

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КАЛЬБИДИНА В РАЗВИВАЮЩЕМСЯ МОЗЖЕЧКЕ КРЫСЫ

Карнюшко О. А., Зиматкин С. М.

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Введение. Кальбиндин – кальций-связывающий белок, поддерживающий кальциевый гомеостаз для нормального функционирования нейронов.

Цель. Изучить распределение иммунореактивности кальбиндина-D28K (calbindin-D28k) в структурах развивающегося мозжечка крысы.

Материал и методы. Исследование выполнено на 16 беспородных белых крысах разных возрастных групп: 2, 7, 15-суточные (ранний постнатальный период), 45-суточные (пубертатный период). Для исследования брали участки коры мозжечка и фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде для иммуногистохимического исследования. На парафиновых срезах с помощью первичных поликлональных кроличьих антител определяли иммунореактивность кальбиндина-D28K.

Результаты. В коре мозжечка иммунореактивность кальбиндина выявляется на вторые сутки после развития в перикарионах клеток Пуркинье, а к 15 суткам – в дендритах и не изменяется к 45 суткам. Во все сроки исследования в КП она выявлялась не только в цитоплазме, но и в их ядре.

В зернистом слое иммунореактивность кальбиндина снижается у крыс в постнатальном онтогенезе, однако у взрослых крыс некоторая часть нейронов умеренно иммунопозитивны, среди них с 15 суток после рождения выявляются кальбиндин-иммунореактивные афферентные нервные волокна, идущие в белом веществе. Не выявлено существенных различий распределения кальбиндина между долями мозжечка разного филогенетического возраста.

Выводы. Учитывая, что экспрессия calbindin-D28k выявляется на протяжении всего периода развития клеток Пуркинье, а также его физиологическую роль в поддержании функции и гомеостаза кальция в них, calbindin-D28k – ценный маркер для морфофункциональной характеристики КП в развивающемся и взрослом мозжечке крыс в норме и при патологии.

Ключевые слова: мозжечок, кальбиндин, крыса, клетки Пуркинье.

Для цитирования: Карнюшко, О. А. Иммуногистохимическое исследование кальбиндина в развивающемся мозжечке крысы / О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2020. Т. 18, № 6. С. 692-697. <http://dx.doi.org/10.25298/2221-8785-2020-18-6-692-697>.

Введение

Кальций-связывающие белки широко экспрессируются во многих отделах головного мозга, включая мозжечок. Они поддерживают кальциевый гомеостаз для нормального функционирования нейронов. В нейронах кальций регулирует нейротрансдукцию, синаптическую пластичность, лежащую в основе обучения, памяти, модулирует возбудимость и транскрипцию генов [1]. При избытке кальция оказывает цитотоксическое действие. Считается, что кальций-связывающие белки важны для развития головного мозга, поскольку такие процессы, как деление клеток, рост отростков и миграция клеток, тесно связаны с внутриклеточной концентрацией кальция [2]. Одним из таких кальций-связывающих белков является кальбиндин.

Известно, что в мозжечке крыс уже на 15 суток эмбрионального развития клетки Пуркинье становятся кальбиндин-положительными, а нейроны ядер мозжечка в процессе развития также временно экспрессируют кальбиндин [3]. Биохимически установлено, что к моменту рождения у крыс экспрессия кальбиндина в клетках Пуркинье гетерогенна [4]. В мозжечке взрослых крыс кальбиндин экспрессируется равномерно всеми клетками Пуркинье. Тенденция к снижению иммунореактивности кальбиндина в этих нейронах наблюдается при старении крыс [5]. Показано, что в мозжечке кальбиндин участвует в под-

держании долгосрочной депрессии (long-term depression), необходимой для функционирования клеток Пуркинье и, следовательно, нормальной двигательной координации и сенсорной интеграции [6]. В дегенерирующих клетках Пуркинье с признаками апоптоза экспрессия каспазы-3 сопоставима с экспрессией кальбиндина [7]. У экспериментальных животных и человека кальбиндин используют в качестве специфического маркера клеток Пуркинье коры мозжечка. При этом у человека низкая иммунореактивность выявлялась в развивающихся зернистых нейронах, а также интернейронах зернистого слоя во взрослом мозжечке [8]. Однако динамика иммунореактивности кальбиндина в КП и других нейронах мозжечка в постнатальном онтогенезе крысы ранее детально не описана.

