

УДК 611.81:611.86:591.3

ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗВИТИЯ ОБОНЯТЕЛЬНЫХ ЛУКОВИЦ ЧЕЛОВЕКА С АНТИТЕЛАМИ К БЕЛКАМ ПРЕСИНАПТИЧЕСКИХ ОКОНЧАНИЙ (SNAP-25, SYNAPSIN-I, SYNAPTOPHYSIN) НА ЭТАПЕ ПРЕНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА

© 2015 г. А. С. Харламова, В. М. Барабанов, С. В. Савельев

Научно-исследовательский институт морфологии человека РАМН

117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3

E-mail: grossu@rambler.ru, grossulyar@gmail.com

Поступила в редакцию 30.01.2014 г.

Окончательный вариант получен 22.05.2014 г.

В работе приведены результаты исследования антенатального развития основных обонятельных луковиц (ОЛ) человека на сроках от 8-й недели развития до рождения. Дифференцировка первичных обонятельных центров оценивалась с помощью гистологических критериев и трех маркеров пресинаптических окончаний – антител к SNAP-25, синапсину (synapsin-I) и синаптофизину (synaptophysin). Структурно-функциональная дифференцировка слоев в ОЛ начинается с периферических слоев и развивается центростремительно, что косвенно подтверждает индуцирующую роль прорастающих обонятельных волокон не только на анатомическую дифференцировку структуры, но и на дифференцировку ее функциональных слоев. При этом созревание клубочкового слоя, показанное иммуногистохимически, непосредственно предшествует гистологическому обособлению клубочков ОЛ. Проводящая система ОЛ демонстрирует иммунореактивность с антителами к пресинаптическим белкам уже после 10–11 недели развития. Выделены четыре этапа созревания ОЛ. Все функциональные слои ОЛ сформированы к 22-й неделе развития. У плодов на более поздних сроках развития продолжают процессы дифференцировки, включая формирование подслоев в пределах внутреннего гранулярного слоя, оформление клубочкового слоя, происходит увеличение размеров ОЛ. Процессы дифференцировки нейробластов продолжают в ОЛ до рождения и полностью процессы созревания завершаются к 38–40-й неделе развития, что подтверждается характером реакции на белки пресинаптических окончаний.

Ключевые слова: плоды человека, развитие обоняния, первичные обонятельные центры, SNAP-25, Synapsin-I, Synaptophysin.

DOI: 10.7868/S0475145015030052

ВВЕДЕНИЕ

Вопрос о развитии обонятельных структур у человека на ранних сроках пренатального развития хорошо освещен в классических исследованиях (Hampfrey 1940; Pearson 1941, 1942; Bossy 1980; Muller, O'Rahilly, 2004). Однако эти работы посвящены в основном развитию периферического отдела обонятельного анализатора на ранних этапах плодного развития (Пяткина, 1982; Pearson, 1941, 1942; Bossy 1980; Muller, O'Rahilly, 2004). Иммуногистохимические (Chuah, Zheng, 1987; Takahashi et al., 1984) и электронномикроскопические (Moran et al., 1982; Kimura et al., 2009) исследования также проводятся, в основном, на материале обонятельного эпителия и нерва человека. Специальные аспекты развития ОЛ изучаются на модельных видах, а полученные данные распространяются на всех млекопитаю-

щих, включая человека (Valverde et al., 1992; Lin, Ngai, 1999), или изучаются в рамках общих вопросов развития обонятельного эпителия и нерва (Chuah, Zheng, 1992).

ОЛ млекопитающих имеют радиальную слоистую организацию и включают 6 слоев: слой входящих обонятельных волокон (1), образованный аксонами обонятельных рецепторов, гломерулярный или клубочковый слой (2), внешний плексиформный (волоконистый) слой (3), слой митральных клеток (4), внутренний плексиформный слой (5) и гранулярный слой (6) (Doty, 2012; Huart et al., 2013). У млекопитающих с крупными ОЛ, включающими желудочки, выделяют прижелудочковый слой клеток (Nieuwenhuys, 1998). В ОЛ взрослого человека желудочки отсутствуют.

Развитие ОЛ человека начинается с индукции со стороны обонятельных волокон, которые под-

растают к переднему мозгу на 6-й недели развития. На 7-й неделе развития начинается анатомическая дифференцировка ОЛ (Pearson, 1941, 1942). Вопрос о гистологической и функциональной дифференцировке ОЛ на антенатальном этапе развития человека мало изучен, а классические исследования содержат ряд противоречий (Hamphrey 1940; Muller, O'Rahilly, 2004).

Первые синаптические контакты в ОЛ млекопитающих образуют аксоны обонятельных клеток-рецепторов. Их постсинаптическими мишенями являются дендриты митральных клеток, клеток "с султанчиками" и перигломерулярных клеток (Grubb et al., 2008). Области этих первичных контактов образуют сферические структуры – клубочки (гломерулы). Они образуют самый наружный функциональный слой луковицы и являются первым местом переключения сигналов, поступающих от обонятельных рецепторов в центральной нервной системе (ЦНС). Внешний волокнистый слой составлен дендритами митральных клеток и клеток "с султанчиками", которые контактируют с отростками юкстагломерулярных, перигломерулярных и гранулярных клеток, выполняющих функции локальных интернейронов. Внутренний гранулярный слой содержит тела наиболее многочисленных в пределах ОЛ ГАМК-эргических гранулярных клеток. Отростки митральных клеток и клеток "с султанчиками" объединяются, образуя волокна обонятельного тракта, несущего обонятельную информацию к вторичным центрам переднего мозга (Huart et al., 2013). Также ОЛ получают центральные эфференты, их модулирующее воздействие осуществляется, в основном, через гранулярные клетки (Doty, 2012).

Данная работа посвящена уточнению сроков и особенностей процессов гистологической дифференцировки и созревания ОЛ человека, в том числе, с использованием для оценки процессов созревания иммуногистохимических маркеров пресинаптических окончаний (анти-SNAP-25, Synapsin-I, Synaptophysin), широко распространенных в исследовании развития нервной системы на животных (Leclerc et al., 1989; Goutan et al., 1999; Greenlee et al., 2001; Biranowska et al., 2002).

Синаптосомально-ассоциированный белок (SNAP-25), синапсин (Synapsin-I) и синаптофизин (Synaptophysin) – белки пресинаптических окончаний, регулирующие взаимодействие везикулярной и клеточной мембран в активной зоне синапса.

SNAP-25 – белок плазматической мембраны комплекса SNARE (soluble N-ethylmaleimidesensitive factor attachment protein receptor, t-SNARE), вместе с другим мембранным белком комплекса syntaxin-I (t-SNARE) и белком везикулярной мембраны VAMP (synaptobrevin, v-SNARE), участвующий в слиянии мембран при экзоцитозе (Sollner et al., 1993). SNAP-25 в клетках нервной ткани ло-

кализуется не только в области пресинаптической мембраны, но и в аксолеме, а также на транс-домене аппарата Гольджи (Тао-Cheng et al., 2000). Таким образом, иммуноцитохимически SNAP-25 выявляется также в составе проводящих путей в ЦНС и периферических нервов (Duc, Catsicas, 1995). Кроме того, внутриклеточная локализация SNAP-25 может отличаться в центральной и периферической нервной системе: в пределах ЦНС на иммуногистохимических препаратах тела нейронов в основном иммунонегативны (могут выявляться точечные локусы концентрации белка в районе аппарата гольджи), тогда как в периферической нервной системе SNAP-25 иммуногистохимически хорошо выявляется в телах нейронов (Duc, Catsicas, 1995). Изменение внутриклеточной локализации SNAP-25 показано в процессе развития нервной системы (Oyler et al., 1991).

