

И. П. Григорьев, М. А. Шкляева, О. В. Кирик, Е. Г. Гилерович и Д. Э. Коржевский

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЬФА-ТУБУЛИНА В СТРУКТУРАХ ПЕРЕДНЕГО МОЗГА КРЫСЫ

Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (зав. — д-р мед. наук Д. Э. Коржевский), отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург

Иммуногистохимически исследовано распределение белка микротрубочек α -тубулина в структурах переднего мозга крысы. Обнаружена неравномерность окраски при реакции на α -тубулин. Высокая иммунореактивность выявлена в поясной и пириформной коре, обонятельных бугорках и перекресте зрительных нервов. Наиболее слабая иммуногистохимическая реакция отмечена в полосатом теле, поверхностных слоях перегородки, поясе и структурах вокруг III желудочка мозга. Иммунореактивность в нейронах была отчетливо выражена по периферии перикариона и в апикальном дендрите. Высказано предположение, что интенсивность иммуногистохимической реакции на α -тубулин может отражать уровень функционального состояния нейронов.

Ключевые слова: головной мозг, иммуногистохимия, α -тубулин

Микротрубочки, состоящие из молекул α - и β -тубулина, являются частью цитоскелета и определяют форму клетки, участвуют в процессах внутриклеточного транспорта, двигательной активности ресничек и жгутиков, клеточном делении [2, 6]. В нервной системе тубулин обнаружен в телах зрелых нейронов, их дендритах и аксонах [8], а также синаптической мембране и постсинаптическом уплотнении [5, 9]. Имеются сведения о его участии в аксоплазматическом транспорте, росте аксонов и синаптогенезе [8]. Тубулин микротрубочек играет важную роль в миграции нейронов вдоль отростков радиальных глиоцитов [15], а генетические нарушения синтеза тубулина приводят к тяжёлым нарушениям развития мозга [14].

В последние годы исследуются возможности фармакологического воздействия на тубулин для подавления неконтролируемого клеточного деления и стимуляции регенерации повреждённых аксонов [7, 12]. Несмотря на интенсивное изучение тубулинов, имеются лишь отрывочные данные о распределении α -тубулина в структурах головного мозга. Цель настоящей работы — иммуногистохимическое исследование распределения α -тубулина в переднем мозгу крысы.

Материал и методы. В работе использованы половозрелые крысы-самцы линии Вистар ($n=8$). Содержание животных и все экспериментальные манипуляции осуществляли с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от

12.08.1977 г. МЗ СССР). Головной мозг крыс фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [1]. Серийные фронтальные срезы мозга толщиной 5 мкм изготавливали на ротационном микротоме Leica RM2125RT (Leica, Германия).

Для иммуногистохимического выявления белка α -тубулина были использованы мышиные моноклональные антитела (клон DM-1A, разведение 1:100, BioGenex, США). В качестве вторичных реагентов использовали набор EnVision+ System Labelled Polymer-HRP Anti-Mouse (Dako, Дания). После постановки иммуногистохимических реакций часть срезов докрашивали гематоксилином.

Анализ и фотографирование гистологических препаратов проводили с помощью микроскопа Leica DM750 (Германия) и фотокамеры ICC50, а также программы обработки изображений LAS EZ (Leica, Германия). Структуры мозга идентифицировали по атласу [13].

Результаты исследования. На препаратах головного мозга крысы при малом увеличении наблюдается дифференциальная иммунохимическая реакция на α -тубулин. Наибольшая интенсивность окраски отмечается вблизи поверхности мозга — в I слое неокортекса. Выделяется яркой реакцией поясная кора (особенно I слой и глубокие слои на границе с поясом, но не с мозолистым телом), пириформная кора, обонятельные бугорки и перекрест зрительных нервов. Окрашивание средней интенсивности наблюдается в IV–V слоях двигательной, первичной и вторичной соматосенсорной коры, вплоть до инсулярной коры, а также в VI слое двигательной и частично прилегающей к ней первичной соматосенсорной коры, мозолистом теле, ядре ложа конечной полоски, особенно его медиальной части, интерстициальном ядре

Сведения об авторах:

Григорьев Игорь Павлович (e-mail: ipg-iem@yandex.ru), Шкляева Маргарита Александровна (e-mail: margarita.shklyeva@student.spb.ru), Кирик Ольга Викторовна (e-mail: olga_kirik@mail.ru), Гилерович Елена Георгиевна (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), Коржевский Дмитрий Эдуардович (e-mail: dek2@yandex.ru), лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

