

© Коллектив авторов, 2015  
УДК 611.813.8.018:599.323.4

*О.В.Кирик<sup>1</sup>, Д.А.Суфиева<sup>2</sup>, А.В.Назаренкова<sup>2</sup>, Д.Э.Коржевский<sup>1</sup>*

## СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ОТРОСТКОВ ЭПЕНДИМОЦИТОВ, ОБРАЗУЮЩИХ ВЫСТИЛКУ БОКОВЫХ ЖЕЛУДОЧКОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА

<sup>1</sup> 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; <sup>2</sup> кафедра цитологии и гистологии (зав. — проф. А.Д.Харазова), Санкт-Петербургский государственный университет

Цель работы — определение структурной организации отростков эпендимокитов, выстилающих боковые желудочки мозга с применением иммуноцитохимической реакции на виментин и конфокальной лазерной микроскопии. Исследование проведено на взрослых крысах-самцах (n=3). Установлено, что у большинства типичных эпендимокитов имеются базальные отростки, в то время как у  $1/3$  эпендимокитов отростки отсутствуют. В составе эпендимной выстилки присутствуют виментин-иммунопозитивные таницитоподобные клетки, которые имеют длинные отростки, подходящие к кровеносным сосудам. У части типичных эпендимокитов цитоскелет образован промежуточными филаментами смешанного типа, в составе которых присутствуют и виментин, и глиальный фибриллярный кислый белок.

**Ключевые слова:** головной мозг, боковые желудочки, эпендима, отростки эпендимокитов, танициты

Выстилка желудочков головного мозга, в частности, боковых, представлена эпендимой, которая создает барьер между цереброспинальной жидкостью и нервной тканью (ликворэпендифический барьер). Несмотря на длительную историю изучения эпендимы, до сих пор существуют сомнения в отношении ее структурной и функциональной однородности [8]. Известно, что в отличие от типичных эпителиальных тканей эпендима не имеет базальной мембраны, и базальные части ее клеток напрямую взаимодействуют с другими клетками нервной ткани, хотя даже и этот факт не является общепризнанным [9, 13]. Показано, что отдельные клетки в составе эпендимы имеют длинные базальные отростки, что дает основание относить их к таницитам [12] либо радиальным глиокитам [14]. Однако остается неясным, насколько распространены такие клетки и какие клетки в составе выстилки боковых желудочков в действительности имеют радиальные отростки, сходные с отростками таницитов.

Наиболее удобным маркером для изучения структурных особенностей эпендимокитов и их отростков является один из белков цитоскелета — виментин, который всегда присутствует в их промежуточных филаментах [1, 2]. Поэтому целью настоящей работы было определение

структурной организации отростков эпендимокитов, выстилающих боковые желудочки мозга крысы, с применением иммуноцитохимической реакции на виментин и конфокальной лазерной микроскопии.

**Материал и методы.** Работа проведена на взрослых крысах-самцах линии Вистар (n=3), которых содержали и умерщвляли с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Головной мозг был фиксирован в цинк-этанол-формальдегиде [6], обезвожен и залит в парафин обычным способом, его фронтальные срезы толщиной 5 и 10 мкм, соответствующие уровню стереотаксических координат: Брегма +0,2 — Брегма +0,48 мм [15], получали с помощью ротационного микротомы RM2125RT (Leica, Германия). Перед постановкой иммуноцитохимических реакций проводили тепловое демаскирование антигена в модифицированном цитратном буфере (S1700, Dako, Дания) [4]. Иммуноцитохимическое выявление виментина проводили с помощью мышиных моноклональных антител (клон V9, Dako, Дания) в разведении 1:100. В качестве вторичных молекул для микроскопии в проходящем свете были использованы реагенты из набора EnVision+ HRP/DAB anti-Mouse (Dako, Дания). Визуализацию продукта реакции антиген—антитело осуществляли хромогеном 3'-диаминобензидином из набора DAB+ (Dako, Дания). После постановки реакции часть срезов докрашивали гематоксилином.