Уровень экспрессии SNAP-25 (в том числе, оцененной по интенсивности иммуногистохимической окраски) и ее распределение могут изменяться на разных этапах развития в центральной и периферической нервной системе. Интенсивную иммунореактивность с антителами к SNAP-25, которую демонстрируют структуры центральной и периферической нервной системы на отдельных этапах развития, связывают с активным синаптогенезом в этих областях. Снижение уровня иммунореактивности до уровня, характерного для зрелой нервной ткани, наблюдают после завершения процессов созревания в центральной и периферической нервной системе (Catsicas et al., 1991; Goutan et al., 1999; Greenlee et al., 2001; Biranowska et al., 2002; Sidor-Kaczmarek et al., 2004).

Synapsin-I – белок семейства синапсинов, нейрон-специфических фосфопротеинов, ассоциированных с синаптическими пузырьками. Синапсин-I, как правило, концентрируется в пресинаптических терминалях нейронов, иммуногистохимически синапсин выявляется в нейропиле ЦНС. Появление синапсина в клетках нервной ткани также скоррелировано с событиями активного синаптогенеза (DeCamilli et al., 1983). Считается, что он оказывает модулирующие эффекты в процессе формирования синаптических контактов (Fornasiero et al., 2010). Synaptophysin также белок, ассоциированный с мембраной синаптических пузырьков. Концентрация синаптофизина также нарастает параллельно с процессами активного образования синаптических контактов (Knaus et al., 1986; Leclerc et al., 1989). Сходные закономерности распределения иммунореактивности с антителами к синаптофизину и синапсину-I показаны на материале развивающегося мозжечка грызунов (Mason, 1987 (крысы); Leclerc et al., 1989 (мыши)).

Таким образом, компоненты экзоцитарного механизма могут экспрессироваться до созревания

ния синапса, включены в процессы роста аксонов и содержатся в прорастающем нервном окончании (Leclerc et al., 1989; Fletcher et al. 1991; Oyler et al., 1991). Тем не менее, пики экспрессии и накопления в синаптических окончаниях данных белков коррелируют с фазами активного синаптогенеза, а интенсивная иммунореактивность тканей с антителами к этим белкам приурочена по локализации и времени возникновения к появлению и созреванию синаптических контактов (DeCamilli et al., 1983; Catsicas et al., 1991; Ichikawa et al., 1991; Goutan et al., 1999; Hepp, Langley, 2001; Greenlee et al., 2001; Biranowska et al., 2002; Sidor-Kaczmarek et al., 2004; Fornasiero et al., 2010). Антитела к пресинаптическим белкам используются не только в качестве маркеров пресинаптических терминалей (Oyler et al., 1991), но и для мониторинга развития синаптических связей в онтогенезе (Knaus et al., 1986; Sollner, 1993).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на аутопсийном материале плодов человека на сроках от 8-й недели развития до рождения (таблица). В сравнительных целях был использован аутопсийный материал взрослых людей, а также одного ребенка в возрасте 4 лет. В работе использован материал собранный в патологоанатомических отделениях ГБУЗ МО МОНИИАГ, ГКБ № 72, ДГКБ св. Владимира № 53, а также материал из коллекции лаборатории развития нервной системы ФГБУ “НИИМЧ” РАМН.

В зависимости от срока развития в качестве материала для исследования брали голову плода целиком или участок носовой перегородки с обонятельным эпителием и нервами (включая *lamina cribrosa*), ОЛ, ОТ включая место контакта последнего с передним мозгом (вместе с прилежащей тканью переднего мозга). В некоторых случаях мы получали только ОЛ с участками ОТ. Материал фиксировали в нейтральном (фосфатный буфер, pH = 7.2–7.4) 10% формалине или в жидкости Буэна с последующим хранением в 70% спирте. При необходимости, материал декальцинировали в растворе 70% спирта, глицерина и азотной кислоты. Время декальцинации зависело от размера блока и плотности костных и хрящевых компонентов и составляло от одной до трех недель (таблица). После заключения в парафиновые среды (Histomix, BioVitrum, Россия; Paraplast X-tra, McCormick Sci, Netherland) изготавливали серии срезов (10 мкм). Серии из каждого 5-го либо 10-го среза, в зависимости от возраста плода, окрашивали методом Маллори и крезилвиолетом по методу Ниссля.

Протоколы иммуногистохимических реакций. Для инактивации эндогенной пероксидазы депарфинированные, гидратированные срезы обрабатывали 3% раствором H_2O_2 в течение 15 мин,

затем в целях блокировки неспецифического связывания антител обрабатывали раствором Ultra V Block (“Lab Vision”) (5 мин) и ополаскивали в фосфатном буфере (PBS, pH = 7.2).

В качестве первых антител использовали мышиные моноклональные антитела к SNAP-25 (Novocastra, UK; 1 : 200–1 : 1600), антитела к синаптофизину (synaptophysin) (monomouse, Santa-Cruz, USA; monorabbit, Epitomics, CA; 1 : 50–1 : 2000) и к синапсину-I (synapsin-I) (polyrabbit, Chemicon, US; monorabbit, Epitomics, CA; 1 : 100–1 : 2000). Рабочие разведения первых антител подбирали в отработочных опытах. Предварительное демаскирование антигенов проводили путем высокотемпературной обработки срезов в 0.01 М цитратном буфере (pH 6.0) в микроволновой печи (5 мин), с последующим остыванием (20 мин).

В работе применяли два варианта протокола. В первом случае срезы инкубировали с первыми антителами в течении 20 часов при температуре 4°C, затем после отмывки в фосфатном буфере срезы обрабатывали конъюгатом HRP-F(ab')₂ козьих антител, специфичных к первым антителам (“Zymed”, 1 : 500, 1 ч при 37°C). Во втором варианте проведения реакции срезы инкубировали с первыми антителами в течении часа при комнатной температуре. Для визуализации комплекса антиген–антитело использовали стандартные готовые к употреблению наборы реактивов для стрептовидин-биотиновых реакций Ultra Vision Detection Kit (Lab Vision, UK), Ultra Vision LP Detection System HRP Polymer (Ready-To-Use) (Lab-Vision, UK). На заключительном этапе срезы обрабатывали раствором хромогена (DAB, Sigma, 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 . В качестве негативного контроля использовали реакцию с заменой первых антител на раствор для разведения антител (Dako), контроль ставился для каждого опыта и был “чистым”.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На 8-й неделе развития ОЛ были представлены в виде дивертикулов вентральных стенок переднего мозга, в которых можно выделить три области – прижелудочковую (эпендимальную), мантийную и краевую волокнистую. Мозговые желудочки продолжались в область ОЛ. На 10–13-й неделях развития полость желудочков была хорошо заметна начиная с ростральных областей ОЛ. С возрастом передняя граница желудочка сдвигалась кзади. На 20–23-й неделях развития желудочек был различим только в самой каудальной части ОЛ, в области перехода в обонятельный тракт (ОТ), на 26-й недели желудочек ОЛ полностью закрылся.

