

ТОРМОЗНЫЕ ИНТЕРНЕЙРОНЫ НЕОКОРТЕКСА ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ КЛИНИЧЕСКОЙ СМЕРТИ

В. А. Акулинин, С. С. Степанов, А. В. Мыщик, А. С. Степанов, В. С. Разумовский

Омский государственный медицинский университет Минздрава России,
Россия, 644099, г. Омск, ул. Ленина, д. 12

Inhibitory Interneurons of The Human Neocortex after Clinical Death

V. A. Akulinin, S. S. Stepanov, A. V. Mytsik, A. S. Stepanov, V. S. Rasumovsky

Omsk State Medical University, Ministry of Health of Russia,
12, Lenin Str., Omsk 644099, Russia

Цель: изучение количества и структуры интернейронов в разных областях коры головного мозга человека после остановки сердца (клиническая смерть).

Материал и методы. Основная группа ($n=7$, мужчины) пациенты, пережившие остановку сердца и умершие позже (через 7–10 и 70–90 сут) от повторной острой сердечной недостаточности. Контрольная группа ($n=4$, мужчины) погибшие в результате несчастных случаев. С использованием световой и конфокальной микроскопии проведен гистологический и морфометрический анализ 420 полей зрения неокортекса (окраска по Ниссли, на кальбиндин D28k и нейропептид Y).

Результаты. У умерших обеих групп подтвердили наличие в неокортексе всех главных типов интернейронов (корзинчатые, клетки Мартинотти и нейроглиаформные интернейроны), в соответствии с морфологией их тел и дендритных отростков. При этом количество кальбиндин- и NPY-позитивных нейронов неокортекса было одинаковым в контроле и в постреанимационном периоде. Однако, поля кальбиндин- и NPY-позитивных структур, включая тела нейронов и их дендриты, были значительно больше в образцах основной группы, чем в контроле. Максимальное увеличение общей площади кальбиндин-позитивных структур наблюдалось через 90 сут после клинической смерти. Площадь NPY-позитивных структур была больше, чем в контроле, уже через 7 сут после оживления и осталась на этом уровне через 90 сут.

Вывод. Наши находки свидетельствуют об увеличении после клинической смерти экспрессии кальбиндина и NPY в неокортексе человека, что рассматривается как компенсаторная реакция неповрежденных тормозных корковых интернейронов, направленная на защиту мозга от ишемии.

Ключевые слова: клиническая смерть; человек; неокортекс; тормозные интернейроны; кальбиндин D28k; нейропептид Y

Objective: to analyze the human neocortex interneurons (areas 4, 10, 17 and 21 by Brodmann) after cardiac arrest (clinical death).

Materials and methods. The main group included patients ($n=7$, men) who survived 7–10 days and 70–90 days after cardiac arrest and later died due to heart failure. The control group ($n=4$, men) included individuals after sudden fatal accidents. The morphometric and histological analysis of 420 neocortical fields (Nissl-staining, calbindin D28k, neuropeptide Y) was performed using light and confocal microscopy.

Results. We verified all main types of interneurons (Basket, Martinotti, and neurogliaform interneurons) in neocortex based on the morphology of their bodies and dendritic processes in both groups. The number of calbindin- and NPY-positive neurons in the neocortex was similar in the control and in the postoperative period. However, calbindin- and NPY-immunopositive structure fields including neuronal cell bodies and their dendrites were significantly more represented in neocortex of patients from the main group. Maximum increase in common square in the relative areas of calbindin-immunopositive structures was observed 90 days after ischemia. The

Адрес для корреспонденции:

Виктор Акулинин
E-mail: akulinin@omsk-osma.ru

Correspondence to:

Mr. Victor Akulinin
E-mail: akulinin@omsk-osma.ru

squares of NPY-immunopositive fields became larger seven days after resuscitation and remained increased on 90th day post-resuscitation.

Conclusion. Our findings demonstrate an increase of calbindin and NPY expression in human neocortex after clinical death, which can be explained by a compensatory reaction of undamaged inhibitory cortical interneurons directed to protect brain from ischemia.

Key words: clinical death; man; neocortex, inhibitory interneurons, calbindin D28k; neuropeptide Y

DOI:10.15360/1813-9779-2016-4-24-36

Введение

Наличие тормозных интернейронов показано во всех без исключения слоях неокортекса, где они являются постоянным компонентом локальных межнейронных цепей [1]. Форма и размеры тела, характер разветвления и длина отростков различных интернейронов существенно отличаются и, вероятно, зависят от функции конкретного нейрона [2, 3].

В неокортексе млекопитающих тормозные интернейроны представляют собой разнородную популяцию непиримидных клеток, содержащих медиатор ГАМК, комедиаторы и нейропептиды (соматостатин, кальбиндин, парвальбумин, кальренин, холецистокинин и нейропептид Y) [3–6]. ГАМК-эргические тормозные интернейроны коры в нейрохимическом отношении неодинаковы. В неокортексе 20–25% интернейронов экспрессирует парвальбумин, 45–50% — кальренин и 20–25% — кальбиндин [3].

По данным С. Aoki и V. M. Pickel [7], в коре головного мозга нейропептид Y (NPY) содержится преимущественно в тормозных интернейронах и составляет 1–2% всех ее нейронов. Следовательно, идентификация NPY может быть использована для анализа корковых тормозных интернейронов [3, 8]. Таким образом, антитела к кальбиндину и NPY могут использоваться для идентификации тормозных интернейронов коры головного мозга человека [9, 10].

Прошлые молекулярные и морфометрические исследования показали существенную роль как возбуждающих, так и тормозных интернейронов в реакции и реорганизации корковой и субкортикальной сетей после повреждения головного мозга и в развитии патологии головного мозга [4, 11, 12].

Цель исследования — изучение количества и структуры интернейронов в разных областях коры головного мозга человека после остановки сердца (клиническая смерть).

Материал и методы

В исследование были включены мужчины ($n=11$, возраст — 58–70 лет) без предшествующих неврологических заболеваний. Основная группа состояла из семи пациентов, перенесших остановку сердца (клиническая смерть), успешно реанимированных и умерших

Introduction

The presence of inhibitory interneurons has been previously demonstrated in all layers of neocortex as a constant component of local interneuron networks [1]. The shape, body size, character of branching, and the length of processes in various interneurons are significantly different and depend on specific neuron function [2, 3].

In the mammalian neocortex, the inhibitory interneurons are present by a heterogeneous population of non-pyramidal cells, containing GABA neurotransmitters, co-mediators, and neuropeptides (somatostatin, calbindin, parvalbumin, calretinin, cholecystokinin, and NPY) [3–6]. GABA-ergic inhibitory cortical interneurons are non-homologous in neurochemical aspect. About 20–25% of interneurons in neocortex express parvalbumin, 45–50% express calretinin, and 20–25% of them express calbindin [3].

According to Aoki et al [7], cortical inhibitory interneurons contain mainly NPY and constitute 1–2% of all neurons in neocortex. Therefore, the identification of NPY can be used to analyze cortical inhibitory interneurons [3, 8]. Thus, Cal and NPY antibodies can be used for identification of inhibitory interneurons in the human cerebral cortex [9, 10].

Previous molecular and morphometric studies showed the significant roles of both excitatory and inhibitory interneurons in reaction and reorganization of cortical and subcortical network after brain injury and in developmental brain pathology [4, 11, 12].

The purpose of this study was analyze the amount and structure of interneurons in different human neocortical areas after cardiac arrest (clinical death).

Materials and Methods

Patients without previous history of neurologic disease were included in the study. 11 patients (males, age 58–70 years) were investigated. The group of interest, patients with the clinical death, included seven patients who had suffered from cardiac arrest and successfully resuscitated; later these patients died from an acute fatal cardiac failure 7–10, 70–90 days after clinical death. In all cases the resuscitation included artificial ventilation, oxygen, and medications to enhance cardiac function. Four patients who died from accidents served as controls. The study protocol was approved by the ethical committee of the Omsk State Medical University [13].

позже в результате острой сердечной недостаточности через 7–10 и 70–90 сут после клинической смерти. Во всех случаях реанимация включала искусственную вентиляцию легких и лекарственные препараты, усиливавшие функцию сердечной деятельности. Контрольная группа ($n=4$) состояла из погибших в результате несчастных случаев. Исследовательский протокол одобрен этическим комитетом Омского государственного медицинского университета [13].

Стволовые функции головного мозга были восстановлены у пациентов в течение 2–3 минут после реанимации. Затем пациенты были транспортированы в палаты интенсивной терапии, где постоянно контролировали и поддерживали в пределах нормальных значений основные физиологические параметры. Согласие на забор тканей получено у родственников.

Аутопсийный материал взят в течение первых 24 часов с момента констатации биологической смерти. Были исследованы двигательная (поле 4), височная (поле 21), лобная (поле 10) и зрительная (поле 17) кора головного мозга (КГМ). Фрагменты тканей в подготовительном блоке размером $20 \times 10 \times 10$ мм погружали в 4% раствор параформальдегида с 0,1 М фосфатным буфером при pH 7,4 и хранили в этом растворе в холодильнике при температуре 4°C. Срезы толщиной 10 м делали во фронтальной плоскости через все слои коры на замораживающем криостате (Cryostat, Leica, Germany). Часть срезов была окрашена по Нисслю (крезилвиолет) для визуализации слоев и общей послойной морфометрической характеристики нейронов КГМ.

После преинкубации в фосфатном буфере срезы обрабатывали для непрямой иммунофлуоресценции с использованием первичных моноклональных антител (Calbindin D28k; SWant, Swiss antibodies, Switzerland, diluted 1:400 and Neuropeptide Y, NPY; Sigma Chemicals, St. Louis, USA; diluted 1:8000). Затем срезы инкубировали со вторичными антителами (Sigma) в разведении 1:200 в 0,1 М фосфатном буфере, содержащим 0,3% Тритон X100, в течение 2–3 ч при комнатной температуре. После промывки срезы инкубировали с FITC-конъюгированным стрептавидином (Amersham, Buckinghamshire, UK) в разведении 1:200 в темноте в течение 1–2 ч при комнатной температуре, промывали в фосфатном буфере. Затем все срезы монтировали на предметные стекла с глицерином.

