

С. М. Зиматкин, О. А. Карнюшко

ПОСТНАТАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ ГАМК-ЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ МОЗЖЕЧКА КРЫСЫ

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — д-р биол. наук проф. С. М. Зиматкин),
Гродненский государственный медицинский университет, г. Гродно, Беларусь

Цель — оценка динамики формирования ГАМК-ергических нейронов в коре и ядрах развивающегося мозжечка белой крысы в постнатальном онтогенезе с помощью иммуногистохимического выявления глутаматдекарбоксилазы (ГДК).

Материал и методы. Исследование выполнено на 16 беспородных белых крысах на 2-, 7-, 15-е сутки (ранний постнатальный период) и 45-е сутки после рождения (пубертатный период). Для иммуногистохимического выявления ГАМК-ергических нейронов применяли первичные моноклональные мышиные антитела GAD-67 к ГДК, являющейся ферментом синтеза γ-аминомасляной кислоты. Иммунореактивность ГДК изучали на парафиновых срезах околичервячной части мозжечка.

Результаты. Установлено, что в цитоплазме тел всех типов ГАМК-ергических нейронов коры мозжечка ГДК выявлялась уже на 2-е сутки после рождения. В цитоплазме тел грушевидных нейронов (клеток Пуркинье, КП) она достигала максимума на 7-е сутки, а в их дендритах — на 15-е сутки, позднее снова уменьшалась в больших звездчатых нейронах (клетках Гольджи, КГ) — на 45-е сутки. В аксонах звездчатых и корзинчатых нейронов ГДК-иммунореактивность к 45-м суткам становилась значительно выше, они формировали сплетения (корзинки) вокруг тел КП. ГАМК-ергические синапсы выявлялись в коре мозжечка на 7-е сутки и достигали максимального развития на 45-е сутки. В цитоплазме тел некоторых нейронов шаровидного и пробковидного ядер мозжечка у двухсуточных крысят выявлялась умеренная ГДК-иммунореактивность. На 7-е сутки между нейронами обнаруживались ГДК-иммунопозитивные волокна и аксодендритические синапсы, а на телах нейронов — аксосоматические синапсы, число которых возрастало к 45-м суткам.

Выводы. Иммуногистохимическое исследование ГДК позволило выявить чёткую динамику постнатальных структурных преобразований тел, отростков и синаптических окончаний ГАМК-ергических нейронов в мозжечке крысы.

Ключевые слова: мозжечок крысы, постнатальное развитие, ГАМК-ергические нейроны, глутаматдекарбоксилаза

Введение. Основным нейромедиатором торможения в мозжечке является гамма-аминомасляная кислота (ГАМК). Из 7 основных типов нейронов коры мозжечка 5 являются ГАМК-ергическими. Все ГАМК-ергические нейроны коры и ядер мозжечка образуются из нейроэпителлия IV желудочка, а затем мигрируют, занимают свое definitivo положение и дифференцируются [14, 15]. Предшественники корзинчатых нейронов у крыс образуются на 2–17-е сутки, а звездчатых нейронов — на 4–19-е сутки постнатального развития. Они достигают своего конечного положения в молекулярном слое на 7–21-е сутки после рождения [14, 15], дифференцируются и устанавливают ГАМК-ергические синаптические контакты с грушевидными нейронами (клетками Пуркинье, КП). Предшественники КП у крыс образуются на 13–16-е сутки эмбриогенеза [4]. Постмиграционные КП в коре мозжечка с 19-х суток внутриутробного развития по 6-е сутки после рождения осуществля-

ют ремоделирование дендритов, а затем с 7-х по 30-е сутки — рост обширного дендритного дерева. КП обеспечивают выход информации из коры, образуя большинство ГАМК-ергических синапсов на нейронах ядер мозжечка. В зернистом слое располагаются ГАМК-ергические биполярные веретеновидные нейроны (клетки Луго, КЛ) и большие звездчатые нейроны (клетки Гольджи, КГ). КЛ начинают формироваться на 14–15-е сутки внутриутробного развития. Они образуют ГАМК-ергические синапсы, ингибирующие КГ, корзинчатые, звездчатые нейроны [11] и КП [6]. КГ образуются с 18-х суток эмбриогенеза по 2-е сутки постнатального онтогенеза. Аксоны КГ ветвятся в зернистом слое, входят в состав клубочков мозжечка и подавляют активность зерновидных нейронов (ЗН) с помощью ГАМК [5]. По электрофизиологическим, морфологическим и биохимическим свойствам различают пять типов нейронов в ядрах мозжечка, из которых два типа являются ГАМК-ергическими [12].