Распределение материала по полу и срокам антенатального развития, особенности гистологической проводки и фиксации материала^а

№	Пол	Срок развития (нед.)			Фиксатор	Дакальцинат (сутки)
		гестационный ^б	по ТКД	по массе		
1	—	8	7–8	—	Фнейтр.	Нет
2	—	8	8	—	Фнейтр.	Нет
3	—	—	10	—	Фнейтр.	Нет
4	—	10–11		—	Фнейтр.	4
5	—	12–13	12	13	Фнейтр.	4
6	—	16	14	14	Фнейтр.	5
7	—	15–16	—	—	Фнейтр.	Нет
8	ж	16	—	—	Фнейтр.	Нет
9	ж	17–18	—	17	Фнейтр.	13
10	м	18–19	—	19	Фнейтр.	Нет
11	м	18–19	—	—	Фнейтр.	14
12	м	19–20	19	20	Фнейтр.	16
13	м	20	—	19	Фнейтр.	16
14	м	20	—	—	Фнейтр.	14
15	м	20	—	—	Фнейтр.	14
16	м	20–21	—	—	Фнейтр.	Нет
17	м	20–21	—	—	Фнейтр.	Нет
18	м	—	—	22–23	Фнейтр.	20
19	м	21	22	23–24	Фнейтр.	20
20	—	22–23	—	22	Фнейтр.	Нет
21	м	22–23	—	—	Фнейтр.	Нет
22	—	25–26	—	—	Фнейтр.	Нет
23	—	25–26	—	—	Фнейтр.	Нет
24	ж	26	—	24–25	Б	21
25	ж	27–28	—	24–25	Фнейтр.	Нет
26	ж	28–29	—	27	Фнейтр.	Нет
27	—	30–31	—	33–34	Фнейтр.	Нет
28	—	32–33	—	35	Фнейтр.	Нет
29	ж	33–34	—	34	Фнейтр.	Нет
30	м	34–35	40	>40	Б	Нет
32	ж	38–40	—	—	Фнейтр/к	26
33	ж	40	—	—	Фнейтр.	Нет
34	м	40	—	—	Фнейтр.	Нет

^а Фнейтр. — фиксация нейтральным формалином 5–7 суток (фосфатный буфер рН = 7.2–7.4); Фнейтр/к — материал из коллекции лаборатории, длительный срок хранения; Б — фиксация в жидкости Буэна в течении 3 сут, с последующим хранением в 70° этиловом спирте.

^б Данные о гестационном возрасте, приведенные в таблице, мы получали из патологоанатомических заключений. Возраст плодов, приведенный по теменно-копчиковой длине (ТКД) и массе плода, определяли в соответствии с таблицами Б.М. Пэттен (Пэттен, 1959).

На 10–11-й неделе развития в ОЛ можно было выделить 4–5 слоев: краевой или периферический слой (наиболее развит вентро-медиально, соответствует слою входящих обонятельных волокон, и во временной перспективе, зоне образо-

вания клубочков), внешний волокнистый (плексиформный) слой, слой со сравнительно плотно расположенными клетками (внешний клеточный), наиболее обширный — внутренний клеточный слой. Последний в медиальной области ОЛ

был локально отделен волокнами внутреннего волокнистого слоя. Наиболее глубоким слоем ОЛ на этом этапе являлся прижелудочковый слой, который не всегда был четко ограничен от внутреннего клеточного слоя. Значительной дифференциации клеток по размеру на этом сроке развития обнаружено не было. На 12–13-й неделе развития наблюдалась четкая граница между прижелудочковым и внутренним клеточным слоями, хорошо определялся внешний клеточный слой, соответствующий слою митральных клеток на более поздних сроках развития, развивающиеся митральные клетки на этом сроке были отличны по размеру от гранулярных. На 15–16-й неделе развития клетки развивающегося митрального слоя и гранулярные клетки были хорошо различимы: ядра клеток развивающегося митрального слоя были крупнее ядер клеток внутреннего клеточного слоя. Периферическая зона ОЛ на этом сроке как и на более ранних сроках развития наиболее сильно была развита вентро-медиально. На 17–18-й неделе развития слой входящих волокон и слой образования клубочков также был наиболее выражен вентро-медиально. Топография развивающегося слоя митральных клеток на ростокаудальной серии срезов повторяла эту закономерность расположения слоя входящих волокон. Аналогичная пространственная закономерность сохраняется на более поздних сроках развития и у взрослого человека. У плодов на 18–19-й неделе развития в ОЛ хорошо определялись все 6 слоев ОЛ и прижелудочковая область, с этого этапа хорошо определялись зоны формирования клубочков. На 19–20-й неделе внутриутробного развития во внешней области гранулярного слоя локально определялись образованные клетками подслои. В ОЛ на 22–23-й неделе развития клетки внутреннего гранулярного слоя образовывали хорошо видимые подслои, клубочки образовывали крупное вентральное скопление, характерное для ОЛ взрослого человека. На 23–24-й выделялись клетки-митры нормальной для ОЛ взрослого человека формы, с контрастно окрашенной по Ниссию цитоплазмой. На 25–26-й неделе развития во внутреннем гранулярном слое выделялось до 3–4-х подслоев. На 28–29-й неделе антенатального развития организация клубочкового слоя уже полностью напоминала его организацию в ОЛ взрослого человека: вентро-медиально и дорсолатерально в средней части ОЛ находились два крупных скопления клубочков. Внутренний гранулярный слой насчитывал до 5 подслоев. На 38–40-й неделе развития ОЛ соответствовали луковицам взрослого человека, за тем исключением, что краевой слой входящих волокон по сравнению с ОЛ взрослого человека был практически незаметен, а центральную область ОЛ занимали плотно расположенные клетки с узким слоем цитоплазмы. ОЛ мальчика в возрасте 4-х лет были

сходны по строению с луковицами взрослого человека. Краевой слой входящих волокон был четко ограничен от клубочковой зоны луковицы, центральные области ОЛ занимали проводящие пути с редко расположенными клетками и каудально структуры переднего обонятельного ядра.

Формирующийся обонятельный тракт как самостоятельная анатомическая структура определялась с 18–19-й недели развития. После 15–16 недель развития они распределялись на срезах характерным образом – опоясывали центральную зону ОЛ. После контакта ОЛ/ОТ с передним мозгом они проходили тангенциально вглубь переднего мозга.

Результаты иммуногистохимического исследования. Общая картина распределения иммунореактивных участков с антителами к SNAP-25, синаптофизину и синапсину-1 в ОЛ и окружающих тканях у плодов человека разного возраста была сходна. На 8-й неделе внутриутробного развития ОЛ демонстрировали иммунореактивность по интенсивности сходную с таковой в переднем мозге, наиболее интенсивная реакция в пределах среза наблюдалась в нервах языка и верхнего неба, а также сетчатке глаза.

На 10–14-й неделях развития иммунопозитивную реакцию с использованными маркерами демонстрировали волокна обонятельного, терминально-вомероназального нерва и терминального ганглия, в остальных структурах среза иммуногистохимическое окрашивание наблюдали в нервной сети языка и желез в основании языка и верхнего неба. В переднем мозге иммунореактивность демонстрировали радиальные волокна, по интенсивности иммунопозитивной окраски выделялся краевой слой развивающейся коры (номенклатура по Rakic, 1972). В ОЛ интенсивную иммунореактивность с антителами к пресинаптическим белкам наблюдали в периферическом слое ОЛ – слое входящих волокон и развивающемся клубочковом слое. Сходную по интенсивности высокую иммунореактивность проявляли пучки вторичной проводящей системы ОЛ. Иммунопозитивная реакция сохранялась в центральных областях ОЛ (нейропилль), но она была заметно слабее, по интенсивности сходна с реакцией в развивающейся коре переднего мозга (рис. 1а).

