

А.В. Ревущин, В.Е. Охотин и Г.В. Павлова

НОВЫЕ КАЛЬРЕТИНИН-ПОЗИТИВНЫЕ КЛЕТКИ С ПОЛИМОРФНЫМИ ШИПИКАМИ В ПЕРЕДНЕМ МОЗГУ МЫШЕЙ В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

Лаборатория нейрогенетики и генетики развития (зав. — д-р биол. наук Г.В. Павлова) Института биологии гена РАН, Москва; e-mail: ve_okhotin@mail.ru

У взрослых мышей с помощью иммуногистохимического выявления кальретинина (CR) в структурах переднего мозга, прилежащих к переднему рогу бокового желудочка, нами была описана (Морфология, 2009, т. 135, вып. 3, с. 7–19) популяция ранее неизвестных моно- и биполярных клеток, тела и отростки которых покрыты полиморфными шипиками (PS). CR-позитивные шипиковые (CR⁺PS) клетки не содержат GAD67, располагаются в белом веществе и в слоях V–VI фронтальной области дорсомедиальной коры рядом с cingulum, в росто-дорсальной части caudate-putamen, в nucleus olfactorius anterior и в субэпендиме дорсолатерального угла бокового желудочка. В настоящей работе мы изучили распределение этих клеток у 7-дневных мышат. При сравнительном топографическом анализе дефинитивных и ранних CR⁺PS-клеток установлено, что у 7-дневных мышат CR⁺PS-клетки отсутствуют в местах их локализации у взрослых животных — переднем обонятельном ядре, корковой пластинке и внутренней части неостриатума. Вместе с тем, в небольшом количестве CR⁺PS-подобные клетки в этом возрасте выявляются внутри рострального миграционного пути, у передней границы неостриатума, вдоль дорсальной границы неостриатума с мозолистым телом, в субэпендимальном слое латеральной стенки бокового желудочка и в области cingulum. Эти данные указывают на возможность постнатального происхождения CR⁺PS-клеток. С целью проверки этой гипотезы были проведены эксперименты с постнатальным введением бромдезоксифуридина (BrdU) мышатам в возрасте 2–4 сут с последующим исследованием срезов мозга этих животных, зафиксированных в возрасте 20 сут. Двойное иммуномечение срезов на CR и BrdU показало наличие CR⁺PS-клеток, содержащих постнатально введенный BrdU. Полученные данные доказывают, что, по крайней мере, часть CR⁺PS-клеток проходят митоз в постнатальном возрасте. По всей вероятности, в период с 7-х по 20-е сутки постнатального развития CR⁺PS-клетки мигрируют в места их локализации у взрослых животных.

Ключевые слова: шипиковые кальретинин-позитивные клетки, миграция, передний мозг, постнатальное развитие, мышшь.

Ранее у взрослых мышей с помощью иммуногистохимического метода, выявляющего кальретинин (CR), в структурах переднего мозга, прилежащих к переднему рогу бокового желудочка, была обнаружена новая популяция клеток характерного строения [2]. Эти клетки имеют мелкие (8–10 мкм) округлые тела, от которых отходят 1, редко 2 узловатых отростка, несущие многочисленные полиморфные шипики (PS) и неправильной формы утолщения. Относительно толстые первичные отростки ветвятся на более тонкие, также формирующие утолщения и шипики различной величины и строения. CR-позитивные клетки с полиморфными шипиками (CR⁺PS) располагаются в белом подкорковом веществе, в слое VI, значительно реже — в слое V фронтальной области дорсомедиальной коры по соседству с поясным пучком (cingulum). Кроме того, CR⁺PS-клетки присутствуют в росто-дорсальной части комплекса хвостатое ядро — скорлупа (caudate-putamen), в переднем обонятельном ядре (NOA; nucleus olfactorius anterior), в субэпендимальном слое дорсолатерального угла бокового желудочка и редко — у дорсальной его стенки. Было

установлено, что CR⁺PS-клетки являются особыми видоспецифическими элементами, которые отсутствуют в мозгу крыс и других животных (кролика, кошки). По нашим данным, CR⁺PS-клетки не содержат многих маркерных белков нервных и глиальных клеток, в частности, они не экспрессируют такие Ca-связывающие белки, как кальбиндин и парвальбумин [2]. В CR⁺PS-клетках отсутствует декарбоксилаза глутаминовой кислоты (GAD67) — маркерный фермент ГАМК-ергических нейронов, что в известной степени находится в противоречии с представлениями о том, что все CR⁺-клетки в коре являются ГАМК-ергическими нейронами [3–6, 8, 9]. Сопоставление полученных нами результатов [2] с данными литературы [5, 7, 10, 11] позволило сделать вывод, что исследованные клетки представляют собой новый, ранее не известный фенотип клеточных элементов переднего мозга и предположить, что многие, если не все CR⁺PS-клетки, появляются после рождения. Целью настоящей работы явилось определение сроков появления этих клеток в раннем постнатальном периоде. Для этого мышатам в возрасте 2–4 сут вводили бромдезок-

сиуридин (BrdU) с последующим иммуногистохимическим тестированием его включения в ДНК CR⁺PS-клеток у тех же животных в возрасте 20 сут.

