

Экспрессия даблкортина в обонятельной луковице и ростральном потоке у крыс инфантильного возраста после воздействия нейротоксина

Д. А. Пожилов, Т. А. Румянцева, В. Е. Варенцов, А. В. Москаленко
 ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет»
 Минздрава России, г. Ярославль, Россия

Целью работы явилось изучение изменения численной плотности нейробластов в обонятельной луковице и ростральном миграционном потоке у крыс после введения нейротоксина в инфантильном возрасте.

Материал и методы. Изучено распределение DCX, маркера незрелых нейронов, в обонятельных луковицах и ростральном потоке у крыс 30-, 60-, 90-, 180-суточного возраста для выявления динамики его экспрессии в эволютивном периоде онтогенеза. Моделирование нейротоксического воздействия осуществлялось трехкратным введением капсаицина на 30–32-е сут жизни в суммарной дозе 120 мг/кг. Материал для исследования забирали на 15-, 30- и 60-е сут эксперимента. Маркер выявляли на парасагиттальных парафиновых срезах с учетом слоев обонятельной луковицы. Определяли численную плотность DCX+ нейронов (шт/мм²) и их долю в общем количестве клеток.

Результаты. Установлены нормативные возрастные показатели численной плотности незрелых нейронов и их доли в популяции клеткок, а также аналогичные показатели на протяжении двух месяцев после токсического воздействия. Распределение DCX-позитивных клеток имеет топографические и возрастные особенности. Введение токсических доз капсаицина вызывает массовую гибель зрелых нейронов. В ответ на это развивается компенсаторная реакция, проявляющаяся активацией нейрогенеза в стволовых нишах мозга, результатом чего является повышение численной плотности нейробластов рострального потока.

Выводы. Активизация нейрогенеза при нейродегенерации вызывает увеличение количества DCX+ нейрональных предшественников в обонятельной луковице уже через 30 сут после воздействия и сохранение высоких показателей до конца наблюдения.

Ключевые слова: нейрогенез, обонятельная луковица, ростральный миграционный поток, нейробласты, даблкортин, DCX, нейротоксин.

© D. A. Pozhilov, T. A. Rumyantseva, V. E. Varentsov, A. V. Moskalenko, 2018
 Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia

Doublecortin Expression in the Olfactory Bulb and Rostral Stream in Infantile Rats after Exposure to Neurotoxin

The aim of the study was to investigate changes of neuroblasts' numeral destiny in rats' olfactory bulb and rostral migratory stream after neurotoxic action in infant age.

Material and methods. The distribution of DCX, a marker of immature neurons, was studied to reveal the dynamics of its expression in the evolutionary period of ontogenesis in olfactory bulbs and rostral migratory stream in 30, 60, 90, and 180-day-old rats. Modeling of neurotoxic effects was carried out by three times injections of capsaicin on the 30–32 day of life in a total dose of 120 mg/kg. The material for the study was sampled on the 15-, 30- and 60th days of the experiment. The marker was detected on parasagittal paraffin sections, taking into account the layers of the olfactory bulb. The numerical density of DCX+ neurons (pcs/mm²) and their part in the total number of cells were determined.

Results. The standard age indicators of the numerical density of immature neurons and their share in the cell population, as well as similar indicators for two months after toxic effects, were established. The administration of toxic doses of capsaicin causes a massive death of mature neurons. Compensatory reaction manifested by activation of neurogenesis in the brain stem niches and an increase in the numerical density neuroblasts in the rostral stream.

Conclusions. Activation of neurogenesis during neurodegeneration causes an increase in the number of DCX + neuronal progenitors in the olfactory bulb after 30 days after exposure and maintaining high levels until the end of observation.

Key words: neurogenesis, olfactory bulb, rostral migration stream, neuroblasts, doublecortin, DCX, neurotoxin.

