

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК МОТОНЕЙРОНОВ БЕЛОЙ КРЫСЫ

Порсева В. В.

Кафедра анатомии человека, Ярославский государственный медицинский университет Ярославль, Россия
Corresponding author: vvporseva@mail.ru

Abstract

AGE CHANGES MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTIC WHITE RAT MOTONEURONS

Background: Proteins neurofilaments (NF) are a family of intermediate filaments, the most common structure of the cytoskeleton of neurons with large sizes and long myelinated axons, participate in the development and maintenance of normal diameter axons, provide optimal speed of axonal conduction is transferred from the cell body to the end of the slow axon transport and consist of three polypeptide subunits, which differ in molecular weight: light – 68-73 kDa (NFL), medium – 140-160 kDa (NFM), heavy – 195-200 kDa (NFH). The breach in the structure of each protein neurofilaments can change the structure of the whole complex of the cytoskeleton of axons and thereby affect the functioning of both the axon and the neuron as a whole.

Material and methods: Morphometric characteristics of neurons containing protein neurofilaments with weight of 200 kDa was studied on transverse cryostat sections with a thickness of 14 μ m T2 spinal cord (SC) in 3, 10, 20, 30, 60, 90, 180, 360-day-old Wistar rats immunohistochemical and histological methods. Topographical characteristics of motor neurons was studied in slices in the ventral horn of the SC by setting their respective IX lamina of Rexed, the number and cross-sectional area of motor neurons.

Results: The motoneurons containing protein neurofilaments NFH detected in T2 SC with 3-day-old rats and presents in the ventromedial and dorsolateral groups of neurons localized in the lamina IX and correspond to large neurons. The number of motoneurons with NFH in both topographic groups decreases during the first year of life rats with peak reduction at 10-day-old. The average cross-sectional area of the motoneurons in both topographic groups increases during the life of the rat, the maximum growth rate is in 10-day-old. Dimensions are ventromedial motoneurons more, than dorsolateral in the first month of life, after that age differences are leveled out.

Conclusions: The critical period is the 10-day-old rats for the formation of immunoreactivity to NFH in motoneurons SC, that is evident not only quantitative but also qualitative neuronal structural rearrangements.

Key words: motoneuron, thoracic spinal cord, neurofilament 200 kDa, development, rat.

Актуальность

Белки нейрофиламентов (НФ) принадлежат к семейству промежуточных филаментов и являются наиболее распространенной структурой цитоскелета нейронов, имеющих большие размеры и длинные миелиновые аксоны, играют незаменимую роль в развитии и поддержании нормального диаметра аксонов, обеспечивают оптимальную скорость аксональной проводимости (Zhu et al., 1997; Liu et al., 2004), переносятся от тела клетки к аксонному окончанию медленным транспортом и состоят из трех полипептидных субъединиц, различающихся по молекулярной массе: легкий – 68-73 кДа (НФЛ), средний – 140-160 кДа (НФС), тяжелый – 195-200 кДа (НФТ) (Sarano et al., 2001; Liu et al., 2004).

Нарушение в строении каждого белка нейрофиламентов может изменять структуру всего комплекса цитоскелета аксонов и тем самым влиять на функционирование, как аксона, так и нейрона в целом (Julien, 1999; Shaw et al., 2005; Paulussen et al., 2011).

Исследования организации цитоскелета мотонейронов показало, что увеличение НФТ и НФС вызывает агрегацию и диссоциацию сети НФ из сети микротрубочек, тем самым ингибируя ветвление дендритов, а увеличение НФЛ нивелирует эти изменения, что имеет решающее значение для роста дендритных деревьев мотонейронов (Kong et al., 1998; Zhang et al., 2002).

Известно, что дендриты создают большую часть площади поверхности для формирования синапсов и играют важную роль в функционировании нейронов, особенно в процессах пластичности, влияют на интеграцию синаптических входов и возбуждения нейронов и регулируют распределение различных клеточных компонентов, ионных каналов и рецепторов, в том числе структур цитоскелета.