Для конфокальной лазерной микроскопии были использованы биотинилированные антимышинные Fab-фрагменты иммуноглобулинов ослы (Jackson ImmunoResearch, США) и

### Сведения об авторах:

*Кирик Ольга Викторовна* (e-mail: olga\_kirik@mail.ru), *Коржевский Дмитрий Эдуардович* (e-mail: DEK2@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. Акад. Павлова, 12;

*Назаренкова Анна Владимировна* (e-mail: rhucus@mail.ru), *Суфиева Дина Азатовна* (e-mail: rondo-13@mail.ru), кафедра цитологии и гистологии, Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

стрептавидин, конъюгированный с флюоресцентными красителями — индокарбоданином (Cy3, разведение 1:100; Invitrogen, США) и DyLight 405 (разведение 1:100; Jackson ImmunoResearch, США) [3]. Для того, чтобы отличить отростки эпендимоцитов от отростков субэпендимных астроцитов, в которых иногда может присутствовать виментин [5], была проведена иммуноцитохимическая реакция на глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), входящий в состав промежуточных филаментов астроцитов. Для проведения реакции были использованы поликлональные кроличьи антитела к глиальному фибриллярному кислому белку — GFAP (Dako, Дания). В качестве вторичных реагентов использовали козы антикроличьи антитела, конъюгированные с флюорохромом BODIPY-FL (Invitrogen, США) и свиные антикроличьи антитела, конъюгированные с тетраметилпродамин-изотиоцианатом — TRITC (Dako, Дания). После постановки иммуноцитохимических реакций ядра клеток в части срезов докрашивали красителем SYTOX Green (Invitrogen, США) [3], который избирательно связывается с ДНК. Полученные препараты исследовали при помощи конфокального лазерного микроскопа LSM 710 (Zeiss, Германия) с аргоновым лазером (488 нм), диодным лазером (405 нм) и твердотельным лазером (561 нм). Обработку полученных изображений и трехмерную реконструкцию объектов проводили с помощью компьютерных программ LSM Image Browser, Zen-2011 и Zen-2012 (Zeiss, Германия).

**Результаты исследования.** После проведения иммуноцитохимической реакции на виментин иммунопозитивными (виментин-ИП) были все клетки эпендимы боковых желудочков, внеэпендимные эпендимоциты, клетки эндотелия кровеносных сосудов, отдельные астроциты, расположенные в мозолистом теле, клетки мягкой оболочки мозга и клетки, расположенные в области поверхностной глиальной пограничной мембраны основания мозга.

Виментин-ИП отростки эпендимоцитов в области субвентрикулярной зоны (СВЗ) многочисленны и разнонаправлены. Часть из них заканчивается на поверхности кровеносных сосудов и участвуют в формировании периваскулярной глиальной пограничной мембраны. В стриатуме отростки выглядят как небольшие (10–30 мкм) виментин-ИП отрезки, располагающиеся радиально (т.е. под углом  $90 \pm 5 - 10^\circ$  к поверхности желудочка).

При конфокальной микроскопии препаратов, окрашенных с использованием антител к виментину и GFAP, отчетливо выявляется структурная и цитохимическая неоднородность отростков, расположенных в субэпендимной области латеральной стенки бокового желудочка. Основания всех отростков эпендимоцитов являются виментин-ИП, но имеют морфологические различия. У одних клеток отростки формируются при переходе вытянутой базальной части тела в широкие основания отростков. У других клеток отростки не имеют отчетливо выраженной переходной

зоны. Они примерно одной толщины (0,6–0,9 мкм) на всем видимом протяжении и начинаются на базальной или базолатеральной поверхности тела клетки (рис. 1). У трети эпендимоцитов в области СВЗ отростки не определяются (см. рис. 1). По цитохимическим особенностям отростки можно разделить на 3 группы в зависимости от наличия в них тех или иных белков промежуточных филаментов — виментина, GFAP или двух этих белков одновременно (виментин/GFAP-ИП).

В СВЗ встречаются все типы отростков, они ориентированы в разных направлениях и образуют густую сеть (см. рис. 1), также выявляются тела GFAP-иммунопозитивных (GFAP-ИП) астроцитов, однако тела клеток, которые были бы виментин-ИП или виментин/GFAP-ИП, отсутствуют, за исключением виментин-ИП внеэпендимных эпендимоцитов, встречающихся редко и имеющих характерную форму. Кровеносные сосуды, обнаруживаемые в этой области, оплетены отростками всех трех типов, фрагменты отростков перечисленных типов присутствуют и в нейропиле стриатума.

