

© Коллектив авторов, 2012
УДК 611.018.8:616.831-005.4:599.323.4

О. В. Кирик¹, Т. Д. Власов² и Д. Э. Коржевский¹

МАРКЕРЫ НЕЙРАЛЬНЫХ СТОЛОВЫХ КЛЕТОК НЕСТИН И MUSASHI-1 В КЛЕТКАХ КОНЕЧНОГО МОЗГА КРЫСЫ ПОСЛЕ ТРАНЗИТОРНОЙ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (зав. — д-р мед. наук Д. Э. Коржевский), отдел общей и частной морфологии; ФГБУ Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург; ² кафедра патологической физиологии (зав. — проф. Т. Д. Власов), Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова

Белки нестин и Msi-1 наиболее часто используются для маркирования нейральных стволовых и прогениторных клеток *in vivo*, однако, остается неясным действительно ли эти маркеры выявляют одни и те же клетки. В результате изучения структурных характеристик и локализации клеток, экспрессирующих нестин и Msi-1, было установлено, что в интактном мозгу 15 крыс изученные белки выявляются в различных популяциях клеток. В интактном мозгу не обнаружено групп клеток, которые экспрессируют как нестин, так и Msi-1. Однако после ишемического повреждения, вызванного у 38 крыс эндоваскулярной окклюзией левой средней мозговой артерии в течение 30 мин с последующей реперфузией в течение 48 ч, оба эти маркера обнаруживаются в клетках субвентрикулярной зоны и эпандимоцитах. Это свидетельствует об изменении цитохимических характеристик предполагаемых нейральных стволовых клеток.

Ключевые слова: мозг, нейральные стволовые клетки, нестин, Msi-1, ишемия

Современная концепция нейральных стволовых и прогениторных клеток (НСПК) предусматривает их идентификацию *in vivo* при помощи особых маркерных белков [4, 8, 18]. Наиболее часто для маркирования НСПК используется белок промежуточных филаментов — нестин [1] и регуляторный РНК-связывающий белок — Musashi-1 (Msi-1) [2, 14]. Считается, что после ишемического повреждения головного мозга происходит активация НСПК и миграция нейробластов в зоны повреждения [12, 17, 19]. Однако остается неясным, действительно ли разные маркеры НСПК указывают при этом на одни и те же клетки.

Цель данного исследования — изучение структурных характеристик и локализации клеток, экспрессирующих нестин и Msi-1 в конечном мозгу крысы после непродолжительной фокальной ишемии.

Материал и методы. Опыты выполнены на половозрелых крысах-самцах линии Вистар. Содержание животных и все экспериментальные манипуляции осуществляли с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г.

МЗ СССР). Индукцию ишемии у 38 животных проводили при помощи эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии [7] под общей анестезией (тиопентал-натрий, 60 мг/кг). Продолжительность нарушения кровообращения в бассейне левой средней мозговой артерии в каждом случае составляла 30 мин, а время реперфузии — 48 ч. Контролем служили соответствующие структуры конечного мозга интактных животных (n=15). Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [6], обезжизняли и заливали в парафин обычным способом. Морфологическому исследованию подвергали серийные фронтальные срезы конечного мозга. Для иммуноцитохимического выявления белка промежуточных филаментов — нестина были использованы мышинные моноклональные антитела (клон Rat-401) (BD Pharmingen, США), и набор EnVision+ System Labelled Polymer-HRP Anti-Mouse (Dako, Дания). Для иммуноцитохимического выявления белка Msi-1 были использованы поликлональные кроличьи антитела (Abcam, Великобритания) и набор Super Sensitive Polymer-HRP Detection System (BioGenex, США). После постановки иммуногистохимических реакций часть срезов докрашивали гематоксилином. В качестве дополнительных методов, позволяющих определить степень повреждения стриатума и визуализировать нейроны, были проведены иммуногистохимическая реакция на белок NeuN [5] и окраска толуидиновым синим по Нисслю.

Сведения об авторах:

Кирик Ольга Викторовна, Коржевский Дмитрий Эдуардович (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдел общей и частной морфологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, 197376 Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

Власов Тимур Дмитриевич (e-mail: tvlasov@yandex.ru), кафедра патологической физиологии, Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, 197022 Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6–8

Результаты исследования. У интактных животных положительная реакция на нестин наблюдается как в отдельных клетках, так и в небольших компактных группах клеток субвентрикулярной зоны (СВЗ), ядра которых содержат преимущественно гетерохроматин. Эти клетки располагаются непосредственно под эпендимой (рис. 1, а) и в области рострального миграционного пути (РМП). Эпендимоциты нестин не содержат.