Введение

Современные исследования показывают, что нейрогенез осуществляется не только в пренатальном и неонатальном периоде онтогенеза, но и на протяжении всей жизни [1, 5, 11]. Исследования возрастных особенностей нейрогенеза в норме и при экспериментальном повреждении могут существенно расши-

рить представления о нейродегенеративных заболеваниях и возможностях терапии.

Исследованиями последних лет установлено, что большинство нервных клеток, в связи с особенностями своей структурно-функциональной организации, содержат ряд специфических белков, ассоциированных с органеллами цитоскелета – микротрубочками и промежуточными филаментами, которые не

характерны для глиальных клеток и большинства иных клеток организма. Таким образом, появление этих белков в постмитотических клетках может свидетельствовать об их нейрональной дифференцировке, а применение методов их иммуноцитохимического выявления должно обеспечивать селективное обнаружение нейробластов и дифференцирующихся нейронов как *in vivo*, так и *in vitro*. Расшифровка механизмов реализации нейрональной дифференцировки неспециализированных прогениторных клеток и установление факторов среды, способных повлиять на нейрогенез, лежат в основе дальнейшего прогресса науки на пути управления восстановительными процессами в ЦНС [3].

DCX интенсивно экспрессируется в постмитотических нейробластах и накапливается в дистальной части нейритов. В проксимальных отделах конусов роста DCX необходим растущим отросткам, где он, предположительно, участвует в сложных процессах, опосредуемых мембранными рецепторами и молекулами адгезии, обеспечивая правильный выбор пути для роста аксона и для миграции клетки [8].

Существует большое количество работ, исследующих экспрессию даблкортина в норме [3, 8]. Работы, посвященные его экспрессии при патологии или экспериментальном воздействии, немногочисленны [4, 7, 12], в них слабо отражен возрастной аспект.

Целью работы явилось изучение изменения численной плотности нейробластов в обонятельной луковице (ОЛ) и ростральном миграционном потоке (РМП) у крыс после введения нейротоксина в инфантильном возрасте.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на самцах крыс линии Wistar. Животные были разделены на контрольную и экспериментальную группы. В контрольную вошли 20 крыс возрастом 30, 60, 90, 180 сут, по 5 особей каждого возраста. Согласно классификации И.П. Западнюка [2], эти возраста соответствуют инфантильному (30 сут) и ювенильному (60 и 90 сут). Зрелый возраст (180 сут) взят в качестве контрольной точки для определения дефинитивных показателей в конце эволютивного периода.

В экспериментальную группу вошли 20 крыс линии Wistar 30-суточного возраста. Капсаицин вводили трехкратно с интервалом в сутки, подкожно в дозировке 30, 30 и 60 мг/кг массы тела соответственно. Капсаицин разводили в смеси 10% ТВИН-80, 10% этанола и 80% физиологического раствора.

Использованная доза капсаицина относится к высоким: 100–200 мг/кг сразу после введения стимулируют экспрессию нейропептидов, а затем оказывают токсическое дейст-

вие [6], которое реализуется через деполяризацию мембран клеток и повышение проводимости неспецифических ионных каналов. Это ведет к накоплению в клетках Ca^{2+} и Na^{+} . Ионы кальция активируют рилизинг нейромедиаторов, а натрий в составе NaCl смещает осмотическое равновесие, приводя впоследствии к гидратации, активации протеаз и гибели клеток [6].

Животные выводились из эксперимента на 15-, 30-, 60-е сут от начала эксперимента. Оценивались морфологические изменения на протяжении двух месяцев после токсического воздействия. Все процедуры проводили в соответствии со строгим соблюдением принципов, изложенных в Руководстве по разведению и работе с лабораторными животными [9], в соответствии с приказом МЗ СССР от 12.08.1977 г. «Правила проведения работы с использованием экспериментальных животных». Получено разрешение этического комитета ЯГМУ. Использовался уретановый наркоз (1000 мг/кг, внутривенно). Материал забирали после предварительной транкардиальной перфузии 10% раствором забуференного формалина и фиксации в течение 24 ч при 4°C.

