УДК 591.88:611.8.81

МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТОРМОЗНЫХ ПРОЦЕССОВ В НЕЙРОТРАНСПЛАНТАТАХ

Журавлева З.Н.

ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, e-mail: zhuravleva@iteb.ru

Проведено изучение количества тормозных ГАМК-ергических нейронов и общей нейрональной плотности в неокортикальных трансплантатах и в окружающей соматосенсорной области мозга реципиента через шесть месяцев после трансплантации. Трансплантаты были обнаружены у всех оперированных животных. Для идентификации тормозных клеток использовали метод иммуноцитохимического окрашивания полутонких срезов. Было обнаружено, что по сравнению с контрольным неокортексом в трансплантатах общее число нейронов значительно увеличено. В то же время, популяция тормозных ГАМК-ергических клеток, наоборот, была резко снижена, хотя и наблюдалась некоторая гипертрофия их размеров. Нарушение баланса между возбуждением и торможением в трансплантированной ткани может приводить к развитию патологической активности и формированию эпилептического фокуса. В качестве возможных факторов, приводящих к селективной редукции тормозных нейронов, обсуждается роль частичной деафферентации или бóльшей уязвимости ГАМК-предшественников к временной гипоксии во время процедуры трансплантации.

Ключевые слова: интракортикальные трансплантаты, неокортекс, ГАМК-ергические нейроны, иммуноцитохимия, количественный анализ.

MICROSCOPIC CHARACTERISTIC OF INHIBITORY PROCESSES IN THE NEUROTRANSPLANTS

Zhuravleva Z.N.

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, e-mail: zhuravleva@iteb.ru

We investigated the number of inhibitory GABA-ergic neurons and the overall neuronal density in neocortical transplants and surrounding somatosensory region of the recipient brain six months after transplantation. Transplant survival was noted in all operated animals. Inhibitory cells were identified in semithin sections by immunocytostaining method. It was found that the total number of neurons was significantly increased in the transplants in comparison with the control neocortex. At the same time, the population of inhibitory GABA-ergic cells was greatly reduced, although there was some hypertrophy of their sizes. Imbalance between excitation and inhibition in the transplanted tissue can lead to development of pathologic activity and formation of the epileptic focus. The possible role of partial deafferentation as well as the relative vulnerability of the GABA-progenitors by temporary hypoxia during the grafting procedure is discussed as the probable factors in selective decline of inhibitory cells.

Keywords: intracortical transplants, neocortex, GABA-ergic neurons, immunocytochemistry, quantitative analysis

Центральная нервная система млекопитающих обладает очень ограниченной способностью к регенерации. Это является серьезным препятствием для восстановления нормального функционирования мозга после повреждения в результате травм или нейродегенеративных заболеваний. Показано, что нейротрансплантация в поврежденный мозг кусочков фетальной ткани или нейральных клеток-предшественников оказывает позитивное воздействие на его регенеративные способности. Недифференцированные трансплантированные клетки продолжают свое развитие, воспроизводят основные морфологические и физиологические свойства, интегрируются с мозгом реципиента и замещают поврежденные структуры [2, 6, 10]. Ранее мы показали, что воспроизведение

органотипических характеристик донорских тканей сохраняется даже при интраокулярной трансплантации [1]. Однако морфологическая и функциональная изоляция трансплантатов от других структур мозга приводит к формированию в них патологической электрофизиологической активности [5]. Аномалии функциональных процессов в трансплантированной ткани могут зависеть от нарушения соотношения возбудительных и тормозных нейронов. Общеизвестно, что основным тормозным медиатором в ЦНС млекопитающих является гамма-аминомасляная кислота (ГАМК). Целью настоящей работы было изучение числовой плотности тормозных ГАМК-ергических нейронов в неокортикальных трансплантатах, а также оценка их соотношения с нейронами другой нейромедиаторной природы.