Материал и методы. Для иммуногистохимического исследования срезов мозга мышей раннего постнатального возраста кровеносную систему 7-дневных мышат линий СЗН и 101/ну [1] (по 2 мыши каждой линии), предварительно усыпленных уретаном, промывали сначала раствором фосфатно-солевого буфера (рН 7,4) в физиологическом растворе (PBS), а затем фиксирующим раствором: 4% раствором параформальдегида в PBS. После этого мозг погружали в фиксирующий раствор на 5–6 ч, после чего пропитывали в 30% растворе сахарозы в PBS 12 ч при 4 °С. На фронтальных срезах полушарий большого мозга толщиной 40 мкм иммуногистохимически выявляли CR с помощью поликлональных антител (Swant, Швейцария) при разведении 1:500. Для этого срезы опускали на ночь в раствор этих антител, разведенных PBS, содержащим 2% нормальной сыворотки козы, 0,3% Triton X-100 и 0,01% азида натрия, охлажденный до 4 °С. На следующий день срезы после трехкратной промывки в PBS помещали в раствор биотинилированных антител к иммуноглобулину кролика (Vector Laboratories, США), разведенных PBS в соотношении 1:100, с добавлением 0,3% Triton X-100 на 1 ч при комнатной температуре. После этого срезы трехкратно промывали в PBS и помещали в раствор авидин-биотинового комплекса (Vector Laboratories, США) в PBS при разведении 1:200 на 1 ч. После трехкратной промывки проводили стандартную реакцию на пероксидазу с помощью 0,03% раствора диаминобензидина (Sigma, США) в PBS с добавлением 0,01% перекиси водорода. Далее срезы помещали на предметные стекла, обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации и заключали в синтетическую просветляющую среду DPX (Fluka, Германия). Часть срезов после иммуногистохимической реакции докрашивали нейтральным красным. В работе также использованы полученные в ходе предыдущего исследования [2] срезы мозга взрослых мышей линии СЗН, на которых иммуногистохимически выявляли CR описанным выше методом.

В экспериментах по постнатальному введению BrdU 3 мышатам линии СЗН внутрибрюшинно инъецировали раствор BrdU в PBS (в количестве 1 мг BrdU на 10 г массы животного) 1 раз в день, начиная со 2-х суток после рождения по 4-е сутки включительно. В возрасте 20 сут животные были усыплены летальной дозой уретана. Все опыты проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР).

Фронтальные срезы толщиной 40 мкм, изготовленные на замораживающем микротоме, промывали в дистиллированной воде (5 мин) и погружали в 2-нормальный раствор соляной кислоты на 30 мин при 37 °С.

После промывки в дистиллированной воде и трехкратной промывки в PBS срезы на 12 ч погружали в коктейль первичных антител. Использовали смесь поликлональных кроличьих антител к CR (Chemicon, США) в разведении 1:100 и моноклональных мышинных антител к BrdU той же фирмы в разведении 1:10 в растворе PBS с добавлением детергента и нормальной сыворотки осла. Затем после промывки срезы на 1 ч погружали в коктейль ослиных антимышинных антител, помеченных флюоресцентным красителем Cy2 и ослиных же антикроличьих антител, помеченных флюоресцентным

красителем Texas Red (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Великобритания) в разведении 1:100. Срезы монтировали на предметных стеклах, высушивали, покрывали глицерином и рассматривали с помощью флюоресцентного микроскопа Olympus (Япония). В дальнейшем срезы были исследованы с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа TCS SP2 (Leica, ФРГ).

Результаты исследования. При исследовании срезов переднего мозга взрослых мышей найдены CR-иммунопозитивные мелкие клетки характерного строения, имеющие 1, реже 2 тонких извилистых отростка, с многочисленными утолщениями и шипиками разной формы (CR⁺PS). Примеры типичных дефинитивных монополярных CR⁺PS-клеток подкоркового белого вещества и стриатума показаны на рис. 1.

С целью выяснения вопроса о времени появления CR⁺PS-клеток проведено изучение срезов мозга 7-дневных мышат после проведения иммуногистохимической реакции на CR. Исследование показало полное отсутствие CR⁺PS-клеток в основных областях их распространения в мозгу взрослых мышей. Они отсутствовали в пределах корковой пластинки, в переднем обонятельном ядре и внутренних частях неостриатума. Вместе с тем, в ряде областей переднего мозга постоянно выявлялись CR⁺-клетки, по морфологическим характеристикам сходные с CR⁺PS-клетками. Эти CR⁺PS-подобные клетки имели один или два узловатых отростка с очень редкими шипиками разной формы. Единственный отросток в проксимальной части по толщине был сопоставим с диаметром клетки и постепенно становился тоньше с удалением от тела. В дистальной части отросток ветвился, образуя тонкие веточки с утолщениями и шипиками (рис. 2, е). Второй отросток у биполярных CR⁺PS-подобных клеток был одинаково тонким на всем протяжении и также формировал утолщения и шипики. CR⁺PS-подобные клетки в очень небольшом количестве располагались внутри рострального миграционного пути (см. рис. 2, а, б), у передней границы неостриатума (см. рис. 2, в, г), вдоль дорсальной границы неостриатума с мозолистым телом (см. рис. 2, д, е), в субэпендимальном слое латеральной стенки бокового желудочка и в поясном пучке (не проиллюстрировано) на уровне бахромки (fimbria) гиппокампа.