Реакция на белок Msi-1 проявляется в цитоплазме и ядрах клеток эпендимы, в ядрах большинства клеток СВЗ боковых желудочков (см. рис. 1, б). В области РМП подавляющее большинство клеток экспрессируют белок Msi-1, для них характерна локализация этого маркера преимущественно в ядрах. В стриатуме положительную реакцию на белок Msi-1 дают клетки, у которых контурируются отростки. При этом в отростках продукт реакции мелко гранулярный. В белом веществе мозга (в основном в мозолистом теле) Msi-1-иммунопозитивные (Msi-1⁺) клетки обнаруживаются среди интерфасцикулярных олигодендроцитов. Слабую реакцию на Msi-1 имеют отдельные клетки, располагающиеся периваскулярно. Наиболее яркая реакция наблюдается в клетках СВЗ и РМП. В сосудистом сплетении реакция на белок Msi-1 отсутствует.

Через 2 сут после односторонней ишемии было обнаружено, что очаги повреждения затрагивают только одно левое полушарие и локализуются в стриатуме и/или в базолатеральной области полушария. По степени повреждения были выделены два варианта: умеренное локальное повреждение стриатума без деструкции нервной ткани (n=29) и ишемический инфаркт в области левого полушария мозга (n=9), сопровождающийся некротической деструкцией ткани.

После ишемического воздействия в случае умеренного локального повреждения нейронов стриатума в левом полушарии мозга появляются многочисленные нестин-иммунопозитивные (нестин⁺) отростчатые клетки и кровеносные сосуды, в которых определяется отчетливая реакция на нестин вдоль внутренней границы стенок. Большинство эпендимоцитов медиальной и верхней стенок бокового желудочка ишемизированного (левого) полушария начинают синтезировать нестин. В то же время, небольшая часть эпендимоцитов латеральной стенки этого же желудочка

