ANALIZA GĘSTOŚCI NEURONÓW ORAZ ELEMENTÓW NEUROPILU ZAWIERAJĄCYCH BIAŁKA WIĄŻĄCE WAPŃ W PRZEDMURZU I JĄDRZE ŚRÓDGRUSZKOWYM GRZBIETOWYM OPOSA KRÓTKOOGONOWEGO *(MONODELPHIS DOMESTICA)*

Katarzyna Majak[1], Beata Domaradzka-Pytel[1], Jerzy Dziewiątkowski[1], Ruzanna L. Djavadian[2], Krzysztof Turlejski[2], Janusz Moryś[1]

1) Zakład Anatomii i Neurobiologii; **Gdański Uniwersytet Medyczny**
2) Pracownia Neurobiologii Rozwoju i Ewolucji; **Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk**, Warszawa

Wstęp oraz cele pracy:

Metabolizm wapnia jest niezwykle istotny dla prawidłowego funkcjonowania całego organizmu, a zwłaszcza ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Dzięki zdolności wiązania wapnia białka takie jak parwalbumina (PV), kalbindyna-D28k (CB) i kalretynina (CR) mają istotny wpływ na rozwój oraz funkcjonowanie OUN zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych.
W literaturze znaleźć można szereg badań ilościowych i jakościowych dotyczących neuronów zawierających CaBP w mózgowiach wielu gatunków ssaków, jednak tylko nieliczne z nich prowadzone były u torbaczy. Ponieważ jednak żadna z tych analiz nie dotyczyła ani przedmurza (Cl) ani jądra śródgruszkowego grzbietowego (EP), celem naszej pracy była analiza gęstości oraz rozkładu neuronów oraz elementów neuropilu zawierających CaBPs w Cl i EP u oposa krótkoogonkowego (Monodelphis domestica).

Materiał i metody:

Badania wykonano na 5 dorosłych oposach, obojga płci (waga 73 – 124 g). Uzyskane drogą perfuzji przezsercowej mózgowia cięto w płaszczyźnie czołowej na skrawki o grubości 30 µm, które poddano barwieniom immunohistochemicznym z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko badanym białkom (Tabela 1).
Analizę gęstości neuronów w obu jądrach oraz intensywności barwienia elementów neuropilu PV-, CB- i CR-immunoreaktywnych (PV-ir, CB-ir, CR-ir) wykonano przy użyciu mikroskopu Olympus SZX2-ILLK z wykorzystaniem programu CellSense Dimetion v. 1.5 (Olympus, Japonia). Oba badane jądra podzielone zostały na część przednią, środkową i tylną, a badania gęstości przeprowadzone zostały osobno dla każdej z tych części.
Wyniki poddano analizie wariancji z powtórzonymi pomiarami przy użyciu programu GraphPad Instat 3.10. W celu znalezienia różnic międzygrupowych zastosowano test Tuckeya-Kramera.

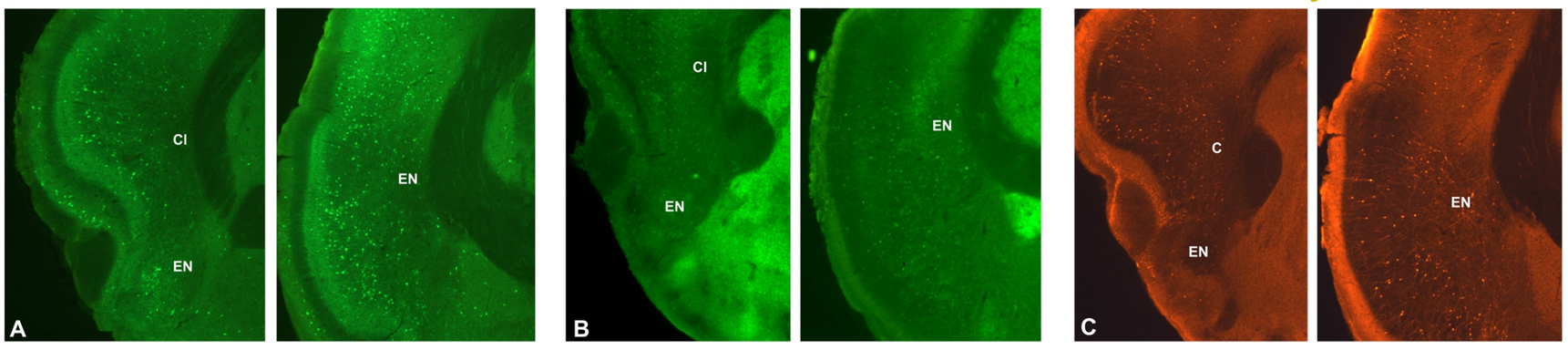
	Przeciwciało pierwotne		Przeciwciało wtórne	
PV	#P3088, Sigma (mysie)	1:1500	#115-165-146, Jackson ImmunoResearch Laboratories (kozie, Cy3);	1:600
			A-11001, Molecular Probes, Eugene, OR, USA (kozie, AlexaFluor)	1:150
CB	#AB1778, Chemicon (królicze)	1:1000	#111-165-144, Jackson ImmunoResearch Laboratories (kozie,Cy3),	1:600
			#11008, Molecular Probes (kozie, Alexa Fluor)	1:150
CR	#AB5054, Chemicon (królicze)	1:1500	#111-165-144, Jackson ImmunoResearch Laboratories (kozie,Cy3);	1:600
			#11008, Molecular Probes (kozie, Alexa Fluor)	1:150

