре мозга крыс, что свидетельствует о наличии субпопуляций астроцитов. Однако, несмотря на существующие данные о различиях в распределении Сх43 и Сх30 в норме в различных структурах мозга, причины такой неоднородности остаются неисследованными.

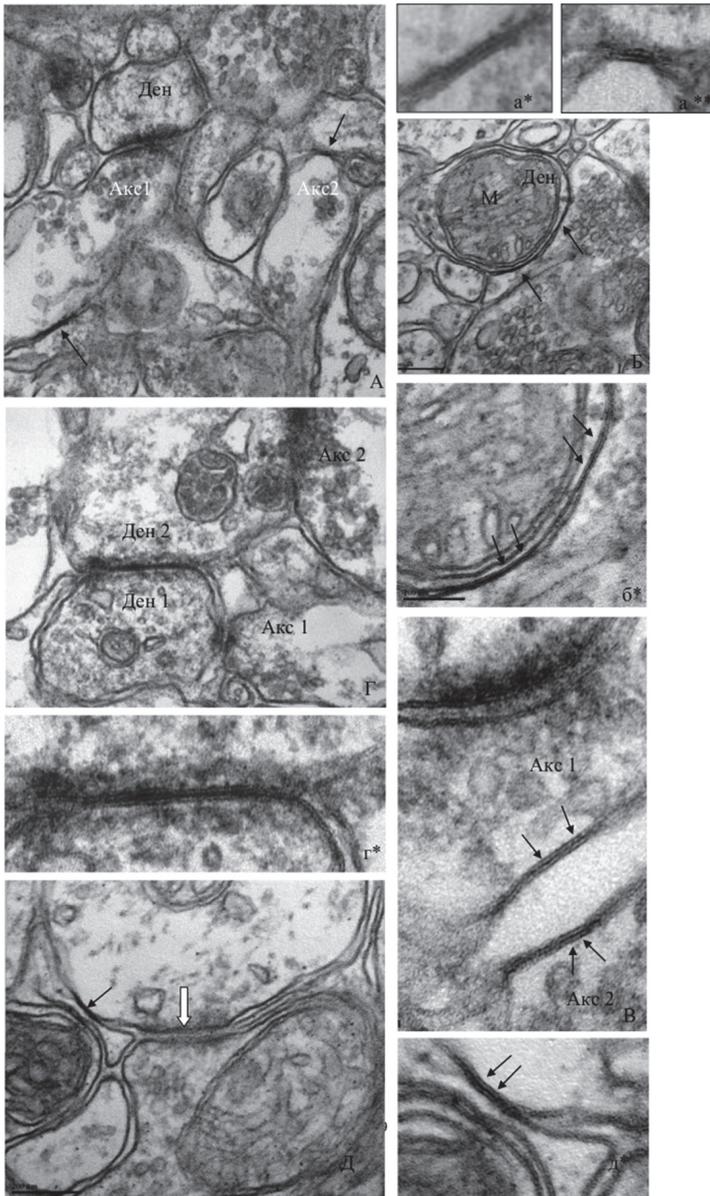
Между тем изучение гетерогенности астроглии способствует изменению представлений о нейро-глиальных отношениях, а также формирует новый взгляд на различные патологии ЦНС, в которых астроглия принимает непосредственное участие (Teubner B. et al., 2003, Hamdan R. et al., 2013).

### **2.2.3. Ультраструктура нейро-нейрональных и глия-глиальных щелевых контактов в колонках соматической коры и ядрах таламуса крысы**

При электронномикроскопическом исследовании соматической коры и ядер таламуса нами были обнаружены ЦК (электрические синапсы), локализованные на отростках, имеющих ультраструктурные признаки принадлежности к нейронам: наличие синаптических везикул, нейротрубочек, нейрофиламентов, а также активных зон химических синапсов с постсинаптическим уплотнением. На относительно небольших увеличениях ЦК определяются как уплотненные ровные участки на мембранах отростков нервных клеток. При больших увеличениях такие нейрональные контакты обладают характерной для типичного ЦК семислойной структурой: две

контактирующие трехслойные мембраны, между которыми располагается узкая щель шириной около 3 нм (рисунок 8а\*, а\*\*). Выявленные ЩК были представлены следующими типами: аксо-дендритические, дендродендритические, а также «смешанные» синапсы. В ряде случаев нами обнаруживались несколько рядом расположенных ЩК в одном поле зрения, которые были локализованы на соседних аксонах, содержащих синаптические везикулы (рисунок 8 А). Помимо контактов с короткими зонами некуса также визуализировались протяженные ЩК, расположенные между аксонами и предположительно дендритами (рисунок 8 Б, б\*). В таламических ядрах нами нередко выявлялись два и более параллельно расположенных ЩК между отростком со светлой электроннопрозрачной цитоплазмой (предположительно дендритом) и двумя аксонами, содержащими синаптические везикулы. При этом отмечено, что расстояние между двумя ЩК относительно небольшое (около 85 нм), что может обеспечивать быструю межклеточную передачу (рисунок 8 В). В некоторых случаях ЩК был локализован между двумя дендритами, которые формируют одновременно аксо-дендритические химические синапсы (рисунок 8 Г). В случаях дендродендритических ЩК на цитоплазматической стороне мембран, формирующих ЩК, имеются небольшие скопления хлопьевидного электронно-плотного материала, «опушающего» контактирующие мембраны (рисунок 8 г\*). В области формирования баррелей коры нами обнаружены единичные «смешанные» синапсы, которые представлены близко расположенными на одном дендрите дендродендритическим ЩК и симметричным аксо-дендритическим химическим синапсом (рисунок 8 Д, д\*). В результате последовательного просмотра полей зрения в четвертом слое было обнаружено 11 нейронейрональных и 19 глия-глиальных ЩК из общего числа 30 обнаруженных ЩК. В исследуемых ядрах таламуса количество нейронейрональных ЩК оказалось значительно меньше. Так, в ретикулярном ядре (RTN) из 30 обнаруженных ЩК 29 являлись глия-глиальными, и 1 – нейронейрональным. В вентропостеромедиальном (VPM) ядре из 41 ЩК 37 являлись глия-глиальными и 4 нейронейрональными. В прилежащем к VPM ядру вентропостеролатеральном ядре (VPL) было обнаружено 48 ЩК, из которых 44 ЩК являлись глия-глиальными, а 4 ЩК являлись нейронейрональными. В постеромедиальном (Pom) ядре из 30 обнаруженных ЩК 28 ЩК были представлены глия-глиальными и 2 нейронейрональными ЩК. Проведенное морфометрическое исследование выявило большее количество нейронейрональных ЩК в коре по сравнению с таламическими ядрами. Кроме того, по нашим данным, наибольшее количество ЩК среди исследуемых ядер в таламусе локализовано в области формирования баррелоидов – в VPM ядре.

Согласно литературным данным, в модульных группировках коры (баррели) наблюдается асимметричный характер ветвления дендритов и их ориентация в полость баррелей (Сухов А. Г., 1992). Эта морфологическая особенность может определять более высокую степень синхронизации осцилляторной активности внутри отдельных корковых и подкорковых модулей, что соответствует данным известных электрофизиологических исследований (Lübke J., Feldmeyer D., 2007).



