

И. П. Григорьев¹, О. С. Алексеева^{1, 2}, О. В. Кирик¹,
Д. А. Суфиева¹, Д. Э. Коржевский¹

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ НЕЙРОФИЛАМЕНТОВ В ПОЯСНОЙ КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ

¹ Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (зав. — д-р мед. наук Д. Э. Коржевский), ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург;

² лаборатория сравнительной физиологии дыхания (зав. — чл.-кор. РАН А. И. Кривченко), ФГБНУ «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова» РАН, Санкт-Петербург

Цель — иммуногистохимическое исследование особенностей распределения низкомолекулярных белков нейрофиламентов (НФ) в поясной коре и прилежащих областях переднего мозга крысы.

Материал и методы. На половозрелых крысах-самцах линии Вистар (7 особей) иммуногистохимически исследовали распределение низкомолекулярных белков НФ в поясной коре и прилежащих областях переднего мозга с использованием моноклональных антител, специфических для НФ с молекулярной массой 70 килодальтон (клон 2F11).

Результаты. Установлено, что низкомолекулярные белки НФ распределены в головном мозгу неравномерно с максимальной экспрессией в проводящих путях поясной извилины и белом веществе двигательной, соматосенсорной и инсुлярной коры. Интенсивная 2F11-иммунореактивность наблюдалась в дорсальной (но не вентральной) части мозолистого тела, что указывает на отличие аксонов в вентральной части мозолистого тела от нервных волокон других проводящих путей по содержанию низкомолекулярных белков НФ. Из областей серого вещества переднего мозга наиболее интенсивная 2F11-иммунореактивность наблюдалась в поясной и ретроспленальной коре, где она имела четко выраженный ламинарный характер: два слоя интенсивной экспрессии белков НФ перемежались более слабо окрашенными слоями. Ламинарность распределения НФ не наблюдалась в соседней вторичной двигательной коре, которая была окрашена также интенсивно, как поясная и ретроспленальная, но гомогенно. В более латеральных отделах неокортекса НФ-иммунореактивность — очень слабая.

Выводы. Проведенное исследование выявило ламинарное распределение НФ-содержащих нервных проводников в поясной и ретроспленальной коре, а также неоднородное их распределение в мозолистом теле, и показало пригодность применения антител к низкомолекулярным белкам НФ (клон 2F11) для эффективного маркирования нервных волокон в нейроанатомических исследованиях и анализе миелоархитектоники головного мозга.

Ключевые слова: поясная кора, ретроспленальная кора, мозолистое тело, нейрофиламенты, иммуногистохимия

Одной из структур головного мозга человека, изучение которой в последнее время вызывает пристальный интерес специалистов в области нейрочислительных исследований, является кора поясной извилины (цингулярная кора), расположенная на медиальной поверхности головного мозга между мозолистым телом и поясной бороздой [16]. Данная область мозга является составной частью лимбической системы и получает афферентные сигналы от передней группы ядер таламуса. Афферентные сигналы из цингулярной коры идут в парагиппокампальную извилину и далее в гиппокамп. Кроме того, цингулярная кора имеет многочисленные двусто-

ронные связи с лобной, теменной и затылочной корой полушарий большого мозга.

В цитоархитектоническом отношении цингулярная кора довольно неоднородна. По классификации К. Бродмана [8], в ней различают семь полей. Но в связи с тем, что точные границы между полями практически невозможно визуально различить на томограммах, в последнее время в цингулярной коре выделяют только три крупных отдела: переднюю (поля 24 и 33), заднюю (поля 23 и 31) и ретроспленальную (поля 26, 29 и 30) кору. Иногда в задней цингулярной коре дополнительно выделяют вентральную (поле 23) и дорсальную (поле 31) части [2].