Исследование проведено на парафиновых парасагитальных серийных срезах мозга крыс, проходящих через центральную часть ОЛ. Использовали кроличьи поликлональные антитела к даблкортину (DCX) (ab18723, UK, разведение 1:500), вторичные антитела (Goat anti Rabbit IgG, ab97051, UK, разведение 1:1000). Детекцию пероксидазы проводили диаминобензидиновым хромогеном DAB Substrate Kit (ab64238). Срезы докрашивали гематоксилином Майера, промывали в воде, обезживали, заключали в канадский балзам. Микроскопировали при помощи светового микроскопа Optica DM-20 (Italy 2015) со встроенной камерой. На каждом срезе в 50 полях зрения оценивали численную плотность распределения DCX+ нейронов (шт/мм²) и их доля в общем количестве клеток. Результаты обрабатывали в программе Microsoft Excel 2010 методами вариационной статистики, вычисляли среднее арифметическое и стандартное отклонение. Достоверность различий при нормальном распределении показателей оценивали при помощи критерия Стьюдента, при отличном от нормального – использовали непараметрический критерий Уилкоксона (уровень значимости $p < 0.05$).

Результаты и их обсуждение

DCX+ нейробласты имеют округлую или овоидную форму. В середине РМП клетки плотно уложены и не имеют отростков (рис. 1 А). Клетки в дистальной части РМП имеют по одному слабоизвитому неветвящемуся отро-