Цель исследования – изучить распределение иммунореактивности кальбиндина-D28K в структурах развивающегося мозжечка крысы.

Материал и методы

Исследование выполнено на самках беспородных белых крыс с исходной массой 180±20 г и на родившемся от них потомстве (16 крысят). Все опыты проведены с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». На данное исследование получено разрешение комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета. Все беременные самки, как

и родившееся от них потомство, содержались в стандартных условиях вивария при естественном световом режиме и свободном доступе к воде и пище. Для исследования использовали потомство разных возрастных групп: 2, 7, 15-суточные (ранний постнатальный период), 45-суточные (пубертатный период). Крысят, достигших этого возраста, выводили из опыта декапитацией и забирали материал мозжечка. Образцы мозжечка фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде при +4°C (на ночь) с последующей стандартной гистологической обработкой в спиртах возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в парафин.

Парафиновые сагиттальные срезы толщиной 5 мкм паравермальной части мозжечка готовили с помощью микротомы (LeicaRM 2125 RTS, Германия), монтировали на предметные стекла, покрытые желатиной с алюмохромовыми квасцами. Демаскировка антигена не использовалась. Для иммуногистохимического выявления кальбиндина применяли первичные поликлональные кроличьи антитела фирмы Abcam (Великобритания, ab. 11426) в разведении 1:1200 (выбрано как оптимальное из ряда разведений: 1:100-2000), при +4°C, экспозиция 20 часов, во влажной камере. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (Великобритания, ab. 80437). В качестве отрицательного контроля использовали препараты, при изготовлении которых вместо первичных антител срезы обрабатывали разбавителем антител (иммунопозитивная окраска в них отсутствовала). Внутренним положительным контролем служили клетки Пуркинью мозжечка взрослых крыс, известные своей высокой иммунореактивностью к кальбиндину. Изучение иммуногистохимических препаратов и их микрофотографирование проводили при разных увеличениях микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры Leica DFC 320 (Leica Microsystems GmbH, Германия) и программы компьютерного анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США).

Результаты и обсуждение

На вторые сутки после рождения у крыс на поверхности коры мозжечка находится тонкий наружный зернистый слой, где располагаются нейроны с умеренной кальбиндин-иммунореактивностью. Клетки Пуркинью (КП) располагаются в несколько рядов. В узком ободке цитоплазмы КП определяется высокая кальбиндин-иммунореактивность, в их ядрах – более низкая. Мигрирующие предшественники зернистых нейронов, а также зернистые нейроны формирующегося зернистого слоя имеют высокую иммунореактивность кальбиндина в их цитоплазме (рис. 1А).

На седьмые сутки толщина наружного зернистого слоя увеличивается в два раза и его нейроны становятся иммунонегативными. В КП увеличиваются размеры перикарионов в апикальной части, где выявляется умеренная рав-

номерная иммунореактивность кальбиндина, а в их ядрах – в виде крупных 2-3 гранул с высокой иммунореактивностью. В этот срок также выявлено сильное иммунопозитивное окрашивание синапсов в виде единичных точек на растущих дендритах и перикарионах КП. В формирующемся зернистом слое нейроны сохраняют высокую иммунореактивность кальбиндина (рис. 1Б).