Сведения об авторах:

Григорьев Игорь Павлович, Алексеева Ольга Сергеевна, Кирик Ольга Викторовна, Суфиева Дина Азатовна, Коржевский Дмитрий Эдуардович (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12

Поясная кора принимает участие в осуществлении важнейших реакций организма, включающих регуляцию вегетативных и эндокринных функций, локомоции, ноцицепции, обработку поступающей извне информации, оценку эмоций, а также — в реализации когнитивных функций, таких как ожидание награды, принятие решений, эмпатии. Вследствие этого она играет важнейшую роль в социальных взаимоотношениях и при психопатологических состояниях, в первую очередь, при депрессии и шизофрении [2, 9–10, 13].

Исследование структурных особенностей нейронов и их отростков в этой области мозга в норме является важной задачей для оценки влияния их изменения при патологии на когнитивные и психические нарушения функций мозга. Для оценки состояния нервных проводников существуют небольшое количество маркеров, оптимальные среди них — белки нейрофиламентов, присутствующие преимущественно в отростках нервных клеток. Нейрофиламенты (НФ) — один из видов промежуточных филаментов, внутриклеточных компонентов цитоскелета, специфичных для нейронов. Они необходимы для поддержания сложной формы нервной клетки и ее отростков и обеспечения медленного аксонального транспорта. Среди белков НФ выделяют три группы, различающиеся по молекулярной массе: низкомолекулярные с молекулярной массой 68–73 килодальтон, белки промежуточной массы — 140–160 и высокомолекулярные — 195–200 килодальтон [3].

Иммуногистохимическая реакция на НФ широко используется в нейрогистологических исследованиях [5, 11–12, 14–15].

Цель настоящего исследования — изучение особенностей распределения низкомолекулярных белков НФ в поясной коре и прилежащих к ней отделах переднего мозга крысы с использованием моноклональных антител, специфических для НФ с молекулярной массой 70 килодальтон, и оценка возможности использования этой методики для исследования особенностей организации миеоархитектоники в коре и других структурах мозга.

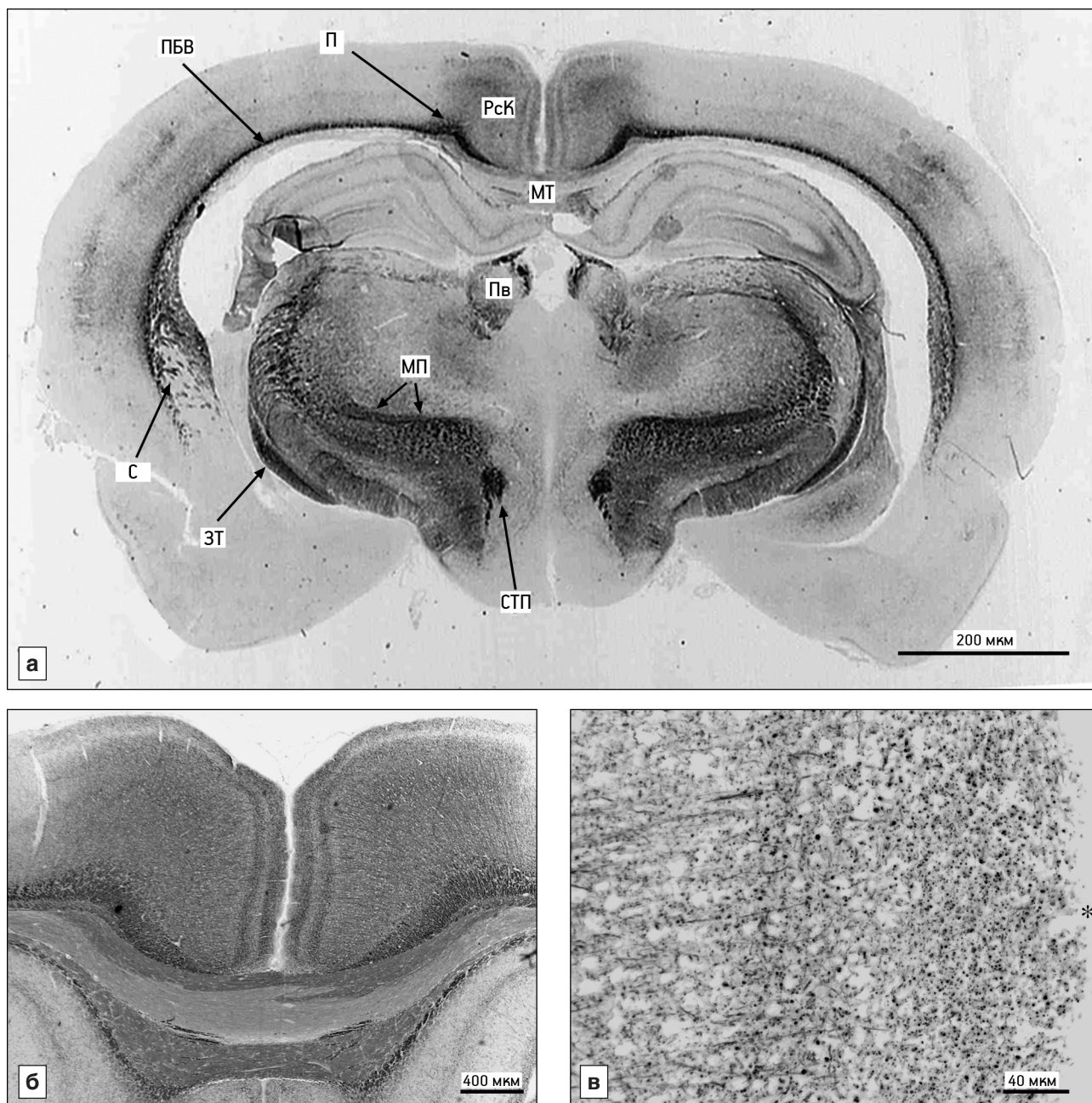
Материал и методы. В работе использован головной мозг половозрелых (5–6 мес) крыс-самцов линии Вистар (7 особей). При содержании животных и выведении их из эксперимента руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.), Хельсинкской декларацией 1975 г. и ее пересмотренным вариантом 2000 г. План проведения работ утвержден и одоб-

