

© Е.С. Петрова, 2011
УДК 612.015.3486611.831.31-089.843:599.323.4

Е.С. Петрова

ВИМЕНТИН И ГЛИАЛЬНЫЙ ФИБРИЛЛЯРНЫЙ КИСЛЫЙ БЕЛОК В КЛЕТКАХ ЭКТОПИЧЕСКИХ НЕЙРОТРАНСПЛАНТАТОВ НЕОКОРТЕКСА КРЫС

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; e-mail: iemmorphol@yandex.ru

Цель настоящей работы — изучение экспрессии белков промежуточных филаментов — виментина и глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в клетках неокортекса эмбриона крыс в разные сроки после аллотрансплантации в поврежденный периферический седалищный нерв взрослых животных. Иммуногистохимически прослежено формирование GFAP-позитивных астроцитов из виментин-положительных радиальных глиоцитов в закладках неокортекса эмбриона крыс, развивающихся в поврежденном нерве. Показано, что в этих условиях формирование астроцитов неокортекса эмбриона осуществляется на несколько суток раньше, чем в неокортексе крыс в нормальном онтогенезе. В длительно живущих трансплантатах развивается реактивный глиоз, о чем свидетельствует наличие большого числа интенсивно окрашенных GFAP-позитивных клеток, а также виментин-содержащих астроцитов. Полученные данные свидетельствуют о том, что эктопические нейротрансплантаты могут служить моделью для фундаментальных исследований механизмов развития реактивного глиоза.

Ключевые слова: неокортекс, глиальный фибриллярный кислый белок, виментин, эмбриональное развитие, нейротрансплантация

Иммуногистохимическое выявление белков промежуточных филаментов — виментина и глиального кислого фибриллярного белка (GFAP) — позволяет изучать дифференцировку астроцитов ЦНС млекопитающих [15, 19]. Известно, что предшественниками астроцитов неокортекса в онтогенезе являются как нейральные стволовые/прогениторные клетки (НСПК), так и радиальные глиоциты [16, 17, 23, 24], однако неясно, каким образом этот процесс осуществляется вне ЦНС. Несмотря на длительную историю изучения развития нервных элементов в эктопических трансплантатах неокортекса [2, 6–10, 12, 14], остается неизученным вопрос о механизмах регуляции дифференцировки глиальных клеток в условиях измененного микроокружения, создаваемых при трансплантации закладки неокортекса в структуры периферической нервной системы. Актуальность такого исследования связана и с возрастанием интереса к применению клеточных технологий для стимуляции регенерации нервов [11, 18, 26] при отсутствии четких представлений о судьбе трансплантированных клеток. Ранее [8] в гетеротопических нейротрансплантатах обнаруживали GFAP-иммунопозитивные клетки, однако длительные сроки развития и зависимость от экспрессии других белков промежуточных филаментов не анализировались.

Цель настоящей работы — изучение экспрессии белков промежуточных филаментов — виментина и GFAP в клетках неокортекса эмбрионов

крыс в различные сроки после аллотрансплантации в поврежденный периферический нерв взрослых животных.

Материал и методы. В работе были использованы 20 самцов и 5 беременных самок крыс линии Вистар массой 200–250 г. У эмбрионов 14–15 сут развития выделяли дорсолатеральную стенку переднего мозгового пузыря и под эфирным наркозом пересаживали в поврежденный седалищный нерв взрослым животным по описанной ранее методике [7, 10]. Содержание крыс и все эксперименты осуществляли с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Фрагменты седалищных нервов с трансплантатами фиксировали в жидкости Буэна и цинк-формалин-этанол [4] через 1, 3, 7, 15, 30 сут и 12–18 мес после операции, обезжизивали, заливали в парафин, изготавливали срезы толщиной 5 мкм. Для выявления GFAP — маркера астроцитов использовали поликлональные кроличьи антитела (Dako, Дания); для выявления виментина — белка, характерного для радиальных глиоцитов и эпендимоцитов крыс [5] — моноклональные мышинные антитела (клон V-9, Dako, Дания). После промывки в фосфатном буфере (pH 7.4) препараты обрабатывали вторичными биотинилированными антителами и стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена, входящими в набор LSAB2 (Dako, Дания). Пероксидазную метку выявляли с помощью хромогена DAB+ (Dako, Дания). Часть срезов докрашивали толуидиновым синим по Ниссли или астровым синим.