Для ОЛ на 15–16-й неделе развития характерна выраженная иммунопозитивная реакция с использованными маркерами в периферическом слое (входящих волокон и развивающийся клубочковый слой) и пучках проводящей системы, а также постепенное центростремительное уменьшение иммунореактивности. На сроке 17–18 недель наиболее интенсивно реагировали слои от зоны входящих волокон до границы внутреннего клеточного (гранулярного) слоя включительно. Кроме того, в пределах слоя входящих волокон и развивающегося клубочкового слоя выделялись

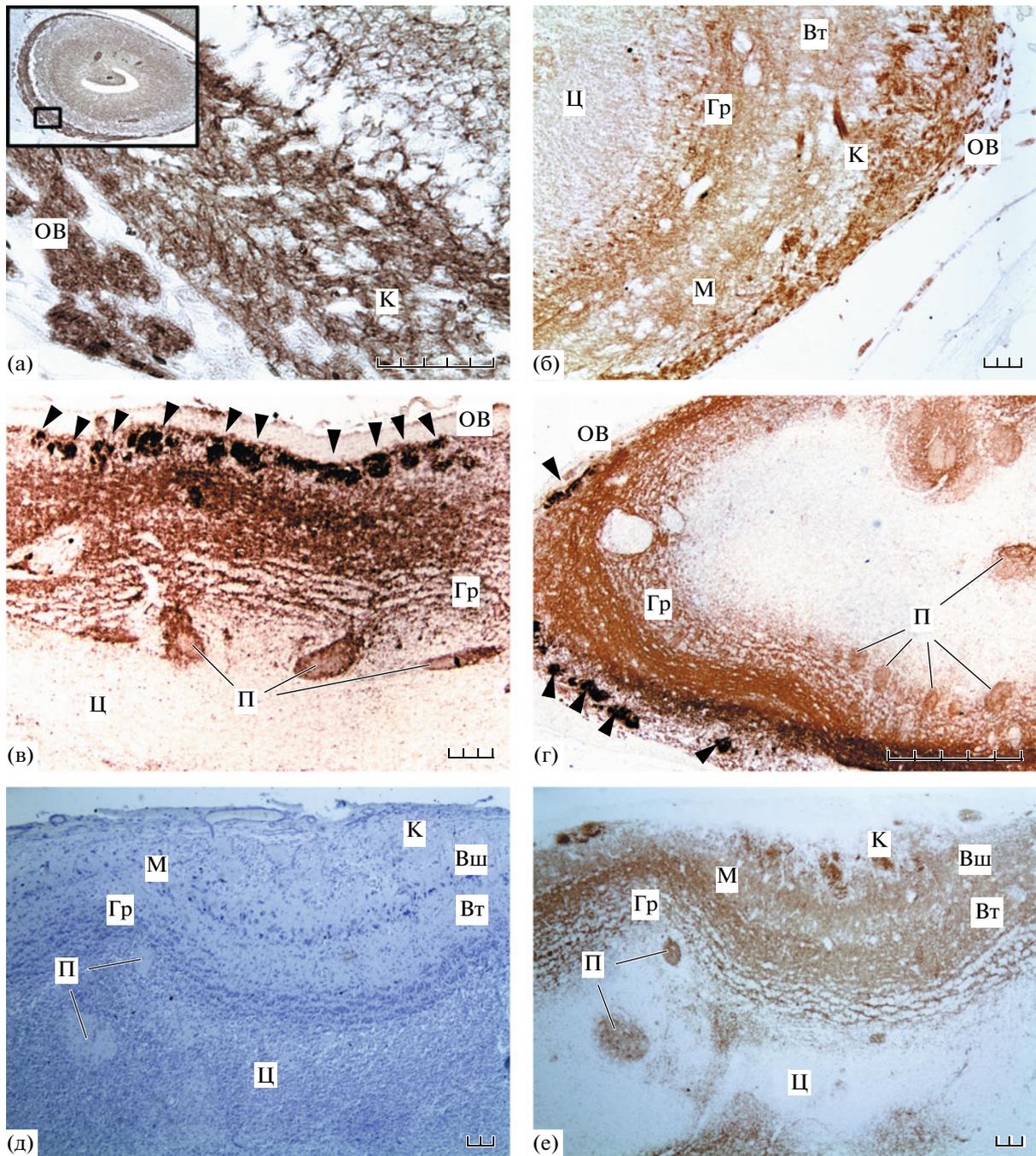


Рис. 1. Иммунореактивность с антителами к SNAP-25 в ОЛ плодов человека на 14-й неделе развития (а, линейка 5 мкм), на 19–20-й (б, линейка 10 мкм) и 22–23-й (в, линейка 10 мкм) неделях развития. ОЛ плода на 28–29-й неделе развития: иммунореактивность с антителами к синаптофизину (г, линейка 50 мкм) и иммунореактивность с антителами к синапсину-1 (е, линейка 10 мкм) на гистологических срезах из одной области ОЛ. (в, г) – клубочки (указаны стрелками) демонстрируют сравнительно интенсивную иммунореактивность с использованными маркерами; иммунореактивность в пределах внутреннего гранулярного слоя распределена соответственно подслоям, образованным гранулярными клетками; центральная зона ОЛ демонстрирует низкую иммунореактивность; OB – область входящих обонятельных волокон, К – клубочковый слой ОЛ, Вш – внешний волокнистый (плексиформный) слой ОЛ, Вт – внутренний волокнистый (плексиформный) слой ОЛ, М – слой митральных клеток, Гр – внутренний гранулярный слой, П – вторичные проводящие обонятельные пучки, Ц – центральная зона ОЛ.

отдельные локусы, демонстрирующие наиболее интенсивную иммунореактивность в пределах ОЛ – зоны образования клубочков. На гистологиче-

ских препаратах на этом же сроке развития мы не смогли выделить отдельных клубочков, хотя относительно всей ОЛ толщина слоя входящих во-

локон и будущей клубочковой зоны увеличивалась. Центральная область ОЛ демонстрировала сравнительно низкую иммунореактивность.

На 18–20-й неделях развития наиболее интенсивную иммунореактивность демонстрировали слой развивающихся клубочков. Иммунопозитивно реагировал нейропиль вокруг развивающихся митральных клеток и внутреннего гранулярного слоя. Внешний и внутренний волокнистые слои реагировали слабее (рис. 1б).

Иммуногистохимическая окраска в реакциях с антителами к пресинаптическим белкам во внутреннем гранулярном слое на 22–24 неделях локально имела послынное распределение (рис. 1в): иммунореактивные участки располагались между телами нейронов. К 23–24-й неделе развития волокнистые слои ОЛ реагировали с антителами к пресинаптическим белкам с той же интенсивностью, что и внутренний гранулярный слой и на 25–27-й неделе развития интенсивность реакции во внутренних слоях ОЛ была равномерной, по интенсивности иммуногистохимической окраски выделялись только клубочки, что особенно хорошо было заметно в реакции на синаптофизин. Центральная зона ОЛ сохраняла низкую иммунореактивность.

