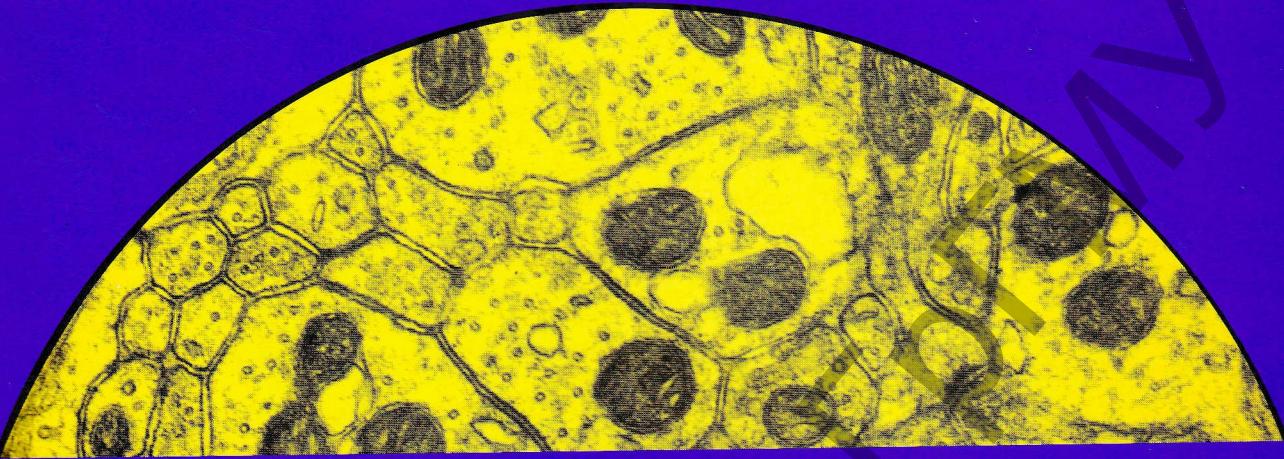
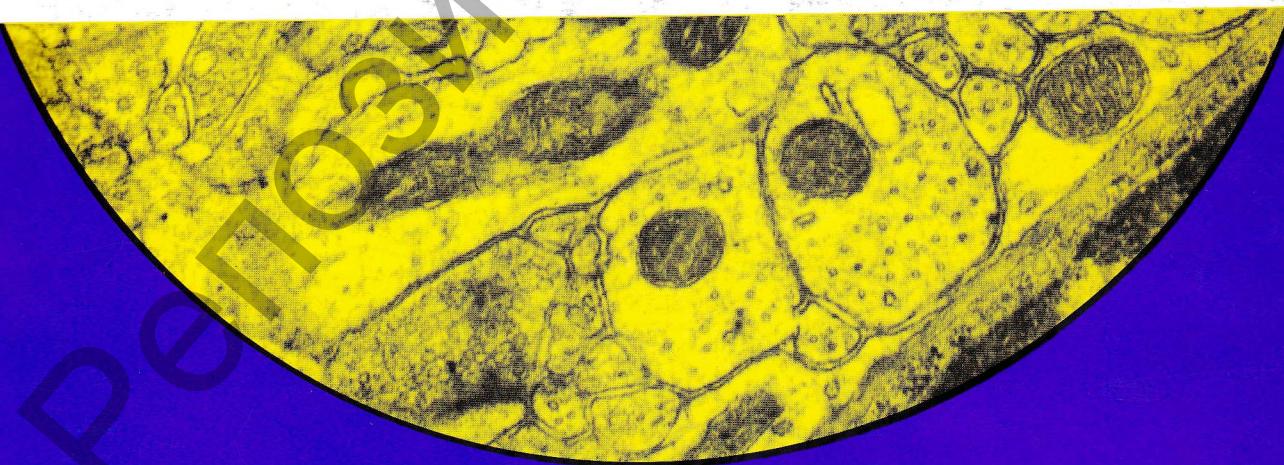