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, УО «Гродненский государственный медицинский университет», Беларусь, 230015, г. Гродно, ул. Горького, 80

Таким образом, ГАМК-ергические нейроны в коре и ядрах мозжечка у эмбрионов и взрослых крыс достаточно хорошо изучены, но о динамике постнатального развития этих нейронов известно недостаточно, что необходимо для понимания постнатального морфогенеза и становления функций мозжечка.

ГАМК образуется путем декарбоксилирования глутаминовой кислоты ферментом глутаматдекарбоксилазой (ГДК) [3]. ГДК синтезируется в телах ГАМК-ергических нейронов, а затем транспортируется вдоль аксона в терминали, где участвует в образовании ГАМК. ГДК экспрессируется только в нейронах, которые используют ГАМК как нейромедиатор [8], и поэтому служит хорошим маркером ГАМК-ергических нейронов в ЦНС [1].

Целью настоящего исследования была оценка динамики формирования ГАМК-ергических нейронов в развивающемся мозжечке крысы с помощью иммуногистохимического выявления ГДК

Материал и методы. Эксперименты выполнены на потомстве самок беспородных белых крыс с исходной массой 180 ± 20 г. Все опыты проведены с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». 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 для исследования по одному крысенку по достижении ими 2, 7, 15 и 45 сут после рождения (всего изучено 16 крысят). Для получения сопоставимых результатов от всех животных образцы околичервячной части мозжечка обрабатывали параллельно и в одинаковых условиях. Их фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде при $+4^\circ\text{C}$ (в течение ночи), затем заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 7 мкм, проходящие через кору палео- и неocerebellума, а также шаровидное и пробковидное ядра мозжечка готовили с помощью микротомы Leica RM 2125 RTS (Leica, Германия), монтировали на предметные стекла. Для иммуногистохимического выявления ГДК применяли первичные моноклональные мышинные антитела GAD67 фирмы Abcam (Великобритания, ab. 26116) в разведении 1:2000, экспозиция 20 ч при $+4^\circ\text{C}$ во влажной камере. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (Великобритания, ab. 80436). Расположение филогенетически древней (paleocerebellum) и новой (neocerebellum) частей мозжечка крысят на гистологических препаратах определяли по С. Н. Оленеву [2], используя атлас G. Paxinos и С. Watson [10]. Изучение и микрофотографирование гистологических препаратов проводили с помощью микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия) и цифровой видеокамеры DFC 320 (Leica, Германия).

Результаты исследования. На 2-е сутки постнатального развития слои коры мозжечка крысы ещё не сформированы. КП располагаются в 3–4 ряда, ГДК-иммунореактивная цитоплазма их тел представлена лишь узким обод-

ком вокруг ядра. В молекулярном и зернистом слоях выявляются единичные мелкие ГДК-иммунопозитивные нейроны. Их тела хорошо выделяются на фоне светлого нейропиля (рис. 1, а). На 7-е сутки КП располагаются в один ряд, ГДК-иммунопозитивная цитоплазма их тел увеличивается преимущественно в апикальной части клетки. На 7-е сутки после рождения как в палео-, так и неocerebellуме, ГДК-иммунопозитивное окрашивание синапсов появляется на некоторых дендритах и телах КП. В молекулярном и зернистых слоях ГДК-иммунопозитивные нейроны на фоне более темного нейропиля выявляются хуже, чем на 2-е сутки. На телах нейронов молекулярного слоя на 7-е сутки уже четко определяются мелкие ГДК-иммунопозитивные аксосоматические синапсы (см. рис. 1, б).

На 15-е сутки равномерное ГДК-иммунопозитивное окрашивание наблюдалось в телах КП вокруг иммунонегативных ядер и в проксимальной части дендритов. Интересно, что дендриты КП в другие сроки исследования так четко не выявлялись (см. рис. 1). Тело и дендриты многих КП были покрыты переменным количеством ГДК-иммунопозитивных аксосоматических и аксодендритических синапсов. Среди зернистых нейронов определялись мелкие ГДК-иммунопозитивные гранулы, расположенные по периферии формирующихся клубочков мозжечка (см. рис. 1, в). На 45-е сутки ГДК-иммунореактивность выявлялась по всей цитоплазме тел КП, вокруг которых появлялись корзинчатые сплетения из ГДК-позитивных нервных волокон. В молекулярном слое иммунопозитивные по ГДК синапсы становились более мелкими, многочисленными и располагались более равномерно по дендритному дереву КП. ГДК-иммунореактивность наблюдалась в телах звездчатых и корзинчатых нейронов, но она была значительно выше в аксонах этих нейронов. ГДК-иммунопозитивные гранулы (аксодендритические синапсы) по периферии сформированных клубочков мозжечка становились крупнее (см. рис. 1, г).