Иммуногистохимические препараты просматривались на BioRad MRC 600 конфокальном лазерном сканирующем микроскопе, присоединенном к флуоресцентному микроскопу Nikon FXA. Оптимальные условия для выявления иммунофлуоресценции были следующие: увеличение линзы — $\times 20$ (объектив Nikon; Fluor 1.30), шаг просмотра срезов — $2 \mu\text{m}$, увеличение поля — 3, средняя плотность — 1, режим быстрого просмотра, 10 просмотров каждого среза с помощью фильтров Kalman с коэффициентом 3 и размером блока $1/4$, сохранение в памяти компьютера. Область сканирования составляла 140×125 мкм (17500 мкм²) на уровне III и V слоя КГМ. Разрешение матрицы — $0,48 \times 0,48$ мкм, область изображения — 384×256 пикселей. Иммунофлуоресценция и липофусциновая флуоресценция сначала проводилась с использованием фильтра 488 DF 10 через первый канал «зеленый» с получением изображения 5–10-ти Z-серийных участков, которые сохранялись в файлах на лазерных дисках. Затем КЛСМ воз-

The patient's brain stem functions have been recovered in 2–3 minutes after resuscitation. Then the patients were transferred to the intensive care unit, basic physiological parameters were monitored continuously and maintained within the normal ranges. The agreement for tissue collection was received from relatives.

Autopsy material was obtained within the first 24 hours after biological death ascertaining. Motor (area 4), temporal (area 21), frontal (area 10) and visual (area 17 by Brodmann) cortices were investigated. A small preparation block of each cortical area $20 \times 10 \times 10$ mm was immediately immersed in 4% paraformaldehyde based 0.1 M phosphate buffer (PB) at pH 7.4 and stored in this fixative at 4°C till further processing from three to seven days. The cortical specimens were serially sectioned perpendicular to the pial surface using freezing Cryostat at $10 \mu\text{m}$ (Cryostat, Leica, Germany). A sample of the frozen sections were stained with Nissl-stain to visualize the basic cortical anatomy.

After preincubation in 5% non-fat milk in PBS for 1 h in a free floating condition, sections were incubated for indirect immunofluorescence with primary monoclonal antibody (Calbindin D28k; SWant, Swiss antibodies, Switzerland, diluted 1:400 and Neuropeptide Y, NPY; Sigma Chemicals, St. Louis, USA; diluted 1:8 000) in PBS containing solution for 12 h at room temperature. After three 15-min washes with PBS, the sections were incubated with biotinylated anti-mouse (Sigma) secondary antibody diluted 1:200 in 0.1 M PBS containing 0.3% Triton X100 solution for 2–3 h at a room temperature. Following three additional washes, the tissue sections were incubated with FITC-conjugated streptavidin (Amersham, Buckinghamshire, UK) diluted 1:200 in dark for 1–2 h at room temperature. Afterward, three 15-min washes with PBS were performed. All sections were installed on a microscope glass slide and coverslipped with glycerol in PBS.

Sections were examined using a BioRad MRC 600 confocal laser microscope (CLSM) attached to Nikon FXA fluorescent microscope. Argon and krypton mixed gas laser with filters for FITS 488 DF 10, and 568 DF 10 were used. The optimal conditions for CLSM imaging of immunofluorescence and lipofuscin were the following: lens magnification of $\times 20$ (Nikon objective; Fluor 1.30), the optical sections scanned with a regular increments of $2 \mu\text{m}$, zoom factor of 3, neutral density of 1, and fast speed scanning regime was applied. Each optical section stored in the computer memory was the result of 10 scans by Kalman filtering, with a division factor of 3 and box size was equal to $1/4$. The scanned area was $140 \times 125 \mu\text{m}$, a matrix resolution was equal to $0.48 \times 0.48 \mu\text{m}$, and an image area was 384×256 pixels at level III and V of the cerebral cortex. Immunofluorescence and lipofuscin fluorescence were initially carried out using 488 DF filter through the first «green» channel with a certain number of 5–10 CLMS Z-series frames stored in files on laser CD discs. Afterward, CLSM was returned to its original position and the same area was studied for lipofuscin with 568 DF 10 filter through the second «red» channel and the corresponding Z-series frames were also stored. The morphometric analysis was performed using «ImageJ 1.46» software.

Interneurons were identified on the basis of morphological criteria, established for this type of cells [14]. For immunohistochemical Cal detection, the typology of interneurons was determined by small perikaryon size with

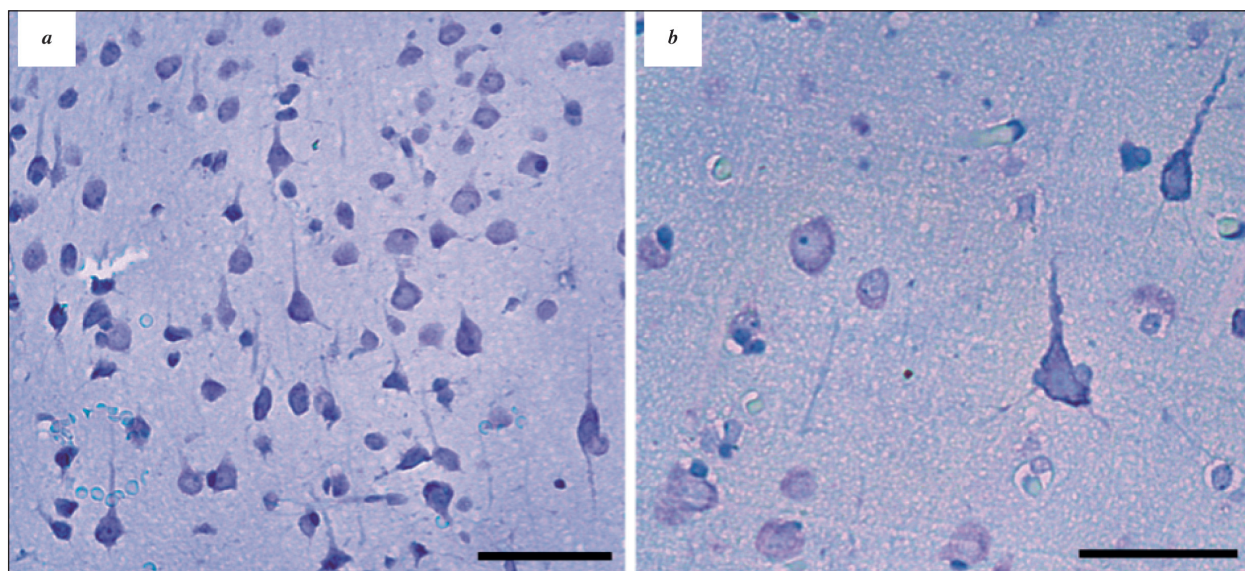


Рис. 1. Нейроны слоя III (а) и V (b) поля 10 лобной коры головного мозга пациентов контрольной группы.

Fig. 1. Neurons in layer III (a) and V (b) of area 10 frontal cerebral cortex of control group.

Note. Nissl stained. Fold $\times 10$ (a), $\times 40$ (b). Scale bar — 50 μm .

Примечание. Окраска по Нислю. Об. $\times 10$ (a) и $\times 40$ (b). Шкала — 50 мкм.

вращали в первоначальное положение и эту же область исследовали на липофусцин с фильтром 568 DF 10 через второй канал «красный», а соответствующие Z-участки также сохранялись. Морфометрический анализ провели с использованием программы «ImageJ 1.46».

Интернейроны идентифицировали на основании морфологических критериев, установленных для данного типа клеток [14]. При иммуногистохимическом выявлении кальбиндина (Cal) типология интернейронов определялась небольшой величиной перикариона с короткими радиальными дендритами. В ходе морфометрического анализа определяли общую численную плотность нейронов и относительную площадь (%) Cal- и NPY-позитивных структур (тела и отростки в нейропиле) в поле зрения микроскопа.

Препараты, окрашенные по Нислю, фотографировали с помощью микроскопа Leica DM 1000, делали цифровые микрофотографии (2048 $\times$ 1536 пикселей) на уровне III и V слоя КГМ. На полученных микрофотографиях проводили общую оценку основных типов непирамидных нейронов.

Для статистического анализа полученных результатов использовали программу STATISTICA 8.0. Проверку статистических гипотез проводили при помощи непараметрического *U*-критерия Манна-Уитни (для парного сравнения), ANOVA Краскела-Уоллиса и Фридмана (для множественного сравнения). В каждом сравниваемом случае количество измерений и полей зрения клеток определялось требованиями выявления необходимой статистической значимости ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

В КГМ лиц контрольной и основной группы преобладали нормо- и гиперхромные несморщенные нейроны, часть которых имела признаки различных уровней аутолитических изменений цитоплазмы.

short radial dendrites. During the morphometric analysis, total numerical density of Cal-immunoreactive neurons and relative density (%) of Cal-positive structures (bodies and processes in neuropile) were defined.

Images of specimens stained by Nissl were acquired by a Leica DM 1000 microscope as digital micrographs (2048 $\times$ 1536 pixels) of layers III and V of the cerebral cortex. General evaluation of the main types of the nonpyramidal neurons in the neocortex was conducted using the micrographs.

Results were analyzed using STATISTICA 8.0 software. The non-parametric *U*-Mann-Whitney test (for paired comparison) and Kruskal-Wallis ANOVA and Friedman ANOVA tests for multiple comparisons were used. In each compared case, the number of dimensions and cell fields were determined and differences were considered as statistically significant at $P < 0.05$.

