

Zawartość żelaza w różnych typach oligodendrogleju w korze czołowej mózgowia szczurów

AGATA WAWRZYNIAK-GACEK, JAROSŁAW PAWELEC*, REGINA CYBULSKA

Zakład Histologii i Embriologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin

*Pracownia Mikroskopii Elektronowej Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Wawrzyniak-Gacek A., Pawelec J., Cybulska R.

Iron content in various types of oligodendroglia in the cortex frontalis of rat's brains

Summary

The aim of the study was to trace the content and location of iron in three types of oligodendrocytes in the cortex frontalis of the brain of thirty-day old Wistar rats. The assessment was achieved in a LEO OMEGA 912 AB electron microscope, using the ESI spectroscopy method of mapping iron (Electron Spectroscopic Imaging). Differentiated iron content in the three types of examined cells was indicated. The greatest accumulation of iron was found in dark oligodendrocytes, a smaller accumulation in medium oligodendrocytes and the smallest in light oligodendrocytes. The article discusses the dependency between cytoplasm density and iron content in investigated types of oligodendroglia.

Keywords: oligodendrocytes, cortex frontalis, rat

Oligodendrocyty stanowią najliczniejszą populację komórek glejowych ośrodkowego układu nerwowego (OUN) ssaków i są głównymi komórkami zawierającymi żelazo. Histochemicznie wykazano podczas rozwoju OUN, że najpierw obecność żelaza wykazują komórki mikrogleju, a następnie pojawia się ono w oligodendrocytach i nie jest już obecne w tych komórkach (11, 13).

Zawartość żelaza w komórkach regulowana jest przez interakcje transferyny – białka transportującego ten pierwiastek – z receptorami transferyny na powierzchni komórki (17). Żelazo, które nie jest bezpośrednio zużywane przez komórkę jest magazynowane w ferrytynie – białku przechowującym żelazo. Oligodendrocyty zawierają ferrytynę, transferynę i żelazo (12).

W mózgowiu szczura bezpośrednio po urodzeniu poziom żelaza, transferyny i ferrytyny jest stosunkowo wysoki. W miarę wzrostu poszczególnych obszarów mózgowia do około 3. tygodnia życia zawartość żelaza spada w różnym stopniu w zależności od zapotrzebowania tego pierwiastka dla mitochondriogenezy, mielinizacji i syntezy neuroprzekaźników, po czym ustala się na względnie stałym poziomie (22). U dorosłych osobników zawartość żelaza jest jednak zróżnicowana w poszczególnych obszarach w zależności od specyfiki danego obszaru (15). Wyższą zawartość żelaza przejawiają obszary związane z funkcją motoryczną lub syntezą niektórych neuroprzekaźników (8, 9). W obszarach istoty białej mózgowia oligoden-

drocyty wykazują lokalizację przy naczyniach krwionośnych i włóknach nerwowych (4, 25), a w obszarach istoty szarej lokalizują się przy neuronach i również przy naczyniach krwionośnych oraz włóknach nerwowych (18, 24).

Badania tych komórek glejowych w mikroskopie elektronowym ujawniły, iż zarówno w obszarach istoty białej, jak i szarej OUN oligodendrocyty różnicowane są na 3 typy różniące się gęstością cytoplazmy. Obserwacje te dały możliwość wyodrębnienia oligodendrocytów o jasnej, średniej i ciemnej cytoplazmie. Umożliwiły także wykazanie wzrostu, wraz z wiekiem osobnika, populacji komórek o średniej i stopniowo o ciemnej cytoplazmie (19, 20, 24, 25). Pilotowe badania własne (26) zawartości żelaza w poszczególnych typach oligodendrocytów w obszarach istoty białej ciała modzelowatego i torebki wewnętrznej szczurów wykazały, że największa ilość tego pierwiastka występowała w oligodendrocytach ciemnych.

Celem badań było określenie zawartości i rozmieszczenia żelaza w 3 typach oligodendrocytów istoty szarej kory mózgowia 30-dniowych szczurów. Badania te są próbą oceny związku między zawartością żelaza i gęstością cytoplazmy.

