

<sup>1</sup>Харламова А. С., <sup>2</sup>Арчакова Х. М.

**ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ КАК ИНСТРУМЕНТ  
ОЦЕНКИ ТЕМПОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ  
ОБОНЯТЕЛЬНЫХ ЦЕНТРОВ ЧЕЛОВЕКА  
НА ПРЕНАТАЛЬНОМ ЭТАПЕ ОНТОГЕНЕЗА**

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт морфологии человека, г. Москва, Россия,

<sup>2</sup> Морозовская детская городская клиническая больница  
Департамента здравоохранения города Москвы

Изучение развития различных систем органов и тканей у человека ограничено спецификой доступа к аутопсийному материалу, принципиальным отсутствием возможности постановки полноценных экспериментальных опытов. Тем не менее, существуют косвенные способы оценки функционального созревания нервной системы. В этих целях используют антитела к антигенам нервной системы, уровень экспрессии которых изменяется в процессе развития [6, 8, 19], в том числе, антитела к белкам зрелых пресинаптических окончаний [5, 6, 9, 10, 17], к антигенам, специфически экспрессирующимся в дифференцирующихся (PSA-NCAM) [18] и зрелых (NeuN) [1] нейронах.

Несмотря на большой интерес к изучению обонятельной системы человека и млекопитающих прицельного изучения морфогенеза центрального морфологического субстрата обоняния — обонятельного мозга — не проводилось с середины прошлого века [2, 7, 11, 12]. Даже вопрос о дифференцировке первичных центров человека — обонятельных луковиц (ОЛ) — освещен в основном на ранних сроках внутриутробного развития [13, 15, 16] и не без ряда противоречий [11, 13].

Мы описали созревание ОЛ человека с использованием стандартных гистологических методик и линейки иммуногистохимических маркеров (anti-SNAP-25, -synaptophysin, -synapsin, -PSA-NCAM, NeuN), что позволило косвенно оценить темпы функционального развития обонятельных центров.

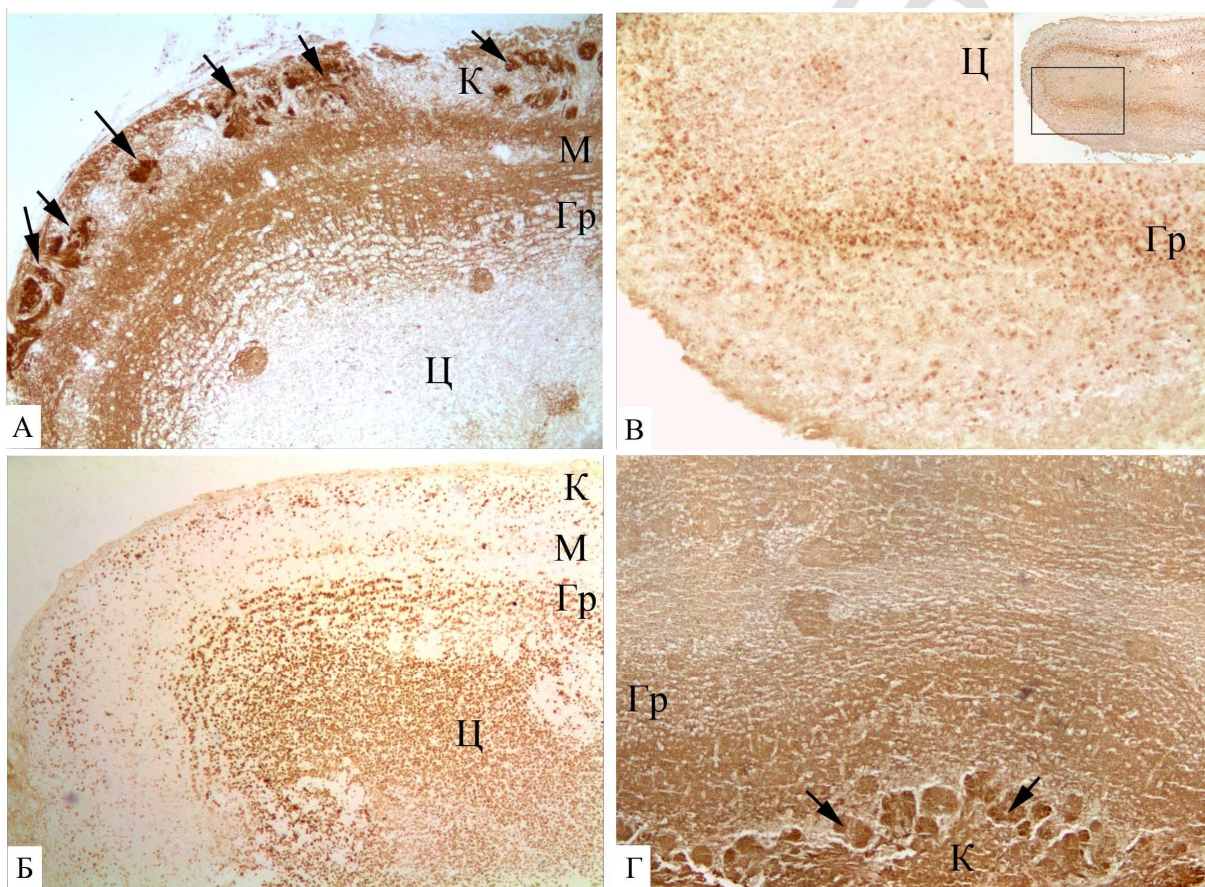
**Материал и методы.** Работа выполнена на аутопсийном материале плодов человека на сроках от 8-й недели развития до рождения. В качестве маркеров использовали anti-SNAP-25, -synaptophysin, -synapsin-I, -PSA-NCAM, -NeuN (см. подробно материалы и методы [2]).