На срезах мозга 20-дневных мышей при реакции на CR выявляются клетки, которые приобретают строение, типичное для дефинитивных CR⁺PS-клеток (рис. 3, а), и свойственную им топографию, располагаясь в областях, обычных для локализации этих клеток у взрослых мышей, хотя они встречаются в несколько меньших количествах. Следует отметить, что как и у взрослых

животных, в CR⁺PS-клетках 20-дневных мышей отсутствует ядерный нейрональный маркер — NeuN (см. рис. 3, б), однако до 70% клеток содержат ядра, дающие более или менее яркую реакцию на BrdU (рис. 4, 5). Исследование с помощью конфокальной микроскопии подтвердило принадлежность ядер, содержащих BrdU, профилю CR⁺PS-клеток. При этом CR⁺PS-клетки, содержащие BrdU, были найдены как в новой коре (см. рис. 4), так и в неостриатуме (см. рис. 5) и субэпендиме.

Обсуждение полученных данных. Полученные в настоящей работе результаты подтверждают особый характер описанных ранее [2] CR⁺PS-клеток. Они позволяют сделать вывод, что, по крайней мере, часть из них имеют постнатальное происхождение. Наличие BrdU в ядрах CR⁺PS-клеток типичного строения в мозгу 20-дневных животных позволяет заключить, что митотическая активность этих клеток или их предшественников продолжалась в постнатальном возрасте (2–4-е сутки после рождения).

