

© С. М. Зиматкин, О. А. Карнюшко, 2016
УДК 611.817.1.018.86:599.323.4

С. М. Зиматкин, О. А. Карнюшко

СИНАПТОГЕНЕЗ В РАЗВИВАЮЩЕМСЯ МОЗЖЕЧКЕ КРЫСЫ

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

Цель исследования — качественная и количественная оценка синаптогенеза в развивающемся мозжечке крысы (2–45-е сутки после рождения) с помощью иммуногистохимического выявления маркера синаптофизина (СФ). Экспрессия СФ выявлена в постмитотических нейронах наружного зернистого слоя и мигрирующих предшественниках зернистых нейронов мозжечка. В течение всего изученного периода происходит увеличение ширины зоны синаптогенеза в молекулярном слое и при этом снижение СФ-иммунореактивности. Отмечено также уменьшение количества СФ-иммунопозитивных синапсов вокруг перикарионов клеток Пуркинье с 7-х по 15-е сутки. Во внутреннем зернистом слое наблюдаются СФ-иммунопозитивные точки, размеры которых увеличиваются со 2-х по 45-е сутки, что связано с формированием клубочков мозжечка. В промежуточном ядре мозжечка в течение всего изученного периода происходит увеличение количества и размеров аксономатических синапсов вокруг перикарионов нейронов. В нейропиле выявлены неравномерные скопления СФ-позитивных аксодендритных синапсов.

Ключевые слова: *мозжечок, развитие, синаптогенез, синаптофизин*

Развитие мозжечка в онтогенезе сопровождается пролиферацией, миграцией, дифференцировкой нейронов, формированием между ними синаптических связей. Предшественники клеток Пуркинье (КП) формируются на 13–16-е сутки эмбриогенеза крысы в вентрикулярном слое крыши IV желудочка, а затем мигрируют в радиальном направлении, сначала образуя в будущей коре мозжечка многорядный слой и только к 3–4-м суткам постнатального развития — однорядный. Образование синапсов между КП и параллельными волокнами (аксонами зернистых нейронов) начинается в глубокой части молекулярного слоя коры мозжечка на 7–9-е сутки постнатального периода онтогенеза [9]. У крыс корзинчатые нейроны образуются со 2-х по 17-е сутки постнатального развития, а звездчатые нейроны — с 4-х по 19-е сутки. Затем они дифференцируются и образуют синаптические контакты с КП [14]. Лазящие волокна (аксоны нейронов нижней оливы) достигают коры развивающегося мозжечка и устанавливают синаптические контакты с КП к 18–19-м суткам эмбрионального развития. Затем к 15-м суткам постнатального развития множественная иннервация лазящими волокнами к моменту рождения сменяется моноиннервацией [5]. Моховидные афферентные волокна во внутреннем зернистом слое (ВЗС) мозжечка формируют клубочки. Существуют несколько источников моховидных волокон: нейроны спин-

ного мозга (волокна спиноцеребеллярного пути, которые проникают в мозжечок на 15-е сутки эмбрионального развития), вестибулярные ядра (вестибулоцеребеллярные афферентные волокна — 13–15-е сутки), ядра ретикулярной формации (ретикулоцеребеллярные проекции на 16–17-е сутки), ядра тройничного нерва (на 22-е сутки внутриутробного развития) и ядра моста (понтocereбеллярные афферентные волокна — после рождения) [12].

В ходе дифференцировки клубочков мозжечка различают 2 этапа: протогломерулярный и гломерулярный. Первый этап проходит у крыс в течение первых 2 нед постнатального развития и характеризуется быстрым расширением розеток моховидных нервных волокон, содержащих синаптические пузырьки вблизи плазмолеммы. Второй этап (гломерулярный) — формирование и стабилизация клубочков — с 15-х по 45-е сутки. В этот период происходит увеличение в терминалях моховидных волокон числа синаптических пузырьков и контактов с дендритами зернистых клеток, которые образуют выпячивания (шипики), содержащие митохондрии и цистерны эндоплазматической сети [2]. Афферентные пути мозжечка (образованы аксонами КП) начинают формироваться в позднем периоде эмбриогенеза, и КП устанавливают синаптические контакты с клетками-мишенями (нейронами ядер мозжечка) к 20-м суткам внутриутробного развития [7].