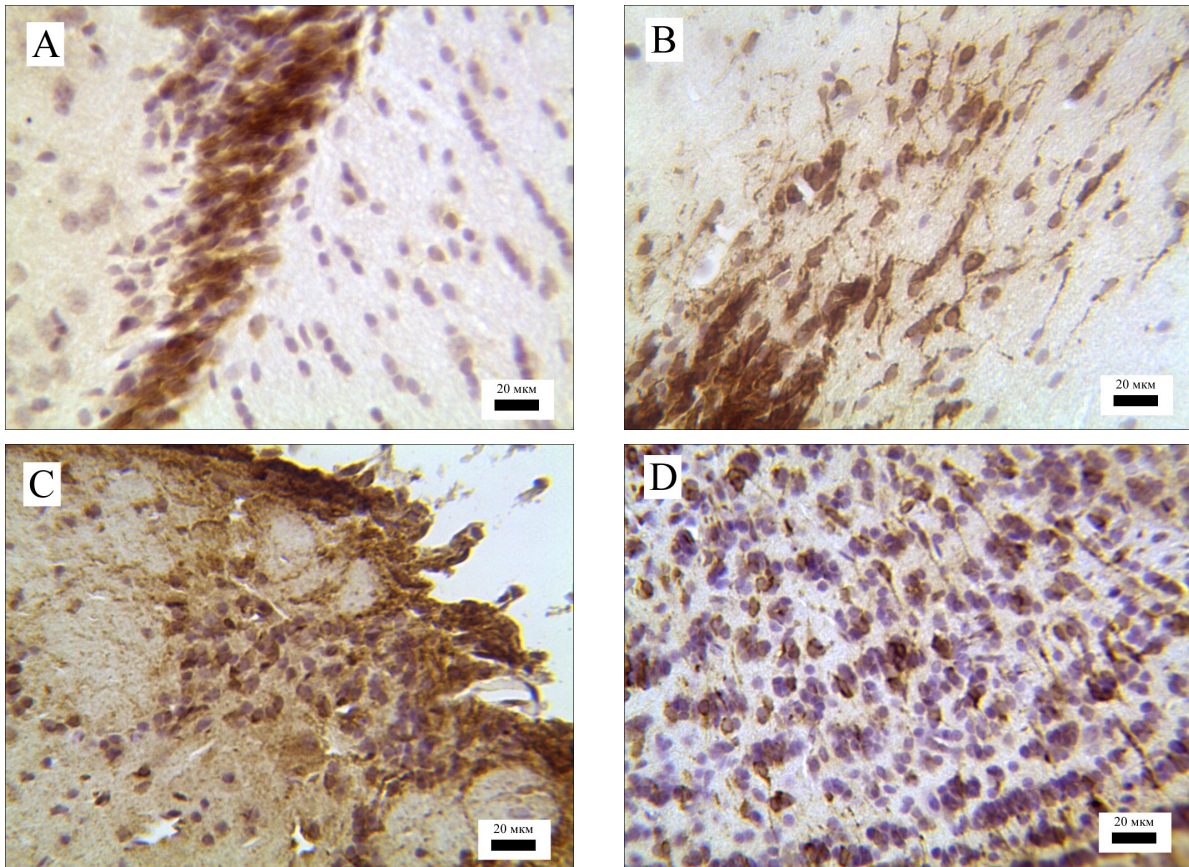


Рис. 1. Распределение DCX+ клеток в слоях обонятельной луковицы (ОЛ) и в ростральном миграционном потоке (РМП) у крыс разного возраста. Обозначения: А – 2 мес., проксимальная часть РМП; В – 2 мес., дистальная часть РМП; С – 3 мес., гломерулярный слой ОЛ; D – 3 мес., гранулярный слой ОЛ. Микрофото: иммуногистохимическое исследование, антитела к DCX, система детекции с пероксидазой (коричневая метка), докраска гематоксилином Майера. Ув. 400.

стку. Они расположены менее плотно, их отростки направлены хаотично (рис. 1 В). По мере движения через гранулярный слой, отростки клеток приобретают радиальное направление (рис. 1 D). В наружном плексиформном слое выявляются единичные клетки, в гломерулярном слое DCX+ клетки не имеют позитивных отростков, включены в состав клубочков. На всем протяжении наблюдения их концентрация максимальна в вентральной части обонятельной луковицы (рис. 1 С).

В контрольной группе в гломерулярном слое численная плотность DCX+ нейронов с 30-х по 60-е сут жизни снижается с 1174 ± 25.9 до 465 ± 19.7 на мм^2 (с 6–7 до 3–4 в пересчете на клубочек), к 90-м сут снижается до 389 ± 21.2 на мм^2 (4–5 на клубочек), к 180-м сут численная плотность повышается до 551 ± 39.9 на мм^2 (плотность клеток на клубочек снижается до 2–3) ($p < 0.05$ для соседних сроков). Доля позитивных клеток в общем количестве на 30-е сут составляет 27–29%, на 60-е сут – 10%, на 90-е – 5–6%, к 180-м сут не изменяется. Согласно данным литературы, изменение количества перигломерулярных DCX+ нейробластов и показателя их численной плотности обусловлены в основном увеличением

размеров клубочков, а не изменением количества DCX+ клеток [5, 10].

В наружном плексиформном и митральном слоях незрелые клетки на всех сроках наблюдения встречаются единично, до 1–2 в поле зрения.

Среди всех слоев ОЛ именно гранулярный наиболее выражен и имеет однородный клеточный состав, где подсчет численной плотности позитивных клеток не осложняется наличием сложноорганизованных конструкций. В гранулярном слое плотность DCX+ нейронов с 30-х по 60-е сут возрастает с 526 ± 66.6 до 1045 ± 69.1 на мм^2 , к 90-м сут снижается до 710 ± 18 на мм^2 , к 180-м сут уменьшается до значений 30-суточных животных ($p < 0.05$ для соседних сроков). Доля позитивных нейронов в общем количестве клеток на 30 суток составляет 8–11%, на 60-е сут – 16%, на 90-е сут – 5–7%, к 180-м сут достоверно не изменяется. Динамика численной плотности позитивных клеток от 30-х до 180-х сут в гранулярном слое ОЛ показывает, что максимальная плотность нейрональных предшественников регистрируется не в инфантильном возрасте, что можно было ожидать, а в начале ювенильного (60-е сут). Этот период, предше-