Results and Discussion

Normochromic and hyperchromic non-shrunk-en neurons were predominantly seen in cerebral cortex of control and basic group. Different levels of autolytic changes were shown in the cytoplasm of most cells. The highest neuronal density was observed in cortical layer III in all studied sections (Fig. 1).

Cal- and NPY-immunopositive neurons were detected in all layers of studied cortical fields, with layer III showing the highest numbers. Cal staining was detected in both pyramidal and non-pyramidal neurons. The maximal quantity of Cal-positive pyramidal neurons was detected in cortical layer V (Fig. 2). The identification and classification of Cal-positive neurons by their cell body and processes mor-

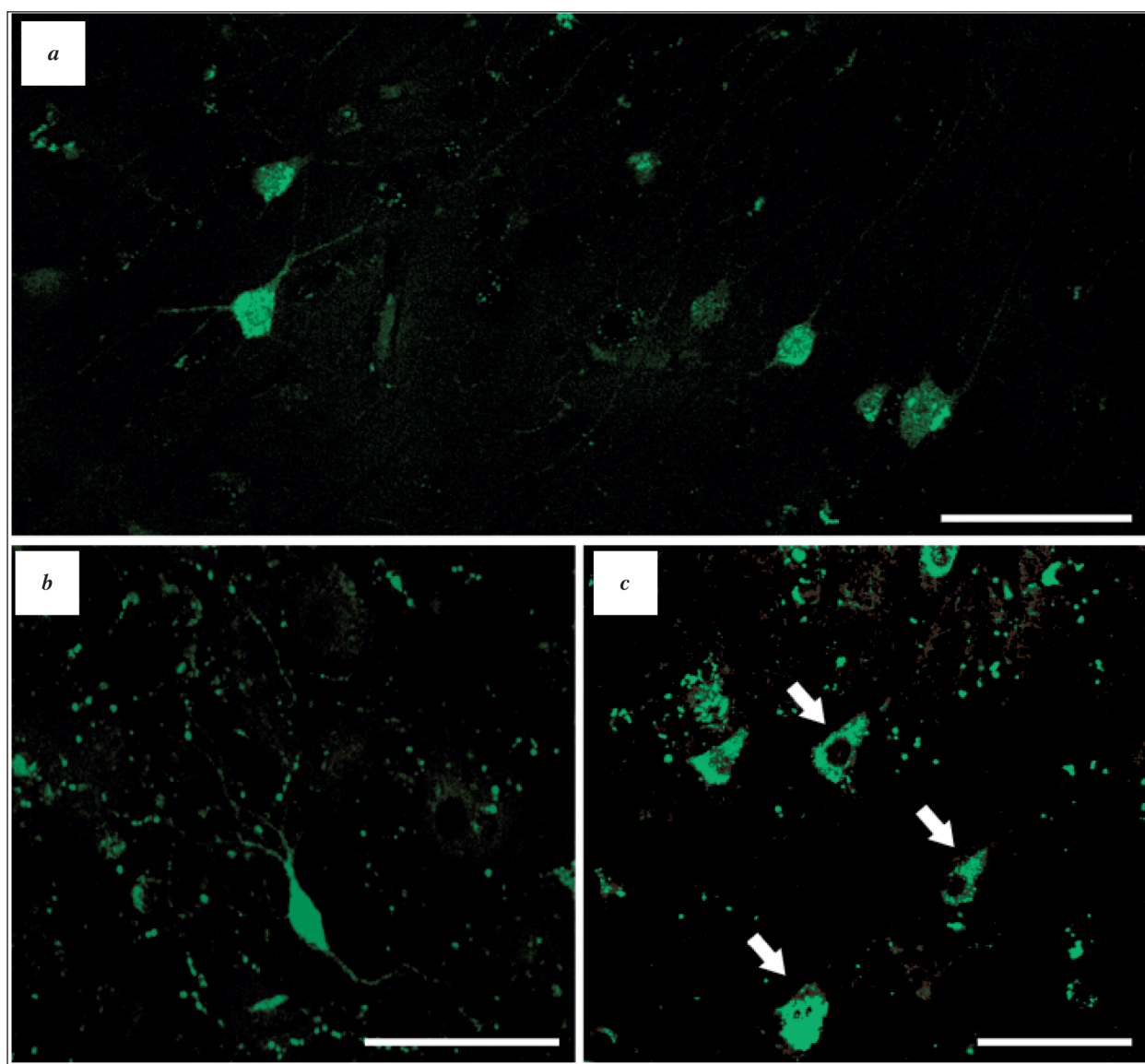


Рис. 2. Иммунофлуоресцентная маркировка кальбиндина D28k (*a, c*) и NPY (*b*) в теле и отростках нейронов слоя III (*a, b*) и V (*c*) коры большого мозга пациентов контрольной группы.

Fig. 2. Various types Cal- and NPY-positive neurons of a cerebral cortex in norm.

Note. Immunofluorescent marking of calbindin D28k (*a, c*) and neuropeptide Y (*b*) in the neuron body and processes of layer III (*a, b*) and V (*c*) of cerebral cortex of control group. *a* — area 21; *b, c* — area 4. Arrows — pyramidal neurons. Fold $\times 20$. Scale bar — 50 μm .

Примечание. *a* — поле 21 височной доли; *b, c* — поле 4 лобной доли. Об. $\times 20$. Стрелки — пирамидные нейроны. Шкала — 50 мкм.

Плотность клеток была существенно выше в слое III всех изученных полей неокортекса (рис. 1).

Cal- и NPY-позитивные нейроны выявляли во всех слоях изученных полей неокортекса, но преобладали в слое III. Кальбиндин выявляли в пирамидных и непирамидных нейронах. При этом максимальное количество верифицируемых Cal-позитивных пирамидных нейронов отмечалось в слое V КГМ (рис. 2). Однако только часть Cal-позитивных клеток можно было верифицировать по форме тела, отростков и отнести к какому-то определенному типу нейронов. Это было связано с тем, что флуоресцирующая метка в цитоплазме плохо идентифицируемых нейронов

phology was partial, secondary to the irregularity of fluorescent mark spreading in cytoplasm of some neurons. The marks appeared as single granules, or their aggregates, without coloring of cytoplasmic and/or the neuronal contours. Moreover, in a substantial part of Cal-positive cells, their processes were not detected, which complicated the cell discrimination (Fig. 2).

Among the clearly verified Cal-positive non-pyramidal cells, we observed predominantly basket cells, Martinotti cells and neurogliomorphic interneurons. In the most cases, there were more intense fluorescence in layer III (Fig. 3).

NPY allows to verify exactly the bodies of interneurons only and their long processes in neu-

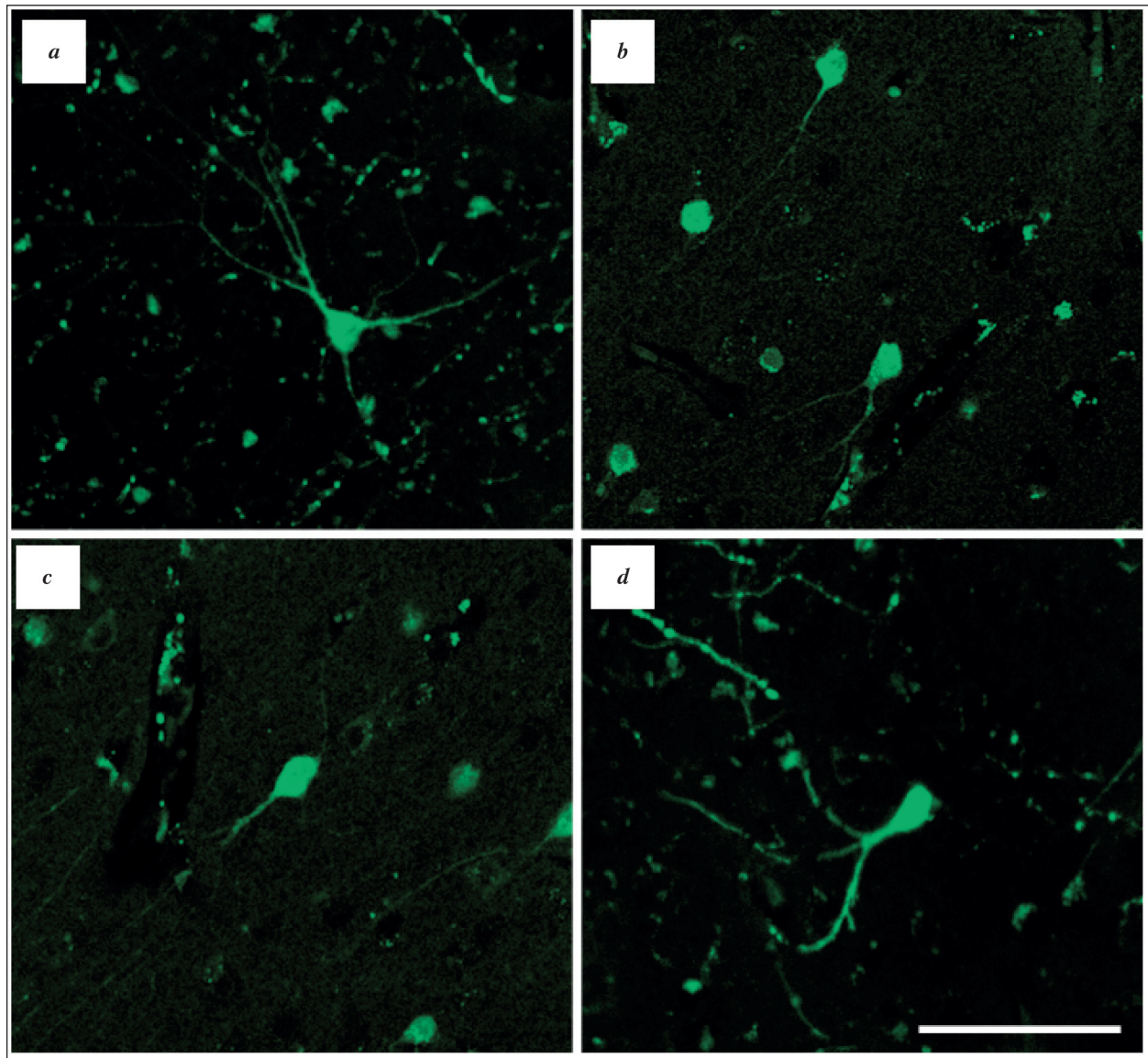


Рис. 3. Основные морфотипы интернейронов коры головного мозга пациентов контрольной группы.

