

- from comparative proteomics. *J. Neurosci. Res.*, 2007, v. 85, № 14, p. 3160–1170.
8. Kotaria N.T., Bolkvadze T., Chkhikvishvili C.L. et al. Quantitative analysis of cells in rat hippocampus at different time-points after status epilepticus induced by kainic acid administration. *Georgian J. Neurosci.*, 2006, v. 1, № 5, p. 47–52.
9. Kunz W.S., Kadin A.P., Vielhaber S. et al. Mitochondrial complex 1 deficiency in the epileptic focus of patients with temporal lobe epilepsy. *Ann. Neurol.*, 2000, v. 48, p. 766–773.
10. Leite J.P., Neder L., Arisi G.M. et al. Plasticity, synaptic strength, and epilepsy: what can we learn from ultrastructural data? *Epilepsia*. 2005, v. 6 Suppl. 5, p. 134–141.
11. Mikati M.A., Abi-Habib R.J., El Sabban M.E. et al. Hippocampal programmed cell death after status epilepticus: evidence for NMDA receptor and ceramide mediated mechanism. *Epilepsia*, 2003, v. 44, p. 282–291.
12. Pollard H., Charriaud-Marlangue C., Cantagrel S. et al. Kainate acid-induced apoptotic cell death in hippocampal neurons. *Neuroscience*, 1994, v. 63, p. 7–18.
13. Walter C., Murphy B.L., Pun R.Y. et al. Pilocarpine-induced seizures cause selective time-dependent changes to adult-generated hippocampal dentate granule cells. *J. Neurosci.*, 2007, v. 27, № 28, p. 7541–7552.
14. Yao-Chung Chuang, Alice Y.W., Jui-Wei Lin et al. Mitochondrial dysfunction and ultrastructural damage in the hippocampus during kainic acid-induced status epilepticus in the rat. *Epilepsia*, 2004, v. 45, № 10, p. 1202–1209.
15. Zhivotosky B. and Orrenius S. Assessment of apoptosis and necrosis by DNA fragmentation and morphological criteria. *Curr. Protoc. Cell Biol.*, 2001, Chapter 18, Unit 18.3, p. 207–221.

Поступила в редакцию 23.04.08
Получена после доработки 24.11.08

THE ULTRASTRUCTURE OF HIPPOCAMPAL CA1 AREA OF THE RAT AFTER STATUS EPILEPTICUS PROVOKED BY KAINIC ACID SYSTEMIC ADMINISTRATION

Kotaria N.T., Bikashvili T.Z., Zhvania M.G. and Chkhikvishvili T.G.

The ultrastructure of hippocampal CA1 area was investigated in rats 14 days after status epilepticus was induced by kainic acid. The structural alterations were found in 40% of the cells, predominantly in interneurons, which demonstrated both reversible changes (mitochondria with a dilated space between cristae and electron-dense matrix or mitochondria with few short cristae and moderately widened rough endoplasmic reticulum [RER] cisterns with few ribosomes) and more significant alterations (swollen mitochondria containing single dilapidated cristae, including those with damaged mitochondrial membranes, pathologically dilated RER profiles and focal or peripheral chromatolysis. In the areas subjected to chromatolysis, the membrane-like inclusions and vacuoles were sometimes observed. Besides, large osmophilic irregular structures, surrounded by astrocyte processes rich in glycogen granules and gliofibrils, were rarely found in the neuropil. The synaptic architectonics was also changed. Asymmetrical synapses on small dendrites and spines containing osmophilic postsynaptic zone were frequently observed. Their synaptic endings contained numerous synaptic vesicles and large vesicles with a central dense core. Some part of presynaptic endings showed clear signs of a classical dark-type degeneration. As in all the altered neurons the nucleus remained intact, we suggest that after status epilepticus the majority of the cells underwent the necrotic-type pathological changes.