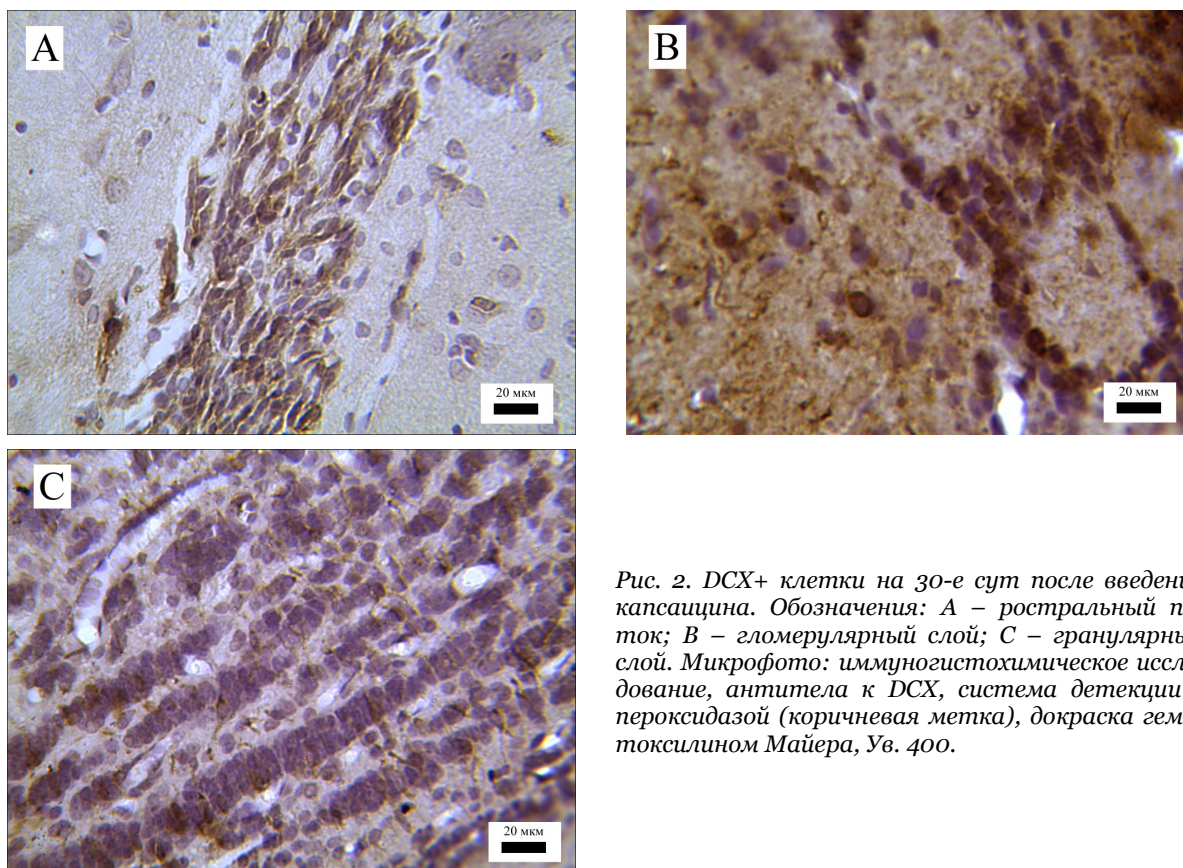


Рис. 2. DCX+ клетки на 30-е сут после введения капсаицина. Обозначения: А – ростральный поток; В – гломерулярный слой; С – гранулярный слой. Микрофото: иммуногистохимическое исследование, антитела к DCX, система детекции с пероксидазой (коричневая метка), докраска гематоксилином Майера, Ув. 400.

ственник полового созревания, является фазой интенсивного нейрогенеза [5, 11].

