

О.В.Кирик¹, Д.А.Суфиева¹, А.В.Назаренкова¹, Д.Э.Коржевский^{1,2}

БЕЛОК КЛЕТОЧНЫХ КОНТАКТОВ БЕТА-КАТЕНИН В КЛЕТКАХ ЭПЕНДИМЫ И ЭПИТЕЛИЯ СОСУДИСТОГО СПЛЕТЕНИЯ БОКОВЫХ ЖЕЛУДОЧКОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА

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, Санкт-Петербург; ² кафедра фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий (зав. — проф. А.Н.Суворов), Санкт-Петербургский государственный университет

Целью настоящего исследования было изучение характера распределения белка клеточных контактов бета-катенина в сосудистом сплетении и эпендиме боковых желудочков головного мозга. Исследование проведено на фронтальных срезах головного мозга крыс линии Вистар (n=10) с использованием поликлональных антител к бета-катенину. Полученные препараты анализировали с помощью микроскопии в проходящем свете и конфокальной лазерной микроскопии. Для изучения распределения бета-катенина в различных проекциях была проведена трехмерная реконструкция. В результате исследования был выявлен различный характер распределения данного белка в эпендиме и сосудистом сплетении. В отличие от эпендимы, в клетках сосудистого сплетения бета-катенин распределен так же, как и в однослойных эпителиальных тканях (на базальной и латеральной границах клеток). Это может свидетельствовать о различной тканевой принадлежности эпендимы и эпителия сосудистого сплетения, несмотря на их общее происхождение.

Ключевые слова: *головной мозг, эпендима, сосудистое сплетение, бета-катенин, конфокальная микроскопия*

Клеточные контакты являются важным компонентом сложного надмембранного и подмембранного комплекса структур, который позволяет организовать группы клеток в пласты. Это характерно, в первую очередь, для эпителиальных тканей. В формировании различных типов контактов принимают участие определенные группы белков. Бета-катенин входит в состав комплекса, необходимого для скрепления мембран соседних клеток и стабилизации их цитоскелета с образованием единой жесткой системы [9]. В головном мозгу пласты образованы клетками эпендимы, выстилающими желудочки головного мозга, и клетками, покрывающими сосудистое сплетение. Вопрос о тканевой принадлежности этих клеток является одним из дискуссионных. Несмотря на то, что они развиваются из одного эмбрионального зачатка (нервной трубки), существует мнение, что клетки сосудистого сплетения истинно эпителиальные [2], в отличие от клеток эпендимы желудочков головного мозга и центрального канала спинного мозга. В отечественной гистологической терминологии клетки, покрывающие сосудистое сплетение, именуется эпендимоцитами (эпендимными клетками) сосудистого сплетения [4]. В зарубеж-

ной литературе чаще эти клетки называют эпителием сосудистого сплетения [6].

В настоящее время в работах, посвященных постнатальному нейрогенезу [5], реакция на бета-катенин нередко используется для выявления границ клеток эпендимы, но фундаментальные гистологические исследования тканевой организации циркумвентрикулярных органов головного мозга с использованием этого маркера ранее не проводились.

В связи с этим целью настоящего исследования было изучение характера распределения бета-катенина в сосудистом сплетении и эпендиме боковых желудочков головного мозга.

Материал и методы. Исследовали головной мозг взрослых, половозрелых крыс линии Вистар (n=10). При содержании и умерщвлении животных руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.). Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [3]. Обезвоженные объекты заливали в парафин по общепринятой методике. Морфологическому исследованию подвергали фронтальные срезы конечного мозга. Для иммуноцитохимического выявления бета-катенина были использованы поликлональные кроличьи антитела (Abscam, Великобритания) в разведении 1:100

Сведения об авторах:

Кирик Ольга Викторовна, Суфиева Дина Азатовна (e-mail: rondo-13@mail.ru), Назаренкова Анна Владимировна (e-mail: phucus@mail.ru), Коржевский Дмитрий Эдуардович (e-mail: iemtmorphol@yandex.ru), лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины, 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12

и набор Reveal Polyvalent HRP DAB Detections System (SpringBioscience, США). Визуализацию продукта иммуногистохимической реакции проводили при помощи хромогена диаминобензидина (DAB+, Дако, Дания). После проведения реакции часть срезов докрашивали квасцовым гематоксилином. Фотосъемку проводили с помощью микроскопа Leica DM750 и фотокамеры ICC50 (Leica, Германия). Для флуоресцентного выявления бета-катенина были использованы биотинилированные вторичные антитела из набора Cell and Tissue Staining Kit (rabbit Kit) HRP-DAB System («R&D»Systems, США) и конъюгаты стрептавидина с карбоцианином (Cy2, Jackson ImmunoResearch, США) или с индокарбоцианином (Cy3, Invitrogen, США). Ядра клеток докрашивали флуоресцентным красителем TO-PRO3 (1:300) из набора SelectFX (Invitrogen, США). Обработку полученных изображений и трехмерную реконструкцию проводили с применением конфокального микроскопа LSM710 (лазеры с длиной волны 488 и 633 нм) и компьютерной программы ZEN 2011 (Carl Zeiss, Германия).