Tabela 1. Specyfikacja przeciwciał wykorzystanych w badaniach immunohistochemicznych.

W Y N I K I

Jak u wielu innych gatunków ssaków przedmurze położone jest powyżej, a jądro śródgruszkowe grzbietowe poniżej bruzdy węchowej, sąsiadując odpowiednio z korą wyspową (Cl) oraz korą gruszkową i śródwęchową (EP). Od przyśrodka oba jądra, poprzez torebkę zewnętrzną, sąsiadują z prążkowiem i nieco ku tyłowi - z ciałem migdałowatym.

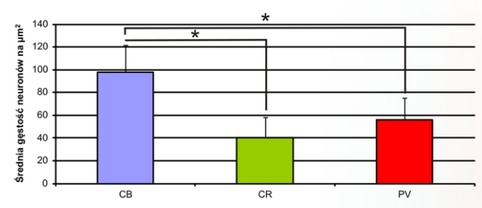
Parvalbumina **Kalbindyna** **Kalretynina**



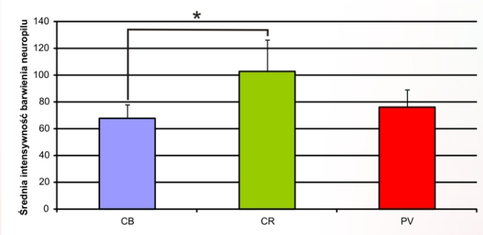
Ryc. 1. Rozmieszczenie elementów PV- (**A**), CB- (**B**) oraz CR-immunoreaktywnych (**C**) w poszczególnych częściach przedmurza oraz jądra śródgruszkowego grzbietowego.

P R Z E D M U R Z E

Porównanie gęstości neuronów oraz intensywności barwienia elementów neuropilu zawierających PV, CB oraz CR

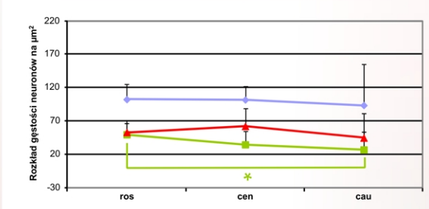


Ryc. 2. Średnie gęstości na µm² (± SD) neuronów zawierających PV, CB oraz CR w przedmurzu oposa (*p<0,05).

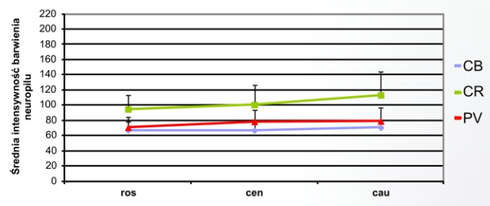


Ryc. 3. Średnie intensywności barwienia elementów neuropilu (± SD) zawierających PV, CB oraz CR w przedmurzu oposa (*p<0,05).

Analiza rozkładu gęstości neuronów oraz intensywności barwienia elementów neuropilu zawierających PV, CB oraz CR w poszczególnych częściach przedmurza.



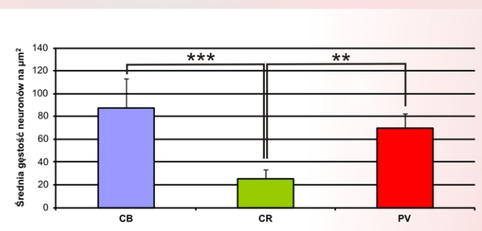
Ryc. 4. Rozkład gęstości neuronów (± SD) w przedniej (ros), środkowej (cen) i tylnej (cau) części przedmurza dla poszczególnych białek wiążących wapń (*p<0,05).