Материалы и методы исследования

Эксперименты были выполнены на крысах породы Вистар с соблюдением требований к работе с животными (ГОСТ Р ИСО 10993-2-2009). Материалом для трансплантации служили эмбриональные закладки соматосенсорного неокортекса, выделенные из мозга 17-дневных плодов крыс. Для извлечения плодов самке-донору под глубоким нембуталовым наркозом (40 мг/кг) делали кесарево сечение. В качестве реципиентов использовали половозрелых крыс-самцов той же породы (n = 5), которым также делали общий нембуталовый наркоз и дополнительно локальную анестезию новокаином. Трансплантацию производили через отверстие в кости черепа в области первичной соматосенсорной коры и прокол в твердой мозговой оболочке. С помощью туберкулинового шприца со стеклянным наконечником в отверстие вводили кусочек эмбриональной ткани объемом около 1 мм³. Через 6 месяцев после трансплантации животных транскардиально перфузировали фиксирующим раствором (смесь 2.5% параформальдегида и 1% глутаральдегида на 0.1 М фосфатном буфере при pH 7.2). Интрамозговые трансплантаты выделяли из мозга вместе с окружающим неокортексом, который служил в качестве контроля. Затем материал постфиксировали в 1% растворе четырехокиси осмия и заливали в эпоксидную смолу Эпон 812 по общепринятой методике. На ультрамикротоме из каждого эпонового блока через 50 мкм приготавливали пары полутонких срезов толщиной 1 мкм, один из которых окрашивали толуидиновым синим для рутинной гистологии и для подсчета общего числа нейронов, а следующий срез подвергали иммуноцитохимическому окрашиванию на ГАМК. Для количественной оценки плотности и размеров ГАМК-положительных (ГАМК+) и ГАМК-отрицательных (ГАМК-) клеток в трансплантатах и в контрольном неокортексе использовали компьютерную программу UTHSCSA Image Tool. Подсчет и измерение диаметров ядер и перикарионов производили на 10 случайно выбранных участках каждого среза. Числовую плотность клеток в единице объема (1 мм³) вычисляли по формуле,

предложенной Вайбел с соавторами для эллипсоидов [9]. Такой стереологический подход для подсчета клеток применялся нами ранее; в настоящей работе использованы некоторые цифровые данные, полученные в предыдущем исследовании [4]. Статистическую значимость различий определяли по t-критерию Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Визуальный и микроскопический анализ через 6месяцев после операции показал, что трансплантаты сохранились у всех оперированных животных. На гистологических срезах было видно, что все трансплантаты увеличили свои размеры; нервные клетки содержали выраженные ядра и дифференцированную цитоплазму. Однако нейроны располагались диффузно, без типичной для неокортекса колончатой организации клеточных элементов (рис.1).