На 28–34-й неделях внутриутробного развития наиболее интенсивно с антителами к пресинаптическим белкам также реагировали клубочки (рис. 1г, 1е; 2а; 3а). Наиболее заметное различие в интенсивности иммуногистохимической окраски клубочкового слоя по сравнению с другими функциональными слоями в ОЛ наблюдалось в реакциях с антителами к синаптофизину (рис. 1г). Краевой слой входящих волокон ОЛ демонстрировал сравнительно низкую иммунореактивность с антителами к SNAP-25, синапсину-1 и синаптофизину (рис. 1г). Иммунопозитивную реакцию демонстрировали группы входящих волокон обонятельного нерва (рис. 2в). В пределах внутреннего гранулярного слоя иммунопозитивно с антителами к SNAP-25 и синаптофизину реагировал только волокнистый компонент, иммуногистохимическая окраска была распределена слоями (рис. 2е). В реакциях на синапсин-1 общее распределение иммунореактивности было таким же, однако некоторые нейроны митрального и внутреннего гранулярного слоя демонстрировали иммунореактивность в пределах тел клеток (рис. 2д). Центральная зона ОЛ оставалась в основном иммунонегативной — иммунореактивность проявлялась точечно, основная масса клеток и волокон была иммунонегативна (рис. 2б).

На 38–40-й неделях развития с антителами к пресинаптическим белкам реагировал нейропиль всех зон ОЛ. Участки вокруг и к периферии от клубочков проявляли более слабую иммунореактивность сравнительно с остальными зонами ОЛ. Отсутствия специфической реакции с антителами

к белкам пресинаптических окончаний в краевой области ОЛ (характерно для ОЛ взрослого человека (рис. 3в)) на 38–40-й неделях развития мы не наблюдали, хотя эти участки проявляли сравнительно с другими слоями ОЛ слабую иммунореактивность. Таким образом, только на 38–40-й неделях развития характер иммуногистохимического окрашивания с антителами к пресинаптическим белкам соответствовал таковому у ребенка 4 лет и взрослого человека (рис. 3б–3в). Тела нейронов как в коре, так и в ОЛ в реакции с антителами к синапсину-1 у взрослого человека в основном оставались иммунонегативными (рис. 3д), в реакции на SNAP-25 тела нейронов демонстрировали хорошо видимые при световой микроскопии иммунопозитивные участки (рис. 3е).

ОБСУЖДЕНИЕ

Дифференцировка слоев внутри ОЛ начинается после 8-й недели развития, что совпадает с литературными данными (Humphrey, 1940; Muller, O'Rahilly, 2004). Начало дифференцировки клеток по размерам и обособление митрального слоя описывалось не ранее 9.5–10 недель развития (Humphrey, 1940). По другим данным митральный слой клеток различают уже на 8.5 неделе развития (Muller, O'Rahilly, 2004). Мы смогли найти незначительные размерные различия между развивающимися митральными и гранулярными клетками на 12–13-й неделе развития. Разночтения могут быть связаны с методиками определения возраста плодов и гистологических окрасок.

Гистологическая дифференцировка всех функциональных слоев, характерных для ОЛ взрослого человека, заканчивается на 20–22-й неделе развития. Позже ОЛ увеличиваются в размерах, усиливаются размерные отличия клеток из различных областей ОЛ, происходит дальнейшая дифференцировка внутри слоев (образование подслоев внутреннего гранулярного слоя, образование крупных клубочковых скоплений вентрально и дорсально), структурные характеристики луковицы существенно не меняются. ОЛ плодов на 38–40-й неделях уже полностью напоминают луковицы взрослого человека. Для ОЛ плодов на 38–40-й недели развития характерен более тонкий слой входящих волокон по сравнению с ОЛ взрослых людей. Увеличение толщины слоя входящих волокон в ОЛ взрослого человека по сравнению с плодами на 38–40 неделе развития может быть связано с возобновлением рецепторной выстилки обонятельного эпителия. Входящие в ОЛ волокна являются аксонами клеток-рецепторов основного обонятельного эпителия, которые возобновляются в течение жизни человека и животных (Niewenhues, 1998). Периферическая часть ОЛ — структура динамическая, куда постоянно врастают новые аксоны и образуют новые связи. Старые

