

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА NeuN В СПИНАЛЬНЫХ НЕЙРОНАХ, ОРГАНИЗУЮЩИХ ПРОЕКЦИИ К МОЗЖЕЧКУ

© 2023 г. А. А. Вещицкий¹, Н. В. Павлова¹, П. Ю. Шкорбатова¹,
Н. И. Никитина¹, Н. С. Меркульева^{1,*}

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: mer-natalia@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.10.2023 г.

После доработки 20.10.2023 г.

Принята к публикации 22.10.2023 г.

В настоящей работе были проанализированы особенности иммуномечения антителами NeuN нейронов спинного мозга кошки, расположенных в четырех структурах, организующих проекции к мозжечку: ядре Кларка и пограничных клетках – в сегменте L4, центральном шейном ядре – в сегменте С3, и ядре Штиллинга – в сегменте S2. Проведены морфометрическое и денситометрическое исследования. Показано, что все нейроны интереса обладают яркой особенностью: крайне слабым уровнем NeuN-иммуномечения в цитоплазме, с сохранением высокого уровня NeuN-иммуномечения в ядре. Средний размер сомы нейронов интереса составил 1000–1850 мкм², что сопоставимо с другим типом крупных нейронов на срезах – мотонейронами (1140–1660 мкм²), поэтому мы использовали популяции мотонейронов соответствующих сегментов для сравнения величин оптической плотности. Относительная оптическая плотность нейронов интереса была в несколько раз ниже таковой у мотонейронов (0.060 ± 0.030 vs 0.330 ± 0.127). Достоверных отличий по величине оптической плотности между разными структурами интереса не выявлено. Учитывая морфологическую уникальность и схожесть этих четырех популяций клеток, полагаем, что особенность экспрессии белка NeuN может быть использована в качестве простого метода визуализации клеток, организующих проекции к мозжечку, что представляет собой ценность как при целевом морфологическом исследовании, так и при проведении гистологического контроля после физиологического эксперимента.

Ключевые слова: NeuN, спинно-мозжечковые тракты, ядро Кларка, ядро Штиллинга, центральное шейное ядро, пограничные клетки, кошка

DOI: 10.31857/S0044452923060098, **EDN:** HURKUU

ВВЕДЕНИЕ

Спинно-мозжечковые тракты – одни из важнейших восходящих систем спинного мозга, несущие в мозжечок проприоцептивную информацию от мышечных веретен, сухожильных рецепторов Гольджи, телец Пачини и свободных нервных окончаний [1]. Пути проприоцептивной чувствительности организованы группами нейронов в спинном мозге, организующих проекции к мозжечку. Существует несколько десятков таких групп [2]; при этом основными из них являются четыре [3]:

(1) Нейроны ядер Кларка – симметричных образований, локализованных на уровне пластин V–VI грудного и верхнепоясничного отделов спинного мозга [4–7], впервые описанных Clarke [8] – источник дорзального спинно-мозжечкового тракта.

(2) Так называемые пограничные клетки (BC; в оригинале “border cells”), разбросанные вдоль вентро-латеральной границы серого и белого вещества и инициирующие вентральный спинно-мозжечковый тракт [9–11]. У хищных эти нейроны

выявлены в каудальных грудных и поясничных сегментах, с максимумом в сегментах L2–L6 [6, 12]. Оба тракта принимают участие в контроле моторики задних конечностей и локомоции в целом [13–16].

(3) Центральное шейное ядро, расположенное в пластине VI верхних шейных сегментов, организует так называемый “спинно-мозжечковый тракт центрального шейного ядра” [12, 17] и принимает участие в контроле позы, движений головы и глаз [18, 19].

(4) Ядро Штиллинга, расположенное в крестцовых и копчиковых сегментах [20], посылает в мозжечок проприоцептивные проекции от хвоста [12, 21, 22].

Среди этих четырех групп наиболее легко распознаваемым на гистологических срезах является ядро Кларка: в частности, из-за кольцевых пучков волокон, проходящих по периметру ядра на поперечных срезах [23]. Центральное шейное ядро также можно распознать, благодаря группированию крупных нейронов, его составляющих [24]. Ядро Штиллинга показано у грызунов [7, 25], сумчатых

[26] и приматов [7, 27], но не у кошки [7], хотя нейроны, иницирующие проекции к мозжечку, выявлены у кошки в тех же областях, что и у грызунов, сумчатых и приматов [12]. Что касается пограничных нейронов, то до сих пор их было возможно выявить лишь с помощью прямого треисирования [12, 20, 28, 29], ретроградной дегенерации [30] и транскриптового анализа [3, 31], но не с помощью цитоархитектонических или нейрохимических критериев. В настоящем исследовании мы предлагаем простой критерий для выделения нейронов в составе четырех источников спинно-мозжечковых проекций, основываясь на особенностях их иммуномечения антителами к белку NeuN, который полагается специфическим нейрональным маркером, поскольку отсутствует в не-нейронных клетках, например, глиальных [32]. Полагаем, это станет удобным инструментом для визуализации нейронов, иницирующих спинномозжечковые взаимодействия, как в морфологических, так и в физиологических исследованиях.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на поперечных срезах третьего шейного (С3), четвертого поясничного (L4) и второго крестцового (S2) сегментов и горизонтальных срезах сегмента L4 спинного мозга 9 нормально пигментированных взрослых кошек обоего пола (*Felis catus*) массой 2.5–3.5 кг. Согласно целям гуманного использования экспериментальных животных и принципу “3R”, часть образцов спинного мозга была получена от животных, принимавших участие в морфологическом опыте по изучению структур головного мозга [33–35].

Подготовка гистологического материала. Под глубоким наркозом (5%-ным изофлюраном) проводили транскардиальную перфузию. Для предупреждения свертываемости крови и образования тромбов за 10 мин до начала перфузии внутримышечно вводили гепарин (0.5 мл/кг). Промывку сосудов от форменных элементов крови осуществляли физиологическим раствором (0.9%-ный натрия хлорид, 700–800 мл/кг, рН 7.4, 25°C), фиксацию тканей – 4%-ным раствором параформальдегида на 0.01 М фосфатном буфере (рН 7.4, 600–700 мл/кг, 25°C). После перфузии спинной мозг извлекали из позвоночного канала и делили на сегменты, ориентируясь на положение дорзальных корешков [36]. Затем, для приготовления замороженных свободно плавающих срезов толщиной 50 мкм, материал проводили по растворам сахарозы 20- и 30%-ной концентрации, а для приготовления парафиновых срезов толщиной 7 мкм – по растворам спиртов восходящей концентрации, хлороформа, после чего заливали в парафин. Изготовление замороженных поперечных и горизонтальных срезов проводили на образцах спинного мозга 6 животных с помощью замораживающего микротомы (Reichert, Ав-

стрия); парафиновых – на образцах спинного мозга 3 животных с помощью ротационного микротомы МПС-2 (Украина).