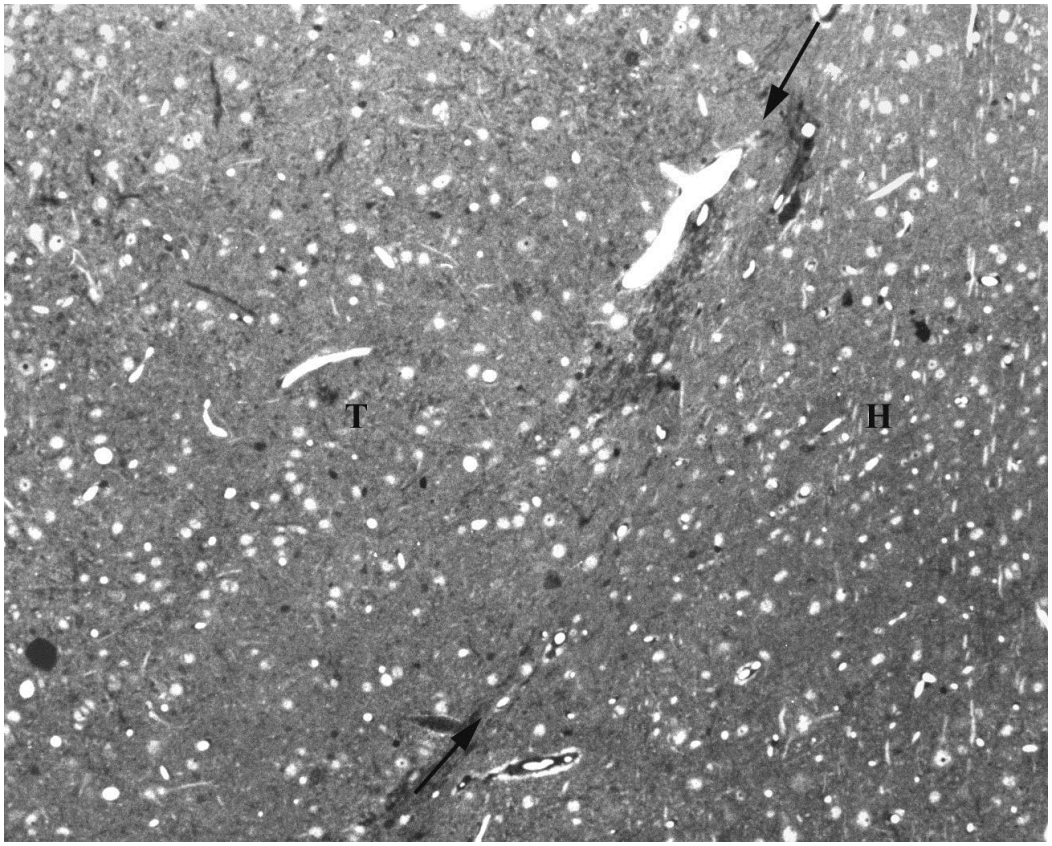

Рис. 1. Полутонкий гистологический срез с эпонового блока через интранеокортикальный трансплантат (Т) и окружающий неокортекс реципиента (Н). Стрелки указывают на границу между трансплантатом и мозгом. Окраска толуидиновым синим

Граница между самим трансплантатом и соседним неокортексом реципиента хорошо идентифицировалась благодаря проникающим в эту зону кровеносным сосудам. Кроме того, окружающая неокортикальная ткань выделялась более упорядоченным расположением нейронов и параллельно расположенным апикальным дендритам, направленным к поверхности мозга. Нарушением органотипической клеточной организации

неокортикальные трансплантаты отличались от изученных нами ранее трансплантатов зубчатой извилины гиппокампа, в которых при идентичном типе трансплантации формировался выраженный слой гранулярных нейронов [1, 10].

После проведения иммунохимической реакции на ГАМК в срезах, содержащих нейротрансплантат и окружающий его неокортекс, были выявлены ГАМК-позитивные нейроны. Общая микроскопическая оценка препаратов показала, что ГАМК-ергических нейронов в трансплантатах значительно меньше, чем в интактной неокортикальной ткани. Иммунореактивные нейроны имели овальную, мультиполярную или пирамидоподобную форму. Метка коричневого цвета была гомогенно распределена по всему клеточному телу; ядра выглядели более светлыми. В план среза некоторых нейрональных перикарионов входили позитивно окрашенные нервные отростки. Кроме того, были видны ГАМК(+) фрагменты отростков, перерезанные в разных направлениях, которые выглядели как точечные включения или прерывистые и изогнутые линии. Яркие иммунопозитивные вкрапления также обнаруживались на поверхности ГАМК(-) нервных клеток и их дендритов (рис. 2).