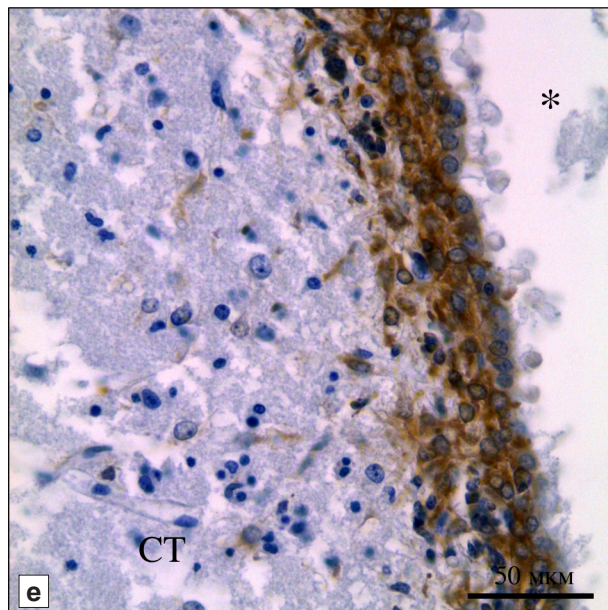
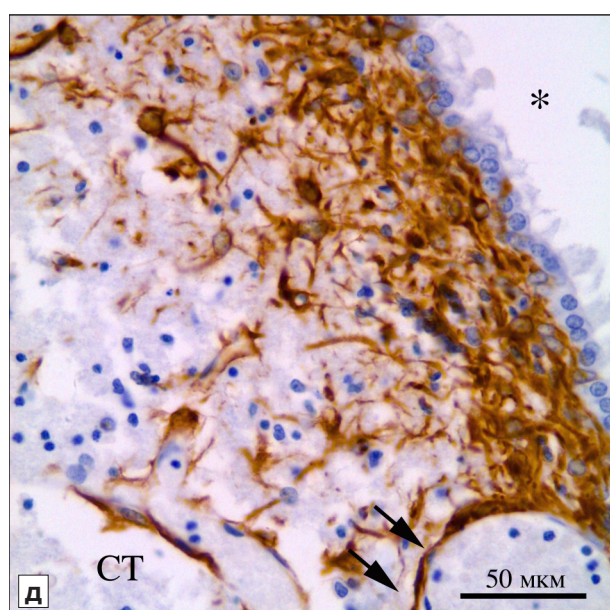
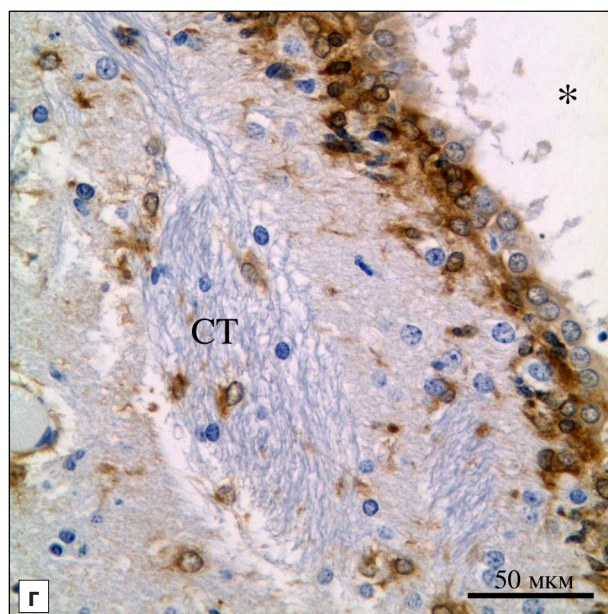
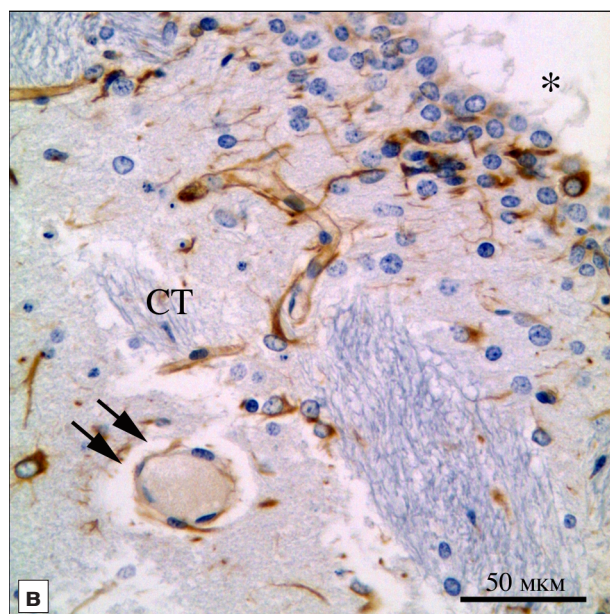
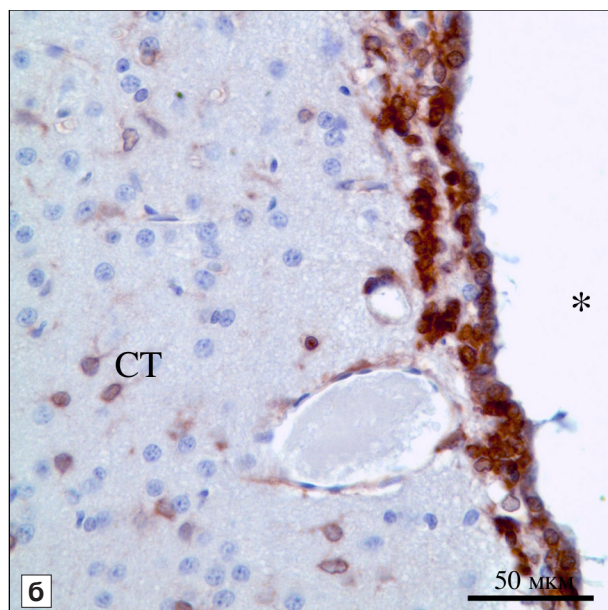
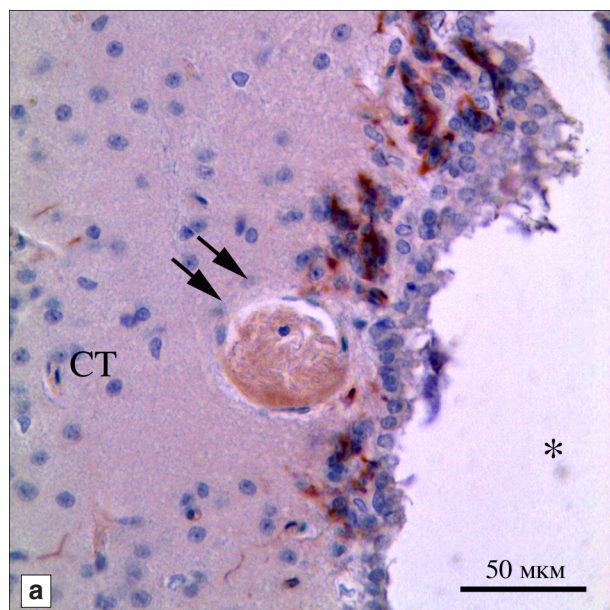
дают реакцию на нестин. Группы нестин⁺-клеток расположены в той части стенки желудочка, которая наиболее близка к зоне повреждения. Если ишемическое повреждение регистрируется в отдаленной от желудочка базолатеральной части полушария, то нестин⁺-клетки в эпендиме медиальной и верхней стенок желудочка отсутствуют. В латеральной стенке желудочка отдельные нестин⁺-эпендимоциты определяются в участке, ближайшем к повреждению. В СВЗ присутствуют группы нестин-иммунонегативных клеток с мелкими овальными ядрами, в которых преобладает гетерохроматин. В этой области обнаруживаются митотически делящиеся клетки, часть из которых экспрессируют нестин.

