

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПЕРФТОРУГЛЕРОДНОЙ ЭМУЛЬСИИ НА КЛЕТКИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ КРЫС IN VIVO И IN VITRO

© 2000 г. В. Г. Цыганова, В. И. Попов, В. В. Рогачевский, Т. А. Заргарова,
Т. А. Турбов, член-корреспондент РАН Г. Р. Иваницкий

Поступило 22.05.2000 г.

Известно, что коммерческая газотранспортная перфторуглеродная эмульсия перфторан эффективно применяется у больных с различными видами заболеваний: с поражением сосудов нижних конечностей, при нарушении микроциркуляции тканевого газообмена и метаболизма, обусловленных сепсисом и перитонитом. Применяется также при черепно-мозговых травмах, нарушениях мозгового кровообращения и энцефалопатии разного генеза [1]. В данной работе мы исследовали изменение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) мозга крыс *in vivo* (*in situ*) и влияние перфторана на нервные клетки в условиях культуры ткани *in vitro*.

Известно, что гематоэнцефалический барьер - это морфофункциональная транспортная система между мозгом и кровью, которая обладает избирательной проницаемостью для различных химических соединений. Мы изучали проницаемость гематоэнцефалического барьера для перфторана в гиппокампе: области мозга, где ГЭБ имеет строение, сходное со многими другими структурами в отличие, например, от гипоталамо-гипофизарной области, где ГЭБ фенестрирован [2-4].

Исследования гиппокампа *in situ* проводили на взрослых крысах массой 250 г линии Sprague-Dowley (SD). В хвостовую вену в течение одной минуты вводился 1 мл перфторана, контрольные крысы получали 1 мл внутривенно 0.9%-ного раствора NaCl. Материал для морфологического исследования брали через 6 ч, 24 ч и 7 дней после введения. Сразу после декапитации иссекался гиппокамп. Кусочки гиппокампа толщиной 1-2 мм фиксировали имерсией в 2.5%-ном глутаровом альдегиде в течение 2-4 ч с последующей постфиксацией в 1%-ном OsO₄ в течение 2 ч. Оба фик-

сатора готовили на 0.1 М Na-какодилатном буфере (pH 7.2-7.4). Фиксированный материал обезживали в этаноле и 100%-ном ацетоне с последующим заключением срезов в смесь эпоксидных смол Эпон-812/Аралдит М по стандартной методике.

Исследования *in vitro* проводили на органотипических культурах гиппокампальных срезов, взятых от новорожденных крыс линии SD. Срезы гиппокампа помещали на покровные стекла, покрытые коллагеном, и культивировали в питательной среде, содержащей 35% эмбриональной телячьей сыворотки, 55% среды Игла MEM, 20% раствора Хенкса, 600 мг % глюкозы, 100 ед. пенициллина в инкубаторе в присутствии 5.2% CO₂ при 37°C. В опытах использовали культуры на 21-й день культивирования, когда между нейронами устанавливаются синаптические связи. При смене среды в опытные культуры был добавлен перфторан 10 мкл на 1 мл питательной среды, а в контрольные культуры добавлялась обычная среда. Через 48 ч культуры гиппокампальных срезов фиксировали, обезживали и заключали в эпоксидную смолу, подобно кусочкам гиппокампа, как отмечено выше.

Ультратонкие срезы готовили с помощью стеклянных ножей на ультрамикротоме LKB (Швеция). Срезы окрашивали в уранилацетате и цитрате свинца и исследовали в электронном микроскопе JEM 100B ("JEOL", Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Полутонкие срезы толщиной 1-2 мкм окрашивали толудиновым синим и исследовали в микроскопе Перавал-Интерфако ("Карл Цейс", Йена, Германия).