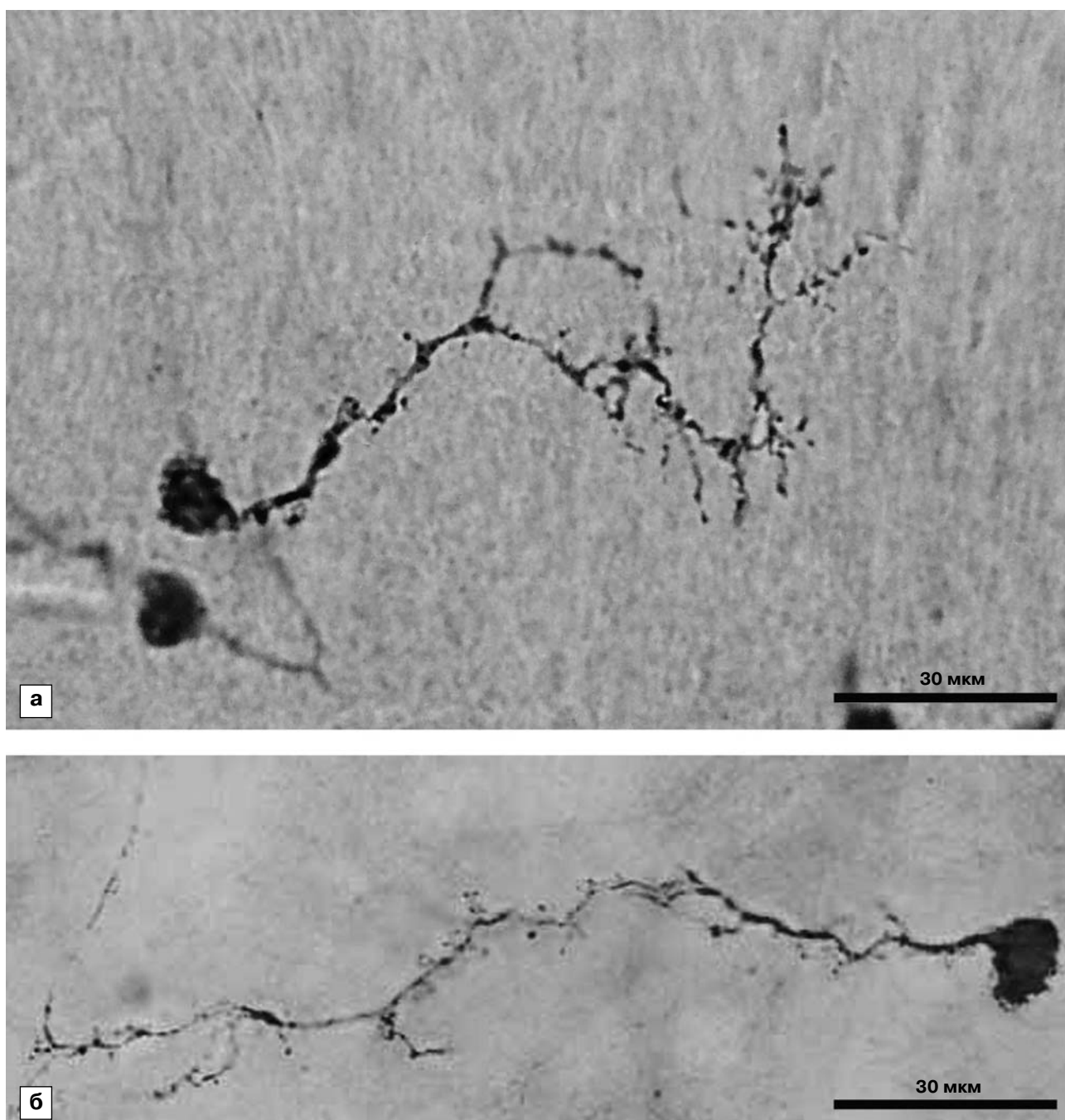


Рис. 1. Типичные униполярные CR⁺PS-клетки подкоркового белого вещества (а) и стриатума (б) мозга взрослой мыши. Иммуногистохимическая реакция на кальретинин.

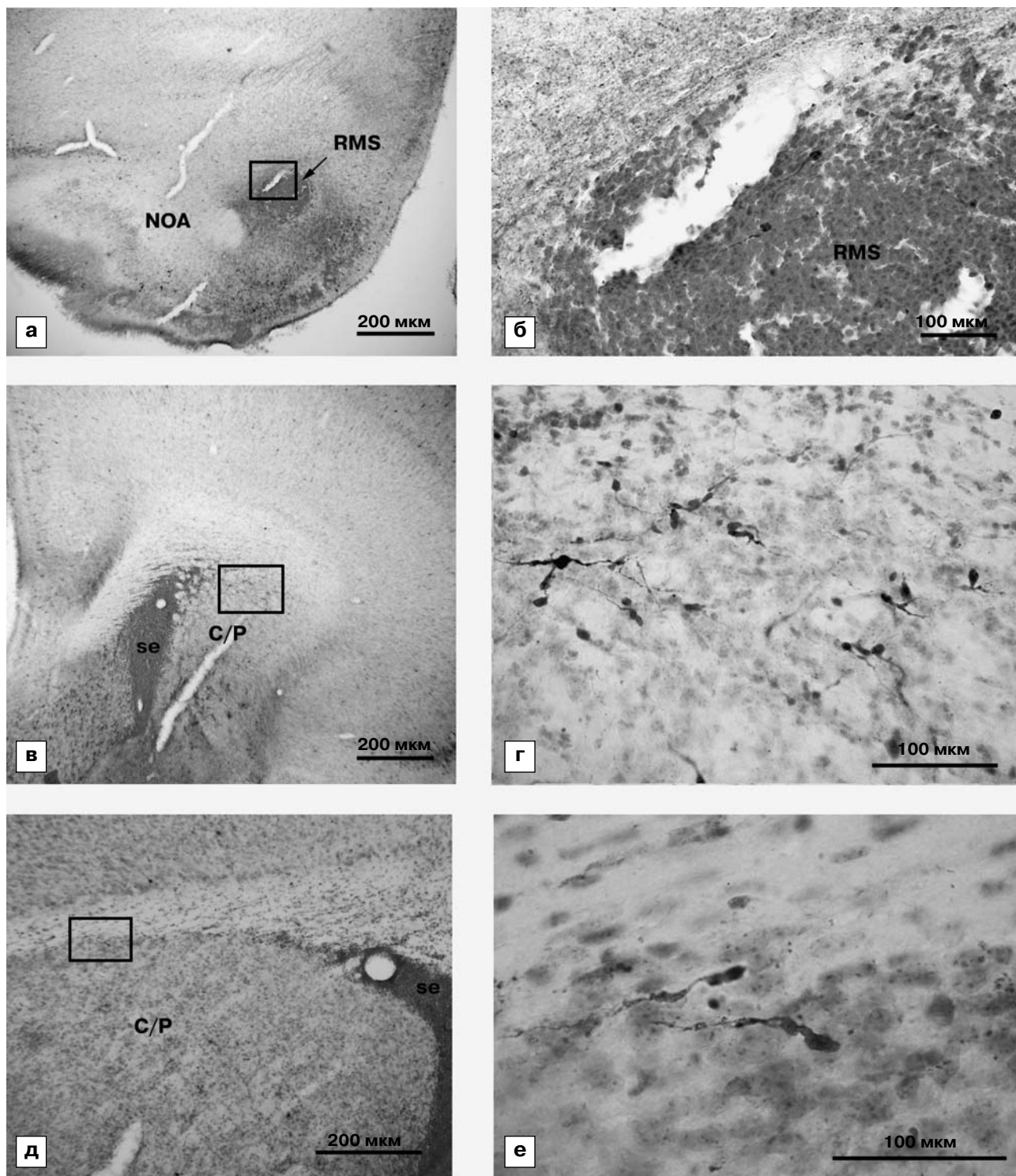


Рис. 2. CR⁺PS-подобные клетки в мозгу 7-дневных мышат.