В противоположном (неишемизированном) полушарии при умеренном повреждении ипсилатерального стриатума нестин⁺-клетки с ядрами, в которых преобладает гетерохроматин, так же как и у интактных животных, располагаются группами в СВЗ. При этом нестин⁺ становятся все эпендимоциты медиальной и верхней стенок желудочка, в латеральной стенке нестин⁺-эпендимоциты располагаются поодиночке или небольшими группами (по 2–3 клетки). Встречаются митотически делящиеся нестин⁺-клетки. В случае базолатерального повреждения противоположного полушария нестин⁺-эпендимоциты единичны. Иногда реакция на нестин отсутствует на всем протяжении эпендимы бокового желудочка.

В случае умеренного локального повреждения нейронов стриатума в ишемизированной области только в некоторых эпендимоцитах ядро и цитоплазма имеют положительную реакцию на белок Msi-1. В СВЗ присутствуют Msi-1 — иммуноотрицательные (Msi-1⁻) клетки с крупными светлыми ядрами, содержащими преимущественно эухроматин, и группы клеток с мелкими ядрами, богатыми гетерохроматином (см. рис. 1). В РМП встречаются как Msi-1⁺, так и Msi-1⁻-клетки, причем клетки с мелкими ядрами, богатыми гетерохроматином, как правило, Msi-1⁻. Встречаются Msi-1⁺ митотически делящиеся клетки. В стриатуме положительную реакцию на белок Msi-1 имеют отростчатые клетки и некоторые клетки, располагающиеся периваскулярно. Интенсивность реакции вокруг зоны повреждения не увеличивается по сравнению с таковой в других зонах стриатума.

Рис. 1. Субвентрикулярная зона левого бокового желудочка и прилегающая часть стриатума конечного мозга крысы.

а, б — интактный контроль; в–е — после 30-минутной левосторонней ишемии: в, г — умеренное повреждение; д, е — ишемический инфаркт части стриатума. Звездочка — полость желудочка; СТ — стриатум; стрелки — крупные тонкостенные кровеносные сосуды. Иммуногистохимические реакции: а, в, д — на нестин; б, г, е — на Msi-1; докраска гематоксилином.



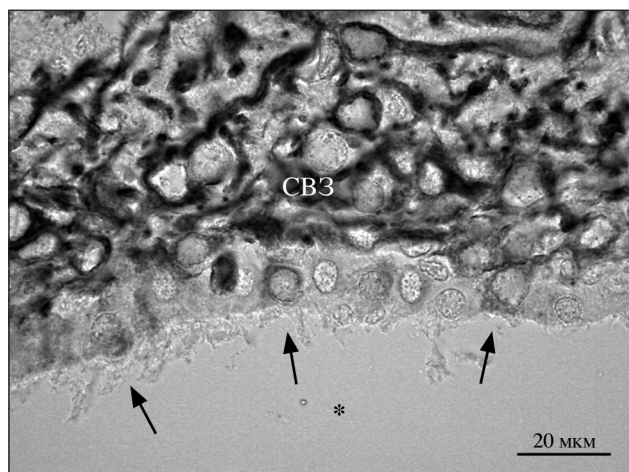


Рис. 2. Нестин в клетках эндодермы и субвентрикулярной зоны (СВЗ) после 30-минутной левосторонней ишемии, вызвавшей развитие ишемического инфаркта части стриатума, пограничной с СВЗ, у крысы.

