

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

© О. В. Кирик, Д. Э. Коржевский, 2013
УДК 611.813.018:599.323.4

О. В. Кирик и Д. Э. Коржевский

ВНЕЭПЕНДИМНЫЕ ЭПЕНДИМОЦИТЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ

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 СЗО РАМН, Санкт-Петербург

Цель работы состояла в проверке гипотезы о существовании в интактном головном мозгу крысы клеток, которые по структурной организации и цитохимическим характеристикам сходны с эпендимоклетками, но расположены вне слоя эпендимы. Работа выполнена на крысах линии Вистар ($n=10$). Для идентификации эпендимоклеток использовали иммуноцитохимические реакции на эзрин и виментин, световую и конфокальную лазерную микроскопию. Установлено, что в нервной ткани интактного головного мозга крысы вне слоя эпендимоклеток присутствуют клетки, имеющие структурное и цитохимическое сходство с типичными клетками эпендимы. Предполагается, что внеэпендимные эпендимоклетки выполняют функцию резервной популяции нейральных стволовых клеток головного мозга.

Ключевые слова: *головной мозг, эпендима, виментин, эзрин*

Эпендима, выстилающая желудочки головного мозга, ограничивает проникновение веществ из цереброспинальной жидкости в нервную ткань, являясь важным компонентом гематоликворного барьера и барьерной системы головного мозга в целом [4]. Несмотря на длительную историю изучения эпендимы, сохраняется неопределенность в вопросе о структурной и функциональной однородности эпендимоклеток и возможности их участия в нейрогенезе [5]. В связи с этим интересен факт обнаружения в стриатуме у крыс после ишемии клеток, имеющих полное структурное сходство с эпендимоклетками и названных «эктопическими эпендимными клетками» [6].

Цель настоящего исследования — проверка гипотезы о существовании в интактном головном мозгу крысы клеток со сходными с типичными эпендимоклетками иммуноцитохимическими характеристиками.

Материал и методы. Работа выполнена на половозрелых крысах-самцах ($n=10$) линии Вистар. Содержание животных и их умерщвление осуществляли с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ №755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде, обезжировали и заливали в парафин общепринятым способом. Морфологическому исследованию подвергали фронтальные срезы конечного мозга. Для иммуноцитохимического выявления белка промежуточных филаментов — виментина были использованы мышинные моноклональные антитела (клон V9; Dako, Дания) в разведении 1:100. Иммуноцитохимическое

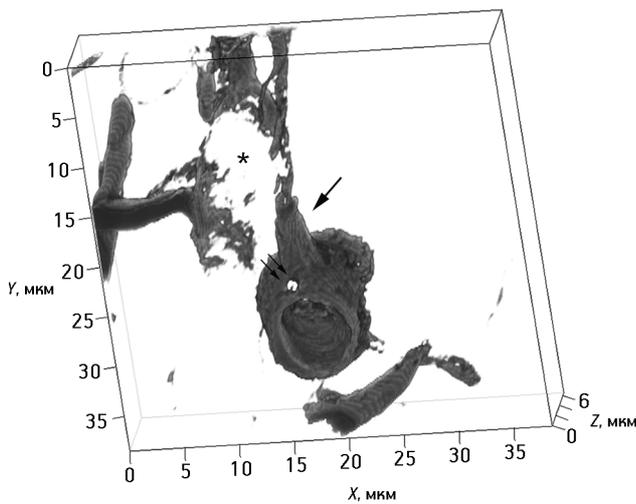
выявление эзрина (белка, присутствующего в апикальной части эпендимоклеток) проводили при помощи моноклональных (клон 3C12) мышинных антител фирмы Diagnostic Bio Systems (США) в разведении 1:100 [2], в качестве вторичных реагентов использовали реактивы из набора EnVision+ HRP/DAB (Dako, Дания). Перед постановкой реакций проводили тепловое демаскирование антигена в модифицированном цитратном буфере (S1700, Dako, Дания) [2]. После постановки иммуноцитохимических реакций часть срезов докрасивали гематоксилином. Фотосъемку выполняли, используя микроскоп Leica DM750 и фотокамеру ICC50 (Leica, Германия).