Иммуногистохимия. Выявление нейронального белка NeuN проводили с помощью непрямого иммуногистохимического метода на стекле (для парафиновых срезов) и свободно плавающих (для замороженных срезов) срезов. Парафиновые срезы предварительно депарафинизировали в ксилоле и растворах спиртов нисходящей концентрации. В начале выполнения протокола и между всеми ключевыми этапами срезы промывали в 0.01 М фосфатно-солевом буфере 3 раза по 10 мин. Демаскировку антигенов на свободно плавающих срезах проводили в 1%-ном NaBH_4 в течение 15 мин, на парафиновых – нагреванием до 70°C в цитратном буфере в течение 25 мин. Активность эндогенной пероксидазы блокировали путем получасовой инкубации в 0.3%-ной H_2O_2 . Неспецифическую реакцию антител подавляли 3% нормальной сывороткой козы (NGS, Vector Labs, Великобритания) в течение 90 мин. Затем, не промывая, свободно плавающие срезы инкубировали в течение 72 ч при +4°C, а парафиновые срезы – в течение 2 ч при +37°C в растворе первичных поликлональных антител мыши к NeuN (Sigma-Aldrich, MAB377, RRID:AB_2298767, разведение 1:5000 – для свободно плавающих и 1:200 – для парафиновых срезов), 3% нормальной сыворотки козы и консерванта 0.1% NaN_3 . Затем срезы инкубировали в растворе биотинилированных вторичных кроличьих антител против сыворотки мыши (Vector Labs, разведение 1:600) в течение 24 ч – для замороженных срезов и в течение 1 ч – для парафиновых срезов. К раствору вторичных антител добавляли 3%-ную нормальную сыворотку козы. Затем срезы инкубировали в авидин-биотин-комплекс с пероксидазой (ABC Elite system, PK-6100, Vector Labs) в течение 1 ч. Визуализацию пероксидазной реакции осуществляли с помощью раствора, содержащего 1% DAB (хромоген 3,3'-диаминобензидин), 10% NiNH_4SO_4 и 0.03% H_2O_2 , для парафиновых срезов NiNH_4SO_4 не использовался. Для парафиновых срезов проводили дополнительную окраску астровым синим. Свободно плавающие срезы после промывки в дистиллированной воде монтировали на желатинизированные предметные стекла и высушивали. После обезвоживания в спиртах восходящей концентрации и просветления в ксилоле срезы заключали в среду для заключения препаратов (Bio Mount НМ, Италия).

Цифровая обработка и анализ гистологического материала. Получение цифровых изображений срезов с выявленными антигенами проводили на компьютерной установке, оснащенной световым микроскопом Olympus CX33 (Olympus Corporation, Япония; увеличение объектива $\times 10$), свободно расширяемым программным комплексом digiCamControl и камерой Nikon (D3200, Nikon Corporation,

Япония). Иммунопозитивные нейроны анализировали в следующих областях интереса: центральном шейном ядре, ядре Кларка, ядре Штиллинга и вблизи границы белого и серого вещества в вентролатеральной области. Подсчет площади сомы и оптической плотности иммунопозитивных нейронов проводили в свободном программном комплексе Fiji ImageJ [37]. Для морфометрического (площадь сечения сомы) и денситометрического (оптическая плотность) анализа использовали только замороженные срезы. Для сравнения также анализировали альфа-мотонейроны как сопоставимые по размеру клетки, расположенные на том же срезе спинного мозга. В анализ было взято по 5 срезов сегментов С3, L4, S2, поскольку сегмент L4 одновременно содержит ядра Кларка, пограничные клетки и соматические мотонейроны [38]; центральное шейное ядро наиболее выражено в сегменте С3 [24], а ядро Штиллинга у грызунов, сумчатых и приматов наиболее выражено в крестцовых сегментах [26, 39], поэтому для его поиска у кошки был выбран срединный крестцовый сегмент S2. Относительную оптическую плотность вычисляли по формуле контраста Майкельсона: $(L_{\max} - L_{\min}) / (L_{\max} + L_{\min})$, где L_{\max} и L_{\min} — максимальная и минимальная яркости соответственно [40]. Согласно данной формуле, чем меньше полученное значение, тем меньше разность оптической плотности между клеткой и фоном.

Статистическая обработка. Достоверность отличий оценивали в программе GraphPad (ver 8.0) с помощью парного критерия Вилкоксона (при сравнении двух выборок) или парного критерия Фридмана с поправкой Данна на множественные сравнения (при сравнении трех и более выборок). Для сравнения областей интереса, расположенных в разных сегментах, применяли непарный критерий Краскела–Уоллиса с поправкой Данна на множественные сравнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Как на поперечных, так и на горизонтальных срезах спинного мозга, отчетливо видны нейроны с особым типом мечения: отсутствием интенсивного иммуномечения цитоплазмы, с сохранением интенсивного иммуномечения в области клеточного ядра (рис. 1). При этом для большинства нейронов спинного мозга характерно интенсивное иммуномечение как ядра, так и цитоплазмы [24]. Нейроны со светлой цитоплазмой выявлены во всех исследованных сегментах спинного мозга, при этом для каждой из областей интереса получена выборка индивидуального размера. Наиболее многоклеточными являются ядра Кларка, формирующие сплошную колонну нейронов, проходящую через весь сегмент [41]; это отличает это ядро от прочих ядер и областей интереса, содержащих значительно меньшее число клеток. Более того, для центрального шейного ядра известно неравномерное распределение нейронов вдоль rostrocaudальной

оси спинного мозга: чередование небольших скоплений и продолжительных пустых зон [7]; очевидно, это значительно затрудняет поиск этих нейронов на гистологических срезах. Как итог, в ряде случаев нейроны центрального шейного ядра было невозможно визуализировать не на одном из имеющихся срезов; как итог, объем выборки для этих клеток был ниже, чем для прочих ($n = 4$ vs $n = 7$).

Ядра Кларка и пограничные нейроны

В сегменте L4 нейроны со слабым иммуномечением цитоплазмы расположены, главным образом, лишь в пределах узких локусов: на границе дорзальных рогов и промежуточного серого вещества — в области залегания ядер Кларка (по 3–7 клеток на поперечный срез), и вдоль вентролатеральной границы серого и белого вещества — в области предположительной локализации пограничных нейронов (по 1–4 клетки на поперечный срез) (рис. 1b (черные стрелки)). В соответствии с этим у одного из животных анализировали не поперечные, но горизонтальные срезы, охватывающие всю протяженность поясничного сегмента (рис. 1c, d). При использовании такой плоскости резки видно, что пограничные нейроны распределены вдоль оси мозга менее равномерно, чем нейроны ядер Кларка: между отдельными пограничными нейронами или их группами существуют пробелы протяженностью 300–600 мкм.