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

Охарактеризовать синаптогенез в ходе развития мозжечка позволяет молекулярный маркер синаптических пузырьков синаптофизин (СФ) [1, 3, 11]. СФ составляет 10% от всех белков синаптических пузырьков, обеспечивает их контакт с пресинаптической мембраной, участвует в эндо- и экзоцитозе нейромедиаторов [10]. Эмбриональный СФ отличается по своим биохимическим свойствам от СФ взрослых животных [6]. Присутствие СФ не является обязательным для образования синаптических пузырьков [8]. В настоящее время считают, что при отсутствии СФ не происходит изменения экзоцитоза медиатора, но после передачи нервного импульса нарушается эндоцитоз и замедляется заполнение синаптических пузырьков медиатором, что ограничивает возможности передачи нервных импульсов нейронами [10]. СФ синтезируется в перикарионах, а затем поступает в аксоны нейронов [9]. Экспрессия СФ в молекулярном слое мозжечка главным образом обусловлена синаптическими контактами между дендритами КП и параллельными волокнами, а в зернистом слое — с моховидными волокнами [11].

Цель настоящего исследования — оценка синаптогенеза в развивающемся мозжечке крысы с помощью иммуногистохимического выявления СФ.

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 по одному крысенку по достижении ими 2-, 7- 15-х и 45-х суток после рождения и декапитировали (всего изучено 12 крысят). Для получения сопоставимых результатов от всех животных образцы мозжечка обрабатывали параллельно и в одинаковых условиях. Их фиксировали в цинк-формалине при 4°C (в течение ночи), а затем заливали в парафин. Срезы толщиной 7 мкм готовили с помощью микротомы Leica RM 2125 RTS (Leica, Германия). Для иммуногистохимического выявления СФ применяли первичные поликлональные кроличьи антитела Synaptophysin Antibody (PA5-27286) (Thermo Scientific, США) в разведении 1:400 при 4°C , экспозиция 20 ч, во влажной камере. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор Thermo Scientific (США) Super Picture™ Polymer Detection Kit. Расположение филогенетически древней (paleocerebellum) и новой (neocerebellum) частей мозжечка на гистологических препаратах развивающегося мозжечка крысят определяли на основании данных С.Н.Оленева [4], используя атлас G.Paxinos и С.Watson [13]. Изучение гистологических препаратов, микрофотографирование и морфометрическое исследование проводили с помощью микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры LeicaDFC 320 (Leica, Германия) и программы анализа изображения

ImageWarp (Bitflow, США). У крысят определяли плотность расположения клубочков мозжечка на 1 мм^2 ВЗС, ширину зоны синаптогенеза и экспрессию СФ в молекулярном слое коры мозжечка, количество синапсов вокруг перикарионов КП, экспрессию СФ в нейропиле промежуточного ядра. Средние значения, полученные у животных в каждой экспериментальной группе, анализировали методами непараметрической статистики с помощью программы Statistica 6.0 для Windows (StatSoft, Inc., США). В описательной статистике для каждого показателя определяли значения медианы (Me) и интерквартильного диапазона (IQR).

Результаты исследования. В коре мозжечка крыс на 2-е и 15-е сутки после рождения в наружных рядах наружного зернистого слоя (НЗС), которые образованы делящимися клетками — предшественниками зернистых нейронов, окраска при реакции на СФ отсутствует. В цитоплазме готовящихся к миграции и мигрирующих через молекулярный слой будущих зернистых нейронов она выявляется (рис. 1, а–в). Иммунореактивность СФ присутствует и в цитоплазме зернистых нейронов ВЗС, но с возрастом (на 15–45-е сутки) она снижается (см. рис. 1).

На 7-е сутки у контрольных крыс как в древней, так и в новой части мозжечка при реакции на СФ окрашивание синапсов наблюдается в виде плотно расположенных точек между перикарионами КП и в глубокой части молекулярного слоя (рис. 2, б). На 15-е и особенно 45-е сутки постнатального онтогенеза у крыс по мере утолщения молекулярного слоя в обеих частях мозжечка ширина зоны синаптогенеза увеличивается (табл. 1). При этом СФ-иммунопозитивные синапсы становятся более мелкими, многочисленными и расположены равномернее на иммунонегативных дендритах КП, чем на 7-е сутки, а окрашивание зоны синаптогенеза становится более гомогенным и слабым (см. рис. 1, табл. 1), за исключением полосы повышенной иммунореактивности на поверхности молекулярного слоя на 45-е сутки (см. рис 1, г).