**Рисунок 8** – Ультраструктура щелевых контактов на отростках нейронов коры и таламуса крыс:

А, а\*, а\*\* – два ЩК, локализованных на аксонах в одном поле зрения.  
А – общий вид (ЩК отмечены стрелками); а\* – увеличенный фрагмент, демонстрирующий ультраструктуру ЩК на аксоне, формирующем на противоположном конце аксо-дендритический синапс; а\*\* – увеличенный фрагмент, демонстрирующий аксо-дендритический ЩК с небольшой зоной нексуса; Б, б\* – ЩК с протяженной активной зоной между аксоном и дендритом; Б – общий вид (ЩК отмечены стрелками); б\* – увеличенный фрагмент рисунка, демонстрирующий места попадания ЩК в плоскость среза (стрелки) и близость синаптических везикул к зоне нексуса;  
В – два ЩК (стрелки) на двух аксонах (Акс1, Акс2), между которыми предположительно расположен дендрит; Г, г\* – дендро-дендритический (Ден1, Ден2) ЩК; Г – общий вид; г\* – увеличенный фрагмент рисунка, демонстрирующий зону нексуса в плоскости среза с развитым опушающим хлопьевидным материалом вокруг контактирующих мембран; Д, д\* – «смешанный» электрический и химический синапс (обозначен белой стрелкой); Д – общий вид (ЩК отмечен стрелкой); д\* – увеличенный фрагмент, демонстрирующий ультраструктуру ЩК на дендрите.  
Условные обозначения: Акс – аксон, Ден – дендрит, М – митохондрия.  
Увеличения: А –  $\times 50\ 000$ , а\* –  $\times 250\ 000$ , а\*\* –  $\times 250\ 000$ , Б –  $\times 200\ 000$ , б\* –  $\times 300\ 000$ , В –  $\times 200\ 000$ , Г –  $\times 80\ 000$ , г\* –  $300\ 000$ , Д –  $\times 250\ 000$ , д\* –  $\times 400\ 000$

Структурно-функциональная особенность баррелей и баррелоидов также способствует формированию электрических дендро-дендритических связей между нейронами одного модуля для обеспечения локальной подпороговой синхронизации активности нейронов, более поздние этапы синхронизации при этом обеспечиваются химическими синапсами.

По литературным данным, многие пары тормозных быстроспайковых нейронов соединены одновременно и электрическими дендро-дендритными синапсами и ГАМК-ергическими тормозными химическими синапсами, образуя сеть в коре и гиппокампе, активность которой и обеспечивает синхронизацию подпорогового гиперполяризационного ритма отдельных модулей в этих структурах (Fukuda T., Kosaka T., 2003, 2006). При этом ведущая роль в функционировании этой сети отводится электрическим синапсам (ЩК), содержащим коннексин 36 (Deans M. R. et al., 2001).

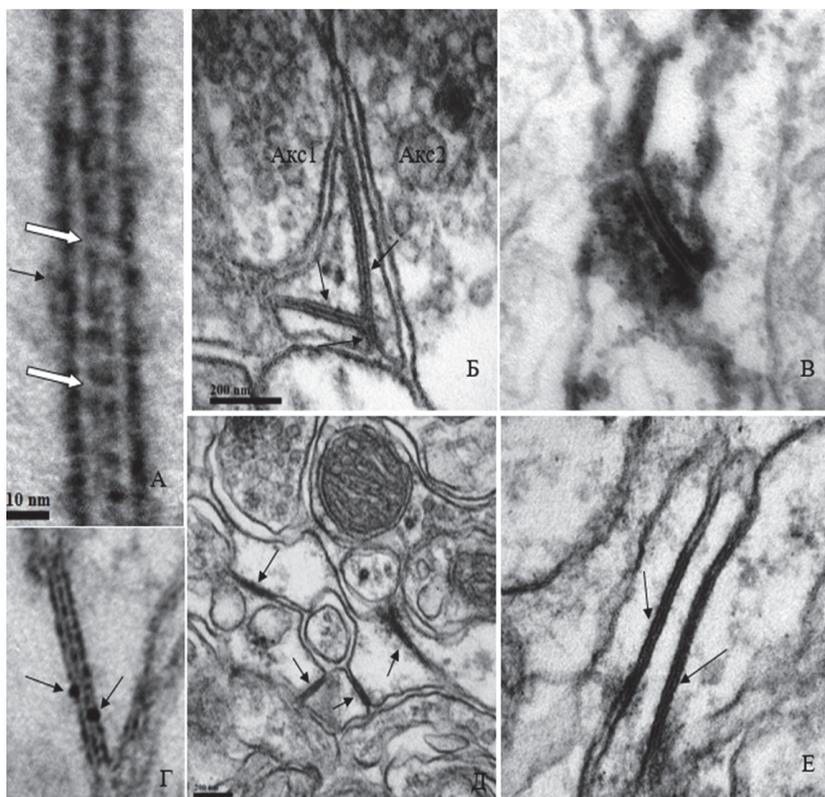
Смешанные синапсы, обнаруженные в нашем исследовании, представляют собой близко локализованные на одной мембране дендрита контакты: дендро-дендритический ЩК и симметричный аксо-дендритический химический синапс. Смешанные синапсы в неокортексе впервые описал Слорер (Sloper J. J., 1972), однако до сих пор мало известно о той роли, которую они играют в нервной системе позвоночных. Как показано в модельных исследованиях у низших позвоночных, электротонический компонент в смешанных синапсах у млекопитающих может быть связан с долговременной потенциацией (Kosaka T. et al., 2005; Hamzei-Sichani F. et al., 2012) и/или синхронизацией высокочастотных колебаний (Traub R. D. et al., 2010). По литературным данным, такие структуры также могут быть связаны с пластическими изменениями в нейрональных цепях (Pereda A. E., 2014).

В настоящем исследовании были впервые выявлены аксо-дендритические ЩК как в области коры, так и в ядрах таламуса. Этот тип контактов может играть определенную функциональную роль в локаль-

ной синхронизации активности нейронов одного ансамбля на пресинаптическом уровне. При этом возникновение потенциала действия в одном из синаптических контактов приводит к потенциалу действия в другом синаптическом контакте при помощи ЦК с низким антидромным сопротивлением и распространением потенциала в обоих афферентах. Выявление подобных случаев локализации ЦК и химических синапсов представляет особый интерес. Мы полагаем, что механизмы проведения сигнала при помощи электрических синапсов наравне с тесным пространственным взаимодействием астроглиальных ЦК и асимметричных химических синапсов являются частью функциональной организации специфических и неспецифических ядер таламуса, основных центров афферентных и эфферентных влияний коры больших полушарий.

Электронномикроскопическое исследование колонок коры и ядер таламуса показало, что большинство идентифицированных ЦК сформированы отростками, имеющими ультраструктуру астроглиальных – это электроннопрозрачные отростки, практически не содержащие органелл. Глиальные ЦК при больших увеличениях характеризовались специфической ультраструктурой: между контактирующими мембранами визуализируется электроннопрозрачная щель шириной 2–3 нм, прерываемая поперечными мостиками и кластерами осмиофильного материала – результат состыковки коннексонов (рисунок 9 А).