Результаты исследования. Исходный материал для трансплантации — дорсолатеральная стенка переднего мозгового пузыря крыс 14–15-х суток пренатального развития, содержащая закладку неокортекса, состоит из пред-

шественников нервных и глиальных клеток и радиальной глии. Иммуногистохимическое исследование показало, что значительная часть клеток в исходном материале экспрессируют виментин. Клеток, содержащих GFAP, в эмбриональной закладке не обнаружено.

В ранние сроки после операции (через 1–3 сут) трансплантаты располагаются в центре или по периферии нервного ствола и состоят, главным образом, из тех же клеточных элементов, что и исходный материал. Через 3 сут, наряду с виментин-положительными клетками, в толще трансплантатов выявляются не дающие иммуноцитохимической реакции клеточные элементы, которые представляют собой, по-видимому, дифференцирующиеся нейробласты. GFAP-позитивные клетки в трансплантатах этих сроков отсутствуют.

Анализ препаратов, окрашенных толуидиновым синим по Нисслю, показал, что через 7 сут после пересадки в трансплантатах образуются кластеры нейробластов, начинает формироваться нейропиль. Иммуногистохимически выявлено, что виментин-содержащие клетки располагаются, главным образом, по периферии трансплантатов, на границе с тканями нерва реципиента. Впервые в этот срок в трансплантатах можно видеть отдельные GFAP-позитивные астроциты (рис. 1, а). Это небольшие клетки разной формы с тонкими отростками, многие из которых достигают значительной длины. GFAP-позитивные клеточные элементы встречаются как в центре, так и на периферии трансплантатов.

Через 15 сут трансплантаты достигают большей степени зрелости: нейрональные элементы представлены молодыми нейронами, между которыми формируется нейропиль. Количество виментин-позитивных клеток уменьшается по сравнению с таковым в предыдущие сроки. Небольшое их число встречается на периферии трансплантатов (рис. 2, а). Количество GFAP-содержащих клеток, наоборот, сильно увеличивается, их отростки формируют густую сеть во всей толще трансплантатов. Интенсивность их окраски

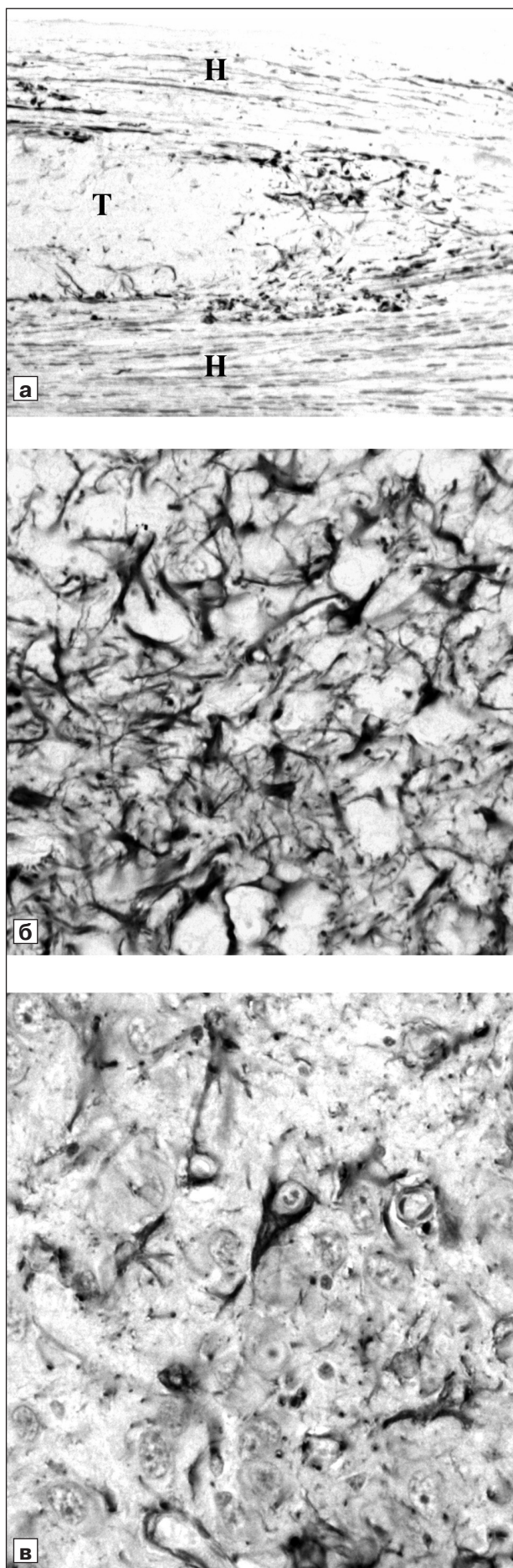


Рис. 1. GFAP-иммунопозитивные клетки в трансплантатах неокортекса 14–15-суточных эмбрионов крыс, развивающихся в седалищном нерве взрослых крыс, через 7 сут (а), 30 сут (б) и 12 мес (в) после пересадки.