рен на заседании локального этического комитета ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 2 от 13.11.2015 г.). Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [4], обезжизняли и заливали в парафин по общепринятой методике. Готовили срезы толщиной 5 мкм. После стандартной процедуры депарафинирования и регидратации проводили тепловое демаскирование антигена в модифицированном цитратном буфере S1700 (Dako, Дания). Локализацию низкомолекулярных белков НФ определяли с помощью мышиных моноклональных антител к НФ человека (клон 2F11, разведение 1:300, номер по каталогу M 0762, Dako, Дания). Для выявления комплекса антиген—антитело для световой микроскопии применяли вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой, из набора MACH2 Universal HRP polymer (Biacare Medical, США). Для визуализации продукта иммуноцитохимической реакции при световой микроскопии использовали хромоген DAB+ (Dako, Дания). После проведения реакции часть срезов подкрашивали квасцовым гематоксилином. Препараты исследовали под микроскопом Leica DM750 (Leica, Германия), фотосъемку выполняли с помощью фотокамеры ICC50 (Leica, Германия). Препараты срезов мозга сканировали с помощью сканера Epson Perfection V500 Photo (Epson, Япония). Локализацию областей мозга определяли по стереотаксическому атласу [16].

Результаты исследования. Иммуноцитохимическое выявление низкомолекулярных белков НФ в поясной коре и прилежащих к ней отделах переднего мозга крысы показало её неравномерное распределение (*рисунок, а*).

Очень высокая интенсивность окрашивания на НФ обнаруживается в поясной коре и белом веществе двигательной, соматосенсорной и инсулярной коры. В гиппокампе также наблюдается выраженная неоднородность окрашивания. Наибольшая интенсивность окраски на НФ наблюдалась в бахромке (фимбрии) гиппокампа, наименьшая — в медиальной части зоны CA1, в латеральной части зоны CA2 и stratum lucidum hippocampus. Лишь интенсивность окраски в фимбрии сопоставима с таковой в близлежащей поясной извилине, в остальных областях гиппокампа она значительно слабее.