На 15 сутки после рождения у крыс высокое кальбиндин-иммунопозитивное окрашивание выявляется в цитоплазме всех КП и отходящих от перикарионов проксимальных частях дендритов, вплоть до их более тонких концевых ветвлений. На границе с иммунонегативным наружным зернистым слоем на терминальных ветвлениях дендритов КП наблюдались синапсы в виде точек с высокой кальбиндин-иммунореактивностью. Иммунореактивность нейронов внутреннего зернистого слоя снижается, а некоторые из них становятся иммунонегативными. На этом фоне отчетливо видны кальбиндин-иммунореактивные волокна с варикозными расширениями, проходящие через зернистый слой. В белом веществе наблюдаются многочисленные интенсивно окрашенные пучки нервных волокон и единичные кальбиндин-иммунореактивные клетки (рис. 1В).

На 45 сутки после рождения у крыс кальбиндин-иммунореактивность в перикарионах КП становится ниже, но сохраняется на прежнем уровне в их дендритах. В молекулярном слое все нейроны остаются иммунонегативными. На дендритах КП в молекулярном слое иммунореактивность кальбиндин-позитивных синапсов уменьшается. В зернистом слое умеренная иммунореактивность сохраняется в некоторых нейронах, располагающихся группами (рис. 1Г). Визуально не выявлено существенных различий распределения кальбиндина между долями мозжечка разного филогенетического возраста (палео- и неocerebellумом).

Промежуточное ядро. На вторые сутки после рождения в цитоплазме нейронов промежуточного ядра мозжечка выявляется низкая иммунореактивность кальбиндина, а в их ядрах она отсутствует (рис. 2А). На седьмые сутки в перикарионах нейронов иммунореактивность остается низкой (рис. 2Б), к 15 и 45 суткам на их телах определяются мелкие кальбиндин-иммунореактивные точки. При этом цитоплазма данных нейронов умеренно гомогенно иммунопозитивная (рис. 2В, Г).

В нашем исследовании подтверждено отсутствие иммунореактивности кальбиндина в нейронах молекулярного слоя у крыс в постнатальном онтогенезе. Полагают, что в этих нейронах основным кальций-связывающим белком является парвальбумин [9].

Высокая иммунореактивность кальбиндина выявлялась в перикарионах клеток Пуркинью уже на вторые сутки после развития, а к 15 суткам она появлялась в дендритах и несколько снижалась в перикарионах к 45 суткам. При этом во все сроки исследования в КП она выявлялась не только в цитоплазме, но и в ядре.

