

Е.Ю.Кириченко¹, А.К.Логвинов², П.Е.Повилайтите³ и А.О.Гранкина¹

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ НЕЙРОНАЛЬНЫХ И ГЛИАЛЬНЫХ АНТИГЕНОВ В КОЛОНКАХ СОМАТОСЕНСОРНОЙ КОРЫ МОЗГА КРЫСЫ (ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

¹ Лаборатория функциональной нейроморфологии и электронной микроскопии (зав. — канд. биол. наук Е.Ю.Кириченко), Научно-исследовательский институт нейрокибернетики им. А.Б.Когана, Южный Федеральный университет; ² патологоанатомическое отделение (зав. — канд. биол. наук Д.Г.Пасечник), Областная клиническая больница № 2; ³ отдел экспериментальной патоморфологии и электронной микроскопии (зав. — канд. биол. наук П.Е.Повилайтите), Ростовское областное патологоанатомическое бюро, г. Ростов-на-Дону

Целью исследования было выявление колонок неокортекса поля S1 на фронтальных срезах головного мозга у белых беспородных крыс (n=10) с использованием метода иммуногистохимии и антител к белкам нейронов (синаптофизину, нейрофиламентам) и глиоцитов (глиальному фибриллярному белку — GFAP, основному белку миелина). Изучение экспрессии основных нейроспецифических антигенов позволило установить, что на тонких срезах (4 мкм) колонку можно идентифицировать благодаря скоплениям астроцитов и отростков нейронов — аксонов и дендритов. Исследование экспрессии GFAP также показало, что в I слое коры, как правило, содержится большое количество крупных астроцитов с ветвящимися отростками, а также многочисленные мелкие отростки с высокой интенсивностью экспрессии. Содержание синаптофизина — высокое во всех слоях коры, но наиболее интенсивная реакция выявлена в молекулярном слое, так же как и при реакции на GFAP. Экспрессия основного белка миелина выявляется, соответственно, радиально расположенным миелинизированным отросткам нейронов в коре.

Ключевые слова: *соматосенсорная кора, колонки, белки нейронов и глиоцитов, иммуногистохимия*

При изучении фокальной веретенообразной (альфа-частотной) активности корковых колонок было показано, что они обладают собственными механизмами ритмогенеза и представляют собой эндогенно-активные морфофункциональные единицы коры [6]. Иммуногистохимическое исследование тонких тангенциальных срезов (4 мкм) баррельной коры выявило неоднородность распределения нейрональных и глиальных элементов на уровне IV слоя. Было показано, что в стенках баррелей (бочонков) локализованы преимущественно химические синапсы, а в центральной части — наблюдаются скопления астроцитов [3], что позволяет более точно идентифицировать корковые колонки. Как известно, выявление границ макроколонок является одной из актуальных задач, в частности, для выяснения структурно-функциональных особенностей отдельных корковых модулей. Цель настоящего

исследования — выявление колонок соматосенсорной коры, используя иммуногистохимические методы исследования.

Материал и методы. Содержание животных и экспериментальные исследования осуществляли в соответствии с протоколом, утвержденным Комиссией по биоэтике Южного Федерального университета от 18.04.2012 г. Объектом исследования являлись колонки соматосенсорной коры мозга беспородных лабораторных белых крыс. Опыты проведены на 10 животных обоего пола массой 150–200 г, которым вводили нембутал в дозе 60 мг/кг и проводили транскортиальную перфузию изотоническим раствором фосфатного буфера [1], а затем раствором 10% формалина на фосфатном буфере pH 7,2. После чего головной мозг извлекали и дофиксировали при температуре 18 ° в течение 20 ч в свежем фиксирующем растворе того же состава. Из головного мозга выделяли секцию по координатам в соответствии с атласом [11]: 1-й разрез — 0,2 мм роstralно от брегмы, 2-й разрез — 6,04 каудально от брегмы, при этом, латерально мозг не рассекали. Иссеченный фрагмент мозга прикрепляли каудальной стороной среза вниз и на вибраторе VT 1000E (Leica,

Сведения об авторах:

Кириченко Евгения Юрьевна (e-mail: kiriche.evgeniya@yandex.ru), *Гранкина Анастасия Олеговна* (e-mail: grankina.anastasia@mail.ru), лаборатория функциональной нейроморфологии и электронной микроскопии, Научно-исследовательский институт нейрокибернетики им. А.Б.Когана, Южный Федеральный университет, 344090, Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1;