**Результаты и обсуждение.** Выделено четыре этапа созревания ОЛ. На 7–8 неделе после индукции со стороны растущих обонятельных волокон начинается анатомическое обособление ОЛ, гистологическая дифференцировка слоев начинается после 8-й недели [11, 13]. На этом этапе ОЛ демонстрируют иммунореактивность с белками пресинаптических окончаний сходную по интенсивности с таковой в остальных отделах переднего мозга.

На втором этапе (9–14 неделя развития) идет первоначальная дифференцировка функциональных слоев ОЛ. С 10–11 недели видно периферический слой (входящих обонятельных волокон, и во временной перспективе, зона образования клубочков), внешний волокнистый (плексиформный) слой, развивающийся внешний клеточный и внутренний клеточный слой. Интенсивная иммунопозитивная реакция с антителами к белкам пресинаптических окончаний характерна

на этом сроке для периферического слоя — слоя входящих обонятельных волокон и образования клубочков. Проводящая система ОЛ демонстрирует иммунопозитивную реакцию с пресинаптическими белками с 10–11-й недели. С увеличением срока развития иммунореактивность с антителами к пресинаптическим белкам распространяется центростремительно, что подтверждает индуцирующую роль прорастающих обонятельных волокон и образованных ими связей [15, 16].

На третьем этапе к 20–22 неделе заканчивается гистологическая дифференцировка шести функциональных слоев ОЛ. На 19–20-й неделе внутриутробного развития во внешней области гранулярного слоя локально можно выделить образованные клетками подслои. Иммунореактивность с антителами к трем пресинаптическим белкам демонстрируют все функциональные слои, самая высокая интенсивность реакции в клубочковом слое, центральная область ОЛ иммунонегативна (рис.).