Key words: *hippocampus, area CA, kainic acid, ultrastructure, status epilepticus.*

Department of Neuroanatomy, I. Beritashvili Institute of Physiology, Tbilisi, Georgia

© Коллектив авторов, 2008
УДК 611.813.3:612.647

А.С. Харламова, В.М. Барабанов и С.В. Савельев

РАЗВИТИЕ ОБОНЯТЕЛЬНЫХ ЛУКОВИЦ У ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА (ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Лаборатория развития нервной системы (зав. — проф. С.В. Савельев) Научно-исследовательского института морфологии человека РАН, Москва

Проведено иммуногистохимическое исследование обонятельных лукович (ОЛ) плодов человека. В работе использовали иммуногистохимические маркеры специфичных для нервной системы белковых комплексов S-100 и SNAP-25. На 20–22-й неделе развития клеток, экспрессирующих белок S-100, в ОЛ было обнаружено больше, чем в исследованной области новой коры (участки gyrus rectus и gyrus orbitalis longitudinalis internus). Выявленные количественные различия указывают на гетерохронность глиальной дифференцировки в ОЛ и коре мозга. Иммунопозитивная реакция на SNAP-25 была впервые выявлена по периферии ОЛ и в клубочках у плодов человека на 15–16-, 20–22-й неделе развития. По результатам иммуногистохимической реакции ОЛ с антителами к SNAP-25 можно утверждать, что функционирование обонятельной системы человека ранее 20–22-й недели развития невозможно. В ОЛ плодов на 28–29-й неделе развития интенсивность иммуногистохимической реакции имела топологические различия. Реакция с антителами к SNAP-25 в ОЛ доношенных плодов была сходна с реакцией в ОЛ взрослых людей. Результаты иммуногистохимического исследования с использованием реакции на белковый комплекс SNAP-25 ОЛ у плодов разного возраста позволяют предположить, что функционирование первичного обонятельного центра человека начинается не раньше 30-й недели развития.

Ключевые слова: *обонятельные луковичы, развитие, иммуногистохимия, S-100, SNAP-25.*