На 2-е и 7-е сутки после рождения экспрессия СФ наблюдается между перикарионами КП (см. рис. 1, а). На 7-е сутки СФ-иммунопозитивные синапсы в виде многочисленных крупных, интенсивно окрашенных точек видны вокруг перикарионов клеток Пуркинье — формирующиеся аксосоматические синапсы. На 15–45-е сутки после рождения количество аксосоматических синапсов на перикарионах КП значительно уменьшается. В эти сроки количество крупных СФ-позитивных синапсов на перикарионах КП в древней и новой части мозжечка составляет всего $2,0 \pm 1,0$ (Me $\pm$ IQR). В этот период преобладают мелкие СФ-иммунопозитивные аксосоматические синапсы, выглядящие как мелкая пылевидная зер-

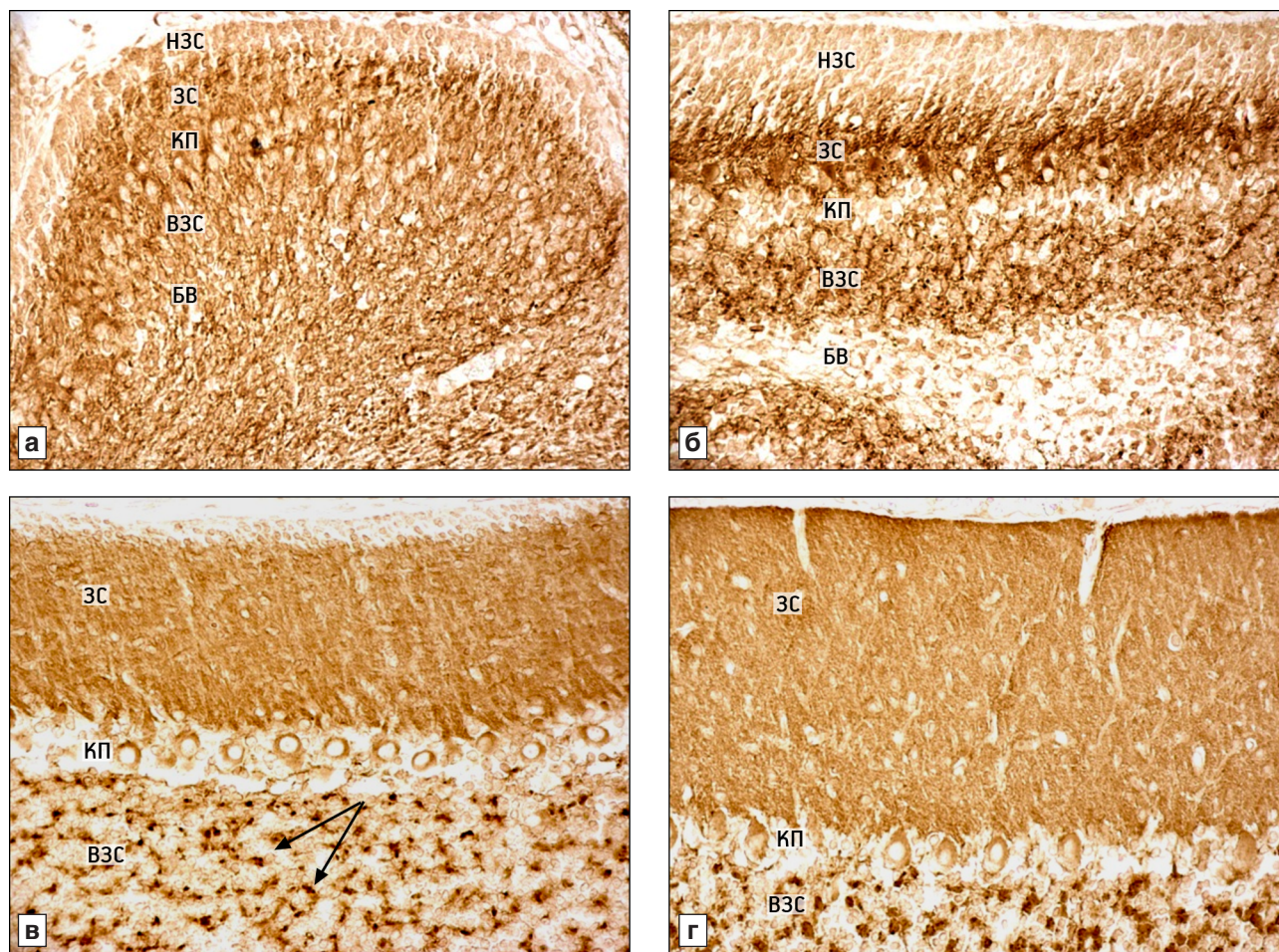


Рис. 1. Экспрессия синаптофизина (СФ) в древней части мозжечка у крыс на 2-е (а), 7-е (б), 15-е (в) и 45-е (г) сутки после рождения.