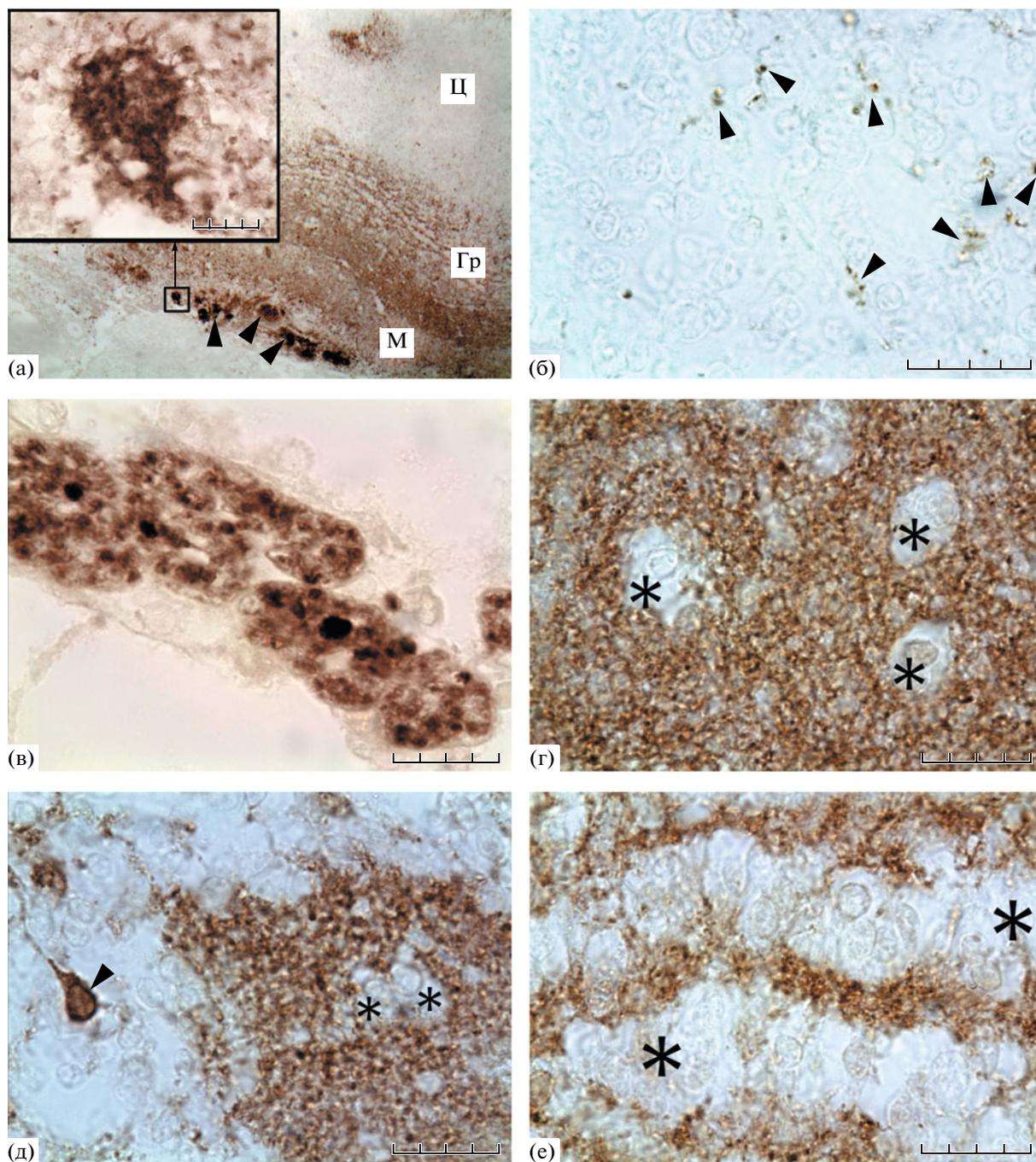


Рис. 2. Иммунореактивность с антителами к синапсину-I в ОЛ плода на 28–29-й неделе развития: область единичного клубочка (а, сверху); центральная зона ОЛ: единичные иммунореактивные элементы указаны стрелками (б); пучок волокон обонятельного нерва (в); участок митрального слоя (г, * отмечены места расположения тел клеток митрального слоя); зона вторичного проводящего пучка из дорсо-латеральной области ОЛ, стрелкой указана единичная клетка, демонстрирующая иммунопозитивную реакцию (д); область внутреннего гранулярного слоя, видно послойное распределение иммунореактивных участков между подслоями, образованными телами гранулярных клеток (* отмечены иммунонегативные области расположения тел нейронов (е). Линейка 5 мкм. М – слой митральных клеток, Гр – внутренний гранулярный слой, Ц – центральная зона ОЛ.

окончания отмирают и с возрастом краевая область ОЛ расширяется. Эти наблюдения подтверждаются результатами иммуногистохимических исследований с белками пресинаптических окон-

чаний: краевая область ОЛ взрослого человека снаружи от клубочков иммунонегативна (рис. 3в).

Анализ результатов иммуногистохимических реакций антителами к пресинаптическим белкам

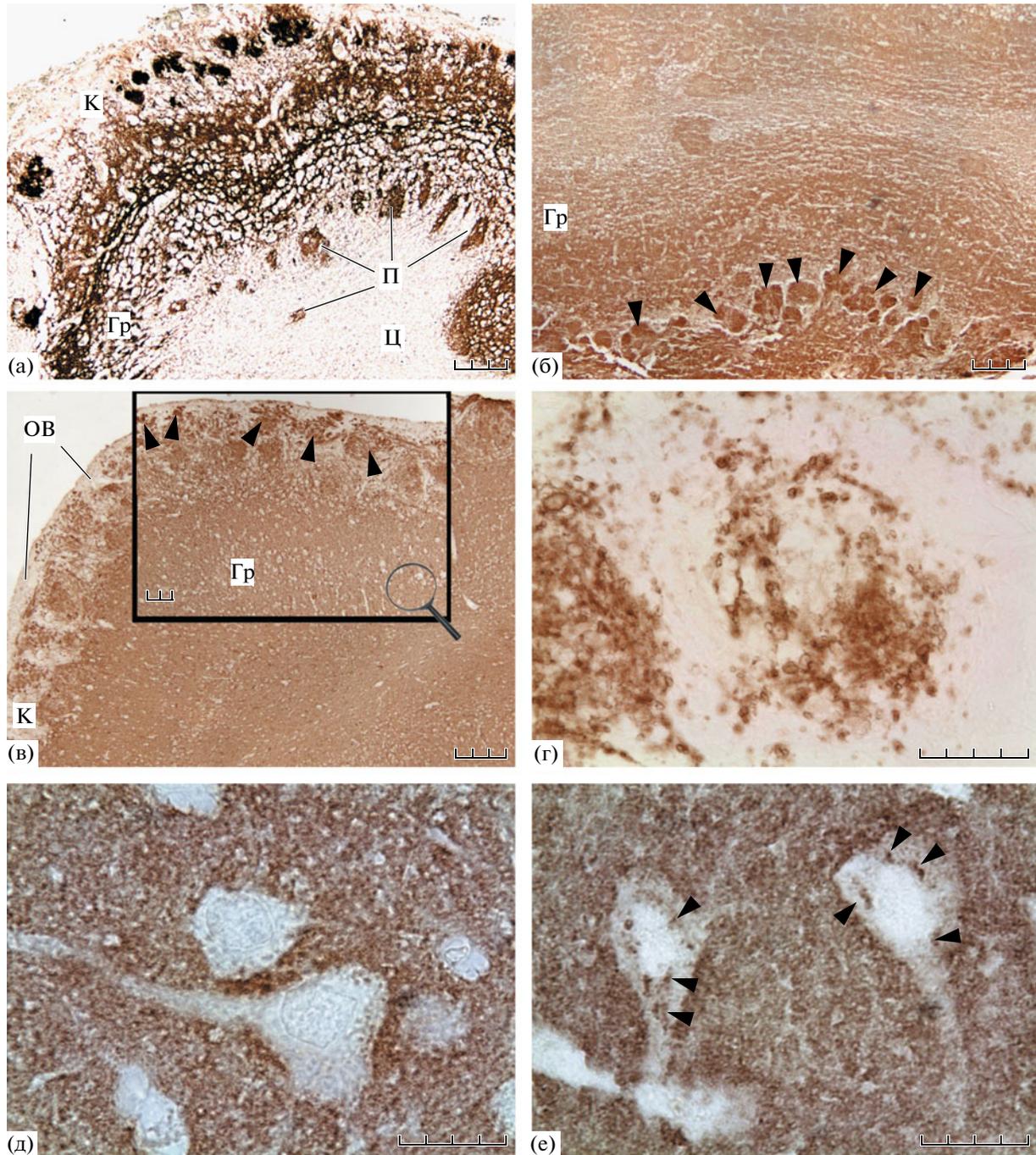


Рис. 3. Иммунореактивность с антителами к синаптофизину в ОЛ плода на 34–35-й неделе развития (а, линейка 10 мкм). Иммунореактивность с антителами к SNAP-25 в ОЛ новорожденного (40 недель, линейка 10 мкм) и взрослого человека (50 лет, линейка 10 мкм). Иммунореактивность с антителами к синапсину-I в зоне клубочка ОЛ (г, линейка 5 мкм) и коре (д, линейка 5 мкм) взрослого человека (50 лет). Иммунореактивность с антителами к SNAP-25 в коре взрослого человека (е, линейка 5 мкм); К – клубочковый слой ОЛ, Гр – внутренний гранулярный слой, П – вторичные проводящие обонятельные пучки, Ц – центральная зона ОЛ.

(анти-SNAP-25, -Synapsin-I, -Synaptophysin) у плодов человека показал, что на антенатальном этапе развития характер распределения иммунореактивных участков в ОЛ изменяется. Появление и изменение интенсивности иммуногистохимиче-

ской реакции с данными маркерами в различных зонах ОЛ отражает процессы функционального созревания структуры. На 8-й неделе развития ОЛ демонстрируют иммунореактивность сходную с другими участками развивающегося мозга. На 10–

14 неделях развития наиболее интенсивно с использованными антителами реагирует краевой слой развивающейся ОЛ (зона входящих волокон и во временной перспективе развивающийся клубочковый слой), остальные зоны ОЛ демонстрируют иммунореактивность сходную с таковой в развивающемся переднем мозге. С 15–16 недели развития позитивная иммуногистохимическая реакция на все три маркера распространяется центростремительно, наиболее интенсивную иммунореактивность с использованными маркерами демонстрируют клубочки ОЛ. Центральная зона ОЛ проявляет низкую иммунореактивность вплоть до 38–40-й недели развития. Внутренний и внешний плексиформные слои до 23–24 недели развития демонстрируют иммунореактивность меньшей интенсивности по сравнению с внутренним гранулярным и клубочковым слоем, что может быть связано со вторичной вставочной природой связей в пределах волокнистых слоев ОЛ.

