

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Годовалова О.С., Савельев С.В., 2012
УДК 611.81+611.451+612.393]:611.9

**ЭКСПРЕССИЯ ГАМК ТРАНСПОРТЕРА (GAT-1)
И ГЛИАЛЬНОГО ФИБРИЛЛЯРНОГО КИСЛОГО БЕЛКА (GFAP)
В СОЗРЕВАЮЩЕМ НЕОКОРТЕКСЕ ЧЕЛОВЕКА**

О.С. Годовалова, С.В. Савельев

ФГБУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» РАМН, г. Москва

Изучено распределение ГАМК транспортера (GAT-1) в бороздах неокортекса человека с 14 недель пренатального до 4 лет постнатального периодов развития иммуногистохимическим методом. В пренатальном периоде обнаружены интенсивно GAT-1 маркированные области губ борозд неокортекса. Внутри борозд и на прямых участках коры GAT-1 маркирование ослабевает с разной степенью интенсивности на разных стадиях пренатального развития. После рождения губы и свободные участки коры окрашены равномерно, но сохраняют ослабление маркирования внутри борозд. В субвентрикулярной/вентрикулярной зоне с 26 по 33 неделю выявлена иннервация GAT-1 маркированными нервными окончаниями, которая запускает механизм дифференцировки астроцитов.

Ключевые слова: ГАМК, неокортекс, иммуногистохимия, головной мозг, неокортекс, дифференцировка астроцитов.

Изучение механизмов созревания синаптической активности в процессе развития мозга человека остается одной из важнейших проблем современной нейробиологии. Активность ГАМК, основного ингибирующего медиатора в мозге млекопитающих, регулируется транспортными белками, которые в пресинаптических терминалях и глиальных отростках завершают синаптическую передачу и предотвращают накопление медиатора в синаптической щели и его диффузию во внеклеточное пространство [2]. Существует 3 разновидности GAT (GABA transporter). GAT-3 свойственен исключительно глиальным клеткам. GAT-2 присутствует в эпендиме, сосудистых сплетениях и оболочках мозга. GAT-1 встречается в нейронах, но также может встречаться в глиальных отростках [4]. Доказано, что на ранних этапах развития мозга ГАМК опосредует преимущественно синаптическое возбуждение [3]. Также известно, что в клетках радиальной глии в

развивающемся мозге присутствуют GABA A рецепторы [5]. В связи с чем целью нашего исследования стало проследить взаимосвязь локализации GAT-1 и GFAP (Glial fibrillary acidic protein) с этапами развития неокортекса человека.

Материалы и методы

Работа проводилась на аутопсийном материале больших полушарий головного мозга 16 плодов человека от 14 до 40 нед. пренатального периода, одного ребенка 10 мес. после рождения, одного ребенка 4 лет и 2 взрослых. Материал фиксировали в 10 % формалине и в растворе Буэна. Проводили стандартную гистологическую заливку в парафин образцов медиальной стенки полушария затылочной доли, содержащих шпорную и теменно-затылочную борозды. Иммуногистохимическое маркирование осуществляли антителами Anti-GFAP Ab-1 mouse «Lab vision» и Anti-GAT-1 rabbit «Chemicon». В качестве визуализирующей системы ис-

пользовался набор UltraVision Plus Detection System «Lab vision». Оценивали окрашенные элементы на фотографиях препаратов в программе Image J, высчитывали коэффициент интенсивности окраски. Проверка статистической достоверности различий по F-критерию Фишера осуществлялась с помощью программы «Statistica 6.0».