Т — трансплантат; Н — ткани нерва реципиента. Иммуногистохимическая реакция на глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP); в — с докраской толуидиновым синим. а — об. 10, ок. 10; б, в — об. 40, ок. 10.

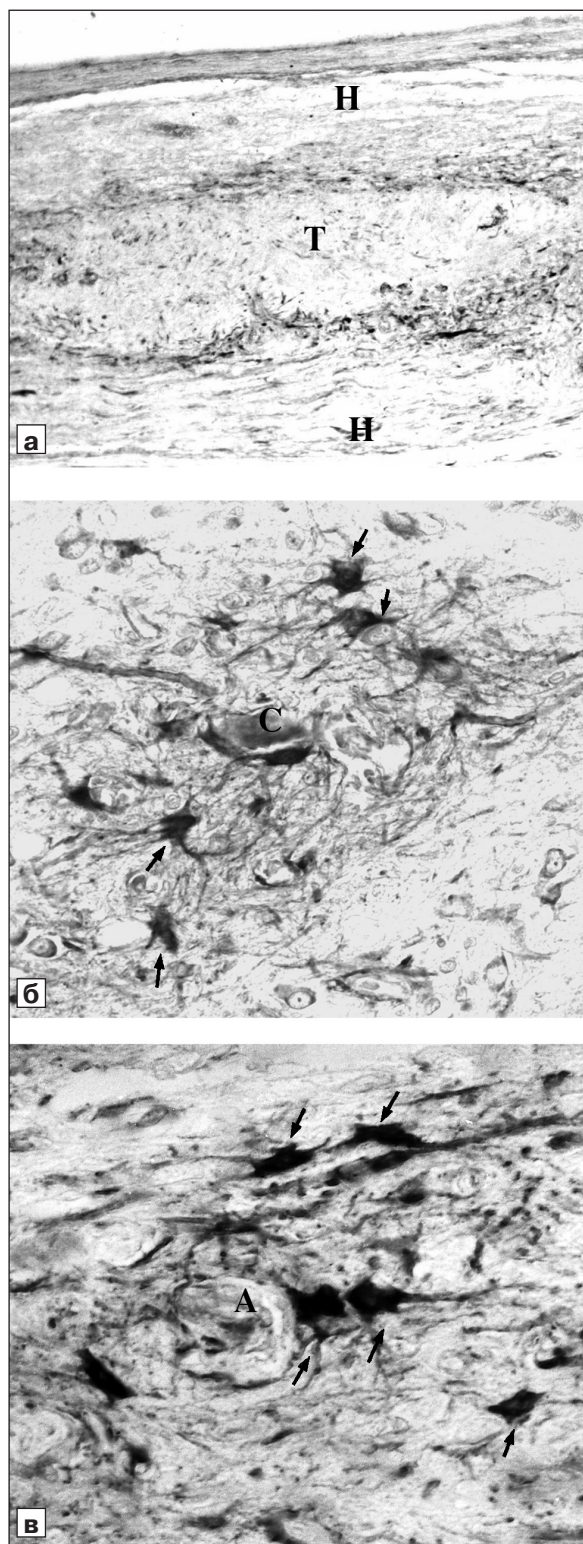


Рис. 2. Виментин-иммунопозитивные клетки в трансплантатах неокортекса 14–15-суточных эмбрионов крыс, развивающихся в седалищном нерве взрослых крыс, через 15 сут (а) и 18 мес (б, в) после пересадки.

А — амилоидоподобное отложение; С — кровеносный сосуд в стадии дегенерации. Стрелки — реактивные астроциты. Остальные обозначения те же, что на рис. 1. а, б, в — иммуногистохимическая реакция на виментин; б — с докраской толуидиновым синим. а — об. 10, ок. 10; б, в — об. 40, ок. 10.