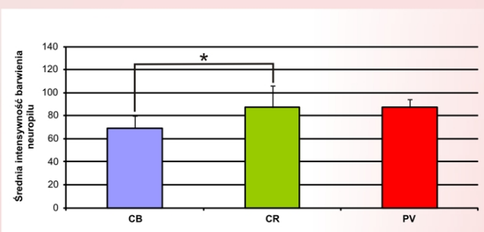
Ryc. 5. Rozkład intensywności barwienia neuropilu (± SD) w przedniej (ros), środkowej (cen) i tylnej (cau) części przedmurza dla poszczególnych białek wiążących wapń.

J Ą D R O Ś R Ó D G R U S Z K O W E G R Z B I E T O W E

Porównanie gęstości neuronów oraz intensywności barwienia elementów neuropilu zawierających PV, CB oraz CR

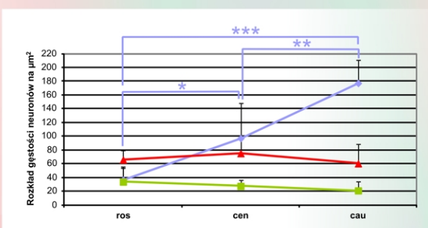


Ryc. 6. Średnie gęstości na µm² (± SD) neuronów zawierających PV, CB oraz CR w jądrze śródgruszkowym grzbietowym oposa (** p<0,01; *** p<0,001).

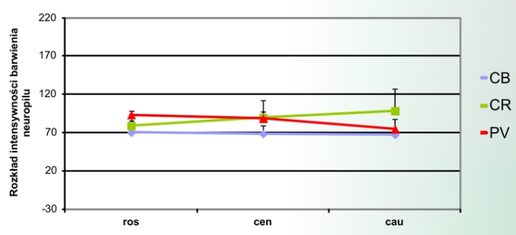


Ryc. 7. Średnie intensywności barwienia elementów neuropilu (± SD) zawierających PV, CB oraz CR w jądrze śródgruszkowym grzbietowym oposa (*p<0,05).

Analiza rozkładu gęstości neuronów oraz intensywności barwienia elementów neuropilu zawierających PV, CB oraz CR w poszczególnych częściach jądra śródgruszkowego grzbietowego.



Ryc. 8. Rozkład gęstości neuronów (± SD) w przedniej (ros), środkowej (cen) i tylnej (cau) części jądra śródgruszkowego grzbietowego dla poszczególnych białek wiążących wapń (*p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).



Ryc. 9. Rozkład intensywności barwienia neuropilu (± SD) w przedniej (ros), środkowej (cen) i tylnej (cau) części jądra śródgruszkowego grzbietowego dla poszczególnych białek wiążących wapń.

P O D S U M O W A N I E W Y N I K Ó W I W N I O S K I

- W Cl gęstość neuronów CB-ir była większa od gęstości neuronów zawierających CR lub PV (p<0,05). Stwierdzono także różnice intensywności barwienia elementów neuropilu. W jądrze tym intensywność barwienia elementów CR-ir była większa niż CB-ir (p<0,05).
- Analiza gęstości neuronów zawierających PV, CB i CR w przedniej, środkowej i tylnej części Cl (osobno dla każdego z białek) wykazała jedynie różnice w gęstości CR-ir neuronów w przedniej i tylnej części Cl (p<0,05).
- W EP gęstość komórek CB-ir była większa od gęstości komórek CR-ir (p<0,001), a gęstość komórek CR-ir była mniejsza od gęstości neuronów PV-ir (p<0,01).
- Analiza gęstości neuronów zawierających PV, CB i CR w przedniej, środkowej i tylnej części EP (osobno dla każdego z białek) wykazała jedynie istotne różnice w gęstości CB-ir neuronów pomiędzy częścią przednią i środkową (p<0,05), przednią i tylną (p< 0,001) oraz środkową i tylna (p<0,01) EP.

Uzyskane wyniki wskazują, że rozmieszczenia PV, CR i CB w Cl i EP oposa różni się między badanymi strukturami, co odzwierciedla odmienne funkcje obu jąder. Porównanie z innymi gatunkami ssaków może przyczynić się do lepszego poznania zmian zachodzących w trakcie rozwoju filogenetycznego mózgowia ssaków.

Design Sylwia Ścisłowska www.scislowska.pl