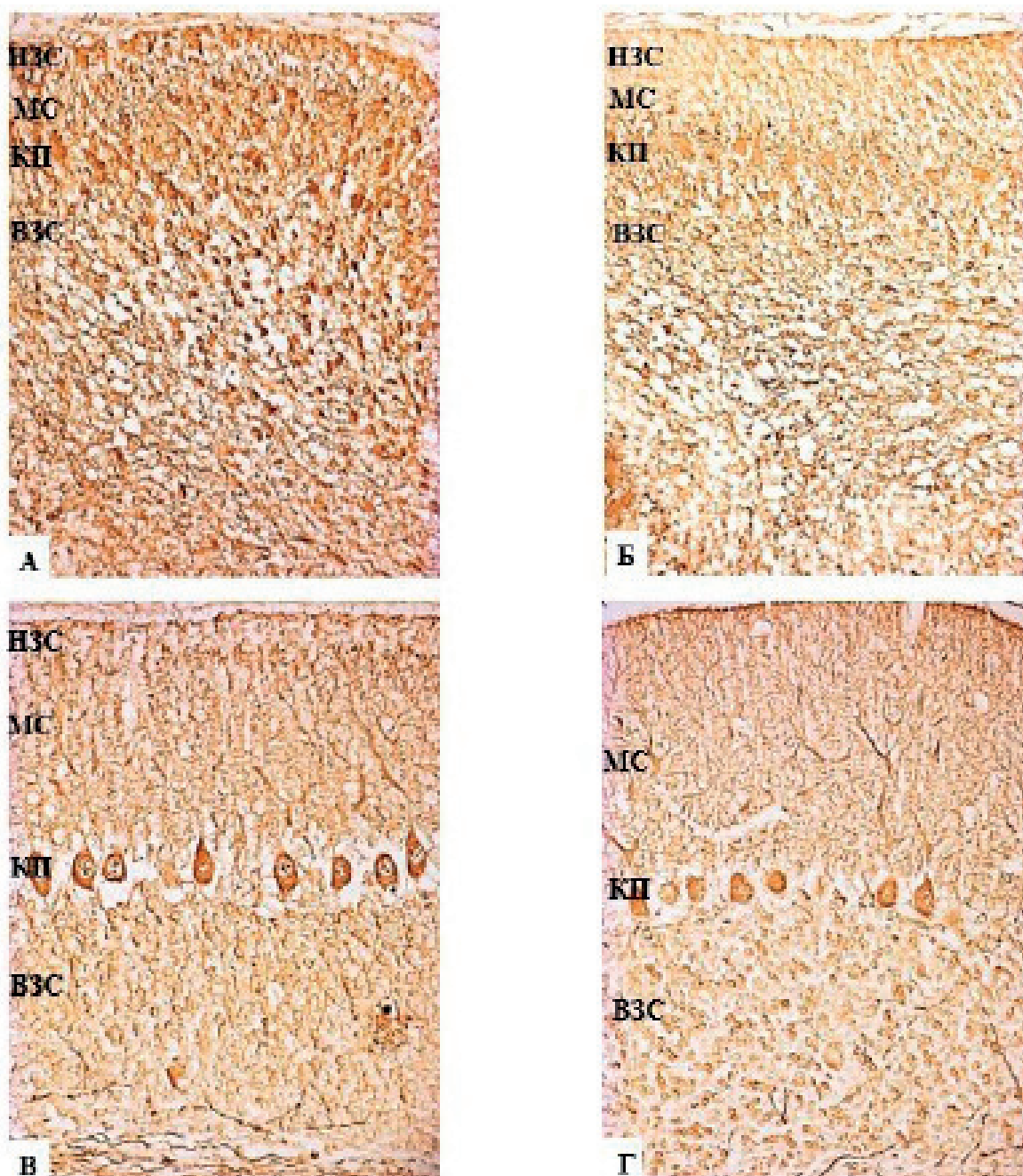


Рисунок 1. – Иммунореактивность кальбиндина в палеocerebellуме крыс на 2 (А), 7 (Б), 15 (В) и 45 (Г) сутки после рождения. НЗС – наружный зернистый слой, МС – молекулярный слой, КП – клетки Пуркинью; ВЗС – внутренний зернистый слой. Иммуногистохимическая реакция на кальбиндин. Цифровая микрофотография. ×200

Figure 1. – Immunoreactivity of calbindin in paleocerebellum of rats on the 2nd (A), 7th (B), 15th (C) and 45th (D) days after birth EGL – the external granular layer, ML – the molecular layer, PC – Purkinje cells; IGL – the internal granular layer. Immunohistochemical reaction to calbindin. Digital microphotography. ×200

Ранняя экспрессия кальбиндина обусловлена активным процессом дифференцировки нейронов и синаптогенезом. Сохранение экспрессии на протяжении всего постнатального онтогенеза обусловлено важностью регуляции внутриклеточного содержания кальция в клетках Пуркинью для обеспечения их функциональной активности. Наличие иммунореактивности кальбиндина в ядре клеток Пуркинью связано с тем, что этот кальций-связывающий белок участвует и в регуляции экспрессии генов.

На 7-15 сутки после рождения у крыс выявляется иммунопозитивное окрашивание в виде точек на растущих дендритах и перикарионах клеток Пуркинью, а также появление кальбиндин-иммунореактивных волокон, проходящих через зернистый слой, что связано с формированием афферентных волокон. Ранее кальбиндин выявляется в лазающих волокнах (ЛВ) [10]. ЛВ достигают коры развивающегося мозжечка и устанавливают синаптические контакты непосредственно с КП. Поэтому выявляющиеся в