Результаты и их обсуждение

С 14 по 21 нед. (3 случая) в стенке полушария головного мозга маркер GAT-1 выявляется преимущественно в I слое,

где отмечены GAT-1 позитивные волокна и тела клеток. Экспрессия маркера в II-VI слоях неокортекса значительно ниже ($p < 0,001$). Выявляются также очень редкие отдельные волокна в других зонах полушария, но в меньшем количестве, их число от 14 к 21 неделе несколько увеличивается. Краевой слой шпорной борозды окрашен интенсивней теменно-затылочной борозды ($p < 0,001$). В маркировании II-VI слоев неокортекса есть тенденция к более выраженной окраске в шпорной борозде, хотя для 16 нед. она не подтверждается (рис. 1А, Б).

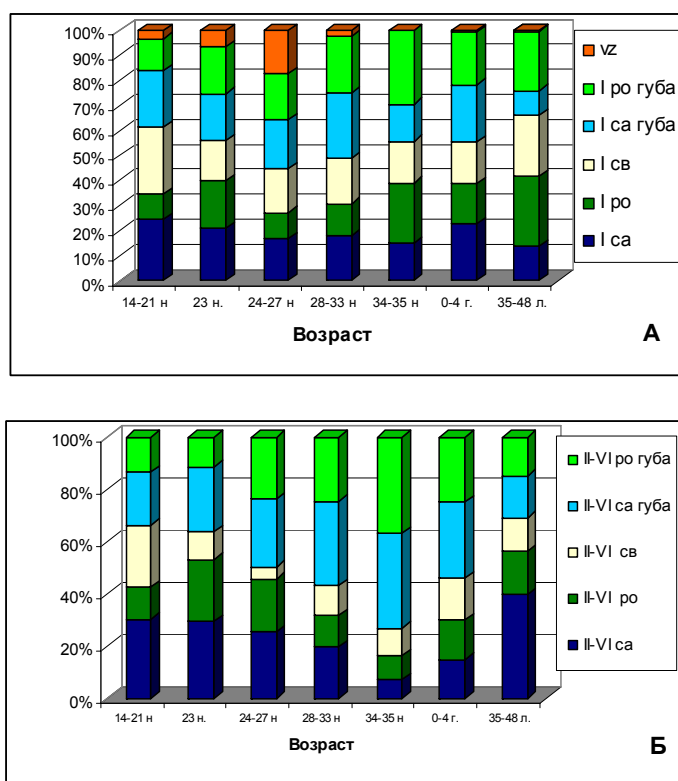


Рис. 1. Интенсивность GAT-1 маркирования I (А) и II-VI (Б) слоев неокортекса внутри борозд, в губах борозд и в свободной коре в различные возрастные периоды. Ca – шпорная борозда, po – теменно-затылочная борозда, vz – вендрикулярная зона, св – свободная кора

Отличий в распределении маркера в теменно-затылочной борозде и прямом участке неокортекса не выявлено. Экспрессия GAT-1 в вендрикулярной области очень слабая, интенсивность маркирова-

ния сохраняется на уровне значений II-VI слоев неокортекса или ниже (рис. 1Б). Согласно литературе, для крыс выявлены аналогичные тенденции появления маркера прежде всего в краевой зоне с выявле-

нием окраски в телах и отростках нервных и глиальных клеток, что говорит об активном синтезе этих белков на начальных этапах. С возрастом основным местом локализации GAT-1 становятся тонкие нервные и глиальные отростки [4]. Экспрессия GFAP в радиальной глии обнаружена только с 16 нед., что может говорить о начале неких морфогенетических событий. Тела клеток расположены в вентрикулярной зоне, а их отростки направлены радиально к краевой зоне. В области дна первичных бороздок GFAP позитивные волокна расходятся тангенциально, а не вертикально, как в областях стенки полушария, лишенных борозд. Под теменно-затылочной бороздой выраженность тангенциально расходящихся GFAP позитивных волокон меньше, чем под шпорной.