Materiał i metody

Do badań przeznaczono 5 samców szczurów Wistar w wieku 30 dni. W narkozie, przy użyciu ketaminy (30 mg/kg m.c.), dokonano u nich perfuzji dosercowej, najpierw 0,9% roztworem NaCl, po czym kontynuowano perfuzję

roztworem 1% paraformaldehydu i 1% aldehydu glutarowego w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,4. Następnie z mózgowia szczurów pobrano próbki obszaru kory czołowej (*cortex frontalis*), które utrwalano w 2,5% roztworze aldehydu glutarowego w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,4. Utrwalone próbki przygotowano do obserwacji w mikroskopie elektronowym wg standardowej metody Sato (23), które skrawano do badania spektroskopowego na grubość 40-60 μm . Tak sporządzone skrawki obserwowano w mikroskopie elektronowym LEO OMEGA 912 AB. Uzyskane obrazy stanowiły podstawę do mapowania żelaza metodą ESI (Elektron Spectroscopic Imaging). Obrazy w formacie 512 \times 512 pixeli posłużyły jako podkład do rejestrowania żelaza w wysokim kontraście (High Contrast Image) przy użyciu filtra energii w widmie elektronów nie-

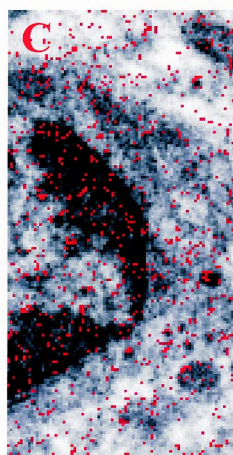
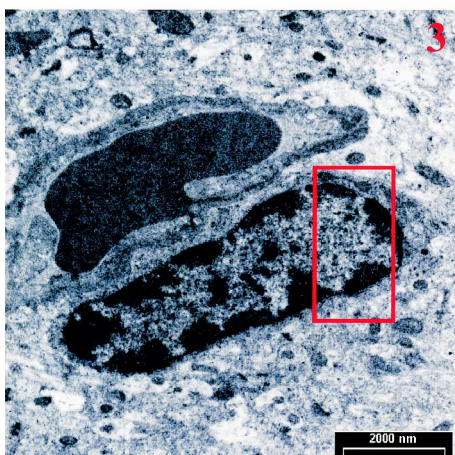
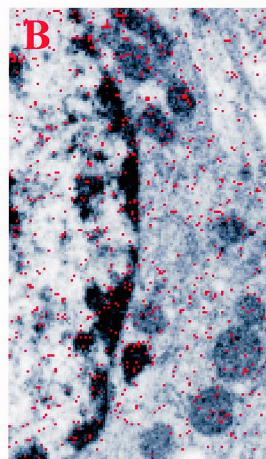
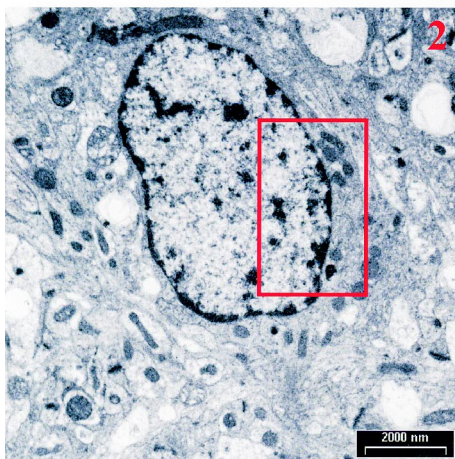
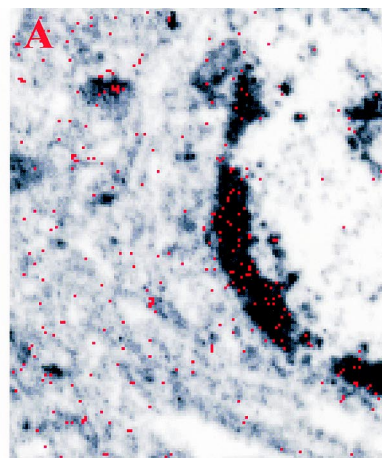
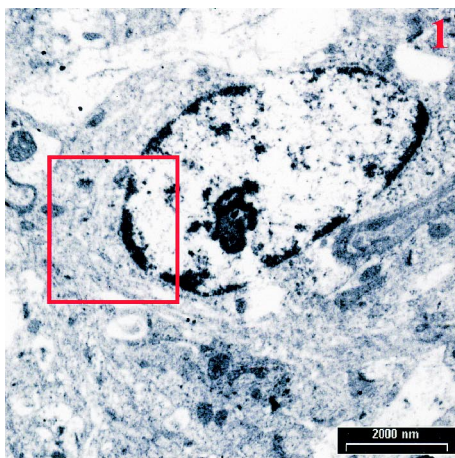
elastycznie rozproszonych o dE 250 eV i w widmie dla żelaza (Fe) o dE 719 eV zgodnie z procedurą opisaną przez Reimera (21).