Fig. 3. Basic types of interneurons in cerebral cortex in norm (control group).

Note. *a* — neurogliophoric cell, area 17 layer III (NPY); *b* — neurogliophoric cell, area 17 layer III, calbindin D28k; *c* — bipolar Martinotti cells, area 17 layer III, calbindin D28k; *d* — big basket-neuron, area 17 layer III (NPY). Fold $\times 20$. Scale bar — 50 μm .

Примечание. *a* — нейроглиоформная клетка, 17 поле затылочной доли, слой III (NPY); *b* — нейроглиоформная клетка, 17 поле затылочной доли, слой III, кальбиндин D28k; *c* — биполярные клетки Мартинотти, 17 поле затылочной доли, слой III, кальбиндин D28k; *d* — большой корзинчатый нейрон, 17 поле затылочной доли, слой III (NPY). Об. $\times 20$. Шкала — 50 мкм.

распределялась неравномерно, единичными гранулами или агрегатами гранул, не повторяющих в совокупности контуры нейронов. Кроме того, в значительной части Cal-позитивных клеток не выявляли их отростки, что так же затрудняло дискриминацию клеток (рис. 2).

Среди четко верифицируемых Cal-позитивных тормозных интернейронов различных полей КГМ преобладали корзинчатые клетки, клетки Мартинотти и нейроглиоформные интернейроны. В слое III, как правило, в этих интернейронах выявлялась более интенсивная флуоресценция маркера (рис. 3).

rope. There is an opportunity to evaluate the exact amount of NPY in concrete cortex area by square of mark in unit of area of sight using ImageJ 1.46 (Fig.4).

A large numbers of hyperchromic wrinkled (dehydrated) cells and shadow-cells were detected in the group of interest. These morphologic changes accompanied by a different intraneuronal spreading of immunohistochemical calbindine marker (Fig. 5).

There were numerous cells with compact marker aggregates and some neurons with diffusely distributed fine fluorescent particles (20–25%, 95% CI). Basket-cells, Martinotti and neurogliomorph cells were the dominant interneurons in the neocor-

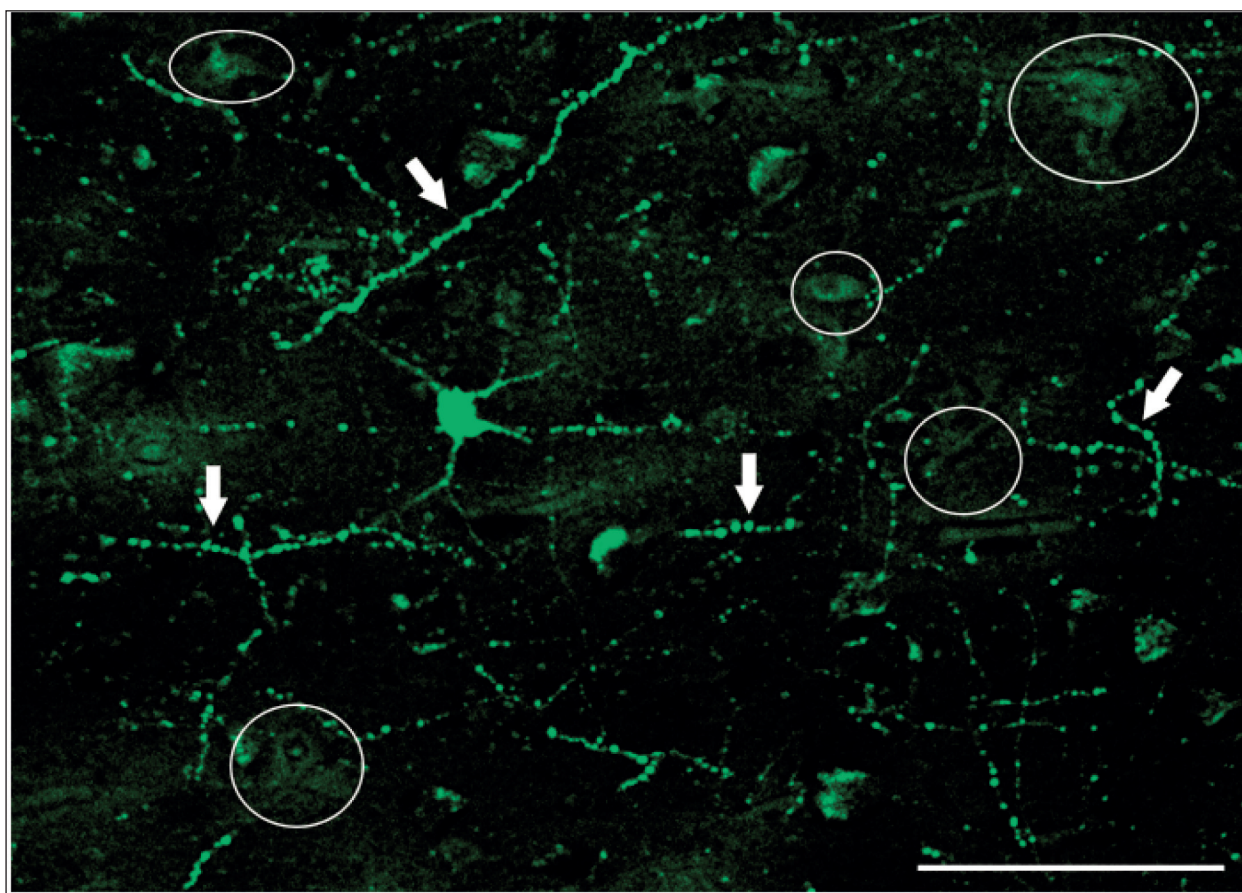


Рис. 4. Тело и отростки (стрелка) NPY-позитивных нейронов в норме.

Fig. 4. Features of distribution NPY in interneurons bodies and processes in norm.

Note. Layer III, fields 4 frontal shares of the control group patient. ($\times 20$). Cells, that don't contain NPY, are identified as pale formations (inside the ovals). The area of immunofluorescence marking is 3,5% field of vision. Fold $\times 20$. Scale bar — 50 μm .

Примечание. Слой III поля 4 лобной доли больных контрольной группы. Об. $\times 20$. Клетки, не содержащие NPY, выявляются в виде бледных образований (внутри овалов). Площадь иммунофлуоресцентной метки составляет 3,5% поля зрения. Шкала — 50 мкм.

NPY позволял отчетливо верифицировать тела только интернейронов и их длинные отростки в нейропиле. Это давало возможность точно оценивать количество нейروпептида в конкретном поле КГМ по площади метки на единицу площади поля зрения, используя программу ImageJ 1.46 (рис. 4).

В основной группе (после клинической смерти) выявлено большое содержание гиперхромных сморщенных (дегидратированных) клеток и клеток-теней. Эти морфологические изменения сопровождались изменениями внутринейронального распределения флуоресцирующего маркера кальбиндина (рис. 5).

Увеличивалось количество клеток с глыбчатым компактным распределением маркера и клеток с незначительным количеством диффузно распределенных мелких флуоресцирующих частиц (20–25%, доверительный интервал). Среди хорошо верифицируемых нейронов, как и в контроле, после клинической смерти преобладали корзинчатые клетки, клетки Мартинотти и

tex after acute ischemia as well as in control group (85–95%, 95% CI).

Comparative morphometrical analysis in the control and the main groups showed no statistical changes in total numerical density of Cal- and NPY-positive neuron's bodies (Table 1).

There were a large number of various Cal-positive neurons in neocortex after clinical death (Fig. 5, a). Pyramidal neurons with increased total mark volume in cytoplasm in layer III & V after ischemia were detected. Due to them the relative area of Cal-immunoreactive structures in layer III&V of brain cortex was significantly larger after ischemic event, than in control group. These changes were detected 90 days after the cardiac arrest and resuscitation (Table 2); however, the total numerical density of Cal-positive neurons was not significantly changed (Table 2).

The numerical distribution of NPY interneurons was the same in different cortical fields of main and control group — the percentage of these cells was 1–2% of all Cal-positive neurons (Table 1). At

нейроглиоформные тормозные интернейроны (85–95%, доверительный интервал).

Сравнительный морфометрический анализ контрольной и основной группы показал, что общая численная плотность тел Cal- и NPY-позитивных нейронов у них статистически значимо не различалась (табл. 1).

После клинической смерти в КГМ было идентифицировано большое число разнообразных Cal-позитивных нейронов (рис. 5, *a*). Выявлены пирамидные нейроны с увеличенной площадью общей метки в цитоплазме в слоях III и V после ишемии. За счет них относительная площадь Cal-позитивных структур в слоях III и V различных полей КГМ в основной группе была статистически значимо выше, чем в контроле. Особенно это было характерно через 90 сут после оживления (табл. 2). При этом общая численная плотность Cal-позитивных нейронов статистически значимо не различалась (табл. 1).

Количественное распределение интернейронов с NPY было одинаковым в различных корковых полях контрольной и основной группы — доля этих клеток составляла 1–2% от всех Cal-позитивных нейронов (табл. 1). При этом относительная площадь NPY-позитивных структур (перикарион, отростки) во всех изучаемых полях основной группы была статистически значимо больше (табл. 2).