а, б — локализация в ростральном миграционном пути; в, г — вблизи субэпендимальной области в стриатуме; д, е — на дорсальной границе стриатума. Фрагменты, выделенные на рис. 2, а, в, д, показаны под большим увеличением на рис. 2, б, г, е соответственно. Типичные монополярные CR⁺PS-подобные клетки с толстым проксимальным отростком располагаются вдоль дорсальной границы стриатума с мозолистым телом (е). NOA — переднее обонятельное ядро; se — субэпендима; RMS — ростральный миграционный путь; C/P — хвостатое ядро — скорлупа (caudate-putamen). Иммуногистохимическая реакция с антителами к кальретинину, докраска нейтральным красным.

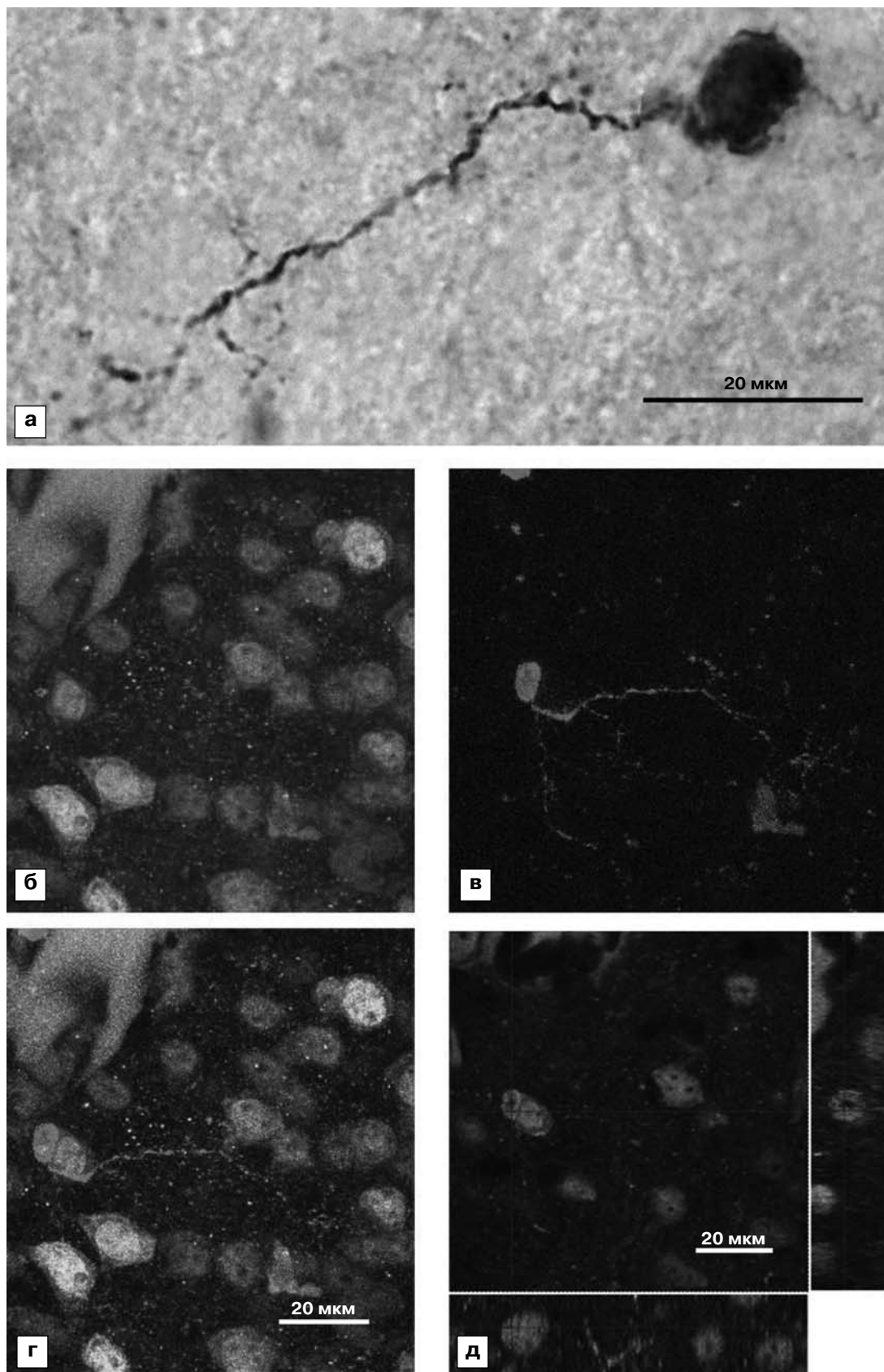


Рис. 3. Характерные формы CR⁺PS-клеток хвостатого ядра — скорлупы (а) и неокортекса (б — д) 20-дневной мыши.

а — иммуногистохимическая реакция на кальретиин (CR); б — д — CR⁺PS-клетки, при реакции на CR (красная флюоресценция) и ядер нейронов коры мозга при реакции на NeuN (зеленая флюоресценция; частично окрашены также и тела нейронов); б — выявление NeuN; в — выявление CR; г — совмещение двух реакций; д — реконструкция ортогональных проекций при совмещении реакций. Конфокальная микроскопия.