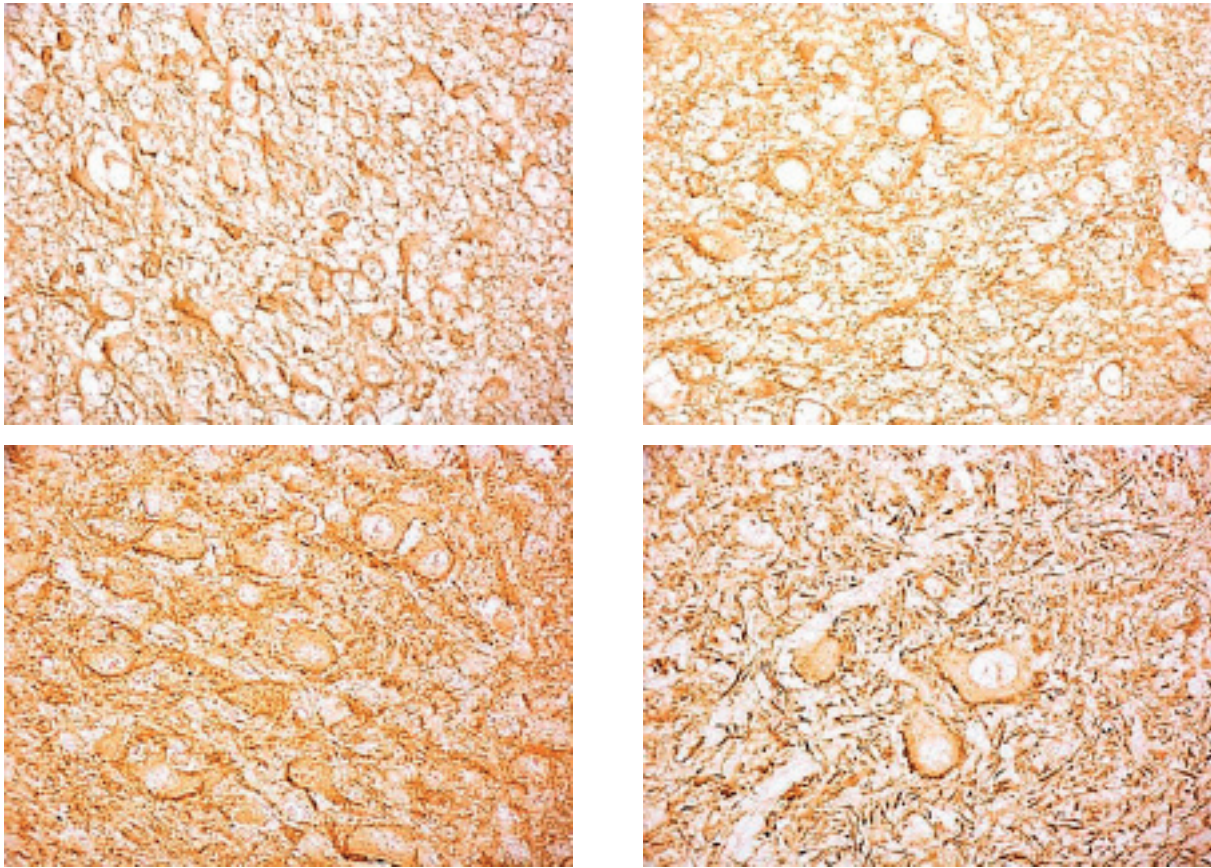


Рисунок 2. – Иммунореактивность кальбиндина в нейронах промежуточного ядра мозжечка крыс на 2 (А), 7 (Б), 15 (В) и 45 (Г) сутки после рождения. Иммуногистохимическая реакция на кальбиндин.

Цифровая микрофотография. ×400

Figure 2. – Immunoreactivity of calbindin in the neurons cerebellar interpositus nucleus of rats on the 2nd (A), 7th (B), 15th (C) and 45th (D) days after birth. Immunohistochemical reaction to calbindin. Digital microphotography. ×400

белом веществе и зернистом слое иммунореактивные волокна можно отнести к ЛВ или аксонам КП.