Целью настоящего исследования явилось изучение морфометрических характеристик мотонейронов спинного мозга, содержащих белок нейрофиламентов с массой 200 кДа, в постнатальном развитии крысы.

Материал и методы

Исследование проведено на 40 белых крысах-самках линии Вистар в возрасте 3, 10, 20, 30, 60, 90, 180 и 360 суток после рождения с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Эвтаназию осуществляли под уретановым наркозом (3 г/кг внутривенно) путем транскардиальной перфузии раствора в фосфатно-солевом буфере PBS, 0.01 М, pH 7.4 (БиолоТ, Россия), PBS, содержащего гепарин (5 Ед/л), затем 4% раствора параформальдегида (Sigma, США) на PBS.

Из спинного мозга (СМ), ориентируясь по корешкам, выделяли второй грудной сегмент, который фиксировали в 4% растворе параформальдегида на PBS в течение 2 часов при 4°C, после чего промывали трехкратно в PBS в течение 30 минут и оставляли в 30% растворе сахарозы (Panreac, Испания) на 24 часа при 4°C.

Выделенные сегменты замораживали в криогеле Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Нидерланды), из которых на криостате Shandon E (Thermo Scientific, Великобритания) готовили поперечные серийные срезы толщиной 14 мкм.

Для выявления мотонейронов использовали каждый пятый из серийных срезов – всего 10 срезов с каждого сегмента.

Выявление нервных клеток, иммунореактивных (ИР) к белку НФТ, проводили по ранее описанной методике с использованием меченых антител (Porseva, 2014): первичные антитела (Abcam, Великобритания) моноклональные мышинные АВ82259 против белка НФТ, разведение 1:300; вторичные ослиные антитела против мыши (Jackson ImmunoResearch Laboratories, США), конъюгированные с индокарбоцианином – Cy3, разведение 1:500), флюоресцирующим в красной области спектра.

Для предотвращения неспецифического окрашивания, перед применением первичных антител, использовали преинкубацию в течение 1 часа с Fab-фрагментом неконъюгированных ослиных антител против мыши (Jackson Immunoresearch, США, разведение 10 мг/мл).

Мечение всей популяции нейронов по Ниссли проводили красителем, флюоресцирующим в зеленой области спектра NeuroTrace Green Fluorescent Nissl Stains (Molecular Probes, США), разведение 1:200.

После чего срезы отмывали в растворе PBS и заключали в среду для иммунофлюоресценции VectaShield (Vector Laboratories, США). С целью контроля, для исключения неспецифической реакции, часть срезов инкубировали без первичных и вторичных антител.

Анализ препаратов проводили на флюоресцентном микроскопе ЛОМО Микмед 2, вариант 12 (Россия, Санкт-Петербург) с соответствующим набором светофильтров и CCD камеры MDC320 (ScoreTec, Китай).

На срезах под объективом 10x/0.30 изучали топографические характеристики мотонейронов в вентральном роге СМ, устанавливая их соответствие IX пластинке Рекседа, конфигурация которой соответствовала верхним грудным сегментам (Molander et al., 1989).

На цифровых изображениях гистологических препаратов, полученных объективом с увеличением 20x с помощью программы Image J (НИН, США) измеряли площадь сечения мотонейронов.

Для определения средних арифметических и их стандартных ошибок использовали программу Statistica, версия 10 (StatSoft, Inc., 2011). Для поиска различий средних значений применяли анализ вариаций ANOVA, различия средних считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Во всех исследуемых возрастах крысы на поперечном срезе СМ выявлены ИР мотонейроны, которые располагались в виде двух групп в области вентрального и латерального края вентраль-

ного рога в пластинке IX, что по топографическому расположению соответствовало вентромедиальной (ВМ) и дорсолатеральной (ДЛ) группам.

Цитоплазма тел и аксоны ИР мотонейронов имели красную флюоресценцию, интенсивность которой с возрастом крысы не менялась, нейриты прослеживались в вентральном направлении и были ориентированы исключительно к верхушке вентрального рога только у ВМ мотонейронов. Мотонейроны ДЛ группы имели полигональную форму, флюоресценцией обладали только проксимальные части нейритов, которые были ориентированы в различных направлениях в пределах серого вещества вентрального рога СМ.