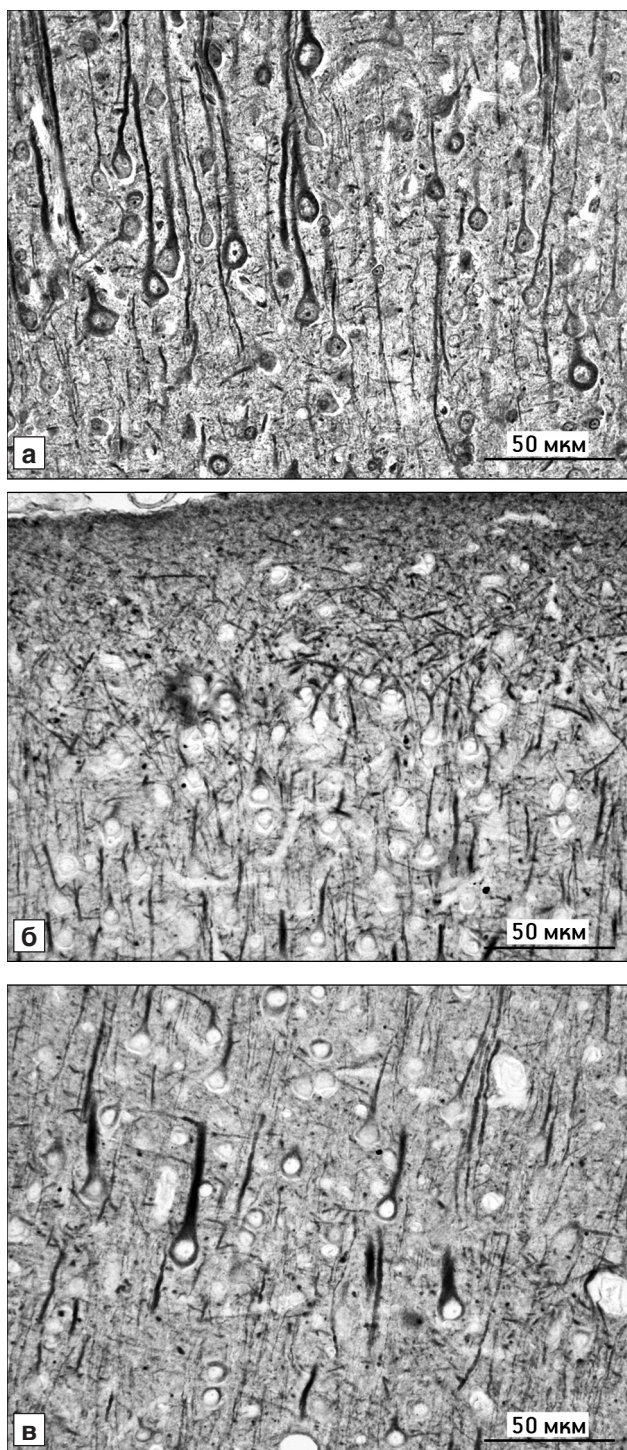


Рис. 1. Кора головного мозга крысы.

а — поясная кора; б, в — двигательная кора (поверхностные и глубокие слои соответственно). Иммуногистохимическая реакция на α -тубулин. а — докраска гематоксилином; б, в — без докраски

концевой пластинки передней спайки и медиальной части перегородки (промежуточная часть латерального ядра перегородки, перегородочно-бахромчатое ядро). Наиболее слабая иммуногистохимическая реакция отмечается в полосатом теле, поверхностных слоях перегородки, поясе и

структурах, расположенных вокруг III желудочка мозга.

При большом увеличении в неокортексе выявляются многочисленные α -тубулин-иммунореактивные клетки с интенсивным прокрашиванием периферии клеточного тела, контурирующей клетку, при отсутствии окраски ядра и перинуклеарной области. Выделяются своей интенсивной окраской гигантские пирамидные нейроны V слоя (рис. 1). Особенно много ярко окрашенных пирамидных нейронов в поясной коре.

Апикальные дендриты, направленные к поверхности коры, ярко окрашены по всей длине (рис. 2). Доходя до I слоя, они образуют интенсивно окрашенное скопление волокон, идущих вдоль всей поверхности неокортекса — от цингулярной до инсुлярной коры. Интенсивная реакция на α -тубулин в волокнах контрастирует с ее отсутствием в клетках I слоя, а также слабой окраской нейронов II и III слоёв, от которых отходят интенсивно окрашенные апикальные дендриты.

Тангенциально идущие окрашенные отростки расположены также в VI слое неокортекса, причём нередко встречаются пирамидные нейроны с хорошо различающимися боковыми дендритами.