В большинстве зон коры большого мозга окраска слабая, а в инсулярной и пириформной коре практически отсутствует. В соматосенсорной коре можно заметить слабую или умеренную НФ-иммунореактивность, в частности в IV слое соматосенсорной коры. Наиболее интенсивная среди корковых областей НФ-иммунореактивность наблюдается в поясной, ретроспленальной и вторичной двигательной коре. НФ-иммунореактивность была чётко ограничена данной областью неокортекса, резко ослабевая в более латеральных зонах (см. *рисунок, б*). При этом экспрессия НФ в цингулярной



Фронтальный срез головного мозга крысы.

а — сканированный срез; б — кора мозга крысы в области поясной извилины (ретросплениальная и вторичная двигательная кора); в — участок коры мозга крысы в области поясной извилины. Звездочка — межполушарная борозда. П — пояс; МТ — мозолистое тело; С — стриатум; Пв — поводок; МП — медиальная петля; СТП — сосцевидно-таламический пучок; ЗТ — зрительный тракт; РсК — ретросплениальная кора; ПБВ — подкорковое белое вещество. Иммуногистохимическая реакция на низкомолекулярные нейрофиламенты (клон 2F11)

и ретросплениальной коре имела чёткое послойное распределение в верхних слоях: интенсивная окраска в поверхностной части I слоя сменялась слабой иммуноокраской в подлежащей части слоя I, слой II прокрашивался интенсивно, а слой III — слабо. Более глубокие слои имели относительно гомогенное и достаточно сильное окрашивание, хотя и слабее по сравнению с ярко

окрашенными полосами в слоях I и II. При большем увеличении в ретросплениальной коре выявлялось большое число волокон, иммунопозитивных к белкам НФ. НФ-иммунопозитивных клеточных тел не наблюдалось. В области поясной коры волокна шли ростро-каудально, а в прилегающих зонах — расходились радиально. Отростки клеток радиально пересекали все слои коры (см.

рисунок, в). В слое I коры около поверхности радиальные отростки имели большую степень ветвления и были разнонаправлены. В мозолистом теле под цингулярной корой выявлялись два слоя НФ-иммунопозитивных структур: тонкий дорсальный слой с очень интенсивной окраской и слабо окрашенный вентральный слой. Также очень интенсивной окраской отличалась область пояса, подлежащая под цингулярной корой.

Обсуждение полученных данных. Низкомолекулярные белки НФ, выявляемые с помощью иммуногистохимии (антитела клон 2F11), экспрессируются в головном мозгу крысы с выраженной неравномерностью. Наиболее интенсивно окрашиваются на НФ проводящие пути: пояс, узкая дорсальная полоска мозолистого тела, белое вещество двигательной, соматосенсорной и инсулярной коры и *stratum lucidum hippocampi* — слой мшистых волокон, идущих от зернистых клеток зубчатой извилины.

Резко контрастирует с интенсивной окраской вышеперечисленных проводящих путей бо́льшая (вентральная) часть мозолистого тела, практически полностью лишённая окраски на НФ. При иммуногистохимическом выявлении белка в микротрубочках альфа-тубулина, характерного для нервных волокон, мозолистое тело не отличалось от других проводящих путей по степени его экспрессии [1].