Научно-теоретический
медицинский
журнал

ISSN 0004-1947



МОРФОЛОГИЯ



MORPHOLOGY

1

—
2016

С.М. Зиматкин, О.А. Карнюшко

ЭКСПРЕССИЯ ДАБЛКОРТИНА И NeuN В РАЗВИВАЮЩИХСЯ НЕЙРОНАХ МОЗЖЕЧКА КРЫС

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. С.М. Зиматкин), Гродненский государственный медицинский университет, Беларусь

Работа проведена на потомстве 5 беспородных самок белых крыс с целью сравнительной иммуногистохимической оценки экспрессии даблкортина (DCX) и нейронального ядерного антигена (NeuN) в нейронах коры и промежуточного ядра мозжечка у животных в раннем постнатальном онтогенезе (на 2–15-е сутки). Установлено, что экспрессия DCX выявляется в постмитотических нейронах наружного зернистого слоя и мигрирующих нейронах коры мозжечка. При этом в новой части мозжечка у 2- и 7-суточных крысят экспрессия DCX была больше, чем в древней части мозжечка. Экспрессия NeuN появлялась в мигрирующих зернистых нейронах, достигая максимума в более зрелых нейронах внутреннего зернистого слоя. Экспрессия DCX не выявлялась в клетках Пуркинье и нейронах промежуточного ядра мозжечка. При этом в нейронах промежуточного ядра со 2-х по 15-е сутки после рождения прогрессивно увеличивалась экспрессия NeuN. Таким образом, сравнительное иммуногистохимическое исследование динамики экспрессии исследованной пары молекулярных маркеров является эффективным способом оценки развития зернистых нейронов мозжечка в раннем постнатальном онтогенезе.

Ключевые слова: мозжечок, нейроны, развитие, даблкортин, NeuN

Молекулярные маркеры все шире используются для оценки развития головного мозга в онтогенезе у животных и человека [2–4]. Даблкортин (Doublecortin, DCX) представляет собой белок, ассоциированный с микротрубочками цитоскелета нейронов позвоночных, который экспрессируется незрелыми нейронами перед и во время миграции в период развития мозга. Позднее он выявляется в растущих отростках нейронов [7]. DCX экспрессируется и в щеточных нейронах вестибулоцеребеллума у взрослых крыс и играет определенную роль в синооптической пластичности этих клеток [13]. NeuN (neuronal nuclear antigen) — нейрональный ядерный антиген, который экспрессируется в ядрах и перинуклеарной цитоплазме большинства зрелых нейронов ЦНС и не определяется в незрелых нервных клетках. NeuN не экспрессируется в клетках Пуркинье и нейронах зубчатого ядра мозжечка, а также в глиальных клетках [12].