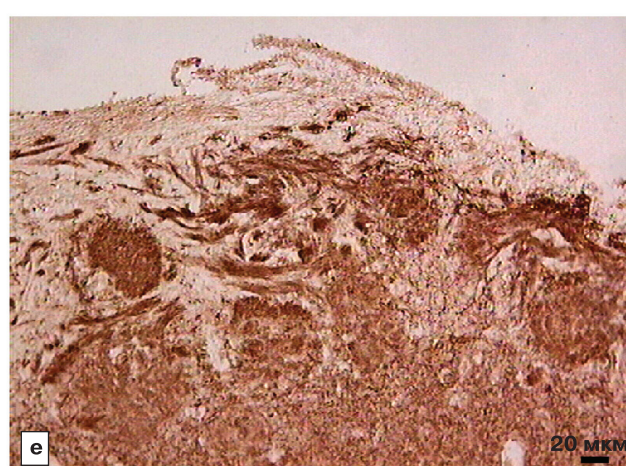
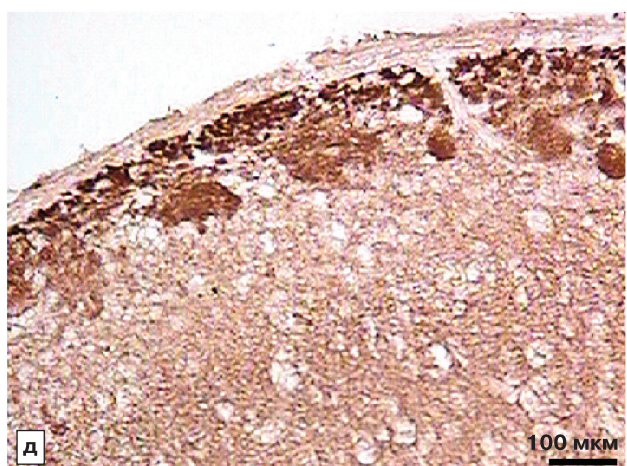
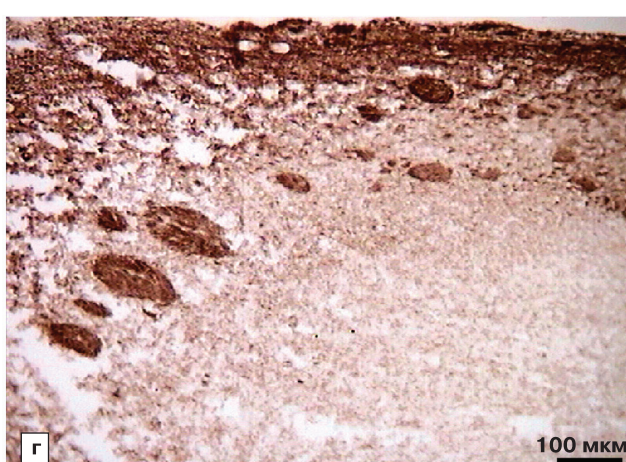
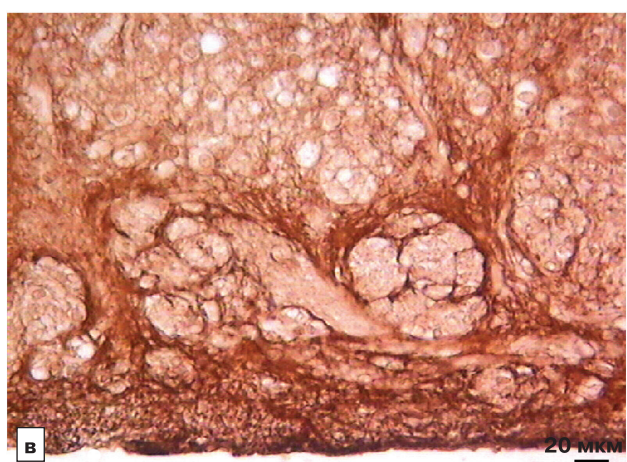
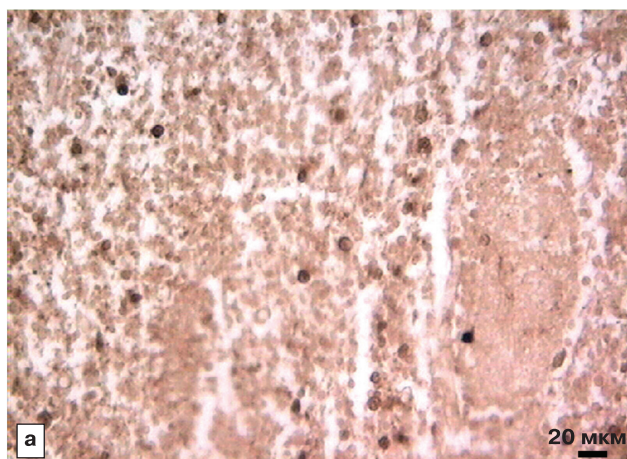
Работы, посвященные изучению развития первичных обонятельных центров у человека в пренатальный период жизни, крайне немногочисленны [3, 7, 9]. Это связано с труднодоступностью человеческого эмбрионального и плодного материала. Имеются ряд классических и современных работ, посвященных изучению развития обонятельных структур, и в частности обонятельных луковиц (ОЛ), у эмбрионов и плодов человека [3, 7–10], на которых основываются современные знания о ходе пренатального становления его первичных обонятельных центров. Описание развития ОЛ человека в этих работах охватывает период с раннего эмбрионального этапа развития до 18,5 нед [3, 7, 8]. Тем не менее, вопрос о гистологической и функциональной дифференцировке ОЛ на плодном этапе развития мало изучен, а информация о ее развитии в поздний плодный и перинатальный период в литературе отсутствует. В большинстве случаев изучение развития ОЛ у человека проводили с помощью традиционных гистологических методик [3, 7, 9, 10]. Иммуногистохимические, электронно-микроскопические исследования обонятельной системы человека были проведены в основном на обонятельном эпителии и нерве [4, 5, 13]. В литературе отсутствуют сведения об использовании иммуногистохимических маркеров для оценки дифференцировки ОЛ человека.

Цель настоящей работы — изучение морфофункциональной дифференцировки ОЛ человека в период плодного развития с использованием распространенных в исследованиях на животных иммуногистохимических методов.