С помощью электронной иммуногистохимии с антителами к Cx43 и коллоидным золотом так же, как и пероксидазным методом, показано, что продукт иммунной реакции локализуется в зонах некуссов ЦК и в контактирующих отростках и в коре, и в таламусе (рисунок 9 В, Г). Помимо одиночных ЦК, в таламических ядрах нами были обнаружены серии близкорасположенных межглиальных ЦК, причем преимущественно в VPM и в прилегающем к нему ядре VPL. Такие ЦК имели характерное строение: это несколько соседствующих некуссов, расположенных под углом друг к другу, которые соединяют не два, а три отростка (рисунок 9 Б). Кроме того, некоторые глиальные отростки формируют несколько ЦК на небольшом расстоянии, соединяя три или четыре отростка (рисунок 9 Д, Е). По нашему мнению, такие близкорасположенные ЦК различной длины представляют собой основу панглиального синцития (gap junction-mediated glial networks), описанного нами на светооптическом уровне в коре и таламусе. Сцепление астроцитов посредством щелевых контактов способствует достижению изопотенциальности в астроцитарных синцитиях, что напрямую связано с поддержанием постоянной внеклеточной среды в процессе межклеточной передачи между нейронами (Ma B. et al., 2016). Такие сети глиальных ЦК могут быть интегрированы в процессы развития и функционирования миелина (Tress O. et. al., 2012), восстановления потенциала покоя на мембране аксонов путем перераспределения ионов калия (Nualart-Marti A. et. al., 2012), осуществления межклеточного обмена и перераспределения нейрорактивных субстанций (Pannasch U., Rouach N., 2013).



**Рисунок 9** – Глиа-глиальные щелевые контакты в коре и таламусе крыс:

А – ультраструктура ЩК коры при большом увеличении: белыми стрелками

обозначены коннексоны, черными – внутриклеточные петли коннексина;

Б – раздвоенный ЩК таламуса (активные зоны контактов обозначены стрелками), соединяющий три отростка вокруг нескольких аксонов (Акс1, Акс2);

В, Г – электронная иммуногистохимия с антителами к белку астроглиальных ЩК

коннексину 43; В – электронноплотный продукт реакции локализован вокруг

активных зон контакта и в контактирующих отростках; Г – частицы коллоидного

золота (стрелки) локализованы на мембранах в зонах ЩК коры; Д – четыре ЩК

таламуса, соединяющие четыре глиальных отростка в непосредственной близости

от аксона; Е – два параллельных ЩК таламуса с удлиненными активными зонами.

Ширина среднего отростка между ЩК составляет около 50 нм. Увеличение:

А – х 400 000, Б – х 120000, В – х 250 000, Г – х 300 000, Д – х 200 000, Е – х 200 000

Объединяясь в сети посредством ЩК, глиоциты, по нашему мнению, имеют определяющее значение для циркуляции информации и могут обеспечивать модуляцию функционирования больших нейронных ансамблей корковых

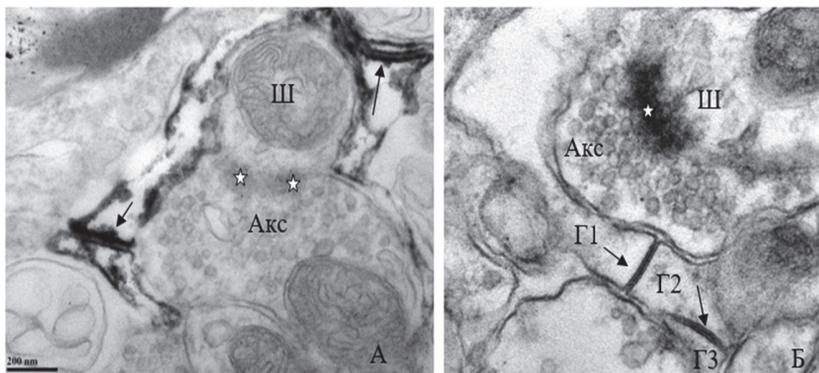
и подкорковых структур, способствовать обработке моносинаптической передачи сигнала от подкоркового представительства вибрисс к корковому и обратно. При этом, по современным данным, для поддержания ЦК в открытом состоянии внутри синцития астроциты обладают уникальным свойством – накоплением полиаминов, таких как путресцин, агматин, спермидин, спермин (Benedikt J. et al., 2012; Skatchkov S. N. et al., 2015, 2016; Zayas-Santiago A. et al., 2014).

В то же время массовая деполяризация такого синцития путем повышения концентрации ионов калия при эпилепсии, нейротравме или ишемии (Wang Q. et al., 2020) ведет к потере астроцитами способности устранять избыток калия из межклеточного пространства, что приводит к резкому падению нейрональной активности и коме.

Все обнаруженные нами глиальные ЦК формировались в основном между отростками в нейропиле, однако встречались также ЦК как в непосредственной близости от сомы нейронов и глиоцитов, так и на some глиальных клеток, что было отмечено нами в колонках коры и в ядрах VPM и PoM. Следует отметить, что как в коре, так и в таламусе практически все идентифицированные в нейропиле ЦК локализованы в непосредственной близости от активной зоны аксо-шиповых химических синапсов. При этом особенности взаимного расположения ЦК и химических синапсов позволяют отчетливо выделить несколько вариантов. Первый вариант включает глиальные ЦК, локализованные рядом с пресинаптической частью химических синапсов. Второй вариант включает ЦК, локализованные со стороны постсинаптической части химических синапсов – вокруг срезанных вдоль и поперек дендритов или шипиков. Чаще всего ЦК расположены на относительно небольшом расстоянии от синаптической щели химического синапса. ЦК и активные зоны химического синапса могут располагаться как под углом по отношению друг к другу, так и параллельно или перпендикулярно (рисунок 10 А, Б). Кроме того, во всех исследуемых ядрах нами выявлены ЦК вокруг перфорированных асимметричных химических синапсов с несколькими активными зонами (рисунок 10 А). Последние, как известно, вовлечены в процессы синаптической пластичности и долговременной потенциации. Выявленные нами ЦК могли быть различной длины и конфигурации и сформированы как крупными, так и мелкими по площади глиальными отростками. Так, к особенностям ядер таламуса можно отнести наличие ЦК с длинными протяженными бляшками, соединяющими крупные глиальные отростки, в том числе вокруг аксо-шиповых химических синапсов. Эти данные свидетельствуют в пользу гипотезы о гетерогенности как глиальных клеток, так и ЦК, образующихся между ними. Очевидно, что для обеспечения функционирования изученных таламических ядер существенным является удлиненность выявленных контактов, способствующая передаче большого объема информации между астроцитами, окружающими химические синапсы.