Логвинов Александр Константинович (e-mail: alekloov@rambler.ru), патологоанатомическое отделение, Областная клиническая больница № 2;

Повилайтите Патриция Эдмундовна (e-mail: povpe@yandex.ru), отдел экспериментальной патоморфологии и электронной микроскопии, Ростовское областное патологоанатомическое бюро, 344090, Ростов-на-Дону, ул. Благодатная, 170

Германия) на холоду изготавливали фронтальные срезы толщиной 100 мкм, содержащие первичную соматосенсорную кору S1. Для тангенциальных срезов иссеченный фрагмент ткани прикрепляли к столику вибратора молекулярным слоем вверх, срезы изготавливали до тех пор, пока на них не определялись баррели, являющиеся частью колонки на уровне IV слоя. После этого головной мозг ориентировали для получения с помощью микротомы фронтальных срезов через колонку, определяя верх и низ образца, заливали в парафин по стандартной методике. Были проведены реакции на белки нейрофиламентов (мышинные моноклональные антитела — клон 2F11, разведение 1:100), основной белок миеллина — MBP (кроличьи поликлональные антитела), глиальный фибриллярный кислый белок — GFAP (моноклональные мышинные антитела — клон 6F2, разведение 2:100), синаптофизин (моноклональные мышинные антитела — клон SY38, разведение 5:100). Для визуализации каждой иммуногистохимической реакции был использован набор Dako EnVision+ System Peroxidase (DAB). Все реактивы, использованные в иммуногистохимических реакциях, — производства Dako (Германия). Для каждой реакции проводили отрицательный контроль, в котором вместо первичных антител на срезы наносили буфер. После проведения иммуногистохимической реакции ядра клеток докрашивали гематоксилином.

Результаты исследования. В соматосенсорной коре мозга крыс как на фронтальных, так и на тангенциальных неокрашенных вибраторных срезах толщиной 100 мкм на уровне IV слоя выявляются баррели в виде компактных ячеистых структур. Стенки ячеек визуально оптически более плотные, нежели их середина (рисунк, а, б). На всех срезах после перфузии отмечаются поперечно (в тангенциальной плоскости) и продольно (во фронтальной плоскости) срезанные радиальные сосуды мелкого и среднего калибра. Как правило, наиболее крупные сосуды располагаются в стенках отдельных баррелей, обозначая границы колонок. При окраске гематоксилином — эозином на тонких (4 мкм) фронтальных срезах выявить как колонку, так и характерную отчетливую ячеистую структуру баррельной коры не удается.

Изучение распространения миелиновых волокон в колонках соматосенсорной коры на фронтальных срезах с использованием антитела к MBP показало, что наибольшее их количество локализуется в V–VI слоях, единичные тяжи достигают IV слоя, а наименьшее количество наблюдается в I–III слоях (см. рисунок, в). При этом, на фронтальных срезах (как в продольном, так и в поперечном сечении, но в меньшем количестве) выявляются мелкие и крупные миелиновые волокна.