В ростральном потоке плотность незрелых нейронов на 30-е сут составляет 840 ± 96.1 , на 60-е сут – 1161 ± 170.8 на мм^2 , к 90-м сут достигает 1492 ± 96.0 на мм^2 ($p < 0.05$ для соседних сроков) и до 180-х сут достоверно не изменяется. Следует отметить, что на 30-е сут DCX+ клетки распределяются на всем протяжении потока равномерно, а к 180-м сут – преимущественно в дистальной его части. Такие показатели доказывают, что интенсивность образования предшественников в основной стволовой нише – субвентрикулярной зоне, резко замедляется, что приводит на протяжении ювенильного периода (60–90-е сут) к истощению потока DCX+ клеток, а вслед за этим приводит к снижению на 180-е сут численной плотности незрелых клеток и в ОЛ.

Через месяц после введения капсаицина в гломерулярном слое численная плотность DCX+ нейронов повышается с 1174 ± 25.9 до 1432 ± 89.5 на мм^2 (с 6–7 до 7–8 в пересчете на клубочек) (рис. 2 В), к 60-м сут снижается до 1083 ± 164.8 на мм^2 (6 на клубочек), ($p < 0.05$). Доля позитивных клеток в общем количестве перед началом эксперимента составляет 27–29%, на 30-е сут эксперимента – 32%, на 60-е сут – 15% ($p < 0.05$ для соседних сроков).

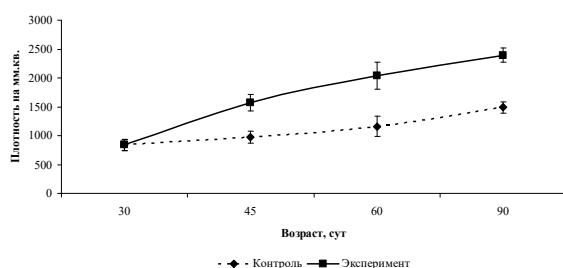
Численная плотность нейрональных предшественников в гломерулярном слое ОЛ у экспериментальной группы на пике токсического воздействия (15-е–30-е сут эксперимента) выше в 3–4 раза по сравнению с кон-

трольной группой (45-е–60-е сутки жизни). Этот феномен отмечен и в работе [12], описавшем при острой массовой гибели нейронов падение экспрессии DCX на 1-е сут и восстановление с превышением нормы на 14-е сут.

В наружном плексиформном и митральном слоях ОЛ незрелые клетки на всех сроках наблюдения встречаются единично, до 3–4 в поле зрения.

В гранулярном слое плотность DCX+ нейронов к 30 суткам эксперимента возрастает с 526 ± 66.6 до 1148 ± 70.8 на мм^2 (рис. 2 С), к 60-м сут эксперимента снижается до 920 ± 84 на мм^2 ($p < 0.05$ для соседних сроков). Численная плотность позитивных клеток в гранулярном слое ОЛ экспериментальной группы на 10–15% выше контрольной для соответствующих сроков. Доля позитивных нейронов в общем количестве клеток на начало эксперимента (данные интактных 30-суточных животных) составляет 8–11%, на 30-е сут эксперимента – 20%, на 60-е сут – 29%. Особенности экспрессии DCX не позволяют оценить эффективность регенерации и установить, какая часть незрелых клеток формирует в ОЛ межнейрональные связи и сохраняется, а какая гибнет, т.к. зрелая клетка становится негативной.

В ростральном потоке плотность незрелых нейронов на начало эксперимента составляет 840 ± 96.1 на мм^2 , на 30-е сут – 2141 ± 23.4 на мм^2 (рис. 2 А), к 60-е сут достигает 2794 ± 123.1 на мм^2 ($p < 0.05$ для соседних сроков), что в 2 раза превышает показатели



контрольной группы (рис. 3). Эти результаты согласуются с данными литературы [7], где уровень экспрессии даблкортина используется как критерий эффективности нейротоксического воздействия.

