

## ОСОБЕННОСТИ МОРФОМЕТРИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ ЦИТОАРХИТЕКТониКИ НЕОКОРТЕКСА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ NeuN и MAP-2

Степанов А.С.<sup>1</sup>, Акулинин В.А.<sup>1</sup>, Степанов С.С.<sup>1</sup>, Авдеев Д.Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Омск, e-mail: akulinin@omsk-osma.ru

С помощью иммунофлуоресцентной визуализации нейронального ядерного протеина (NeuN), белка, ассоциированного с микротрубочками (MAP-2), автоматизированного компьютерного анализа изображений, полученных на конфокальном микроскопе, была изучена цитоархитектоника слоев III и V (поля 10, 17) лобной и височной коры головного мозга человека (n=4) в норме. Сравнивались количественные результаты исследования в зависимости от использованного белка. Морфометрический анализ проведен с помощью программы ImageJ 1.46 на масках при высоком конечном разрешении реального изображения (600 пикс/дюйм). Это позволило выявить даже очень мелкие флуоресцирующие структуры (тонкие дендриты). В совокупности нейронспецифические белки позволили установить общую площадь фронтального сечения перикарионов (в слое III поля 10 – 14097±2650, слое V – 13716±2780, в слое III поля 17 – 16003±3280, слое V – 14860±2875 мкм<sup>2</sup> на 381024 мкм<sup>2</sup> поля зрения), дендритов (в слое III поля 10 – 40390±7650, слое V – 35054±7560, в слое III поля 17 – 17908±3890, слое V – 16003±2250 мкм<sup>2</sup> на 381024 мкм<sup>2</sup> поля зрения) и численную плотность нейронов (в слое III поля 10 – 57861±7650, слое V – 40644±8765, в слое III поля 17 – 120330±20005, слое V – 84601±9880 на 1 мм<sup>3</sup>). Результаты настоящего исследования близки значениям аналогичных показателей, полученным другими авторами при помощи иных способов верификации нейронов (окраска гематоксилином/эозином, по методу Ниссля, электронная микроскопия). Данное исследование выявило сопоставимую численную плотность перикарионов при использовании Neu- и MAP-2, что свидетельствует об объективной морфометрической оценке цитоархитектоники различных слоев неокортекса человека.

Ключевые слова: человек, неокортекс, нейроны, NeuN, MAP-2 иммунофлуоресценция, морфометрия.

## FEATURES MORPHOMETRIC EVALUATION OF THE HUMAN NEOCORTEX CYTO-ARCHITECTONIC WITH IMMUNOHISTOCHEMICAL VISUALISATION OF NeuN AND MAP-2

Stepanov A.S.<sup>1</sup>, Akulinin V.A.<sup>1</sup>, Stepanov S.S.<sup>1</sup>, Avdeev D.B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Omsk State Medical University Ministry of Health of the Russian Federation, Omsk, e-mail: akulinin@omsk-osma.ru

Immunofluorescence imaging of neuronal nuclear protein (NeuN), protein associated with microtubules (MAP-2), automated computer image analysis obtained on a confocal laser scanning microscope, cytoarchitecture of layers III and V (fields 10 and 17) of the frontal and temporal of the human neocortex (n = 4) is normal cases. Quantitative results of the study were compared with the protein used. Morphometric analysis was performed using ImageJ 1.46 on masks at high final resolution of the real image (600 pixels / inch). This made it possible to detect even very small fluorescent structures (thin dendrites). Together, the neuron-specific proteins allowed us to determine the total area of the frontal section of the perikaryons (in the layer III of the field 10 - 14097 ± 2650, the layer V - 13716 ± 2780, in the layer III of the field 17- 16003 ± 3280, the layer V - 14860 ± 2875 μm<sup>2</sup> by 381024 μm<sup>2</sup>), dendrites (in the layer III of the field 10 - 40390 ± 7650, the layer V - 35054 ± 7560, in the layer III of the field 17 - 17908 ± 3890, the layer V - 16003 ± 2250 μm<sup>2</sup> at 381024 μm<sup>2</sup> of the field of view) and the numerical density of neurons in the layer III of the field 10 - 57861 ± 7650, the layer V - 40644 ± 8765, in the layer III of the field 17 - 120330 ± 20005, the layer V - 84601 ± 9880 per 1 mm<sup>3</sup>). The results of this study are similar to those obtained by other authors using other methods for verifying neurons (staining with hematoxylin / eosin, Nissl staining, electron microscopy). This study revealed a comparable numerical density of perikaryons using Neu- and MAP-2, which indicates an objective morphometric evaluation of cytoarchitectonics of various layers of the human neocortex.