больше, чем в интактном неокортексе взрослых крыс.

Через 30 сут после пересадки на препаратах, окрашенных толуидиновым синим, в трансплантатах можно видеть большое число нервных и глиальных клеток и многочисленные кровеносные сосуды. На границе трансплантатов с тканями нерва реципиента к этому сроку формируется глиальная выстилка. Иммуногистохимически установлено, что на периферии трансплантатов располагаются клетки кубической формы, экспрессирующие виментин. Как и в предыдущий срок, в трансплантатах содержится большое количество GFAP-позитивных активированных астроцитов (см. рис. 1, б).

Спустя длительные сроки после операции (12–18 мес), в трансплантатах закладок ЦНС эмбрионов в нерве наблюдаются дегенеративные процессы: гибель части нейронов, нарушение кровоснабжения, дистрофические изменения нервных клеток, отложение амилоидоподобных структур и др. Происходят изменения и в экспрессии белков промежуточных филаментов. В толще трансплантатов можно видеть большое число GFAP-позитивных реактивных астроцитов с гипертрофированной цитоплазмой и толстыми отростками (см. рис. 1, в). Часть клеток в толще трансплантатов вновь начинают экспрессировать виментин. По своему строению они сходны с реактивными астроцитами (см. рис. 2, б, в). Нередко они располагаются вокруг кровеносных сосудов в местах, где происходит нарушение кровоснабжения: дегенерация клеточных элементов стенок сосудов (см. рис. 1, в), а также в местах амилоидоподобных отложений (см. рис. 2, б).

Обсуждение полученных данных. Использованные в настоящей работе иммуногистохимические методы позволили проследить динамику формирования GFAP-позитивных астроцитов из пересаженных виментин-содержащих клеток-предшественников. Показано, что дифференцировка пересаженных клеток в астроциты осуществляется в трансплантатах в течение первых 15 сут после операции. Виментин-позитивные клетки наблюдаются в трансплантатах через 1–3 сут после пересадки. В последующие сроки они встречаются, главным образом, на периферии трансплантатов, где через 30 сут образуется эпендимоглиальная выстилка из виментин-содержащих клеток. Формирование выстилки из эпендимоподобных клеток в трансплантатах неокортекса эмбриона, развивающегося в нерве, отмечалось нами в предыдущих работах [7, 10]. Сравнительное исследование развития трансплантатов неокортекса эмбриона крыс в мозгу, перед-

ней камере глаза и периферическом нерве показало, что наличие выстилки из эпендимоподобных клеток свойственно именно трансплантатам, развивающимся в нерве [8]. Настоящее исследование подтверждает с помощью иммуногистохимического метода, что большинство клеток глиальной выстилки являются эпендимоцитами. Известно, что для эпендимоцитов желудочков интактного мозга крыс характерна экспрессия виментина [5].

Срок 7 сут после операции примечателен тем, что в нейротрансплантатах появляются первые GFAP-позитивные астроциты. Поскольку материалом для трансплантации служили закладки неокортекса эмбрионов 14–15 сут развития, через 7 сут после пересадки можно ожидать, что степень зрелости глиальных клеток трансплантата будет соответствовать таковой у 21-суточных плодов. Однако на 21-е сутки пренатального онтогенеза у крысы GFAP-позитивные астроциты в неокортексе отсутствуют. По литературным данным, у грызунов процесс дифференцировки астроцитов в мозгу происходит в постнатальный период [3, 22]. Это отличает их от приматов и человека, у которых формирование астроцитов осуществляется в эмбриогенезе [13, 17, 21]. В настоящей работе показано, что в период с 7-х по 15-е сутки пересаженные радиальные глиоциты в большинстве своем дифференцируются в астроциты. По данным А.В. Гилярова [3], при развитии неокортекса у крысы в нормальном онтогенезе виментин-позитивные радиальные глиоциты исчезают, а GFAP-позитивные астроциты формируются в период от 10-х до 14-х суток постнатального развития. Ранее А. Tuba и соавт. [22] показали, что формирование из виментин-позитивных радиальных глиоцитов GFAP-позитивных астроцитов в неокортексе крыс *in situ* происходит в период со 2-й по 3-ю неделю после рождения. Таким образом, по результатам данного исследования формирование астроцитов в эктопических трансплантатах осуществляется на несколько суток раньше, чем при развитии соответствующих эмбриональных закладок мозга в нормальном онтогенезе. Ускорение астроглиогенеза в мозгу в условиях нейротрансплантации отмечалось и при гомотопических пересадках [1, 22]. Причина этого явления не ясна и может быть связана с развитием реактивного глиоза, вызванного повреждением эмбриональной ткани при трансплантации.