В хвостатом ядре (nucleus caudatus/putamen) выделяются скопления иммунореактивных волокон, окружённые слабоокрашенным нейропилем (см. рис. 2, а). В латеральной, а также дорсомедиальной (субвентрикулярной) части хвостатого ядра нейропиль окрашен интенсивнее, чем в вентромедиальной. Группы α -тубулин-иммунореактивных нейронов встречаются во всём хвостатом ядре, чаще — в центральной его части, в базально-медиальной (субвентрикулярной) и латеральной, прилежащей к субкортикальному белому веществу. Они представляют собой мелкие и среднего размера нейроны с окрашенным перикарионем и отростками и иммунонегативным ядром (см. рис. 2, б).

Полость латерального желудочка окаймлена интенсивно окрашенной бахромой (рис. 3), которая, по-видимому, представляет собой слой ресничек эпендимных клеток. Однако цитоплазма эпендимоцитов не дает реакции на α -тубулин. Также отсутствует реакция на α -тубулин в сосудистом сплетении желудочков мозга и элементах оболочек мозга. Эндотелий сосудов во всех исследованных структурах мозга не дает реакции. Непосредственно под эпендимой латеральной стенки бокового желудочка присутствуют иммунопозитивные мелкие клетки, не имеющие морфологических признаков нейронов.

Обсуждение полученных данных. α -тубулин — основной компонент микротрубочек, которые образуют цитоскелет и определяют форму клетки, а также являются обязательным

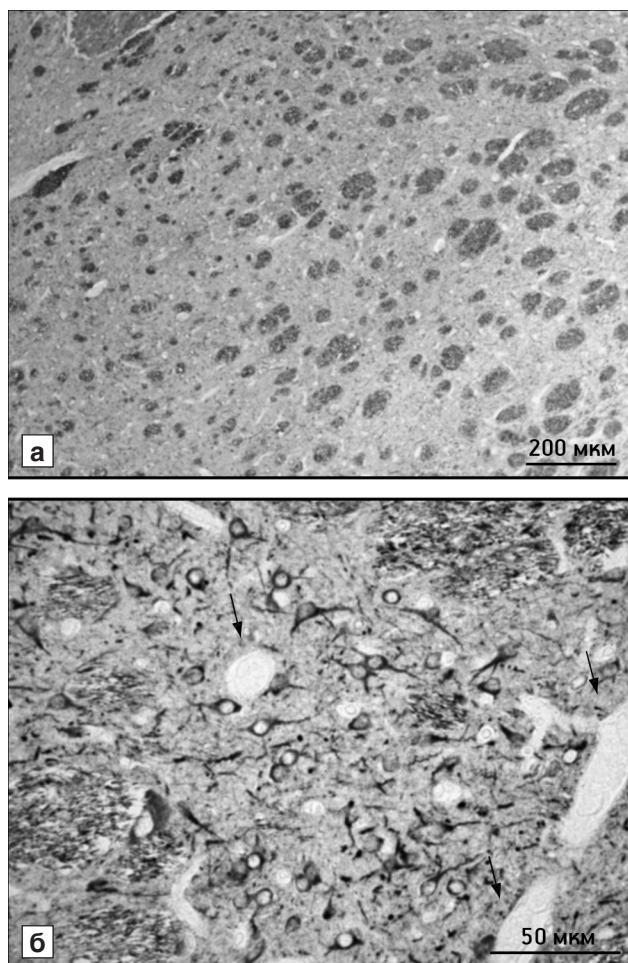


Рис. 2. Каудатопутамен (nucleus caudatus/putamen) головного мозга крысы.

а — базальная часть хвостатого ядра. Иммунореактивные пучки аксонов на фоне слабоокрашенного нейропиля; б — перивентрикулярная зона хвостатого ядра. Положительная реакция на тубулин по периферии мультиполярных нейронов и в их отростках. Стрелки — сосуды без признаков иммунореактивности. Иммуногистохимическая реакция на α -тубулин без докраски

элементом аксонов, дендритов и синаптических окончаний [2, 5, 9]. Вследствие этого можно было бы ожидать примерно одинакового распределения α -тубулина во всех структурах головного мозга. Однако реакция на α -тубулин выявила неравномерное распределение этого белка в переднем мозгу крыс. Так, в неокортексе отмечена отчётливая послойная дифференциация интенсивности окрашивания при реакции на α -тубулин: окраска наиболее интенсивна в поверхностном и базальном (I и VI) слоях, а среди менее окрашенных средних слоёв коры она более интенсивна в IV слое. В то же время, среди нервных клеток наиболее интенсивно окрашиваются перикарионы пирамидных нейронов V слоя, тогда как многие другие нейроны окрашены слабо, а в поверхностных слоях имеются клетки, не содержащие α -тубулина. Это свидетельствует, что повышен-