Ядра мозжечка. На 2-е сутки постнатального онтогенеза крысы в цитоплазме тел некоторых нейронов шаровидного и пробковидного ядер мозжечка выявлялась умеренная ГДК-иммунореактивность. На телах нейронов и в нейропиле ГАМК-ергические синапсы были единичны (рис. 2, а).

На 7-е сутки между нейронами начинали выявляться ГДК-иммунопозитивные волокна и ГАМК-ергические аксодендритические синапсы, а на телах нейронов — аксосоматические синапсы

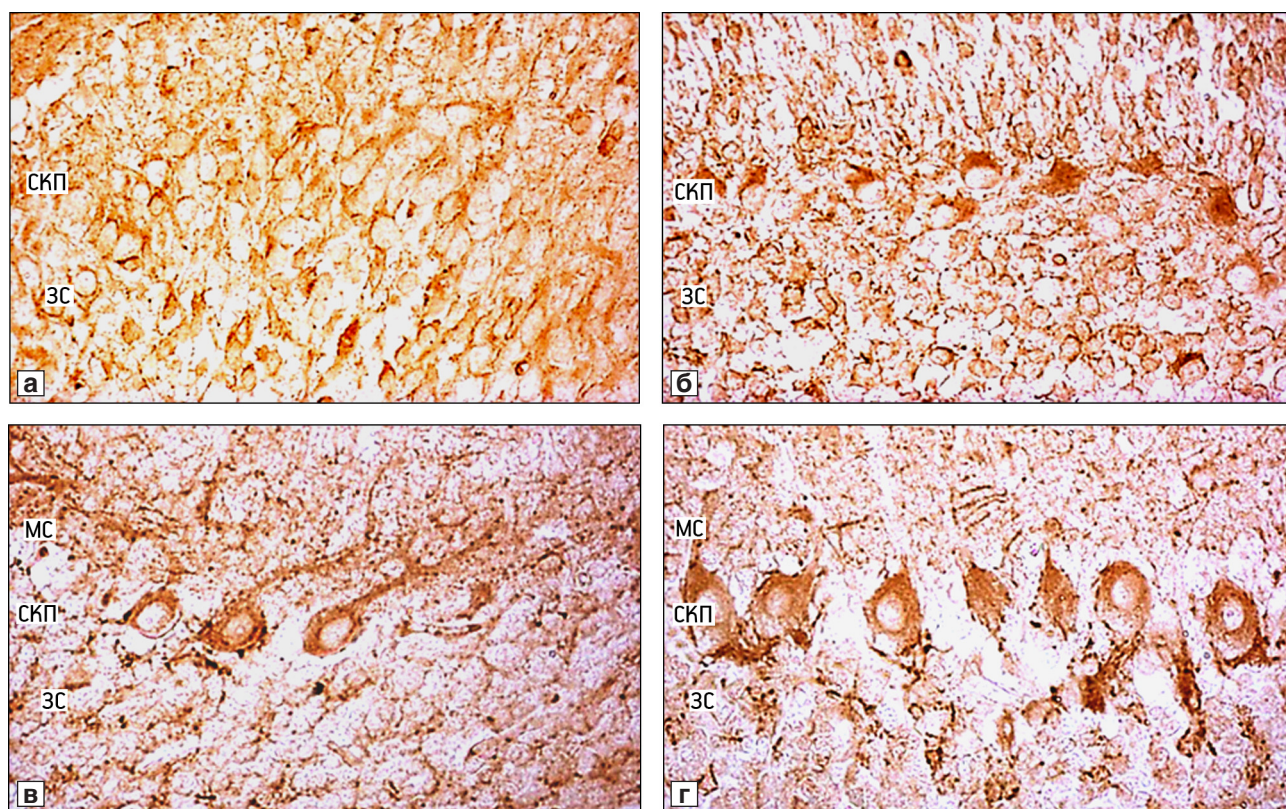


Рис. 1. Экспрессия глутаматдекарбоксилазы (ГДК) в палеocerebellуме у крыс на 2- (а), 7- (б), 15-е (в) и 45-е (г) сутки после рождения.