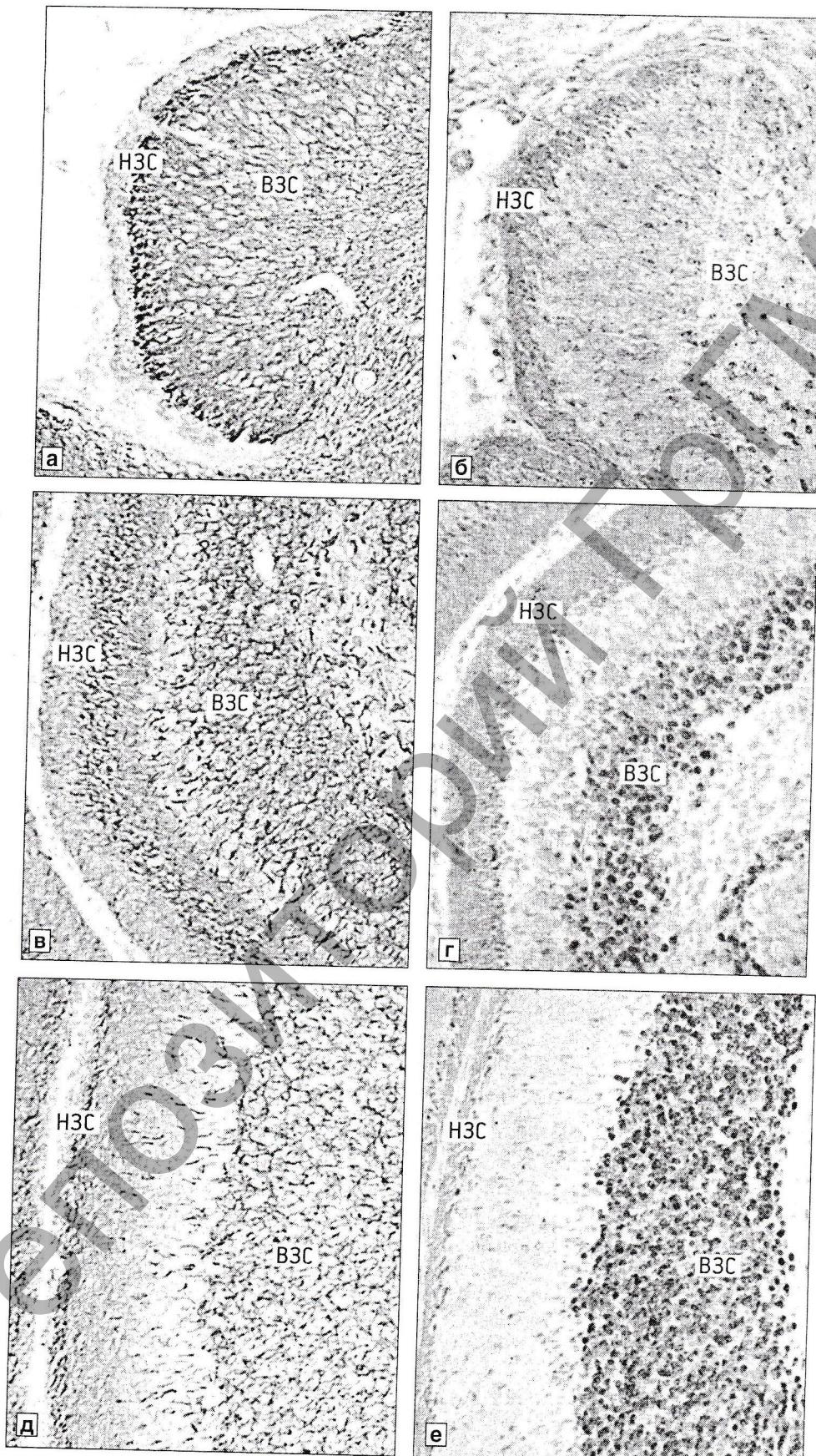
В коре развивающегося мозжечка у крыс, наряду с обычным, «внутренним» зернистым слоем (ВЗС), существует дополнительный, наружный зернистый слой (НЗС), где пролиферация клеток продолжается в постнатальный период. НЗС мозжечка образуется у 17-суточного зародыша в результате первой волны миграции к наружной поверхности развивающегося мозжечка из дорсальной части нервной трубки, называемой

ромбовидной губой, расположенной на границе среднего и заднего мозга [16]. НЗС является герминативной зоной, состоящей из 3–6 рядов предшественников зернистых нейронов [10]. При этом 1–3 наружные ряда образуют пролиферирующие клетки, которые после последнего митоза вытесняются во внутренние ряды НЗС, принимают веретеновидную форму и начинают радиальную миграцию в область будущего ВЗС [11]. НЗС наибольшего развития достигает к 7 сут, и между 7–15-ми сутками постнатального развития образуются большинство зернистых нейронов, формирующих ВЗС, а к 20–21-м суткам постнатальной жизни у крыс НЗС исчезает. В ряде исследований установлено, что миграционное поведение зернистых клеток обусловлено генетической программой [17], а также влиянием микроокружения, активацией специфических рецепторов N-метил D-аспарагиновой кислоты (NMDA), полимеризацией и распадом микротрубочек, создающих тянувшую и толкающую силу для перемещения ядра и цитоплазмы [14].

Цель настоящего исследования — сравнительная оценка динамики экспрессии DCX и NeuN в нейронах коры древней, новой частей и промежуточного ядра мозжечка у крыс в раннем постнатальном онтогенезе.