Таблица 1

Абсолютное содержание (АС) и средняя площадь сечения (S) ИР мотонейронов на срезах Т2 СМ крысы ($X \pm S_x$)

| Возраст (сутки) | Медиальная группа | | Латеральная группа | |
|-----------------|-------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| | АС | S, мкм ² | АС | S, мкм ² |
| 3 | 11,7±0,56 | 289,3±13,61 | 11,3±0,49 | 219,5±12,88 |
| 10 | 2,5±0,22* | 611,5±14,29* | 4,5±0,43* | 519,2±13,10* |
| 20 | 7,5±0,22* | 656,4±12,36* | 10,7±0,29 | 567,2±18,91* |
| 30 | 7,5±0,22* | 668,9±11,31* | 10,3±0,25 | 571,7±17,19* |
| 60 | 7,6±0,36* | 601,2±14,12* | 9,0±0,22* | 629,1±15,73* |
| 90 | 6,3±0,25* | 662,7±13,09* | 8,6±0,20* | 623,3±13,97* |
| 180 | 7,2±0,24* | 634,3±15,98* | 8,1±0,27* | 613,3±16,97* |
| 360 | 6,8±0,24* | 568,4±17,18* | 8,0±0,26* | 595,2±18,16* |

* p<0.05, различия достоверны по сравнению с 3-суточным крысенком

Количество мотонейронов, выявленных флюоресцентным красителем по Нисслию совпадало с числом крупных мотонейронов, содержащих НФТ, площадь сечения которых в 3 дневном возрасте превышала 150 мкм² в ДЛ группе и 200 мкм² в ВМ группе, в 10 дневном возрасте – 400 и 350 мкм² соответственно, и в последующих возрастах – 500 мкм² в обеих группах мотонейронов.

Нейроны, локализованные в области пластинки IX СМ и имеющие в определенные возрастные периоды жизни крысы площадь сечения меньше указанных выше значений не проявляли ИР к НФТ.

Подсчет на каждом гистологическом срезе клеток, содержащих НФТ, показал, что количество ВМ и ДЛ мотонейронов в 3 дневном возрасте было одинаковым (см. табл.). Численность ИР мотонейронов в течение года жизни крысы уменьшилась: ВМ- в 1,7 раза, ДЛ – в 1,4 раза. Снижение количества ИР мотонейронов на срезе в течение года жизни крысы имело волнообразный характер с выраженным уменьшением в 10 дневном возрасте, которое составило в ВМ группе – 4,7 раза, ДЛ группе – 2,5 раза.

В 20 дневном возрасте их количество увеличилось по сравнению с предыдущим возрастом в 3 раза в ВМ группе и в 2,4 раза в ДЛ группе и не менялось до 360 дневного возраста крысы, не достигая, однако, значений показателя в 3 дневном возрасте.

Средняя площадь сечения ИР мотонейронов в течение года жизни крысы увеличилась у ВМ – в 2 раза, у ДЛ – в 2,7 раза (табл. 1). В 3 дневном возрасте большие средние размеры имели мотонейроны ВМ группы, которые превышали таковые в ДЛ группе на 32%.

Превышение средней площади сечения ИР ВМ мотонейронов сохранялось до 30 дневного возраста крысы, после чего различия топографических групп мотонейронов не являлись значимыми.

Отмечено значимое прогрессивное возрастание средней площади сечения мотонейронов к 10 дневному возрасту по отношению к 3 дневному возрасту, что составило в ВМ группе – 2,1 раза, в ДЛ группе – 2,4 раза, после чего показатели до 360 дневного возраста крысы значимо не менялись с данного возраста – у ВМ мотонейронов и с 60 дневного возраста – у ДЛ.

Морфологически нейроны пластинки IX относят на основании размерных характеристик к группе крупных, которые являются α -мотонейронами вентрального рога, и к группе мелких нейронов, куда входят γ -мотонейроны и интернейроны.