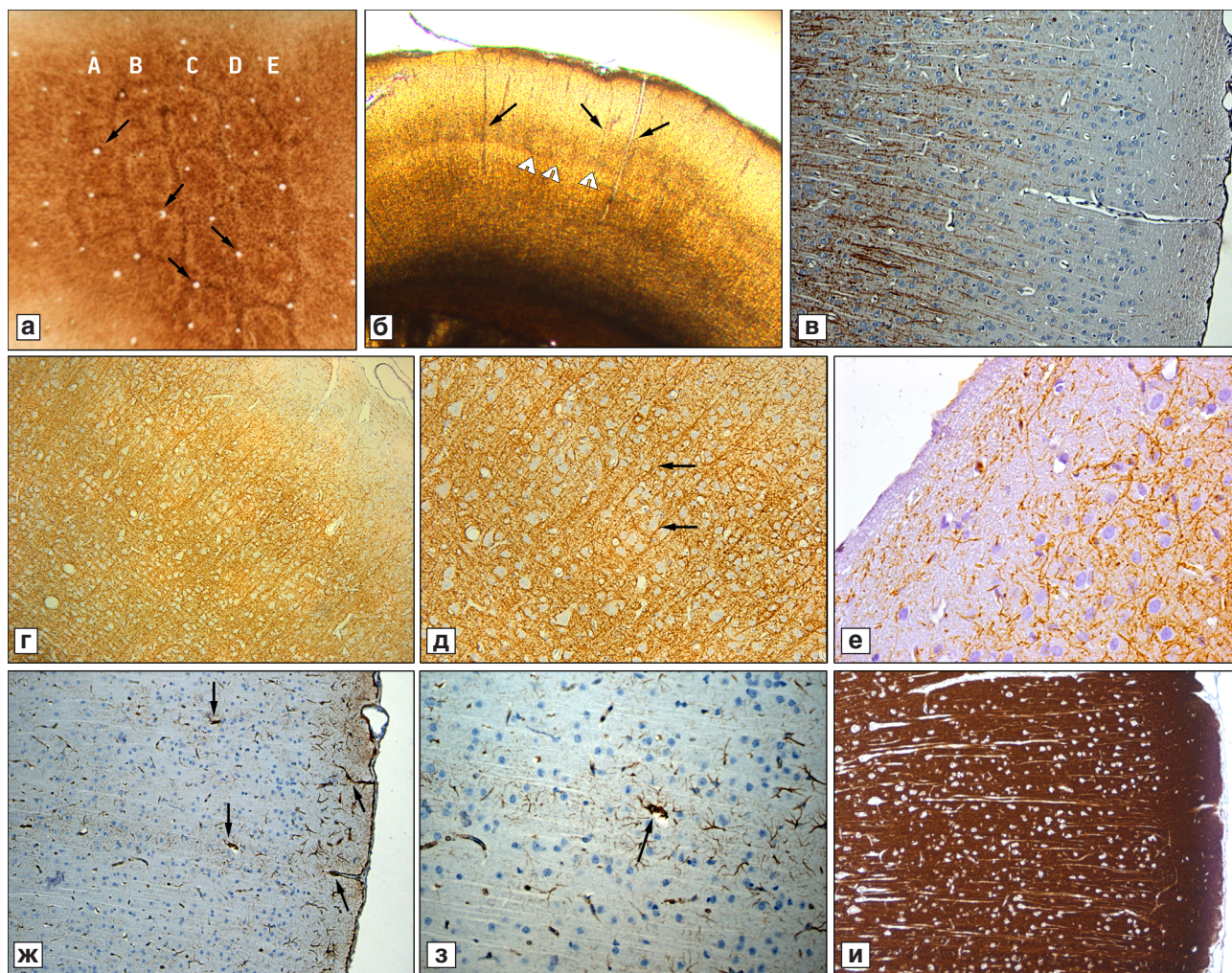
Изучение фронтальных срезов соматосенсорной коры после проведения иммуногистохимической реакции с моноклональными антителами к нейрофиламентам выявило некоторые колебания оптической плотности в разных слоях за счет количества структур, содержащих данный анти-

ген. Более интенсивная реакция обнаружена в V внутреннем пирамидном слое (пластинке) и мультиформном (IV) слое и наименьшая выраженность экспрессии — в средней части наружного зернистого (II) и наружного пирамидного (III) слоев (см. рисунок, г). На уровне IV — внутреннего зернистого слоя наблюдается группировка пучков нейрофиламентов в тяжи, проходящие, преимущественно, через септу и стенку баррелей, за счет чего выявляется ячеистый рисунок баррельной коры и определяются границы колонок на тонких (4 мкм) фронтальных срезах (см. рисунок, г, д). При больших увеличениях в нейропиле I слоя выявляются скопления многочисленных ярко окрашенных срезанных мелких отростков с высоким уровнем экспрессии нейрофиламентов. При этом, в отличие от других слоев, здесь наблюдается смена ориентации отростков нейронов с вертикальной на горизонтальную, а также уменьшение их диаметра в 2 раза (см. рисунок, е).

Реакция на GFAP выявила повышенное (по сравнению с другими слоями) количество астроглиальных элементов в молекулярном, наружных зернистом и пирамидном слоях, а также умеренное скопление глиоцитов во внутреннем зернистом (IV), внутреннем пирамидном и мультиформном слоях. После проведения реакции во всех слоях идентифицируются окрашенные периваскулярные муфты из сосудистых ножек астроцитов вокруг крупных и мелких капилляров — компонент гематоэнцефалического барьера, а также тонкие отростки астроцитов вокруг нейронов (см. рисунок, ж). На некоторых препаратах отчетливо выявляется повышенное содержание глиальных элементов — клеток и в основном их отростков — вдоль всей колонки соматической коры (см. рисунок, з).