Сведения об авторах:

Зиматкин Сергей Михайлович (e-mail: smzimatkin@grsmu.by), Карнюшко Ольга Анатольевна (e-mail: karnyushko-olga@mail.ru), кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, Гродненский государственный медицинский университет, 230015, г. Гродно, ул. Горького, 80



Иммуногистохимия даблкортина (DCX) и нейронального ядерного антигена (NeuN) в коре древней части мозжечка у 2- (а, б), 7- (в, г), 14- (д, е) суточных крысят.

НЗС — наружный зернистый слой; **ВЗС** — внутренний зернистый слой. Иммуногистохимические реакции: а, в, д — на DCX; б, г, е — на NeuN. Ув. 100

Материал и методы. Эксперименты проведены на 5 самках беспородных белых крыс с исходной массой 180 ± 20 г и родившемся от них потомстве. Все опыты выполнены с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» [1]. На данное исследование получено разрешение комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета (протокол № 7 от 23.12.2013 г.). Животные находились на стандартном рационе вивария. От каждой самки брали по одному крысенку по достижении ими 2-, 7-х и 15-х суток после рождения и декапитировали. Для получения сопоставимых результатов образцы мозжечка от всех животных обрабатывали параллельно и в одинаковых условиях. Их фиксировали в цинк-формалине при 4°C (в течение ночи), а затем обычным способом заливали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью микротома LeicaRM 2125 RTS (Leica, Германия). Для иммуногистохимического выявления DCX применяли первичные поликлональные кроличьи антитела (Abcam, Великобритания) ab.18723, для NeuN — ab.12886 (в разведении 1:400, при 4°C , 20 ч, во влажной камере). Для выявления связанных первичных антител использовали набор EXPOSE Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit ab.80437 Abcam (Великобритания). Соседние срезы окрашивали 0,1% раствором тионина по методу Нисселя. В филогенетически древней и новой частях мозжечка измеряли толщину НЗС и ВЗС коры. Их расположение на гистологических препаратах развивающегося мозжечка определяли по описаниям С.Н. Оленева [5]. Измеряли оптическую плотность осадка хромогена в DCX-иммунопозитивных нейронах НЗС, NeuN-иммунопозитивных нейронах ВЗС и промежуточного ядра мозжечка. Во ВЗС определяли плотность расположения NeuN-иммунопозитивных нейронов на 1000 мкм^2 .

Изучение гистологических препаратов, их микрофотографирование и морфометрию проводили с помощью микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры LeicaDFC 320 (Leica, Германия) и программы анализа изображения ImageWarp (Bitflow, США). Для каждого показателя определяли значения медианы и интерквартильного диапазона ($\text{Мe}\pm\text{IQR}$). Различия сравниваемых величин оценивали по U-критерию Манна—Уитни и считали значимыми при $P<0,05$.

Результаты исследования. На 2-е сутки после рождения в НЗС коры мозжечка в 2–3 наружных рядах, где находятся делящиеся клетки, DCX-иммунопозитивные нейроны отсутствовали (рисунок, а). Интенсивная экспрессия

Таблица 1

Экспрессия даблкортина в предмиграционных нейронах наружного зернистого слоя коры мозжечка у крыс в постнатальном онтогенезе ($\text{Мe}\pm\text{IQR}$, ед. опт. плотности)

Срок после рожде- ния, сутки	Части мозжечка	
	Древняя	Новая
2-е	$0,25\pm0,03$	$0,33\pm0,05^+$
7-е	$0,20\pm0,020^*$	$0,24\pm0,04^{*+}$
15-е	$0,190\pm0,010^*$	$0,190\pm0,020^{*#}$

Здесь и в табл. 2–4: * различия по сравнению с показателями у 2-суточных крыс; # с показателями у 7-суточных крыс; + по сравнению с показателями в древней части мозжечка значимы при $P<0,05$.