Вдоль средней трети латеральной стенки бокового желудочка встречаются единичные эпендимоциты с длинными виментин/GFAP-ИП отростками, которые заканчиваются на сосудах, и отдельные виментин-ИП отростки. GFAP-ИП отростки и тела клеток в этой области многочисленны, в субэпендимной зоне они образуют сплошной слой и иногда контактируют с эпендимоцитами выстилки желудочка (рис. 2).

Среди эпендимоцитов, выстилающих латеральную стенку бокового желудочка, встречаются единичные клетки, содержащие в перинуклеарной области оба белка промежуточных филаментов — виментин и GFAP (см. рис. 1).

**Обсуждение полученных данных.** В результате проведенного исследования были подтверждены полученные нами ранее данные [1, 2], что интенсивную реакцию на виментин дают все клетки эпендимы и внеэпендимные эпендимоциты. Обнаружено, что не все эпендимоциты имеют отчетливо выявляемые отростки. У части этих клеток (около  $1/3$ ) такие отростки отсутствуют. Особенности структурной организации отростков позволяют предположить их участие в различных процессах, происходящих в субэпендимной зоне и окружающем нейропиле. Ранее было высказано мнение [11], что в области СВЗ, где у взрослых животных происходят процессы нейрогенеза, пул нейрогенных клеток изолирован отростками астроцитов. Наши данные показывают, что, наряду с астроцитами, эпендимоциты и их отростки могут участвовать в создании