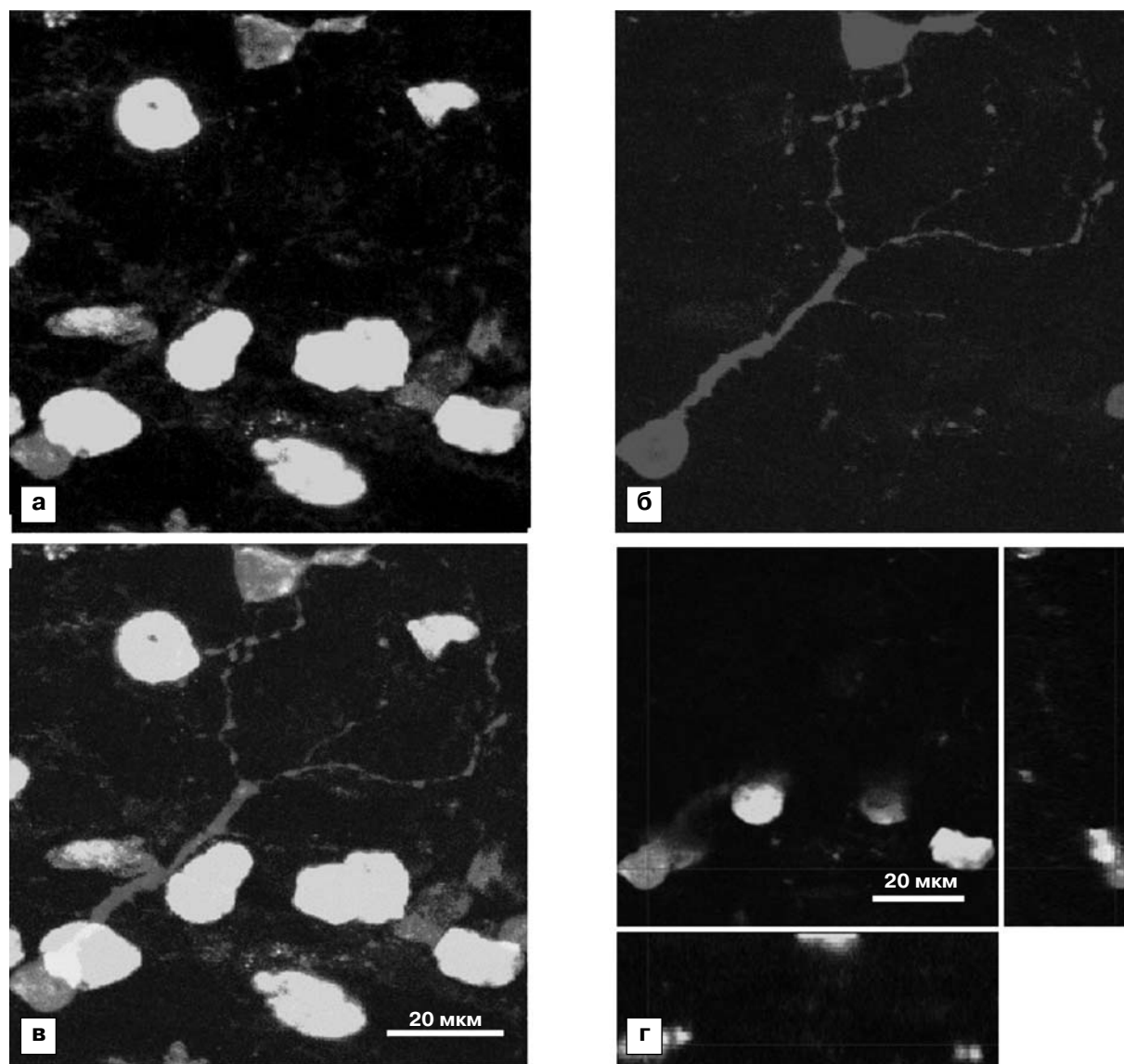


Рис. 4. CR⁺PS-клетки коры мозга 20-дневной мыши при реакции на кальретинин (CR), содержащей также и BrdU, инъецированный в возрасте 2–4 сут постнатального развития.

а — выявление BrdU; б — выявление CR; в — совмещение двух реакций; г — реконструкция ортогональных проекций при совмещении реакций. Двойное иммуногистохимическое выявление CR (красная флюоресценция) и BrdU (зеленая флюоресценция). Конфокальная микроскопия.

В работе также показано, что в мозгу 7-дневных мышат отсутствуют типичные для взрослых животных CR⁺PS-клетки. Одновременно в пределах субэпендимы и в некоторых прилежащих областях переднего мозга 7-дневных мышей идентифицированы CR⁺PS-подобные клетки. По размерам и наличию не более 1–2 отходящих от тела отростков, несущих утолщения и шипики, они сходны с CR⁺PS-клетками взрослых мышей. При этом CR⁺PS-подобные клетки у 7-дневных животных отсутствуют в трех образованиях переднего мозга: в корковой пластинке, переднем обонятельном ядре и внутренней части неостриата-

ма — местах обычной локализации CR⁺PS-клеток у взрослых мышей [2]. Кроме того, у взрослых мышей таких CR⁺PS-подобных клеток с более толстым проксимальным отростком мы не наблюдали. Возможно, что наличие более толстого отростка в проксимальной его части обусловлено состоянием миграции CR⁺PS-подобных клеток.