Keywords: neocortex, neurons, NeuN, MAP-2 immunofluorescence, morphometry.

Изучение структурно-функционального состояния нейронов и цитоархитектоники

коры головного мозга млекопитающих является актуальным направлением нейроморфологии и поиска новых методов получения объективных данных [7]. Для этого широко используются моноклональные антитела к нейронспецифическим белкам, которые локализуются в перикарионе: нейрон-специфическая енолаза (NSE), нейрональный ядерный антиген (NeuN), ассоциированный с микротрубочками белок 2 (MAP-2) [3; 5; 6; 8].

Несмотря на длительную историю применения этих маркеров, сравнительный морфометрический анализ результатов иммуногистохимического определения их на серийных срезах одного образца для оценки общей численной плотности нейронов коры головного мозга человека ранее не проводился. В этой связи наибольший интерес представляют NeuN и MAP-2 [5].

NeuN обнаружен в большинстве нейронов центральной и периферической нервной системы взрослых млекопитающих (за исключением клеток Пуркинье мозжечка, обонятельных митральных клеток луковицы, фоторецепторных клеток сетчатки и дофаминергических нейронов в черной субстанции). При иммуногистохимической реакции белок выявляется в ядре и перинуклеолярном пространстве [5].

MAP-2 является цитоскелетным белком, участвует в сборке микротрубочек, стабилизируя их рост путем сшивания с промежуточными филаментами и другими микротрубочками, играет определенную роль в детерминации и стабилизации дендритной формы, выявляется в перикарионе и в пределах дендритного дерева [3; 4; 9].

Целью настоящего исследования было сравнительное морфометрическое изучение нейронов слоя III и V в лобной и височной коре головного мозга человека при иммуногистохимической визуализации NeuN и MAP-2 в норме.

### **Материал и методы**

Работа выполнена на базе ГБОУ ВПО «Омский государственный медицинский университет» и Department of Anatomy and Cell Biology (Goteborg University, Medicinaregatan 3-5, Goteborg S-41390, Sweden). Материал для гистологического исследования забирался в Омском областном бюро судебно-медицинской экспертизы. Данное исследование одобрено этическим комитетом Омского государственного медицинского университета.

Для исследования использовался аутопсийный материал (5-10 ч после смерти) из поля 10 и 17 (по Бродману) коры головного мозга (КГМ) погибших в результате несчастных случаев (n=4). Кусочки 20 × 10 × 10 мм фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида (0,1 М фосфатный буфер, pH 7,4, при температуре 4 °C). Для иммуногистохимического исследования срезы (10 мкм) производились во фронтальной плоскости через все слои коры на замораживающем криостате (Cryostat, Leica, Германия). Для окраски использовали моноклональные антитела к ядерному нейрональному протеину (Neuronal nuclei protein,

NeuN; CHEMICON International Inc., США) и к белку, ассоциированному с микротрубочками (MAP-2); вторичные антитела (Biotinylated anti-mouse; Sigma Chemicals, США), FITC-связанный стрептавидин (FITC-conjugated streptavidin; Amersham, Buckinghamshire, Великобритания) [3].

Иммуногистохимические препараты просматривались на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе BioRad MRC 600, присоединенном к флуоресцентному микроскопу Nikon FXA. Использовался аргонокриптоновый лазер с фильтром для FITC (488 DF 10) и липофусцина (568 DF 10). Применялась двухканальная флуоресценция.

