

Д.Э. Коржевский¹, О.В. Кирик¹ и О.С. Алексеева^{1,2}

ЭКСПРЕССИЯ НЕСТИНА В КЛЕТКАХ ЭПЕНДИМЫ БОКОВЫХ ЖЕЛУДОЧКОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ ПРИ СТАРЕНИИ

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 СЗО РАМН; ² лаборатория сравнительной физиологии дыхания (зав. — чл.-кор. РАН А.И. Кривченко), Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

Известно, что при развитии головного мозга по мере дифференцировки эпендимоцитов из радиальных глиоцитов происходит прекращение синтеза нестина. Однако показано, что нестин в эпендиме боковых желудочков головного мозга начинает синтезироваться в ответ на ишемическое повреждение. Цель настоящего исследования состояла в проверке гипотезы о возможности восстановления экспрессии нестина в эпендиме при старении. Работа выполнена на крысах-самцах линии Вистар в возрасте 4 (n=4) и 28 мес (n=3). У старых животных установлена экспрессия нестина в эпендиме боковых желудочков головного мозга, причем в области медиальной и верхней стенок бокового желудочка обнаружены участки эпендимы, в которых все клетки имели интенсивную окраску цитоплазмы. Причины обнаруженного факта остаются неясными.

Ключевые слова: головной мозг, эпендима, нестин, старение

Нестин — белок промежуточных филаментов VI типа — нередко используют как маркер нейральных стволовых клеток. Известно, что при повреждении головного мозга нестин начинают синтезировать астроциты [4], что, как полагают некоторые авторы, отражает сохранение у этих клеток нейрогенных свойств [6]. В отношении таких же свойств у эпендимы боковых желудочков головного мозга мнения исследователей противоречивы. Большинство авторов не склонны считать эпендимные клетки нейрогенными, тем не менее, было показано, что в составе эпендимы присутствуют нейральные стволовые клетки [5]. Известно, что при развитии головного мозга, по мере дифференцировки эпендимоцитов из радиальных глиоцитов, происходит прекращение синтеза нестина [1], однако после транзиторной ишемии головного мозга эпендима боковых желудочков вновь приобретает способность синтезировать этот белок [2]. Вопрос о возможности синтеза нестина в эпендимоцитах стареющего мозга, когда наблюдаются возрастная нейродегенерация и глиоз, до настоящего времени не решен.

Цель настоящего исследования состояла в проверке гипотезы о возможности восстанов-

ления экспрессии нестина в эпендиме боковых желудочков головного мозга крысы при старении.

Материал и методы. Работа выполнена на крысах-самцах (n=7) линии Вистар, которых содержали в виварии Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Контролем служили 4-месячные животные (n=4). В группу старых животных (n=3) входили крысы в возрасте 28 мес. Содержание животных и их умерщвление осуществляли с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Головной мозг фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде, обезжизняли и заливали в парафин общепринятым способом. Морфологическому исследованию подвергали фронтальные срезы конечного мозга. Для иммуноцитохимического выявления белка промежуточных филаментов — нестина — были использованы мышинные моноклональные антитела (клон Rat-401; BD Pharmingen, США) в разведении 1:400 [3]. Для увеличения чувствительности иммуноцитохимической реакции проводили тепловое демаскирование антигена в модифицированном цитратном буфере pH 6,1 (S1700, Dako, Дания). В качестве вторичных реагентов использовали реактивы из набора EnVision+ HRP/DAB (Dako, Дания). Внутренним положительным контролем служили клетки субвентрикулярной пролиферативной зоны. После постановки иммуноцитохимических реакций часть срезов докрашивали гематоксилином.

Сведения об авторах:

Коржевский Дмитрий Эдуардович (e-mail: dek2@yandex.ru), Кирик Ольга Викторовна (e-mail: olga_kirik@mail.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, 12

Алексеева Ольга Сергеевна (e-mail: osa72@inbox.ru), лаборатория сравнительной физиологии дыхания, Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44

Фотосъемку выполняли, используя микроскоп Leica DM750 и фотокамеру ICC50 (Leica, Германия).

Результаты исследования. Во всех изученных препаратах селективность иммуноцитохимической реакции не вызвала сомнений. Неспецифическая фоновая реакция была минимальной.

У контрольных животных нестин-иммунопозитивными преимущественно были клетки, расположенные в субвентрикулярной пролиферативной зоне. Очень слабая положительная реакция регистрировалась по периметру просветов кровеносных капилляров различных отделов головного мозга. У двух контрольных животных была обнаружена слабая реакция на нестин в единичных клетках в составе эпендимы нижней части медиальной и латеральной стенок боковых желудочков. У двух других крыс реакция на нестин в эпендиме была отрицательной.

В группе старых животных у всех трех изученных крыс были обнаружены значительные участки нестин-иммунопозитивной эпендимы, в которых все клетки имели интенсивную окраску цитоплазмы (*рисунок*).

Эти участки преимущественно локализовались в области медиальной и верхней стенок бокового желудочка. При этом, в эпендимной выстилке латеральной стенки бокового желудочка обнаруживались лишь единичные клетки, дающие сравнительно слабую реакцию на нестин. Клетки субвентрикулярной зоны были иммунопозитивными, однако интенсивность реакции на нестин в их перинуклеарной цитоплазме и отростках была меньше, чем в эпендимocyтaх медиальных стенок боковых желудочков.