НЗС — наружный зернистый слой; ЗС — зона синаптогенеза в молекулярном слое; КП — клетки Пуркинье; ВЗС — внутренний зернистый слой; БВ — белое вещество; стрелки — клубочки мозжечка. Иммуногистохимическая реакция на СФ. Ув. 200

нистость. Иммунореактивность СФ выявляется и в цитоплазме КП: на 2-е сутки она слабая, резко возрастает, достигая максимума на 7-е сутки, а затем постепенно уменьшается. При этом перикарионы КП хорошо выделяются на фоне светлого нейропиля со слабой иммунореактивностью (см. рис. 1, в, г).

В формирующемся ВЗС на 2-е сутки постнатального онтогенеза у крыс иммунореактивность СФ слабая и проявляется мелкой зернистостью, не отличающейся от таковой в белом веществе. На 7-е сутки среди зернистых нейронов равномерно располагаются преимущественно мелкие СФ-иммунопозитивные точки — по-видимому, терминали моховидных волокон, являющихся основой для формирования будущих клубочков мозжечка (см. рис. 2, б). На 15-е сутки равномерно среди зернистых клеток определяются СФ-иммунопозитивные мелкие и среднего размера формирующиеся клубочки мозжечка (см. рис. 2, в). К 45-м суткам число крупных СФ-позитивных клубочков с очень высокой иммунореактивно-

стью возрастает, а мелких — уменьшается (см. рис. 1, в; табл. 2). При этом общее количество (плотность расположения) клубочков во ВЗС не меняется (см. табл. 2).

В промежуточном ядре мозжечка на 2-е сутки после рождения на перикарионах нейронов наблюдаются лишь единичные СФ-иммунопозитивные точки — аксосоматические синапсы. Преобладают нейроны с малым количеством аксосоматических синапсов, нейроны с плотно расположенными синапсами единичны. В нейропиле равномерно расположены многочисленные мелкие аксо-дендритные синапсы. На 7–45-е сутки вокруг перикарионов некоторых нейронов образуются темные ободки из плотно расположенных аксосоматических синапсов (см. рис. 2). В промежутке между 7-ми и 4-ми сутками в нейропиле размеры аксо-дендритных синапсов увеличиваются, и они начинают располагаться неравномерно, образуя скопления (см. рис. 2). При этом общая иммунореактивность нейропиля в промежуточном ядре мозжечка в динамике постнатального онтогенеза