Для конфокальной микроскопии были использованы вторичные антитела, конъюгированные с тетраметилродаминиозотиоцианатом (TRITC, Dako, Дания). Просмотр препаратов, обработку полученных изображений и трехмерную реконструкцию клеток проводили с применением конфокального микроскопа LSM 710 и компьютерной программы ZEN 2010 (Zeiss, Германия).

Результаты исследования. На фронтальных срезах головного мозга положительная иммуноцитохимическая реакция на виментин обнаруживалась в эпендиме желудочков и на поверхности мозга — в клетках мягкой оболочки мозга и стенках кровеносных сосудов (в эндотелиоцитах, гладких миоцитах и клетках адвентиции). В основании мозга наблюдалась отчетливая реакция на виментин в клетках, формирующих поверхностную глиальную пограничную мембрану. Интенсивная реакция на виментин наблюдалась во всех клетках эпендимы желудочков мозга,

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, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12



Трехмерная реконструкция внеэпендимного эпендимоицита, расположенного вблизи кровеносного сосуда.

Клетка имеет один толстый отросток, направленный к сосуду (стрелка), и сквозной цитоплазматический канал, проходящий в околоядерной области (две стрелки), звездочка — просвет сосуда. Иммуноцитохимическая реакция на виментин. Визуализация при помощи тетраметилродаминотиоцианата. Конфокальная лазерная микроскопия

а также в отдельных клетках, близких по размерам к эпендимоицитам, располагающихся как непосредственно под эпендимой, так и в прилегающем к ней нейропиле. Селективная окраска эпендимоицитов позволяет определить, что некоторые из них имеют длинный, как правило, неразветвленный отросток, отходящий от базального отдела клетки и проходящий в прилегающую субвентрикулярную зону, а далее — в нейропиле стриатума. Отдельные клетки, дающие отчетливо выраженную реакцию на виментин и расположенные непосредственно под эпендимой, имеют округлую или неправильную полигональную форму. От некоторых из них, как и от части эпендимоицитов, отходит один неветвящийся отросток. В нейропиле, прилежащем к субвентрикулярной зоне, видны единичные округлые виментин-иммунопозитивные клетки, располагающиеся либо отдельно, либо контактирующие с пронизывающими нейропиле виментин-позитивными отростками других клеток, которые подобны отросткам радиальных глиоцитов. Положительную реакцию на виментин различной интенсивности дают эндотелиоциты капилляров разных отделов головного мозга и единичные астроциты субкортикального белого вещества мозга.

При постановке иммуноцитохимической реакции на эзрин, наряду с отчетливо выявляющейся эпендимой, на небольшом (20–80 мкм) расстоянии от стенки желудочка в нервной ткани обнаруживаются отдельные клетки, с интенсивной

реакцией цитоплазмы без отростков. По размерам и расположению эти клетки сходны с виментин-иммунопозитивными внеэпендимными клетками. Кроме этих клеток, эзрин содержат астроциты, которые могут быть безошибочно идентифицированы по наличию характерных отростков.

При построении трехмерных реконструкций (рисунок) было выявлено, что внеэпендимные виментин-иммунопозитивные клетки имеют, как правило, по одному отростку. Этот отросток нередко направлен к недалеко расположенному кровеносному сосуду. Интенсивность реакции по мере удаления от тела клетки в цитоплазме отростка уменьшается, поэтому не удается четко проследить его взаимоотношение с клетками сосудистой стенки. Иногда в цитоплазме таких виментин-иммунопозитивных клеток обнаруживается сквозной канал (см. рисунок), назначение которого не понятно.