Материал и методы. Работа выполнена на аутопсийном материале, полученном от взрослых людей разного возраста и плодов на 15–16-, 20-, 22-, 28–29-, 38-й и 40-й неделе развития из коллекции лаборатории развития нервной системы Научно-исследовательского института морфологии человека. Для изучения созревания структур ОЛ у плодов человека исследовали экспрессию специфичных для нервной системы белков S-100 и SNAP-25 (синаптосомально-ассоциированный белок-25). Семейство белков S-100 участвует в Ca^{2+} -зависимой регуляции внутриклеточных процессов. В нервной системе взрослого человека S-100 иммуногистохимически выявляется в основном в клетках астроцитарной глии [14], а также внеклеточно [6]. Белок SNAP-25 — часть комплекса SNARE (растворимого NSF-зависимого рецептора прикрепления; NSF — N-этилмалеимид-чувствительный фактор), отвечающего за экзоцитоз на пресинаптической мембране — как и другие белки комплекса может быть использован для оценки функциональной зрелости синапсов [12]. Зрелые белки комплекса SNARE могут содержаться в пресинаптической части функционально незрелого синапса [2]. Тем более, отсутствие иммунопозитивной реакции на один из белков SNARE означает функциональную неактивность синапса. Возраст плодов определяли по их теменно-копчиковой длине, строению головного мозга [1] и в поздние сроки — по данным истории болезни матери. ОЛ

фиксируют в забуференном 10% формалине (pH 7,2–7,4) либо в жидкости Буэна, обрабатывали стандартными гистологическими методами, изготавливали серии срезов толщиной 10 мкм, которые окрашивали по Маллори, крезильным фиолетовым по Нисслю и гематоксилином—эозином. Иммуногистохимические реакции ставили на срезах ОЛ плодов всех перечисленных сроков развития ОЛ и взрослых людей (44, 50, 60 лет). При сравнительном анализе исследовали срезы прилежащей к ОЛ новой коры — участки *gyrus rectus* и *gyrus orbitalis longitudinalis internus* (препараты мозга плода на 20–22-й неделе развития, мужчины 50 лет). При проведении иммуногистохимических реакций депарафинированные, гидратированные срезы обрабатывали 3% раствором H_2O_2 в течение 15 мин для инактивации эндогенной пероксидазы, затем с целью блокировки неспецифического связывания антител обрабатывали раствором Ultra V Block (Lab Vision, Великобритания) (5 мин) и ополаскивали в фосфатном буфере (PBS, pH 7,2). В качестве первых антител использовали поликлональные кроличьи антитела к белку S-100 (Sigma, США, рабочие разведения 1:150; 1:300; 1:600) и мышиные моноклональные антитела к SNAP-25 (Novocastra, Великобритания, рабочие разведения 1:200; 1:400; 1:800). При реакции на SNAP-25 проводили предварительное демаскирование антигенов путем высокотемпературной обработки срезов под давлением (кипячение в скороварке, при котором создается дополнительное давление, и температура поднимается выше 100° C) в 0,01M цитратном буфере (pH 6,0) в течение 1 мин. В работе применяли 2 варианта иммуногистохимических реакций. В первом случае срезы инкубировали с первыми антителами в течение 20 ч при температуре 4° C, затем после отмывки в фосфатном буфере (3 раза по 10 мин) срезы обрабатывали конъюгатом HRP-F(ab)₂ козьих антител (Zymed, США) специфичных к первым антителам (Zymed, США, 1:500, 1 ч при 37° C). На заключительном этапе срезы обрабатывали раствором хромогена (диаминобензидин — DAB, Sigma, США, 0,05%) в Tris-HCl буферном растворе (pH 7,6), содержащем 0,02% H_2O_2 . Реакции при необходимости контрастировали 0,2% раствором OsO_4 . Во втором варианте проведения реакции срезы инкубировали с первыми антителами в течение 1 ч при комнатной температуре. Для визуализации комплекса антиген — антитело использовали стандартный готовый к употреблению набор реактивов для стрептовидин-биотиновых реакций (Ultra Vision Detection Kit, Lab Vision, Великобритания) с заменой хромогена на DAB (0,05% раствор) в 0,05M Tris-HCl буферном растворе (pH 7,6), содержащем 0,02% раствор H_2O_2 . Реакции при необходимости контрастировали 0,2% раствором OsO_4 . В качестве контроля использовали реакции с заменой первых антител на раствор для разведения антител (Dako, США).