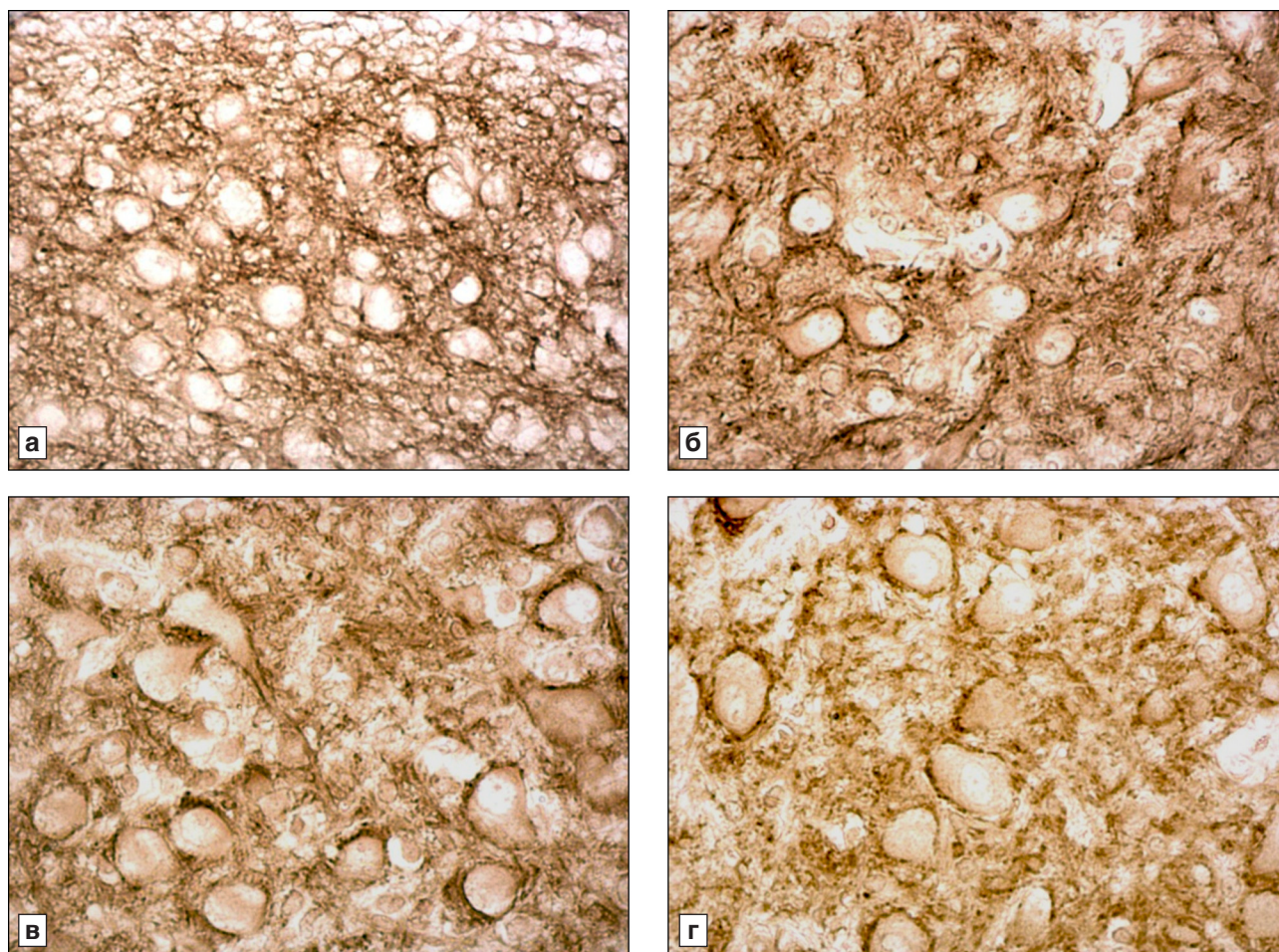


Рис. 2. Синапсы на телах и дендритах нейронов промежуточного ядра мозжечка на 2-е (а), 7-е (б), 15-е (в) и 45-е (г) сутки после рождения.

Иммуногистохимическая реакция на синаптофизин. Ув. 400

Таблица 1

Характеристика зоны синаптогенеза в молекулярном слое коры древней и новой части мозжечка у крыс в постнатальном онтогенезе ($M \pm IQR$)

Исследованный показатель	Возраст крысят, сутки	Древняя часть мозжечка	Новая часть мозжечка
Ширина зоны, мкм	7-е	29,22±8,45	24,19±5,64
	15-е	81,99±12,03*	78,03±13,01*
	45-е	170,47±17,83*	146,56±20,48*
Иммунореактивность, ед. опт. плотн.	7-е	0,29±0,02	0,32±0,04
	15-е	0,25±0,05*	0,23±0,02*
	45-е	0,22±0,03*	0,23±0,02*

* Различия значимы по сравнению с показателями у 7-суточных крысят.

не меняется (табл. 3). Иммунореактивность СФ в цитоплазме нейронов этого ядра умеренная, однородная и не меняется на протяжении всех сроков наблюдения (см. рис. 2).

В белом веществе мозжечка СФ-иммунореактивность выявляется на 2-е и меньше на 7-е сутки постнатального развития, что особенно отчетливо видно в Crus I на 7-е сутки после рождения. В дальнейшем она исчезает.