*Рис.* ОЛ плода на 28–29 неделе развития ( $\times 5$ ). Иммунореактивность с антителами к синаптофизину (А) демонстрирует нейропиль всех функциональных слоев ОЛ, наиболее интенсивная реакция наблюдается в клубочках (указаны стрелкой) ОЛ, центральная зона (Ц) иммунонегативна; с антителами к PSA-NCAM (Б). ОЛ плода на 19–20 неделе развития, иммунореактивность с антителами к NeuN демонстрируют клетки в пределах функциональных слоев ОЛ (В) ( $\times 10$ ). ОЛ новорожденного, равномерную иммунореактивность с антителами к SNAP-25 демонстрируют все зоны ОЛ, вентральное скопление клубочков указано стрелкой (Г,  $\times 5$ ). К — клубочковый слой, М — слой митральных клеток, Гр — внутренний гранулярный слой, Ц — центральная зона ОЛ

Зоны образования клубочков выделяются более интенсивной иммунореактивностью на пресинаптические белки уже на 17–18 неделях развития, тогда как гистологически оформленные клубочки можно увидеть только с 18–19 недели. Первые признаки интенсивной иммунореактивности с антителами к NeuN наблюдаются в области развивающихся периферического и митрального слоя уже с 14–15 недели развития. К 19–20 неделе интенсивную иммунореактивность демонстрируют нейроны клубочкового, митрального и внутреннего гранулярного слоев ОЛ (рис.). Такая ситуация сохраняется вплоть до поздних сроков развития.

На четвертом этапе (от 22–23 до 35 недели) четко выделены все шесть функциональных слоев, характерных для луковиц взрослых людей. Происходит увеличение размеров ОЛ, дальнейшее созревание образованных слоев — митральные клетки демонстрируют характерные цитологические признаки и отличия по размерам, клетки внутреннего гранулярного слоя образуют хорошо видимые подслой, клубочки образуют крупное вентральное скопление. Все слои демонстрируют иммунопозитивную реакцию на пресинаптические белки, центральная зона остается иммунонегативной. Наиболее интенсивную иммунореактивность до 28–29 недели включительно имеют клубочки ОЛ (рис.). Центральная зона ОЛ до 35-й недели иммунонегативна с антителами к пресинаптическим белкам. Равномерная иммунореактивность всех зон ОЛ, включая центральную, с использованными маркерами, характерная для луковиц взрослых людей, наблюдается только к 38–40 неделе. Иммунореактивность с антителами к пресинаптическим белкам в клубочковом слое также снижается до общего уровня к рождению. Снижение экспрессии пресинаптических белков до характерного для зрелой структуры уровня, связано с завершением активного синаптогенеза в процессе созревания [4, 17]. Центральная зона ОЛ идентифицируется с остатками прижелудочкового слоя клеток [14]: отсутствие иммунопозитивной реакции отражает продолжающиеся до рождения процессы созревания — она содержит в дифференцирующиеся нейроны, что подтверждается в реакции с анти-PSA-NCAM (рис.).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Годовалова, О. С. Экспрессия ядерного белка нервной ткани и глиального фибриллярного кислого белка в морфогенезе неокортекса / О. С. Годовалова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2010. Т. 149, № 5. С. 589–593.
2. Харламова, А. С. Исследование развития обонятельных луковиц человека с антителами к белкам пресинаптических окончаний (SNAP-25, Synapsin-I, Synaptophysin) на этапе пренатального онтогенеза / А. С. Харламова, С. В. Савельев, В. М. Барабанов // Онтогенез. 2015. Т. 46, № 3. С. 174–85.
3. Allison, A. C. The secondary olfactory areas in the human brain / A. C. Allison // J. Anat. 1954. Vol. 88, N 4. P. 481–8.
4. *Developmental* changes of synaptic proteins expression within the hippocampal formation of the rat / J. Biranowska [et al.] // J. Anat. Embryol. (Berl.). 2002. Vol. 206, N 1–2. P. 85–96.
5. *Expression* of a conserved cell type-specific protein in nerve terminals coincides with synaptogenesis / S. Catsicas [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. Vol. 88, N 3. P. 785–789.