Результаты и обсуждение. Электронно-микроскопический анализ ультратонких срезов гиппокампа крыс показал, что ультраструктура нейронов всех полей гиппокампа как в контроле, так и в опыте практически не меняется (рис. 1г, 1д, 1е). Принципиальных отличий в морфологии синапсов нами также не выявлено (рис. 1ж, 1з). Детальный анализ астроглиальных клеток выявил появление в их цитоплазме специфических

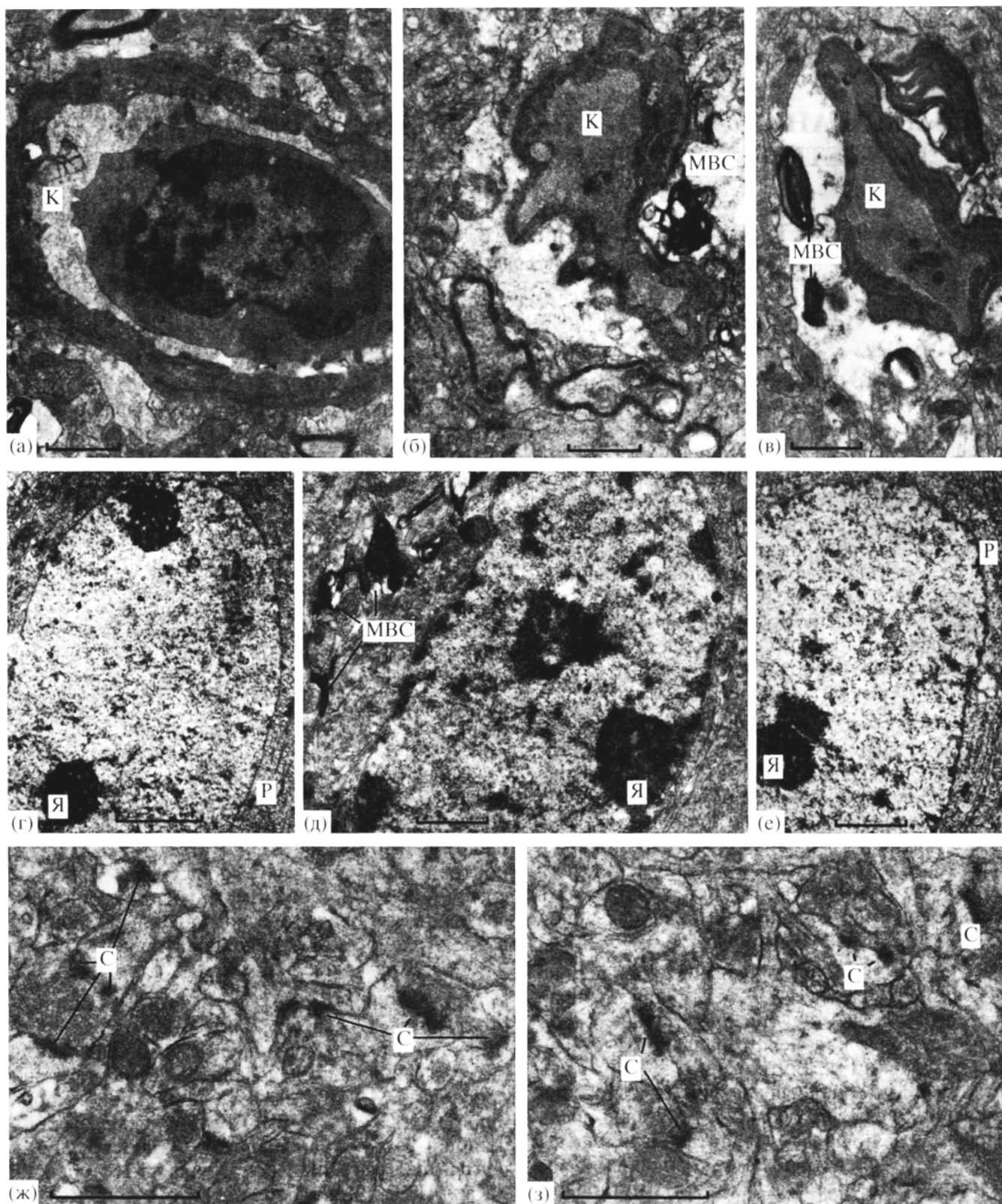


Рис. 1. Ультраструктура гиппокампа крыс: капилляры, окруженные глиальными клетками - а - контроль, б - опыт 6 ч, в - опыт 24 ч; отростки астроцитов вблизи нейронов - д - опыт 6 ч; ультраструктура нейронов - г - опыт 24 ч; е - контроль; синаптические контакты - ж - контроль, з - опыт 24 ч. К - просвет капилляров; МВС - мультивезикулярные структуры; Я - ядрышки; Р - эндоплазматический ретикулум; С - синаптические контакты. Шкала: а, б, в, д, ж, з - 1 мкм; г, е - 2 мкм.