Проверку статистических гипотез проводили при помощи программы STATISTICA 8.0 с использованием параметрического t-критерия Стьюдента (для парного сравнения зависимых выборок) и критерия  $\chi^2$  (относительные величины). Нулевая гипотеза отвергалась при статистической значимости  $p < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

В ходе исследования препаратов слоя III (рис. 1 а, б) и V (рис. 1 в, г) лобной КБМ было установлено, что иммунофлуоресцентная метка на NeuN и MAP-2 маркировала тела мелких, средних и крупных нейронов. Яркость структур варьировала от различных оттенков серого до белого, что свидетельствовало о разной интенсивности флуоресценции и разном количестве молекул изученных белков в местах связывания моноклональных антител. При реакции на NeuN маркировались тела (перикарион и ядра клеток), а при MAP-2 – перикарион и дендритное дерево, вплоть до очень мелких веточек (рис. 1 а, в). На цифровых изображениях преобладали нейроны с интенсивным свечением перикариона (рис. 1 а-г).

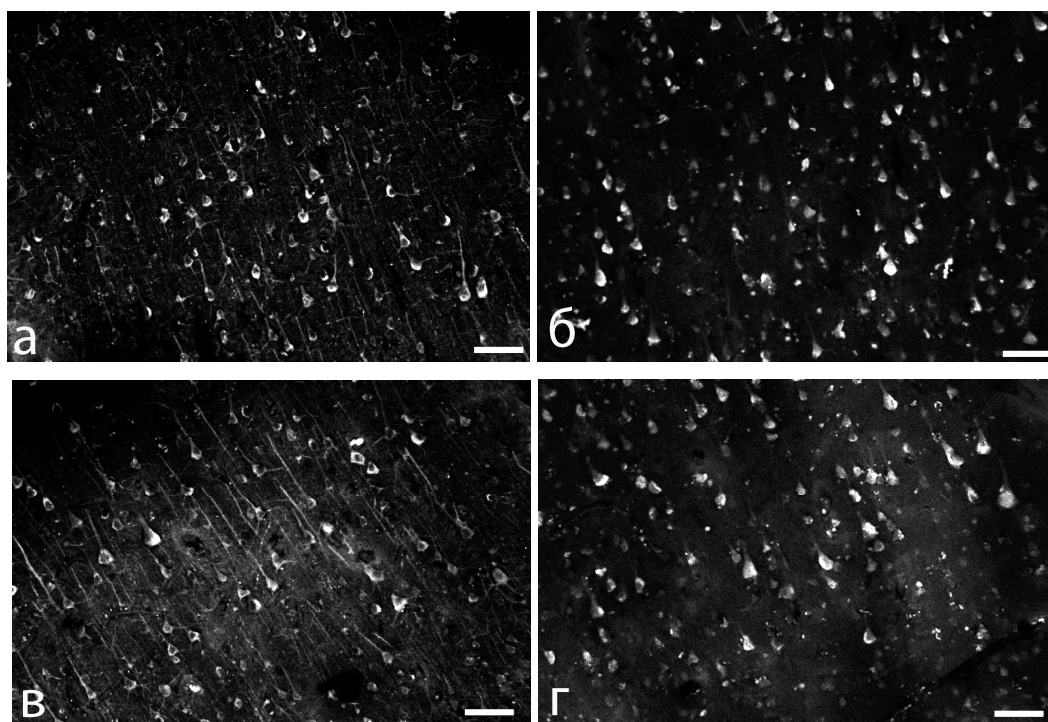


Рис. 1. NeuN- и MAP-2 позитивные структуры слоя III (а, б) и V (в, г) лобной коры головного

мозга человека (поле 10): а, в – MAP-2, б, г – NeuN. Метод флуоресцентной иммуногистохимии. Об.  $\times 20$ , шкала 50 мкм

Таким образом, на аутопсийном материале КГМ человека отчетливо верифицировались NeuN- и MAP-позитивные структуры – перикарионы, ядра и дендритное дерево, которые могли быть подвергнуты морфометрическому анализу. Нами использовались программы Photoshop 8 и ImageJ 1.46. Для увеличения степени детализации исходные 8-битовые изображения в формате xxx.pis трансформировали в формат xxx.tif, задавали стандартные настройки яркости/контрастности и увеличивали конечное разрешение до 600 пикселей на дюйм.

Морфометрический анализ изображений (8-битовые) проводили после их превращения в бинарное (программа ImageJ 1.46). На первом этапе при автоматическом анализе частиц на масках изображений их размер и форма не лимитировались. Это позволило отразить все составляющие реального изображения и определить площадь маркированных структур NeuN и MAP-2 (рис. 2а).