МС — молекулярный слой; СКП — слой клеток Пуркинью; ЗС — зернистый слой. Иммуногистохимическая реакция на ГДК. Ув. 400

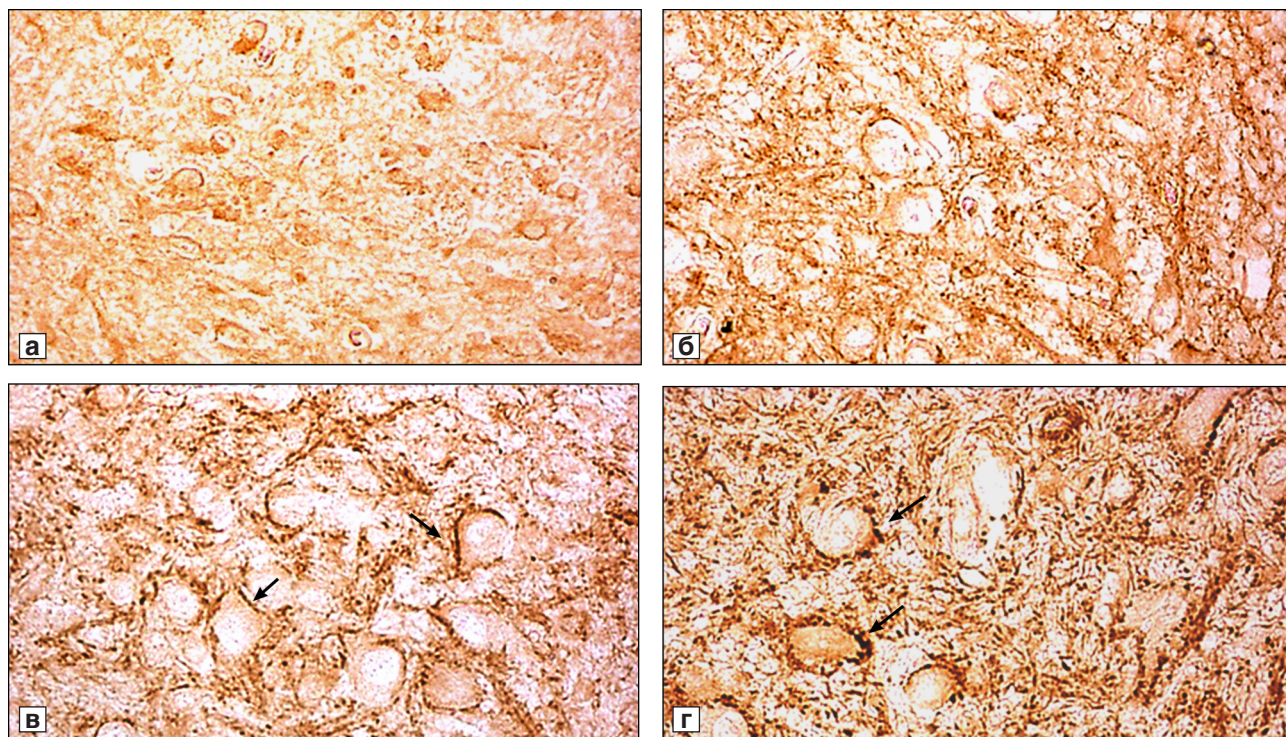


Рис. 2. ГДК-иммунореактивные синапсы на телах (стрелки) и дендритах нейронов шаровидного и пробковидного ядер мозжечка на 2- (а), 7- (б), 15- (в), 45-е (г) сутки после рождения.

Иммуногистохимическая реакция на ГДК. Ув. 400

(см. рис. 2, б). На 15-е и особенно на 45-е сутки число аксосоматических синапсов ещё больше возрастало. При этом тела большинства нейронов полностью окружаются ГДК-иммунопозитивными ободками. ГДК-иммунореактивность нейропиля также возрастает, за счёт увеличения числа и размеров аксодендритических синапсов (см. рис. 2, в–г).

Обсуждение полученных данных. В зрелом мозгу ГАМК функционирует главным образом в качестве тормозного медиатора, а в процессе развития нервной системы она может выступать в качестве трофического фактора, влияя на пролиферацию, миграцию, дифференцировку, созревание синапсов и гибель клеток [9]. Этим можно объяснить выявленную нами экспрессию ГДК в нейронах коры мозжечка уже у двухсуточных крыс еще до начала синаптогенеза.