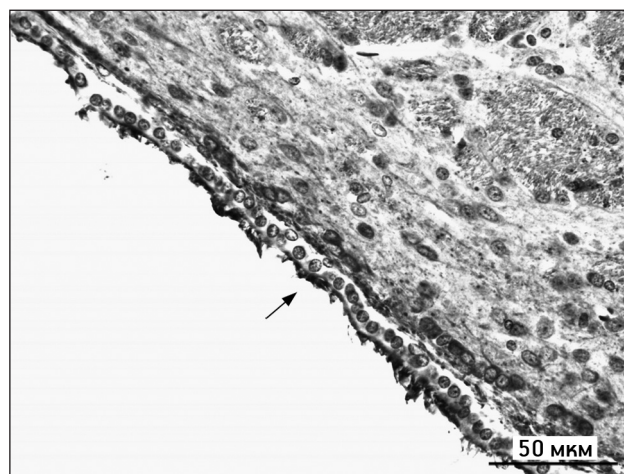


Рис. 3. Стенка бокового желудочка головного мозга крысы.

Слой выраженной иммунореактивности на поверхности эпендимы (стрелка), которая иммунонегативна. Под эпендимой расположены клетки с окрашенным узким ободком цитоплазмы, а в перивентрикулярной зоне хвостатого ядра видны слабоиммунореактивные нейроны с хорошо окрашенными отростками. Иммуногистохимическая реакция на α -тубулин с докраской гематоксилином

ная иммунореактивность в I, VI, а также IV слоях коры определяется обилием иммунореактивных волокон. Интенсивность окрашивания областей прохождения нервных проводников также была различной: в перекресте зрительных нервов иммунохимическая реакция на α -тубулин была высокой интенсивности, почти такой же — в передней комиссуре, несколько меньше — в мозолистом теле, значительно слабее было окрашивание пучков нервных волокон в каудатопутамене и минимальным — в субкортикальном белом веществе.

Ранее в чувствительных ганглиях спинномозговых нервов также были обнаружены не содержащие α -тубулина нейроны, которые составляли небольшую часть от всей нейронной популяции (3%) [11]. В эпителиальных клетках различных внутренних органов также были обнаружены вариации содержания иммунореактивного α -тубулина — от высокого до полного отсутствия [3].

Обнаруженное нами и описанное в литературе неравномерное распределение иммунореактивного α -тубулина в структурах и клетках нервной системы и внутренних органов может быть связано с неоднородностью самих молекул α -тубулина: известны 5 изоформ α -тубулина [4, 16], которые, кроме того, в ходе функционирования клеток подвергаются различным модификациям: циклическому тирозинированию—детирозинированию С-конца и ацетилированию лизина-40 [10]. Вследствие этого высока вероятность того, что указанные подвиды α -тубулина разнятся по выявляемости с помощью использованного нами клона антител. Постоянное динамичное и

обратимое превращение одной формы α -тубулина в другую может объяснить различие окраски в разных клетках и группах клеток, однако оно не объясняет наличия в нервной системе нейронов, не окрашивающихся при реакции на α -тубулин, что мы наблюдали в головном мозгу крыс, а другие исследователи — в чувствительных ганглиях [11]. Данный феномен может быть объяснён либо реальным отсутствием α -тубулина в небольшом числе нервных, а также эпителиальных клеток, что противоречит существующим воззрениям об обязательном наличии α -тубулин-содержащих микротрубочек в эукариотических клетках, либо наличием в небольшой части нейронов такой формы тубулина, которая совершенно не выявляется с помощью использованного нами клона DM-1A. В любом случае, данный вопрос требует дальнейшего исследования, поскольку касается одного из фундаментальных принципов организации клетки.