Звездочка — полость желудочка. Стрелки — эндодермиды, содержащие нестин.

В контралатеральном полушарии позитивная реакция на белок Msi-1 отсутствует в клетках эндодермы. В СВЗ появляются Msi-1⁺-клетки с крупными ядрами и небольшое количество Msi-1⁺-клеток с ядрами, богатыми гетерохроматином, которые либо расположены поодиночке, либо входят в состав небольших групп мелких клеток, ядра которых содержат Msi-1 и богаты гетерохроматином. Встречаются Msi-1⁺-клетки, делящиеся митозом. В области РМП также появляются Msi-1⁺-клетки с мелкими интенсивно окрашивающимися гематоксилином ядрами. В стриатуме и белом веществе распределение Msi-1⁺-клеток аналогично таковому в интактном мозгу.

В случае развития ишемического инфаркта в ишемизированном полушарии по всей границе поврежденной области располагаются нестин⁺-отростчатые клетки (астроциты) и клетки сосудов, дающие реакцию на нестин на границе с просветом (эндотелиоциты). Эндодермиды латеральной стенки желудочка дают интенсивную реакцию на нестин в области, прилежащей к инфаркту (рис. 2). Иммуноположительными становятся и клетки эндодермы, выстилающие медиальную и верхнюю стенки желудочка, если инфаркт затрагивает базолатеральную часть полушария. При локализации инфаркта в базальной части полушария нестин⁺-эндодермиды в верхней и медиальной стенках желудочка обнаруживаются меньше. В трех случаях такие клетки отсутствовали. Клетки с ядрами, богатыми гетерохроматином, располагающиеся при умеренном повреждении небольшими группами, в случае развития ишемического инфаркта лежат поодиночке или парами и являются нестин-иммунонегативными.

В неишемизированном (контралатеральном) полушарии нестин⁺-клетки в эндодерме располагаются мозаично или образуют небольшие группы в медиальной, верхней и латеральной стенках бокового желудочка. При локализации инфаркта в базальной части левого полушария реакция на нестин в эндодерме правого желудочка не определяется. В СВЗ хорошо видны кластеры небольших клеток с ядрами, богатыми гетерохроматином, имеющие положительную реакцию на нестин.

После ишемического воздействия, вызвавшего развитие инфаркта мозга в ишемизированном полушарии, количество диффузно расположенных, преимущественно отростчатых Msi-1⁺-клеток, возрастает во всех изученных областях. В сосудистом сплетении наблюдается умеренно выраженная реакция на белок Msi-1, причем интенсивность окраски в ишемизированном полушарии выше, чем в контралатеральном. Msi-1⁺-клетки наблюдаются вокруг сосудов и вблизи поверхности мозга. В очаге повреждения Msi-1⁺-клетки отсутствуют, не видно никакой концентрации этих клеток и вокруг поврежденной области. В эндодерме все клетки содержат белок Msi-1, однако, реакция на него — различной интенсивности. Отсутствует типичная для контроля положительная реакция в крупноядерных клетках, расположенных небольшими группами под эндодермой. В кластерах мелких клеток с ядрами, богатыми гетерохроматином, положительная реакция на Msi-1 также отсутствует, тогда, как в противоположном полушарии примерно половина таких клеток содержат Msi-1.

Обсуждение полученных данных. Полученные результаты свидетельствуют о том, что как в интактном головном мозгу крысы, так и при реакции на ишемическое повреждение изученные белки выявляются в различных популяциях клеток. У интактных крыс Msi-1 отчетливо маркирует эндодерму и значительное число клеток в СВЗ, а также в РМП, тогда как нестин обнаруживается только в небольших кластерах клеток СВЗ, ядра которых Msi-1⁺. После ишемического повреждения наблюдаются изменения в интенсивности реакции на Msi-1, но не происходит инициации экспрессии этого маркера в клетках других популяций. В противоположность этому ишемия вызывает экспрессию нестина в тех клетках, где он в обычных условиях не обнаруживается (эндодермиды, астроциты).