Обсуждение полученных данных. Отсутствие иммунореактивности СФ в наружных рядах НЗС на 2–15-е сутки после рождения свидетельствует об экспрессии этого гликопротеина в цитоплазме и отсутствии нервных терминалей в зоне пролиферации предшественников зернистых нейронов. Однако иммунореактивность выявляется в цитоплазме премиграторных и мигрирующих предшественников зернистых нейронов. Это под-

Таблица 2

Количество клубочков мозжечка во внутреннем зернистом слое мозжечка ($Me \pm IQR$ на 1 мм² среза)

Возраст крысят, сутки	Клубочки мозжечка	Древняя часть мозжечка	Новая часть мозжечка
15-е	Крупные	121,84±97,97	124,65±77,29
	Среднего размера	2193,16±1411,22	2476,98±2278,41
	Мелкие	785,60±1137,94	1227,77±1000,18
	Общее количество	3568,80±733,23	3757,72±896,52
45-е	Крупные	472,38±11,32*	434,39±30,84*
	Среднего размера	2909,60±305,09	3185,52±893,87
	Мелкие	356,66±88,31*	732,23±226,61*
	Общее количество	3715,36±206,42	4394,87±515,69

* Различия значимы по сравнению с показателями у 15-суточных крысят при $P < 0,05$.

Таблица 3

Экспрессия синаптофизина (СФ) в нейропиле промежуточного ядра мозжечка крыс в постнатальном онтогенезе ($Me \pm IQR$, ед. опт. плотн.)

Возраст крысят, сутки	Экспрессия СФ
2-е	0,22±0,03
7-е	0,23±0,03
15-е	0,22±0,01
45-е	0,21±0,04

тверждается тем, что в нейронах НЗС, находящихся в премиграторной зоне, СФ локализуется в транслатеральных цистернах комплекса Гольджи и возле него в синаптически-подобных пузырьках и сохраняется в этих же нейронах, мигрирующих через молекулярный слой [9].

В нашем исследовании при иммуногистохимической реакции на СФ окрашивание было выявлено на 2-е сутки постнатального онтогенеза вокруг перикарионов КП и в формирующемся молекулярном слое. В литературе описано, что при электронно-микроскопическом исследовании первые синапсы в молекулярном слое наблюдаются уже на 19-е сутки внутриутробного развития [15]. Возможно, это окончания моховидных волокон на КП, входящих в мозжечок еще до рождения. Контакты с ними являются временными, когда зернистый слой созревает, моховидные волокна вытесняются с КП и устанавливают синапсы с дендритами зернистых нейронов [12].

Увеличение ширины зоны синаптогенеза и уменьшение в ней СФ-иммунореактивности с 7-х по 45-е сутки после рождения, по-видимому, связано с ростом дендритного древа КП. Уменьшение количества СФ-иммунопозитивных синапсов вокруг перикарионов КП с 7-х по 15-е сутки может быть обусловлено элиминацией избыточной иннервации лазающими волокнами и формированием ими синапсов с дендритами КП.

В ВЗС на 2–7-е сутки постнатального онтогенеза мелкозернистая СФ-иммунореактивность, вероятно, обусловлена колбами роста и терминалями моховидных волокон, а на 15–45-е сутки формирующимися клубочками мозжечка [2], которые выглядят как более крупные участки высокой СФ-иммунореактивности.

Увеличение количества СФ-позитивных синапсов на перикарионах нейронов промежуточного ядра мозжечка в постнатальном онтогенезе очевидно связано с формированием терминалей эфферентных волокон, идущих от КП, и по срокам соответствует данным литературы [7]. Кроме того, на нейронах ядер мозжечка заканчиваются коллатерали моховидных и лазающих волокон, а также многослойные (нейромодулирующие) волокна. К последним относятся: серотонинергические (формируются постнатально), норадренергические (проникают в мозжечок на 17-е сутки внутриутробного развития), а также холинэргические, дофаминэргические и гистаминэргические [12]. При этом, по нашим данным, общая экспрессия СФ в нейропиле промежуточного ядра мозжечка у крыс в постнатальном онтогенезе не меняется, что связано с укрупнением синапсов и уменьшением их числа (плотности расположения).

Выявленная иммунореактивность СФ в белом веществе на 2–7-е сутки после рождения, вероятно, обусловлена конусами роста развивающихся афферентных волокон. Известно, что синаптические пузырьки образуются в телах нейронов, транспортируются по растущим аксонам и накапливаются в конусах роста ещё до начала синаптогенеза [9]. Это объясняет присутствие умеренной СФ-иммунореактивности и в цитоплазме перикарионов, но не в ядрах нейронов мозжечка (КП, зернистые нейроны, нейроны ядер).