В области ядер Кларка нейроны со светлой цитоплазмой характеризуются крупной сомой (площадь поперечного сечения: 1245 ± 366 мкм²) полигональной, овальной или треугольной формы (рис. 1b, c). В вентролатеральной области светлые нейроны также имеют крупную сому (площадь поперечного сечения: 1836 ± 457 мкм²); ее форма, главным образом, полигональная (рис. 1c, d). Пограничные нейроны достоверно крупнее клеток ядра Кларка ($p < 0.05$; критерий Фридмана). Размерность нейронов ядер Кларка и пограничных нейронов соответствует данным литературы [2, 38].

Мы сравнили основные особенности иммуномечения крупных нейронов со светлой цитоплазмой с еще одним типом крупных нейронов серого вещества — альфа-мотонейронами (рис. 1e, f). Площадь сечения сомы альфа-мотонейронов сходна с таковой у пограничных клеток и клеток ядер Кларка и составляет 1445 ± 298 мкм² ($p > 0.05$ и $p > 0.05$; критерий Фридмана). Альфа-мотонейроны имеют достоверно большую нормированную оптическую плотность, чем пограничные нейроны (0.051 ± 0.024 vs 0.339 ± 0.139 ; $p < 0.01$) и нейроны ядра Кларка (0.056 ± 0.036 vs 0.339 ± 0.139 ; $p < 0.05$; критерий Фридмана). Отличий в нормированной оптической плотности между крупными клетками ядер Кларка и пограничными нейронами не выявлено ($p > 0.05$; критерий Фридмана).

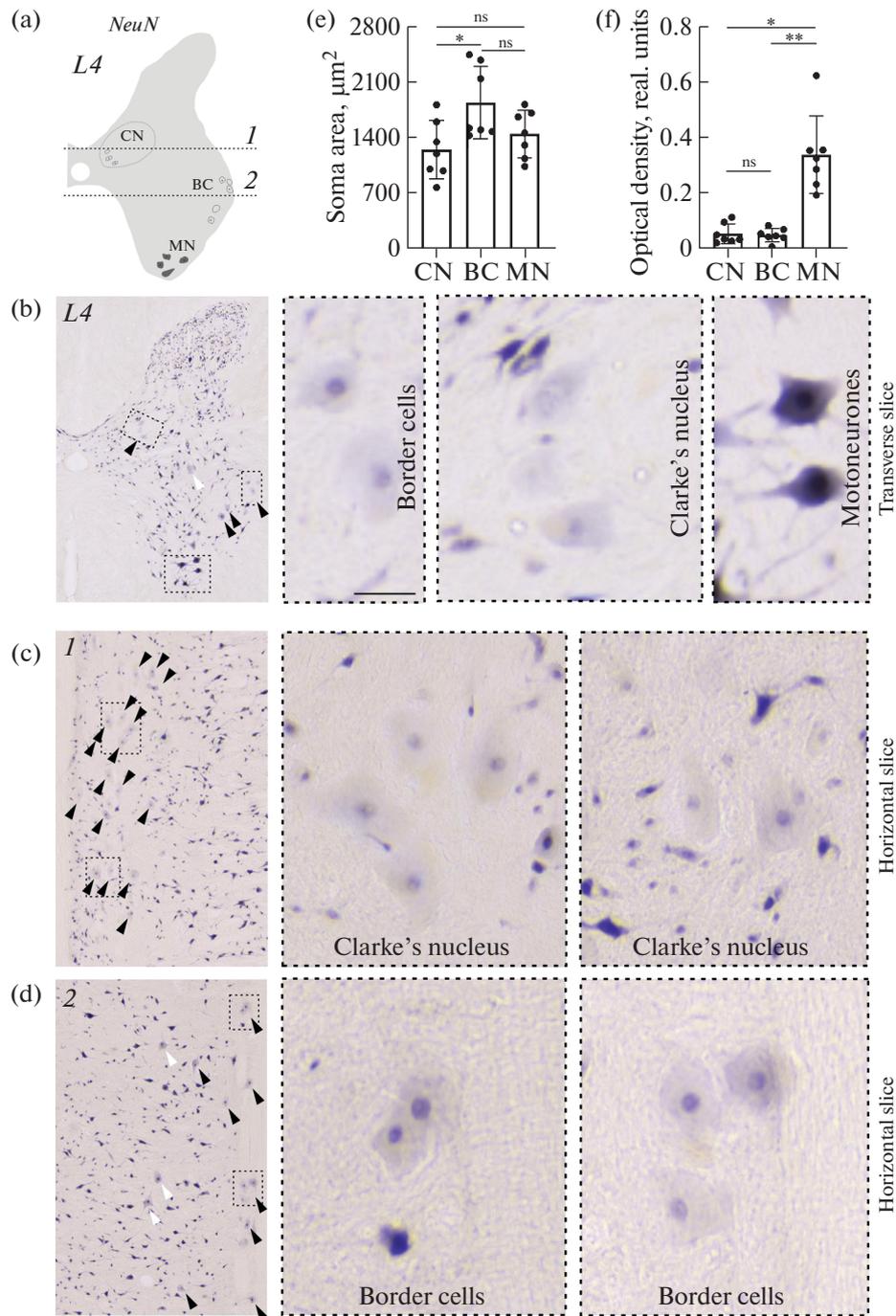


Рис. 1. Распределение нейронов, иммунопозитивных к ядерному белку NeuN, на замороженных срезах поясничного сегмента L4 спинного мозга кошки. (a) – Схема локализации нейронов интереса на поперечном срезе. Пунктирной линией обозначены уровни горизонтальных срезов. (b) – Поперечный срез спинного мозга, прошедшие через ядро Кларка (CN; уровень 1; (c)) или область залегания пограничных клеток (BC; уровень 2; (d)). На (b–d) слева – общий вид среза, по центру и справа – увеличенные изображения нейронов, выделенных слева прямоугольниками. Хорошо видны крупные нейроны (помечены стрелками) с бледно окрашенной цитоплазмой и более темным ядром в областях локализации пограничных нейронов и ядер Кларка. (e) – Средняя площадь сечения сомы нейронов интереса. (f) – Относительная оптическая плотность нейронов интереса, вычисленная по формуле контраста Майкельсона. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; ns – отсутствие достоверных отличий. Калибровочный маркер равен 50 мкм.