Исследование экспрессии синаптофизина показало, что в структурах молекулярного слоя содержится большее количество этого белка, чем в других слоях коры (см. рисунок, и), за счет чего выделить границы колонки на фронтальном срезе коры не удастся. При больших увеличениях обращают на себя внимание негативные к синаптофизину группы нейронов и крупные, продольно срезанные аксоны и дендриты, а также сосуды, которые располагаются вблизи от зон интенсивного выпадения продукта реакции, т. е. в участках с высоким содержанием синаптофизина.

Обсуждение полученных данных. Нами было установлено, что на фронтальных вибраторных неокрашенных срезах толщиной 100 мкм границы колонки возможно определить по баррелям IV слоя, что соответствует данным других исследователей [2]. При этом отмеченная



Локализация крупных радиальных сосудов в стенках баррелей и экспрессия основных нейрональных и глиальных антигенов на фронтальных срезах соматосенсорной коры мозга крыс.

а — срез толщиной 100 мкм баррельной коры с поперечно рассеянными капиллярами (стрелки); А–Е — ряды баррелей; б — срез толщиной 100 мкм коры большого мозга с рассеянными вдоль радиальными сосудами (черные стрелки); белые стрелки — баррели IV слоя; в — миелиновые волокна в слоях соматической коры, расположенные перпендикулярно ее поверхности; г — экспрессия нейрофиламентов в соматосенсорной коре S1; на уровне IV — внутреннего зернистого слоя видны границы колонок; д — увеличенный фрагмент рисунка г, «пучки» нейрофиламентов, локализованные в стенках баррелей (стрелки); е — экспрессия нейрофиламентов — мелкие, горизонтально ориентированные аксоны и дендриты в I слое, уменьшение экспрессии на уровне II слоя, отчетливо выраженная экспрессия на уровне III слоя коры; ж — в I слое коры крупные астроциты с ветвящимися отростками, а также многочисленные мелкие отростки, срезынные вдоль и поперек, с высокой интенсивностью экспрессии в нейропиле; стрелки — компоненты гематоэнцефалического барьера (ГЭБ); з — локализация астроглиальных элементов внутри колонок коры; стрелка — компоненты ГЭБ; и — экспрессия синаптофизина на фронтальном срезе соматической коры. а, б — неокрашенные срезы; в — иммуногистохимическая реакция с первичными антителами к основному белку миелина и докраской гематоксилином; г–е — иммуногистохимическая реакция на нейрофиламенты; ж, з — иммуногистохимическая реакция на глиальный фибриллярный кислый белок с докраской гематоксилином; и — иммуногистохимическая реакция на синаптофизин. Ув.: а, в, г, ж, и — 100; б — 200; д, е, з — 400

нами локализация крупных капилляров в стенках баррелей на тангенциальных срезах и по границам колонок на фронтальных срезах может свидетельствовать об автономной ангиоархитектонике этих модулей. На тонких фронтальных срезах, так же как и на тангенциальных окрашенных гематоксилином — эозином, колонки обнаружить было невозможно. Цитоплазма нейронов при этом окрашивании сливается с нейропилем. В связи с этим при визуальном анализе невозможно определить контуры колонок, которые

на толстых срезах выделяются благодаря более плотному расположению нейронов. Вместе с тем, изучение экспрессии основных нейроспецифичных антигенов позволило установить, что на тонких срезах колонку позволяют идентифицировать группировки астроцитов и отростков нейронов, содержащих нейрофиламенты. Согласно полученным нами результатам при изучении структур, экспрессирующих нейрофиламенты, значительная часть нейронов, расположенных в пределах фронтального среза неокортекса, имеют крупные

отростки, направленные по продольной оси колонок. При этом наблюдается чередование участков с более и менее плотным переплетением мелких отростков нейронов. Отмечена неравномерность экспрессии на уровне IV и I слоев коры, где имеется значительно большее количество переплетающихся мелких отростков, чем в остальных слоях. Эти изменения уровня экспрессии отражают количество не столько нейронов, сколько их отростков — аксонов и дендритов, в которых содержатся нейрофиламенты. При этом, как известно, нейрофиламенты ответственны за радиальный рост и необходимую ориентацию аксонов и дендритов, что особенно важно для пространственной организации корковых модулей. Нейрофиламенты также обеспечивают скорость нервной проводимости, участвуя в anterо- и ретроградном транспорте веществ, в том числе нейротрансмиттеров [15].