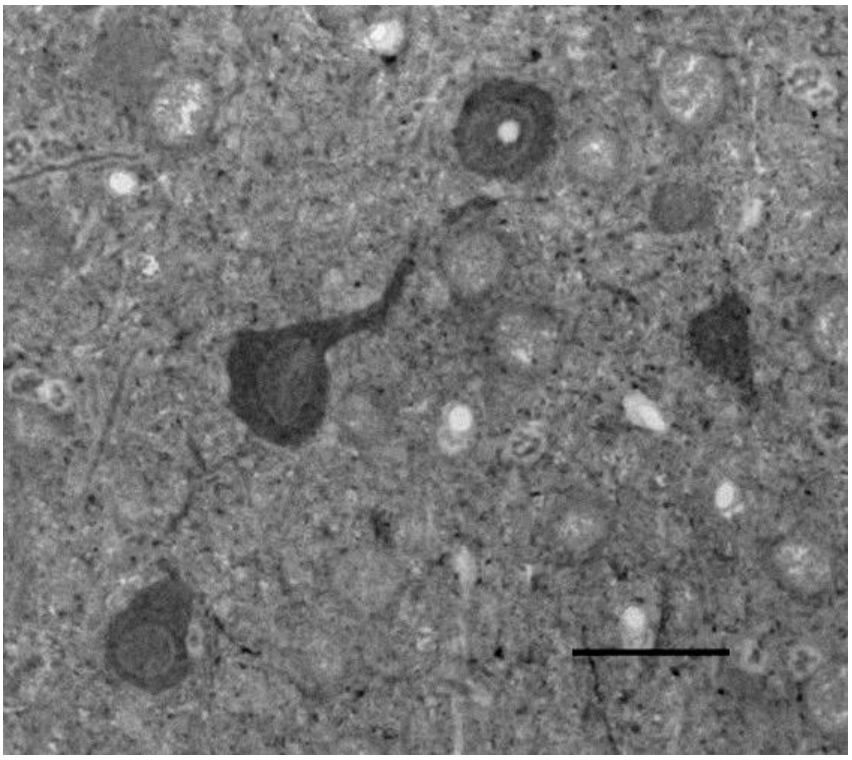

Рис. 2. Группа ГАМК-иммунопозитивных нейронов в неокортикальном трансплантате. Масштаб: 25 мкм.

По-видимому, ГАМК(+) микроструктуры в виде точек могут представлять собой синаптические окончания тормозных интернейронов. Интенсивность реакции в разных ГАМК-ергических нейронах несколько варьировала, что, по-видимому, было следствием их

разного биохимического или функционального состояния. Известно, что в процессе развития нейронов, а также при пластических и некоторых патологических состояниях биосинтез ГАМК в нейронах может изменяться за счет активации альтернативных изоформ синтезирующих ферментов [8].

Количественный анализ общей числовой плотности нейронов, проведенный на гистологических препаратах, окрашенных толуидиновым синим, показал, что в кубическом миллиметре трансплантированной ткани содержится нервных клеток достоверно больше, чем в контрольном неокортексе реципиента (75393 ±9127 и 41708±7816, соответственно; различия при $p \leq 0.0001$). В то же время количество ГАМК-ергических нейронов, наоборот, в трансплантатах было значительно меньше (959±674 против 5605±1353, $p \leq 0.0001$). По-видимому, помимо высоких ростовых потенций эмбриональной ткани, для развития нейрохимического фенотипа нервных клеток требуются и другие факторы, такие как соответствующее микроокружение и адекватная иннервация. Возможное объяснение нарушения дифференцировки ГАМК-позитивных клеток может заключаться и в том, что их предшественники более чувствительны к временной гипоксии во время процедуры трансплантации.

При сравнительном морфометрическом исследовании размеров нейронов и их ядер в неокортикальных трансплантатах и контрольном неокортексе также были прослежены интересные закономерности. Размеры ГАМК-отрицательных клеток анализировали лишь по ядрам, так как в материале, залитом в эпоксидную смолу, определить границы цитоплазмы не представлялось возможным. Измерения диаметров ядер ГАМК-отрицательных клеток не дали различий по этому параметру между двумя типами изученных тканей; их средние значения были практически одинаковыми (8.5±0.7 мкм в трансплантатах и 8.6±0.5 мкм в соседнем неокортексе). Однако ядра ГАМК-позитивных нейронов в трансплантированной ткани достоверно отличались от таковых в ткани реципиента бóльшими размерами. Если в трансплантатах они равнялись 11.9±1.4 мкм, то в контрольных образцах они достигали лишь 9.5±1.5 мкм ($p \leq 0.005$). В таком же соотношении были различия и в поперечных размерах тел ГАМК(+) клеток (21.1±1.9 мкм в трансплантатах и 16.7±1.6 мкм в коре реципиента ($p \leq 0.005$). По-видимому, увеличение размеров ГАМК-ергических нейронов в условиях трансплантации является некой компенсацией снижения их числа.