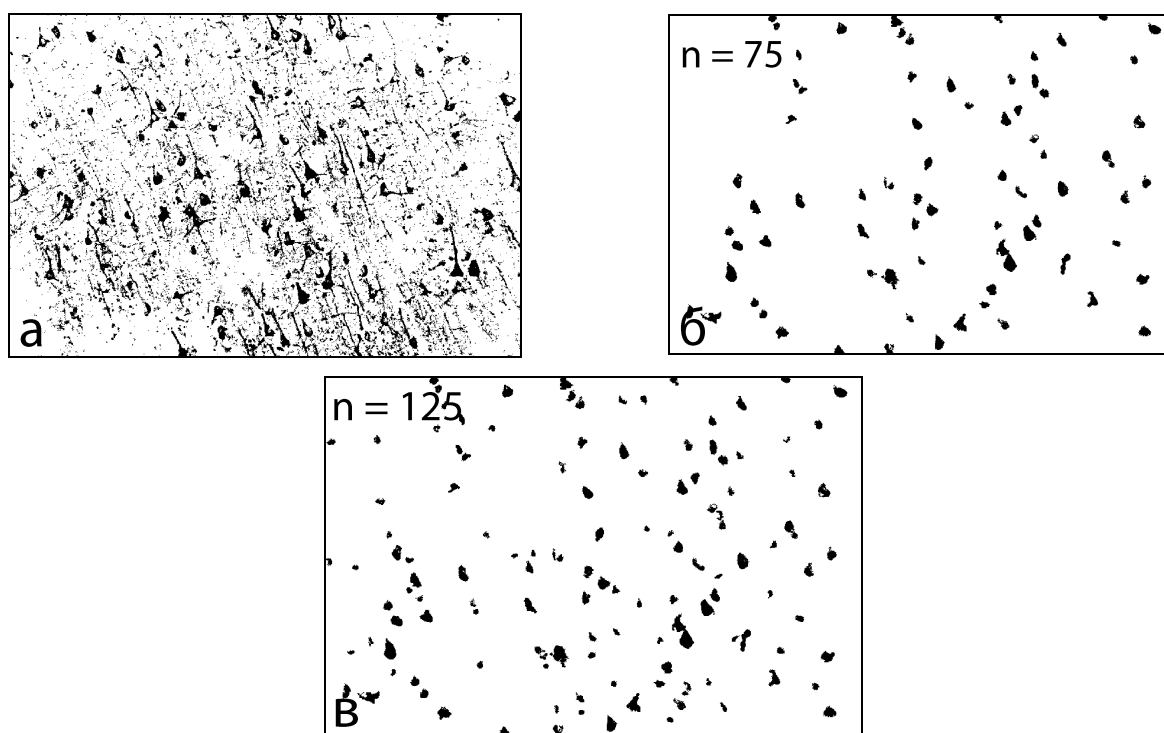


Рис. 2. Маски изображения поля зрения слоя III лобной коры головного мозга человека, созданные программой ImageJ 1.46 (оригинал на рис. 1): а – все MAP-позитивные структуры, б – только яркие NeuN-позитивные структуры, в – все NeuN-позитивные структуры. Шкала 50 мкм

На препаратах MAP-2 общую численную плотность тел нейронов нельзя было определить в автоматическом режиме. Это связано со сложностью изображения и невозможностью с помощью программы ImageJ 1.46 формирования на его масках

дискретных частиц, соответствующих только телам (рис. 2а). Ручной режим подсчета позволил выявить  $52974/\text{мм}^3$  тел MAP-позитивных нейронов (рис. 2а).

Тела NeuN-позитивных нейронов четко верифицировались (рис. 2 б, в). Однако, в силу различия яркости частей (середина клетки, периферия) меченых нейронов в срезе (рис. 1 б, г), требовалась ручная подборка параметров отсечения для наибольшего соответствия реального изображения его маске. Так, если учитывать на изображении (рис. 1б) только яркие (интенсивно флуоресцирующие) срединные фрагменты нейронов, то на его маске выявлялось 75 частиц (рис. 2б), а при менее строгих ограничениях – 125 (рис. 2в). При пересчете на единицу объема соответственно получалось  $54432$  и  $90720/\text{мм}^3$ .