Со вторых суток постнатального онтогенеза у крыс в нейронах зернистого слоя наблюдалось постепенное уменьшение иммунореактивности кальбиндина, а к 45 суткам эта иммунореактивность сохранялась лишь в некоторых нейронах, лежащих группами. По данным литературы, в зернистом слое развивающегося мозжечка крыс высокая экспрессия кальбиндина в зернистых нейронах отсутствует, поскольку основным кальций-связывающим белком в них является кальретинин [9].

Иммунореактивность кальбиндина выявлялась в виде точек на перикарионах нейронов промежуточного ядра мозжечка уже на седьмые

сутки и увеличивалась на 15 и 45 сутки. Известно, что на нейронах ядер мозжечка устанавливаются синапсы коллатерали афферентных волокон и аксоны клеток Пуркинье у крыс и количество их прогрессивно увеличивается в постнатальном онтогенезе.

Выводы

Таким образом, учитывая, что экспрессия calbindin-D28k выявляется на протяжении всего периода развития клеток Пуркинье, а также его физиологическую роль в поддержании функции и гомеостаза кальция в них, calbindin-D28k – ценный маркер для морфофункциональной характеристики КП в развивающемся и взрослом мозжечке крыс в норме и при патологии.

Литература

1. Neuronal calcium signaling: function and dysfunction / M. Brini [et al.] // Cell Mol. Life Sci. – 2014. – Vol. 71, № 15. – P. 2787-2814. – doi: 10.1007/s00018-013-1550-7.
2. Ca²⁺ signaling in cytoskeletal reorganization, cell migration, and cancer metastasis / F. C. Tsai [et al.] // Biomed. Res. Int. – 2015. – Vol. 2015. – Art. 409245. – doi: 10.1155/2015/409245.
3. Enderlin, S. Ontogeny of the calcium binding protein calbindin D-28k in the rat nervous system / S. Enderlin, A. W. Norman, M. R. Celio // Anat. Embryol. (Berl). – 1987. – Vol. 177, № 1. – P. 15-28. – doi: 10.1007/bf00325286.
4. Transient biochemical compartmentalization of Purkinje cells during early cerebellar development / M. Wassef [et al.] // Dev. Biol. – 1985. – Vol. 111, iss. 1. – P. 129-137. – doi: 10.1016/0012-1606(85)90441-5.
5. Calbindin D-28k immunoreactivity in the rat cerebellar cortex: age-related changes / F. Amenta [et al.] // Neurosci Lett. – 1994. – Vol. 178, № 1. – P. 131-134. – doi: 10.1016/0304-3940(94)90307-7.