Отметим, что, согласно некоторым данным, нейроны, формирующие вентральный спинно-мозжечковый тракт, могут локализоваться и в толще пластины VII, а не только вдоль границы серого и белого ве-

щества [9, 10]. И, действительно, редкие нейроны с морфологией пограничных нейронов отмечены в центральной части пластины VII (рис. 1b, d (белые стрелки)). Эти клетки не были взяты в анализ в силу

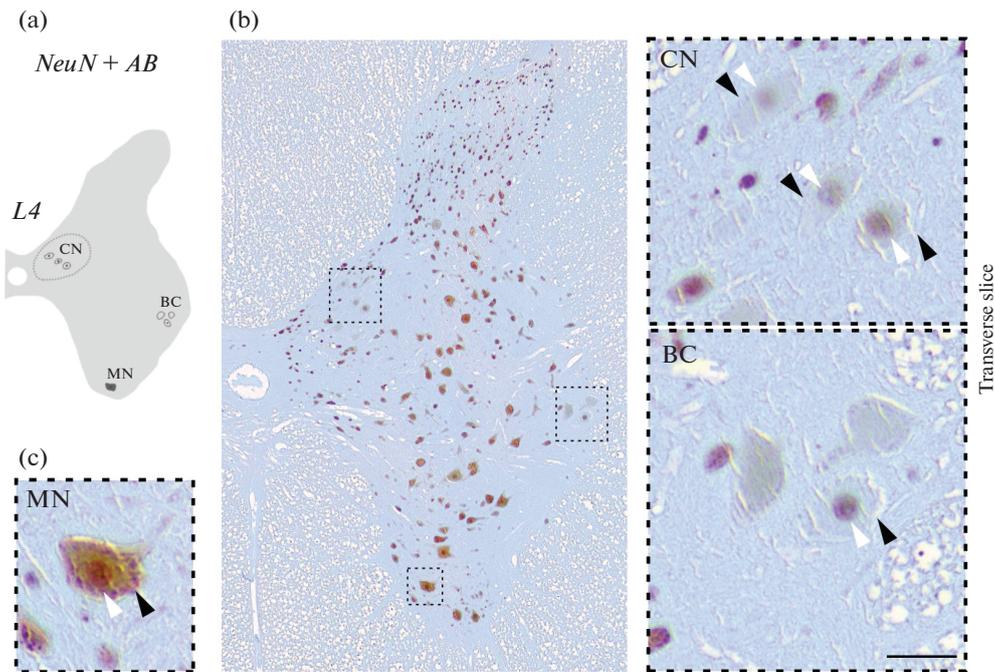


Рис. 2. Распределение нейронов, иммунопозитивных к ядерному белку NeuN, на парафиновых срезах поясничного сегмента L4 спинного мозга кошки. (a) – Схема локализации нейронов интереса на поперечном срезе. (b) и (c) – Парафиновый срез и увеличенные изображения пограничных клеток (BC), клеток ядер Кларка (CN) и мотонейрона (MN). Для пограничных клеток и клеток ядра Кларка хорошо видна разница между интенсивностью иммуногистохимической реакции в цитоплазме (черные стрелки) и ядром (белые стрелки). Срезы дополнительно подкрашены астровым синим (AB). Калибровочный маркер равен 50 мкм.

их малочисленности. Также отметим, что численные данные, полученные на горизонтальных срезах, соответствуют тем, что получены с использованием поперечных срезов.

Для большей достоверности мы также рассмотрели тонкие парафиновые (7 мкм) срезы от трех дополнительных животных (рис. 1a). Как видно на рис. 2, пограничные нейроны и нейроны ядер Кларка на парафиновых срезах имеют те же особенности иммуномечения, что были показаны выше: очень светлую цитоплазму и более интенсивно окрашенное ядро (рис. 2b). Использование парафиновых срезов позволяет убедиться в том, что ядра действительно имеют более высокий уровень иммуномечения, чем окружающая цитоплазма, поскольку продукты реакции в цитоплазме и ядре не взаимно накладываются, как это может произойти при использовании толстых замороженных срезов. Парафиновые срезы также позволяют убедиться в том, что доминирующая форма сомы пограничных нейронов – полигональная, сомы нейронов ядер Кларка – овальная.

Прочие нейроны (рис. 2b), в том числе и мотонейроны (рис. 2c), имеют интенсивное иммуномечение как ядра, так и цитоплазмы. Таким образом, представленные выше данные не являются артефактом иммуномечения на толстых замороженных срезах.

Центральное шейное ядро

Как и в поясничном отделе, в шейном сегменте С3 визуализируются нейроны со светлой цитоплазмой и более темным ядром; их локализация – граница пластин VI и VII промежуточного серого вещества, что соответствует положению центрального шейного ядра (рис. 3a). Нейроны распределены от среза к срезу неравномерно: их число варьирует от 0 до 5 на срез, что соответствует литературным данным [7]. Нейроны с бледной цитоплазмой имеют сому крупного размера (площадь поперечного сечения: $902 \pm 287 \text{ мкм}^2$), главным образом, треугольной формы (рис. 3b). В ряде случаев также видны проксимальные части дендритов (рис. 3b). Площадь сечения сомы альфа-мотонейронов сегмента С3 несколько больше и составляет $1143 \pm 203 \text{ мкм}^2$; но отличия между этими типами клеток не достоверны ($p > 0.05$; критерий Вилкоксона) (рис. 3c). Нормированная оптическая плотность нейронов центрального шейного ядра очевидно ниже, чем у альфа-мотонейронов (0.102 ± 0.039 vs 0.414 ± 0.173), однако, в силу малочисленности выборок, эти отличия являются недостоверными ($p > 0.05$; критерий Вилкоксона) (рис. 3d).

Ядро Штиллинга

Крестцовый сегмент S2 также содержит нейроны со светлой цитоплазмой и более темным ядром:

в локальной области на границе пластин VI и VII промежуточного серого вещества, что соответствует локализации нейронов, организующих проекции к мозжечку из каудальных сегментов спинного мозга [7], т.е. клеточной популяции, аналогичной ядру Штиллинга у грызунов, сумчатых и приматов (рис. 3е). Нейроны со светлой цитоплазмой имеют сому крупного размера (площадь поперечного сечения: 1034 ± 307 мкм²) полигональной или треугольной формы (рис. 3ф). Площадь сечения сомы альфа-мотонейронов сегмента S2 составляет 1662 ± 154 мкм²; отличия между этими типами клеток являются достоверными ($p < 0.05$; критерий Вилкоксона) (рис. 3г). Нормированная оптическая плотность нейронов ядра Штиллинга достоверно ниже, чем у альфа-мотонейронов (0.0941 ± 0.090 vs 0.281 ± 0.140 ; $p < 0.05$; критерий Вилкоксона) (рис. 3h).