Ультраструктурное исследование образцов, полученных как с использованием иммуногистохимии, так и без применения этого метода, позволило

выявить не только ЩК, но и установить особенности пространственного расположения отростков астроцитов вокруг химических синапсов. В большинстве случаев отростки астроглии плотно примыкают к аксо-шиповому синапсу, окружая аксоны, шипики и активные зоны химических синапсов, создавая подобие некой изолирующей оболочки или псевдокапсулы вокруг химического контакта (рисунок 10 А), что было также показано нами при исследовании серийных ультратонких срезов.



**Рисунок 10** – Коннексины глиальных щелевых контактов в составе трехчастного синапса: А, Б – ЩК вокруг аксошиповых синапсов; А – псевдооболочка из астроглиальных отростков и двойных ЩК (стрелки) вокруг перфорированных синапсов, содержащих коннексин 43 (электронная иммуногистохимия); Б – два ЩК (стрелки) вокруг аксо-шипового синапса, соединяющие глиальные отростки. Условные обозначения: Акс – аксон, Ш – шипик, звездочки – активная зона химических синапсов, Г – глиальная клетка. Увеличение: А – х 80 000, Б – х 60 000

Такая система формирования трехчастного синапса, состоящего из астроглиальных отростков с локализацией ЩК вокруг химических синапсов, способствует моносинаптической передаче сигнала от подкоркового представительства вибрисс к корковому и обратно. ЩК, располагаясь рядом с химическими синапсами, могут облегчать первичную обработку афферентной импульсации непосредственно от внеталамических источников и ее передачу в проекционные слои коры больших полушарий. Также участие ЩК выражается в обеспечении ионного, энергетического гомеостаза, а также в регуляции нейротрансмиттерного, в частности глутаматного, обмена между астроцитами и нейронами (Giaume C. et. al., 1997, Pellerin L., Magistretti P. J., 2012). В то время как астроциты через энергозависимые каналы способны усилить нейротрансмиссию путем выделения собственного глутамата или ослабить передачу путем его поглощения, ЩК способствуют перераспределению нейротрансмиттера внутри астроглиальных отростков благодаря высокой проницаемости и быстрому обмену (Blomstrand

F., Giaume C., 2006., Rouach N. et. al., 2008). Кроме того, в таламусе астроглиальные ЩК могут содействовать процессам ингибирования активности нейронов IV и VI слоев коры мозга, внутриталамического (между ядрами VPM, VPL), а также лагерального торможения, участвуя в глутаминовом цикле, обеспечивая миграцию глутаматных транспортеров и регуляцию работы ГАМК-ергических синапсов. Астроцитарные ЩК способствуют перераспределению ГАМК внутри глиальных клеток, а после того как ГАМК метаболизируется в глутамат и глутамин, эти контакты способствуют миграции глутамина обратно в пресинаптическую терминаль ГАМК-ергического нейрона, где он снова декарбоксилируется до ГАМК.

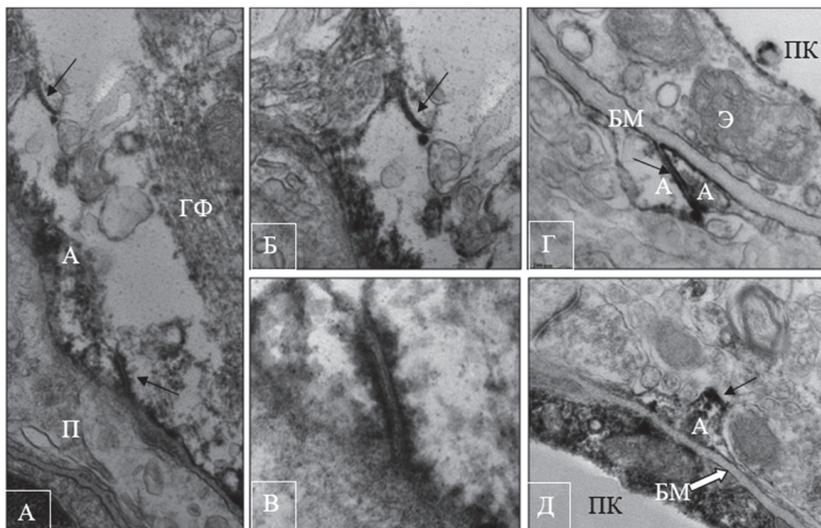
Детальное ультраструктурное исследование ЩК, расположенных вблизи микрокапилляров, показало, что межастроцитарные щелевые контакты являются еще одним компонентом ГЭБ наряду с эндотелиоцитами, базальной мембраной, перицитами и астроцитами. Особенностью тонкого строения периваскулярных ЩК является то, что они, как правило, довольно протяженные, а сам контакт нередко прерывистый, пунктирный и сходен с таковым у перфорированных химических синапсов. Отростки астроцитов, формирующие контакт, нередко лежат «внахлест», образуя многослойную муфту вокруг сосуда. Также обращает внимание наличие симметричного осмиофильного опушения обеих мембран, формирующих контакт, в зоне нексуса. По нашим данным, нексусы таких соединений характеризуются не только более протяженной обильно опушенной зоной контакта, но и нередко имеют специфическую изогнутую форму, что отличает их от прямых щелевых контактов, расположенных на удалении от капилляров.

С одной стороны, наличие крупных нексусов ЩК между соседними сосудистыми отростками астроцитов формирует прочную механическую связь, которая тем более необходима, поскольку плотные контакты других типов в этих зонах не обнаружены (Mathiisen T. M., 2010). С другой стороны, обширные зоны перекрытия ножек астроцитов, «прошитые» протяженными нексусами ЩК, могут служить физическим барьером для проникновения из капилляра по межклеточным пространствам воды и растворимых веществ, прошедших через эндотелиоциты, базальную мембрану, перициты.

Осмиофильное опушение на внутренних мембранах ЩК, вероятно, представляет собой макромолекулярные комплексы, которые формируют внутриклеточные петли белков коннексинов, и в первую очередь Sx43, с белками, участвующими в построении цитоскелета – дребрином, тубулином, актиновыми филаментами и другими. Эта связь, как известно, необходима для поддержания ЩК в активном состоянии (Ambrosi C., 2016). Наиболее важным следствием образования большого количества ЩК и связи коннексинов с белками цитоскелета может оказаться интенсификация передачи ионов и низкомолекулярных соединений между астроцитами в периваскулярной зоне. В первую очередь, такая связь может обеспечивать проведение  $Ca^{2+}$  между астроцитами, как это происходит между отростками астроцитов, которые прилегают к химическим синапсам (Giaume C. et. al., 2009). Передача кальциевого сигнала от активных химических синапсов по телу астроцита

к васкулярной ножке и между соседними сосудистыми отростками может приводить к высвобождению специфических сигналов, модулирующих состояние сосуда в ответ на активность химического синапса, тем самым обеспечивая локальное адаптивное изменение кровотока.

Электронная иммуногистохимия с антителами к коннексинам астроцитов показала, что в зоне ЩК, соединяющих периваскулярные отростки вокруг микрокапилляров, присутствуют как Сх30, так и Сх43. При этом реакция на Сх30 отмечалась в виде обильного выпадения продукта реакции в крупных отростках астроцитов, примыкающих к капилляру (рисунок 11 А–В).