Существует два основных пути деструкции и смерти нейронов после острой ишемии головного мозга: некроз и апоптоз [15, 16]. Центральную роль в этих процессах играет внутриклеточная концентрация ионов кальция, уровень которого повышается при ишемии и продолжает увеличиваться в постишемическом периоде [16–18]. Внутриклеточное содержание ионов кальция прямо связано с метаболическим состоянием и активностью нейронов. Нормальные жизненные функции нейронов и электрофизиологические процессы возможны при концентрации внутриклеточного кальция менее 180 нМ. Повышение концентрации Ca^{2+} до 180–500 нМ обычно ведет к долгосрочной депрессии синаптической передачи и долгосрочному потенцированию. Концентрация более 600 нМ блокирует пластические механизмы и активирует гибель клетки [19].

Кальбиндин, будучи кальций-связывающим белком буферного типа, играет роль нейропротективного агента, регулируя внутриклеточный уровень кальция [20–22].

Роль кальбиндина, как одного из самых ранних маркеров ишемического повреждения, была изучена на ряде экспериментальных моделей острой ишемии и в постишемическом периоде [20, 23, 24]. Показано, что уровень кальбиндина снижался в течение 2–3 суток с момента ишемического инсульта, а максимальное снижение его

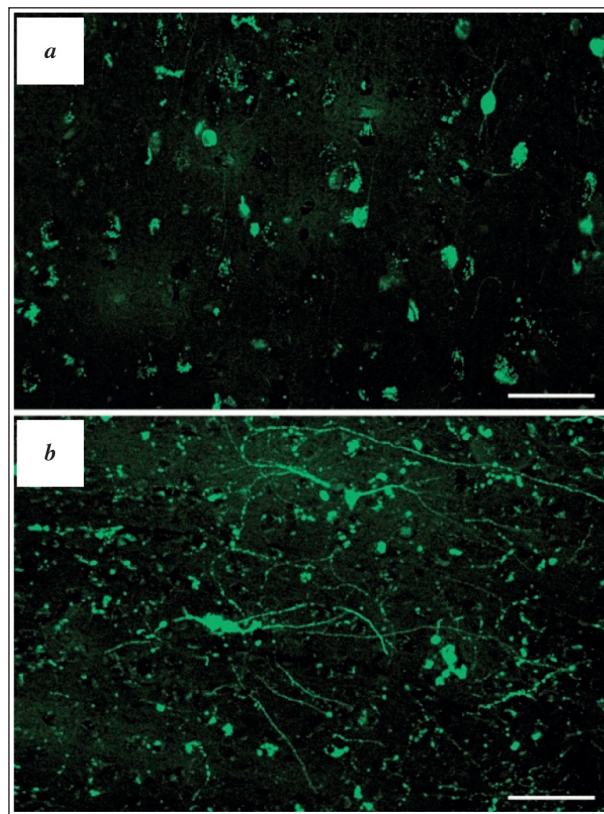


Рис. 5. Иммунофлуоресцентная маркировка кальбиндина D28k (*a*) и NPY (*b*) в теле и отростках интернейронов слоя III коры головного мозга пациентов основной группы (клиническая смерть).

Fig. 5. The high maintenance calbindin D28k (*a*) and NPY (*b*) in the interneurons body and processes of layer III of cerebral cortex of the patients main group (clinical death).

Note. *a* — area 21 of temporal cortex, 7 days after cardiac arrest, *b* — area 21 of temporal cortex, 90 days after cardiac arrest. Scale bar — 50 μm .

Примечание. *a* — поле 21 височной доли, 7 сут, *b* — поле 21 височной доли, 90 сут. Шкала — 50 мкм.

the same time, the relative area of NPY-immunoreactive structures (perikarion, processes) was statistically significant higher in all studied fields (Table 2).

There are two main kinds of neuronal destruction and death after acute brain ischemia: necrosis and apoptosis [15, 16]. A pivotal factors in these processes include alterations in intracellular calcium ion concentration arising during ischemia, and progressing in post-resuscitation period [16–18]. Intracellular calcium ion homeostasis is strictly related to neuronal metabolism condition and activity. Neuronal vital functions and electrophysiological processes are possible at intracellular calcium concentration less than 180 нМ. Elevation of Ca^{2+} concentration (180–500 нМ) typically leads to long-term depression of synaptic transmission and long-term potentiation. The concentration more than 600 нМ blocks plasticity mechanisms and activates the cell destruction [19].

Таблица 1. Общая численная плотность (на 0,1 мм²) Cal- и NPY-позитивных перикарионов в различных полях коры головного мозга человека в норме и после клинической смерти, Me (Ql-Qu).

Table 1. Total numerical density (on 0.1 mm²) of Cal- and NPY-positive perikaryons in various human brain cortex fields in norm and after clinical death, Me (Ql-Qu).

Neocortex area, Brodman	Control group, <i>n</i> =4	Postreanimation period	
		7 days, <i>n</i> =4	90 days, <i>n</i> =3
Calbindin, layer III			
4	25.0 (24.2–28.5)	21 (12.2–26.0)	16.5 (14.5–25.2)
10	22.2 (17.1–26.4)	19.5 (14.5–23.0)	18.7 (13.0–23.0)
17	19.5 (18.0–28.5)	17.0 (12.3–20.5)	15.5 (12.0–20.0)
21	26.5 (23.0–28.5)	20.5 (15.0–27.0)	18.0 (11.5–26.6)
ANOVA, df=3	$\chi^2=4.3$; <i>P</i> =0.2	$\chi^2=4.5$; <i>P</i> =0.2	$\chi^2=2.1$; <i>P</i> =0.6
Calbindin, layer V			
4	11.0 (10.2–17.4)	10.5 (10.0–13.3)	10.0 (9.5–12.0)
10	17.5 (16.5–18.0)	13.0 (11.2–18.0)	15.0 (11.0–18.5)
17	16.5 (15.5–17.5)	15.0 (11.0–17.5)	14.5 (12.0–16.5)
21	15.0 (14.0–20.5)	14.5 (14.0–16.5)	13.0 (11.0–17.0)
ANOVA	$\chi^2=3.5$; <i>P</i> =0.3	$\chi^2=3.8$; <i>P</i> =0.3	$\chi^2=0.2$; <i>P</i> =0.9
Neuropeptide Y, layer III			
4	0.26 (0.12–0.29)	0.23 (0.17–0.26)	0.20 (0.12–0.30)
10	0.22 (0.15–0.27)	0.21 (0.16–0.23)	0.17 (0.15–0.25)
17	0.19 (0.17–0.26)	0.22 (0.20–0.27)	0.15 (0.14–0.28)
21	0.28 (0.21–0.29)	0.24 (0.22–0.28)	0.20 (0.18–0.31)
ANOVA	$\chi^2=2.5$; <i>P</i> =0.4	$\chi^2=4.6$; <i>P</i> =0.2	$\chi^2=2.0$; <i>P</i> =0.8

Note. The differences in comparison with control group, previous term (Mann-Whitney criterion, $P>0.05$) and between fields (Friedman ANOVA, $P>0.05$) were insignificant. The material is presented as the median (Me), the lower (Ql) and the upper (Qu) quartiles.

Примечание. Также для таблицы 2: Neocortex area, Brodman — поля неокортекса по Бродману; Control group — контрольная группа; Postreanimation period, days — постреанимационный период, сутки; Calbindin — кальбинди; Neuropeptide — нейропептид; layer — слой. Различия в сравнении с контролем, предыдущим сроком (критерий Манна-Уитни, $p>0.05$) и между полями (ANOVA Фридмана, $p>0.05$) статистически незначимы. Материал представлен как медиана (Me), нижний (Ql) и верхний (Qu) квантили.

уровня регистрировалось на 3 сут после ишемии [25]. Большая устойчивость к ишемическому воздействию отмечалась у нейронов, содержащих кальбиндин. Нейроны, которые не содержали кальбиндин были особенно предрасположены к необратимым ишемическим повреждениям [26].

В то время как существуют сведения в поддержку роли кальбиндина как нейропротектора в экспериментальных моделях, исследования с использованием человеческого материала не проводились. Также не ясно, есть ли разница в изменении количества и плотности Cal-позитивных нейронов в различных областях КГМ в течение постреанимационного периода.

Как было показано ранее, в КГМ человека при иммуногистохимическом выявлении кальбиндин обнаруживается в непиримидных, мелких (слой III) и крупных (слой V) пиримидных нейронах, а большая часть NPY содержится в непиримидных ГАМК-ергических (тормозных) интернейронах [7, 12]. В нашем исследовании получены аналогичные данные. Среди хорошо верифицируемых нейронов в контроле и после клинической смерти выявлено преобладание корзинчатых клеток, клеток Мартинотти и нейроглиоформных тормозных интернейронов.

После травматических и/или ишемических воздействий на головной мозг экспериментальных животных происходит реорганизация тормозных и возбуждающих нейронных систем неокортекса. Было показано, что после черепно-мозговой трав-

Calbindin, being a 'buffer'-type calcium-binding protein, acts as a neuroprotective agent by regulation of intracellular calcium homeostasis [20–22].

The role of calbindin, as one of the earliest markers of ischemic damage, has been studied in a number of experimental models of acute ischemia and in the post-resuscitation period [20, 23, 24]. It was shown that the level of calbindin decreases in 2–3 days after hypoxic/ischemic insult and the maximal reduction of calbindin level occurs 3 days after ischemia [25]. High resistance to ischemic exposure has been determined in neurons containing calbindin. Neurons which do not contain calbindin are particularly predisposed to irreversible ischemic damage [26].

Whereas evidence supporting the calbindin's role as a neuroprotective agent in experimental models exists, no studies using human samples have been published. It is also not clear if there is any difference in pattern changes of Cal-containing neurons amount and density in different cortical areas during post-resuscitation period.