Приведенный принцип деления нейронов на группы весьма относителен, так как зависит от вида и возраста животного, способа окраски нервной ткани и возможностей метрической обработки результатов исследований. Топография мотонейронов в СМ, содержание в них белка нейрофиламентов дает основание отнесения нервных клеток к α -мотонейронам (Julien, 1999; Zhang et al., 2002).

Известно, что мотонейроны, посылающие аксоны к определенной мышце, так называемый «мотонейронный пул» мышцы, располагаются в СМ млекопитающих отдельными группами. Структурный уровень Т2 СМ являясь транзиторным, содержит группы мотонейронов, которые связаны как с эпаксиальной (дорсальной), так и с гипаксиальной мускулатурой верхней конечности, что в данном исследовании и подтверждается практически одинаковым количественным представительством ИР мотонейронов в обеих топографических группах, а также наличием латеральной группы мотонейронов, которая характерна для сегментарных уровней, относящихся к спинальным утолщениям и связана у млекопитающих с иннервацией лишь только конечностей.

Развитие нервной системы сопровождается гетерохронной экспрессией различных белков нейрофиламентов, при этом в начале нейрональной дифференцировки первоначально содержится белок НФЛ, как в центральных, так и периферических нейронах.

Развитие аксональных проекций характеризуется наличием в нейронах белка НФС, в то время как белок НФТ экспрессируется нейронами только уже в начальном постнатальном периоде развития мышцы, что является характерным для функционирования центральных нейронов (Liu et al., 2013). В нашем исследовании, НФТ выявляется в периоде новорожденности в многочисленной популяции (в сравнении с последующими возрастными периодами) нейронов вентрального рога СМ.

Изменение экспрессии нейрональных маркеров в растущем СМ происходит примерно в то время, когда мотонейроны получают целевые ответные сигналы с мышц, что является фактором, регулирующим непосредственно саму временную трансформацию транскриптера и способность формирования нейронных сетей в СМ.

Как видно, критическим периодом в формировании ИР к НФТ в мотонейронах СМ является 10 суточный возраст крысы, что проявляется не только количественными, но и качественными нейрональными структурными перестройками. Именно к 10 дневному возрасту белой крысы происходит функциональная перестройка синаптической организации мотонейронов в сторону увеличения числа смешанных синапсов, как переходной формы от электрического к химическому типу межнейронной связи (Tresch, Kiehn, 2000; Pereda, 2014).

Известно также, что в процессе развития нервной системы образуется избыточное количество нейронов, аксонов и синаптических аппаратов. В разных областях мозга на ранних этапах постнатального развития организма физиологической гибели подвергается от 15 до 85% нейронов в сравнении с исходной популяцией.

При этом регулирование динамики фосфорилирования белков нейрофиламентов может быть существенным, чтобы избежать их избыточного скопления в нервной клетке.

Установлена роль белков нейрофиламентов в увеличении диаметра аксонов миелиновых волокон, что тем самым увеличивает скорость нервной проводимости (McGraw et al., 2002). Тем не менее, уменьшение количества мотонейронов, содержащих НФТ, может быть связано как с уменьшением только диаметра аксонов, что наблюдается у молодых мышей (Elder et al., 1999), так и с клеточной гибелью по типу аксональной дегенерации (Shaw et al., 2005) или же путем апоптоза (Yamamoto, Henderson, 1999).

Таким образом, уменьшение числа мотонейронов СМ, содержащих белок нейрофиламентов 200 кДа к десятидневному возрасту у белой крысы, может быть обусловлено несколькими факторами, регулирующими возрастную адаптацию двигательных структур центральной нервной системы, что подтверждает происходящее на фоне увеличения площади сечения мотонейронов.

Выводы

1. Нейроны, содержащие белок нейрофиламентов с молекулярной массой 200 кДа, выявляются в вентральном роге СМ с 3-дневного возраста крысы и представлены вентромедиальной и дорсолатеральной группами мотонейронов, локализованными в пластинке IX. Маркирование популяции мотонейронов флуоресцентной окраской по Ниссию, позволяет с достоверностью говорить о том, что все крупные мотонейроны содержат НФТ.