Обсуждение полученных данных. В результате проведенного исследования было обнаружено, что эпендима боковых желудочков у старых крыс содержит нестин. Специфичность иммуноцитохимической реакции подтверждается ее выявлением в эндотелии части кровеносных сосудов головного мозга, что согласуется с данными о наличии нестина в эндотелии [7]. Интенсивность реакции на нестин в эпендимocyтaх была сопоставима с реакцией эпендимы, наблюдаемой при ишемическом инфаркте головного мозга [2]. Усиление экспрессии нестина в эпендимocyтaх при старении нуждается в объяснении, которое в настоящее время отсутствует. Можно предполагать, что эпендимocyтa, являясь резервной популяцией прогениторных клеток, активируются при возрастных нарушениях функционирования головного мозга и начинают синтезировать нестин, как это происходит с астроцитами при их постишемической актива-

ции [4]. Не исключено и то, что благодаря особым антиапоптотическим свойствам нестина [8] его синтез усиливается в эпендиме с целью защиты медленно обновляющейся популяции эпендимocyтa от повреждения.

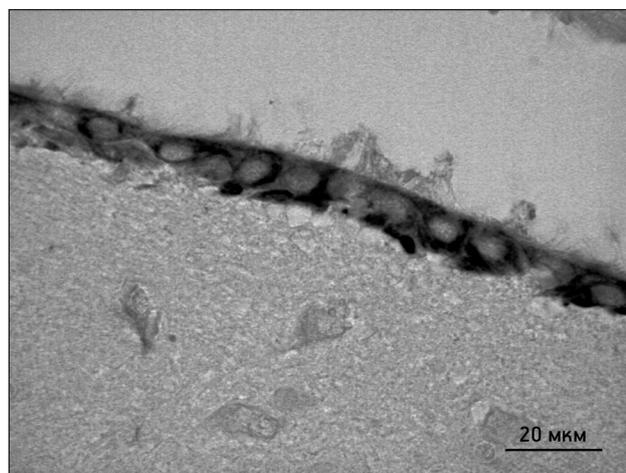
Наличие слабой реакции на нестин в единичных эпендимocyтaх у животных из контрольной группы не вполне согласуется с полученными нами ранее данными об отсутствии нестина в эпендиме у интактных половозрелых крыс, использованных в контрольных сериях проводившихся экспериментов [2, 4]. Вероятно, присутствие в составе эпендимы у этих животных нестин-иммунопозитивных клеток не регистрировалось из-за меньшей чувствительности применявшегося нами ранее варианта иммуноцитохимического метода. Использование теплового демаскирования исследованного антигена в модифицированном цитратном буфере позволило повысить чувствительность иммуноцитохимической реакции и выявить эпендимocyтa, содержащие незначительное количество нестина.

Таким образом, проведенное исследование подтвердило гипотезу о восстановлении экспрессии нестина в эпендиме головного мозга крысы при старении. Причины обнаруженного факта остаются неясными.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 14-04-00049а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Гиляров А.В., Коржевский Д.Э. и Отеллин В.А. Изменение состава промежуточных филаментов в клетках конечного мозга крыс в ранний постнатальный период онтогенеза. Журн. эволюц. биохим., 2009, т. 45, № 1, с. 130–137.



Эпендима медиальной стенки бокового желудочка головного мозга крысы (возраст — 28 мес).

Иммуноцитохимическая реакция на нестин без докраски

2. 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.
3. Коржевский Д.Э. и Гиляров А.В. Оптимизация метода иммуноцитохимического выявления нестина на парафиновых срезах головного мозга крысы. Морфология, 2006, т. 130, вып. 6, с. 77–79.
4. Коржевский Д.Э., Ленцман М.В., Гиляров А.В. и др. Индукция синтеза нестина в клетках головного мозга крысы под влиянием ишемического повреждения. Морфология, 2007, т. 131, вып. 1, с. 23–26.
5. Coskun V., Wu H., Bianchi 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. Gonzalez-Perez O. and Quinones-Hinojosa A. Astrocytes as neural stem cells in the adult brain. J. Stem Cells, 2012, v. 7, № 3, p. 181–188.
7. Krüger K., Stefansson I.M., Collett K. et al. Microvessel proliferation by co-expression of endothelial nestin and Ki-67 is associated with a basal-like phenotype and aggressive features in breast cancer. Breast, 2013, v. 22, № 3, p. 282–288.
8. Park D., Xiang A.P., Mao F.F. et al. Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. Stem Cells, 2010, v. 28, № 12, p. 2162–2171.

Поступила в редакцию 14.01.2014

NESTIN EXPRESSION IN EPENDYMAL CELLS OF LATERAL VENTRICLES OF THE RAT BRAIN IN AGING

D.E. Korzhevskiy, O.V. Kirik and O.S. Alekseyeva

It is known that during development of the brain, with the progress of ependymocyte differentiation from radial gliocytes, the synthesis of nestin is stopped. However, it was shown that in the ependyma of the lateral brain ventricles nestin synthesis was resumed in response to ischemic injury. The aim of the present study was to test the hypothesis of possible re-expression of nestin in the ependyma in aging. The study was performed on male Wistar rats aged 4 (n=4) and 28 months (n=3). In older animals the expression of nestin was demonstrated in the ependyma of the lateral ventricles of the brain. It was also found that the area of the medial and upper walls of the lateral ventricle contained the regions of ependyma, in which all cells had intense cytoplasmic staining. The causes of the phenomenon described remain unclear.

Key words: *brain, ependyma, nestin, aging*

Laboratory of the Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAS Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg; Laboratory of the Comparative Respiratory Physiology, RAS I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, St. Petersburg