DCX определялась в 2–3 внутренних рядах клеток НЗС, где располагаются постмитотические зернистые нейроны, готовящиеся к радиальной миграции (см. рисунок, а; табл. 1). В последних экспрессия NeuN еще отсутствовала, но она появлялась в мигрирующих зернистых нейронах, достигая максимума в более зрелых нейронах ВЗС (см. рисунок, б).

На 7-е сутки постнатального онтогенеза, когда НЗС достигал максимальной толщины (табл. 2), в его постмитотических нейронах, готовящихся к миграции, иммунореактивность DCX снизилась (см. табл. 1). Экспрессия DCX возросла в мигрирующих нейронах и разрастающихся отростках нейронов ВЗС (см. рисунок, в). В НЗС экспрессия NeuN была низкой, но увеличивалась в мигрирующих нейронах, достигая максимума в более зрелых нейронах, завершивших миграцию во ВЗС (см. рисунок, г).

На 15-е сутки после рождения толщина НЗС становилась в 2 раза меньше, чем на 7-е сутки (см. табл. 2). В этот период в нейронах, готовящихся к миграции, экспрессия DCX еще больше снижалась. Она выявлялась в мигрирующих зернистых нейронах, но уже отсутствовала в тела нейронов ВЗС. Однако в его нейропиле (вероятно, растущих отростках зернистых нейронов) интенсивность реакции на DCX была довольно высокая (см. рисунок, д). В этот срок умеренная экспрессия NeuN выявлялась в мигрирующих зернистых нейронах и достигала максимума в тела нейронов ВЗС. В нейропиле этого слоя NeuN-иммунореактивность не выявлялась (см. рисунок, е).

Таким образом, экспрессия DCX в предмиграционных нейронах НЗС коры в древней и новой частях мозжечка постепенно снижалась со 2-х по 15-е сутки постнатального онтогенеза. В новой части мозжечка 2- и 7-суточных крысят экспрессия DCX была больше, чем в древней, но уже к 15-суточному возрасту не отличалась от таковой в древней части мозжечка (см. табл. 1).

Со 2-х по 15-е сутки постнатального онтогенеза у крыс плотность расположения NeuN-иммунопозитивных нейронов во ВЗС прогрессивно увеличивалась (в 3–4 раза), при этом в них возрастала (в 2–2,5 раза) экспрессия NeuN (см. табл. 2).

При сравнении коры древней и новой частей мозжечка выявлено некоторое запаздывание в нарастании экспрессии NeuN в новой его части по сравнению с таковой в древней (см. табл. 2). На 15-е сутки после рождения в новой части мозжечка НЗС был значительно толще, а ВЗС несколько тоньше, чем в древней части (табл. 3).

Таблица 2

Характеристика нейронов мозжечка у крыс в постнатальном онтогенезе ($M \pm IQR$)

Исследованный показатель	Срок после рождения, сутки	Части мозжечка		
		Древняя	Новая	Промежуточное ядро
Количество NeuN-позитивных нейронов во ВЗС коры на площади среза 1000 $\mu\text{м}^2$	2-е	4,4 \pm 1,8	3,9 \pm 0,5	—
	7-е	8,89 \pm 0,28*	9 \pm 4*	—
	15-е	14,1 \pm 1,6*#	15,4 \pm 2,1*#	—
Экспрессия NeuN в нейронах, ед. опт. плотности:	2-е	0,14 \pm 0,06	0,10 \pm 0,10	0,130 \pm 0,010
	7-е	0,20 \pm 0,09	0,18 \pm 0,03	0,140 \pm 0,010
	15-е	0,25 \pm 0,04*#	0,26 \pm 0,04*#	0,170 \pm 0,020*#

Примечание. ВЗС — внутренний зернистый слой коры; NeuN — нейрональный ядерный антиген.

Клетки Пуркинье (КП) у 2-суточных крысят располагались в несколько рядов, а к 7-м суткам они выравнивались, образуя монослои. Экспрессия белка DCX в КП не выявлялась на 2-е сутки после рождения.

Экспрессия DCX в нейронах промежуточного ядра мозжечка на 2-, 7-е и 15-е сутки постнатального развития не выявлялась. Это свидетельствует о том, что к 2-м суткам постнатального онтогенеза миграция этих нейронов уже была завершена, и идет процесс их дифференцировки, что сопровождается прогрессивным возрастанием в них экспрессии NeuN (см. табл. 2).