As it was shown previously in human neocortex by immunohistochemical analysis [7, 12], calbindin was distributed predominantly in non-pyramidal, small (layer III) and large (layer V) pyramidal neurons and the greater part of NPY was shown in non-pyramidal interneurons (inhibitory, GABA-ergic). Similar data were received in a current study: Basket cells, Martinotti cells and neurogliaform inhibitory

Таблица 2. Относительная площадь (% поля зрения) Cal- и NPY-позитивных структур в слое III различных отделов неокортекса человека в контроле и после клинической смерти, Me (Ql-Qu).**Table 2. The relative area (% of fieldview) of Calbindin- and NPY-positive structures in a layer III of various neocortex sections in control group and after clinical death, Me (Ql-Qu).**

Neocortex area, Brodman	Control group, <i>n</i> =4	Postreanimation period	
		7 days, <i>n</i> =4	90 days, <i>n</i> =3
Calbindin			
4	2.5 (1.7–2.9)	2.4 (2.1–3.0)	3.5 (3.1–3.7) <i>P</i> =0.03* <i>P</i> =0.03#
10	1.7 (1.5–2.3)	2.6 (2.1–2.9) <i>P</i> =0.04*	3.4 (3.0–3.8) <i>P</i> =0.02* <i>P</i> =0.04#
17	2.0 (1.6–2.7)	3.0 (2.7–3.6) <i>P</i> =0.04*	3.1 (2.5–3.2) <i>P</i> =0.02*
21	1.9 (1.6–2.5)	2.7 (2.8–3.7) <i>P</i> =0.04*	2.9 (2.4–3.3) <i>P</i> =0.03*
Neuropeptide Y			
4	3.2 (2.5–4.2)	5.1 (4.3–7.8) <i>P</i> =0.02*	6.0 (5.3–7.2) <i>P</i> =0.01*
10	3.3 (2.6–4.3)	5.4 (5.0–6.4) <i>P</i> =0.02*	6.8 (5.5–7.7) <i>P</i> =0.01* <i>P</i> =0.04#
17	3.1 (2.9–4.0)	5.2 (5.1–8.3) <i>P</i> =0.03*	5.8 (5.1–7.3) <i>P</i> =0.01*
21	2.5 (2.1–4.1)	5.0 (4.7–7.7) <i>P</i> =0.03*	6.5 (5.2–7.9) <i>P</i> =0.01*

Note. * — the differences are statistically significant in comparison to control and # — in comparison with the previous term, $P < 0.05$ (Mann-Whitney criterion). There are no statistically significant differences between fields (Friedman ANOVA, $P < 0.05$). The material is presented as the median (Me), the lower (Ql) and the upper (Qu) quartiles.

Примечание. * — различия в сравнении с контролем и # — предыдущим сроком статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни). Между полями статистически значимых различий не выявлено (ANOVA Фридмана, $p > 0,05$). Материал представлен как медиана (Me), нижний (Ql) и верхний (Qu) квартили.

мы в зоне ишемической полутени увеличивается количество Cal-позитивных пирамидных нейронов в слое III и непиримидных нейронов в слое IV [12]. В экспериментальных исследованиях выявлено увеличение экспрессии кальбиндина в нейронах после ишемии [24] и деафферентации [27]. Увеличение количества и большая сохранность Cal-позитивных нейронов рассматривается как результат компенсаторной экспрессии белков, регулирующих внутриклеточную концентрацию ионов кальция, играющих ключевую роль в инициации механизмов некроза и апоптоза [3, 8, 12, 28, 29].

Нами установлено, что после клинической смерти количество Cal-позитивных нейронов статистически значимо не отличалось от контрольного уровня. Изменялся лишь размер и характер распределения флуоресцирующих меток в цитоплазме нейронов. На фоне высокого содержания гиперхромных сморщенных нейронов увеличивалось количество клеток с грубыми конгломератами меток кальбиндина. Кроме того, появлялись гипертрофированные Cal-позитивные нейроны. Морфометрический анализ показал увеличение в постреанимационном периоде относительной площади Cal-позитивных структур. Все это, вероятно, свидетельствовало о том, что популяция различных Cal-позитивных нейронов (пирамид-

interneurons were predominantly accumulated in control group and after clinical death.

Traumatic and/or ischemic brain injury in experimental animal model caused reorganization of inhibitory and excitatory neuronal systems of the neocortex. The number of Cal-positive pyramidal neurons in a layer III and non-pyramidal neurons in layer IV increased in the ischemic penumbra after craniocerebral injury [12]. In experimental studies calbindin expression was increased in neurons after ischemia [24] and deafferentation [27]. Increasing number and integrity of Cal-positive neurons was considered as a result of compensatory expression of proteins regulating the intracellular concentration of calcium ions that contributed to necrosis and apoptosis mechanisms [3, 8, 12, 28, 29].

After global ischemia the number of Cal-positive neurons was stable in all analyzed cortical fields. The size of fluorescent particles and the type of their distribution in the neuron cytoplasm was the only observed difference. Post-resuscitation tissue exhibited both high content of the shrunken hyperchromatic neurons and elevated number Cal-labeled neurons. Moreover, hypertrophied labeled Cal-positive neurons have appeared. Morphometric analysis demonstrated an extension of the relative area of Cal-containing structures in patients underwent

ных и непирамидных) в меньшей степени подвержена необратимой деструкции и элиминации.

NPY один из биомаркеров корковых тормозных интернейронов. Анализ его распределения в КГМ после клинической смерти показал статистически значимое увеличение относительной площади NPY-позитивных структур. Это, вероятно, можно считать проявлением активации компенсаторных механизмов, которые сопровождаются усилением экспрессии ингибиторного нейропептида [7, 30–32]. Экспрессия NPY служит защитным механизмом от кальциевой перегрузки и эксайтотоксичности при перевозбуждении нейронов. Действие NPY может быть связано с влиянием на синаптические Y1- и Y2-рецепторы. В итоге уменьшается вход ионов кальция в нейрон во время возбуждения и подавляется выделение глутамата возбуждающего нейромедиатора [7, 33, 34].

Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об адаптационных и компенсаторных изменениях тормозных интернейронов нервной ткани неокортекса человека в постреанимационном периоде.

Литература

1. Аврущенко М.Ш., Острова И.В., Волков А.В. Постреанимационные изменения экспрессии глиального нейротрофического фактора (GDNF): взаимосвязь с повреждением клеток Пуркинье мозжечка (экспериментальное исследование). *Общая реаниматология*. 2014; 10 (5): 59-68. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-5-59-68>
2. Зарзешский Ю.В., Мороз В.В., Волков А.В. Влияния иммуоактивных препаратов на функциональное восстановление мозга и стероидные гормоны в постреанимационном периоде. *Общая реаниматология*. 2014; 10 (1): 5-11. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-1-5-11>
3. Острова И.В., Аврущенко М.Ш. Экспрессия мозгового нейротрофического фактора (BDNF) повышает устойчивость нейронов к гибели в постреанимационном периоде. *Общая реаниматология*. 2015; 11 (3): 45-53. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2015-3-45-53>
4. Markram H., Toledo-Rodriguez M., Wang Y., Gupta A., Silberberg G., Wu C. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat. Rev. Neurosci.* 2004; 5 (10): 793-807. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1519>. PMID: 15378039
5. Kalinichenko S.G., Dudina Y.V., Motavkin P.A. Neurogliaform cells: neurochemistry, spatial arrangement, and their role in the neocortical inhibitory system. *Tsitologiya*. 2006; 48 (5): 508-514. PMID: 16893057
6. Druga R. Neocortical inhibitory system. *Folia Biol. (Praha)*. 2009; 55 (6): 201-217. PMID: 20163769
7. Rossignol E. Genetic and function of neocortical GABAergic interneurons in neurodevelopmental disorders. *Neural. Plast.* 2011; 2011: 649325. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/649325>. PMID: 21876820
8. Wenner P. Mechanisms of GABAergic homeostatic plasticity. *Neural. Plast.* 2011; 2011: 489470. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/489470>. PMID: 21876819
9. Calabresi P., Di Filippo M. A pathophysiological link between dystonia, striatal interneurons and neuropeptide Y. *Brain*. 2013; 136 (Pt 5): 1341-1344. <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awt096>. PMID: 23599388
10. Aoki C., Pickel V.M. Neuropeptide Y in the cerebral cortex and the caudate-putamen nuclei: ultrastructural basis for interactions with GABAergic and non-GABAergic neurons. *J. Neurosci.* 1989; 9 (12): 4333-4354. PMID: 2687439
11. Maekawa S., Al-Sarraj S., Kibble M., Landau S., Parnavelas J., Cotter D., Everall I., Leigh P.N. Cortical selective vulnerability in motor neuron disease: a morphometric study. *Brain*. 2004; 127 (Pt 6): 1237-1251. <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awh132>. PMID: 15130949

total brain ischemia. It could demonstrate that the population of various Cal-positive neurons (pyramidal and non-pyramidal) was less prone to irreversible destruction and elimination.

NPY is one of biomarkers of cortical inhibitory interneurons. The analysis of its distribution in cerebral cortex after clinical death showed a statistically significant increase in the relative area of immunoreactive structures. It could be presumably considered as a feature of activation of one of the compensatory mechanisms mediated by reinforced expression of the inhibitory neuropeptide [7, 30, 31, 32]. NPY expression serves as a protective mechanism for calcium overload and excitotoxicity during the overexciting of neurons. NPY action may be applied to Y1 and Y2 synaptic receptors. As a result, the entry of calcium ions into neuron during over excitation is reduced and and to glutamate release became inhibited [7, 33, 34].

Conclusion

Therefore, obtained data demonstrate the adaptive and compensatory changes of inhibitory interneurons of human neocortex in the post-resuscitation period.