Центростремительное распространение иммунореактивности с антителами к пресинаптическим белкам в ОЛ человека с увеличением срока плода позволяет подтвердить индуцирующую роль прорастающих обонятельных волокон и образованных ими связей. Еще в середине 20 века было хорошо известно, что именно прорастающие обонятельные волокна инициируют анатомическую дифференцировку ОЛ (Pearson, 1941; 1942). Функциональная дифференцировка структуры, также как и морфологическая, запускается растущими аксонами обонятельных рецепторов, что косвенно подтверждается динамикой созревания слоев в ОЛ – дорсальные области, получающие в развивающейся ОЛ меньше окончаний обонятельных нервов дольше остаются недифференцированными, чем вентральные области (Chuah, Zheng, 1992).

С помощью иммуногистохимических маркеров пресинаптических окончаний отдельные развивающиеся клубочки выявляются на 17–18-й неделе развития – раньше, чем с помощью гистологических критериев. По-видимому, созревание, показанное иммуногистохимически с антителами к пресинаптическим белкам, непосредственно предшествует гистологическому обособлению клубочков ОЛ. Эти результаты согласуются с литературными данными. Презумптивные незрелые синаптические контакты и синапсы, образованные ветвящимися аксонами обонятельных рецепторов на телах некоторых развивающихся митральных клеток были описаны с помощью электронной микроскопии на 13 неделе развития. Зрелые синапсы и перигломерулярные клетки в слое входящих обонятельных волокон и развивающихся клубочков впервые выявляются на 17-й неделе развития (Chuah, Zheng, 1992).

Центральная зона ОЛ плодов до 35-й недели развития включительно демонстрировала низкую

иммунореактивность в реакциях с антителами к пресинаптическим белкам, иммунопозитивная реакция с использованными маркерами наблюдалась на 38–40 неделе. Поскольку центральная зона ОЛ идентифицируется с остатками прижелудочкового слоя клеток (Niewenhues, 1998), отсутствие иммунопозитивной реакции в центральной зоне может отражать продолжающиеся до рождения процессы созревания структуры. В процессе развития нейробласты мигрируют из эпендимальной или прижелудочковой зоны головного мозга (Nadarajah, Parnavelas, 2002). Источником нейробластов в развивающейся ОЛ является ее прижелудочковый слой. Таким образом, центральная зона ОЛ плодов человека может содержать клетки, только вступающие в дифференцировку, что подтверждается характером распределения иммуногистохимической реакции на пресинаптические белки. Это свидетельствует об активно продолжающихся процессах созревания в ОЛ плодов на сроках до 38–40-й недели развития. Также на этом сроке снижается интенсивность иммунореактивности с использованными маркерами в клубочковом слое и все слои ОЛ демонстрируют сходную по интенсивности иммунореактивность, что характерно для ОЛ взрослого человека. Снижение экспрессии белков пресинаптических окончаний до уровня, характерного для зрелой структуры, связывают с завершением процессов созревания и активного синаптогенеза в процессе развития нервной системы (Biranowska et al., 2002; Sidor-Kaczmarek et al., 2004).

Таким образом, можно выделить четыре этапа созревания ОЛ. На 7–8 неделе происходит индукция развития ОЛ со стороны обонятельных волокон и анатомическое обособление структуры. После 8-й недели развития начинается гистологическая дифференцировка слоев внутри ОЛ. Для второго этапа (9–14 неделя развития) характерны интенсивная иммунопозитивная реакция с антителами к белкам пресинаптических окончаний периферического слоя – слоя входящих обонятельных волокон и образования клубочков – и процессы активной дифференцировки функциональных слоев луковиц. На третьем этапе (15–22 неделя) заканчивается гистологическая дифференцировка ОЛ, различную по интенсивности иммунореактивность с антителами к трем пресинаптическим белкам демонстрируют все функциональные слои. На четвертом этапе (от 22–23 до 35 недели) четко выделены все шесть функциональных слоев, характерных для луковиц взрослых людей, все они демонстрируют иммунопозитивную реакцию на пресинаптические белки, происходит увеличение размеров ОЛ и дальнейшее созревание образованных слоев. Наиболее интенсивно до 28–29 недели включительно реагируют клубочки ОЛ. На заключительном этапе распределение иммуногистохимической реакции на пресинаптические

белки в ОЛ плодов на 38–40-й неделе развития соответствует таковому в ОЛ взрослого человека, все слои демонстрируют одинаковую по интенсивности иммуногистохимическую окраску с использованными маркерами.

По-видимому, процессы дифференцировки нейробластов продолжают в ОЛ до рождения. Развивающиеся ОЛ полностью соответствуют луковицам взрослого человека к 38–40 неделе, что подтверждается характером иммуногистохимической реакции на белки пресинаптического комплекса в ОЛ плодов и взрослого человека. Однако функциональная зрелость слоев и проводящей системы ОЛ и ОТ, оцененная по трем белкам пресинаптических окончаний (SNAP-25, синаптофизин и синапсин-I), не исключает возможности восприятия и передачи обонятельных стимулов у человека до рождения, предполагаемых в поведенческих экспериментах (Schaal et al., 2000; Mennella et al., 2001), и у новорожденных (Кулаковская, 1929).