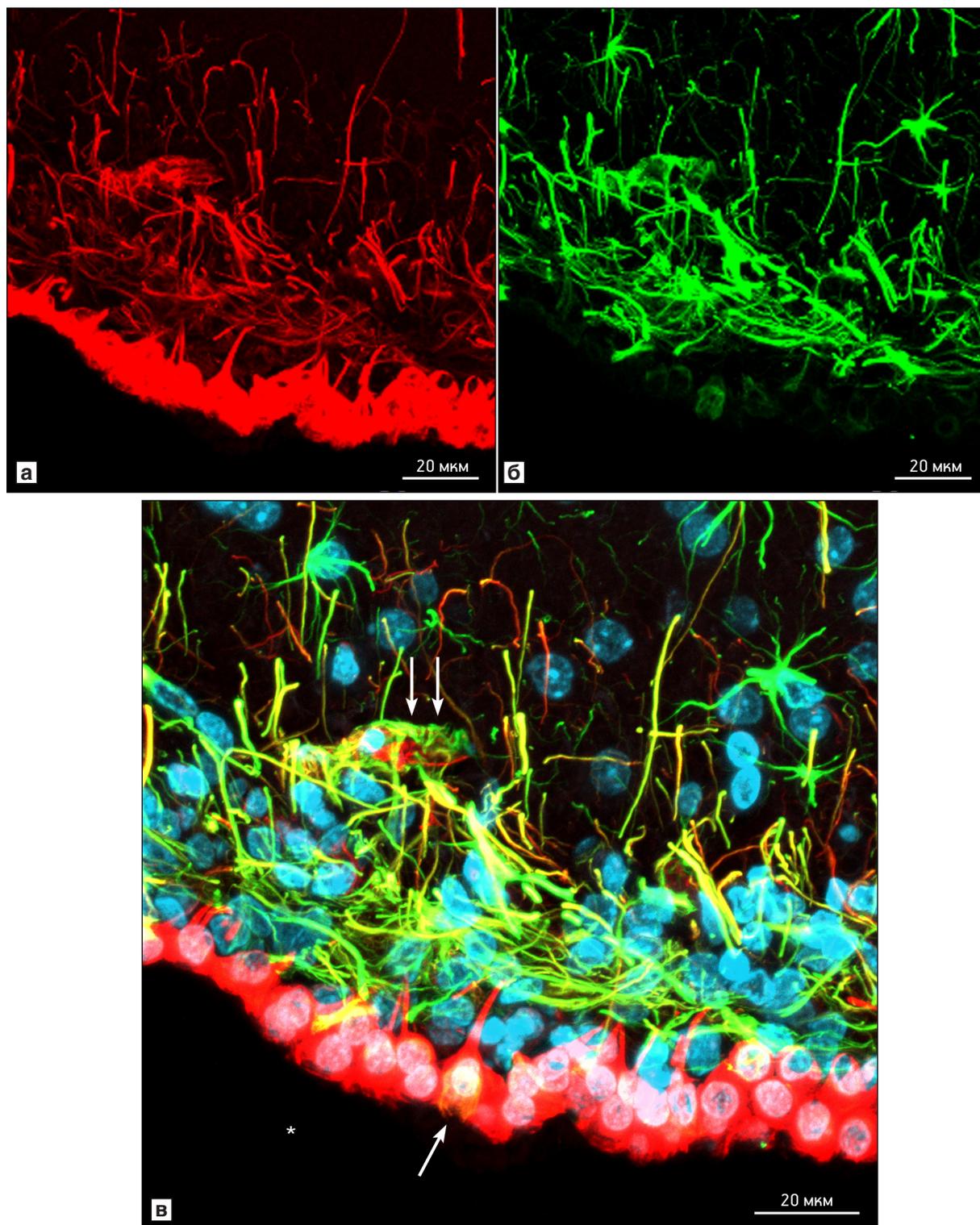


Рис. 1. Участок стенки бокового желудочка головного мозга крысы в области субвентрикулярной пролиферативной зоны.

Звездочка — полость желудочка; стрелка — типичный эпендимоцит, у которого часть цитоскелета образована промежуточными филаментами смешанного состава (виментин/глиальный фибриллярный кислый белок GFAP); две стрелки — кровеносный сосуд. Конфокальная лазерная микроскопия. Раздельное (а, б) и объединенное (в) представление зеленого, красного и синего каналов. Иммуноцитохимическая реакция на виментин, визуализация с помощью флюорохрома Су3 (красный цвет). Иммуноцитохимическая реакция на GFAP, визуализация с помощью флюорохрома BODIPY-FL (зеленый цвет). Ядра окрашены красителем Hoechst 33342 (голубой цвет). Изображение получено путем проекции 125 оптических срезов (величина Z-серии — 12,40 мкм) в программе LSM Image Browser (Zeiss, Германия)

