

© Е. А. Колос, Д. Э. Коржевский, 2013
УДК 612.015:611.89:599.323.4

Е. А. Колос и Д. Э. Коржевский

ВИМЕНТИН И БЕЛОК S100 В КЛЕТКАХ ФОРМИРУЮЩЕГОСЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО УЗЛА СПИННОМОЗГОВОГО НЕРВА

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

Целью настоящего исследования было изучение экспрессии одного из белков промежуточных филаментов — виментина и белка S100 в клетках формирующегося чувствительного узла спинномозгового нерва (ЧУСН) у крыс линии Вистар на 12–19-е сутки внутриутробного развития (n=22) и новорожденных крысят (n=6). Формирование глиоцитов ЧУСН изучали иммуногистохимическими методами. Установлено, что виментин-иммунопозитивные предшественники нейронов и глиоцитов присутствуют в закладках ЧУСН у зародышей крысы на 12–17-е сутки развития. В более поздние сроки (19-е сутки внутриутробного и 1-е сутки постнатального развития) виментин синтезируется только в клетках дифференцирующейся глии. Показано, что в эти же сроки в глиоцитах ЧУСН у крысы начинает выявляться белок S100. В 1-е сутки постнатального развития проявляется тенденция к накоплению белка S100 в более крупных нейронах, характерная для зрелых ЧУСН.

Ключевые слова: чувствительный узел спинномозгового нерва, иммуногистохимия, виментин, белок S100

Чувствительный узел спинномозгового нерва (ЧУСН) содержит тела нейронов различных типов, которые передают сенсорную информацию от периферии (кожа, мышцы, внутренние органы) в ЦНС. Знание морфологических и цитохимических особенностей и изменений в ЧУСН важно при исследовании хронического болевого синдрома [7] и нарушений сенсорной иннервации, вызванных различными патологическими процессами [5]. Несмотря на то, что ЧУСН занимает ключевое место в цепи передачи сенсорной информации в ЦНС, закономерности его эмбрионального развития изучены недостаточно. Основные работы выполнены классическими нейростологическими методами и с помощью электронной микроскопии [1, 3]. Экспрессия дифференцировочных маркеров, к которым относятся белки промежуточных филаментов и белок S100, в клетках развивающегося ЧУСН изучена лишь фрагментарно.

Цель настоящего исследования — изучение экспрессии белка промежуточных филаментов — виментина и белка S100 в клетках формирующегося ЧУСН крысы в пренатальном онтогенезе.

Материал и методы. При выполнении работы использовали беременных самок крыс линии Вистар (n=10). Исследовали ЧУСН, соответствующие шейному отделу спинного мозга на 12-, 14-, 15-, 17-е и 19-е сутки внутриутробного развития и у новорожденных крысят (4–6 со-

бей каждого срока). Первым днем беременности считался день обнаружения сперматозоидов в вагинальном мазке после подсадки самцов к самкам. Содержание, умерщвление животных, экспериментальные мероприятия осуществляли с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [2], обезжизивали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин с использованием петролейного эфира (Вектон, Россия) в качестве промежуточной среды. Для исследования изготавливали серийные срезы толщиной 5 мкм. Виментин выявляли с помощью мышиных моноклональных антител (V9, Dako, Дания) в разведении 1:100. Белок S100 определяли с помощью кроличьих поликлональных антител (Z0311, Dako, Дания) в разведении 1:600. В качестве вторичных антител для реакции на виментин применяли антитела из набора EnVision+System Labeled Polymer-HRP Anti-Mouse (K4001; Dako, Дания), для выявления белка S100 использовали набор Super Sensitive Polymer-HRP Detection Kit HRP/Dab (Bio Genex, США). Визуализацию прореагировавших антител проводили с использованием диаминобензидинового хромогена DAB+ (Dako, Дания). Затем часть срезов докрашивали толудиновым синим по Нисслю, гематоксилином или астровым синим.

Результаты исследования. На 12-е сутки эмбрионального развития закладки ЧУСН у крысы представляют собой небольшие скопления мелких клеток с округлыми ядрами и тонким ободком цитоплазмы, расположенные рядом с формирующимся спинным мозгом. При иммуногистохимической реакции на виментин цито-

Сведения об авторах:

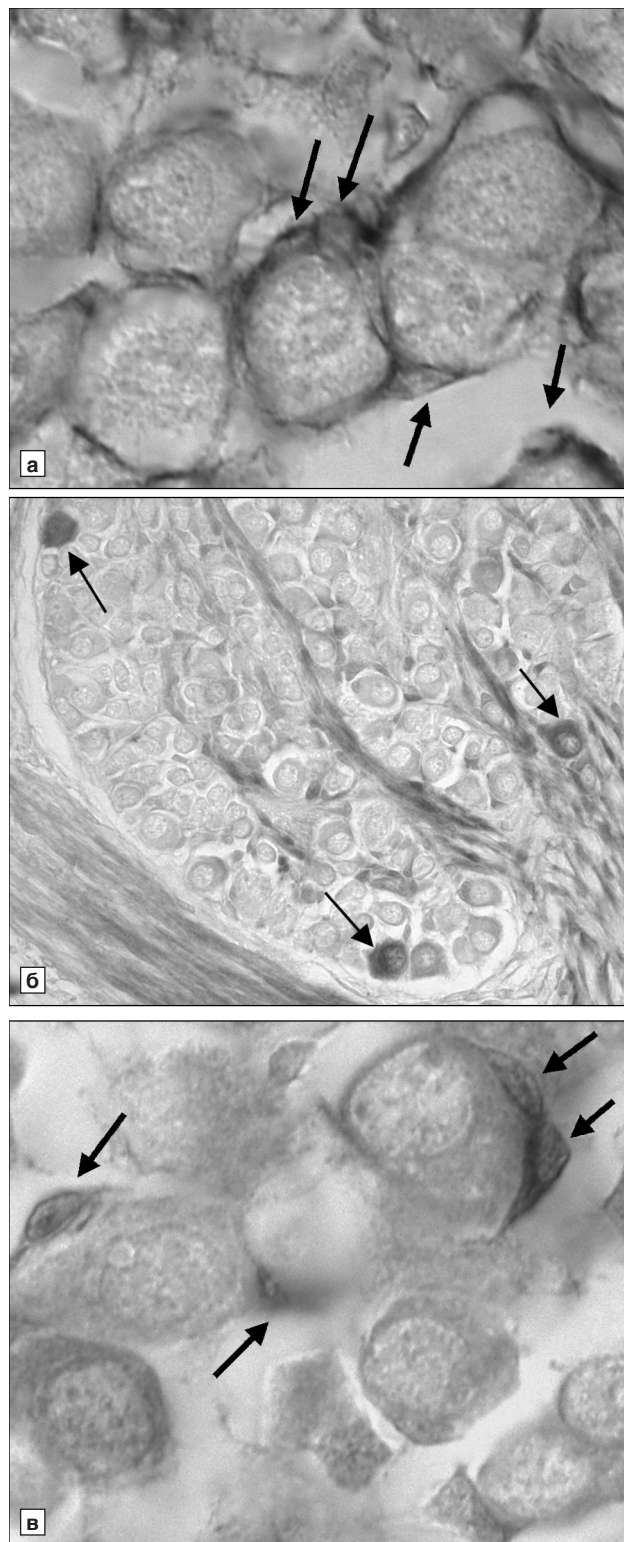
Колос Елена Андреевна (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), Коржевский Дмитрий Эдуардович (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

плазма этих клеток интенсивно окрашивается. На 14-е сутки развития число клеток в формирующемся узле увеличивается. Среди них выявляются мелкие Vim-иммунопозитивные и крупные Vim-иммунонегативные клетки. Последние локализуются преимущественно в вентральной части ЧУСН. Позднее, на 15-е и 17-е сутки, крупные клетки, не экспрессирующие виментин, обнаруживаются и в дорсальной части ганглия. Белок S100 на 12–17-е сутки развития в клетках ЧУСН не экспрессируется.

У плодов 19-х суток развития клетки узла приобретают топографию, сходную с таковой в узле взрослой крысы. В структуре ЧУСН можно четко дифференцировать нейробласты и окружающие их презумптивные клетки-сателлиты. Виментин обнаруживается в цитоплазме всех развивающихся сателлитоцитов, в то время как в нейробластах он не экспрессируется (рисунок, а). На 19-е сутки развития в части клеток ЧУСН выявляется белок S100. S100-иммунопозитивными оказываются некоторые нейробласты, нейролеммоциты формирующихся нервных стволов, а также прилежащие к нейробластам дифференцирующиеся клетки-сателлиты (рисунок, б, в).

При изучении ЧУСН новорожденных крысят было установлено, что все клетки-сателлиты синтезируют виментин, а молодые нейроны соответствующего маркера не содержат. После рождения белок S100 начинает синтезироваться не только в клетках-сателлитах, но и в молодых чувствительных нейронах. При этом отмечено, что в зависимости от размеров клеток интенсивность реакции на белок S100 меняется. Молодые нейроны меньшего диаметра (10–12 мкм) имеют слабую реакцию на S100, более крупные клетки (25–30 мкм) более интенсивно окрашены. Клетки-сателлиты обладают интенсивной иммунореактивностью, в них белок S100 локализуется преимущественно в околядерной зоне. Положительная реакция на S100 наблюдается также в цитоплазме нейролеммоцитов.