6. Calbindin in cerebellar Purkinje cells is a critical determinant of the precision of motor coordination / J. J. Barski [et al.] // *J. Neurosci.* – 2003. – Vol. 23, № 8. – P. 3469-3477. – doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-08-03469.2003.
7. Erekat, N. S. Cerebellar Purkinje cells die by apoptosis in the shaker mutant rat / N. S. Erekat // *Brain Res.* – 2017. – Vol. 1657. – P. 323-332. – doi: 10.1016/j.brainres.2016.12.025.
8. Calbindin-D28K immunoreactivity in the human cerebellar cortex / P. Flace [et al.] // *Anat. Rec. (Hoboken)*. – 2014. – Vol. 297, № 7. – P. 1306-1315. – doi: 10.1002/ar.22921.
9. Bastianelli, E. Distribution of calcium-binding proteins in the cerebellum / E. Bastianelli // *Cerebellum*. – 2003. – Vol. 2, № 4. – P. 242-262. – doi: 10.1080/14734220310022289.
10. Scotti, A. L. Calbindin D28k in the olivocerebellar projection. A light and electron microscope study / A. L. Scotti // *J. Anat.* – 1995. – Vol. 187, № 3. – P. 649-659.
4. Wassef M, Zanetta JP, Brehier A, Sotelo C. Transient biochemical compartmentalization of Purkinje cells during early cerebellar development. *Dev Biol.* 1985;111(1):129-137. doi: 10.1016/0012-1606(85)90441-5.
5. Amenta F, Cavalotta D, Del Valle ME, Mancini M, Sabbatini M, Torres JM, Vega JA. Calbindin D-28k immunoreactivity in the rat cerebellar cortex: age-related changes. *Neurosci Lett.* 1994;178(1):131-134. doi: 10.1016/0304-3940(94)90307-7.
6. Barski JJ, Hartmann J, Rose CR, Hoebeek F, Mörl K, Noll-Hussong M, De Zeeuw CI, Konnerth A, Meyer M. Calbindin in cerebellar Purkinje cells is a critical determinant of the precision of motor coordination. *J Neurosci.* 2003;23(8):3469-3477. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-08-03469.2003.
7. Erekat NS. Cerebellar Purkinje cells die by apoptosis in the shaker mutant rat. *Brain Res.* 2017;1657:323-332. doi: 10.1016/j.brainres.2016.12.025.
8. Flace P, Lorusso L, Laiso G, Rizzi A, Cagiano R, Nico B, Ribatti D, Ambrosi G, Benagiano V. Calbindin-D28K immunoreactivity in the human cerebellar cortex. *Anat Rec (Hoboken)*. 2014;297(7):1306-1315. doi: 10.1002/ar.22921.
9. Bastianelli E. Distribution of calcium-binding proteins in the cerebellum. *Cerebellum*. 2003;2(4):242-262. doi: 10.1080/14734220310022289.
10. Scotti AL. Calbindin D28k in the olivocerebellar projection. A light and electron microscope study. *J Anat.* 1995;187(3):649-659.

References

1. Brini M, Cali T, Ottolini D, Carafoli E. Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(15):2787-2814. doi: 10.1007/s00018-013-1550-7.
2. Tsai FC, Kuo GH, Chang SW, Tsai PJ. Ca²⁺ signaling in cytoskeletal reorganization, cell migration, and cancer metastasis. *Biomed Res Int.* 2015;409245. doi: 10.1155/2015/409245.
3. Enderlin S, Norman AW, Celio MR. Ontogeny of the calcium binding protein calbindin D-28k in the rat nervous system. *Anat Embryol (Berl)*. 1987;177(1):15-28. doi: 10.1007/bf00325286.

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF CALBINDIN IN THE DEVELOPING CEREBELLUM OF THE RAT

Karnyushko O. A., Zimatkin S. M.

Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

Background. Calbindin is a calcium-binding protein that supports calcium homeostasis for the normal functioning of neurons.

Purpose. To study the distribution of immunoreactivity of calbindin-D28K in the structures of the developing cerebellum of the rat.

Material and methods. The study was performed on 16 outbred white rats of different age groups: 2-, 7-, 15-days (early postnatal period), 45-days (puberty period). The cerebellum samples were taken and fixed in zinc-ethanol-formaldehyde for immunohistochemistry. Calbindin-D28K immunoreactivity was determined on paraffin sections using primary polyclonal rabbit antibodies.

Results. In the cerebellar cortex, calbindin immunoreactivity was detected on the 2nd day after development of Purkinje cells (PC) in their perikaryons, and by the 15th day in their dendrites and it did not change by the 45th day. In all terms of the study in PC, it was detected not only in the cytoplasm, but also in their nucleus.

In the granular layer, calbindin immunoreactivity decreased in rats in postnatal ontogenesis, however, in adult rats, some neurons were moderately immunopositive. Among them, from the 15th day after birth, the calbindin-immunoreactive afferent nerve fibers running in the white matter were detected. There were no significant differences in the distribution of calbindin between the lobes of the cerebellum of different phylogenetic age.

Conclusions. Considering that the expression of calbindin-D28k is detected throughout the entire period of development of Purkinje cells, as well as its physiological role in maintaining the function and homeostasis of calcium in them, it can be concluded that calbindin-D28k is a valuable marker for the morphofunctional characteristics of PC in the developing and adult cerebellum of rats in normal and pathological conditions.

Keywords: cerebellum, calbindin, rats, Purkinje cells.