Исследование выполнено с использованием оборудования, предоставленного в соответствии с программой «Протеом человека» РАН.

Результаты исследования. После проведения иммуногистохимической реакции на бета-катенин положительная реакция различной степени интенсивности была обнаружена в клетках эндими, сосудистого сплетения, отростках и телах клеток субвентрикулярной зоны и рострального миграционного потока, эндотелии кровеносных сосудов, клетках мягкой оболочки мозга, нейропиле стриатума и неокортексе. Наиболее интенсивная реакция была в эндиме и сосудистом сплетении (*рис. 1*).

В эндиме наблюдалась ячеистая структура, которая соответствовала зоне клеточных границ с усилением интенсивности в апикальной области эндимоцитов. В перинуклеарной цитоплазме и ядре последних бета-катенин не определялся (см. *рис. 1, а*). В эпителиоцитах сосудистого сплетения продукта иммуногистохимической реакции было больше, чем в эндиме. Он располагался вблизи предполагаемых границ латеральных и базальных поверхностей клеток и отсутствовал со стороны апикальной поверхности (см. *рис. 1, б*). В перинуклеарной цитоплазме и в ядре клеток реакция также отсутствовала. В стромальном компоненте сосудистого сплетения бета-катенин не определялся.

Использование конфокальной лазерной микроскопии и построение трехмерных реконструкций позволяют изучать исследуемые объекты в различных проекциях. Установлено, что значительное (почти все) количество бета-катенина располагалось рядом с межклеточной границей в верхней трети латеральной поверхности эндимоцитов (*рис. 2, а, б*). Он распределялся по границе клеток в виде опоясывающего кольца и, поскольку клетки соединились друг с другом, то

общая картина напоминала пчелиные соты при отсутствии отчетливой гексагональной организации (см. *рис. 2, а*). Со стороны желудочка на поверхности эндими обнаруживались области концентрации бета-катенина вокруг небольших иммунонегативных зон (см. *рис. 2, а*). В цитоплазме эндимоцитов и субэндимном слое присутствовал мелкозернистый продукт иммуногистохимической реакции.

В клетках эпителия сосудистого сплетения при больших увеличениях конфокального лазерного микроскопа, так же как и при световой микроскопии, было видно, что реакция на бета-катенин локализуется на границе между клетками и вблизи границы клеток с базальной мембраной (см. *рис. 2, в*). Высокое разрешение изображения, которое можно получить с помощью конфокального лазерного микроскопа при толщине оптического среза 0,2 мкм, позволяет наблюдать неравномерное распределение бета-катенина в базальной части, которое занимает широкую зону (до 1–2 мкм) и иногда напоминает картину, характерную для базальной складчатости.

Обсуждение полученных данных. В результате настоящего исследования было обнаружено, что характер распределения бета-катенина в эндиме и сосудистом сплетении различен при сопоставимой интенсивности реакции в обеих структурах. В эндимоцитах продукт реакции обнаруживается в области апикальной части их латеральной поверхности, что согласуется с данными о локализации опоясывающих десмосом (zonulae adherentes) в эпителиальных тканях [8], которые играют важную роль в определении полярности клеток. Характер распределения бета-катенина кажется различным при изучении объекта в разных плоскостях. При исследовании бета-катенина в эндиме на фронтальных срезах с помощью микроскопии в проходящем свете видно, что продукт реакции занимает всего лишь небольшую зону у апикальной поверхности клетки. Однако при наблюдении эндими со стороны поверхности желудочков видно, что продукт реакции распределен по всему периметру клеток, поэтому их границы хорошо прослеживаются. В ряде работ, посвященных изучению нейральных стволовых клеток в составе эндими, бета-катенин используется для определения клеточных границ [5]. Вследствие сказанного выше возникает вопрос о том, подходит ли реакция на бета-катенин для определения границ клеток эндими. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что не во всех плоскостях можно четко визуализировать границы клеток. Если при изготовлении препарата фронтальный срез про-