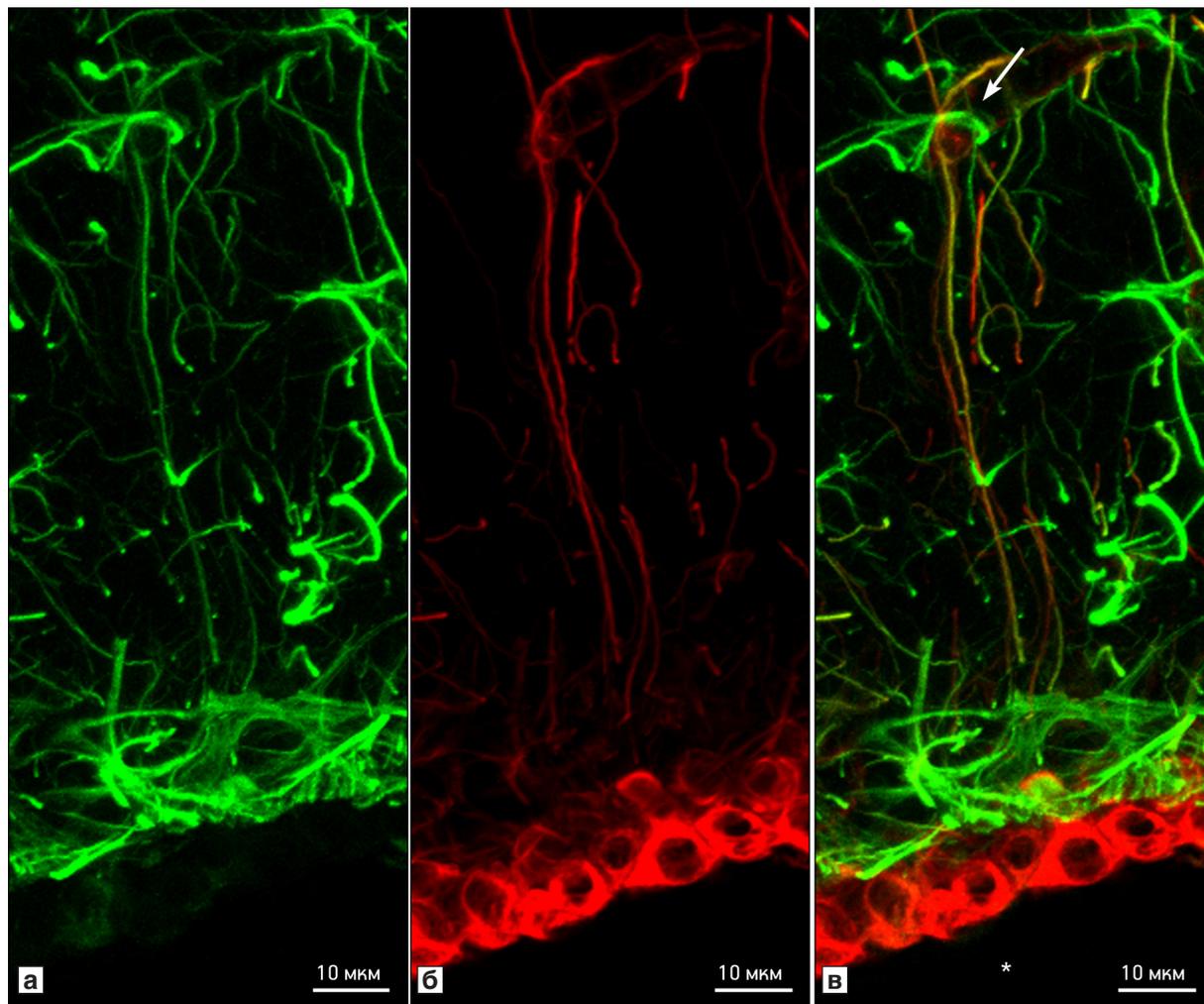


Рис. 2. Участок боковой стенки латерального желудочка головного мозга крысы.

Звездочка — полость желудочка; стрелка — кровеносный сосуд. Конфокальная лазерная микроскопия. Трехмерная реконструкция клеточных элементов в режиме «Maximum basic» в программе ZEN 2011 (Zeiss, Германия), разделное (а, б) и объединенное (в) представление зеленого и красного каналов. Иммуноцитохимическая реакция на виментин, визуализация с помощью флюорохрома Су3 (красный цвет). Иммуноцитохимическая реакция на глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), визуализация с помощью флюорохрома BODIPY-FL (зеленый цвет). Величина Z-серии — 7,40 мкм, количество оптических срезов — 38

микроокружения для нейрогенных клеток в СВЗ. Это заключение следует из взаимного расположения отростков разных типов, наблюдаемых в СВЗ вокруг групп безотростчатых клеток. Клетки с длинными виментин-ИП отростками, уходящими вглубь стриатума, как считают некоторые исследователи [12], являются аналогом радиальных глиоцитов и служат опорой для мигрирующих в стриатум клеток [10]. Нами были обнаружены клетки с отростками, дающими ИП-реакцию на виментин и GFAP одновременно и имеющими связь с кровеносными сосудами. Такие отростки подобны отросткам таницитов III желудочка головного мозга, однако отличаются от них составом промежуточных филаментов цитоскелета. Клетки эпендимы, которым принадлежат эти отростки, могут играть роль особых коммуникативных элементов на уровне гематоликворного

барьера. Учитывая некоторое сходство структурной организации выявленных таницитоподобных клеток с радиальными глиоцитами [7, 12], можно предположить участие именно этих клеток в регуляции миграции из СВЗ вновь образованных при нейрогенезе нейробластов.