**Рисунок 11** – Коннексыны глиальных щелевых контактов (черные стрелки) в составе ГЭБ:

А–В – отростки астроцитов, формирующие 2 ЩК и содержащие Сх30;  
 Г–Д – отростки астроцитов, формирующие ЩК и содержащие Сх43; А – общий вид ЩК, содержащих Сх30 вокруг микрокапилляров; Б – увеличенный фрагмент рисунка А, демонстрирующий ультраструктуру одного из ЩК; В – увеличенный фрагмент рисунка А, демонстрирующий ультраструктуру второго ЩК;  
 Г – гомотипический ЩК, содержащий Сх43 ; Д – гетеротипический ЩК, содержащий Сх43. Условные обозначения: А – астроцит, ГФ – глиофибриллы, П – перицит, БМ – базальная мембрана, Э – эндотелиоцит, ПК – просвет капилляра. Увеличение: А – х 50 000, Б – х 150 000, В – х 200 000, Г – х 200 000, Д – х 80 000

Белок Сх43, напротив, был локализован исключительно в тонких и небольших периваскулярных отростках астроцитов (рисунок 11 Г). Следует отметить, что в некоторых типичных по ультраструктуре ЩК продукты реакции на Сх43 были локализованы лишь в одном из контактирующих отростков (рисунок 11 Д). Вероятно, такие асимметричные гетеротипические контак-

ты могут быть образованы двумя различными типами отростков, один из которых содержит Сх43, а другой – коннексоны, состоящие из коннексина другого типа. В настоящей работе с помощью ультраструктурного исследования невозможно достоверно установить, к какому типу глиоцитов относится вторая клетка. Однако не исключено, что это олигодендроцит, так как, согласно литературным данным, полученным *in vitro*, формирование гетеротипических контактов типа Сх30/Сх43 между астроцитами маловероятно (Orthmann-Murphy J. L., 2007), а другие варианты сочетания можно считать незначительными ввиду очень слабой экспрессии других типов коннексинов в астроцитах. Наличие гетеротипических ЩК между астроцитами и олигодендроцитами в периваскулярных зонах представляет несомненный интерес, поскольку такие контакты в доступной литературе не описаны и их возможное значение остаётся неясным.

Полученные нами результаты свидетельствуют, что коннексины участвуют также и в регуляции транспорта различных веществ из сосудистого русла к нейронам, и наоборот. По крайней мере два белка – Сх30 и Сх43 – образуют многочисленные ЩК между сосудистыми ножками астроцитов, следовательно, нарушение экспрессии этих коннексинов должно также драматически отразиться и на функционировании ГЭБ. В частности, при одновременной блокаде выработки Сх43 и Сх30 у подопытных животных наблюдались значимые изменения в обмене метаболитов в нервной ткани (Rouach N. et al., 2008), существенные нарушения глио- и нейрогенеза (Kunze A. et al., 2009), демиелинизация и вакуолизация белого вещества (Lutz S. E. et al., 2009), а также угнетение синаптической передачи в гиппокампе (Pannasch U. et al., 2011). Таким образом, можно заключить, что астроциты выступают в качестве основного посредника между нейронами и сосудистым руслом, образуя нейро-глио-сосудистые комплексы, являющиеся морфо-функциональной единицей различных структур головного мозга. В составе нейро-глио-сосудистых комплексов большую роль играют межастроцитарные ЩК, образованные преимущественно Сх43 и Сх30, которые формируются не только между отростками астроцитов, окружающими химические синапсы, но также и между сосудистыми ножками астроцитов. В баррельной коре крыс и в баррелоидах таламуса ЩК в составе нейро-глио-сосудистых комплексов могут играть ключевую роль в процессе локального повышения кровотока в пределах этих модулей в ответ на увеличивающуюся синаптическую активность при стимуляции вибрисс.

## ВЫВОДЫ

1. В баррельной коре S1, в вентральных и ретикулярном таламических ядрах крыс в стенках каждого барреля и баррелоида расположены нейронные ансамбли, характеризующиеся высокой экспрессией парвальбумина. В центральной части каждого барреля и баррелоида локализованы глиальные клетки (астроциты), что свидетельствует о структурно-функциональной схожести нейро-глиальных ансамблей в этих корковых и подкорковых зонах.
2. В корковых и таламических зонах представительства вибрисс имеется плотная сеть глиальных и нейрональных щелевых контактов, благодаря которой осуществляется метаболическая и электротоническая коммуникация при обработке сенсорных сигналов между корой и подкорковыми структурами.
3. Экспрессия белков щелевых контактов астроглии коннексина 43 и коннексина 30 в коре и таламусе крыс гетерогенна. Коннексин 43 является преимущественно в нейропиле в виде точек различного диаметра на отростках и телах астроцитов, а также в периваскулярных астроцитарных муфтах. Коннексин 30 локализован в цитоплазме и в отростках астроцитов, контактирующих с сомой нейронов. Эти данные свидетельствуют о наличии субпопуляций астроцитов, экспрессирующих различные типы коннексинов в головном мозге.
4. Щелевые контакты нейронов в коре и таламусе головного мозга представлены следующими типами: аксо-дендритические, дендродендритические и «смешанные» синапсы. В баррельной коре сформировано больше нейрональных щелевых контактов по сравнению с таламическими ядрами. В ядрах таламуса наибольшее количество этих контактов локализовано в области формирования баррелоидов в заднепостеромедиальном ядре. Полученные данные свидетельствуют о формировании электротонических связей между тормозными парвальбуминсодержащими клетками как корковых, так и подкорковых модулей для обеспечения локальной подпороговой синхронизации активности нейронов в этих структурах.
5. В коре и таламусе имеются многочисленные одиночные и близкорасположенные глиа-глиальные щелевые контакты, содержащие коннексин 43 и создающие локальный панглиальный синцитий. По количеству такие глиальные щелевые контакты значительно преобладают над нейрональными в исследуемых структурах, что указывает на их участие в процессах циркуляции информации и обеспечения модуляции функционирования больших нейронных ансамблей.
6. В коре и таламусе мозга крыс аксонные терминалы и химические аксо-шиповые синапсы окружены астроглиальными оболочками, соединенными щелевыми контактами, содержащими коннексин 43. В системе трехчастного синапса астроглия может играть роль пространственного ионного буфера, благодаря которой обеспечивается

регуляция нейронной передачи сигнала и восстановление потенциала покоя на мембране нейронов в этих структурах.

7. В комплексе нейро-глио-сосудистых ансамблей сформированы гомотипические и гетеротипические щелевые контакты, образованные коннексином 43 и коннексином 30, которые соединяют васкулярные ножки астроцитов. Расположение щелевых контактов в нейро-глио-сосудистых ансамблях свидетельствует об их роли в поддержании целостности астроцитарной муфты, а также в осуществлении ограничительных функций ГЭБ.

## Практические предложения

Ведущая роль щелевых контактов в синхронизации ритмической активности и ее поддержании указывает на их ключевую роль при развитии патологической эпилептиформной активности. Новый терапевтический подход для лечения эпилепсии и уменьшения побочных эффектов эпилептогенеза млекопитающих может быть основан на использовании специфических для ЦНС блокаторов щелевых контактов нейронов.