Среди участков серого вещества головного мозга высоким содержанием низкомолекулярных белков НФ выделялись цингулярная и ретроспленальная кора. Причём локализация данных белков имела чётко выраженный ламинарный характер: наблюдались два слоя интенсивной экспрессии белков НФ, которые перемежались с более слабо окрашенными слоями. Интересно, что поверхностные полосы интенсивной и слабой окраски в цингулярной и ретроспленальной коре приходятся на слой I, что подтверждает данные о его сложной ультраструктуре [7]. При этом ламинарность распределения НФ наблюдается только в цингулярной и ретроспленальной коре, но не во вторичной двигательной коре, которая окрашена также интенсивно, но гомогенно. В более латеральных отделах неокортекса, где НФ-иммунореактивность очень слабая, выделяются отдельные корковые слои с несколько более выраженной иммуноокраской, интенсивность которой варьирует в разных зонах коры. В частности, в первичной соматосенсорной коре слой IV

выделяется чётко локализованной, умеренной по интенсивности НФ-иммунореактивностью.

Ранее при иммуногистохимическом исследовании белка в микротрубочках альфа-тубулина нами также наблюдалась ламинарность распределения данного белка в коре большого мозга крысы, причём интенсивность иммунореактивности на альфа-тубулин по слоям была однотипной во всех корковых областях [1]. В настоящем исследовании при использовании иммуногистохимической методики также можно было ожидать примерно одинаковой по интенсивности и однотипной послойной локализации низкомолекулярных белков НФ в цингулярной и других отделах коры мозга. Однако распределение НФ в коре оказалось крайне неравномерным: интенсивная экспрессия данных белков наблюдалась в поясной, ретроспленальной и вторичной двигательной коре, тогда как в других корковых зонах она была значительно слабее или практически отсутствовала. В то же время, ламинарность распределения низкомолекулярных белков в НФ отмечалась как в области поясной извилины, так и в других корковых зонах (кроме вторичной двигательной коры), хотя там интенсивность НФ-иммуноокрашивания была значительно слабее. Это наблюдение указывает на то, что послойный характер распределения проводящих волокон в коре мозга выявляется с помощью низкомолекулярных белков НФ не хуже, чем с помощью альфа-тубулина или других белков-маркеров нервных волокон [6], но позволяет выявить различие проводящих волокон в разных (в том числе соседних) областях коры по количеству содержащихся в них низкомолекулярных белков НФ. Наиболее богаты низкомолекулярными белками НФ нервные проводники поясной, ретроспленальной и вторичной двигательной коры. Учитывая этот обнаруженный факт, можно предположить, что дорсальная часть мозолистого тела, интенсивно экспрессирующая НФ, содержит именно каллозальные аксоны цингулярной, ретроспленальной и вторичной двигательной коры.

Проведённое исследование показало пригодность использования антител к низкомолекулярным белкам НФ (клон 2F11) в качестве эффективного маркера нервных волокон для нейроанатомических исследований и анализа миелоархитектоники головного мозга. Этот маркер не только выявляет нервные проводники, но позволяет обнаружить их химическую гетерогенность по наличию и концентрации низкомолекулярных белков НФ. Настоящее исследование показало, что нерв-

ные волокна в коре мозга значительно различаются по содержанию низкомолекулярных белков НФ в зависимости от области коры, а волокна с максимальным количеством низкомолекулярных белков НФ локализованы в поясной, ретроспленальной и вторичной двигательной коре. Есть основания предполагать, что они организуют каллозальные проекции в наиболее дорсальной полоске мозолистого тела.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: Д. Э. К.

Сбор и обработка материала: Д. А. С., О. В. К., О. С. А.

Анализ и интерпретация данных: Д. Э. К., О. С. А., И. П. Г.