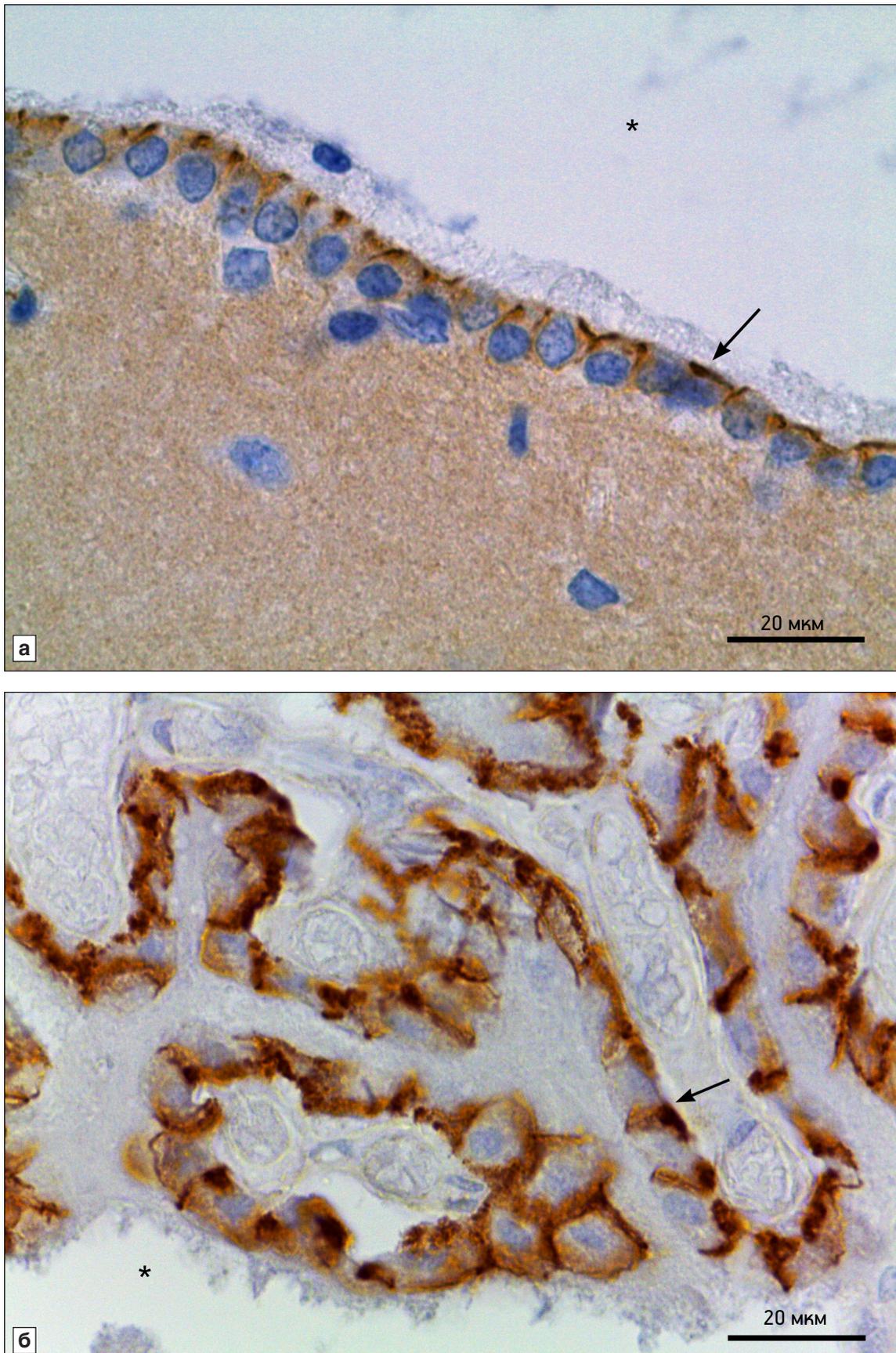


Рис. 1. Стенка бокового желудочка (а) и сосудистое сплетение (б) головного мозга крысы.

