

Д.Э. Коржевский¹, Е.Г. Сухорукова¹, О.В. Кирик¹ и О.С. Алексеева^{1,2}

АСТРОЦИТЫ СУБВЕНТРИКУЛЯРНОЙ ЗОНЫ КОНЕЧНОГО МОЗГА

¹ Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (зав. — д-р мед. наук Д.Э. Коржевский), отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН; ² лаборатория сравнительной физиологии дыхания (зав. — чл.-кор. РАН А.И. Кривченко), Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

Субвентрикулярная пролиферативная зона является одной из наиболее интересных и наименее понятных, с точки зрения клеточной и пространственной организации, областей головного мозга. Цель настоящего исследования состояла в изучении структурной и цитохимической организации астроцитов субвентрикулярной зоны головного мозга крысы. Астроциты выявляли иммуноцитохимически. Препараты анализировали с применением световой и конфокальной лазерной микроскопии. Проведенное исследование показало, что ведущей клеточной популяцией субвентрикулярной зоны являются атипичные волокнистые астроциты, промежуточные филаменты которых содержат только глиальный фибриллярный кислый белок. Отростки этих клеток формируют под эпандимой сложную двухуровневую сеть. Выявленные структурные особенности глиального каркаса субвентрикулярной зоны, вероятно, обусловлены специфическими функциями этой области и расположением ее в зоне ликворэнцефалического барьера.

Ключевые слова: астроциты, субвентрикулярная зона, конфокальная лазерная микроскопия, иммуноцитохимия

Общепринятым является представление о том, что астроциты головного мозга млекопитающих подразделяются на два структурных подтипа — протоплазматические и волокнистые (фиброзные) астроциты. Однако в отдельных участках головного мозга астроциты обладают своеобразными морфологическими и цитохимическими признаками, которые не вполне типичны для двух основных классификационных групп [3]. В качестве примера можно привести особые астроциты первой пластинки неокортекса, образующие поверхностную глиальную пограничную мембрану.

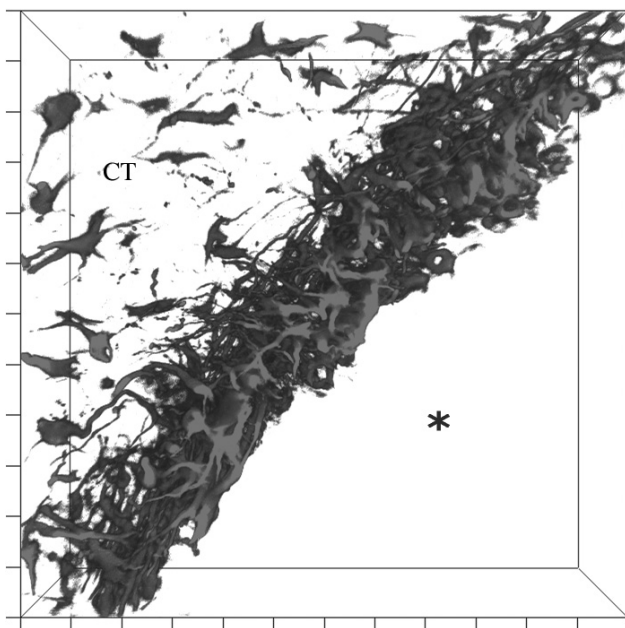
Одной из наиболее интересных и наименее понятных с точки зрения клеточной организации областей головного мозга является пролиферативная субвентрикулярная зона (СВЗ). Она располагается в области наружной стенки боковых желудочков мозга и является местом локализации нейральных стволовых клеток [1, 5]. Ранее выполненные исследования позволили ряду авторов предположить, что астроциты в этой зоне обладают свойствами стволовых клеток, и ввести в обращение, кажущийся абсурдным, термин — «нейрогенные астроциты» [5, 6]. До настоящего времени остаются неопределенными морфологические характеристики этих клеток, а вопросы о клеточном составе и трехмерной организации СВЗ представляются дискуссионными.

Цель настоящего исследования состояла в изучении структурной и цитохимической организации астроцитов субвентрикулярной зоны голов-

ного мозга крысы при помощи методов иммуноцитохимии, конфокальной микроскопии и трехмерной реконструкции.

Материал и методы. Материалом для исследования служил головной мозг половозрелых крыс-самцов линии Вистар (n=20). Содержание и умерщвление животных осуществляли согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.). Материал фиксировали цинк-этанол-формальдегидом и заливали в парафин. Срезы толщиной от 5 до 30 мкм были изготовлены на санном (Leica SM 2000R, Германия) и ротационном (Leica RM 2125RT, Германия) микротоме. Иммуноцитохимически выявляли глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), характерный для промежуточных филаментов (ПФ) астроцитов при помощи поликлональных антител (Dako, Дания), согласно ранее опубликованному протоколу [4]. Другие белки ПФ — виментин и нестин — выявляли при помощи моноклональных антител к виментину (клон V-9, Dako, Дания) и нестину (клон Rat-401, BD Pharmingen, США) в соответствии с рекомендациями производителя и собственными оптимизирующими модификациями. Для конфокальной микроскопии использовали конъюгаты вторичных антител с флюоресцентными реагентами BODIPY-FL и тетраметилродаминизотиоцетатом (TRITC) фирм Invitrogen (США) и Dako (Дания). Полученные препараты исследовали с помощью световой (микроскоп Leica DM750 — Leica, Германия) и конфокальной (микроскоп LSM 510 Meta — Zeiss, Германия) микроскопии. Обработку изображений, измерения и трехмерную реконструкцию объектов проводили с учетом ранее разработанных методических приемов [2].

Результаты исследования. Проведенные иммуноцитохимические реакции с антителами к различным белкам промежуточных филамен-



Трехмерная реконструкция клеток субвентрикулярной зоны конечного мозга крысы.

Звездочка — полость бокового желудочка; СТ — стриатум с иммунопозитивными астроцитами; на осях каждое деление соответствует 20 мкм. Иммуноцитохимическая реакция на глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) — тетраметилроданизинотиоцианат (TRITC). Конфокальная микроскопия, трехмерная реконструкция по 43 оптическим срезам (интервал — 1 мкм).

тов на последовательных срезах головного мозга показали, что ведущей клеточной популяцией СВЗ являются GFAP-иммунопозитивные (GFAP⁺) отростчатые клетки. Нестин-иммунопозитивными являются небольшие безотростчатые клетки, образующие в СВЗ компактные скопления (по 5–10 клеток). Виментин содержат клетки эпендимы желудочков, которые дают на него интенсивную реакцию. Кроме клеток эпендимы, виментин присутствует в эндотелиоцитах части кровеносных сосудов головного мозга.

GFAP⁺-клетки СВЗ имеют сложную форму, определить которую не удастся на препаратах, подготовленных для световой микроскопии. Эти клетки отличаются от астроцитов серого и белого вещества конечного мозга более высокой интенсивностью реакции на GFAP и не дают положительной реакции на нестин и виментин. Трехмерная реконструкция клеток СВЗ, содержащих GFAP, показывает, что они отличаются по размерам, форме и характеру ветвления отростков от типичных астроцитов серого и белого вещества конечного мозга. Тела этих клеток в основном расположены неглубоко под эпендимой, а их отростки формируют двойную сеть. Непосредственно под эпендимой расположена мелкая сеть, образованная толстыми отрост-

ками GFAP⁺-клеток. От толстых отростков, часто под прямым углом, ответвляются более тонкие. В более глубоких участках СВЗ сеть более густая и состоит из длинных, маловетвящихся отростков, идущих параллельно эпендиме (рисунок). Через эту сеть проходят тонкие отростки и редкие, более крупные неветвящиеся отростки, направляющиеся далее в нейропиль стриатума.

Обсуждение полученных данных. Структурная организация и состав промежуточных филаментов GFAP⁺-клеток субвентрикулярной зоны свидетельствуют в пользу того, что они действительно являются астроцитами [2, 3]. Однако пространственная реконструкция показывает, что по формальным признакам они не могут рассматриваться ни как протоплазматические астроциты, ни как типичные волокнистые астроциты, от которых их отличает структурная организация отростков и пластинчатый характер образуемой ими сети. Вероятно, особые функции СВЗ, связанные с генерацией новых клеток [1, 5], а также расположение в этой зоне ликворозцефалического барьера, обуславливают своеобразную организацию ее глиального каркаса.

Таким образом, астроциты СВЗ мозга крысы представляют собой особую популяцию атипичных волокнистых астроцитов, особенности трехмерной организации которых, по-видимому, обусловлены специфическими функциональными характеристиками этой области головного мозга. Полученные данные показывают, что использованный метод пространственной реконструкции [2] позволяет получить ценную дополнительную информацию о структурной организации выявляемых тканевых элементов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 10-04-00180а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д.Э. Нейрогенез и нейральные стволовые клетки. Мед. академ. журн., 2010, т. 10, № 4, с. 175–182.
2. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Сухорукова Е.Г. и др. Изучение пространственной организации астроцитов головного мозга при помощи конфокальной лазерной микроскопии. Морфология, 2009, т. 135, вып. 3, с. 76–79.
3. Коржевский Д.Э., Отеллин В.А. и Григорьев И.П. Глиальный фибриллярный кислый белок в астроцитах неокортекса человека. Морфология, 2004, т. 126, вып. 5, с. 7–10.
4. Сухорукова Е.Г., Коржевский Д.Э., Кирик О.В. и Коржевская В.Ф. Иммуногистохимическое выявление астроцитов головного мозга при черепно-мозговой травме. Суд.-мед. экспер., 2010, № 1, с. 14–16.
5. Pfenninger C.V., Roschupkina T., Hertwig F. et al. CD133 is not present on neurogenic astrocytes in the adult subventricular zone, but on embryonic neural stem cells, ependymal cells, and glioblastoma cells. Cancer Res., 2007, v. 67, № 12, p. 5727–5736.

6. Zheng T., Marshall G.P., Laywell E.D. and Steindler D.A. Neurogenic astrocytes transplanted into the adult mouse lateral ventricle contribute to olfactory neurogenesis, and reveal a novel intrinsic subependymal neuron. *Neuroscience*, 2006, v. 142, № 1, p. 175–185.

Поступила в редакцию 08.02.2011

ASTROCYTES OF THE SUBVENTRICULAR ZONE OF THE TELENCEPHALON

D.E. Korzhevskiy, Ye.G. Sukhorukova, O.V. Kirik and O.S. Alekseyeva

Subventricular proliferative zone is the brain area most intriguing and least understood in terms of cellular and spatial organization. The objective of this study was to focus on the structural and cytochemical organization of astrocytes of the subventricular zone of the rat brain. Astrocytes were detected immunocytochemically. The preparations were analyzed using conventional

light microscopy and confocal laser microscopy. The study performed showed that the major cellular population of the subventricular zone was represented by a special kind of atypical fibrous astrocytes with the intermediate filaments containing only glial fibrillary acidic protein (GFAP). The processes of these cells formed a complex double-layer network beneath the ependyma. The described structural pattern of the glial skeleton of the subventricular zone seems to be determined by specific functions of the area and its location in the zone of CSF-brain barrier.

Key words: *astrocytes, subventricular zone, confocal laser microscopy, immunocytochemistry*

Laboratory of the Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAMS North-Western Branch Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg; Laboratory of Comparative Physiology of Respiration, RAS I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, St. Petersburg