Блокаторы глиальных синцитиев, создаваемых щелевыми контактами, рекомендуется использовать в качестве терапевтической мишени в стратегии лечения нейродегенеративных заболеваний, связанных с массовой межклеточной передачей инфекционных агентов на большие расстояния в мозге (ретровирусные, микробные и прионные инфекции).

Высокая реактивность антител к астроглиальному коннексину 43 способствует их использованию для выявления новых эффективных показателей диагностики и прогноза развития первичных глиальных опухолей головного мозга млекопитающих.

Для разработки рациональных стратегий, позволяющих осуществлять контролируемую доставку соответствующих лекарственных веществ в клетки ЦНС, рекомендуется учитывать функциональное состояние щелевых контактов, входящих в состав гематоэнцефалического барьера.

Результаты диссертационного исследования вошли в «Методические положения для проведения лабораторных и научных работ по изучению нейроморфологического и ультраструктурного анализа нервной ткани», рассмотренные, одобренные и рекомендованные к изданию Комиссией «Фармакология и терапия» секции зоотехнии и ветеринарии Отделения сельскохозяйственных наук РАН (протокол № 3 от 11.12.2020)

## **Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы**

Учитывая существование нейронных сетей, состоящих из ГАМК-ергических нейронов, содержащих добавочный нейропептид парвальбумин и объединенных щелевыми контактами в колонках соматосенсорной коры, целесообразно исследовать и сравнить подобные анатомические субстраты в других функциональных областях коры головного мозга, включая зрительную и моторную кору.

Данные о роли астроглиальных ЦК для нормального функционирования клеток мозга могут служить основой дальнейших исследований распределения таких контактов между отростками опухолевых клеток в астроцитарных опухолях различной степени малигнизации (Grade I-Grade IV), что будет способствовать пониманию значения ЦК в процессах малигнизации, инвазии и метастазирования. Кроме того, данные о гетерогенности астроглии по экспрессии коннексинов могут служить основой разработки новых представлений о биологии глиальных опухолей ЦНС животных.

Новое перспективное направление в изучении распространения прионных инфекций животных – исследование межклеточного проведения в пораженных астроцитах PrPSc посредством нанотрубочек и щелевых контактов с целью блокирования этого механизма.

Принимая во внимание возможное значение щелевых контактов в развитии различных патологических процессов ЦНС, целесообразно продолжить их исследование в клеточных культурах нейронов и глии, а также в модельных экспериментах при ишемии, эпилепсии, болезни Альцгеймера и др.

## СПИСОК ОСНОВНЫХ ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Публикации в журналах, входящих в базы данных Scopus и Web of Science (Q1-Q2)

1. Non-random formation of the ‘tripartite synapse’ in layer 2/3 of rat barrel cortex / S. Filippova, A. Logvinov, A. Starostin, **E. Kirichenko** // *Glia*. – 2019. – V. 67, Issue S1. – P. E340–E341.
2. Kirichenko, E. Y. Ultrastructural study of glial gap junctions in the thalamic nuclei of rat / **E. Y. Kirichenko**, G. A. Churyumova, A. K. Logvinov // *Biochemistry (Moscow)*. – 2016. – V. 10, Issue 3. – P. 207–217.

### Публикации в журналах, входящих в базы данных Scopus и Web of Science (Q3 – Q4)

3. Кириченко, Е. Ю. Структура и функции щелевых контактов и составляющих их коннексинов ЦНС млекопитающих / **Е. Ю. Кириченко**, С. Н. Скачков, А. М. Ермаков // *Биологические мембраны*. – 2021. – Т. 38, № 2. – С. 1–14.
4. Особенности строения нейро-глио-сосудистых ансамблей в гломерулах обонятельной луковицы крысы / **Е. Ю. Кириченко**, А. К. Логвинов, С. Ю. Филиппова и др. // *Цитология*. – 2020. – Т. 62, № 4. – С. 278–285.
5. Ultrastructural evidence for presence of gap junctions in rare case of pleomorphic xanthoastrocytoma / **E. Yu. Kirichenko**, M. M. Salah Sehweil, Z. A. Goncharova et al. // *Ultrastructural pathology*. – 2020. – V. 44, № 2. – P. 227–236.
6. Щелевые контакты в составе нейро-глио-сосудистых ансамблей в колонках баррельной коры крыс / **Е. Ю. Кириченко**, П. Е. Повилайтите, А. К. Логвинов и др. // *Цитология*. – 2018. – Т. 60, № 6. – С. 448–454.
7. Mechanisms of the action of endogenous electrotonic influences and exogenous factors on biological rhythms of neurons / V. I. Orlov, A. G. Sukhov, O. I. Kit et al. // *Cardiometry*. – 2018. – № 12. – P. 39–53.
8. Кириченко, Е. Ю. Щелевые контакты нейронов в корковых колонках и в вентральных ядрах таламуса / **Е. Ю. Кириченко**, А. К. Логвинов, С. Ю. Филиппова // *Цитология*. – 2017. – Т. 59, № 10, – С. 705–710.
9. Mechanisms of electromagnetic influence and effects on membrane systems in neurons and cardiomyocytes / V. I. Orlov, M. Y. Rudenko, A. I. Shikhlyarova et al. // *Cardiometry*. – 2017. – № 11. – P. 17–27.

10. Иммуноterapia колоректального рака: современное состояние и перспективы (обзор) / О. И. Кит, С. Ю. Филиппова, **Е. Ю. Кириченко** и др. // Современные технологии в медицине. – 2017. – Т. 9, № 3. – С. 138–150.
11. Экспрессия коннексина 43 в глиальных опухолях головного мозга человека / **Е. Ю. Кириченко**, А. Ф. Савченко, Д. В. Козаченко и др. // Архив патологии. – 2017. – Т. 79, № (2). – С. 3–9.
12. Ультраструктурная идентификация щелевых контактов в глиальных опухолях головного мозга человека / **Е. Ю. Кириченко**, А. Ф. Савченко, Д. В. Козаченко и др. // Архив патологии. – 2017. – Т. 79, № 1. – С. 3–11.
13. Длинные некодирующие РНК, ассоциированные с канцерогенезом: биологическое значение и перспективы применения в диагностике / О. И. Кит, **Е. Ю. Кириченко**, Ю. Г. Кириченко и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – Т. 61, № 1. – С. 13–16.
14. Characteristics of the structural organization of the ventral posteromedial and posterolateral nuclei and the reticular nucleus of the thalamus in rats (an immunohistochemical study) / **E. Y. Kirichenko**, M. A. Akimenko, A. K. Logvinov et al. // Neuroscience and Behavioral Physiology. – 2017. – V. 47, № 6. – P. 621–626.
15. Особенности экспрессии коннексина-36 и некоторых нейроглиальных антигенов в астроцитарных опухолях головного мозга / **Е. Ю. Кириченко**, Г. В. Жукова, С. В. Григоров и др. // Архив патологии. – 2015. – Т. 77, № 3. – С. 23–29.
16. Distribution of neuronal and glial antigens in somatosensory cortex columns in the rat brain (an immunohistochemical study) / **E. Y. Kirichenko**, A. O. Grankina, A. K. Logvinov, P. E. Povilaitite // Neuroscience and Behavioral Physiology. – 2015. – V. 45, № 3. – P. 252–255.
17. Analysis of the spatial distribution of the gap junctions relative to chemical synapses on the serial ultrathin sections of the rat barrel cortex / **E. Y. Kirichenko**, A. G. Sukhov, A. K. Logvinov, P. E. Povilaitite // Neuroscience and Behavioral Physiology. – 2013. – V. 43, № 3. – P. 336–340.
18. Structural organization of the barrel cortex in rats (an immunohistochemical study) / **E. Y. Kirichenko**, A. K. Logvinov, E. Yu. Kirichenko et al. // Neuroscience and Behavioral Physiology. – 2011. – V. 41, № 1. – P. 6–9.
19. Sukhov, A. G. Structural Characteristics and Spatial Organization of Parvalbumin-Containing Neurons in Somatosensory Zone S1 of the Cerebral Cortex in Rats / A. G. Sukhov, **E. Yu. Kirichenko**, L. A. Belichenko // Neuroscience and Behavioral Physiology. – 2016. – V. 46. – P. 863–867.