Все изложенное выше позволяет предполагать, что появляющиеся после рождения CR⁺PS-подобные клетки в период от 7-х до 20-х суток постнатального развития мигрируют в места локализации дефинитивных CR⁺PS-клеток мозга у взрослых мышей, где и приобретают свое типич-

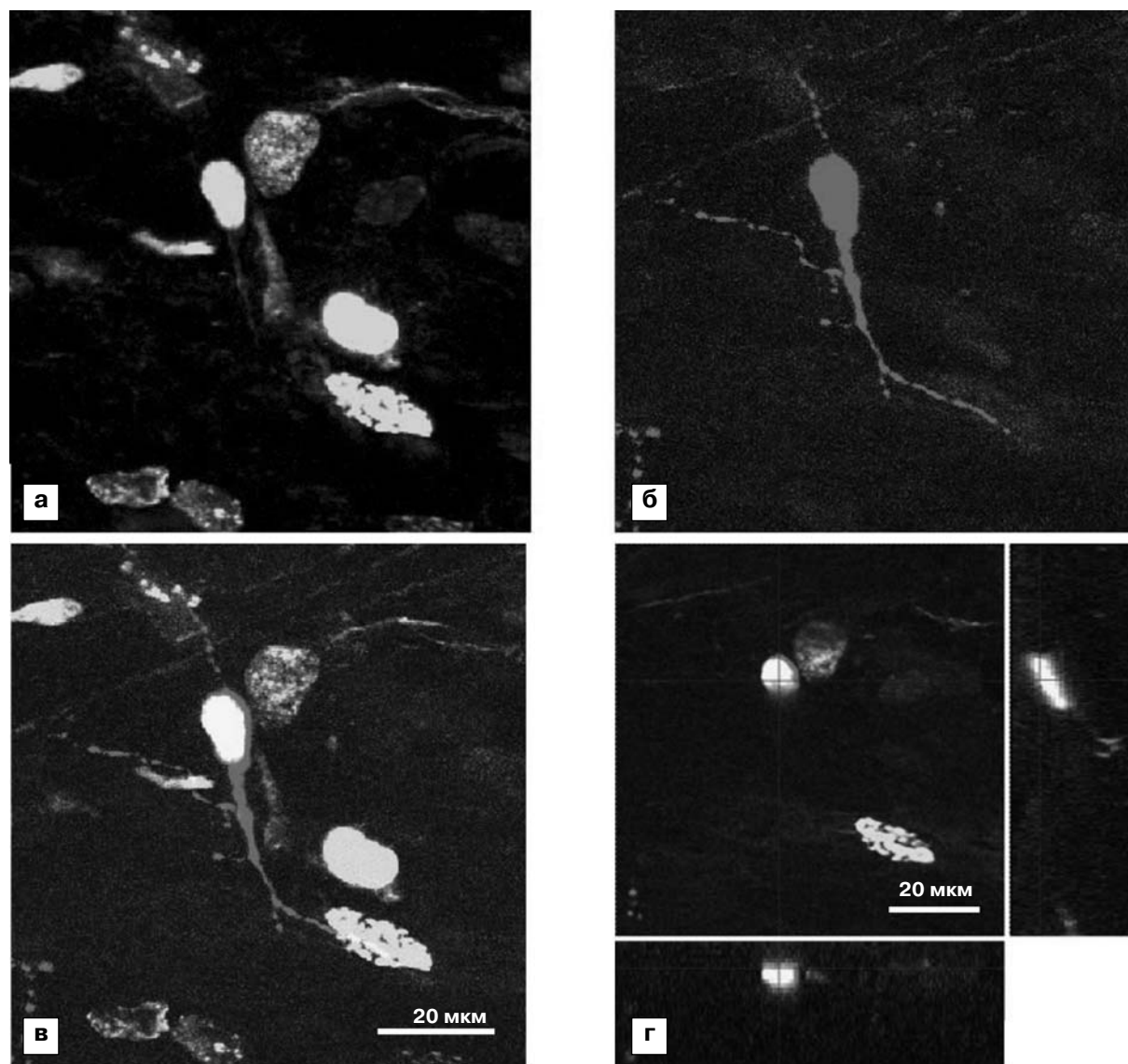


Рис. 5. CR⁺PS-клетки хвостатого ядра — скорлупы при реакции на кальретинин (CR), содержащей также и BrdU, инъецированный в возрасте 2–4 сут постнатального развития.

а — выявление BrdU; б — выявление CR; в — совмещение двух реакций; г — реконструкция ортогональных проекций при совмещении реакций. Двойное иммуногистохимическое выявление CR (красная флюоресценция) и BrdU (зеленая флюоресценция). Конфокальная микроскопия.