Сравнение результатов исследования NeuN- и MAP-позитивных нейронов на последовательных серийных срезах (рис. 2 а, б) показало близкие данные ( $54432$  и  $52974/\text{мм}^3$ ) только для варианта подсчета, когда учитывались интенсивно флуоресцирующие части NeuN-позитивных нейронов, попавшие в срез.

Необходимо отметить, что MAP-позитивные дендриты маскировали часть слабо флуоресцирующих тел нейронов, поэтому визуальный подсчет был менее чувствителен, чем при подсчете NeuN-позитивных нейронов. При использовании MAP-2 невозможно было раздельное определение площади сечения тел нейронов и дендритного дерева. Проблема определения относительных площадей тел и дендритного дерева решалась только сочетанным параллельным использованием NeuN и MAP-2. Так, все MAP-позитивные структуры (тела и дендриты, рис. 2а) занимали 13,6% поля зрения, а NeuN-позитивные (только тела, рис. 2в) – 4,0%. Следовательно, на долю дендритов приходилось 8,6% поля зрения. В срезе нейрона тела занимали 29,4%, а дендриты – 70,6%.

Таким образом, объективные данные по общей численной плотности нейронов в КГМ можно получить при визуализации NeuN и автоматизированном анализе изображений. Окраска на MAP-2 существенно расширяла возможности иммуногистохимического изучения cito- и дендроархитектоники КГМ. Появлялась возможность измерения площади тел нейронов и дендритного дерева в поле зрения.

Описанный выше подход позволил провести сравнительный анализ citoархитектоники лобной (поле 10) и височной (поле 17) КГМ человека в норме. Визуально структура слоев III и V лобной и височной КГМ практически не отличалась, а плотность нейронов в височной казалась выше, чем в лобной (рис. 1 а-г, 3 а-г).

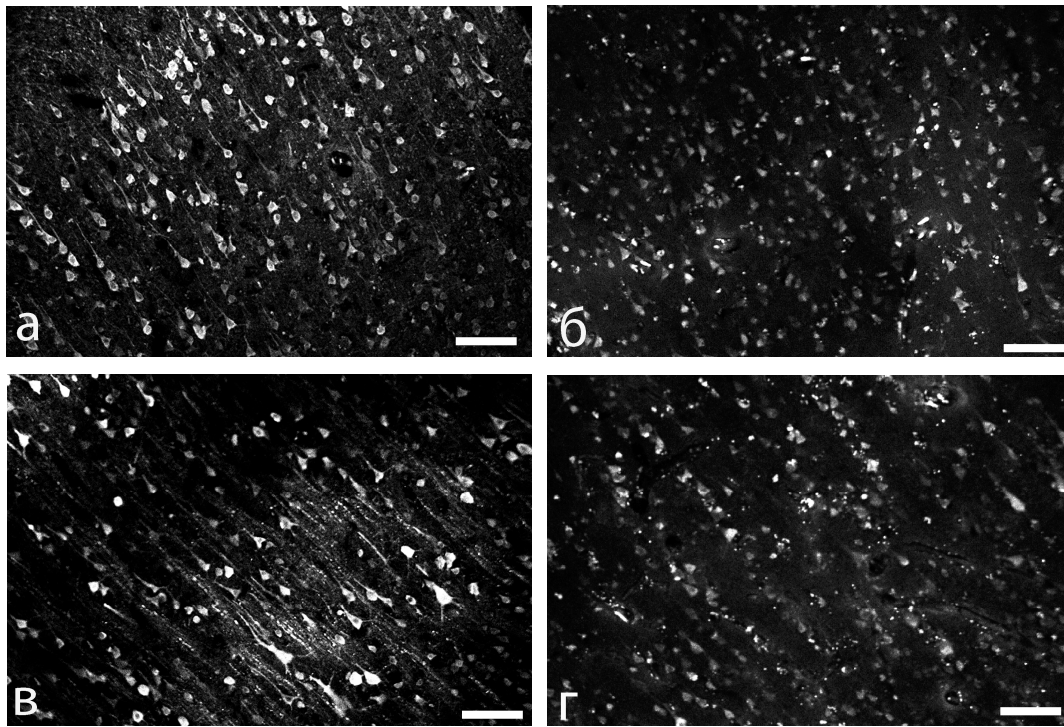


Рис. 3. NeuN- и MAP-2 позитивные структуры слоя III (а, б) и V (в, г) височной коры головного мозга человека (поле 17): а, в – MAP-2, Метод флуоресцентной иммуногистохимии. Об.  $\times 20$ , шкала 50 мкм