Выводы

1. Экспрессия DCX+ в обонятельной луковице имеет выраженную возрастную динамику: пик наблюдается в ювенильном возрасте, с последующим снижением к 180-м сут. Наибольшая численная плотность нейрональных предшественников отмечается в гранулярном слое и в разных звеньях рострального потока.
2. Введение токсических доз капсаицина вызывает массовую гибель зрелых нейронов. В ответ на это развивается компенсаторная реакция, проявляющаяся активацией нейрогенеза в стволовых нишах мозга, результатом чего является увеличение численной плотности нейробластов рострального потока.
3. Активизация нейрогенеза при нейродегенерации вызывает увеличение количества DCX+ нейрональных предшественников в обонятельной луковице уже через 30 суток после воздействия и сохранение высоких показателей до конца наблюдения.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Гомазков О. А. Нейрогенез как организующая функция зрелого мозга. Достаточно ли доказательств? Успехи современной биологии. 2016; 136 (3): 227–246.
2. Западнюк И. П., Западнюк В. И., Захария Е. А., Западнюк Б. В. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. Киев: Вища школа; 1983. 383.
3. Коржевский Д. Э., Карпенко М. Н., Кирик О. В. Белки, ассоциированные с микротрубочками, как показатели дифференцировки и функционального состояния нервных клеток. Морфология. 2011; 139 (1): 13–21.
4. Петухова Е. О., Мухамедшина Я. О., Васильева О. Ю., Аксенова Л. Ю., Соловьева В. В., Гagarина Е. Е., Ризванов А. А., Зефирова А. Л., Исламов Р. Р., Мухамедьяров М. А. Стимулирование нейрогенеза в гиппокампе при болезни

Альцгеймера. Гены и клетки. 2015; 10 (4): 54–59.

5. Пожилов Д. А., Москаленко А. В., Варенцов В. Е. DCX-позитивные клетки в обонятельной луковице и в ростральном миграционном потоке у крыс разного возраста. Морфология. 2018; 153 (3): 221–222.
6. Румянцева Т. А. Клеточный состав спинномозгового узла белой крысы после неонатального введения капсаицина. Морфология. 2000; 118 (5): 22–25.
7. Cho J. H., Kim A. H., Lee S., Lee Y., Lee W. J., Chang S. C., Lee J. Sensitive neurotoxicity assessment of bisphenol A using double immunocytochemistry of DCX and MAP2. Archives of Pharmacal Research. 2018. DOI: 10.1007/s12272-018-1077-4.
8. Friocourt G., Koulakoff A., Chafey P. et al. Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. Cereb. Cortex. 2003; 13(6): 620–626.
9. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. The National Academies Press. Washington, DC; 2011. 248.
10. Royet J.-P. A re-estimation of the number of glomeruli and mitral cells in the olfactory bulb. Brain Research. 1998; 788: 35–42.
11. Wille M. The proteome profiles of the olfactory bulb of juvenile, adult and aged rats – an ontogenetic study. Proteome Science. 2015; 13: 8.
12. Zuo Y., Wang J., Enkhjargal B., Doycheva D., Yan X., Zhang J. H., Liu F. Neurogenesis changes and the fate of progenitor cells after subarachnoid hemorrhage in rats. Experimental Neurology. 2019; 311: 274–284. DOI: 10.1016/j.expneurol.2018.10.011

References

1. Gomazkov O.A. Nejrogenez kak organizuyushchaya funkciya zrelogo mozga. Dostatochno li dokazatel'stv? [Neurogenesis as an organizing function of the mature brain. Is there enough evidence?] Uspekhi sovremennoj biologii. 2016; 136 (3): 227–246 (in Russian).
2. Zapadnyuk I.P., Zapadnyuk V.I., Zahariya E.A., Zapadnyuk B.V. Laboratornye zhivotnye. Razvedenie, sodержание, ispol'zovanie v ehksperimente [Laboratory animals. Dilution, maintenance, use in the experiment]. Kiev: Vishcha shkola; 1983. 383 (in Russian).
3. Korzhevskij D.Eh., Karpenko M.N., Kirik O.V. Belki, associirovannye s mikrotrubochkami, kak pokazateli differencirovki i funkcional'nogo sostoyaniya nervnyh kletok [Microtubule-associated proteins as indicators of differentiation and functional state of nerve cells]. Morfologiya. 2011; 139 (1) 13–21 (in Russian).
4. Petuhova E.O., Muhamedshina YA.O., Vasil'eva O.YU., Akse nova L.YU., Solov'eva V.V., Gagarina E.E., Rizvanov A.A., Zefirov A.L., Islamov R.R., Muhamed'yarov M.A. Stimulirovanie nejrogeneza v gippokampe pri bolezni Al'cgejmara [Stimulation of neurogenesis in the hippocampus in Alzheimer's disease]. Geny i kletki. 2015; 10 (4): 54–59 (in Russian).
5. Pozhilov D.A., Moskalenko A.V., Varenkov V.E. DCX-pozitivnye kletki v obonyatel'noj lukovice i v rostral'nom migracionnom potoke u krys raznogo vozrasta [DCX-positive cells in the olfactory bulb and in the rostral migration flow in rats of differ-