Площади сомы пограничных нейронов, клеток центрального шейного ядра, ядра Кларка и ядра Штиллинга сходны, однако площадь пограничных нейронов достоверно выше, чем площадь нейронов центрального шейного ядра ($p < 0.05$; критерий Краскела–Уоллиса). Площади сомы мотонейронов разных сегментов также сходны, однако отличия между сегментами S3 и S2 являются достоверными ($p < 0.05$; критерий Краскела–Уоллиса). Нормированная оптическая плотность разных нейронов интереса достоверно не различается ($p > 0.05$; критерий Краскела–Уоллиса), как и нормированная оптическая плотность мотонейронов разных сегментов ($p > 0.05$; критерий Краскела–Уоллиса).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основным результатом является обнаружение особого типа иммуномечения к общему нейрональному маркеру – белку NeuN, у крупных нейронов в составе ядер Кларка, ядер Штиллинга, центральных шейных ядер и крупных нейронов, расположенных на вентролатеральной границе серого и белого вещества поясничного отдела.

Данный феномен мог быть связан с особенностями иммуномечения клеток с крупной сомой. В первую очередь мы сопоставили уровень и паттерн NeuN-иммуномечения между нейронами интереса и альфа-мотонейронами, поскольку, согласно ряду данных, морфологические характеристики нейронов, инициирующих спинномозжечковые проекции (на примере пограничных нейронов), и альфа-мотонейронов имеют значительное сходство [9, 30, 42, 43]. Однако, как видно из результатов, светлое окрашивание цитоплазмы крупных нейронов не связано с размером их сомы.

Второе предположение: выявленный паттерн иммуномечения отражает особенности нейрехимии нейронов, организующих проекции к мозжечку. В проведенном исследовании мы не проводили

прямого сопоставления паттерна крупных нейронов со светлой цитоплазмой и клеток, меченых в результате трейсирования, но на принадлежность анализируемых популяций к клеткам, организующим спинно-мозжечковые проекции, указывает, в первую очередь, их пространственное расположение. При этом идентификация таких клеток в пределах ядра Кларка и центрального шейного ядра не вызывает сомнения в силу наличия четких анатомических границ данных ядер. Поскольку крупные нейроны этих ядер не отличаются по общему паттерну NeuN-иммуномечения от крупных нейронов, выявленных в вентролатеральной области сегмента L4 (пограничные нейроны) и в зоне, аналогичной положению ядра Штиллинга, в сегменте S2, полагаем, что критерий выделения спинномозжечковых нейронов ядер Кларка и центрального шейного ядра в равной мере подходит и для них.

В литературе имеются данные о существовании ряда различий между ядрами, организующими связи с мозжечком. Например, (1) ядра Кларка проецируются, главным образом, на ипсилатеральную, а не на контралатеральную сторону мозжечка, что свойственно для остальных прецеребеллярных ядер [2, 7]; (2) ядра Кларка получают входы от кортикоспинальных нейронов [44]; (3) центральное шейное ядро получает вестибулярные входы [45] и организует проекции к вестибулярным ядрам [46]. В ряде недавних молекулярных исследований спинного мозга мыши были получены индивидуальные транскриптомные профили для разных нейрональных популяций, организующих проекции к мозжечку [3, 31]. Однако, несмотря на эти отличия, клеточные источники спинно-мозжечковых трактов имеют сходство в типе NeuN иммуномечения. Белок NeuN является продуктом гена *fox-3* и полагается клеточным фактором, определяющим нейрон-специфический альтернативный сплайсинг [47]. Показано, что начало экспрессии NeuN соответствует переходу нейрона в пост-митотическую фазу и началу его функционирования [32, 48, 49]. При этом у взрослых животных, как в головном (см. обзор [50]), так и спинном мозге [51–53], выявлены структуры с отличным от прочих уровнем экспрессии NeuN в цитоплазме и/или ядре нейронов, вплоть до полного ее отсутствия. Возможно, тип иммуномечения к NeuN позволяет делить нейроны на крупные гетерогенные популяции, объединенные некими базовыми особенностями функционирования. Тогда наличие определенных структурно-функциональных различий между клетками, инициирующими связи к мозжечку, не будет влиять на общий паттерн экспрессии в них белка NeuN. Эта картина может быть сходна с существованием единых маркеров спинальных альфа-мотонейронов (например, холинацетилтрансфераза [51] или SMI-32 [54]), несмотря на то, что они различаются по набору экспрессируемых генов [55], характеристикам аксонов [56], особенностям иннервируемых ими мышц [57].