Морфометрическое исследование показало, что общая численная плотность (ОЧП) нейронов в слоях III и V лобной и височной КГМ человека различались статистически значимо (табл. 1). В слое III ОЧП была больше в 2,1, а в слое V – в 1,46 раза (анализ NeuN). Завышенные значения ОЧП тел нейронов были получены при варианте автоматического анализа, когда учитывались все NeuN-позитивные флуоресцирующие дискретные частицы на глубине всего среза. Это свидетельствовало о необходимости отсечения мелких частей нейронов, основная масса тела которых располагалась в предыдущем и последующем серийном срезе (табл. 1).

**Таблица 1**

Общая численная плотность нейронов (на  $1 \text{ мм}^3$ ) в лобной (поле 10) и височной (поле 17) КГМ человека ( $n = 4$ ) в норме

Метод визуализации	Доли коры головного мозга			
	Лобная (50 полей зрения)		Височная (50 полей зрения)	
	Слой III	Слой V	Слой III	Слой V
NeuN (избирательное выделение интенсивно флуоресцирующих нейронов)	57861 $\pm$ 7650	40644 $\pm$ 8765	120330 $\pm$ 20005 t = 26,5; p < 0,0001*	84601 $\pm$ 9880 t = 19,6; p < 0,0001
NeuN (все флуоресцирующие нейроны)	87570 $\pm$ 10945 t = 15,9; p < 0,0001^	62775 $\pm$ 12660 t = 10,1; p < 0,0001^	211914 $\pm$ 40560 t = 22,3; p < 0,0001*	137664 $\pm$ 25690 t = 18,2; p < 0,0001

			t = 10,7; p < 0,0001 <sup>^</sup>	t = 9,6; p < 0,0001 <sup>^</sup>
MAP-2 (ручной подсчет тел)	52002±5260 t = 3,3; p = 0,002 <sup>^</sup>	37746±7850	112804±12675 t = 27,6; p < 0,0001* t = 3,6; p = 0,001 <sup>^</sup>	79524±10870 t = 15,5; p < 0,0001* t = 4,2; p = 0,0001 <sup>^</sup>
* В сравнении с лобной корой; <sup>^</sup> в сравнении с NeuN (интенсивно флуоресцирующие) различия статистически значимы (t-критерий Стьюдента для зависимых выборок)				

Автоматическое измерение размеров NeuN- и MAP-2 позитивных структур показал, что в слоях III и V лобной и височной КГМ человека абсолютные площади фронтальных срезов тел нейронов и дендритного дерева статистически значимо различались (табл. 2). В слое III лобной КГМ тела занимали 3,7%, а дендриты – 10,6%. В слое V – 3,6 и 9,2% соответственно. В слое III височной КГМ тела занимали 4,2%, а дендриты – 4,7%. В слое V – 3,9 и 4,2% соответственно. То есть при большей плотности нейронов в височной коре общая площадь срезов тел была лишь незначительно больше, чем в лобной коре, а площадь дендритов – существенно меньше (табл. 2).

**Таблица 2**

Площадь срезов тел нейронов и дендритного дерева (на 381024 мкм<sup>2</sup> поля зрения) в лобной (поле 10) и височной (поле 17) КГМ человека (n = 4) в норме

Структуры и метод визуализации	Доли коры головного мозга			
	Лобная (50 полей зрения)		Височная (50 полей зрения)	
	Слой III	Слой V	Слой III	Слой V
Тела (NeuN)	14097±2650	13716±2780	16003±3280 t = 3,2 p = 0,002*	14860±2875 t = 2,0 p = 0,046*
Тела + дендриты (MAP-2)	54486±10340	48770±8990 t = 3,0 p = 0,004 <sup>^</sup>	33910±7860 t = 11,2 p < 0,0001*	30860±6790 t = 11,1 p < 0,0001*
Дендриты (NeuN и MAP-2)	40390±7650	35054±7560 t = 3,5 p = 0,001 <sup>^</sup>	17908±3890 t = 18,5 p < 0,0001*	16003±2250 t = 17,1 p < 0,0001*
В сравнении с лобной корой; <sup>^</sup> в сравнении со слоем III статистически значимы (t-критерий Стьюдента для зависимых выборок)				