а — кажущееся скопление бета-катенина на апикальной поверхности эпендимокита (стрелка); б — скопление бета-катенина в базальной части клетки (стрелка). Звездочка — полость желудочка. Иммуногистохимическая реакция на бета-катенин с докраской ядер гематоксилином

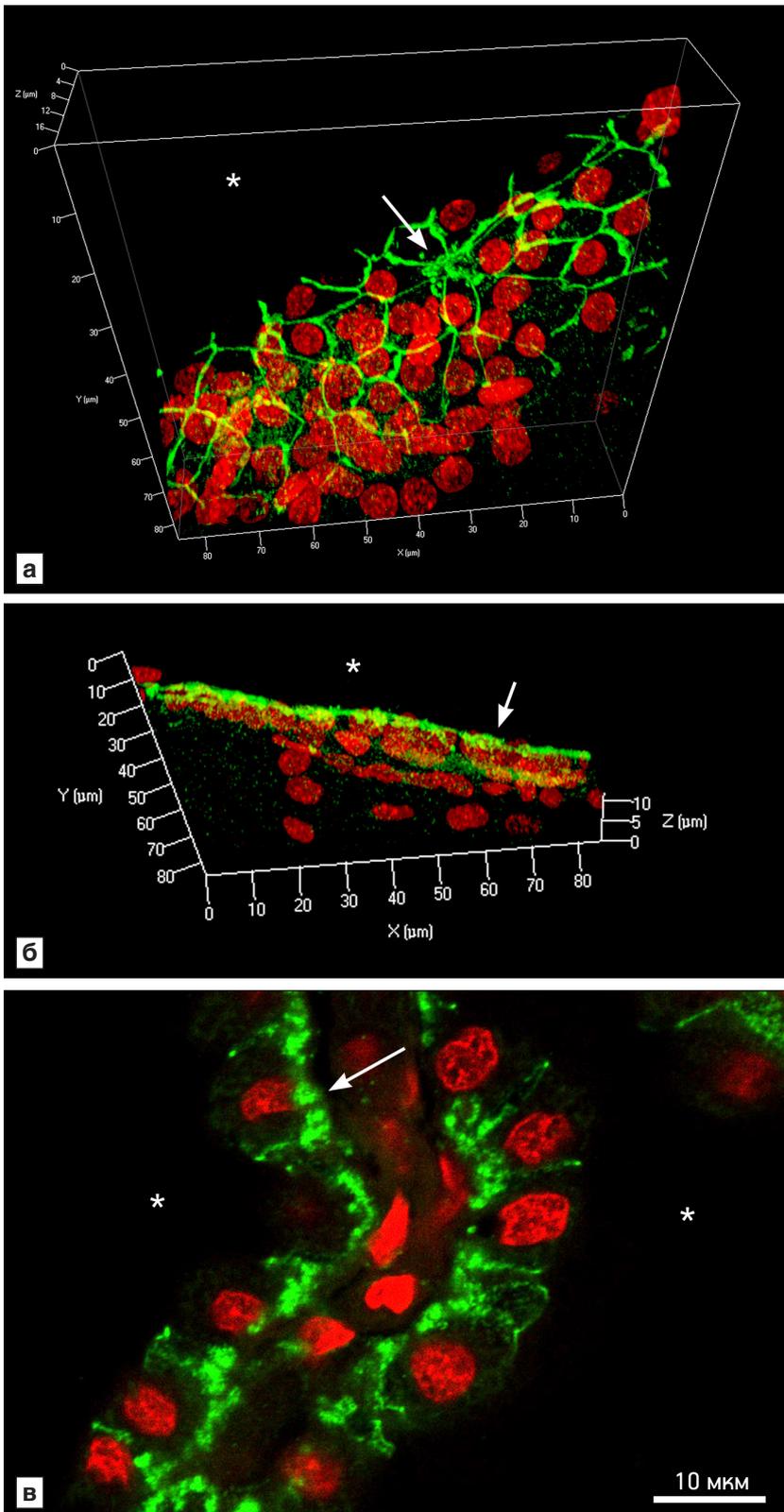


Рис. 2 Трехмерная реконструкция клеток латеральной стенки желудка (а, б) и одиночный оптический срез ворсинки сосудистого сплетения (в).

Скопления бета-катенина (стрелка) вокруг небольшой иммунонегативной зоны в эпендиме (а), апикальной зоне эпендимоцитов (б) и базальной части покровных клеток сосудистого сплетения (в). Звездочка — полость желудка. Иммуногистохимическая реакция на бета-катенин. Визуализация с помощью флюорохрома Cy2 (зеленый), докраска ядер TO-PRO3 (красный). Конфокальная лазерная микроскопия. Объектив plan-Apochromat 100x/1.40 Oil DICM27. Для возбуждения флюоресценции Cy2 и TO-PRO3 использованы аргонный (488 нм) и гелий-неоновый (633 нм) лазеры соответственно. Величина z-серии — 19 мкм, количество оптических срезов — 50

шел строго перпендикулярно продольной оси мозга, можно видеть только точки соприкосновения клеток в апикальной зоне, если же срез получился тангенциальный, то вероятность определения клеточных границ повышается. При построении пространственных реконструкций границы между клетками очень хорошо прослеживаются со стороны полости желудочка и неопределимы в боковой проекции.