6. *Conti, F.* GABA transporters in the mammalian cerebral cortex : localization, development and pathological implications / F. Conti, A. Minelli, M. Melone // *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2004. Vol. 45, N 3. C. 196–212.
7. *Crosby, E. C.* Studies of the vertebrate telencephalon. II. The nuclear pattern of the anterior olfactory nucleus, tuberculum olfactorium and the amygdaloid complex in adult man / E. C. Crosby, T. Humphrey // *J. Comp. Neurol.* 1941. Vol. 74, N 2. P. 309–352.
8. *The role of synapsins in neuronal development* / E. F. Fornasiero [et al.] // *Cell. Mol. Life. Sci.* 2010. Vol. 67, N 9. P. 1383–1396.
9. *Goutan, E.* Expression of synaptic proteins in the developing rat cerebellum following ionizing radiation / E. Goutan, E. Martí, I. Ferrer // *Int. J. Dev. Neurosci.* 1999. Vol. 17, N 4. P. 275–283.
10. *Greenlee, M. H.* Differential localization of SNARE complex proteins SNAP-25, syntaxin, and VAMP during development of the mammalian retina / M. H. Greenlee, C. B. Roosevelt, D. S. Sakaguchi // *J. Comp. Neurol.* 2001. Vol. 430, N 3. P. 306–320.
11. *Humphrey, T.* The development of the olfactory and accessory olfactory formations in human embryos and fetuses / T. Humphrey // *J. Comp. Neurol.* 1940. Vol. 73. P. 431–468.
12. *Macchi, G.* The ontogenetic development of the olfactory telencephalon in man / G. Macchi // *J. Comp. Neurol.* 1951. Vol. 95, N 2. P. 245–305.
13. *Muller, F.* Olfactory structures in staged human embryos / F. Muller, R. O’Rahilly // *Cells Tissues Organs.* 2004. Vol. 178. P. 93–116.
14. *Nieuwenhuys, R.* *The Central Nervous System of Vertebrates* / R. Nieuwenhuys. Berl : Springer-Verlag, 1998. Vol. 3.
15. *Pearson, A. A.* The development of the olfactory nerve in man / A. A. Pearson // *J. Comp. Neurol.* 1941. Vol. 75. P. 199–217.
16. *Pearson, A. A.* The development of the olfactory nerve, the nervus terminalis, and the vomeronasal nerve in man / A. A. Pearson // *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 1942. Vol. 51, N 2. P. 317–332.
17. *Developmental expression of SNAP\_25 protein in the rat striatum and cerebral cortex* / J. Sidor-Kaczmarek [et al.] // *Folia Morphol. (Warsz).* 2004. Vol. 63, N 3. P. 285–288.
18. *Seki, T.* Expression of highly polysialyated NCAM in the neocortex and piriform cortex of the developing and the adult rat / T. Seki, Y. Arai // *Anat. Embryol.* 1991. Vol. 184. P. 395–401.
19. *Ulfig, N.* Transient architectonic features in the basolateral amygdala of the human fetal brain / N. Ulfig, M. Setzer, J. Bohl // *Acta Anat (Basel).* 1998. Vol. 163, N 2. P. 99–112.

<sup>1</sup>*Kharlamova A.,* <sup>2</sup>*Archakova K.*

### **Immunohistochemistry markers for the research of the olfactory centers functional development in the human prenatal ontogenesis**

<sup>1</sup> *Research Institute of Human Morphology RAS, Moscow, Russia,*

<sup>2</sup> *State budgetary health facility Morozov Children's Clinical Hospital, Moscow Health Department*

Morphofunctional development of the primary olfactory centers in the human prenatal ontogenesis was described with the functional immunohistochemistry markers, four critical periods were marked and perspectives for the secondary olfactory centers research were shown. This study is funded by RFBR #16-34-00463.

**Key words:** olfactory centers, olfactory bulbs, Synaptophysin, PSA-NCAM, NeuN.