### Заключение

Таким образом, с помощью флуоресцентной иммуногистохимической визуализации NeuN и MAP-2 в лобной и височной КГМ, при использовании конфокального микроскопа и высокого (600 пикс/дюйм) конечного разрешения цифрового изображения, удалось точно оценить ОЧП нейронов (в слое III поля 10 – 57861±7650, слое V – 40644±8765, в слое III поля 17 – 120330±20005, слое V – 84601±9880 на 1 мм<sup>3</sup>), а также суммарную площадь сечений тел

(в слое III поля 10 –  $14097 \pm 2650$ , слое V –  $13716 \pm 2780$ , в слое III поля 17 –  $16003 \pm 3280$ , слое V –  $14860 \pm 2875$  мкм<sup>2</sup> на 381024 мкм<sup>2</sup> поля зрения) и дендритного дерева (в слое III поля 10 –  $40390 \pm 7650$ , слое V –  $35054 \pm 7560$ , в слое III поля 17 –  $17908 \pm 3890$ , слое V –  $16003 \pm 2250$  мкм<sup>2</sup> на 381024 мкм<sup>2</sup> поля зрения).

Утверждение о точности измерения базировалось на сравнении с литературными данными классической визуализации нейронов с помощью окраски гематоксилином/эозином и по Нисслю, электронной микроскопии. При использовании классических гистологических методов окраски, по данным литературы, в височной коре общая численная плотность нейронов была больше, чем в лобной КГМ (слой III – 2,8, слой V – в 1,45 раза) [1; 2]. По нашим данным, в 2,1 и 1,46 раза соответственно.

Полученные нами результаты необходимо учитывать при изучении цитоархитектоники КГМ с помощью иммуногистохимических методов визуализации нейронспецифических белков NeuN и MAP-2. В совокупности эти методы позволяют получить точные объективные данные не только по общей численной плотности клеток, но и о доле площади сечений тел нейронов и дендритного дерева (в поле зрения).

### Список литературы

1. Блинков С.М. Мозг человека в цифрах и таблицах / Блинков С.М., Глезер И.И. – Л. : Медицина, 1964. – 472 с.
2. Сергеев А.В. Естественные механизмы защиты головного мозга человека при хронической ишемии / А.В. Сергеев [и др.] // Общая реаниматология. – 2015. – Т. 11, № 1. – С. 22–32.
3. Akulinin V.A., Dahlstrom A. Quantitative Analysis of MAP2 Immunoreactivity in Human Neocortex of Three Patients Surviving after Brain Ischemia // *Neurochemistry Research*. - 2003. - V. 28, N 2. - P. 373–378.
4. Dubey J. Neurodegeneration and microtubule dynamics: death by a thousand cuts / J. Dubey [et al.] // *Frontier Cell Neuroscience*. - 2015. - V. 9. - P. 343.
5. Gusel'nikova V.V., Korzhevskiy D.E. NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker // *Acta Naturae*. - 2015. - V. 7, N 25. - P. 42-47.
6. Kokaia M. Seizure-induced Neurogenesis in the Adult Brain // *European Journal Neuroscience*. - 2011. - V. 33, № 6. - P. 1133–1138.
7. Lemmens M.A., Steinbusch H.W., Rutten B.P., Schmitz C. Advanced microscopy techniques for quantitative analysis in neuromorphology and neuropathology research: current status and requirements for the future // *Journal Chemistry Neuroanatomy*. - 2010. - V. 40, N 3. - P.



199-209.

8. Lyck L. Immunohistochemical markers for quantitative studies of neurons and glia in human neocortex / L. Lyck [et al.] // Journal of Histochemistry & Cytochemistry. - 2008. - V. 56, N 3. - P. 201–221.

9. van de Willige D. Microtubule plus-end tracking proteins in neuronal development / van de D. Willige, C.C. Hoogenraad, A. Akhmanova // Cell Molecular Life Science. - 2016. - V. 73, N 10. – P. 2053-2077.