20. Logvinov, A. K. Laminar Distribution of the gap junctions in the rat somatic cortical columns / A. K. Logvinov, **E. Yu. Kirichenko**, P. E. Povilaitite // Journal of Integrative Neuroscience. – 2009. – V. 8, № 4. – P. 425–431.
21. Kirichenko, E. Yu. Role of gap junctions in local rhythmogenesis in cortical columns / **E. Yu. Kirichenko**, P. E. Povilaitite, A. G. Sukhov // Neuroscience and Behavioral Physiology. – 2009. – V. 39, № 2. – P. 199–202.

### **Публикации в журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ**

22. Филиппова, С. Ю. Вероятность образования трехстороннего синапса в первичной соматосенсорной коре крыс и размер активной зоны синапса находятся в прямой зависимости / С. Ю. Филиппова, А. К. Логвинов, **Е. Ю. Кириченко** // Ученые записи Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. – 2020. – Т. 6 (72), № 2. – С. 249–258.
23. Филиппова, С. Ю. Неравномерное распределение мембран астроцитов по слоям первичной соматосенсорной коры мозга крыс / С. Ю. Филиппова, А. К. Логвинов, **Е. Ю. Кириченко** // Журн. мед.-биол. исследований. – 2020. – Т. 8, № 4. – С. 409–418.
24. Кириченко, Е. Ю. Роль электрических синапсов в электротонической синхронизации веретенообразной активности в корковых колонках / **Е. Ю. Кириченко**, А. К. Логвинов // Валеология. – 2008. – № 3. – С. 57–62.
25. Сухов, А. Г. Структурная организация фокальной веретенообразной активности в колонках соматической коры крыс / А. Г. Сухов, **Е. Ю. Кириченко**, П. Е. Повилайтите // Морфология. – 2006. – Т. 129, № 2. – С. 93.

### **Монография**

26. Холинергические и потенциал-зависимые механизмы локального ритмогенеза в нейронных колонках соматической коры крысы / А. Г. Сухов, Т. С. Сердюк, Л. В. Лысенко, Е. Ю. Кириченко, и др. ; под общ. ред. А. Г. Сухова ; Южный федеральный университет. – Ростов-на-Дону : Издательство Южного федерального университета, 2011. – 346 с. ISBN 978-5-9275-0912-6.

### **Методические рекомендации**

27. Методические положения для проведения лабораторных и научных работ по изучению нейроморфологического и ультраструктурного анализа нервной ткани / **Е. Ю. Кириченко**, А. К. Логвинов, Т. С. Сердюк и др. – Ростов-на-Дону, 2021.

### Публикации в других изданиях

28. Антигенная активность коннексина 30 в головном мозге крыс / **Е. Ю. Кириченко**, А. К. Логвинов, Л. В. Лысенко, С. Ю. Филиппова // *Нейронаука для медицины и психологии : материалы XVI Международного междисциплинарного конгресса*, Судак, Крым, Россия, 6–16 октября. – Судак, 2020. – С. 248–249.
29. Филиппова, С. Ю. Неравномерное распределение контактов между химическими синапсами и периферическими отростками астроцитов по слоям баррельной коры крыс / С. Ю. Филиппова, А. К. Логвинов, **Е. Ю. Кириченко** // *Нейронаука для медицины и психологии : материалы XVI Международного междисциплинарного конгресса*, Судак, Крым, Россия, 6–16 октября, 2020. – Судак, 2020. – С. 480–481.
30. Kirichenko, E. Yu. Ultrastructural, immunoelectron and morphometrical study of gap junctions in the rat thalamic nuclei / **E. Yu. Kirichenko**, A. K. Logvinov // *Stress and Behavior : proceedings of 23rd Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference*, St-Petersburg, Russia, May 16–19. – СПб., 2016. – P. 42–43.
31. Immunohistochemical characteristics of neuron-glia relationships in human astrocytic brain tumors of different grades of malignancy / G. V. Zhukova, **E. Yu. Kirichenko**, A. Sukhov et al. // *J. Clin. Oncol.* 33. – 2015 (suppl; abstr e22096).
32. Ультраструктурное исследование щелевых контактов вентропостеромедиального и ретикулярного ядер таламуса / **Е. Ю. Кириченко**, А. К. Логвинов, А. О. Гранкина, Г. А. Чурюмова // *Нейронаука для медицины и психологии : материалы Одиннадцатого Международного междисциплинарного конгресса*, Судак, Россия, 02–12 июня, 2015. – Судак, 2015. – С. 194–195.
33. Возможное влияние щелевых контактов на прогрессию астроцитарных опухолей человека / А. О. Гранкина, **Е. Ю. Кириченко**, А. К. Логвинов, М. А. Акименко // *Нейронаука для медицины и психологии : материалы Одиннадцатого Международного междисциплинарного конгресса*, Судак, Россия, 02–12 июня, 2015. – Судак, 2015. – С. 136–137.
34. Пространственная организация парвальбумин-содержащих ГАМК-ергических нейронов в соматической коре мозга крыс / **Е. Ю. Кириченко**, Л. А. Беличенко, Н. Г. Васильченко, М. А. Акименко // *Нейронаука для медицины и психологии : материалы Одиннадцатого Международного междисциплинарного конгресса*, Судак, Россия, 02–12 июня, 2015. – Судак, 2015. – С. 195–196.
35. Чурюмова, Г. А. Иммуногистохимическое исследование вентральных ядер таламуса мозга крысы / Г. А. Чурюмова, **Е. Ю. Кириченко**,