Обсуждение полученных данных. Одновременное сравнительное иммуногистохимическое исследование пары молекулярных маркеров DCX и NeuN может быть удобным подходом для изучения динамики развития нейронов мозжечка у крысы в раннем постнатальном онтогенезе. Показано, что DCX отсутствует в митотически делящихся клетках НЗС, начинает выявляться в постмитотических нейронах, готовящихся к миграции, и не обнаруживается в телах нейронов, завершивших миграцию и дифференцирующихся. Это соответствует данным литературы о появлении DCX в нейронах, готовящихся к миграции, и отсутствии его в телах зрелых нейронов [15]. DCX участвует в стабилизации микротрубочек, необходимых для миграции нейронов [8], также для формирования новых отростков, и может иметь значение для синаптогенеза нейронов ВЗС. Возрастание DCX в нейропиле зернистого слоя на 7–15-е сутки совпадает с периодом интенсивного роста отростков нейронов и синаптогенеза в коре мозжечка [9]. Напротив, в незрелых постмитотических нейронах НЗС экспрессия NeuN очень низкая, но прогрессивно нарастает в мигрирующих и особенно созревающих нейронах ВЗС, что соответствует данным литературы [12].

Изменения, происходящие с КП и, в частности, образование ими монослоя к 7-м суткам, вероятно, обусловлено механическими факторами: давлением утолщающегося зернистого слоя снизу и барьера, образованным параллельными волокнами сверху, препятствующими проникновению перикарионов КП в молекулярный слой. Этот процесс не сопровождается транслокацией ядра и перестройкой цитоскелета [6]. То, что экспрессия белка DCX в КП не выявлялась даже на 2-е сутки после рождения, свидетельствует о том, что миграция КП к этому сроку завершена. Однако экспрессии NeuN в раннем постнатальном онтогенезе в КП мозжечка также не выявляется, что соответствует данным литературы [12].

Поскольку у 2-суточных крысят созревающие зернистые нейроны расположены диффузно, толщина ВЗС даже несколько больше, чем у 7-суточных крысят. В новой части мозжечка выявлено запаздывание уменьшения толщины НЗС, убыли экспрессии в нем DCX, с одной стороны, и отставание утолщения ВЗС и возрастания экспрессии NeuN в его нейронах по сравнению с таковыми в древней части мозжечка. Все это соответствует представлению об опережающем развитии в раннем онтогенезе коры древней части мозжечка.

Таблица 3

Толщина зернистых слоев в коре мозжечка у крыс в постнатальном онтогенезе ($M \pm IQR$, $\mu\text{м}$)

Зернистые слои	Срок после рождения, сутки	Части мозжечка	
		Древняя	Новая
Наружный	2-е	14 \pm 3	13,8 \pm 2,8
	7-е	41 \pm 11*	45 \pm 6*
	15-е	20,2 \pm 1,2*#	26 \pm 7**+
Внутренний	2-е	72 \pm 7	60 \pm 5*
	7-е	62 \pm 8*	48 \pm 6**+
	15-е	125 \pm 23*#	107 \pm 24*#