Результаты исследования. На 16-й неделе развития в ОЛ плода человека хорошо заметен желудочек, который закрывается при переходе в обонятельный тракт. В ОЛ можно условно различить 4 зоны: прижелудочковую зону клеток (вентрикулярный и субвентрикулярный слой), промежуточную зону компактно расположенных мелких клеток (внутренний плексиформный слой), краевую зону с более диффузно расположенными клетками (внешний плексиформный слой), а также зону, где расположены более крупные клетки (зачатковый слой митральных



Обонятельные луковицы (ОЛ) и прилегающие к ним участки новой коры человека.

а — иммуногистохимическая реакция с антителами к S-100 в ОЛ плода на 20–22-й неделе развития; б — иммуногистохимическая реакция с антителами к S-100 в новой коре (участок gyrus rectus) плода на 20–22-й неделе развития; в — иммуногистохимическое окрашивание при реакции с антителами к S-100 в клубочковом слое ОЛ взрослого человека (50 лет); г — иммуногистохимическое окрашивание зоны развития клубочков при реакции с антителами к SNAP-25 в ОЛ плода на 20–22-й неделе развития, дорсомедиальный участок; д — иммуногистохимическое окрашивание клубочковой зоны при реакции с антителами к SNAP-25 в ОЛ плода на 28–29-й неделе развития; е — иммуногистохимическая реакция с антителами к SNAP-25 в ОЛ взрослого человека.

клеток). В центральной и промежуточной зонах ОЛ на этом этапе развития преобладают недифференцированные клетки с центрально расположенным ядром и тонким слабо заметным слоем цитоплазмы — нейробласты. Ближе к периферии ОЛ расположена узкая зона, состоящая из клеток с более крупным ядром, окруженным слоем цитоплазмы — будущих митральных клеток.

У плода на 20–22-й неделе развития в каудальной зоне ОЛ сохраняется желудочек. На этом этапе онтогенеза морфологически обособлены и хорошо заметны области формирования клубочков, которые лучше развиты и более многочисленны на дорсальной стороне ОЛ. Ближе к периферии ОЛ за исключением дорсальной поверхности расположен пояс из сравнительно крупных клеток с крупным ядром и хорошо развитой цитоплазмой.

У исследованных доношенных плодов в ОЛ желудочек отсутствует, и можно выделить все 6 клеточных слоев, характерных для ОЛ взрослого человека.

В формирующейся ОЛ на 16-й неделе развития все клетки связывали антитела к белку S-100. Более интенсивно иммуногистохимически окрашенные клетки располагались по периферии ОЛ и около желудочка. В ОЛ плодов на 20–22-й неделе развития при реакции на S-100 выявлялись отдельные клетки, разбросанные по всей ОЛ (рисунок, а). По-видимому, клетки с сильной иммунопозитивной реакцией на S-100 на этом этапе развития являются предшественниками астроцитов, хотя ещё и не имеют характерной астроцитарной формы.

Сравнение ОЛ с прилежащим участком новой коры (участки *gyrus rectus* и *gyrus orbitalis longitudinalis internus*) показало, что в зачатке коры также встречались экспрессирующие S-100 клетки (см. рисунок, б). В исследованных областях новой коры таких клеток меньше, чем в ОЛ (см. рисунок, а, б). ОЛ доношенного плода (38–40 нед) реагировали с антителами к S-100 сходно с ОЛ взрослых людей. В результате реакции выявлялись клетки звездчатой формы, менее интенсивную окраску имело межклеточное пространство. Тела нейронов при реакции на S-100 иммуногистохимически не окрашивались. В прилежащей новой коре при реакции на S-100 нейроны также не окрашивались, что было хорошо заметно на фоне слабо окрашенного межклеточного пространства. Астроцитарная глия в ОЛ на 38-й и 40-й неделе развития имела сильную иммунопозитивную реакцию.