Wyniki i omówienie

W korze czołowej badanych szczurów obserwowano 3 typy oligodendrocytów. Najmniej liczną populację stanowiły komórki o jasnej cytoplazmie (ryc. 1), a oligodendrocyty o średniej (ryc. 2) i ciemnej cytoplazmie (ryc. 3) pozostawały w stosunku do siebie w podobnych proporcjach. Towarzyszyły one neuronom, naczyniom krwionośnym oraz włóknom nerwowym w głębszych warstwach kory. Wszystkie powyższe typy komórek oligodendrogleju wykazywały zawartość żelaza w zróżnicowanym stopniu ujawnionym metodą spektroskopową (ESI). Najmniejsze nagromadzenie tego pierwiastka przejawiały oligodendrocyty o jasnej (ryc. 1A), większe o średniej (ryc. 2A) i największe o ciemnej cytoplazmie (ryc. 3A). W obrębie komórek lokalizacja żelaza związana była z chromatyną i otoczką jądrową, mitochondriami, ergastoplazmą oraz aparatem Golgiego.

Badania innych autorów (2, 22) prowadzone głównie metodami histochemicznymi i immunocytochemicznymi dowiodły, że głównymi komórkami w OUN ssaków zawierającymi żelazo oraz białka z nim związane (ferrytyna i transferyna) są oligodendrocyty. Metody te nie dawały jednak możliwości ujawnienia różnic w zawartości żelaza w poszczególnych typach tych komórek. Zastosowana w niniejszych badaniach metoda spektroskopowa (ESI) umożliwiła nie tylko prześledzenie różnej zawartości żelaza w poszczególnych typach tego gleju, ale również jego wewnątrzkomórkową lokalizację. Uzyskane wyniki sugerują istnienie związku między gęstością cytoplazmy a zawartością żelaza w badanych komórkach.

Białkiem magazynującym żelazo w oligodendrocytach jest ferrytyna wiążąca około 1/3 całkowitej jego zawartości w OUN ssaków (7, 22). Ko-



Ryc. 1. Elektronogram oligodendrocytu o jasnej cytoplazmie z obszaru kory czołowej (*cortex frontalis*)

Ryc. 1A. Fragment oligodendrocytu o jasnej cytoplazmie (obszar zaznaczony prostokątem na ryc. 1), czerwone punkty (pixele) ilustrują lokalizację i zawartość żelaza

Ryc. 2. Elektronogram oligodendrocytu o średniej cytoplazmie z obszaru kory czołowej (*cortex frontalis*)

Ryc. 2A. Fragment oligodendrocytu o średniej cytoplazmie (obszar zaznaczony prostokątem na ryc. 2), czerwone punkty (pixele) ilustrują lokalizację i zawartość żelaza

Ryc. 3. Elektronogram oligodendrocytu o ciemnej cytoplazmie z obszaru kory czołowej (*cortex frontalis*)

Ryc. 3A. Fragment oligodendrocytu o ciemnej cytoplazmie (obszar zaznaczony prostokątem na ryc. 3), czerwone punkty (pixele) ilustrują lokalizację i zawartość żelaza

mórki te zawierają ferrytynę w postaci dwóch łańcuchów H i L. Ciężki łańcuch H włączony jest w szybki metabolizm żelaza, natomiast lekki łańcuch L związany jest z dłuższym składowaniem tego pierwiastka (13, 16). Obserwowana przez nas, zróżnicowana zawartość żelaza w poszczególnych typach oligodendrocytów być może pozostaje w związku z różnym jego metabolizmem.

Żelazo jest niezbędne do prawidłowej czynności OUN, a jego niedobór lub nadmiar powoduje zaburzenia neurologiczne. Jego rola związana jest z procesami oddychania komórkowego, wspomaganiami reakcji, w których występuje transport elektronów. Warunkuje ono aktywność cytochromu, oksydazy cytochromowej, katalazy i peroksydazy. Włączone jest w biosyntezę kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA), w prawidłowe przewodzenie impulsów nerwowych, a także w zachowanie integralności bariery krew-mózg (1, 3, 5, 6, 10, 11). Wewnątrzkomórkowa lokalizacja badanego pierwiastka ujawniona w niniejszych obserwacjach wydaje się pozostawać w związku z przypisywaną mu rolą. Według niektórych autorów (14), żelazo obecne w mitochondriach może mieć związek z mitochondrialną ferrytyną, której domniemaną funkcją jest gromadzenie nadmiaru wolnego żelaza i ograniczaniu jego szkodliwego wpływu na komórkę.

Uzyskane wyniki stanowią podstawę do dalszych badań zawartości tego pierwiastka w innych obszarach OUN ssaków zróżnicowanych pod względem wieku.