По данным литературы, экспрессия мРНК-ГДК (гибридизация *in situ*) в КП достигала уровня взрослых крыс через 1 нед, в КГ — к 14-м суткам постнатального развития [13]. По нашим иммуногистохимическим данным, экспрессия ГДК в этих нейронах также достигала дефинитивного уровня, примерно, в эти же сроки. Наблюдаемое увеличение в молекулярном слое числа ГДК-иммунопозитивных нейронов и ГДК-иммунореактивности нейропиля с 7-х по 45-е сутки может быть связано с увеличением количества ГАМК-ергических звездчатых и корзинчатых нейронов, ростом их отростков и образованием синапсов на растущих дендритах КП. По данным гибридизации *in situ*, эти нейроны в молекулярном слое достигают конечного содержания мРНК-ГДК к 21-м суткам постнатального развития и позже [13].

Наблюдаемое нами постнатальное увеличение ГДК-иммунореактивности в зернистом слое мозжечка может быть связано с ГАМК-ергическими нейронами, КГ и КЛ, а также окончаниями аксонов КГ в клубочках мозжечка.

В формирующихся нейронах ядер мозжечка крысы, которые образуются ещё пренатально, экспрессия ГДК наблюдалась нами уже на 2-е сутки постнатального онтогенеза, что соответствует литературным данным [7]. Во многих нейронах она сохранялась на 7–45-е сутки. Очень четко и закономерно в ядрах мозжечка в постнатальном онтогенезе увеличиваются количество и размеры аксосоматических и аксодендритических ГАМК-ергических синапсов, очевидно образованных КП,

иммунореактивность аксонов которых отчетливо выявлялась как в нейропиле, так и в белом веществе мозжечка.

Заключение. Таким образом, иммуногистохимическое исследование экспрессии глутаматдекарбоксилазы показало определенную динамику постнатального развития ГАМК-ергических нейронов мозжечка крысы. Установлено, что в цитоплазме тел всех типов ГАМК-ергических нейронов мозжечка экспрессия ГДК выявляется уже на 2-е сутки после рождения. В цитоплазме тел КП она достигает максимума на 7-е сутки, а в их дендритах — на 15-е сутки (затем уменьшается), в КГ — на 45-е сутки. ГАМК-ергические синапсы выявляются в коре, а также в шаровидном и пробковидном ядрах мозжечка на 7-е сутки и достигают максимального развития на 45-е сутки после рождения.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: С. М. З.

Сбор и обработка материала: О. А. К.

Статистическая обработка данных: О. А. К.

Написание текста: О. А. К.

Редактирование: С. М. З.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д.Э., Гилеревич О.В., Кирик О.В. и др. Одновременное выявление глутаматдекарбоксилазы и синаптофизина в парафиновых срезах мозжечка крысы // Морфология. 2015. Т. 147, вып. 1. С. 74–77 [Korzhevskii D.E., Gileovich O.V., Kirik O.V. et al. Simultaneous detection of glutamate decarboxylase and synaptophysin in paraffin sections of rat cerebellum // Morfologiya. 2015. Vol. 147, № 1. P. 74–77. In Russ.]. doi: 10.1007/s11055-015-0205-6
2. Оленев С.Н. Развивающийся мозг. Л.: Наука, 1978. 221 с. [Olenov S.N. Developing brain. L.: Nauka, 1978. 221 p. In Russ.].
3. Сухарева Б.С., Дарий Е.Л., Христофоров Р.Р. Глутаматдекарбоксилаза: структура и каталитические свойства // Успехи биологической химии. 2001. № 41. С. 131–162 [Sukhareva B.S., Darii E.L., Khristoforov R.R. Glutamate decarboxylase: structure and catalytic properties // Uspekhi biologicheskoi khimii. 2001. № 41. P. 131–162. In Russ.].
4. Altman J. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer // J. Comp. Neurol. 1972. Vol. 145, № 4. P. 399–463. doi: 10.1002/cne.901450402
5. Altman J. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. III. Maturation of the components of the granular layer // J. Comp. Neurol. 1972. Vol. 145, № 4. P. 465–513. doi: 10.1002/cne.901450403
6. Dean I., Robertson S.J., Edwards F.A. Serotonin drives a novel GABAergic synaptic current recorded in rat cerebellar Purkinje