Таким образом, иммуногистохимическое исследование динамики экспрессии СФ является эффективным способом оценки синаптогенеза

в мозжечке в раннем постнатальном периоде онтогенеза. Этот подход может быть использован и при изучении влияния на этот процесс различных экспериментальных воздействий и патологических состояний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гилерович Е.Г., Григорьев И.П., Кирик О.В. и др. Выявление клубочков в мозжечке человека при помощи иммуноцитохимической реакции на синаптофизин и конфокальной лазерной микроскопии // *Морфология*. 2014. Т. 146, вып. 5. С. 73–77.
2. Дьячкова Л.Н., Хамори И. Формирование гломерул мозжечка крыс в онтогенезе // *Арх. анат.* 1967, Т. 52, вып. 2. С. 30–39.
3. Колос Е.А., Григорьев И.П., Коржевский Д.Э. Маркер синаптических контактов — синаптофизин // *Морфология*. 2015. Т. 147, вып. 1. С. 78–82.
4. Оленев С.Н. Развивающийся мозг. Л.: Наука, 1978.
5. Andjus P.R., Zhu L., Cesa R. et al. A change in the pattern of activity affects the developmental regression of the Purkinje cell polyinnervation by climbing fibers in the rat cerebellum // *Neuroscience*. 2003. Vol. 121, № 3. P. 563–572.
6. Becher A., Drenckhahn A., Pahner I. et al. The synaptophysin — synaptobrevin complex: a hallmark of synaptic vesicle maturation // *J. Neurosci.* 1999. Vol. 19, № 6. P. 1922–1931.
7. Eisenman L.M., Schalekamp M.P., Voogd J. Development of the cerebellar cortical efferent projection: an in-vitro anterograde tracing study in rat brain slices // *Brain. Res. Dev.* 1991. Vol. 60, № 2. P. 261–266.
8. Eshkind L.G., Leube R.E. Mice lacking synaptophysin reproduce and form typical synaptic vesicles // *Cell Tissue Res.* 1995. Vol. 282, № 3. P. 423–433.
9. Fujita M., Kadota T., Sato T. Developmental profiles of synaptophysin in granule cells of rat cerebellum: an immunohistochemical study // *J. Electron. Microsc.* (Tokyo). 1996. Vol. 45, № 3. P. 185–194.
10. Kwon S.E., Chapman E.R. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons // *Neuron*. 2011. Vol. 70, № 5. P. 847–854.
11. Leclerc N., Beesley P.W., Brown I. et al. Synaptophysin expression during synaptogenesis in the rat cerebellar cortex // *J. Comp. Neurol.* 1989. Vol. 280, № 2. P. 197–212.
12. Paxinos G. *The Rat Nervous System*. 3rd Edition. Sydney: Australia, Academic Press, 2004.
13. Paxinos G., Watson C. *The rat brain in Stereotaxic Coordinates*. 7th Edition. San Diego: Academic Press, 2013.
14. Pouzat C., Hestrin S. Developmental regulation of basket/stellate cells — Purkinje cell synapses in the cerebellum // *J. Neurosci.* 1997. Vol. 17, № 23. P. 9104–9112.
15. West M.J., del Cerro M. Early formation of synapses in the molecular layer of the fetal rat cerebellum // *J. Comp. Neurol.* 1976. Vol. 165, № 2. P. 137–153.

Поступила в редакцию 01.04.2016

S.M.Zimatkin, O.A.Karniushko

THE SYNAPTOGENESIS IN THE DEVELOPING CEREBELLUM OF THE RAT

The aim of this study — qualitative and quantitative evaluation of synaptogenesis in the developing cerebellum of the rat (postnatal Days 2–45) using immunohistochemical detection of synaptophysin (SYP) as the marker. The expression of SYP was demonstrated in postmitotic neurons of the external granular layer and migrating precursors of granular neurons of the cerebellum. During the whole period studied, an increase in the width of the zone of synaptogenesis in the molecular layer took place together with the decrease of SYP-immunoreactivity. The reduction in the number of SYP-immunopositive synapses was noted around Purkinje cell perikarya from Day 7 till Day 15. In the internal granular layer, SYP-immunopositive dots were observed that increased in size from Day 2 to Day 45 due to the formation of cerebellar glomeruli. In the cerebellar interposed nucleus, the number and sizes of axosomatic synapses around neuronal perikarya were found to increase during the whole period examined. In the neuropil, the uneven aggregates of SYP-immunopositive axodendritic synapses were observed.

Key words: *cerebellum, development, synaptogenesis, synaptophysin*

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