Не одинаковая интенсивность окрашивания нервных проводников в белом веществе разных структур мозга, наблюдавшаяся нами, по-видимому, соответствует различной концентрации α -тубулина в перикарионах и отростках нейронов и может отражать разную степень их функциональной активности. Данный вопрос также требует дальнейшей разработки, поскольку предлагаемый подход может позволить выявлять нейроны, различающиеся по уровню функциональной активности и, соответственно, привести к созданию эффективного морфологического метода оценки их состояния. Поскольку изменение функциональной активности нейронов происходит при различных внешних воздействиях, в том числе повреждающих, изменение реакции на α -тубулин может оказаться чувствительным индикатором их состояния не только при различных физиологических условиях, но и при патологических процессах.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты 11-04-01693а, 10-04-00180а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д. Э., Григорьев И. П. и Отеллин В. А. Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка в нейрористологических исследованиях. *Морфология*, 2006, т. 129, вып. 1, с. 85–86.
2. Коржевский Д. Э., Карпенко М. Н. и Кирик О. В. Белки, ассоциированные с микротрубочками, как показатели дифференцировки и функционального состояния нервных клеток. *Морфология*, 2011, т. 139, вып. 1, с. 13–21.
3. Dráber P., Leu F. J., Viklický V. and Damjanov I. Immunohistochemical heterogeneity of alpha-tubulin in human epithelia revealed with monoclonal antibodies. *Histochemistry*, 1987, v. 87, № 2, p. 151–155.
4. Field D. J., Collins R. A. and Lee J. C. Heterogeneity of vertebrate brain tubulins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, v. 81, № 13, p. 4041–4045.
5. Gray E. G., Westrum L. E., Burgoyne R. D. and Barton J. Synaptic organization and neuron microtubule distribution. *Cell Tissue Res.*, 1982, v. 226, № 3, p. 579–588.
6. Hyams J. S. and Lloyd C. W. *Microtubules*. New York: Wiley-Liss, 1993.
7. Liu H. H. and Brady S. T. cAMP, tubulin, axonal transport, and regeneration. *Exp. Neurol.*, 2004, v. 189, № 2, p. 199–203.
8. Matus A., Bernhardt R., Bodmer R. and Alaimo S. Microtubule-associated protein 2 and tubulin are differently distributed in the dendrites of developing neurons. *Neuroscience*, 1986, v. 17, № 2, p. 371–389.
9. Matus A. I., Walters B. B. and Mughal S. Immunohistochemical demonstration of tubulin associated with microtubules and synaptic junctions in mammalian brain. *J. Neurocytol.*, 1975, v. 4, № 6, p. 733–744.
10. MacRae T. H. Tubulin post-translational modifications: enzymes and their mechanisms of action. *Eur. J. Biochem.*, 1997, v. 244, № 2, p. 265–278.
11. Naves F. J., Huerta J. J., Garcia-Suarez O. et al. Distribution of immunoreactivity for cytoskeletal (microtubule, microtubule-associated, and neurofilament) proteins in adult human dorsal root ganglia. *Anat. Rec.*, 1996, v. 244, № 2, p. 246–256.
12. Pellegrini F. and Budman D. R. Tubulin function, action of anti-tubulin drugs, and new drug development. *Cancer Invest.*, 2005, v. 23, № 3, p. 264–273.
13. Paxinos G. and Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, Academic Press, 1986.
14. Tischfield M. A. and Engle E. C. Distinct α - and β -tubulin isoforms are required for the positioning, differentiation, and survival of neurons: new support for the «multi-tubulin» hypothesis. *Biosci. Rep.*, 2012, v. 30, № 5, p. 319–330.
15. Tsai L. H. and Gleeson J. G. Nucleokinesis in neuronal migration. *Neuron*, 2005, v. 46, № 3, p. 383–388.
16. Villasante A., Wang D., Dobner P. et al. Six mouse α -tubulin mRNAs encode five distinct isoforms: Testis-specific expression of two sister genes. *Mol. Cell. Biol.*, 1986, v. 6, № 7, p. 2409–2419.

Поступила в редакцию 21.09.2012

DISTRIBUTION OF ALPHA-TUBULIN IN THE STRUCTURES OF RAT FOREBRAIN

I. P. Grigoriyev, M. A. Shklyayeva, O. V. Kirik, Ye. G. Gilerovich and D. E. Korzhevskiy

The distribution of alpha-tubulin, the major protein of the microtubules, was studied using immunohistochemistry in the rat forebrain structures. The differential distribution of alpha-tubulin immunoreactivity was detected: high immunoreactivity was found in cingulate and pyriform cortex, olfactory tubercles and optic chiasm, while the weakest immunohistochemical staining was observed in caudatoputamen, superficial layers of septum, cingulum and areas around the third cerebral ventricle. Immunoreactivity in the nervous cells was distributed along perikaryon periphery and in the apical dendrite. It is suggested that the intensity of alpha-tubulin immunohistochemical reaction could reflect the functional state of the neurons.

Key words: *brain, immunohistochemistry, alpha-tubulin*

Laboratory of the Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAMS North-Western Branch Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg