

© Коллектив авторов, 2011
УДК 611.813.1.018.8:599.323.4

Е.Г. Сухорукова¹, О.С. Алексеева², О.В. Кирик¹, Н.А. Грудина¹ и Д.Э. Коржевский¹

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПОВЕРХНОСТНОЙ ГЛИАЛЬНОЙ ПОГРАНИЧНОЙ МЕМБРАНЫ И АСТРОЦИТОВ I СЛОЯ КОРЫ БОЛЬШОГО МОЗГА КРЫСЫ

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

Изучение структурно-функциональной организации границ раздела сред в ЦНС является фундаментальной задачей нейробиологии. Учитывая противоречивые данные о строении поверхностных слоев неокортекса млекопитающих, актуальными остаются детальные исследования структурной и цитохимической организации астроцитов — основных компонентов барьерной системы головного мозга животных, используемых в экспериментальных исследованиях, связанных с моделированием заболеваний и травм головного мозга. Цель настоящей работы состояла в изучении структурной организации астроцитов I слоя неокортекса крысы. Астроциты выявляли иммуноцитохимически с использованием антител к глиальному фибриллярному кислому белку, виментину, нестину при помощи световой и конфокальной лазерной микроскопии. Результаты исследования показывают, что поверхностная глиальная пограничная мембрана (ПГПМ) в разных областях коры имеет существенные структурные различия, и астроциты I слоя коры большого мозга у крысы не являются типичными протоплазматическими астроцитами, характерными для серого вещества. Выявленные региональные особенности в организации ПГПМ, вероятно, обусловлены различиями в функциональных характеристиках ликворознцефалического барьера в разных областях головного мозга.

Ключевые слова: астроциты, ликворознцефалический барьер, крыса, конфокальная микроскопия, иммуноцитохимия

Изучение структурно-функциональной организации границ раздела структурных компонентов в ЦНС необходимо для раскрытия клеточных и молекулярных механизмов, обеспечивающих поддержание постоянства состава внутренней среды мозга [8], а также регулирующих селективное проникновение различных веществ через гематоэнцефалический и ликворознцефалический барьеры [12]. Среди анатомических зон локализации барьеров головного мозга наружная поверхность занимает особое место. Во всех областях большого мозга она образована I слоем (пластинкой) коры, который формируется раньше других кортикальных слоев [10,11] и играет важную роль в становлении цитоархитектоники неокортекса [14]. Ключевым элементом I слоя коры, обеспечивающим поддержание целостности ликворознцефалического барьера, является поверхностная глиальная пограничная мембрана (ПГПМ), которая в эмбриогенезе начинает формироваться клетками радиальной глии [7], а в постнатальный период онтогенеза образована астроцитами. До настоящего времени не сформирована общепринятая концепция организации ПГПМ у млекопитающих и человека. Отдельные исследования [13] свидетельствуют о наличии существенных различий в структуре астроцитов I слоя коры у приматов и грызунов, однако региональные особенности ПГПМ остаются неизученными.

Цель настоящей работы состояла в изучении структурной организации ПГПМ и астроцитов I слоя коры большого мозга крысы.

Материал и методы. Эксперименты были проведены на 40 половозрелых крысах-самцах линии Вистар. Во всех опытах при эвтаназии крыс соблюдали международные правила Хельсинкской декларации о гуманном обращении с животными. Головной мозг извлекали, фиксировали цинк-этанол-формальдегидом. Далее материал обезжизняли стандартным способом и заливали в парафин. Срезы толщиной 5, 15 и 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 [9]. 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 оптимизирующими модификациями [2,5] с проведением соответствующих контрольных реакций. Для конфокальной микроскопии использовали конъюгаты антител с флуоресцентными реагентами BODIPY-FL, TRITC и QD605 (для визуализации тел и отростков астроцитов) и краситель Hoechst 33342 (для окраски ядер) фирм Dako (Дания), Invitrogen (США) и Chemicon (США) [4]. Часть препаратов окрашивали толуидиновым синим по Нисслю. Полученные препараты исследовали с помощью световой и конфокальной микроскопии, используя световой микроскоп Leica DM750 (Leica, Германия), конфокальный микроскоп LSM 510 Meta (Zeiss, Германия). Обработку изображений, измерения и трехмерную реконструкцию объектов прово-

Сравнительная характеристика поверхностной глиальной пограничной мембраны (ПГПМ) и астроцитов I слоя коры в различных областях большого мозга крысы

Исследованные структуры	Области мозга		
	теменная	поясная	базальная
ПГПМ:			
толщина ($x \pm \sigma$, мкм)	7,0 $\pm$ 0,5	5,10 $\pm$ 0,21	27,2 $\pm$ 2,1
число рядов астроцитов, ее формирующих	1	1	2–3
Астроциты I слоя:			
характеристика отростков	Волнистые неветвящиеся	Прямые разветвляющиеся	Волнистые неветвящиеся
толщина отростков, мкм	0,7–1,0 постоянной толщины	Сужающиеся от 2,5 до 0,5	0,7–1,0 постоянной толщины
длина отростков, мкм	Около 70	Около 50	Около 70
состав промежуточных филаментов	GFAP	GFAP	GFAP и виментин

Примечание. GFAP — глиальный фибриллярный кислый белок.

дили с применением компьютерных программ, входящих в пакет 3Dfor LSM (Zeiss, Германия), программ Image J и LAS EZ (Leica, Германия) с учетом ранее разработанных методических приемов [3].

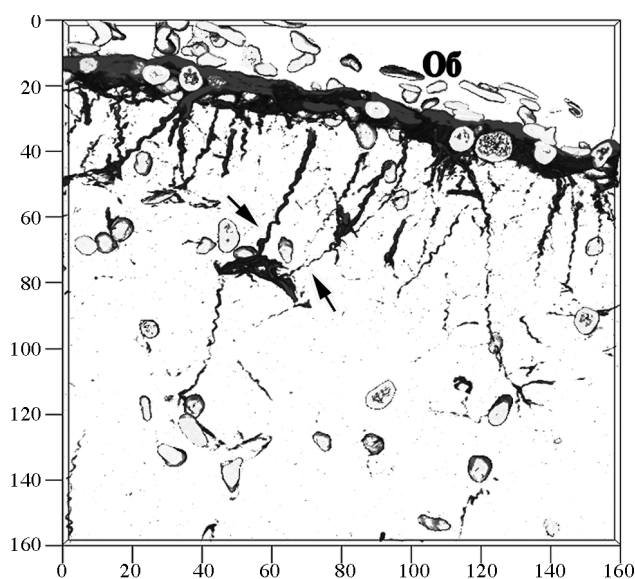
Результаты исследования. Исследование срезов большого мозга крысы при световой и конфокальной лазерной микроскопии показывает, что в разных областях коры ПГПМ и астроциты I слоя имеют ряд структурных различий. На верхнелатеральной поверхности мозга ПГПМ представлена монослоем распластанных GFAP-иммунопозитивных астроцитов, соединенных широколопастными отростками. От этих астроцитов в подлежащую нервную ткань отходит небольшое число относительно длинных (некоторые из них длиной до 70 мкм) извитых (максимальная амплитуда волны до 3 мкм) неветвящихся отростков толщиной 0,7–1 мкм. На медиальной поверхности мозга, в поясной области коры, ПГПМ имеет такое же строение, что и на верхнелатеральной поверхности, однако астроциты здесь клиновидной формы. Широкое основание клетки обращено в сторону поверхности, а верхушка продолжается вглубь мозга в виде толстого (2,5 мкм), иногда разветвляющегося отростка, в практически перпендикулярном к поверхности направлении.

По мере приближения к нижней поверхности мозга происходит утолщение ПГПМ. Она образована уже несколькими рядами уплощенных астроцитов, плотно прилежащими друг к другу. В области расположения подпаутинных цистерн основания мозга и находящихся рядом кровеносных сосудов оболочки мозга крупные поверхностные астроциты также располагаются в несколько рядов, имеют сложную полигональную форму и короткие, толстые (около 4 мкм в диаметре), пере-

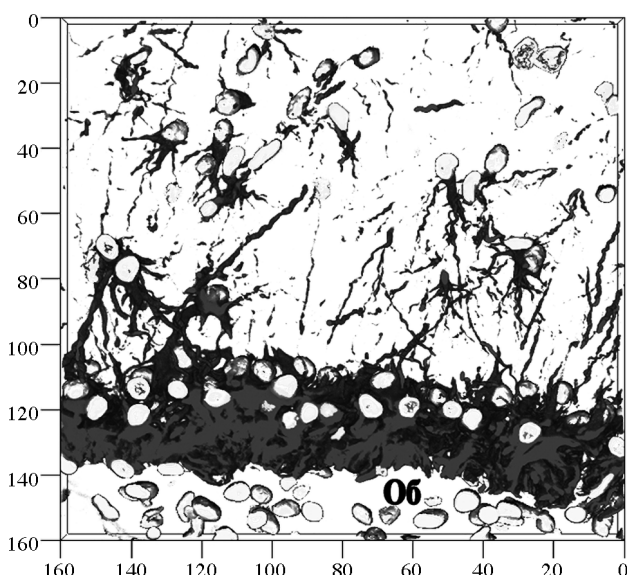
плетенные отростки. Помимо астроцитов, расположенных непосредственно в области ПГПМ, на нижней поверхности мозга в формировании ПГПМ участвуют и отростки астроцитов, тела которых локализованы в глубоких отделах I слоя коры. Трехмерная реконструкция поверхностных астроцитов (рисунок) позволяет наглядно проиллюстрировать сложные взаимоотношения клеток, формирующих ПГПМ.

Измерения показали, что толщина ПГПМ неодинакова в разных областях головного мозга (таблица). В зоне вставания в ткань мозга сосудов мягкой оболочки толщина мембраны уменьшается до 4,5 $\pm$ 0,3 мкм (что соответствует зоне перехода в периваскулярную пограничную мембрану). Нередко отростки астроцитов I слоя подходят к кровеносным сосудам и участвуют в образовании периваскулярной пограничной мембраны. Таким образом, астроциты I слоя коры большого мозга крысы участвуют в образовании ликворо- и гематоэнцефалического барьеров. Сравнительная характеристика ПГПМ и астроцитов I слоя коры в разных областях головного мозга крысы представлена в таблице.

Результаты исследования с использованием антител к трем белкам ПФ (GFAP, виментину и нестину) показали, что астроциты I слоя содержат преимущественно GFAP. У части поверхностных астроцитов в области основания мозга выявлена ассоциация GFAP с виментином. Нестин-иммунопозитивные клетки в исследованных областях коры обнаружены не были, хотя внутренний положительный контроль — клетки субвентрикулярной пролиферативной зоны конечного мозга — демонстрировал отчетливую положительную реакцию на этот белок.



а



б

Трехмерная реконструкция астроцитов I слоя коры в верхне-латеральной (а) и нижней (б) частях поверхности большого мозга крысы.

Об — область расположения мозговых оболочек; стрелки — отростки астроцитов I слоя, оплетающие кровеносный сосуд. Иммуноцитохимическая реакция на глиальный фибриллярный кислый белок; ядра окрашены красителем Hoechst 33342. Конфокальная лазерная микроскопия. а — величина Z-серии — 10 мкм, количество оптических срезов — 25; б — величина Z-серии — 11 мкм, количество оптических срезов — 28. Трехмерная реконструкция. Размеры изображений нанесены на оси x, y; одно деление шкалы соответствует 20 мкм.

Обсуждение полученных данных.

Проведение трехмерной реконструкции позволило повысить информативность данных, получаемых при иммуноцитохимическом исследова-

нии объектов, имеющих сложную структуру, к которым относятся и астроциты, участвующие в образовании ПГПМ. Полученные результаты показывают, что астроциты I слоя коры большого мозга у крысы не являются типичными протоплазматическими астроцитами, характерными для серого вещества. Учитывая региональные особенности поверхностных астроцитов мозга крысы, их также нельзя отнести к общепринятым классификационным типам, характерным для астроцитов неокортекса человека [6]. Выявленные региональные особенности в организации ПГПМ, вероятно, обусловлены различиями в функциональных характеристиках ликворэнцефалического барьера в отдельных областях головного мозга. Эти особенности могут быть связаны с различиями в функциональной специализации нервных структур I слоя коры.

Важным фактом является наличие в составе ПГПМ нижней части коры большого мозга крысы астроцитов, экспрессирующих виментин — белок, характерный для незрелых клеток [5]. Не исключено, что выявленные астроциты могут обладать свойствами глиальных прогениторных клеток. Отсутствие в обнаруженных клетках нестина, характерного для нейральных стволовых клеток [1], свидетельствует против возможного участия изученных астроцитов в нейрогенезе.

Таким образом, структурная и цитохимическая организация астроцитов, формирующих ПГПМ в различных участках коры большого мозга крысы, неодинакова. Установленные особенности строения ПГПМ следует учитывать при экспериментальном исследовании проницаемости барьеров головного мозга.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 10-04-00180а) и Правительства Санкт-Петербурга (ПСР № 10 660).

ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д.Э. Нейрогенез и нейральные стволовые клетки. Мед. академ. журн., 2010, т. 10, № 4, с. 175–182.
2. Коржевский Д.Э. и Гиляров А.В. Оптимизация метода иммуногистохимического выявления нестина для парафиновых срезов головного мозга крысы. Морфология, 2006, т. 130, вып. 6, с. 78–80.
3. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Сухорукова Е.Г. и др. Изучение пространственной организации астроцитов головного мозга при помощи конфокальной микроскопии. Морфология, 2009, т. 135, вып. 3, с. 76–79.
4. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Сухорукова Е.Г. и Гиляров А.В. Применение полупроводниковых нанокристаллов (квантовых точек) в иммуногистохимических исследованиях. Морфология, 2010, т. 137, вып. 3, с. 71–75.
5. Коржевский Д.Э., Ленцман М.В., Кирик О.В. и Отеллин В.А. Виментин-иммунопозитивные клетки конечного мозга

- крысы после экспериментального ишемического инсульта. Морфология, 2007, т. 132, вып. 5, с. 23–27.
6. 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.
 7. Отеллин В.А. и Коржевский Д.Э. Формирование и структурная организация барьера на наружной поверхности головного мозга. Морфология, 2002, т. 122, вып. 6, с. 14–18.
 8. Отеллин В.А. и Саульская Н.Б. Межклеточная интеграция в центральной нервной системе. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова, 2000, т. 86, № 7, с. 801–809.
 9. Сухорукова Е.Г., Коржевский Д.Э., Кирик О.В. и Коржевская В.Ф. Иммуногистохимическое выявление астроцитов головного мозга при черепно-мозговой травме. Суд.-мед. экспертиза, 2010, № 1, с. 14–16.
 10. Федосихина Л.А. Ультраструктурная характеристика первого слоя коры поясной области большого мозга крысы. Арх. анат., 1984, т. 86, вып. 2, с. 22–28.
 11. Хожай Л.И. и Отеллин В.А. Морфогенез слоя I коры мозга мышей в пренатальный период развития. Онтогенез, 1999, т. 30, № 1, с. 40–46.
 12. Abbott N.J. Astrocyte-endothelial interaction and blood-brain barrier permeability. J. Anat., 2002, v. 200, p. 629–638.
 13. Colombo J.A., Fuchs E., Härtig W. et al. «Rodent-like» and «Primate-like» types of astroglial architecture in the adult cerebral cortex of mammals: a comparative study. Anat. Embryol. (Berl.), 2000, v. 201, № 2, p. 111–120.
 14. Doetsch F., Caillé I., Lim D.A. et al. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. Cell, 1999, v. 97, № 6, p. 703–716.
 15. Marin-Padilla M. Ontogenesis of the pyramidal cell of the mammalian neocortex and developmental cytoarchitectonics. A unifying theory. J. Comp. Neurol., 1992, v. 321, № 2, p. 223–240.

Поступила в редакцию 28.04.2011

STRUCTURAL ORGANIZATION OF SUPERFICIAL GLIAL LIMITING MEMBRANE AND LAYER I ASTROCYTES IN RAT BRAIN CORTEX

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

A study of structural and functional organization of the boundaries separating CNS compartments is a fundamental task of neurobiology. Taking into account the contradictory data on the structure of superficial layers of mammalian neocortex, it is pertinent to study structural and cytochemical organization of astrocytes — the main components of the brain barrier system in animals that are often used for experimental modeling of brain diseases and injuries. The aim of the present work was to study the structural organization of layer I astrocytes of rat neocortex. Astrocytes were demonstrated immunocytochemically using anti-GFAP, anti-vimentin and anti-nestin antibodies using light and confocal laser microscopy. The results of the study demonstrated that the superficial glial limiting membrane had significant structural differences in different cortical regions. Astrocytes in layer I of rat neocortex were different from typical protoplasmic astrocytes, common to gray matter. The regional peculiar features of superficial glial limiting membrane organization that were found in this study, are probably determined by the differences in functional characteristics of CSF-encephalic barrier in the specific regions of the brain.

Key words: *astrocytes, CSF-encephalic barrier, rat, confocal 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