References

1. Avrushchenko M.Sh., Ostrova I.V., Volkov A.V. Postreanimatsionnye izmeneniya ekspressii glialnogo neirotroficheskogo faktora (GDNF): vzaimosvyaz s povrezhdeniem kletok Purkinje mozghechka (eksperimentalnoe issledovanie). *Obshchaya Reanimatologiya*. [Postresuscitation changes in the expression of glial derived neurotrophic factor (GDNF): association with cerebellar Purkinje cell damage (an experimental study). *General Reanimatology*]. 2014; 10 (5): 59-68. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-5-59-68>. [In Russ.]
2. Zarzhetsky Y.V., Moroz V.V., Volkov A.V. Vliyaniye immunoaktivnykh preparatov na funktsionalnoye vosstanovleniye mozga i steroidnye gormony v postreanimatsionnom periode. *Obshchaya Reanimatologiya*. [Effect of immunoactive drugs on postresuscitation processes in the brain and steroid hormones. *General Reanimatology*]. 2014; 10 (1): 5-11. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-1-5-11>. [In Russ.]
3. Ostrova I.V., Avrushchenko M.Sh. Ekspressiya mozgovogo neirotroficheskogo faktora (BDNF) povyshayet ustoychivost neuronov k gibeli v postreanimatsionnom periode. *Obshchaya Reanimatologiya*. [Expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) increases the resistance of neurons to death in the postresuscitation period. *General Reanimatology*]. 2015; 11 (3): 45-53. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2015-3-45-53>. [In Russ.]
4. Markram H., Toledo-Rodriguez M., Wang Y., Gupta A., Silberberg G., Wu C. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat. Rev. Neurosci.* 2004; 5 (10): 793-807. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1519>. PMID: 15378039
5. Kalinichenko S.G., Dudina Y.V., Motavkin P.A. Neurogliaform cells: neurochemistry, spatial arrangement, and their role in the neocortical inhibitory system. *Tsitologiya*. 2006; 48 (5): 508-514. PMID: 16893057
6. Druga R. Neocortical inhibitory system. *Folia Biol. (Praha)*. 2009; 55 (6): 201-217. PMID: 20163769
7. Rossignol E. Genetic and function of neocortical GABAergic interneurons in neurodevelopmental disorders. *Neural. Plast.* 2011; 2011: 649325. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/649325>. PMID: 21876820
8. Wenner P. Mechanisms of GABAergic homeostatic plasticity. *Neural. Plast.* 2011; 2011: 489470. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/489470>. PMID: 21876819
9. Calabresi P., Di Filippo M. A pathophysiological link between dystonia, striatal interneurons and neuropeptide Y. *Brain*. 2013; 136 (Pt 5): 1341-1344. <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awt096>. PMID: 23599388
10. Aoki C., Pickel V.M. Neuropeptide Y in the cerebral cortex and the caudate-putamen nuclei: ultrastructural basis for interactions with

12. Lavenex P., Lavenex P.B., Bennett J.L., Amaral D.G. Postmortem changes in the neuroanatomical characteristics of the primate brain: the hippocampal formation. *J. Comp. Neurol.* 2009; 512 (1): 27-51. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.21906>. PMID: 18972553
13. Sharma V., Nag T.C., Wadhwa S., Roy T.S. Stereological investigation and expression of calcium-binding proteins in developing human inferior colliculus. *J. Chem. Neuroanat.* 2009; 37 (2): 78-86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchemneu.2008.11.002>. PMID: 19095058
14. De Almeida J., Mengod G. Quantitative analysis of glutamatergic and GABAergic neurons expressing 5-HT_{2A} receptors in human and monkey prefrontal cortex. *J. Neurochem.* 2007; 103 (2): 475-486. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04768.x>. PMID: 17635672
15. Buritica E., Villamil L., Guzman F., Escobar M.I., García-Cairasco N., Pimienta H.J. Changes in calcium-binding protein expression in human cortical contusion tissue. *J. Neurotrauma.* 2009; 26 (12): 2145-2155. <http://dx.doi.org/10.1089/neu.2009.0894>. PMID: 19645526
16. Akulinin V.A., Dahlstrom A. Quantitative analysis of MAP2 immunoreactivity in human neocortex of three patients surviving after brain ischemia. *Neurochem. Res.* 2003; 28 (2): 373-378. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1022401922669>. PMID: 12608711
17. Naegel J.R., Katz L.C. Cell surface molecules containing N-acetyl-galactosamine are associated with basket cells and neurogliaform cells in cat visual cortex. *J. Neurosci.* 1990; 10 (2): 540-557. PMID: 2303859
18. Raghupathi R., Graham D.I., McIntosh T.K. Apoptosis after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma.* 2000; 17 (10): 927-938. <http://dx.doi.org/10.1089/neu.2000.17.927>. PMID: 11063058
19. Leker R.R., Shohami E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res. Rev.* 2002; 39 (1): 55-73. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-0173\(02\)00157-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-0173(02)00157-1). PMID: 12086708
20. Berman R.F., Verweij B.H., Muizelaar J.P. Neurobehavioral protection by the neuronal calcium channel blocker ziconotide in a model of traumatic diffuse brain injury in rats. *J. Neurosurg.* 2000; 93 (5): 821-828. <http://dx.doi.org/10.3171/jns.2000.93.5.0821>. PMID: 11059664
21. Patterson M., Yasuda R. Signaling pathways underlying structural plasticity of dendritic spines. *Br. J. Pharmacol.* 2011; 163 (8): 1626-1638. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01328.x>. PMID: 21410464
22. Cormier K.J., Greenwood A.C., Connor J.A. Bidirectional synaptic plasticity correlated with the magnitude of dendritic calcium transients above a threshold. *J. Neurophysiol.* 2001; 85 (1): 399-406. PMID: 11152740
23. Klapstein G.J., Vietla S., Lieberman P.M., Gray P.A., Airaksinen M.S., Thoenen H., Meyer M., Mody I. Calbindin D28K fails to protect hippocampal neurons against ischemia in spite of its cytoplasmic calcium buffering properties: evidence from calbindin-D28k knockout mice. *Neuroscience.* 1998; 85 (2): 361-373. [http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00632-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00632-5). PMID: 9622236
24. Ghosh A., Greenberg M.E. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science.* 1995; 268 (5208): 239-247. <http://dx.doi.org/10.1126/science.7716515>. PMID: 7716515
25. Morona R., González A. Pattern of calbindin-D28k and calretinin immunoreactivity in the brain of *Xenopus laevis* during embryonic and larval development. *J. Comp. Neurol.* 2013; 521 (1): 79-108. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.23163>. PMID: 22678695
26. Goodman J.H., Wasterlain C.G., Massarweh W.F., Dean E., Sollas A.L., Sloviter R.S. Calbindin-D28k immunoreactivity and selective vulnerability to ischemia in the dentate gyrus of the developing rat. *Brain Res.* 1993; 606 (2): 309-314. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90999-4](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(93)90999-4). PMID: 8490723
27. Yenari M.A., Minami M., Sun G.H., Meier T.J., Kunis D.M., McLaughlin J.R., Ho D.Y., Sapolsky R.M., Steinberg G.K. Calbindin D28K overexpression protects striatal neurons from transient focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2001; 32 (4): 1028-1035. <http://dx.doi.org/10.1161/01.STR.32.4.1028>. PMID: 11283407
28. Rami A., Rabie A., Thomasset M., Kriegstein J. Calbindin D28K and ischemic damage of pyramidal cells in rat hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 1992; 31 (1): 89-95. PMID: 1613825
29. Rami A., Rabie A., Winckler J. Synergy between chronic corticosterone treatment and cerebral ischemia in producing damage in noncalbindin-ergic neurons. *Exp. Neurol.* 1998; 149 (2): 439-446. <http://dx.doi.org/10.1006/exnr.1997.6729>. PMID: 9500960
30. Barbado M.V., Bricón J.G., Weruaga E., Porteros A., Arévalo R., Aijón J., Alonso J.R. Changes in immunoreactivity to calcium-binding proteins in the anterior olfactory nucleus of the rat after neonatal olfactory deprivation. *Exp. Neurol.* 2002; 177 (1): 133-150. <http://dx.doi.org/10.1006/exnr.2002.7951>. PMID: 12429217
31. Desgent S., Boire D., Pito M. Altered expression of parvalbumin and calbindin in interneurons within the primary visual cortex of neonatal enucleated hamsters. *Neuroscience.* 2010; 171 (4): 1326-1340. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.10.016>. PMID: 20937364
32. Fung S.J., Webster M.J., Sivagnanasundaram S., Duncan C., Elshoff M., Weickert C.S. Expression of interneuron markers in the dorsolateral GABAergic and non-GABAergic neurons. *J. Neurosci.* 1989; 9 (12): 4333-4354. PMID: 2687439
33. Maekawa S., Al-Sarraj S., Kibble M., Landau S., Parnavelas J., Cotter D., Eeverall I., Leigh P.N. Cortical selective vulnerability in motor neuron disease: a morphometric study. *Brain.* 2004; 127 (Pt 6): 1237-1251. <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awh132>. PMID: 15130949
34. Lavenex P., Lavenex P.B., Bennett J.L., Amaral D.G. Postmortem changes in the neuroanatomical characteristics of the primate brain: the hippocampal formation. *J. Comp. Neurol.* 2009; 512 (1): 27-51. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.21906>. PMID: 18972553
35. Sharma V., Nag T.C., Wadhwa S., Roy T.S. Stereological investigation and expression of calcium-binding proteins in developing human inferior colliculus. *J. Chem. Neuroanat.* 2009; 37 (2): 78-86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchemneu.2008.11.002>. PMID: 19095058
36. De Almeida J., Mengod G. Quantitative analysis of glutamatergic and GABAergic neurons expressing 5-HT_{2A} receptors in human and monkey prefrontal cortex. *J. Neurochem.* 2007; 103 (2): 475-486. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04768.x>. PMID: 17635672
37. Buritica E., Villamil L., Guzman F., Escobar M.I., García-Cairasco N., Pimienta H.J. Changes in calcium-binding protein expression in human cortical contusion tissue. *J. Neurotrauma.* 2009; 26 (12): 2145-2155. <http://dx.doi.org/10.1089/neu.2009.0894>. PMID: 19645526
38. Akulinin V.A., Dahlstrom A. Quantitative analysis of MAP2 immunoreactivity in human neocortex of three patients surviving after brain ischemia. *Neurochem. Res.* 2003; 28 (2): 373-378. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1022401922669>. PMID: 12608711
39. Naegel J.R., Katz L.C. Cell surface molecules containing N-acetyl-galactosamine are associated with basket cells and neurogliaform cells in cat visual cortex. *J. Neurosci.* 1990; 10 (2): 540-557. PMID: 2303859
40. Raghupathi R., Graham D.I., McIntosh T.K. Apoptosis after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma.* 2000; 17 (10): 927-938. <http://dx.doi.org/10.1089/neu.2000.17.927>. PMID: 11063058
41. Leker R.R., Shohami E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res. Rev.* 2002; 39 (1): 55-73. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-0173\(02\)00157-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-0173(02)00157-1). PMID: 12086708
42. Berman R.F., Verweij B.H., Muizelaar J.P. Neurobehavioral protection by the neuronal calcium channel blocker ziconotide in a model of traumatic diffuse brain injury in rats. *J. Neurosurg.* 2000; 93 (5): 821-828. <http://dx.doi.org/10.3171/jns.2000.93.5.0821>. PMID: 11059664
43. Patterson M., Yasuda R. Signaling pathways underlying structural plasticity of dendritic spines. *Br. J. Pharmacol.* 2011; 163 (8): 1626-1638. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01328.x>. PMID: 21410464
44. Cormier K.J., Greenwood A.C., Connor J.A. Bidirectional synaptic plasticity correlated with the magnitude of dendritic calcium transients above a threshold. *J. Neurophysiol.* 2001; 85 (1): 399-406. PMID: 11152740
45. Klapstein G.J., Vietla S., Lieberman P.M., Gray P.A., Airaksinen M.S., Thoenen H., Meyer M., Mody I. Calbindin D28K fails to protect hippocampal neurons against ischemia in spite of its cytoplasmic calcium buffering properties: evidence from calbindin-D28k knockout mice. *Neuroscience.* 1998; 85 (2): 361-373. [http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00632-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00632-5). PMID: 9622236
46. Ghosh A., Greenberg M.E. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science.* 1995; 268 (5208): 239-247. <http://dx.doi.org/10.1126/science.7716515>. PMID: 7716515
47. Morona R., González A. Pattern of calbindin-D28k and calretinin immunoreactivity in the brain of *Xenopus laevis* during embryonic and larval development. *J. Comp. Neurol.* 2013; 521 (1): 79-108. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.23163>. PMID: 22678695
48. Goodman J.H., Wasterlain C.G., Massarweh W.F., Dean E., Sollas A.L., Sloviter R.S. Calbindin-D28k immunoreactivity and selective vulnerability to ischemia in the dentate gyrus of the developing rat. *Brain Res.* 1993; 606 (2): 309-314. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90999-4](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(93)90999-4). PMID: 8490723
49. Yenari M.A., Minami M., Sun G.H., Meier T.J., Kunis D.M., McLaughlin J.R., Ho D.Y., Sapolsky R.M., Steinberg G.K. Calbindin D28K overexpression protects striatal neurons from transient focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2001; 32 (4): 1028-1035. <http://dx.doi.org/10.1161/01.STR.32.4.1028>. PMID: 11283407
50. Rami A., Rabie A., Thomasset M., Kriegstein J. Calbindin D28K and ischemic damage of pyramidal cells in rat hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 1992; 31 (1): 89-95. PMID: 1613825
51. Rami A., Rabie A., Winckler J. Synergy between chronic corticosterone treatment and cerebral ischemia in producing damage in noncalbindin-ergic neurons. *Exp. Neurol.* 1998; 149 (2): 439-446. <http://dx.doi.org/10.1006/exnr.1997.6729>. PMID: 9500960
52. Barbado M.V., Bricón J.G., Weruaga E., Porteros A., Arévalo R., Aijón J., Alonso J.R. Changes in immunoreactivity to calcium-binding proteins in the anterior olfactory nucleus of the rat after neonatal olfactory deprivation. *Exp. Neurol.* 2002; 177 (1): 133-150. <http://dx.doi.org/10.1006/exnr.2002.7951>. PMID: 12429217
53. Desgent S., Boire D., Pito M. Altered expression of parvalbumin and calbindin in interneurons within the primary visual cortex of neonatal enucleated hamsters. *Neuroscience.* 2010; 171 (4): 1326-1340. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.10.016>. PMID: 20937364
54. Fung S.J., Webster M.J., Sivagnanasundaram S., Duncan C., Elshoff M., Weickert C.S. Expression of interneuron markers in the dorsolateral