В 23 нед. (1 случай) наблюдается сглаживание шпорной борозды, что подтверждается проведенными ранее исследованиями [1]. На этой стадии GAT-1-маркирование краевого слоя превалирует, но достоверность подтверждается только для прямого участка неокортекса ($p < 0,001$). Распределение маркера в шпорной и теменно-затылочной бороздах более равномерно. Вентрикулярная область стенки полушария сохраняет низкий уровень маркирования, ниже значений II-VI слоев неокортекса (рис. 1Б). Количество GFAP позитивных клеток меньше относительно предыдущей стадии. Под теменно-затылочной бороздой GFAP позитивные волокна расходятся тангенциально, а под шпорной бороздой – радиально.

С 24 по 27 нед. (3 случая) шпорная борозда интактна [1]. Маркирование краевой зоны на этой стадии также хорошо выражено во всех исследуемых областях, но достоверные различия с другими слоями неокортекса выявляются только для прямого участка коры. На этой стадии наблюдаются GAT-1 позитивные нервные окончания по всей толщине корковой зоны шпорной борозды и в губах теменно-затылочной борозды. В губе теменно-затылочной борозды выявляется более интенсивное маркирование в сравнении с прилегающими областями – прямым уча-

стком неокортекса ($p < 0,01$) и стенкой теменно-затылочной борозды ($p < 0,05$). По мере углубления теменно-затылочной борозды наблюдается снижение интенсивности маркирования: сначала уменьшается окраска нижнего этажа коры, дольше всего сохраняются GAT-1 позитивные волокна в верхнем этаже коры, и у дна борозды слабое маркирование сохраняется лишь в I слое. Шпорная борозда сохраняет более равномерное маркирование, поэтому снижение интенсивности окраски не всегда статистически достоверно. В интермедиальной зоне содержатся мощные глиальные пучки, идущие радиально ко дну шпорной борозды. Пучки содержат большое количество GAT-1 позитивных волокон, которые либо идут в кору, либо иннервируют непосредственно пучки радиальной глии. На данной стадии интенсивность маркирования вентрикулярной зоны сопоставима с краевой зоной, чего не наблюдалось на предыдущих стадиях. Известно, что клетки радиальной глии содержат ГАМК А рецепторы, и способны воспринимать сигнал от GAT-1 позитивных терминалей. Есть данные, подтверждающие, что подобная деполаризация мембраны клеток-предшественников активирует кальциевые каналы плазмалеммы, повышая приток ионов Ca^{2+} , что в свою очередь ингибирует синтез ДНК и клеточную пролиферацию [5]. Таким образом, вероятно, что на этой стадии выявляются начальные этапы завершения пролиферации в вентрикулярной/субвентрикулярной области. Но не исключается, что иннервация GAT-1 позитивными нервными окончаниями глиальных пучков связана также с восстановлением складки шпорной борозды. В распределении GFAP на этой стадии не выявляется принципиальных изменений. Наблюдается большее количество GFAP позитивных клеток, в сравнении с предыдущей стадией, но сопоставимое с 20 недель развития. Направленность волокон под бороздами прежняя, они расходятся тангенциально, а вне борозд – радиально.

В 28-33 нед. (5 случаев) GAT-1 позитивные волокна выявляются во всей тол-

ще стенки полушария с акцентом на I слой неокортекса. В губах борозд неокортекса окрашивание особенно интенсивно. Выявляется четкий цитоархитектонически специфичный рисунок распределения GAT-1 позитивных волокон I слоя в 17 и 18 полях. Внутри борозд маркирование краевого слоя несколько снижается (рис. 1А), но не всегда статистически достоверно: в 28-30 недель более характерно снижение интенсивности краевого слоя в шпорной борозде, а в 31-33 недели – в теменно-затылочной. Маркирование II-VI слоев также снижается внутри борозд ($p < 0,05$). В 17 поле дольше сохраняет GAT-1 позитивные волокна нижний этаж

коры, а в 18 поле – верхний. Отметим, что на данной стадии снижение интенсивности маркирования прямых участков неокортекса выражено меньше, чем на предыдущей стадии (рис. 1Б). В вентрикулярной/субвентрикулярной зонах есть умеренное окрашивание, сопоставимое по интенсивности с интермедиальной зоной и с II-VI слоями коры (рис. 1Б). В распределении GFAP отмечены принципиальные изменения. GFAP позитивные клетки появляются в краевом слое коры. Много GFAP позитивных клеток, «втянувших» отростки, то есть преобразующихся из радиальноглиальных в астроцитарные (рис. 2).