В целом, изучение экспрессии нейрофиламентов, так же как и МВР, на фронтальных срезах показало, что характер распределения миелина и элементов цитоскелета нейронов соответствует основным теориям архитектоники миелиновых волокон коры большого мозга.

Данные о локализации астроцитов свидетельствуют об особом значении астроглии для обеспечения структурно-функциональной организации колонок. Глиocyты в колонках традиционно рассматриваются лишь в качестве элементов, поддерживающих структурную, трофическую и метаболическую функции нейронов. Однако исследования последних десятилетий показали, что роль нейрно-глиальных взаимоотношений, как и роль нейроглии в целом, недооценены. Было продемонстрировано участие глии в миграции развивающихся нейронов не только в эмбриогенезе, но и в процессе пластических перестроек нейронных сетей, а также в регуляции работы глутаматергических синапсов [12]. Так, астроциты могут усилить нейротрансмиссию путем выделения собственного глутамата или ослабить передачу путем поглощения нейротрансмиттера или выброса связующих его белков. С помощью собственных сигнальных молекул астроциты увеличивают или уменьшают выброс нейромедиатора при последующих активациях синапса [7]. Благодаря формированию межклеточных щелевых контактов астроглия может приобретать функцию пространственного буфера для регуляции внеклеточной концентрации K^+ , Ca^{2+} и других ионов, контролируя внутри- и внеклеточный ионный гомеостаз [8–10, 14]. При этом активность глии косвенным образом через реакции поглощения внеклеточных ионов отражает активность нейронных структур.

После проведения нами ранее иммуногистохимической реакции была выявлена интенсивная экспрессия белка синаптофизина в стенках баррелей, что позволило идентифицировать характерное сетчатое строение баррельной коры даже на срезах, толщина которых не превышала 4 мкм [3]. Однако в настоящем исследовании при изучении фронтальных срезов с использованием антител к белку синаптофизину было установлено, что этот антиген распределен в соматической коре по вертикали равномерно. Эти результаты показывают, что распределение химических синапсов в различных слоях по глубине колонки равномерно, за исключением I слоя, где экспрессия этого белка выражена значительно, а границы колонки с использованием антител к синаптофизину можно определить только на тангенциальных срезах коры. При этом, на фронтальных срезах нами отмечена неоднородность экспрессии белков нейронов и глии в молекулярном слое коры. Согласно данным литературы, I слой коры уникален по структурно-функциональной организации нейропиля, который состоит из тонких горизонтальных ветвлений апикальных дендритов пирамидных нейронов. Этот слой формируется на самых ранних этапах развития коры и тесно связан с неспецифической афферентацией, возникающей еще до этапа прорастания в кору специфических таламокортикальных афферентных волокон, участвует в нейрогенезе других слоев коры [5, 12]. Характерной особенностью данного слоя также является сплетение ингибирующих аксонов звездчатых клеток всех слоев коры [13]. По нашим данным, I слой коры является уникальной зоной, поскольку в нем практически отсутствуют тела нейронов, а их отростки изменяют свое направление и диаметр, кроме того, в этом слое наблюдаются скопления астроглиальных элементов. Есть основания полагать, что астроциты, расположенные в пределах этого слоя, принимают участие в процессах интеграции входной информации от кортикальных и таламических структур, а также организуют поверхностную глиальную пограничную мембрану, обеспечивающую поддержание целостности ликворорэнцефалического барьера [4].

Таким образом, использование специфичных для нервной ткани антигенов позволяет выявить кортикальную колонку на тонких срезах благодаря экспрессии GFAP и нейрофиламентов. Отсутствие тел нейронов в I слое, а также преимущественно горизонтальное расположение отростков нейронов при наличии значительного количества астроглии позволяют предположить

уникальность структурно-функциональной организации данного слоя коры.