В ОЛ у взрослых людей реакция с антителами к белку S-100 выявляла астроциты, менее интенсивную иммуногистохимическую окраску

имело межклеточное пространство. Интенсивную иммунопозитивную реакцию на S-100 проявляли волокна поверхностного слоя ОЛ и волокна, окружающие клубочки (см. рисунок, в), чего не наблюдалось у плодов даже после 38-й недели развития. У 16-недельных плодов по периферии ОЛ и в зонах образования клубочков была выявлена слабая иммунопозитивная реакция с антителами к SNAP-25.

В ОЛ плода на 20–22-й неделе развития была обнаружена иммунопозитивная реакция на SNAP-25 (см. рисунок, г). Более слабое по сравнению с клубочками периферийное окрашивание соответствовало вентральной зоне ОЛ, где расположен пояс клеток с признаками дифференцировки. У этого же плода при сильной реакции в медиодорсальных клубочках реакция в латерально и вентрально расположенных клубочках отсутствовала либо была выражена слабее. Это может быть связано с различным временем начала созревания белкового комплекса в различных зонах внутри ОЛ, если не является артефактом сохранности препарата. На препаратах, окрашенных с помощью стандартных гистологических методов, зоны образования клубочков располагались и вентрально, и дорсально, хотя последние были более многочисленны. Центральные области ОЛ у плодов этого срока развития при реакции на SNAP-25 иммуногистохимически не окрашивались. В новой коре (участки *gyrus rectus* и *gyrus orbitalis longitudinalis internus*) у плодов данного возраста менее интенсивно по сравнению с иммуногистохимической окраской в ОЛ при реакции на SNAP-25 окрашивались межклеточные структуры. Сильную иммунопозитивную реакцию, сходную по интенсивности с реакцией в клубочковой зоне ОЛ, давали волокна белого вещества новой коры, цитоплазма нейронов при этом была не окрашена. В ОЛ плодов на 28–29-й неделе развития иммунопозитивная реакция на SNAP-25 была обнаружена в клубочках (см. рисунок, д) и по периферии ОЛ. Промежуточная область ОЛ была окрашена менее интенсивно, чем периферийная область. Центральная зона ОЛ проявляла ещё более слабую реакцию. Цитоплазма клеток не окрашивалась, как и в ОЛ у взрослых людей. На препаратах у 38-, 40-недельных плодов иммуногистохимически окрашивались периферия ОЛ и клубочки. Межклеточные структуры окрашивались менее интенсивно, но в отличие от ОЛ на 28–29-й неделе развития — равномерно. Цитоплазма нейронов оставалась неокрашенной. В целом, реакция с антителами SNAP-25 в ОЛ доношенных плодов была сходна с таковой у ОЛ взрослых людей (см. рисунок, е).