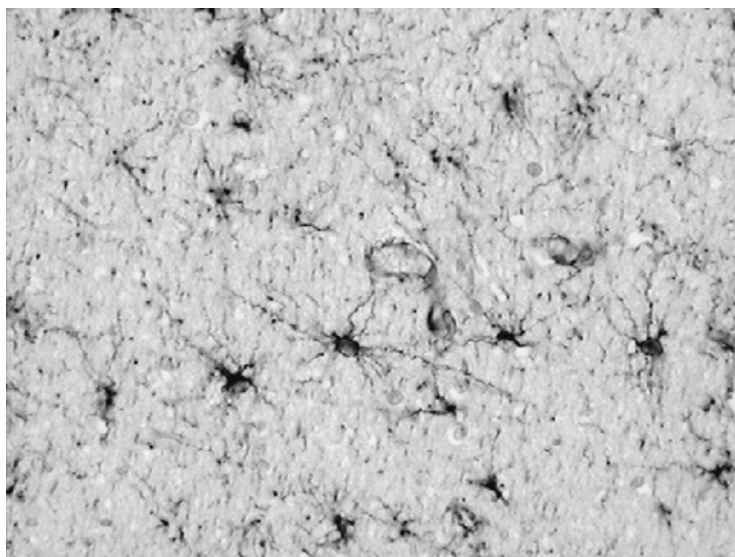


Рис. 2. GFAP маркированные астроциты в интермедиальной зоне стенки полушария головного мозга плода 28 нед, увеличение $\times 400$

Таким образом, только на этой стадии с запаздыванием примерно на 2 недели происходят морфологически видимые изменения радиальной глии, которые индуцировали GAT-1 содержащие волокна.

В 34-35 недель (2 случая) GAT-1 волокна обнаруживаются преимущественно в корковой зоне стенки полушария. Его максимальное количество обнаруживается в губах борозд и на свободной поверхности коры, и по мере углубления в борозды его количество уменьшается. При-

чем в дне шпорной борозды уменьшение интенсивности маркирования более заметное с высоким уровнем статистической достоверности для II-VI слоев (рис. 1Б), чего не наблюдалось на предыдущих стадиях. GAT-1 позитивные волокна в вентрикулярной зоне практически не выявляются. На прямых участках коры снижение интенсивности маркирования выражено слабо. На данной стадии GFAP позитивные клетки есть в вентрикулярной, субвентрикулярной, интермедиаль-

ной зонах, а также в краевом слое неокортекса, где их отростки формируют тонковолокнистую сеть в нижележащую кору.

У новорожденных (2 случая), ребенка 10 месяцев после рождения (1 случай) и в 4 года (1 случай) GAT-1 волокна обнаруживаются преимущественно в корковой зоне стенки полушария с преобладанием маркирования I слоя. В II-VI слоях его максимальное количество обнаруживается в губах борозд и на свободной поверхности коры, по мере углубления в борозды его количество уменьшается (рис. 1Б). На прямых участках коры снижение интенсивности маркирования практически не выражено, а в отдельных случаях отмечено её повышение. Маркирование вентрикулярной зоны очень низкое, ниже уровня II-VI слоев неокортекса. Распределение GFAP аналогично предыдущей стадии.