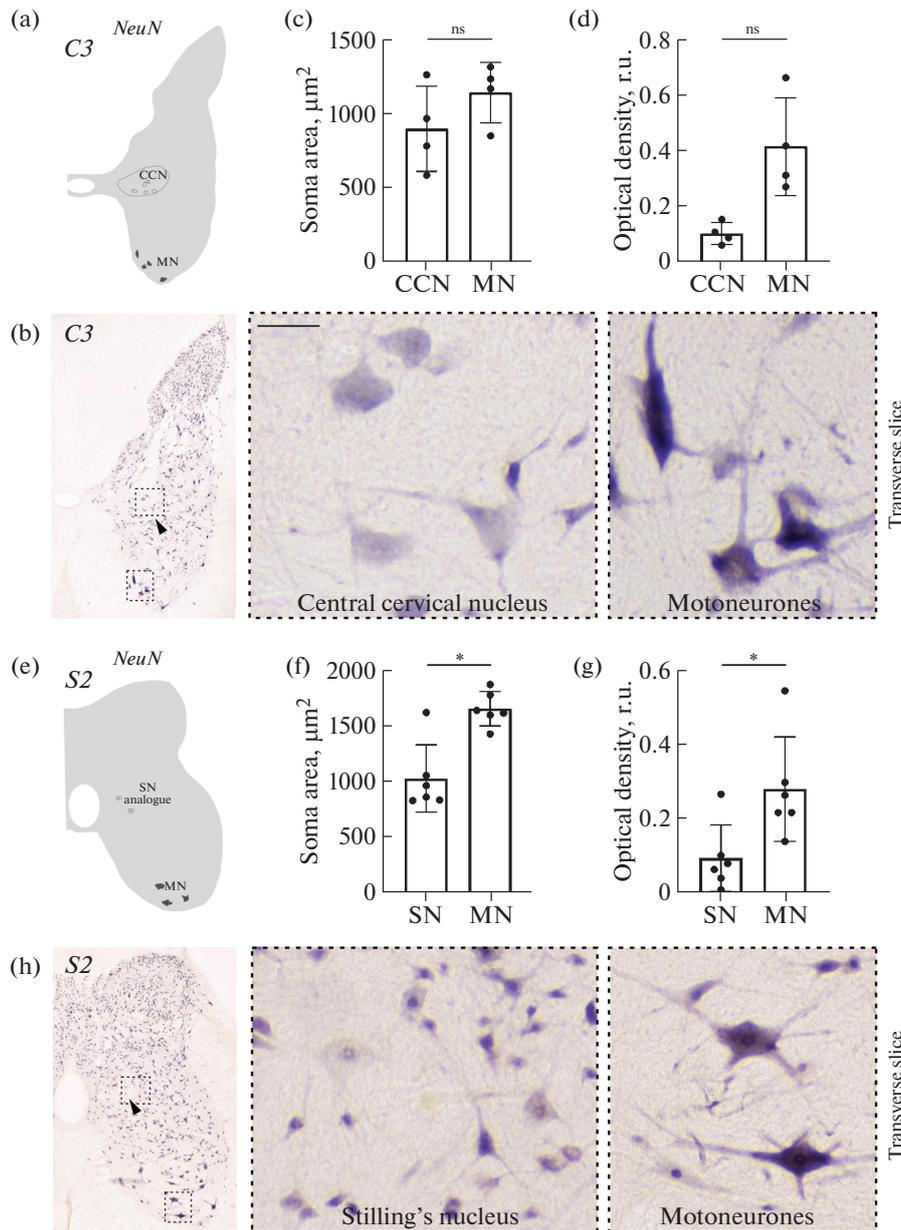


Рис. 3. Распределение нейронов, иммунопозитивных к ядерному белку NeuN, в сером веществе шейного сегмента С3 (а–d) и крестцового сегмента S2 (е–h) спинного мозга кошки. (а, е) – Схемы локализации нейронов интереса на поперечных срезах. (б, f) – Поперечные срезы спинного мозга. На (б, f) слева – общий вид среза, по центру – увеличенные изображения нейронов, выделенных слева прямоугольниками. Видны крупные нейроны (помечены стрелками) с бледно окрашенной цитоплазмой и более темным ядром. Справа – увеличенные изображения мотонейронов. (с, g) – Средняя площадь сечения сомы нейронов интереса. (d, h) – Относительная оптическая плотность нейронов интереса, вычисленная по формуле контраста Майкельсона. CCN – центральное шейное ядро, SN – проекционные клетки области, соответствующей локализации ядра Штиллинга у других видов, MN – мотонейроны. * – $p < 0.05$; ns – отсутствие достоверных отличий. Калибровочный маркер равен 50 мкм.

Не можем не добавить, что анатомии и морфологии нейронов, инициирующих спинно-мозжечковые тракты, посвящены, главным образом, работы 50-летней давности, тогда как функции самих трактов являются объектом интереса современных исследования [58–60]. Очевидно, что обнаружение метода упрощенной идентификации нейронов, организующих эти тракты, будет способствовать реализации ком-

плексных физиолого-морфологических исследований взаимодействия спинного мозга и мозжечка.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, вы-

полненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по этике Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (протокол № 09/11/2015).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект №21-15-00235).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Планирование эксперимента: Н.С.М.; подготовка гистологического материала: А.А.В., П.Ю.Ш., Н.И.Н., Н.В.П.; сбор и обработка данных: Н.С.М., А.А.В., П.Ю.Ш., Н.В.П.; написание и редактирование манускрипта: Н.С.М., А.А.В., П.Ю.Ш., Н.В.П.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны П.Е. Мусиенко за помощь в работе с частью животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bosco G, Poppele RE* (2001) Proprioception from a spinocerebellar perspective. *Physiol Rev* 81: 539–568. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.539>
2. *Matsushita M, Hosoya Y* (1979) Cells of origin of the spinocerebellar tract in the rat, studied with the method of retrograde transport of horseradish peroxidase. *Brain Res* 173: 185–200. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90620-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90620-6)
3. *Baek M, Menon V, Jessell TM, Hantman AW, Dasen JS* (2019) Molecular logic of spinocerebellar tract neuron diversity and connectivity. *Cell Rep* 27: 2620–2635.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.113>
4. *Boehme CC* (1968) The neural structure of Clarke's nucleus of the spinal cord. *J Comp Neurol* 132: 445–461. <https://doi.org/10.1002/cne.901320306>
5. *Mann MD* (1973) Clarke's column and the dorsal spinocerebellar tract: a review. *Brain Behav Evol* 7: 34–83. <https://doi.org/10.1159/000124397>
6. *Petras JM, Cummings JF* (1977) The origin of spinocerebellar pathways. II. The nucleus centrobasis of the cervical enlargement and the nucleus dorsalis of the thoracolumbar spinal cord. *J Comp Neurol* 173. <https://doi.org/10.1002/cne.901730405>
7. *Snyder RL, Faull RL, Mehler WR* (1978) A comparative study of the neurons of origin of the spinocerebellar afferents in the rat, cat and squirrel monkey based on the retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 181: 833–852. <https://doi.org/10.1002/cne.901810409>
8. *Clarke JAL* (1859) Further researches on the grey substance of the spinal cord. *Philos Trans R Soc Lond* 149: 437–467. <https://doi.org/10.1098/rstl.1859.0022>
9. *Ha H, Liu CN* (1968) Cell origin of the ventral spinocerebellar tract. *J Comp Neurol* 133: 185–206. <https://doi.org/10.1002/cne.901330204>
10. *Shrestha SS, Bannatyne BA, Jankowska E, Hammar I, Nilsson E, Maxwell DJ* (2012) Inhibitory inputs to four types of spinocerebellar tract neurons in the cat spinal cord. *Neuroscience* 226: 253–269. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.015>
11. *Xu Q, Grant G* (1988) Collateral projections of neurons from the lower part of the spinal cord to anterior and posterior cerebellar termination areas. A retrograde fluorescent double labeling study in the cat. *Exp Brain Res* 72: 562–576. <https://doi.org/10.1007/BF00250601>
12. *Matsushita M, Hosoya Y, Ikeda M* (1979) Anatomical organization of the spinocerebellar system in the cat, as studied by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 184: 81–106. <https://doi.org/10.1002/cne.901840106>
13. *Arshavsky YI, Berkinblit MB, Fukson OI, Gelfand IM, Orlovsky GN* (1972) Origin of modulation in neurones of the ventral spinocerebellar tract during locomotion. *Brain Res* 43: 276–279. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(72\)90296-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90296-X)
14. *Edgley SA, Jankowska E* (1988) Information processed by dorsal horn spinocerebellar tract neurones in the cat. *J Physiol* 397: 81–97. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp016989>
15. *Jankowska E, Nilsson E, Hammar I* (2011) Processing information related to centrally initiated locomotor and voluntary movements by feline spinocerebellar neurones. *J Physiol* 589: 5709–5725. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.213678>
16. *Pop IV, Espinosa F, Blevins CJ, Okafor PC, Ogujiofor OW, Goyal M, Mona B, Landy MA, Dean KM, Gurumurthy CB, Lai HC* (2022) Structure of long-range direct and indirect spinocerebellar pathways as well as local spinal circuits mediating proprioception. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 42: 581–600. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2157-20.2021>
17. *Hirai N, Hongo T, Sasaki S, Yoshida K* (1979) The neck and labyrinthine influences on cervical spinocerebellar tract neurones of the central cervical nucleus in the cat. *Prog Brain Res* 50: 529–536. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)60851-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)60851-1)
18. *Matsushita M, Tanami T* (1987) Spinocerebellar projections from the central cervical nucleus in the cat, as studied by anterograde transport of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 266: 376–397. <https://doi.org/10.1002/cne.902660306>
19. *Neuhuber WL, Zenker W* (1989) Central distribution of cervical primary afferents in the rat, with emphasis on proprioceptive projections to vestibular, perihypoglossal, and upper thoracic spinal nuclei. *J Comp Neurol* 280: 231–253. <https://doi.org/10.1002/cne.902800206>
20. *Sengul G, Fu Y, Yu Y, Paxinos G* (2015) Spinal cord projections to the cerebellum in the mouse. *Brain Struct*