Piśmiennictwo

- Bali P. K., Zak O., Aisen P.: A new role for the transferrin receptor in the release of iron from transferrin. *Biochem.* 1991, 30, 324-328.
- Benkovic S. A., Connor J. R.: Ferritin, transferrin and iron in selected regions of the adult and aged rat brain. *J. Comp. Neurology* 1993, 338, 97-113.
- Bishop G. M., Robinson S. R., Liu Q., Perry G., Atwood C. S., Smith M. A.: Iron: a pathological mediator of Alzheimer's disease? *Dev. Neurosci.* 2002, 24, 184-187.
- Bjartmar C.: Oligodendroglial sheath in developing rat ventral funiculus and corpus callosum. *J. Neurosci.* 1996, 2, 85-88.
- Burdo J. R., Antonetti D. A., Wolpert E. B., Connor J. R.: Mechanisms and regulation of transferrin and iron transport in a model blood-brain barrier system. *Neurosci.* 2003, 121, 883-890.
- Burdo J. R., Connor J. R.: Brain iron uptake and homeostatic mechanisms. *Biometals* 2003, 16, 63-75.
- Connor J. R., Menzies S. L., St Martin S. M., Mufson E. J.: Cellular distribution of transferrin, ferritin and iron in normal and aged human brains. *J. Neurosci. Res.* 1990, 27, 595-611.
- Connor J. R., Benkovic S. A.: Iron regulation in the brain: Histochemical, biochemical and molecular considerations. *Ann. Neurol.* 1992, 32, 851-861.
- Connor J. R., Menzies S. L., St. Martin S. M., Mufson E. J.: A histochemical study of iron, transferrin and ferritin in Alzheimer's diseased brains. *J. Neurosci. Res.* 1992, 31, 75-83.
- Connor J. R., Boeshore K. L., Benkovic S. A.: Isoforms of ferritin have a specific cellular distribution in the brain. *J. Neurol. Sci.* 1994, 37, 461-465.
- Connor J. R., Menzies S. L.: Cellular management of iron in the brain. *J. Neurol. Sci.* 1995, 134, 33-44.
- Connor J. R., Menzies S. L.: Relationship of iron to oligodendrocytes and myelination. *Glia* 1996, 17, 83-93.
- Connor J. R., Menzies S. L., Burdo J. R., Boyer P. J.: Iron and iron management proteins in neurobiology. *Pediatr. Neurol.* 2001, 25, 118-129.
- Drysdale J., Arosio P., Invernizzi R., Cazzola M., Völz A., Corsi B., Biasiotto G., Levi S.: Mitochondrial ferritin: a new player in iron metabolism. *Blood Cells, Molecules, Diseases* 2002, 29, 376-383.
- Dworak A. J., Schon E. A., Herbert J.: Nonidentical distribution of transferrin and iron in the rat brain. *Neurosci.* 1988, 27, 333-335.
- Han J., Day J. R., Connor J. R., Beard J. L.: H and L ferritin subunit mRNA expression differs in brains of control and iron-deficient rats. *J. Nutr.* 2002, 132, 2769-2774.
- Huebers H. A., Finch C. A.: The physiology of transferrin and transferrin receptors. *Physiol. Rev.* 1987, 67, 520-539.
- LeVine S. M., Torres M. V.: Satellite oligodendrocytes and myelin are displaced in the cortex of the reeler mouse. *Brain Res.* 1993, 75, 279-284.
- Mori S., Leblond C. P.: Electron microscopic identification of three classes of oligodendrocytes and a preliminary study of their proliferative activity in the corpus callosum of young rats. *J. Comp. Neurol.* 1970, 139, 1-30.
- Mori S.: Light and electron microscopic features and frequencies of the glial cells present in the cerebral cortex of the rat brain. *Arch. Histol. Jpn.* 1972, 34, 231-244.
- Reimer L.: Transmission electron microscopy. Physics of image formation and microanalysis. Springer Series in Optical Sciences. Berlin, Heidelberg, New York 1997, 36, 452-454.
- Roskams A. J. I., Connor J. R.: Iron, transferrin and ferritin in the rat brain during development and aging. *J. Neurochem.* 1994, 63, 709-716.
- Sato T.: A modified method for lead staining of thin sections. *J. Electronmicroscop.* 1968, 17, 158-159.
- Wawrzyniak-Gacek A.: Distribution of various types of oligodendrocytes and cellular localisation of iron in the frontal cortex of the adult rat. *Folia Morphol.* 2002, 61, 115-121.
- Wawrzyniak-Gacek A.: Location of various types of oligodendroglia and iron contained in it within the area of corpus callosum and capsula interna. *Annales UMCS* 2003, LVIII, 1-14.
- Wawrzyniak-Gacek A., Pawelec J., Cybulska R.: Badanie zawartości żelaza w różnych typach oligodendroglia w obszarze spoidła wielkiego (corpus callosum) i torebki wewnętrznej (capsula interna) mózgowia 30-dniowych szczurów. *Medycyna Wet.* 2005, 61 (supl.), 31.

Adres autora: dr Agata Wawrzyniak-Gacek, ul. Dubois 14/1, 20-061 Lublin