Значительное уменьшение числа ГАМК-ергических клеток в интрамозговых нейротрансплантатах, несомненно, отражается на функционировании сформированных в них нейрональных сетей. ГАМК-содержащие клетки в неокортексе являются тормозными интернейронами. По данным литературы в разных отделах мозга грызунов они составляют 10 - 25% от всех нервных клеток, что гарантирует физиологический баланс между

возбуждением и торможением [7]. Наши результаты показали, что на долю тормозных нейронов в трансплантатах приходится лишь 1.4%. Снижение тормозных процессов в нейротрансплантатах может сопровождаться гипервозбуждением и развитием патологической эпилептической активности. По-видимому, к снижению числа ГАМК(+) нейронов приводит недостаток нормальных афферентно-эфферентных связей между трансплантатами и мозгом реципиента. Ранее мы показали, что в снижении возбуждающего действия глютаминовой кислоты при формировании синаптических взаимодействий между нейротрансплантатом и мозгом участвуют нейропептидные котрансмиттеры [3].

Заключение

В работе проведено гистологическое и иммунохимическое исследование клеточного состава трансплантатов неокортекса и ткани мозга реципиента, окружающей их. Обнаружено, что в трансплантатах не воспроизводится колончатая архитектоника, свойственная соматосенсорной области коры. Сравнительный количественный анализ показал значительное увеличение общей числовой плотности нейронов и, наоборот, снижение количества тормозных нейронов, содержащих в качестве нейротрансмиттера ГАМК, в трансплантированной ткани. Это, несомненно, может приводить к нарушению тормозных процессов в трансплантированной ткани. Во избежание того, чтобы нейротрансплантат стал источником гипервозбуждения и фокусом эпилептической активности, при использовании трансплантации в медицинской практике необходимо учитывать результаты, полученные в настоящем исследовании.

Список литературы

1. Журавлева З.Н. Ультраструктура синаптических окончаний в трансплантатах нервной ткани, развивающихся в передней камере глаза // Онтогенез. – 1987. – Т. 18. – № 6.– С. 631-638.
2. Журавлева З.Н. Дифференцировка нейронов и синапсов мшистых волокон в трансплантатах зубчатой фасции, развивающихся в неокортексе крыс // Онтогенез. – 1998. – Т. 29. – № 2. – С. 85-91.
3. Журавлева З.Н., Ермаков А.А., Журавлев Г.И. Вовлечение нейропептидных механизмов в процесс интеграции гетеротопических трансплантатов зубчатой фасции с мозгом реципиента // Журн. высш. нервн. деят. – 2007. – Т. 57. – № 2. – С. 205-209.
4. Bragin A., Takács J., Vinogradova O., Zhuravleva Z., Hámori J. Number of GABA-immunopositive and GABA-immunonegative neurons in various types of neocortical transplantats // Exp. Brain Res. 1991. Vol. 85. № 1. P. 114-128.

5. Freund T.F., Buzsàki G. Alterations in excitatory and GABA-ergic inhibitory connections in hippocampal transplants // Neuroscience. 1988. Vol. 27. P. 373-385.

6. Ishii T., Eto K. Fetal stem cell transplantation: Past, present, and future // World J. Stem Cells. 2014. Vol. 6. № 4. P. 404-420.

7. Markram H., Toledo-Rodriguez M., Wang Y. et al. Interneurons of the neocortical inhibitory system // Nat. Rev. Neurosci. 2004. Vol. 5. № 10. P. 793–807.

8. Popp A., Urbach A., Witte O.W. et al. Adult and embryonic GAD transcripts are spatiotemporally regulated during postnatal development in the rat brain // PLoS One. 2009. Vol. 4. № 2: e4371.

9. Weibel E.R., Kistler G.S., Scherle W.F. Practical stereological methods for morphometric cytology // J. Cell Biol. 1966. Vol. 30. № 1. P. 23–38.

10. Zhuravleva Z.N., Vinogradova O.S. // Intracortical dentate fascia grafts: mossy fiber synapses in the host neocortex // J. Neural Transpl. Plasticity. 1994. Vol. 5. № 3. P. 169-182.