For citation: Karnyushko OA, Zimatkin SM. Immunohistochemical study of calbindin in the developing cerebellum of the rat. *Journal of the Grodno State Medical University.* 2020;18(6):692-697. <http://dx.doi.org/10.25298/2221-8785-2020-18-6-692-697>.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом.
Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee

Об авторах / About the authors

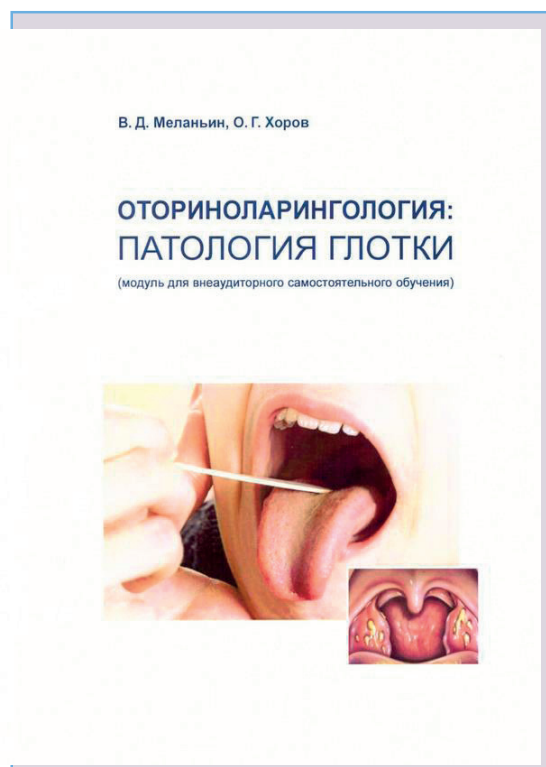
*Карнюшко Ольга Анатольевна / Karnyushko Olga, e-mail: karnyushko-olga@mail.ru, ORCID 0000-0003-2309-1542

Зиматкин Сергей Михайлович / Zimatkin Sergey, e-mail: smzimatkin@mail.ru, ORCID 0000-0001-5728-2588

*- автор, ответственный за переписку / corresponding author.

Поступила / Received: 01.06.2020

Принята к публикации / Accepted for publication: 17.11.2020



Оториноларингология: патология глотки (модуль для внеаудиторного самостоятельного обучения) [Текст] : пособие для студентов учреждений высшего образования, обучающихся по специальностям 1-79 01 01 "Лечебное дело", 1-79 01 02 "Педиатрия" : рекомендовано учебно-методическим объединением по высшему медицинскому, фармацевтическому образованию / В. Д. Меланьин, О. Г. Хоров ; Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Учреждение образования "Гродненский государственный медицинский университет". – Гродно : ГрГМУ, 2020. – 143 с. : цв. ил. – Библиогр.: с. 140-142. – ISBN 978-985-595-283-2.

Пособие написано на основе многолетнего опыта преподавания на кафедрах 1-го Московского медицинского университета им. И. М. Сеченова, Новосибирского и Гродненского медицинских университетов, а также на кафедре ЛОР-болезней Института повышения квалификации Федерального медико-биологического агентства России.

В пособии изложены наиболее важные, узловые проблемы заболеваний глотки. Основополагающее внимание уделено общим вопросам воспаления, физиологическим, патофизиологическим и морфологическим изменениям, происходящим в глотке при воспалении, патогенетической связи заболеваний глотки с заболеваниями других органов и систем человека. Основная цель пособия освоение наименьшей меры (модуля) фундаментальных знаний и выработка у врача клинического мышления, без которого немислима работа врача любой специальности, несмотря на современные достижения научно-технического прогресса в медицине. Авторы поставили более широкую задачу: придерживаясь традиций отечественной медицины, научить логической последовательности обследования пациента по профилю любой специальности в целях постановки верного диагноза и назначения адекватного лечения.

Материал пособия предназначен для внеаудиторной работы студентов, интернов, ординаторов, аспирантов, слушателей ФПК и практических врачей всех специальностей.