Обсуждение полученных данных. В иммуногистохимических исследованиях, касающихся развития ЧУСН, анализируется в основном нейроногенез, но мало внимания уделяется сателлитной глии. Однако надлежащее функционирование нейронов ЧУСН не может не зависеть от состава и функционального статуса окружающих их глиоцитов. Известно, что для глиальных элементов зрелого ЧУСН характерна экспрессия виментина и белка S100 [6]. В настоящем исследовании показано, что данные белки могут служить маркерами сателлитных глиоцитов в поздние сроки внутриутробного развития и ран-



Клетки чувствительного узла спинномозгового нерва крысы на 19-е сутки внутриутробного развития.

Тонкие стрелки — отдельные S100-иммунопозитивные крупные клетки; толстые стрелки — клетки-сателлиты. Иммуногистохимические реакции: а — на виментин; б, в — на белок S100. а, в — об. 100, ок. 10; б — об. 40, ок. 10

ний постнатальный период. При этом на ранних стадиях эмбриогенеза ни один из них не обладает избирательностью по отношению к предшествен-

никам сателлитоглиальных клеток. Как известно, нейральные и глиальные элементы ЧУСН возникают из нервного гребня, а его мигрирующие клетки экспрессируют виментин [4]. Выявленные в настоящем исследовании виментин-содержащие клетки на 12–17-е сутки внутриутробного развития могут являться предшественниками как чувствительных нейронов, так и сателлитных глиоглиальных клеток, а также нейролеммоцитов. Предполагается, что на этом этапе развития среди них также могут присутствовать и недифференцированные клетки нервного гребня. В более поздние сроки (19-е сутки внутриутробного и 1-е сутки постнатального развития) нейробласты и молодые нейроны перестают экспрессировать виментин. Этот белок остается только в клетках дифференцирующейся глии. В эти же сроки в глиальных элементах ЧУСН начинается экспрессия белка S100, что свидетельствует об их вступлении в более позднюю стадию дифференцировки.

Таким образом, установлено, что на 19-е сутки внутриутробного развития формирующиеся глиоглиальные клетки ЧУСН у крыс приобретают локализацию, характерную для ЧУСН у взрослых животных: они располагаются вокруг нейронов, тесно контактируя с ними. В этот срок при использовании иммуногистохимических маркеров (виментина и белка S100) можно четко дифференцировать клетки-сателлиты. Показано, что уже в 1-е сутки постнатального развития проявляется тенденция к накоплению белка S100 в более крупных нейронах, характерная для зрелых ЧУСН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кнорре А. Г. Эмбриональный гистогенез. Л., Медицина, 1971.
2. Коржевский Д. Э., Сухорукова Е. Г., Гилерович Е. Г. и др. Преимущества и недостатки цинк-этанол-формальдегида как фиксатора для иммуногистохимических исследований и конфокальной лазерной микроскопии. Морфология, 2013, т. 143, вып. 2, с. 81–85.
3. Ноздрачев А. Д. и Чумасов Е. И. Периферическая нервная система. СПб., Наука, 1999.
4. Boisseau S. and Simonneau M. Mammalian neuronal differentiation: early expression of a neuronal phenotype from mouse neural crest cells in a chemically defined culture. Development, 1989, v. 106, № 4, p. 665–674.
5. Kishi M., Tanabe J., Schmelzer J. D. and Low P. A. Morphometry of dorsal root ganglion in chronic experimental diabetic neuropathy. Diabetes, 2002, v. 51, № 3, p. 819–824.
6. Nascimento R. S., Santiago M. F., Marques S. A. et al. Diversity among satellite glial cells in dorsal root ganglia of the rat. Braz. J. Med. Biol. Res., 2008, v. 41, № 11, p. 1011–1017.
7. Sapunar D., Kostic S., Banozic A. and Puljak L. Dorsal root ganglion — a potential new therapeutic target for neuropathic pain. J. Pain. Res., 2012, № 5, p. 31–38.

Поступила в редакцию 14.04.2013

VIMENTIN AND S100 PROTEIN IN THE DEVELOPING RAT DORSAL ROOT GANGLION CELLS

Ye. A. Kolos and D. E. Korzhevskiy

The aim of this research was to study the expression of vimentin, one of the intermediate filament proteins, and S100 protein in the cells of developing dorsal root ganglion in prenatal ontogenesis in Wistar rat embryos (n=22) on 12–19 days of development and in newborn rats (n=6). Immunohistochemical staining methods were used to study the formation of rat dorsal root ganglion glial cells. Vimentin-immunopositive neural and glial progenitor cells were present in dorsal root ganglion primordia in rat embryos at 12–17 prenatal days. At the later stages (day 19 of prenatal life and day 1 of postnatal life) vimentin was found to be synthesized only by the differentiating glial cells. It was shown that at the same time, S100 protein was first detected in the glial cells of rat dorsal root ganglion. On postnatal day 1, the tendency was noted for the accumulation of S100 protein in the larger neurons, that was characteristic to mature dorsal root ganglia.

Key words: *dorsal root ganglion, immunohistochemistry, vimentin, S100 protein*

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