Таким образом, в результате настоящего исследования установлены ряд новых фактов, которые важны для понимания тканевой организации и биологической роли эпендимы желудочков головного мозга. Это: наличие базальных отростков у большинства эпендимоцитов, выстилающих стенку боковых желудочков; существование в составе эпендимы особых виментин-ИП таницитоподобных клеток, участвующих при помощи своего базального отростка в формировании периваскулярной глиальной пограничной мембраны; и присутствие в составе эпендимы типичных эпен-

димочитов, у которых часть цитоскелета образована промежуточными филаментами смешанного состава (виментин/GFAP).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кирик О.В., Коржевский Д.Э. Виментин в клетках эпендимы и субвентрикулярной пролиферативной зоны конечного мозга крысы // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2012. № 4. С. 210–214.
2. Кирик О.В., Коржевский Д.Э. Внеэпендимные эпендимочиты головного мозга крысы // Морфология. 2013. Т. 143, вып. 3. С. 71–73.
3. Кирик О.В., Назаренкова А.В., Суфиева Д.А. Трехмерная визуализация эпендимы и таницитов головного мозга крысы // Морфология. 2014. Т. 145, вып. 1. С. 63–66.
4. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Карпенко М.Н. и др. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии: Руководство / Под ред. Д.Э. Коржевского. 2-е изд. СПб.: СпецЛит, 2014.
5. Коржевский Д.Э., Ленцман М.В., Кирик О.В., Отеллин В.А. Виментин-иммунопозитивные клетки конечного мозга крысы после экспериментального ишемического инсульта // Морфология. 2007. Т. 132, вып. 5. С. 23–27.
6. Коржевский Д.Э., Сухорукова Е.Г., Гилерович Е.Г. Преимущества и недостатки цинк-этанол-формальдегида как фиксатора иммуноцитохимических исследований и конфокальной лазерной микроскопии // Морфология. 2013. Т. 143, вып. 2. С. 81–85.
7. Обухов Д.К., Пушина Е.В. Нейрогенез и пролиферативные зоны в ЦНС взрослых животных // Успехи соврем. естествознания. 2013. № 5. С. 18–22.
8. Coskun V., Wu H., Bianchi B. et al. CD133+ neural stem cells in ependyma of mammalian postnatal forebrain // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. Vol. 105, № 3. P. 1026–1031.
9. Del Bigio M.R. Ependymal cell: biology and pathology // Acta. Neuropathol. 2010. Vol. 119, № 1. P. 55–73.
10. De Marchis S., Fasolo A., Puche A.C. Subventricular zone-derived neuronal progenitors migrate into the subcortical forebrain of postnatal mice // J. Comp. Neurol. 2004. Vol. 476, № 3. P. 290–300.
11. Garcia-Verdugo J.M., Doetsch F., Wichterle H. et al. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells // Inc. J. Neurobiol. 1998. Vol. 36. P. 234–248.
12. Gubert F., Zaverucha-do-Valle C., Pimentel-Coelho P.M. et al. Radial glia-like cells persist in the adult rat brain // Brain Res. 2009. Vol. 1258, № 3. P. 43–52.
13. Leonhardt H., Desaga U. Recent observations on ependyma and subependymal basement membranes // Acta. Neurochir. (Wien). 1975. Vol. 31, № 3–4. P. 153–159.
14. Merkle F.T., Tramontin A.D., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. Radial glia give rise to adult neural stem cell in the subventricular zone // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. Vol. 101, № 50. P. 17528–17432.
15. Paxinos G., Watson Ch. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 4<sup>th</sup> Edit. San Diego: Acad. Press, 1998.

Поступила в редакцию 25.09.2014

#### STRUCTURAL ORGANIZATION OF THE PROCESSES OF EPENDYMOCYTES LINING THE LATERAL VENTRICLES OF THE RAT BRAIN

*O.V.Kirik<sup>1</sup>, D.A.Sufiyeva<sup>2</sup>, A.V.Nazarenkova<sup>2</sup>, D.E.Korzhevskiy<sup>1</sup>*

The aim of this study was to examine the structural organization of processes of ependymocytes lining the lateral ventricles of the rat brain using vimentin immunocytochemistry and confocal laser microscopy. The study was performed on adult male rats (n=3). It was found that most typical ependymocytes had basal processes, while  $\frac{1}{3}$  of these cells had none. Some vimentin-immunopositive tancyte-like cells with long processes approaching blood vessels, were found inside the ependymal lining. In some typical ependymocytes, cytoskeleton was formed by intermediate filaments of mixed type containing both vimentin and glial fibrillary acidic protein.

**Key words:** *brain, ependyma, lateral ventricles, ependyma, ependymocyte processes, tancytes*

<sup>1</sup> Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAS North-Western Branch Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg; <sup>2</sup> Department of Cytology and Histology, Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technologies, St. Petersburg State University