В интактном мозгу крысы не существует популяций клеток, которые коэкспрессируют нестин и Msi-1. Однако после ишемического повреждения

оба этих маркера обнаруживаются в клетках СВЗ и эпендимocyтaх.

Было установлено, что белок Msi-1 в клетке может находиться как в ядре, так и в цитоплазме, включая цитоплазму отростков, что характерно для клеток стриатума и белого вещества головного мозга. Это не вполне согласуется с данными литературы [16], где отмечается присутствие этого белка только в ядре и перинуклеарной зоне. Определение реакции на Msi-1 в отростках клеток может быть связано с использованием более высокочувствительного метода детекции первичных антител и, таким образом, выявления более низких концентраций антигена.

Особого внимания заслуживает нейрогенная СВЗ, где у взрослых животных непосредственно под эпендимой располагаются небольшие кластеры клеток с богатыми гетерохроматином ядрами (так называемые клетки типа А), которые обычно считают нейробластами [13, 15]. В интактном мозгу крыс эти кластеры клеток экспрессируют нестин, но не содержат Msi-1. У экспериментальных животных в поврежденном полушарии эти клетки утрачивают нестин, однако в контралатеральном полушарии они продолжают синтезировать нестин, а часть из них (около половины клеток) начинают экспрессировать и Msi-1. Подобная экспрессия изучаемых белков в поврежденном полушарии мозга наблюдается в случае, как умеренного повреждения, так и развития ишемического инфаркта мозга. При этом кластеры А-клеток в поврежденном полушарии сохраняются только при умеренном повреждении ткани мозга, в случае же инфаркта остаются одиночные или попарно расположенные клетки. В неповрежденном полушарии мозга кластеры клеток сохраняются (количество входящих в них клеток увеличивается с 1–3 до 5–7) и в них экспрессируются как нестин, так и Msi-1. По-видимому, эти клетки являются неоднородной популяцией и некоторые из них находятся в особом функциональном состоянии, при котором происходит подавление синтеза Msi-1. Из этого состояния клетки выходят при стимулировании процессов нейрогенеза. Такая стимуляция может приводить к быстрому уменьшению данной популяции клеток (в связи с их ускоренной миграцией в область РМП и зону повреждения).

С точки зрения современных данных, эпендимная выстилка боковых желудочков мозга образована высокодифференцированными клетками, которые участвуют в поддержании целостности ликворо-энцефалического барьера [13]. Известно, что эпендимocyтa не образуют нейросфер *in vitro* [9]. Таким образом, эти клетки не должны являть-

ся источником стволовых клеток в ЦНС. Тем не менее, в отдельных исследованиях указывается на присутствие маркеров стволовых клеток CD133 [11], Msi-1 [2] и нестина [3], а также ядерного белка пролиферирующих клеток (PCNA) [4] в клетках эпендимы при особых условиях. Представленные результаты свидетельствуют о том, что при ишемическом повреждении мозга клетки эпендимы начинают экспрессировать нестин, сохраняя экспрессию Msi-1, что сближает их с НСПК СВЗ. Поэтому нельзя исключить возможности участия эпендимы в образовании новых прогениторных клеток [10].

Таким образом, полученная морфологическая характеристика и данные о локализации клеток конечного мозга крысы, экспрессирующих нестин и Msi-1, свидетельствуют о более сложном, чем это представлялось ранее, изменении популяции предполагаемых НСПК после ишемического повреждения головного мозга.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 10-04-00180a).