- Funct 220: 2997–3009.
<https://doi.org/10.1007/s00429-014-0840-7>
21. *Edgley SA, Grant GM* (1991) Inputs to spinocerebellar tract neurones located in Stilling's nucleus in the sacral segments of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 305: 130–138.
<https://doi.org/10.1002/cne.903050112>
 22. *Luo Y, Onozato T, Wu X, Sasamura K, Sakimura K, Sugihara I* (2020) Dense projection of Stilling's nucleus spinocerebellar axons that convey tail proprioception to the midline area in lobule VIII of the mouse cerebellum. *Brain Struct Funct* 225: 621–638.
<https://doi.org/10.1007/s00429-020-02025-6>
 23. *Merkul'eva NS, Veshchitskii AA, Shkorbatova PYu, Shenkman BS, Musienko PE, Makarov FN* (2017) Morphometric characteristics of the dorsal nuclei of Clarke in the rostral segments of the lumbar part of the spinal cord on cats. *Neurosci Behav Physiol* 47: 851–856.
<https://doi.org/10.1007/s11055-017-0481-4>
 24. *Veshchitskii A, Shkorbatova P, Merkulyeva N* (2022) Neurochemical atlas of the cat spinal cord. *Front Neuroanat* 16: 1034395.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2022.1034395>
 25. *Olude MA, Idowu AO, Mustapha OA, Olopade JO, Akinloye AK* (2015) Spinal cord studies in the african giant rat (*Cricetomys gambianus*, Waterhouse). *Niger J Physiol Sci Off Publ Physiol Soc Niger* 30: 25–32.
 26. *Terman JR, Wang XM, Martin GF* (1998) Origin, course, and laterality of spinocerebellar axons in the North American opossum, *Didelphis virginiana*. *Anat Rec* 251: 528–547.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199808\)251:4<528::AID-AR9>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199808)251:4<528::AID-AR9>3.0.CO;2-N)
 27. *Watson C, Sengul G, Tanaka I, Rusznak Z, Tokuno H* (2015) The spinal cord of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Neurosci Res* 93: 164–175.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2014.12.012>
 28. *Grant G, Wiksten B, Berkley KJ, Aldskogius H* (1982) The location of cerebellar-projecting neurons within the lumbosacral spinal cord in the cat. An anatomical study with HRP and retrograde chromatolysis. *J Comp Neurol* 204: 336–348.
<https://doi.org/10.1002/cne.902040405>
 29. *Fu Y, Sengul G, Paxinos G, Watson C* (2012) The spinal precerebellar nuclei: calcium binding proteins and gene expression profile in the mouse. *Neurosci Lett* 518: 161–166.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.05.002>
 30. *Cooper S, Sherrington CS* (1940) Gower's tract and spinal border cells. *Brain* 63: 123–134.
<https://doi.org/10.1093/brain/63.2.123>
 31. *Coughlan E, Garside VC, Wong SFL, Liang H, Kraus D, Karmakar K, Maheshwari U, Rijli FM, Bourne J, McGlenn E* (2019) A hox dode defines spinocerebellar neuron subtype regionalization. *Cell Rep* 29: 2408–2421.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.048>
 32. *Mullen RJ, Buck CR, Smith AM* (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Dev Camb Engl* 116: 201–211.
<https://doi.org/10.1242/dev.116.1.201>
 33. *Merkulyeva N, Mikhalkin A, Zykin P* (2018) Early postnatal development of the lamination in the lateral geniculate nucleus A-layers in cats. *Cell Mol Neurobiol* 38: 1137–1143.
<https://doi.org/10.1007/s10571-018-0585-6>
 34. *Merkulyeva NS, Mikhalkin AA, Nikitina NI* (2020) Characteristics of the neurochemical state of neurons in the mesencephalic nucleus of the trigeminal nerve in cats. *Neurosci Behav Physiol* 50: 511–515.
<https://doi.org/10.1007/s11055-020-00927-w>
 35. *Mikhalkin AA, Merkulyeva NS* (2021) Peculiarities of age-related dynamics of neurons in the cat lateral geniculate nucleus as revealed in frontal versus sagittal slices. *J Evol Biochem Physiol* 57: 1001–1007.
<https://doi.org/10.1134/S0022093021050021>
 36. *Shkorbatova PY, Lyakhovetskii VA, Merkulyeva NS, Veshchitskii AA, Bazhenova EY, Laurens J, Pavlova NV, Musienko PE* (2019) Prediction algorithm of the cat spinal segments lengths and positions in relation to the vertebrae. *Anat Rec* 302: 1628–1637.
<https://doi.org/10.1002/ar.24054>
 37. *Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A* (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9: 676–682.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
 38. *Edgley SA, Gallimore CM* (1988) The morphology and projections of dorsal horn spinocerebellar tract neurones in the cat. *J Physiol* 397: 99–111.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp016990>
 39. *Sengul G, Watson C, Tanaka I, Paxinos G* (2012) Atlas of the spinal cord: mouse, rat, rhesus, marmoset, and human. Elsevier Science 360.
 40. *Shapley R, Enroth-Cugell C* (1984) Visual adaptation and retinal gain controls. *Prog Retin Res* 3: 263–346.
[https://doi.org/10.1016/0278-4327\(84\)90011-7](https://doi.org/10.1016/0278-4327(84)90011-7)
 41. *Cummings JE, Petras JM* (1977) The origin of spinocerebellar pathways. I. The nucleus cervicalis centralis of the cranial cervical spinal cord. *J Comp Neurol* 173: 655–692.
<https://doi.org/10.1002/cne.901730404>
 42. *Morin F, Schwartz HG, O'leary JL* (1951) Experimental study of the spinothalamic and related tracts. *Acta Psychiatr Neurol Scand* 26: 371–396.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.1951.tb09681.x>
 43. *Sprague JM* (1953) Spinal border cells and their role in postural mechanism (Schiff-Sherrington phenomenon). *J Neurophysiol* 16: 464–474.
<https://doi.org/10.1152/jn.1953.16.5.464>
 44. *Hantman AW, Jessell TM* (2010) Clarke's column neurons as the focus of a corticospinal collateral circuit. *Nat Neurosci* 13: 1233–1239.
<https://doi.org/10.1038/nn.2637>
 45. *Thomson DB, Isu N, Wilson VJ* (1996) Responses of neurons of the cat central cervical nucleus to natural neck and vestibular stimulation. *J Neurophysiol* 76: 2786–2789.
<https://doi.org/10.1152/jn.1996.76.4.2786>
 46. *Xiong G, Matsushita M* (2001) Ipsilateral and contralateral projections from upper cervical segments to the vestibular nuclei in the rat. *Exp Brain Res* 141: 204–217.
<https://doi.org/10.1007/s002210100867>