Обсуждение полученных данных. Существуют отличия в реакциях на S-100 и SNAP-25 при иммуногистохимическом исследовании между ОЛ плодов человека разных сроков развития. ОЛ содержат больше иммунопозитивно реагирующих на S-100 клеток, чем новая кора, что может быть связано с неодинаковыми временем начала или скоростью дифференцировки глии в ОЛ и прилежащей к ним новой коре. Наблюдаемые различия согласуются с представлениями об обонятельной системе как об эволюционно более древнем образовании по сравнению с новой корой. Различия в окраске при иммуногистохимической реакции на белок SNAP-25 внутри ОЛ на 15–16-, 20–22-й неделе и 28–29-й неделе внутриутробной жизни могут быть связаны с разным временем начала созревания синапсов в различных слоях и областях ОЛ. Обнаруженные градиенты реагирования с антителами к SNAP-25 на 20–22-й неделе развития свидетельствуют в пользу утверждения, что созревание ОЛ начинается с периферии. Это противоречит основанному на морфологическом анализе данным о том, что гломерулярный слой ОЛ формируется последним у млекопитающих [11] и человека [7]. Отличие в интенсивности реакции на SNAP-25 в различных областях ОЛ в пределах клубочкового слоя предполагает несоответствие морфологического и функционального критерия зрелости. Результаты иммуногистохимического исследования ОЛ плодов человека с антителами к комплексу SNAP-25 позволяют говорить о том, что функционирование обонятельного анализатора человека ранее 20-й недели развития невозможно и относится к периоду после 30-й недели развития. Результаты иммуногистохимического исследования ОЛ, по крайней мере при использовании реакций на белки S-100 и SNAP-25, в перинатальный период развития, на 38–40-й неделе, не противоречат сформулированной для млекопитающих [11] гипотезе о возможности перинатального обоняния у человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Савельев С.В. Атлас мозга человека. М., ВЕДИ, 2005.
2. Becher A., Drenckhahn A., Pahner I. et al. The synaptophysin-synaptobrevin complex: a hallmark of synaptic vesicle maturation. *J. Neurosci.*, 1999, v. 19, № 6, p. 1922–1931.
3. Bossy J. Development of olfactory and related structures in staged human embryos. *Anat. Embryol.*, 1980, v. 161, p. 225–236.
4. Chuah M.I. and Zheng D.R. Olfactory marker protein is present in olfactory receptor cells of human fetuses. *Neuroscience*, 1987, v. 23, p. 263–370.
5. Chuah M.I. and Zheng D.R. The human primary olfactory pathway: fine structural and cytochemical aspects during development and in adults. *Microsc. Res. Tech.*, 1992, v. 23, № 1, p. 76–85.
6. Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc. Res. Tech.*, 2003, v. 60, № 6, p. 540–541.
7. Humphrey T. The development of the olfactory and accessory olfactory formations in human embryos and fetuses. *J. Comp. Neurol.*, 1940, v. 73, p. 431–468.
8. Muller F. and O'Rahilly R. Olfactory structures in staged human embryos. *Cells Tissues Organs*, 2004, v. 178, p. 93–116.
9. Pearson A.A. The development of the olfactory nerve in man. *J. Comp. Neurol.*, 1941, v. 75, p. 199–217.
10. Pearson A.A. The development of the olfactory nerve, the nervus terminalis, and the vomeronasal nerve in man. *Ann. Otol., Rhinol., Laringol.*, 1942, v. 51, № 2, p. 317–332.
11. Salazar I., Quintiero P.S., Lombardero M. et al. The prenatal maturity of the accessory olfactory bulb in pigs. *Chem. Senses*, 2004, v. 29, № 1, p. 3–11.
12. Sollner T., Bennett M.K., Whiteheart S.W. et al. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*, 1993, v. 75, № 3, p. 409–418.
13. Takahashi S., Iwanaga T., Takahashi Y. et al. Neuron-specific enolase, neurofilament protein and S-100 protein in the olfactory mucosa of human fetuses. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.*, 1984, v. 238, № 2, p. 231–234.
14. Tateishi N., Shimoda T., Yada N. et al. S-100: astrocyte specific protein. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*, 2006, v. 26, № 1, p. 11–16.

Поступила в редакцию 20.03.08

Получена после доработки 20.08.08

OLFACTORY BULB DEVELOPMENT IN HUMAN FETUSES (AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY)

Kharlamova A.S., Barabanov V.M. and Saveliev S.V.

Olfactory bulbs (OB) were studied in human fetuses using immunohistochemistry. Immunohistochemical markers of S-100 and SNAP-25 protein complexes specific to the nervous system, were used in the study. At 20–22 weeks of development, the number of the cells expressing S-100 was greater in the OB than in the neocortical areas studied (gyrus rectus and gyrus orbitalis longitudinalis internus). The quantitative differences detected suggest the heterochronism of the glial differentiation in OB and the cerebral cortex. Immunopositive reaction for SNAP-25 was first detected in the OB peripheral layers and glomeruli in 20–22-week human fetuses. On the basis of immunohistochemical reaction of OB with the antibodies against SNAP-25 it may be suggested that the functioning of human olfactory system before developmental weeks 20–22 was impossible. In 28–29 week fetuses, the intensity of immunostaining was different in various topographic areas. The reaction with the antibodies against SNAP-25 in OB of term fetuses was similar to that one in OB of adults. The results of the immunohistochemical study using the reaction that detected SNAP-25 complex in OB of human fetuses suggest that the functioning of human primary olfactory center does not start before the 30 week of prenatal development.

Key words: *olfactory bulbs, immunohistochemistry, S-100, SNAP-25, development.*

Laboratory of Nervous System Development, RAMS Institute of Human Morphology, Moscow