Original Observation

- prefrontal cortex of the developing human and in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*. 2010; 167 (12): 1479-1488. <http://dx.doi.org/10.1176/appi.ajp.2010.09060784>. PMID: 21041246
33. Colmers W.F., El Bahh B. Neuropeptide Y and epilepsy. *Epilepsy Curr.* 2003; 3 (2): 53-58. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1535-7597.2003.03208.x>. PMID: 15309085
 34. Andiran N., Celik N., Ark N., Koca C., Kurtaran H., Karabel D. Changes in growth pattern, leptin ghrelin and neuropeptide Y levels after adenotonsillectomy in prepubertal children. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2013; 26 (7-8): 683-687. <http://dx.doi.org/10.1515/jpem-2012-0325>. PMID: 23612639
 35. Goto S., Kawarai T., Morigaki R., Okita S., Koizumi H., Nagahiro S., Munoz E.L., Lee L.V., Kaji R. Defects in the striatal neuropeptide Y system in X-linked dystonia-parkinsonism. *Brain*. 2013; 136 (Pt 5): 1555-1567. <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awt084>. PMID: 23599389
 36. González-Albo M.C., Elston G.N., DeFelipe J. The human temporal cortex: characterization of neurons expressing nitric oxide synthase, neuropeptides and calcium-binding proteins, and their glutamate receptor subunit profiles. *Cereb. Cortex*. 2001; 11 (12): 1170-1181. <http://dx.doi.org/10.1093/cercor/11.12.1170>. PMID: 11709488
 37. Hong S.M., Chung S.Y., Park M.S., Huh Y.B., Park M.S., Yeo S.G. Immunoreactivity of calcium-binding proteins in the central auditory nervous system of aged rats. *J. Korean Neurosurg. Soc.* 2009; 45 (4): 231-235. <http://dx.doi.org/10.3340/jkns.2009.45.4.231>. PMID: 19444349
 31. Desgent S., Boire D., Pito M. Altered expression of parvalbumin and calbindin in interneurons within the primary visual cortex of neonatal enucleated hamsters. *Neuroscience*. 2010; 171 (4): 1326-1340. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.10.016>. PMID: 20937364
 32. Fung S.J., Webster M.J., Sivagnanasundaram S., Duncan C., Elashoff M., Weickert C.S. Expression of interneuron markers in the dorsolateral prefrontal cortex of the developing human and in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*. 2010; 167 (12): 1479-1488. <http://dx.doi.org/10.1176/appi.ajp.2010.09060784>. PMID: 21041246
 33. Colmers W.F., El Bahh B. Neuropeptide Y and epilepsy. *Epilepsy Curr.* 2003; 3 (2): 53-58. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1535-7597.2003.03208.x>. PMID: 15309085
 34. Andiran N., Celik N., Ark N., Koca C., Kurtaran H., Karabel D. Changes in growth pattern, leptin ghrelin and neuropeptide Y levels after adenotonsillectomy in prepubertal children. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2013; 26 (7-8): 683-687. <http://dx.doi.org/10.1515/jpem-2012-0325>. PMID: 23612639
 35. Goto S., Kawarai T., Morigaki R., Okita S., Koizumi H., Nagahiro S., Munoz E.L., Lee L.V., Kaji R. Defects in the striatal neuropeptide Y system in X-linked dystonia-parkinsonism. *Brain*. 2013; 136 (Pt 5): 1555-1567. <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awt084>. PMID: 23599389
 36. González-Albo M.C., Elston G.N., DeFelipe J. The human temporal cortex: characterization of neurons expressing nitric oxide synthase, neuropeptides and calcium-binding proteins, and their glutamate receptor subunit profiles. *Cereb. Cortex*. 2001; 11 (12): 1170-1181. <http://dx.doi.org/10.1093/cercor/11.12.1170>. PMID: 11709488
 37. Hong S.M., Chung S.Y., Park M.S., Huh Y.B., Park M.S., Yeo S.G. Immunoreactivity of calcium-binding proteins in the central auditory nervous system of aged rats. *J. Korean Neurosurg. Soc.* 2009; 45 (4): 231-235. <http://dx.doi.org/10.3340/jkns.2009.45.4.231>. PMID: 19444349

Поступила 24.03.16

Submitted 24.03.16

КАЛЕНДАРЬ МЕРОПРИЯТИЙ — 2016

ФГБНУ «НИИ общая реаниматология им. В. А. Неговского»
г. Москва, ул. Петровка, 25/2, +7 (495) 650-25-17
www.niiorramn.ru • niiorramn@niiorramn.ru

Сертификационный цикл повышения квалификации врачей
по специальности «Анестезиология-реаниматология»
07 ноября — 02 декабря

Всероссийская конференция молодых ученых
«Современные методы диагностики и лечения в реаниматологии»
1 декабря

XVIII Всероссийская конференция с международным участием
«Жизнеобеспечение при критических состояниях»
1–2 декабря