- М. А. Акименко // *Нейронаука для медицины и психологии : материалы Одиннадцатого Международного междисциплинарного конгресса, Судак, Россия, 02–12 июня, 2015. – Судак, 2015. – С. 432–433.*
36. Роль щелевых контактов при развитии глиальных опухолей мозга человека и медуллобластом / А. О. Гранкина, **Е. Ю. Кириченко**, А. К. Логвинов и др. // *Материалы 5-го Съезда биофизиков России. – 2015. – Т. 1. – Ростов-на-Дону, 2015. – С. 348.*
37. Экспрессия нейроглиальных белков в глиомах / А. О. Гранкина, **Е. Ю. Кириченко**, А. К. Логвинов и др. // *Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины : материалы VI Международной научно-практической конференции. – Ростов-на-Дону, 2015. – С. 115–116.*
38. Чурюмова, Г. А. Ультраструктурное исследование особенностей структурно-функциональной организации щелевых контактов релейных ядер таламуса мозга крысы / Г. А. Чурюмова, **Е. Ю. Кириченко**, А. К. Логвинов // *Материалы 5-го Съезда биофизиков России. – Ростов-на-Дону, 2015. – Т. 1. – С. 376.*
39. Исследование экспрессии белка коннексина-43 при увеличении уровня малигнизации астроцитарных опухолей мозга человека / А. О. Гранкина, **Е. Ю. Кириченко**, А. К. Логвинов, Г. А. Чурюмова // *Молекулярная диагностика : материалы конференции. – Москва, 2014. – Т. 2, р. 8. – С. 55–56.*
40. Кириченко, Е. Ю. Щелевые контакты нейронов и астроглии в соматической коре головного мозга крыс / **А. К. Кириченко**, А. К. Логвинов, А. О. Гранкина // *Материалы IV Съезда физиологов СНГ. – Дагомыс, 2014. – С. 55.*
41. Гранкина, А. О. Щелевые контакты глиом человека / А. О. Гранкина, Г. В. Жукова, **Е. Ю. Кириченко** // *Материалы XXII Съезда физиологического общества им. Павлова. – Волгоград, 2013. – С. 129.*
42. Чурюмова, Г. А. Ультраструктурное исследование щелевых контактов в баррелоидах специфического ядра таламуса / Г. А. Чурюмова, **Е. Ю. Кириченко** // *Материалы XXII Съезда физиологического общества им. Павлова. – Волгоград, 2013. – С. 586.*
43. Могилевская, М. Ю. Иммуногистохимическое исследование соматической коры крысы / М. Ю. Могилевская, **Е. Ю. Кириченко** // *Материалы XXII Съезда физиологического общества им. Павлова. – Волгоград, 2013. – С. 359.*
44. Могилевская, М. Ю. Исследование локализации нейро-глиальных группировок и межклеточных контактов в соматической коре крысы / М. Ю. Могилевская, **Е. Ю. Кириченко** // *Нейронаука для медицины и психологии : материалы Девятого Международного междисциплинарного конгресса, Судак, Крым, Украина, 7–13 июня, 2013. – Судак, 2013. – С. 227.*

45. Экспрессия основных антигенов, специфичных для нервной ткани в глиальных опухолях человека / **Е. Ю. Кириченко**, Г. В. Жукова, А. О. Гранкина и др. // *Нейронаука для медицины и психологии : материалы Девятого Международного междисциплинарного конгресса*, Судак, Крым, Украина, 7–13 июня 2013 г. – Судак, 2013. – С. 171–172.
46. Кириченко, Е. Ю. Щелевые контакты нейронов и астроглии головного мозга крыс / **Е. Ю. Кириченко**, А. К. Логвинов, М. А. Акименко // *Нейронаука для медицины и психологии : материалы Девятого Международного междисциплинарного конгресса*, Судак, Крым, Украина, 7–13 июня 2013 г. – Судак, 2013. – С. 170–171.
47. Гранкина, А. О. Иммуногистохимическое исследование протеинов глиальных и нервных тканей в астроцитарных опухолях человека / А. О. Гранкина, **Е. Ю. Кириченко** // *Актуальные проблемы современной медицины : материалы конференции*. – Киев, Украина, 2013 г. – Киев, 2013. – С. 188.
48. Особенности пространственного расположения щелевых контактов и химических синапсов на серийных ультратонких срезах баррельной коры крыс / **Е. Ю. Кириченко**, А. Г. Сухов, П. Е. Повилайтите и др. // *Нейронаука для медицины и психологии : материалы Восьмого Международного междисциплинарного конгресса*. – Москва, 2012. – С. 197.
49. Кириченко, Е. Ю. Исследование щелевых контактов на серийных ультратонких срезах баррельной коры крысы / **Е. Ю. Кириченко**, А. К. Логвинов // *Материалы 16-й Международной конференции по нейрокибернетике*. – Ростов-на-Дону, 2012. – Т. 1. – С. 11–15.
50. Expression of main antigens specific for the nervous tissue in rat somatic cortex / **E. Yu. Kirichenko**, A. K. Logvinov, M. A. Akimenko et al. // *Материалы 16-й Международной конференции по нейрокибернетике*. – 2012. – Т. 1. – С. 65–68.
51. Кириченко, Е. Ю. Изучение синаптических контактов соматической коры крыс на серийных ультратонких срезах / **Е. Ю. Кириченко**, А. К. Логвинов, А. Г. Сухов // *Материалы 15-й научной школы – конференции молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии*. – Москва, 2011. – С. 135.
52. Логвинов, А. К. Ultrastructural investigation of synaptic organizations of rat somatic cortex column / А. К. Логвинов, **Е. Ю. Кириченко** // *Нейронаука для медицины и психологии : материалы 6-го Международного междисциплинарного конгресса*. – Судак, 2010. – Т. 1. – С. 197.
53. Логвинов, А. К. Морфофункциональные особенности колонки соматической коры мозга крыс / А. К. Логвинов, **Е. Ю. Кириченко** //

- Фундаментальная наука и клиническая медицина : материалы конференции молодых исследователей. – СПб., 2010. – С. 98.
54. Логвинов, А. К. Изучение электрических и химических синаптических контактов колонки соматической коры крыс / А. К. Логвинов, **Е. Ю. Кириченко**, А. Г. Сухов // Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия : материалы научной конференции, посвященной 120-летию со дня основания Императорского института экспериментальной медицины (НИИЭМ СЗО РАМН). – СПб., 2010. – С. 106.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

- ЦНС – центральная нервная система  
ЩК – щелевые контакты  
Сх36 – коннексин 36  
Сх43 – коннексин 43  
Сх30 – коннексин 30  
S1 – область соматосенсорной коры головного мозга  
VPL – вентропостеролатеральное ядро таламуса  
VPM – вентропостеромедиальное ядро таламуса  
PoM – постеромедиальное ядро таламуса  
RTN – ретикулярное ядро таламуса  
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер  
PrPSc – патологическая форма прионного белка  
ГФКБ – глиальный фибриллярный кислый белок  
BCA – бычий сывороточный альбумин  
PV – парвальбумин  
SOM – соматостатин  
DAPI – 4'-6-диамидино-2-фенилиндоль  
ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

---

Подписано в печать 02.02.2020.  
Формат 60x84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Гарнитура «Таймс». Бумага офсетная.  
Печать офсетная. Усл. печ. л. 2,0. Заказ № 13. Тираж 130 экз.

Отпечатано в типографии издательско-полиграфического комплекса СтГАУ  
«АГРУС», г. Ставрополь, ул. Пушкина, 15.