Работа поддержана грантом РФФИ 13-04-01012 и внутренним грантом Южного Федерального университета № 213.01-24/2013-52.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кириченко Е.Ю., Повилайтите П.Е. и Сухов А.Г. Роль щелевых контактов в локальном ритмогенезе корковых колонок. *Морфология*, 2008, т. 133, вып. 1, с. 31–34.
2. Краснощекова Е.И. Модульная организация нервных центров. СПб., Изд-во СПбГУ, 2007.
3. Логвинов А.К., Кириченко Е.Ю., Повилайтите П.Е. и Сухов А.Г. Структурная организация баррельной коры мозга крысы (иммуногистохимическое исследование). *Морфология*, 2010, т. 137, вып. 1, с. 10–13.
4. Сухорукова Е.Г. Структурная организация астроцитов I слоя коры головного мозга человека. *Морфология*, 2010, т. 137, вып. 4, с. 185.
5. Хожай Л.И. и Отеллин В.А. Морфогенез слоя I коры мозга мышей в пренатальный период развития. *Онтогенез*, 1999, т. 30, № 1, с. 40–46.
6. DeFelipe J., Markram H. and Rockland K. The neocortical column. *Frontiers in neuroanatomy*, 2012, v. 6, № 22, p. 4–5.
7. Fields R.D. and Burnstock G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2006, v. 7, № 6, p. 423–436.
8. Giaume C., Maravall M., Welker E. and Bonvento G. The barrel cortex as a model to study dynamic neuroglial interaction. *Neuroscientist*, 2009, v. 15, № 4, p. 351–366.
9. Kozoriz M.G., Bates D.C., Bond S.R. et al. M. Passing potassium with and without gap junctions. *J. Neurosci.*, 2006, v. 26, № 31, p. 8023–8024.
10. Pannasch U., Derangeon M., Chever O. and Rouach N. Astroglial gap junctions shape neuronal network activity. *Commun. Integr. Biol.*, 2012, v. 5, № 3, p. 248–254.
11. Paxinos G. and Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Second Edition. New York, Academic Press, 1986.
12. Rakic P. Elusive radial glial cells: historical and evolutionary perspective. *Glia*, 2003, v. 43, № 1, p. 19–32.
13. Shlosberg D., Patrick S.L., Buskila Y. and Amitai Y. Inhibitory effect of mouse neocortex layer I on the underlying cellular network. *Eur. J. Neurosci.*, 2003, v. 18, p. 2751–2759.
14. Wallraff A., Köhling R., Heinemann U. et al. The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J. Neurosci.*, 2006, v. 26, № 20, p. 5438–5447.
15. Yuan A., Rao M.V., Veeranna and Nixon R.A. Neurofilaments at a glance. *J. Cell Sci.*, 2012, v. 125, № 14, p. 3257–3263.

Поступила в редакцию 07.08.2013

Получена после доработки 18.12.2013

NEURONAL AND GLIAL ANTIGEN DISTRIBUTION IN THE COLUMNS OF SOMATOSENSORY CORTEX OF RAT BRAIN (AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY)

Ye. Yu. Kirichenko, A. K. Logvinov, P. Ye. Povilaitite and A. O. Grankina

The aim of the study was to detect the neocortical columns in the S1 field on frontal sections of brain of albino rats using the method of immunohistochemistry and the antibodies against neuronal (synaptophysin, neurofilament) and gliocyte (glial fibrillary acidic protein — GFAP, myelin basic protein) proteins. The examination of the expression of the major neurospecific antigens revealed that on thin sections (4 µm) a column could be identified due to accumulations of the astrocytes and neuronal processes — axons and dendrites. GFAP expression study also showed that cortical layer I usually contained multiple large astrocytes with branching processes, as well as numerous smaller processes with high intensity of expression. Synaptophysin content was high in all the layers of the cortex, but the most intense reaction was detected in the molecular layer, similarly with the intensity of GFAP reaction. The expression of myelin basic protein was detected in accordance with the radially extending myelinated processes of the neurons in the cortex.

Key words: *somatosensory cortex, columns, neuronal and glial proteins, immunohistochemistry*

Laboratory of Functional Neuromorphology and Electron Microscopy, A.B. Kogan Scientific Research Institute of Neurocybernetics, Southern Federal University, Rostov-on-Don; Department of Pathological Anatomy, Regional Clinical Hospital №2; Department of Experimental Pathological Morphology and Electron Microscopy, Rostov Regional Bureau of Pathological Anatomy, Rostov-on-Don