

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Е.Г. Сухорукова, В.В. Гусельникова, Д.Э. Коржевский, 2017
УДК 611.81.018:599.323.4

Е.Г. Сухорукова, В.В. Гусельникова, Д.Э. Коржевский

ГЛУТАМИНСИНТЕТАЗА В КЛЕТКАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ

Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (руков. — проф. Д.Э. Коржевский), отдел общей и частной морфологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

Цель — иммуногистохимическим методом исследовать клетки головного мозга, синтезирующие глутаминсинтетазу (ГС).

Материал и методы. Фермент выявляли на фронтальных срезах головного мозга крысы (n=10) с помощью моноклональных мышинных антител. Препараты анализировали с применением световой и конфокальной лазерной микроскопии.

Результаты. Показано, что ГС экспрессируется во всех областях головного мозга преимущественно двумя типами клеток, различающимися по строению и топографии. Преобладающий тип клеток с иммунопозитивной реакцией на глиальный фибриллярный кислый белок идентифицирован как астроциты. Другой тип по строению и локализации не соответствует типичным астроцитам.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о том, что ГС не является селективным маркером какой-либо популяции клеток головного мозга крысы.

Ключевые слова: головной мозг, глия, глутаминсинтетаза, иммуногистохимия

Глутаминсинтетаза (ГС) является ключевым ферментом метаболизма важнейшего возбуждающего нейромедиатора — глутамата. Результаты ранних иммуногистохимических исследований [11] показали, что ГС выявляется исключительно в астроцитах и отсутствует в других клетках мозга. Позже ее обнаружили и в олигодендроцитах [6, 7], однако данные, полученные в результате этих исследований, как полагают, могут быть следствием использования плохо очищенных антител, а сделанные выводы — результатом расхождений в интерпретациях полученных данных. В настоящее время лучше изучено внутриклеточное распределение ГС в астроцитах [3, 12], тогда как данные об обнаружении этого белка в других клетках нервной ткани млекопитающих фрагментарны и противоречивы [5, 8]. Сведения о локализации такого важного фермента, как ГС, участвующего в регуляции синаптических процессов и межклеточных взаимодействий, необходимы для разработки новых подходов к определению функциональной активности клеток головного мозга *in situ*, а также для совершенствования критериев оценки состояния глутаматергической системы головного мозга при гистологическом исследовании.

Целью настоящей работы было иммуногистохимическое исследование клеток головного мозга крысы, синтезирующих ГС.

Материал и методы. В работе использован целый головной мозг половозрелых крыс-самцов линии Вистар (n=10). Умерщвление животных проводили с соблюдением международных правил Хельсинкской декларации о гуманном обращении с животными. На данное исследование получено разрешение этического комитета (№ 1/14 от 21.04.2014 г.). Головной мозг крыс фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде, который обеспечивает высокую сохранность антигенов, необходимую для получения оптимальных результатов при постановке иммуногистохимических реакций [1, 10]. Фиксированный мозг разрезали во фронтальной плоскости на уровне переднего гиппокампа, обезжизняли и обе части мозга заливали в парафин по общепринятой методике. Из полученных блоков готовили фронтальные срезы толщиной 5 мкм на ротационном микротоме Leica RM2125RT (Leica, Германия). Для иммуногистохимического выявления ГС были использованы мышинные моноклональные антитела (клон GS-6, разведение 1:400, Chemicon, США). Для световой микроскопии в качестве вторичных реагентов использовали набор EnVision+ System Labelled Polymer-HRP Anti-Mouse (Dako, Дания). Перед постановкой реакции проводили тепловое демаскирование антигена в модифицированном цитратном буфере (S1700, Dako, Дания) в течение 25 мин. После постановки иммуногистохимических реакций часть срезов докрашивали квасцовым гематоксилином. Для конфокальной лазерной микроскопии в качестве вторичных антител были использованы биотинилированный антимышинный Fab-фрагмент иммуноглобулинов ослы (Jackson ImmunoResearch,

Сведения об авторах:

Сухорукова Елена Геннадьевна, Гусельникова Валерия Владимировна, Коржевский Дмитрий Эдуардович (e-mail: dek2@yandex.ru), лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдел общей и частной морфологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12

США; разведение 1:200) и стрептавидин, конъюгированный с флюоресцентным красителем карбоцианином (Cy2; Jackson ImmunoResearch, США; разведение 1:50). Для подтверждения астроглиальной природы части выявляемых клеток были проведены двойные иммунофлюоресцентные реакции с использованием наиболее селективного маркера астроцитов [2] — глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ). При этом в качестве первичных антител применяли поликлональные кроличьи антитела к ГФКБ (Daко, Дания), а в качестве вторичных — свиньи антикроличьи антитела, конъюгированные с тетраметилпродамин-изотиоцианатом (TRITC) в разведении 1:25. Ядра клеток окрашивали флюоресцентным красителем ToPro3. Анализ препаратов при микроскопии в проходящем свете и фотосъемку при малом (об.10) и большом (об.100) увеличении выполняли, используя микроскоп Leica DM750 и цифровую фотокамеру ICC50 (Leica, Германия). Препараты, обработанные антителами, конъюгированными с флюорохромами, исследовали при помощи конфокального лазерного микроскопа LSM-710 (Zeiss, Германия), их трехмерную реконструкцию проводили с использованием компьютерной программы ZEN-2011 (Zeiss, Германия). Для возбуждения флюоресценции Cy2, TRITC и ToPro3 использовали лазеры с длиной волны 488, 561 и 633 нм соответственно. Измерения проводили с помощью компьютерной программы LSM Image Browser (Zeiss, Германия).

Результаты исследования. Изучение препаратов при малом увеличении позволяет обнаружить неодинаковое распределение иммунореактивных клеток в различных отделах головного мозга. Так, наибольшая интенсивность окраски отмечается в области поверхностной глиальной пограничной мембраны, в глубоких слоях коры большого мозга, в том числе в области пириформной коры, и в белом веществе мозга. Из нервных центров наибольшая реакция на ГС характерна для латерального ядра перегородки, поводка, стриатума и гиппокампа. Менее выражена реакция в наружных слоях неокортекса, ядрах таламуса и гипоталамуса, в клетках, образующих стенки желудочков мозга, субвентрикулярной зоне и сосудистом сплетении. Однако присутствие слабой иммунопозитивной реакции цитоплазмы в клетках сосудистого сплетения не находит убедительного подтверждения при исследовании препаратов с помощью конфокальной лазерной микроскопии.

Исследование препаратов при большом увеличении позволяет выявить у поверхности мозга монослой иммунопозитивных клеток клиновидной формы (рис. 1). Широкое основание клеток обращено в сторону поверхности, а от верхушки вглубь нервной ткани отходят небольшое число относительно длинных (некоторые — до 60 мкм) волнистых (максимальная амплитуда волны до 3 мкм) неветвящихся отростков толщиной 0,7–0,9 мкм.

Детальное изучение остальных областей, имеющих повышенную иммунореактивность, позво-

ляет обнаружить 2 различных типа интенсивно окрашенных клеток. В зонах, соответствующих серому веществу коры и нервных центров, преобладающий тип представлен звездчатыми клетками с центрально расположенным иммунонегативным ядром и ярким ободком перинуклеарной цитоплазмы, от которой в радиальном направлении отходят 3–4 крупных отростка толщиной 3–4 мкм, дающих более мелкие отростки. Эти клетки располагаются между нейронами, нередко окружая их своими телами или отростками, а также вокруг кровеносных сосудов (рис. 2, а). В белом веществе мозга обнаружено небольшое число иммунореактивных клеток этого типа. Двойная иммунофлюоресцентная реакция (ГФКБ/ГС) показала, что часть этих клеток иммунонегативны по отношению к ГС. Другой тип представлен безотростчатыми (или одноотростчатыми) округлыми клетками с ярко окрашенной цитоплазмой и иммунонегативным ядром. В зонах, соответствующих серому веществу коры и нервных центров, эти клетки располагаются диффузно поодиночке (см. рис. 2, б) либо группируются по две. В белом веществе их число увеличивается, здесь они уже располагаются группами по 3–5 клеток в виде цепочек, вытянутых вдоль иммунонегативных нервных волокон.

Обсуждение полученных данных. Полученные данные указывают на распространенность ГС в клетках ЦНС крысы. При этом отмечается неравномерность ее расположения в различных образованиях мозга. Четко контурируемые ГС-позитивные отростчатые клетки разных областей мозга, участвующие в формировании поверхностной и периваскулярной глиальных пограничных мембран, с учетом их структуры и расположения следует идентифицировать в качестве астроцитов. Принадлежность этих клеток к популяции астроцитов подтверждает и их иммунопозитивная реакция на ГФКБ. Второй тип ГС-позитивных безотростчатых (или одноотростчатых) клеток по морфологическим характеристикам и локализации не может быть отождествлен с типичными астроцитами. Исходя из размеров и формы ядра, ГС-иммунопозитивные клетки второго типа не могут быть клетками микроглии и нейронами, но могут представлять собой атипичные популяции астроцитов либо олигодендроцитов. Однако, если обилие ГС-позитивных астроцитов в зонах расположения крупных нейронов объясняется их ключевой ролью в глутамат/глутаминовом цикле [4, 9], то значение их наличия в белом веществе остается пока непонятным. Возможно, ГС-позитивные астроциты и олигодендроциты белого вещества способны

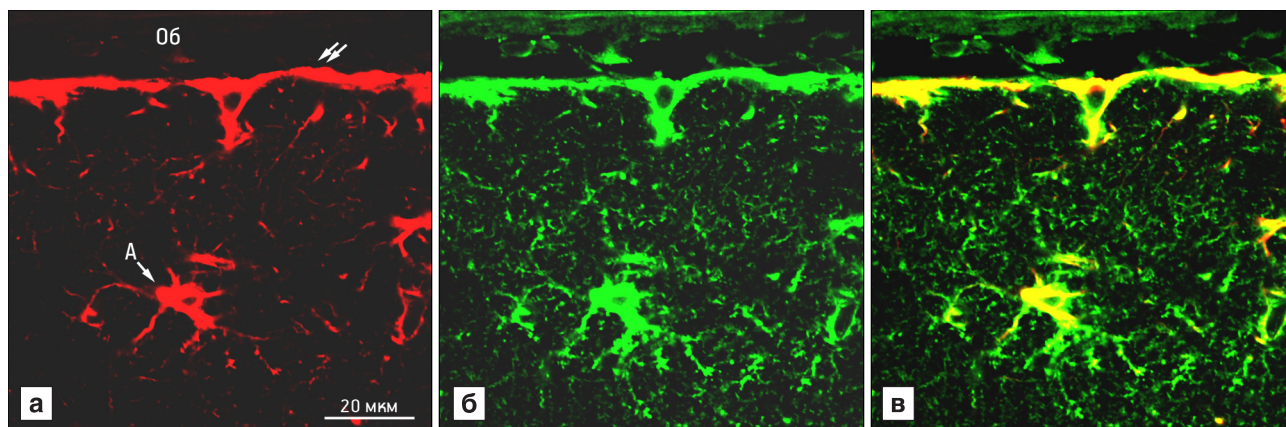


Рис. 1. Сочетанная локализация двух белков в астроцитах поверхностных слоев коры большого мозга крысы.

а — положительная реакция в астроцитах клиновидной формы, формирующих поверхностную глиальную пограничную мембрану (две стрелки), и в астроците (А) I слоя коры. Об — область расположения мозговых оболочек.

Двойная иммуноцитохимическая реакция на глутаминсинтазу (а), визуализация с помощью флюорохрома Cy2 (зеленый цвет) и глиальный фибриллярный кислый белок (б), визуализация с помощью флюорохрома TRITC (красный цвет). В случае сочетанной локализации маркеров структуры окрашиваются в желтый цвет (в). Конфокальная лазерная микроскопия. Величина Z-серии — 7,8 мкм, количество оптических срезов — 27. Реконструкция осуществлена в 3D-модуле программы ZEN 2011 (Zeiss, Германия), в режиме «Maximum Advanced»