ное строение по окончании миграции. Дальнейшие исследования CR⁺PS-клеток в ходе постнатального развития переднего мозга мышей позволят подтвердить или, напротив, опровергнуть эти предположения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 07-04-00835-а и 09-04-13868-офи_ц), Госконтракта № 02[1].512.11.2224 Федерального агентства по науке и инновациям, а также Госконтракта Федерального агентства по образованию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бояршинова О.С., Ревущин А.В., Полетаева И.И. и др. Неонатальное введение АКГГ₄₋₁₀ и его аналога семакса

детенышам лабораторной мыши модулирует число катехоламинергических нейронов в промежуточном мозге взрослого животного. Докл. РАН, 2004, т. 396, № 1, с. 129–131.

2. Ревущин А.В., Охотин В.Е., Корочкин Л.И. и др. Новая популяция шипиковых кальретинин-позитивных, предположительно ненейрональных клеток в переднем мозгу мышей. Морфология, 2009, т. 135, вып. 3, с. 7–19.
3. Cauli B., Audinat E., Lambolez B. et al. Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. J. Neurosci., 1997, v. 17, p. 3894–3906.
4. Dayer A.G., Cleaver K.M., Abouantom T. et al. New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. J. Cell. Biol., 2005, v. 168, p. 415–427.

5. DeFelipe J. Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J. Chem. Neuroanat.*, 1997, v. 14, p. 1–19.
6. Gonchar Y. and Burkhalter A. Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cereb. Cortex*, 1997, v. 7, p. 347–358.
7. Jankovski A., Garcia C., Soriano E. et al. Proliferation, migration and differentiation of neuronal progenitor cells in the adult mouse subventricular zone surgically separated from its olfactory bulb. *Eur. J. Neurosci.*, 1998, v. 10, p. 3853–3868.
8. Lüth H.J., Blümcke I., Winkelman E. et al. The calcium-binding protein calretinin is localized in a subset of interneurons in the rat cerebral cortex: a light and electron immunohistochemical study. *J. Hirnforsch.*, 1993, v. 34, p. 93–103.
9. Rogers J.H. Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *J. Cell Biol.*, 1987, v. 105, p. 1343–1353.
10. Xu X., Roby K.D. and Callaway E.M. Mouse cortical inhibitory neuron type that coexpresses somatostatin and calretinin. *J. Comp. Neurol.*, 2006, v. 499, p. 144–160.
11. Yang Z., You Y. and Levison S.V. Neonatal hypoxic/ischemic brain injury induces production of calretinin-expressing interneurons in the striatum. *J. Comp. Neurol.*, 2008, v. 511, № 1, p. 19–33.

Поступила в редакцию 25.09.09
Получена после доработки 08.10.09

NOVEL CALRETININ-POSITIVE CELLS WITH POLYMORPHOUS SPINES IN MOUSE FOREBRAIN DURING EARLY POSTNATAL ONTOGENESIS

A.V. Revishchin, V.Ye. Okhotin and G.V. Pavlova

Using an immunocytochemical method for calretinin (CR) detection, we have earlier described (Morfologiya, 2009 v. 135,

№ 3, p. 7–19) the population of previously unknown mono- and bipolar cells with polymorphous spines (PS) covering their cell bodies and processes, in adult mice forebrain structures adjacent to anterior horn of lateral ventricle. CR-positive spiny (CR⁺PS) cells were negative to GAD67 and were detected in the white matter and in layers V and VI of frontal area of dorsomedial cortex close to the cingulum, in in rostro-dorsal part of the caudate nucleus–putamen complex, anterior olfactory nucleus and in subependymal layer of the dorso-lateral angle of the lateral ventricle. In this work, the distribution of these cells in 7-day-old mice was studied. Comparative topographical analysis of definitive and early CR⁺PS cells demonstrated that in 7-day-old mice CR⁺PS cells were absent from the areas of their localization in adult animals – anterior olfactory nucleus, cortical plate and inner portion of neostriatum. Meanwhile, some CR⁺PS-like cells were detected in 7-day-old mice inside the rostral migratory route, close to neostriatum anterior boundary, along the dorsal border between neostriatum and corpus callosum, subependymal layer of lateral wall of the lateral ventricle, and in the cingulum area. These findings are indicative of the possible postnatal appearance of CR⁺PS cells. To test this hypothesis, the experiments were conducted in which bromodeoxyuridine (BrdU) was administered to the mice on their postnatal days 2–4 with the subsequent study of the brain sections of these animals sacrificed on their postnatal day 20. Double immunolabeling of these sections for CR and BrdU has detected the presence of CR⁺PS cells that contained postnatally administered BrdU. These results strongly suggest that, at least, some portion of CR⁺PS cells have their mitosis postnatally. It may be assumed, that CR⁺PS cells migrate to the sites of their distribution in adult animals from day 7 till day 20 of postnatal development.

Key words: *spiny calretinin-positive cells, migration, forebrain, postnatal development, mouse.*

Laboratory of Neurogenetics and Developmental Genetics, RAS Institute of Gene Biology, Moscow.