- ent ages]. *Morfologiya*. 2018; 153 (3): 221–222 (in Russian).
6. Rumyantseva T.A. Kletochnyj sostav spinno-mozgovogo uzla beloj krysy posle neonatal'nogo vvedeniya kapsaicina [The cellular composition of the spinal node of the white rat after the neonatal administration of capsaicin]. *Morfologiya*. 2000; 118 (5): 22–25 (in Russian).
 7. Cho J.H., Kim A.H., Lee S., Lee Y., Lee W.J., Chang S.C., Lee J. Sensitive neurotoxicity assessment of bisphenol A using double immunocytochemistry of DCX and MAP2. *Archives of Pharmacal Research*. 2018. DOI: 10.1007/s12272-018-1077-4.
 8. Friocourt G., Koulakoff A., Chafey P. et.al. Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. *Cereb. Cortex*. 2003; 13(6): 620–626.
 9. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. The National Academies Press. Washington, DC; 2011. 248.
 10. Royet J.-P. A re-estimation of the number of glomeruli and mitral cells in the olfactory bulb. *Brain Research*. 1998; 788: 35–42.
 11. Wille M. The proteome profiles of the olfactory bulb of juvenile, adult and aged rats – an ontogenetic study. *Proteome Science*. 2015; 13: 8.
 12. Zuo Y., Wang J., Enkhjargal B., Doycheva D., Yan X., Zhang J.H., Liu F. Neurogenesis changes and the fate of progenitor cells after subarachnoid hemorrhage in rats. *Experimental Neurology*. 2019; 311: 274–284. DOI: 10.1016/j.expneurol.2018.10.011

Сведения об авторах

Пожилов Дмитрий Алексеевич – ассистент кафедры анатомии человека ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России. 150000 Ярославль, ул. Революционная 5. E-mail: dmitry.oldman@yandex.ru

Румянцева Татьяна Анатольевна – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой анатомии человека ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России. 150000 Ярославль, ул. Революционная 5. E-mail: rum-yar@mail.ru

Варенцов Вячеслав Евгеньевич – ассистент кафедры анатомии человека ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России. 150000 Ярославль, ул. Революционная 5. E-mail: carabidolog@mail.ru

Москаленко Александр Владимирович – студент лечебного факультета ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России. 150000 Ярославль, ул. Революционная 5. E-mail: solar-jkee@gmail.com

Поступила в редакцию 29.10.2018 г.

Для цитирования: Пожилов Д.А., Румянцева Т.А., Варенцов В.Е., Москаленко А.В. Экспрессия даблкортина в обонятельной луковице и роstralном потоке у крыс инфантильного возраста после воздействия нейротоксина. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2018; 7(4): 50–55. doi: 10.18499/2225-7357-2018-7-4-50-55.

For citation: Pozhilov D.A., Rumyantseva T.A., Varentsov V.E., Moskalenko A.V. Doublecortin expression in the olfactory bulb and rostral stream in infantile rats after exposure to neurotoxin. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2018; 7(4): 50–55. doi: 10.18499/2225-7357-2018-7-4-50-55.