Написание текста: О. С. А., И. П. Г.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Григорьев И.П., Шкляева М.А., Кирик О.В., Гилерович Е.Г., Коржевский Д.Э. Распределение альфа-тубулина в структурах переднего мозга крысы // *Морфология*. 2013. Т. 143, вып. 1. С. 7–10 [Grigor'ev I.P., Shklyayeva M.A., Kirik O.V., Gilerovich E.G., Korzhevskii D.E. Distribution of alpha-tubulin in rat forebrain structures // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2013. Vol. 44, № 1. P. 1–4]. doi: 10.1007/s11055-013-9864-3.
- Козловский С.А., Величковский Б.Б., Вартанов А.В., Никонова Е.Ю., Величковский Б.М. Роль областей цингулярной коры в функционировании памяти человека // *Экспериментальная психология*. 2012. Т. 5, № 1. С. 12–22 [Kozlovsky S.A., Velichkovsky B.B., Vartanov A.V., Nikonova E. Yu., Velichkovsky B.M. The role of the domains of the anterior cingulate cortex in the functioning of human memory // *Experimental'naya psichologiya*. 2012. Vol. 5, № 1. P. 12–22. In Russ.].
- Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Петрова Е.С., Карпенко М.Н., Григорьев И.П., Сухорукова Е.Г., Колос Е.А., Гиляров А.В. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии (2-е издание, исправленное и дополненное) / Под ред. Д.Э. Коржевского. СПб., 2014 [Korzhevskii D.E., Kirik O.V., Petrova E.S., Karpenko M.N., Grigorev I.P., Sukhorukova E.G., Kolos E.A., Gilyarov A.V. Theoretical bases and practical application of methods of immunohistochemistry, 2nd edition / Korzhevskii D.E., editor. St. Petersburg., 2014. In Russ.].
- Коржевский Д.Э., Сухорукова Е.Г., Гилерович Е.Г., Петрова Е.С., Кирик О.В., Григорьев И.П. Преимущества и недостатки цинк-этанол-формальдегида как фиксатора для иммуноцитохимических исследований и конфокальной лазерной микроскопии // *Морфология*. 2013. Т. 143, вып. 2. С. 81–85 [Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Gilerovich E.G., Petrova E.S., Kirik O.V., Grigor'ev I.P. Advantages and disadvantages of zinc-ethanol-formaldehyde as a fixative for immunocytochemical studies and confocal laser microscopy // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2014. Vol. 44, № 5. P. 542–545]. doi: 10.1007/s11055-014-9948-8.
- Логвинов А.К., Кириченко Е.Ю., Повилайтите П.Е., Сухов А.Г. Структурная организация баррельной коры мозга крысы (иммуногистохимическое исследование) // *Морфология*. 2010. Т. 137, вып. 1. С. 10–13 [Logvinov A.K., Kirichenko E. Yu., Povilaĩtite P. E., Sukhov A. G. Structural organization of the barrel cerebral cortex in rat (an immunohistochemical study) // *Morfologija*. 2010. Vol. 137, № 1. P. 10–13. In Russ.].
- Петрова Е.С., Павлова Н.В., Коржевский Д.Э. Современные морфологические подходы к изучению регенерации периферических нервных проводников // *Мед. Акад. Журн.* 2012. Т. 12, № 3. С. 15–29 [Petrova E.S., Pavlova N.V., Korzhevsky D.E. Advanced morphological approaches to the study of peripheral nerve regeneration // *Meditsinskii akademicheskii zhurnal*. 2012. Vol. 12, № 3. P. 15–29. In Russ.].
- Федосихина Л.А. Ультраструктурная характеристика первого слоя коры поясной области большого мозга крысы // *Арх. анат.* 1984. Т. 86, вып. 2. С. 22–28 [Fedosikhina L.A. Ultrastructure of layer 1 of the rat cingulate cortex // *Neurosci. Behav. Physiol.* 1986. Vol. 16, № 4. P. 340–345]. doi: 10.1007/BF01148178.
- Brodman K. Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde: in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues. Leipzig: Johann Ambrosius Barth Verlag, 1909.
- Devinsky O., Morrell M.J., Vogt B.A. Contributions of anterior cingulate cortex to behavior // *Brain*. 1995. Vol. 118, № 1. P. 279–306. doi: 10.1093/brain/118.1.279.
- Etkin A., Egner T., Kalisch R. Emotional processing in anterior cingulate and medial prefrontal cortex // *Trends Cogn. Sci.* 2011. Vol. 15, № 2. P. 85–93. doi: 10.1016/j.tics.2010.11.004.
- Fressinaud C., Jean I., Dubas F. Lesion mechanism dependent, differential changes in neurofilaments and microtubules: a pathological and experimental study // *Rev. Neurol. (Paris)*. 2005. Vol. 161, № 1. P. 55–60. Doi: RN-01-2005-161-1-0035-3787-101019-ART06.
- Gray E., Rice C., Nightingale H., Ginty M., Hares K., Kemp K., Cohen N., Love S., Scolding N., Wilkins A. Accumulation of cortical hyperphosphorylated neurofilaments as a marker of neurodegeneration in multiple sclerosis // *Mult. Scler.* 2013. Vol. 19, № 2. P. 153–161. doi: 10.1177/1352458512451661.
- Hamani C., Mayberg H., Stone S., Laxton A., Haber S., Lozano A.M. The subcallosal cingulate gyrus in the context of major depression // *Biol. Psychiatry*. 2011. Vol. 69, № 4. P. 301–308. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.09.034.
- Kobek M., Skowronek R., Jankowski Z., Pałasz A. Neurofilaments and traumatic brain injury // *Arch. Med. Sadowej. Kryminol.* 2014. Vol. 64, № 4. P. 268–279. doi: 10.5114/amsik.2014.50531.
- Lopez-Picon F.R., Uusi-Oukari M., Holopainen I.E. Differential expression and localization of the phosphorylated and nonphosphorylated neurofilaments during the early postnatal development of rat hippocampus // *Hippocampus*. 2003. Vol. 13, № 7. P. 767–779. doi: 10.1002/hipo.10122.
- Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th edition. San Diego: Acad. Press, 2007. 451 p.