2. Количество мотонейронов с НФТ в обеих топографических группах уменьшаются в течение первого года жизни крысы с максимальным пиковым снижением в 10-дневном возрасте.

3. Средняя площадь сечения мотонейронов обеих топографических групп меняется в течение жизни крысы однонаправленно с максимальным увеличением к 10-дневному возрасту крысы и последующей относительной стабильностью до годовалого возраста.

4. В первом месяце постнатальной жизни белой крысы изменения количественных показателей разнонаправлены, что проявляется превалированием количества мотонейронов в дорсолатеральной группе, а площади сечения в вентромедиальной.

Литература

1. Capano C.P., Pernas-Alonso R., Porzio U. Neurofilament homeostasis and motoneurone degeneration. *BioEssays*, 2001, v. 23, p. 24-33.
2. Elder G.A., Friedrich V.L.Jr., Margita A., Lazzarini R.A. Age-related atrophy of motor axons in mice deficient in the mid-sized neurofilament subunit. *Cell Biol.*, 1999, 146 (1): 181-192.
3. Julien J.P. Neurofilament functions in health and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 1999, 9:554-560.
4. Kong J., Tung V.W.-Y., Aghajanian J., Xu Z. Antagonistic roles of Neurofilament Subunits NF-H and NF-M against NF-L in shaping dendritic arborization in spinal motor neurons. *J. Cell Biol.*, 1998, 140 (5): 1167-1176.
5. Liu Q., Xie F., Siedlak S.L., Nunomura A., Honda K., Moreira P.I., Zhua X., Smith M.A., Perry G. Biomedicine and Diseases: Review Neurofilament proteins in neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2004, 61: 3057-3075.
6. Liu Y., Staal J.A., Alison J.C., Kirkcaldie M.T., King A.E., Bibari O., Mitew S., Dickson T.C., Vickers J.C. Cytoskeletal changes during development and ageing in the cortex of neurofilament light protein knockout mice. *J. Comp. Neurology*, 2013, 521:1817-1827.
7. McGraw T.S., Mickle J.P., Shaw G., Streit W.J. Axonally transported peripheral signals regulate alpha-internexin expression in regenerating motoneurons. *J. Neurosci.*, 2002, 22: 4955-4963.
8. Molander C., Qu X., Rivero-Melian C., Grant G. Cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat: II. The cervical and upper thoracic cord. *J. Comp. Neurol.*, 1989, 289: 375-385.
9. Paulussen M., Jacobs S., van der Gucht E., Hof P.R., Arckens L. Cytoarchitecture of the mouse neocortex revealed by the low-molecular-weight neurofilament protein subunit. *Brain Struct. Funct.*, 2011, 216:183-199.
10. Pereda A.E. Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2014, 15:250-263.
11. Porseva V.V. Topography and morphometric characteristics of NF200+ neurons in the gray matter of the spinal cord after capsaicin deafferentation. *Neurosci. and Behavi. Physiol.*, 2014, 44 (8): 919-923.
12. Shaw G., Yang C., Ellis R. et al. Hyperphosphorylated neurofilaments NF-H is a serum biomarker of axonal injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, 336: 1268-1277.
13. Tresch M.C., Kiehn O. Motor coordination without action potentials in the mammalian spinal cord. *Nat. Neurosci.*, 2000, 6: 593-599.
14. Zhang Z., Casey D.M., Julien J.P., Xu Z. Normal dendritic arborization in spinal motoneurons requires neurofilament subunit L. *J. Comp. Neurology*, 2002, 450: 144-152.
15. Zhu Q., Couillard-Despr'es S., Julien J. P. Delayed maturation of regenerating myelinated axons in mice lacking neurofilaments. *Experimental Neurology*, 1997, 148: 299-316.
16. Yamamoto Y., Henderson C.E. Patterns of programmed cell death in populations of developing spinal motoneurons in chicken, mouse, and rat. *Dev. Biol.*, 1999, 214: 60-71.