Обсуждение полученных данных. В результате проведенного исследования показано, что в нервной ткани интактного головного мозга крысы вне слоя эпендимоицитов, расположенного на границе с ликвороносными пространствами, присутствуют клетки, имеющие структурное и цитохимическое сходство с типичными клетками эпендимы. Наиболее отчетливо эти клетки выявляются при использовании реакции на виментин, поскольку вне слоя эпендимы не имеется других клеток, столь интенсивно окрашивающихся при проведении иммуноцитохимической реакции на этот белок промежуточных филаментов. Подобные виментин-иммунопозитивные клетки были обнаружены ранее в нервной ткани гипоталамуса рядом с III желудочком [3], однако, из-за отсутствия технической возможности для проведения адекватных трехмерных реконструкций тогда не было получено достаточно данных об их структурной организации.

Обнаруженная взаимосвязь между неветвящимися отростками клеток, подобных радиальным глиоцитам, и внеэпендимными виментин-иммунопозитивными клетками является новым фактом, свидетельствующим о возможном выселении клеток из состава эпендимы и миграции их в пограничные с субвентрикулярной областью структуры интактного головного мозга (стриатум, гипоталамус, прилежащее ядро и др.). Данные о нейрогенных свойствах эпендимы [1, 5] позволяют предполагать, что внеэпендимные эпендимоициты выполняют функцию резервной популяции нейральных стволовых клеток головного мозга. Полученные данные свидетельствуют о том, что присутствие таких клеток в мозгу взрослых

животных не обязательно связано с повреждением нервной ткани.

Таким образом, обнаруженные виментин-иммунопозитивные клетки нервной ткани интактного мозга крысы обладают характерными для эпендимоцитов иммуноцитохимическими признаками. Они имеют своеобразную структурную организацию, сближающую их с типичными эпендимоцитами и отличающую их от других типов глиоцитов головного мозга. Для обозначения этих клеток предпочтительнее использовать термин «внеэпендимные эпендимоциты», а не «эктопические», поскольку данная популяция клеток не является атипичной (либо свойственной только реактивно-измененной нервной ткани), но присутствует и в интактном головном мозгу.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Кирик О. В., Власов Т. Д. и Коржевский Д. Э. Маркеры нейральных стволовых клеток нестин и Musashi-1 в клетках конечного мозга крысы после транзиторной фокальной ишемии. *Морфология*, 2012, т. 142, вып. 4, с. 19–24.
2. Коржевский Д. Э., Кирик О. В. и Гиляров А. В. Клетки головного мозга крысы, содержащие эзрин (цитовиллин). *Морфология*, 2011, т. 140, вып. 6, с. 86–88.
3. Коржевский Д. Э., Ленцман М. В., Кирик О. В. и Отеллин В. А. Виментин-иммунопозитивные клетки конечного мозга крысы после экспериментального ишемического инсульта. *Морфология*, 2007, т. 132, вып. 5, с. 23–27.
4. Отеллин В. А. и Коржевский Д. Э. Формирование и структурная организация барьера на наружной поверхности головного мозга. *Морфология*, 2002, т. 122, вып. 6, с. 14–18
5. Coskun V., Wu H., Blachi B. et al. CD133⁺ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2008, v. 105, № 3, p. 1026–1031.
6. Danilov A. I., Kokaia Z. and Lindvall O. Ectopic ependymal cells in striatum accompany neurogenesis in a rat model of stroke. *Neuroscience*, 2012, v. 214, p. 159–170.

Поступила в редакцию 06.02.2013

EXTRAEPENDYMAL EPENDYMOCYTES IN THE RAT BRAIN

O. V. Kirik and D. E. Korzhevskiy

The aim of the study was to test the hypothesis on the presence, in intact rat brain, of the cells located outside the ependymal layer, but possessing the structural organization and cytochemical characteristics similar to those of ependymocytes. The study was carried out on Wistar rats (n=10). Ependymocytes were identified using immunocytochemical reactions to ezrin and vimentin and were visualized with light and confocal microscopy. Cells, structurally and cytochemically similar to typical ependymocytes, were found outside the layer of ependymocytes in the nervous tissue of intact rat brain. It is suggested that extraependymal ependymocytes may have a function of reserve population of the neural stem cells in the brain.

Key words: *brain, ependyma, vimentin, ezrin*

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, St. Petersburg