В отличие от эпендимы, в сосудистом сплетении бета-катенин более равномерно распределен по базальной и латеральной границам клеток. Сходное распределение этого белка наблюдается в эпителиоцитах проксимальных и дистальных канальцев почки [7]. Обращает на себя внимание факт накопления бета-катенина в базальных отделах покровных клеток сосудистого сплетения и эпителиоцитах проксимальных извитых канальцев почки [7]. Такое сходство распределения бета-катенина может быть объяснено необходимостью дополнительной механической стабилизации в области базальной складчатости этих эпителиальных клеток, а также участием бета-катенина в прикреплении клеток эпителия к базальной мембране. Отсутствие скопления бета-катенина в базальной части эпендимоцитов можно объяснить неровностями базальной поверхности, от которой отходят отростки [1], фиксирующие эпендимный пласт к подлежащим структурам без участия специализированных межклеточных контактов, и отсутствием у эпендимоцитов базальной мембраны.

Таким образом, различия в распределении бета-катенина в

эпендиме и покровных клетках сосудистого сплетения свидетельствуют о сравнительно большей близости последних к клеткам типичных эпителиальных тканей, что нельзя сказать об эпендиме. В связи с этим вопрос о тканевой принадлежности эпендимы и ее производных — эпителиоморфных клетках циркумвентрикулярных органов — нуждается в дальнейшем прояснении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кирик О.В., Суфиева Д.А., Назаренкова А.В., Коржевский Д.Э. Структурная организация отростков эпендимоцитов, образующих выстилку боковых желудочков головного мозга // Морфология, 2015. Т. 147, вып. 2. С. 17–21.
2. Коржевский Д.Э. Эпителий сосудистого сплетения // Руководство по гистологии. Т. 1. СПб.: СпецЛит, 2001. С. 177–179.
3. Коржевский Д.Э., Сухорукова Е.Г., Гилерович Е.Г. и др. Преимущества и недостатки цинк-этанол-формальдегида как фиксатора для иммуноцитохимических исследований и конфокальной лазерной микроскопии // Морфология. 2013. Т. 143, вып. 2. С. 81–85.
4. Международные термины по цитологии и гистологии человека с официальным списком русских эквивалентов / Под ред. В.В. Банина, В.Л. Быкова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009.
5. Giachino C., Basak O., Lugert S. et al. Molecular diversity subdivides the adult forebrain neural stem cell population // Stem Cells. 2014. Vol. 32, № 1. P. 70–84.
6. Meeker R.B., Bragg D.C., Poulton W., Hudson L. Transmigration of macrophages across the choroid plexus epithelium in response of the feline immunodeficiency virus // Cell Tiss. Res. 2012. Vol. 347, № 2. P. 443–455.
7. Nürnberg J., Feldkamp T., Kavapurackal R. et al. N-cadherin is depleted from proximal tubules in experimental and human

acute kidney injury // Histochem. Cell Biol. 2010. Vol. 133, № 6. P. 641–649.

8. Tyler S. Epithelium. The primary building block for metazoan complexity // Integr. Comp. Biol. 2003. Vol. 43. P. 55–63.
9. Valenta T., Hausmann G., Basler K. The many faces and functions of v-catenin // EMBO J. 2012. Vol. 31. P. 2714–2736.

Поступила в редакцию 02.03.2015

CELL CONTACT PROTEIN BETA-CATENIN IN EPENDYMAL AND EPITHELIAL CELLS OF THE CHOROID PLEXUS OF THE CEREBRAL LATERAL VENTRICLES

O. V. Kirik¹, D. A. Sufieyeva¹, A. V. Nazarenkova¹, D. E. Korzhevskiy^{1,2}

The purpose of this study was to examine the distribution pattern of cellular contacts protein beta-catenin in the choroid plexus and ependyma of lateral ventricles of the brain. The study was conducted on frontal sections of the brain of Wistar rats (n=10) using polyclonal antibodies against beta-catenin. The obtained preparations were analyzed by microscopy in transmitted light and using confocal laser microscopy. To study the distribution of beta-catenin in different projections, three-dimensional reconstruction was performed. The study demonstrated different distribution patterns of this protein in ependyma and choroid plexus. Unlike ependyma, in the cells of the choroid plexus beta-catenin was distributed in the same way as in simple epithelial tissues (on the basal and lateral borders of the cells). This may indicate different tissue attribution of the ependyma and the choroid plexus epithelium, despite their common origin.

Key words: *brain, ependyma, choroid plexus, beta-catenin, confocal microscopy*

¹ Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAS Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg; ² Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technology, St. Petersburg State University