вторичных лизосом, содержащих мультивезикулярные структуры (рис. 1б, 1в). Нами было обнаружено, что мультивезикулярные структуры присутствуют как в глиальных клетках, окружающих капилляры, так и в отростках астроцитов вблизи нейронов всех полей гиппокампа (рис. 1д), включая зубчатую фасцию. В самих эндотелиальных клетках, образующих капилляры, каких-либо изменений не было обнаружено (рис. 1в). Полученные результаты свидетельствуют о том, что эмульсии перфторана стимулируют эндцитоз астроглиальных клеток, которые выступают основным барьером для химических соединений, вводимых в кровеносное русло. Известно, что через 8 ч после инъекций эмульсии перфторана перфторуглероды в организме крысы не обнаруживаются [5]. Наши результаты свидетельствуют о том, что в течение первых 24 ч после инъекций перфторана в кровеносное русло между нейронами различных полей гиппокампа обнаруживаются астроциты, содержащие различные по числу и размерам вторичные лизосомы с мультивезикулярными структурами (рис. 1д). Подобные мультивезикулярные структуры обнаруживаются в течение первых 24 ч в глиальных клетках, окружающих капилляры. Мультивезикулярные структуры выявляются и в отсутствие перфторана, в частности после инъекций в кровеносное русло стандартного физраствора. Во всех гиппокампальных полях обнаруживались отростки астроцитов, содержащие подобные мультивезикулярные структуры (тельца). Вместе с тем, каких-либо нарушений или изменений ультраструктуры цитоплазматических органелл в нейронах не было выявлено. Следовательно, введение как эмульсии перфторана, так и стандартного физраствора при функционирующем ГЭБ стимулирует лишь лизосомальную активность астроглиальных клеток и существенно не влияет на ультраструктуру самих нейронов и синапсов (рис. 1б-1з).

При применении перфторана при острой черепно-мозговой травме, когда нарушен ГЭБ, перфторуглерод проникает не только в травмированную область мозга, но и в здоровую его ткань. Представляло интерес посмотреть, как отвечают на это воздействие нормальные дифференцированные клетки: нейроны и астроглия. Ответить на этот вопрос позволяет использование органотипической культуры нервной ткани. В подобного рода исследованиях широко используются органотипические культуры гиппокампа, который является наиболее изученной структурой мозга и содержит типичные для ЦНС пирамидные нейроны. Известно, что в органотипических культурах гиппокампа нервные и астроглиальные клетки имеют характерное для них строение и способны морфологически и функционально развиваться по нормальному пути, свойственному соответствующим тканям *in situ*, включая слоистую струк-