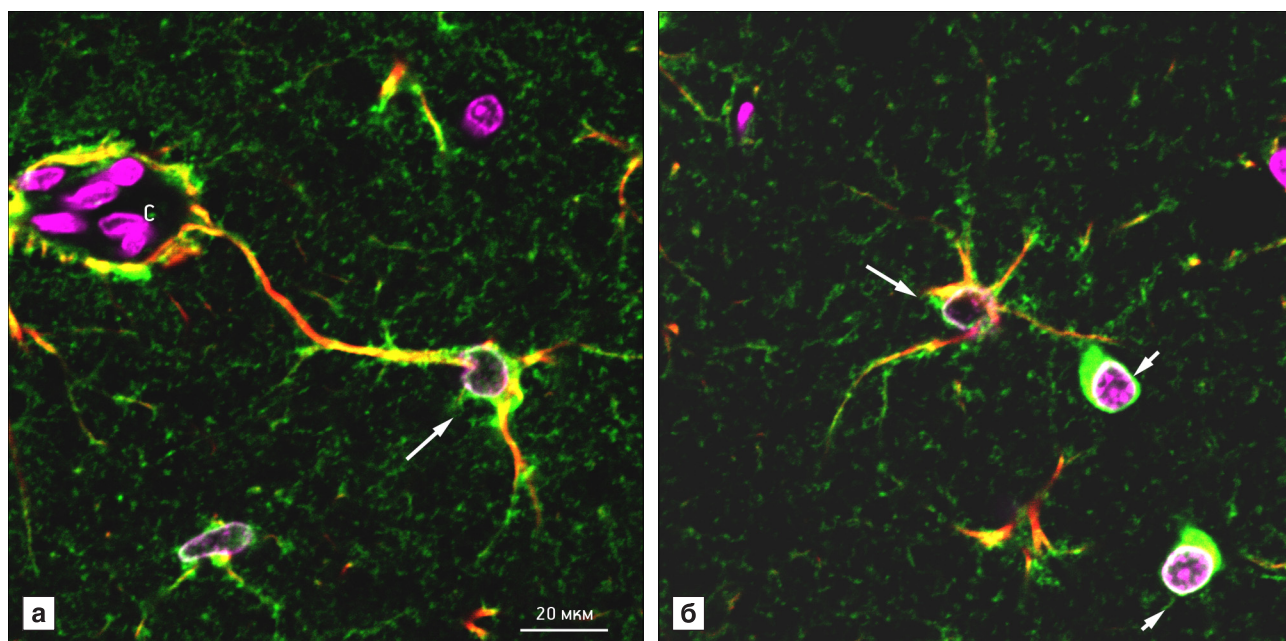


Рис. 2. Глутаминсинтаза в клетках поля СА1 (а) и поля СА3 (б) гиппокампа крысы.

С — кровеносный сосуд. Длинная стрелка — астроцит; короткие стрелки — олигодендроциты. Двойная иммуноцитохимическая реакция на глутаминсинтазу (визуализация с помощью флюорохрома Cy2, зеленый цвет) и глиальный фибриллярный кислый белок (визуализация с помощью флюорохрома тетраметилродамин-изотиоцианата, красный цвет). В случае сочетанной локализации маркеров структуры окрашиваются в желтый цвет. Ядра клеток окрашены флуоресцентным красителем ToPro3 (фиолетовый цвет). Конфокальная лазерная микроскопия: а — величина Z-серии — 4,8 мкм, количество оптических срезов — 17; б — величина Z-серии — 2,7 мкм, количество оптических срезов — 10. Реконструкция осуществлена в 3D-модуле программы ZEN 2011 (Zeiss, Германия), в режиме «Maximum Advanced»

участвовать в элиминации избытка глутамата для предотвращения локального эксайтотоксического повреждения нервных волокон. Ни в одной из исследованных областей ГС не была обнаружена в перикарионах нейронов, что не совпадает с данными других исследователей [5], отмечавших присутствие ГС в нейронах гиппокампа,

черного вещества, ядер гипоталамуса. Однако это может объясняться использованием иных, менее специфичных антител при выявлении ГС, а также выполнением исследования на другом объекте — мозге человека. Неменьший интерес вызывает выявление ГС-негативных астроцитов. Если придерживаться факта экспрессии ГС этими

клетками, данное наблюдение может указывать на то, что ГС-негативные астроциты находятся в измененном функциональном состоянии, при котором происходит подавление синтеза изучаемого фермента. Кроме того, негативный результат иммуноцитохимической реакции части астроцитов может объясняться тем, что ГС в них либо не экспрессируется совсем, либо образуется в таком малом количестве, что использованные нами методы не позволяют ее обнаружить.

Таким образом, полученные в ходе настоящего исследования данные свидетельствуют о том, что ГС экспрессируется двумя клеточными популяциями: типичными астроцитами и другой клеточной популяцией, в состав которой могут входить атипичные астроциты и, с небольшой вероятностью, олигодендроциты. В связи с этим, по нашему мнению, данный белок не может рассматриваться в качестве селективного маркера только одного типа клеток.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-00071А.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: Д. Э. К.

Сбор и обработка материала: В. В. Г.

Анализ и интерпретация данных: Е. Г. С.