- cells: a Lugaro cell to Purkinje cell synapse // *J. Neurosci.* 2003. Vol. 23, № 11. P. 4457–4469.
7. Greif K.F., Erlander M.G., Tillakaratne N.K. et al. Postnatal expression of glutamate decarboxylases in developing rat cerebellum // *Neurochem. Res.* 1991. Vol. 16, № 3. P. 235–242. doi: 10.1007/bf00966086
 8. Kaufman D.L., Houser C.R., Tobin A.J. Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions // *J. Neurochem.* 1991. Vol. 56, № 2. P. 720–723.
 9. Owens D.F., Kriegstein A.R. Is there more to GABA than synaptic inhibition? // *Nat. Rev. Neurosci.* 2002. Vol. 3, № 9. P. 715–727. doi: 10.1038/nrn919
 10. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in stereotaxic coordinates.* 7th Edition. San Diego: Academic Press, 2013.
 11. Schilling K., Oberdick J., Rossi F. et al. Besides Purkinje cells and granule neurons: an appraisal of the cell biology of the interneurons of the cerebellar cortex // *Histochem. Cell Biol.* 2008. Vol. 130, № 4. P. 601–615. doi: 10.1007/s00418-008-0483-y
 12. Uusisaari M., Knöpfel T. Functional classification of neurons in the mouse lateral cerebellar nuclei // *Cerebellum* (London, England). 2011. Vol. 10, № 4. P. 637–646. doi: 10.1007/s12311-010-0240-3.
 13. Willcutts M.D., Morrison-Bogorad M. Quantitative in situ hybridization analysis of glutamic acid decarboxylase messenger RNA in developing rat cerebellum // *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1991. Vol. 63, № 1–2. P. 253–264. doi: 10.1016/0165-3806(91)90085-w
 14. Zhang L., Goldman J.E. Developmental fates and migratory pathways of dividing progenitors in the postnatal rat cerebellum // *J. Comp. Neurol.* 1996. Vol. 370, № 4. P. 536–550. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19960708)370:4<536::AID-CNE9>3.0.CO;2-5
 15. Zhang L., Goldman J.E. Generation of cerebellar interneurons from dividing progenitors in white matter // *J. Neuron.* 1996. Vol. 16, № 1. P. 47–54. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80022-7

Поступила в редакцию 31.07.2017

Получена после доработки 29.11.2019

POSTNATAL DEVELOPMENT OF GABAERGIC NEURONS IN RAT CEREBELLUM

S. M. Zimatkin, O. A. Karniushko

Objective — to evaluate the dynamics of the formation of GABAergic neurons in the cortex and nuclei of the developing cerebellum in albino rat postnatal ontogenesis by immunohistochemical detection of glutamate decarboxylase (GAD).

Method. The study was performed on 16 outbred albino rats on the 2nd, 7th, 15th day (early postnatal period) and 45th day after birth (puberty). For immunohistochemical detection of GABAergic neurons, primary monoclonal mouse antibodies GAD-67 raised against GAD, an enzyme for the synthesis of gamma-aminobutyric acid, were used. GAD immunoreactivity was studied on paraffin sections of the paravermal zone of the cerebellum.

Results. In the cytoplasm of the cell bodies of all types of GABAergic neurons in the cerebellar cortex, GAD was detected as early as on the second postnatal day. In the cytoplasm of the cell bodies of Purkinje cells (PC) it reached the maximum on the 7th day, and in their dendrites — on 15th day, and then decreased; in Golgi cells, maximal GAD staining intensity was detected on 45th day. By the 45th day, in the axons of stellate and basket cells, GAD immunoreactivity became significantly higher; they formed plexuses (baskets) around the PC bodies. GABAergic synapses were detected in the cerebellar cortex on the 7th day and reached their maximal development on the 45th day after birth. Moderate GAD immunoreactivity was detected in the cytoplasm of the cell bodies of neurons in the globose and emboliform nuclei of two-day-old rats. On the 7th day, GAD immunopositive fibers and axodendritic synapses between the neurons, and axosomatic synapses were detected, the number of which increased by the 45th day.

Conclusions. GAD immunohistochemical study demonstrates a distinct dynamics of postnatal structural transformations of bodies, processes and synaptic terminals of GABAergic neurons in rat cerebellum.

Key words: *rat cerebellum, postnatal development, GABAergic neurons, glutamate decarboxylase*

Department of Histology, Cytology and Embryology, Grodno State Medical University, 80 Gorkiy St., Grodno 230015, Belarus