47. Kim KK, Adelstein RS, Kawamoto S (2009) Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J Biol Chem* 284: 31052–31061. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.052969>
48. Weyer A, Schilling K (2003) Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *J Neurosci Res* 73: 400–409. <https://doi.org/10.1002/jnr.10655>
49. Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G (2004) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27: 447–452. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.05.013>
50. Alekseeva OS, Gusel'nikova VV, Beznin GV, Korzhhevskii DE (2015) Prospects for the application of neuron nuclear protein as a marker of the functional state of nerve cells in vertebrates. *J Evol Biochem Physiol* 51: 357–369. <https://doi.org/10.1134/S0022093015050014>
51. Friese A, Kaltschmidt JA, Ladle DR, Sigrist M, Jessell TM, Arber S (2009) Gamma and alpha motor neurons distinguished by expression of transcription factor Err3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 13588–13593. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906809106>
52. Shneider NA, Brown MN, Smith CA, Pickel J, Alvarez FJ (2009) Gamma motor neurons express distinct genetic markers at birth and require muscle spindle-derived GDNF for postnatal survival. *Neural Develop* 4: 42. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-4-42>
53. Veshchitskii AA, Kirik OV, Korzhhevskii DE, Merkulyeva N (2023) Development of neurochemical labeling in the intermedialateral nucleus of cats' spinal cord. *Anat Rec* 306: 2400–2410. <https://doi.org/10.1002/ar.24943>
54. Tsang YM, Chiong F, Kuznetsov D, Kasarskis E, Geula C (2000) Motor neurons are rich in non-phosphorylated neurofilaments: cross-species comparison and alterations in ALS. *Brain Res* 861: 45–58. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)01954-5](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)01954-5)
55. Liao ES, Jin S, Chen Y-C, Liu W-S, Calon M, Nedelec S, Nie Q, Chen J-A (2023) Single-cell transcriptomic analysis reveals diversity within mammalian spinal motor neurons. *Nat Commun* 14: 46. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35574-x>
56. Balbi P, Martinoia S, Massobrio P (2015) Axon-somatic back-propagation in detailed models of spinal alpha motoneurons. *Front Comput Neurosci* 9: 15. <https://doi.org/10.3389/fncom.2015.00015>
57. Vanderhorst VG, Holstege G (1997) Organization of lumbosacral motoneuronal cell groups innervating hindlimb, pelvic floor, and axial muscles in the cat. *J Comp Neurol* 382: 46–76.
58. Fedirchuk B, Stecina K, Kristensen KK, Zhang M, Meehan CF, Bennett DJ, Hultborn H (2013) Rhythmic activity of feline dorsal and ventral spinocerebellar tract neurons during fictive motor actions. *J Neurophysiol* 109: 375–388. <https://doi.org/10.1152/jn.00649.2012>
59. Jankowska E, Hammar I (2013) Interactions between spinal interneurons and ventral spinocerebellar tract neurons. *J Physiol* 591: 5445–5451. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.248740>
60. Chalif JJ, Martínez-Silva M de L, Pagiazitis JG, Murray AJ, Mentis GZ (2022) Control of mammalian locomotion by ventral spinocerebellar tract neurons. *Cell* 185: 328–344.e26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.014>

NEUN EXPRESSION IN SPINAL NEURONS ORGANIZING PROJECTIONS TO THE CEREBELLUM

A. A. Veshchitskii^a, N. V. Pavlova^a, P. Y. Shkorbatova^a, N. I. Nikitina^a, and N. S. Merkulyeva^{a, #}

^a*Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

[#]*e-mail: mer-natalia@yandex.ru*

We analyzed the peculiarities of the NeuN immunostaining of the cat spinal cord neurons located in four structures organizing projections to the cerebellum: the Clarke's nucleus and border cells – in the L4 segment, the central cervical nucleus – in the C3 segment, and the Stilling's nucleus – in the S2 segment. Morphometric and densitometric studies were carried out. It was shown that all neurons of interest have a striking feature: an extremely weak level of the cytoplasmic NeuN-staining, while maintaining a high level of the nuclear NeuN-staining. The soma size of neurons of interest was 1000–1850 mkm², which is comparable to the size of another type of large neurons at slices – motoneurons (1140–1660 mkm²). Thus, we used a motoneuronal population of the corresponding segments to compare the values of optical density. The relative optical density of neurons of interest was several times lower than for the motoneurons (0.060 ± 0.030 vs 0.330 ± 0.127). There were no significant differences in optical density between different structures of interest. Given the morphological uniqueness and similarity of these four cell populations, we believe that the feature of NeuN protein expression can be used as a simple tool for the visualization of cells organizing projections to the cerebellum. It can be valuable both for targeted morphological examination and for histological control after a physiological experiment.

Keywords: NeuN, spinocerebellar tracts, Clarke's nucleus, Stilling's nucleus, central cervical nucleus, border cells, cat