Поступила в редакцию 09.11.2017

Получена после доработки 16.05.2018

DISTRIBUTION OF NEUROFILAMENT LIGHT CHAIN PROTEINS IN RAT BRAIN CINGULATE CORTEX

I. P. Grigoriyev¹, O. S. Alekseyeva^{1, 2}, O. V. Kirik¹,
D. A. Sufiyeva¹, D. E. Korzhevskiy¹

Objective: immunohistochemical study of the distribution of neurofilament (NF) light chain proteins in the cingulate cortex and adjacent areas of rat forebrain.

Material and methods. Distribution of NF light chain proteins in rat cingulate cortex and adjacent areas of the forebrain was studied immunohistochemically on adult male Wistar rats (7 animals) using monoclonal antibodies specific for 70 kDa NF (2F11 clone).

Results. NF light chain proteins were found to have irregular distribution in the brain with the maximal expression in the singular neural pathways and the white matter of motor, somatosensory, and insular cortex. Intense 2F11-immunoreactivity was observed in the dorsal (but not ventral) part of the corpus callosum, thus, indicating the difference between the axons of the ventral part of the corpus callosum and nerve fibers of other pathways in their content of NF light chain proteins. Among the brain grey matter areas, most pronounced 2F11-immunoreactivity was

found in the cingulate and retrosplenial cortex, where a distinct laminar pattern of immunoreactivity was observed with two layers of intensive expression of NF proteins alternating with much weaker stained layers. Laminar pattern of NF distribution was not found in the neighboring secondary motor cortex, which was immunostained as intensively as the cingulate and retrosplenial ones, but homogeneously. More lateral neocortical areas exhibited very low NF immunoreactivity.

Conclusions. The present study demonstrated a laminar pattern of NF-containing nerve fiber distribution in the cingulate and retrosplenial cortex as well as their irregular distribution in the corpus callosum and the effectiveness of antibodies to light chain proteins of neurofilaments (2F11 clone) for labeling the nerve fibers in neuroanatomical studies and analysis of brain myeloarchitectonics.

Key words: *cingulate cortex, retrosplenial cortex, corpus callosum, neurofilaments, immunohistochemistry*

¹ Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, Institute of Experimental Medicine, 12 Academician Pavlov Str., St. Petersburg 197376; ² Laboratory of Comparative Respiratory Physiology, I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, 44 Moris Torez Avenue, St. Petersburg 194223