У взрослых людей GAT-1 волокна обнаруживаются также преимущественно в корковой зоне стенки полушария, с преобладанием маркирования I слоя. Но характер распределения маркера в коре принципиально иной. Не наблюдается ослабления маркирования внутри борозд. Напротив, в 17 поле выявляется усиление маркирования внутри шпорной борозды. Выявляются достоверные цитоархитектонические различия содержания маркера в 17 и 18 поле. В губах борозд окрашивание равномерное, не выявляется максимумов маркирования, как наблюдалось у исследуемых плодов и детей (рис. 1). Вентрикулярная зона практически не маркируется. GFAP маркирует астроциты, которые в большом количестве присутствуют в стенке полушария головного мозга. Отметим GFAP позитивные астроциты в краевом слое, от них в кору простирается обильная тонковолокнистая сеть отростков, которая достигает V слоя коры. Направленность отростков различается в различных цитоархитектонических полях. В 17 поле они преимущественно направлены радиально, а в прилежащих 18, 19 полях направление волокон тангенциально.

Выводы

Установлено, что антитела к ГАМК транспортеру GAT-1 выявляют асинхронное созревание неокортекса внутри борозд, в губах борозд, а также в свободных участках коры в рамках общего морфофункционального цитоархитектонического поля.

В вентрикулярной / субвентрикулярной зонах стенки полушария переднего мозга в 26-30 недель развития выявлено накопление тонких нервных волокон, содержащих GAT-1, блокирующих пролиферацию клеток-предшественниц, в результате чего с 28 недели выявляется значительное количество морфологически зрелых астроцитов.

Литература

1. Годовалова О.С. Определение возраста плодов человека по анатомическим характеристикам головного мозга / О.С. Годовалова, С.В. Савельев, Н.В. Бесова // Российский вестник акушера-гинеколога. – М.: Медиа сфера, 2008. – Т. 4. – С. 52-58.
2. Семьянов А.В. ГАМК-эргическое торможение в ЦНС: типы ГАМК рецепторов и механизмы тонического ГАМК-опосредованного тормозного действия / А.В. Семьянов // Нейрофизиология. – 2002. – Т. 34, №1. – С. 82-92.
3. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis / J.J. Lo Turco [et al.] // Neuron. – 1995. – Vol. 15. – P. 1287-1298.
4. Vitellaro-Zuccarello-L. Expression of GABA transporters, GAT-1 and GAT-3 in the cerebral cortex and thalamus of the rat during postnatal development / L. Vitellaro-Zuccarello, N. Calvaresi, S. Biasi // Cell Tissue Res. – 2003. – Vol. 313. – P. 245-257.
5. Wang D.D. / Defining the role of GABA in cortical development / D.D. Wang, A.R. Kriegstein // J Physiol. – 2009. – Vol. 587, №9. – P. 1873-1879.

EXPRESSION OF GABA TRANSPORTER (GAT-1) AND GLIAL FIDRILLAR ACIDIC PROTEIN (GFAP) IN MATURATED HUMAN NEOCORTEX

O.S. Godovalova, S.V. Savel'ev

GABA transporter (GAT-1) distribution in the human neocortex sulcuses (fetus from 14 weeks prenatal till four years old human) was researched by immunohistochemistry method. Intensive GAT-1 positive staining in the fissure lip from fetus neocortex was detected. GAT-1 positive staining decreased with different intensivity in the sulcuses and in the straight surfaces of neocortex, depended of fetus age. After birth the lips and the straight surfaces of neocortex was stained uniform, but was kept the decay of labeling in the fissures. From 26 till 33 prenatal weeks GAT-1 positive terminals innervated subventricular/ventricular zone, where they blocked cell progenitor proliferation, whereby triggered the astrocytic differentiation.

Key words: GABA, the neocortex, immunohistochemistry, brain, the neocortex, the differentiation of astrocytes.

С.В. Савельев – д.б.н., проф., зав. лабораторией развития нервной системы ФГБУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» РАМН.
E-mail: morfolhum@mail.ru.

О.С. Годовалова – науч. сотрудник лаборатории развития нервной системы ФГБУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» РАМН.
E-mail: morfolhum@mail.ru.