Таким образом, сравнительное имmunогистохимическое исследование динамики экспрессии пары молекулярных маркеров DCX и NeuN является эффективным способом оценки развития зернистых нейронов мозжечка в раннем постнатальном онтогенезе. Этот подход может быть использован также при изучении влияния на постнатальный морфогенез мозжечка различных экспериментальных воздействий и патологических состояний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каркищенко Н.Н., Грачева С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. М.: Профиль-2С, 2010.
2. Коржевский Д.Э., Гиллерович Е.Г., Зинькова Н.Н. и др. Иммуноцитохимическое выявление нейронов головного мозга с помощью селективного маркера NeuN // Морфология. 2005. Т. 128, вып. 5. С. 76–78.
3. Коржевский Д.Э., Карпенко М.Н., Кирик О.В. Белки, ассоциированные с микротрубочками, как показатели дифференцировки функционального состояния нервных клеток // Морфология. 2011. Т. 139, вып. 1. С. 13–21.
4. Коржевский Д.Э., Петрова Е.С., Кирик О.В. и др. Оценка дифференцировки нейронов в эмбриогенезе крысы с использованием иммуноцитохимического выявления дабл-кортина // Морфология. 2008. Т. 133, вып. 4. С. 7–10.
5. Оленев С.Н. Развивающийся мозг. Л.: Наука, 1978.
6. Altman J., Winfree A.T. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. V. Spatial organization of Purkinje cell perikarya // J. Comp. Neurol. 1977. Vol. 171, № 1. P. 1–16.
7. Fricourt G., Koulakoff A., Chafey P. et al. Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes // Cereb. Cortex. 2003. Vol. 13, № 6. P. 620–626.
8. Gleeson J.G., Lin P.T., Flanagan L.A. et al. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons // Neuron. 1999. Vol. 23. P. 257–271.
9. Hashimoto K., Kano M. Synapse elimination in the developing cerebellum // Cell. Mol. Life Sci. 2013. Vol. 70, № 24. P. 4667–4680.
10. Kawaji K., Umeshima H., Eiraku M. et al. Dual phases of migration of cerebellar granule cells guided by axonal and dendritic leading processes // Mol. Cell. Neurosci. 2004. Vol. 25, № 2. P. 228–240.
11. Komuro H., Yacubova E., Rakis P. Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer // J. Neurosci. 2001. Vol. 21, № 2. P. 527–540.
12. Mullen R.J., Buck C.R., Smith A.M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates // Development. 1992. Vol. 116, № 1. P. 201–211.
13. Paolone N., Manohar S., Hayes S. H. et al. Dissociation of doublecortin expression and neurogenesis in unipolar brush cells in the vestibulocerebellum and dorsal cochlear nucleus of the adult rat // Neuroscience. 2014. Vol. 265. P. 323–331.
14. Rakis P., Knyihar-Csillik E., Csillik E. Polarity of microtubule assemblies during neuronal cell migration // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93, № 17. P. 9218–9222.
15. Takács J., Zaninetti R., Vig J. et al. Postnatal expression of Doublecortin (DCX) in the developing cerebellar cortex of mouse // Acta Biol. 2008. Vol. 59, № 2. P. 147–161.
16. Wingate R.J. The rhombic lip and early cerebellar development // Curr. Opin. Neurobiol. 2001. Vol. 11, № 1. P. 82–88.
17. Yacubova E., Komuro H. Intrinsic program for migration of cerebellar granule cells in vitro // J. Neurosci. 2002. Vol. 22, № 14. P. 5966–5981.

Поступила в редакцию 12.07.2015

EXPRESSION OF DOUBLECORTIN AND NeuN IN THE DEVELOPING CEREBELLAR NEURONS IN RAT

S.M.Zimatkin, O.A.Karniushko

This work was performed on the offspring of 5 outbred female albino rats to give a comparative immunohistochemical evaluation of doublecortin (DCX) and NeuN expression in the neurons of the cerebellar cortex and nucleus interpositus in the early postnatal ontogenesis (postnatal days 2–15). DCX expression was detected in postmitotic neurons of the external granular layer and migrating neurons of the cerebellar cortex. At postnatal days 2 and 7 DCX expression in neocerebellum was higher than in paleocerebellum. NeuN expression was found to appear in migrating granule neurons, and reach the maximum in mature neurons of internal granular layer. DCX expression was not detected in Purkinje cells and in the nucleus interpositus of the cerebellum. In neurons of the nucleus interpositus the expression of NeuN progressively increased from postnatal days 2 to 15. Thus, a comparative immunohistochemical study of the dynamics of the expression of the pair of molecular markers studied proved to be an effective way of the assessment of the development of granular neurons of the cerebellum in early postnatal ontogenesis.

Key words: cerebellum, neurons, development, doublecortin, NeuN

Department of Histology, Cytology and Embryology, Grodno State Medical University, Belarus