туру гиппокампальных полей, формирование синаптических контактов, миелинизацию аксонов, формирование электрической активности нейронов [6]. В органотипической культуре практически как нейроны, так и астроглиальные клетки непосредственно контактируют со всеми соединениями, внесенными в культуральную среду, что делает такие культуры крайне привлекательными для изучения влияния различных соединений на дифференцировку нейронов ЦНС. Кроме того, представлялось важным на электронно-микроскопическом уровне выяснить возможность захвата частиц перфторана самими нейронами в отсутствие ГЭБ на примере дифференцированных органотипических культур гиппокампа. Светомикроскопический анализ как контрольных, так и обработанных перфтораном органотипических культур не выявил существенных различий как в структуре полей CA1, CA2, CA3, так и в зубчатой фасции. Общая морфология нейронов и астроглиальных клеток также не изменялась. Но нами были обнаружены как в астроглиальных клетках, так и в нейронах всех полей гиппокампа специфические вторичные лизосомы, содержащие перфторуглеродные частицы эмульсии перфторана (рис. 2а, 2б, 2е). Такие лизосомы мы называли "перфторосомами". Вместе с этим каких-либо различий в ультраструктуре цитоплазматических органелл (аппарат Гольджи, распределение свободных и мембрансвязанных полирибосом, митохондрий, эндоплазматического ретикулума) как нейронов, так и астроглиальных клеток за исключением обнаруженных в цитоплазме "перфторосом" не было выявлено (рис. 2в). "Перфторосомы" ранее детально были исследованы в клетках ретикуло-эндотелиальной системы крыс после введения различных перфторуглеродсодержащих эмульсий [5]. Присутствие в перфторосомах перфторуглеродов было доказано в свое время методами газожидкостной хроматографии [5]. В отличие от нейронов астроциты содержали относительно большое число "перфторосом" (рис. 2а). Очевидно, что высокое содержание перфторосом в астроглиальных клетках связано с их высокой макрофагальной активностью, благодаря чему, в частности, они и обеспечивают ГЭБ в целостном мозге. Существенно, что присутствие перфторосом не влияло ни на другие цитоплазматические органеллы, ни на ультраструктуру ядер. После инъекций физраствора и эмульсий перфторана ядра содержали типичные активные ядрышки, в которых превалировал гранулярный компонент, указывающий на синтетическую активность рибосомальных РНК.

Вопрос о происхождении перфторосом в культуральных нейронах остается открытым, так как не ясно: захватываются частицы перфторана самими нейронами или это является "нейротрофической" функцией астроглии, способных "переда-