Написание текста: Е. Г. С., Д. Э. Г.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д. Э., Сухорукова Е. Г., Гилерович Е. Г., Петрова Е. С., Кирик О. В., Григорьев И. П. Преимущества и недостатки цинк-этанол-формальдегида как фиксатора для иммуноцитохимических исследований и конфокальной лазерной микроскопии // *Морфология*. 2013. Т. 143, № 2. С. 81–85 [Korzhevskiy D. E., Sukhorukova Ye. G., Gilerovich Ye. G., Petrova Ye. S., Kirik O. V., Grigoriev I. P. Advantages and disadvantages of zinc-ethanol-formaldehyde as a fixative for immunocytochemical studies and confocal laser microscopy // *Morfologiya*. 2013. Vol. 143, № 2. P. 81–85. In Russ.].
2. Сухорукова Е. Г., Коржевский Д. Э., Алексеева О. С. Глиальный фибриллярный кислый белок — компонент промежуточных филаментов астроцитов мозга позвоночных // *Журн. эволюц. биохим.* 2015. Т. 51, № 1. С. 3–10 [Sukhorukova E. G., Korzhevskiy D. E., Alekseeva O. S. Glial fibrillary acidic protein: the component of intermediate filaments in the vertebrate brain astrocytes // *Zhurnal evolyutsionnoi biokhimii i fiziologii*. 2015. Vol. 51, № 1. P. 1–10. In Russ.].
3. Anlauf E., Derouiche A. Glutamine synthetase as an astrocytic marker: its cell type and vesicle localization // *Front Endocrinol.* (Lausanne). 2013. Vol. 4, № 144. P. 1–5.
4. Bak L. K., Schousboe A., Vaagepetersen H. S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer // *J. Neurochem.* 2006. Vol. 98, № 3. P. 641–653.
5. Bernstein H.-G., Bannier J., Meyer-Lotz G. et al. Distribution of immunoreactive glutamine synthetase in the adult human and mouse brain. Qualitative and quantitative observations with special emphasis on extra-astroglial protein localization // *J. Chemical Neuroanat.* 2014. Vol. 61–62. P. 33–50.
6. Cammer W. Glutamine synthetase in the central nervous system is not confined to astrocytes // *J. Neuroimmunol.* 1990. Vol. 26. P. 173–178.
7. D'Amelio F., Eng L. F., Gibbs M. A. Glutamine synthetase immunoreactivity is present in oligodendroglia of various regions of the central nervous system // *Glia*. 1990. Vol. 3, № 5. P. 335–341.
8. Fernandes S. P., Dringen R., Lawen A., Robinson S. R. Neuro-nes express glutamine synthetase when deprived of glutamine or interaction with astrocytes // *J. Neurochem.* 2010. Vol. 114, № 5. P. 1527–1536.
9. Hertz L., Zielke H. R. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show // *Trends Neurosci.* 2004. Vol. 27, № 12. P. 735–743.
10. Korzhevskiy D. E., Sukhorukova E. G., Kirik O. V., Grigoriev I. P. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde // *Europ. J. Histochem.* 2015. Vol. 59, № 3. P. 5–9.
11. Norenberg M. D., Martinez-Hernandez A. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain // *Brain Res.* 1979. Vol. 161, № 2. P. 303–310.
12. Rose C. F., Verkhratsky A., Parpura V. Astrocyte glutamine synthetase: pivotal in health and disease // *Biochem Soc Trans.* 2013. Vol. 41, № 6. P. 1518–1524.

Поступила в редакцию 13.10.2016

Получена после доработки 09.06.2017

GLUTAMINE SYNTHETASE IN RAT BRAIN CELLS

*Sukhorukova Ye. G., Gusel'nikova V. V.,
Korzhevskiy D. E.*

Objective — to study, using immunohistochemical method, the cells in the brain producing glutamine synthetase (GS).

Material and methods. The enzyme was demonstrated in the frontal sections of rat brain (n=10) using monoclonal mouse antibody. The preparations were analyzed using light and confocal laser microscopy.

Results. The study showed ubiquitous expression of GS in the brain mainly by two morphologically and topographically different cell types. According to their structure and localization, as well as the immunopositive reaction to glial fibrillary acidic protein, the dominant type of cells was identified as astrocytes. Cells of another type had morphological characteristics and localization corresponding to those of typical oligodendrocytes.

Conclusions. Thus, the data obtained suggest that GS is not a selective marker of any cell population of the rat brain.

Key words: *brain, glia, glutamine synthetase, immunohistochemistry*

Laboratory of Functional Morphology of Central and Peripheral Nervous System Department of General and Special Morphology, RAS Institute of experimental Medicine, 12 Akademika Pavlova St, 197376, St. Petersburg