Автор благодарит руководителя отделения патоморфологии ГБУЗ МО МОНИАГ к.м.н. Ирину Владимировну Бариннову и заведующего патогистологической лабораторией ГКБ № 72 Сергея Григорьевича Ермилова, к.м.н. Евгения Ивановича Фокина за помощь в сборе материала. Исследование частично поддержано специализированным фондом управления целевым капиталом для поддержки научно-исследовательских работ в области биологии и медицины “Фундаментальный”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кулаковская В.С. Наблюдения над чувством вкуса и обоняния у новорожденных // Жур. изуч. ран. дет. возр. 1929. Т. 9. № 1. С. 15–20.
- Пяткина Г.А. Развитие обонятельных рецепторов человека // Цитол. 1982. Т. 24. № 1. С. 11–16.
- Пэттен Б.М. Эмбриология человека. М.: Медгиз., 1959. 768 с.
- Biranowska J., Dziejatkowski J., Ludkiewicz B., Moryś J. Developmental changes of synaptic proteins expression within the hippocampal formation of the rat // J. Anat. Embryol. (Berl.). 2002. V. 206. № 1–2. P. 85–96.
- Bossy J. Development of olfactory and related structures in staged human embryos // Anat. Embryol. 1980. V. 161. P. 225–236.
- Catsicas S., Larhammar D., Blomqvist A., Sanna P.P., Milner R.J., Wilson M.C. Expression of a conserved cell-type-specific protein in nerve terminals coincides with synaptogenesis // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1991. V. 88. № 3. P. 785–789.
- Chuah M.I., Zheng D.R. Olfactory marker protein is present in olfactory receptor cells of human fetuses // Neurosci. 1987. V. 23. P. 263–370.
- Chuah M.I., 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.
- DeCamilli P., Cameron R., Greengard P. Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. I. Its general distribution in synapses of the central and peripheral nervous system demonstrated by immunofluorescence in frozen and plastic sections // J. Cell. Biol. 1983. V. 96. № 5. P. 1337–1354.
- Doty R.L. Olfaction in Parkinson's disease and related disorders // Neurobiol. Dis. 2012. V. 46. № 3. P. 527–552.
- Duc C., Catsicas S. Ultrastructural localization of SNAP-25 within the rat spinal cord and peripheral nervous system // J. Comp. Neurol. 1995. May 22. 356(1): 152–163.
- Fletcher T.L., Cameron P., DeCamilli P., Banker G. The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture // J. Neurosci. 1991. V. 11. P. 1617–1626.
- Fornasiero E.F., Bonanomi D., Benfenati F., Valtorta F. The role of synapsins in neuronal development // Cell. Mol. Life. Sci. 2010. V. 67. № 9. P. 1383–1396.
- Goutan E., Martí E., Ferrer J. Expression of synaptic proteins in the developing rat cerebellum following ionizing radiation // Int. J. Dev. Neurosci. 1999. V. 17. № 4. P. 275–283.
- Greenlee M.H., Roosevelt C.B., Sakaguchi D.S. Differential localization of SNARE complex proteins SNAP-25, syntaxin, and VAMP during development of the mammalian retina // J. Comp. Neurol. 2001. V. 430. № 3. P. 306–320.
- Grubb M.S., Nissant A., Murray K., Lledo P.M. Functional maturation of the first synapse in olfaction: development and adult neurogenesis // J. Neurosci. 2008. V. 28. № 11. P. 2919–2932.
- Hepp R., Langley K. SNAREs during development // Cell. Tissue Res. 2001. V. 305. P. 247–253.
- Huart C., Rombaux P., Hummel T. Plasticity of the human olfactory system: the olfactory bulb // Molecules. 2013. V. 18. № 9. P. 11586–11600.
- 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.
- Ichikawa M., Kimura-Kuroda J., Yasui K., Kuroda Y. Expression of synaptophysin during synapse formation between dissociated cortical neurons // Neurosci. Res. 1991. V. 12. № 3. P. 452–458.
- Kimura M., Umehara T., Udagawa J., Kawachi H., Otani H. Development of olfactory epithelium in the human fetus: scanning electron microscopic observations // Congenit. Anom. (Kyoto). 2009. V. 49. № 3. P. 102–107.
- Knaus P., Betz H., Rehm H. Expression of synaptophysin during postnatal development of the mouse brain // J. Neurochem. 1986. V. 47. № 4. P. 1302–1304.
- Leclerc N., Beesley P.W., Brown I., Colonnier M., Gurd J.W., Paladino T., Hawkes R. Synaptophysin expression during synaptogenesis in the rat cerebellar cortex // J. Comp. Neurol. 1989. V. 280. № 2. P. 197–212.
- Lin D.M., Ngai J. Development of the vertebrate main olfactory system // Current opinion in neurobiology. 1999. V. 9. P. 74–78.
- Mennella J.A., Jagnow C.P., Beauchamp G.K. Prenatal and postnatal flavor learning by human infants // Pediatrics. 2001. V. 107. № 6. E88.

- Moran D.T., Rowley J.C. 3rd, Jafek B.W., Lovell M.A.* The fine structure of the olfactory mucosa in man // *J. Neurocytol.* 1982. V. 11. № 5. P. 721–746.
- Mason C.A.* Axon development in mouse cerebellum: embryonic axon forms and the expression of synapsin I // *Neurosci.* 1987. V. 19. P. 1319–1333.
- Muller F., O'Rahilly R.* Olfactory structures in staged human embryos // *Cells Tissues Organs.* 2004. V. 178. P. 93–116.
- Nadarajah B., Parnavelas J.G.* Mode of neuronal migration in the developing cerebral cortex // *Nat. Rev. Neurosci.* 2002. V. 3. P. 423–443.
- Nieuwenhuys R.* The Central Nervous System of Vertebrates. Berl: Springer-Verlag, 1998. V. 3.
- Oyler G.A., Polli J.W., Wilson M.C., Billingsley M.L.* Developmental expression of the 25-kDa synaptosomal-associated protein (SNAP-25) in rat brain // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991. V. 88. № 12. P. 5247–5251.
- Pearson A.A.* The development of the olfactory nerve in man // *J. Comp. Neurol.* 1941. V. 75. P. 199–217.
- Pearson A.A.* The development of the olfactory nerve, the nervus terminalis, and the vomeronasal nerve in man // *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 1942. V. 51. № 2. P. 317–332.
- Rakic P.* Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex // *J. Comp. Neurol.* 1972. V. 145. № 1. P. 61–84.
- Salasar I., Quintiero P.S., Lombardero M., Aleman N., Fernandez de Troconiz P.* The prenatal maturity of the accessory olfactory bulb in pigs // *Chem. Senses.* 2004. V. 29. № 1. P. 3–11.
- Schaal B., Marlier L., Soussignan R.* Human foetuses learn odours from their pregnant mother's diet // *Chem. Senses.* 2000. V. 25. P. 729–737.
- Sidor-Kaczmarek J., Labuda C., Litwinowicz B., Spodnik J.H., Kowiański P., Dziewiatkowski J., Moryś J.* Developmental expression of SNAP-25 protein in the rat striatum and cerebral cortex // *Folia Morphol. (Warsz).* 2004. V. 63. № 3. P. 285–288.
- Sollner T., Bennett M.K., Whiteheart S.W., Scheller R.H., Rothman J.E.* 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.
- Takahashi S., Iwanaga T., Takahashi Y., Nakano Y., Fujita T.* 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.
- Tao-Cheng J.H., Du J., McBain C.J.* Snap-25 is polarized to axons and abundant along the axolemma: an immunogold study of intact neurons // *J. Neurocytol.* 2000. V. 29. № 1. P. 67–77.
- Valverde F., Santacana M., Heredia M.* Formation of an olfactory glomerulus: morphological aspects of development and organization // *Neuroscience.* 1992. V. 49. P. 255–275.

Development of the Human Olfactory Bulbs in the Prenatal Ontogenesis: an Immunohistochemical Study with Markers of Presynaptic Terminals (anti-SNAP-25, -Synapsin-I, -Synaptophysin)

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

Laboratory of Nervous System Development, Research Institute of Human Morphology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Tsyurupy 3, Moscow, 117418 Russia

e-mail: grossu@rambler.ru, grossulyar@gmail.com

Received January 30, 2014; in final form, May 22, 2014

We provide the data of the olfactory bulbs (OB) development in the human fetuses on the stages from 8 week to birth. Immunohistochemical markers of presynaptic terminals (anti-SNAP-25, -synapsin-I, -synaptophysin) were used to evaluate the maturation of the OB. Differentiation of the OB layers begins from periphery, which implicitly evidences that growth of the olfactory nerves fibers induces not only anatomical differentiation of the OB, but also differentiation of its functional layers. The sites of the developing glomerulus are revealed using the immunohistochemical procedure on the stage before distinct glomerulus can be identified with common histological procedure. OB conductive system demonstrates immunoreactivity with the antibodies to the presynaptic proteins on the all stages from 10–11 weeks of fetus development. Four stages of the OB development are described. All functional layers of the OB are mature at the 22-weeks stage. Further differentiation of the OB neuroblasts, including lamina formation of the internal granular layer, glomerular layer development, OB growth continue after 20–22 weeks stage until 38–40 weeks of the fetus development. Patterns of the immunoreactivity with antibodies to SNAP-25, synapsin-I and synaptophysin are completely appropriate to those of adult's OB on the 38–40 weeks of the prenatal development. Complete maturity of the human OB is achieved at 38–40 weeks of the prenatal development.

Keywords: human fetuses, olfactory development, primary olfactory centers, SNAP-25, Synapsin-I, Synaptophysin