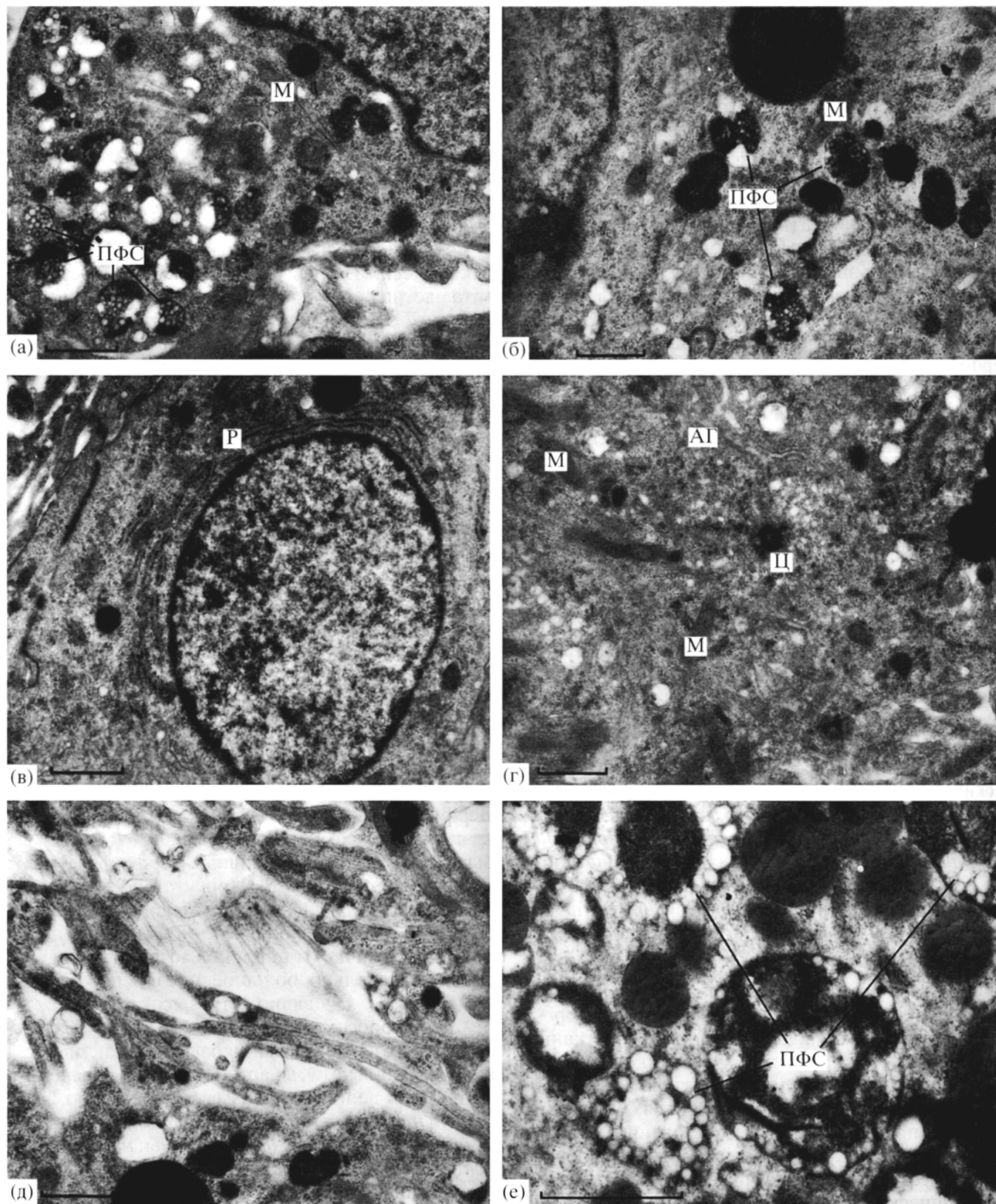


Рис. 2. Ультраструктура органотипической культуры гиппокампа крыс: перфторосомы а - в астроглиальной клетке, б - в нейроне; в, г - ультраструктура нейронов в контроле; д - сеть нейритов и филоподий в опыте; е - перфторосомы при большем увеличении. ПФС - перфторосомы; М - митохондрии; Ц - центриоль; АГ - аппарат Гольджи; Р - эндоплазматический ретикулум. Шкала: а-е - 1 мкм.

вать" частицы перфторуглеродных эмульсий непосредственно нейронам. Этот вопрос требует дальнейшего изучения. Полученные нами данные прямо показывают, что как органотипические культуры гиппокампа из-за их относительной легкости получения, так и использованные перфторуглеродсодержащие эмульсии могут представлять удобные модели для изучения ГЭБ и взаимоотношений между астроглиальными клетками и нейронами ЦНС.

Таким образом, полученные нами данные на примере гиппокампа свидетельствуют о том, что при инъекциях эмульсий перфторана в кровеносное русло крыс существенно не изменяется морфология и ультраструктура нейронов ЦНС при функционирующем ГЭБ - *эмульгированные перфторуглероды не проникают в нейроны мозга*. На примере органотипической культуры гиппокампа новорожденных крыс в отсутствие ГЭБ нами показана возможность захвата частиц перфторуглеродных эмульсий. Последнее надо учитывать в клинике, когда используется перфторан для паци-

ентов с нарушенной целостностью кровоснабжающих структур мозга и с нарушениями ГЭБ.

Работа выполнена при поддержке гранта ведущих научных школ (№ 00-15-97985) и гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№98-04-48175).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Иваницкий Г.Р., Воробьев С.И.* // Вестн. РАН. 1997. Т. 67. №11. С. 998-1013.
2. *Fenstermacher J., Gross P., Sposito N. et al.* // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1988. V. 529. P. 21-30.
3. *Бредбери М.* Концепция гематоэнцефалического барьера. М.: Мир, 1983.
4. *Беляева И.А., Гусев Е.И., Чехонин В.П. и др.* // Журн. невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 1999. Т. 99. № 8. С. 57-62.
5. *Склифас А.Н., Шибяев Н.В. и др.* В сб.: Медико-биологические аспекты применения эмульсий перфторуглеродов. Пушино, 1983. С. 90-95.
6. *Popov V.I., Tsyganova V.G.* // Neurosci. Lett. 1996. V. 203. P. 135-138.