ЛИТЕРАТУРА

1. Гиляров А. В. Нестин в клетках центральной нервной системы. Морфология, 2007, т. 131, вып. 1, с. 85–90.
2. Кирик О. В., Алексеева О. С. и Коржевский Д. Э. Экспрессия маркера нейральных стволовых клеток Msi-1 в конечном мозгу крысы. Морфология, 2011, т. 139, вып. 3, с. 77–79.
3. Кирик О. В., Зухурова М. А., Власов Т. Д. и Коржевский Д. Э. Появление нестина в эпендимocyтaх связано с ишемическим повреждением головного мозга. В кн.: Материалы Всероссийской конференции с международным участием. «Современные направления исследований функциональной и межполушарной асимметрии и пластичности мозга». М., Научный мир, 2010, с. 372–375.
4. Коржевский Д. Э. Нейрогенез и нейральные стволовые клетки. Мед. акад. журн., 2010, т. 10, № 4, с. 175–182.
5. Коржевский Д. Э., Гилерович Е. Г., Зинькова Н. Н. и др. Иммуноцитохимическое выявление нейронов головного мозга с помощью селективного маркера NeuN. Морфология, 2005, т. 128, вып. 5, с. 76–78.
6. Коржевский Д. Э., Григорьев И. П. и Отеллин В. А. Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрoгистологических исследованиях. Морфология, 2006, вып. 129, № 1, с. 85–86.
7. Коржевский Д. Э., Кирик О. В., Байса А. Е. и Власов Т. Д. Моделирование одностороннего ишемического повреждения нейронов стриатума с помощью непродолжительной окклюзии средней мозговой артерии. Бюл. эксп. биол., 2009, т. 147, № 2, с. 217–219.
8. Коржевский Д. Э., Петрова Е. С., Кирик О. В. и др. Нейрональные маркеры, используемые при изучении дифференцировки стволовых клеток. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2010, т. 5, № 3, с. 57–63.
9. Capela A. and Temple S. LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. Neuron, 2002, v. 35, № 5, p.865–867

10. Chojnacki A. K., Mak G. K. and Weiss S. Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: Subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both? *Nat. Rev. Neurosci.*, 2009, v. 10, № 2, p. 153–163.
11. Coskun V., Wu H. and Blanche B. CD133+ neural stem cells in the ependima of mammalian postnatal forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, v. 105, № 3, p. 1026–1031.
12. Curtis M. A., Kam M. and Faull R. L. Neurogenesis in humans. *Eur. J. Neurosci.*, 2011, v. 33, № 6, p. 1170–1174.
13. Doetsch F., Garcia-Verdugo J. M. and Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J. Neurosci.*, 1997, v. 17, № 13, p. 5046–5061.
14. Kaneko Y., Sakakibara S., Imai T et al. Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev. Neurosci.*, 2000, v. 22, № 1–2, p. 139–153.
15. Miller F. D. and Gauthier-Fisher A. Home at last: Neural stem cell niches defined. *Cell Stem Cell*, 2009, v. 4, № 6, p. 507–510.
16. Oki K., Kaneko N., Kanki H. et al. Musashi1 as a marker of reactive astrocytes after transient focal ischemia. *Neurosci. Res.*, 2010, v. 66, № 4, p. 390–395.
17. Thored P., Arvidsson A., Cacci E. et al. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells*, 2006, v. 24, № 3, p. 739–747.
18. Von Bohlen and Halbach O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tiss. Res.*, 2007, v. 329, № 3, p. 409–420.
19. Yamashita T., Ninomia M., Hernandez A. P. et al. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature

neurons in the post-stroke adult striatum. *J. Neurosci.*, 2006, v. 26, № 24, p. 6627–6636.

Поступила в редакцию 30.09.2011

NESTIN AND MUSASHI1 AS THE MARKERS OF NEURAL STEM CELLS IN RAT TELENCEPHALON FOLLOWING TRANSITORY FOCAL ISCHEMIA

O. V. Kirik, T. D. Vlasov and D. E. Korzhevskiy

Nestin and Musashi1 (Msi-1) proteins are most often used for labeling of neural stem cells and progenitor cells *in vivo*, however it remains unclear if these markers really label the same cells. As a result of the study of structural characteristics and localization of nestin- and Msi1-expressing cells it was found that these proteins were detected in non-identical cell populations in the brain of intact 15 rats. We failed to find cell groups demonstrating a coexpression of nestin and Msi-1. However, after ischemic lesion of the brain, which was caused in 38 rats by an endovascular occlusion of the left medial cerebral artery for 30 min with the following reperfusion for 48 hours, both markers were detected in cells of subventricular zone and in ependymocytes. These results indicate the changes in cytochemical patterns of the candidate stem cells.

Key words: *brain, neural stem cells, nestin, Msi-1, ischemia*

Laboratory of the Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAMS North-Western Branch Institute of Experimental Medicine; Department of Pathological Physiology, I. P. Pavlov State Medical University, St. Petersburg