Особого обсуждения требуют полученные данные об экспрессии исследуемых белков промежуточных филаментов в клетках нейротрансплантатов в длительные сроки после пересадки. Через 12–18 мес, когда в пересаженных фрагментах мозга наблюдаются дегенеративные процессы

[6, 9], в них можно видеть густую сеть интенсивно окрашенных GFAP-позитивных клеток. Они располагаются как в центре, так и на периферии трансплантатов. Интенсивность окраски астроцитов значительно превосходит таковую в неокортексе взрослых крыс. Важной особенностью длительно живущих трансплантатов является формирование в них виментин-содержащих астроцитов. Многие из них гипертрофированы и имеют толстые отростки, что свидетельствует об их реактивности. В литературе формирование виментин-позитивных астроцитов описано при экспериментальной ишемии мозга [5]. Считается, что присутствие таких клеток в мозгу при нейродегенеративных заболеваниях и при травме головного мозга свидетельствует о реактивном глиозе [25].

Таким образом, процесс дифференцировки виментин-иммунопозитивных радиальных глиоцитов в GFAP-позитивные астроциты в трансплантатах неокортекса эмбриона крыс, пересаженных в нерв, осуществляется раньше, чем при развитии неокортекса крысы в нормальном онтогенезе. В длительно живущих трансплантатах наличие большого числа интенсивно окрашенных GFAP-позитивных клеток, а также виментин-содержащих астроцитов свидетельствует о развитии реактивного глиоза. Результаты работы показывают, что эктопические нейротрансплантаты являются удобной моделью для фундаментальных исследований механизмов дифференцировки астроцитов и развития реактивного глиоза. Полученные данные необходимо учитывать при проведении работ, касающихся использования нейротрансплантатов для стимулирования регенерации поврежденных периферических нервов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александрова М.А. Механизмы дифференцировки нервной ткани и межклеточные взаимодействия при нейротрансплантации у млекопитающих: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1999.
2. Виноградова О.С. Методы культивирования нервной ткани *in vivo*. В кн.: Руководство по культивированию нервной ткани. М., Наука, 1988, с. 49–66.
3. Гиляров А.В. Нестин в клетках головного мозга крыс (иммуногистохимическое исследование): Автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб., 2008.
4. Коржевский Д.Э. и Гиляров А.В. Основы гистологической техники. СПб., СпецЛит., 2010.
5. Коржевский Д.Э., Ленцман М.И., 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.
6. Отеллин В.А. и Петрова Е.С. Строение длительно живущих трансплантатов эмбриональных закладок ЦНС крыс. Морфология, 1998, т. 113, вып. 2, с. 39–44.

7. Петрова Е.С. Развитие эмбриональных закладок ЦНС крыс в поврежденном периферическом нерве: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 1991.
8. Петрова Е.С. и Отеллин В.А. Особенности развития гомо- и гетеротопических аллотрансплантатов эмбрионального неокортекса крыс. Цитология, 2000, т. 42, № 8, с. 750–757.
9. Петрова Е.С. и Отеллин В.А. Дистрофические изменения и гибель клеток в длительно живущих гомо- и гетеротопических трансплантатах эмбриональных закладок неокортекса крыс. Бюл. exper. биол., 2003, т. 136, № 9, с. 343–347.
10. Чумасов Е.И. и Петрова Е.С. Имплантация эмбриональных закладок неокортекса и спинного мозга в поврежденный периферический нерв взрослой крысы. Бюл. exper. биол., 1990, т. 108, № 8, с. 198–201.
11. Amoh Y., Li L., Campillo K. et al. Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005, v. 102, № 49, p. 17734–17738.
12. Bernstein J.J. Viability, growth and maturation of fetal brain and spinal cord in the sciatic nerve of adult rat. J. Neurosci. Res., 1983, v. 10, № 4, p. 343–350.
13. Choi B.H. Glial fibrillary acidic protein in radial glia of early human fetal cerebrum: a light and electron microscopic immunoperoxidase study. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 1986, v. 45, № 4, p. 408–418.
14. Doering L.C. and Aguayo A.J. Hirano bodies and other cytoskeletal abnormalities develop in fetal rat CNS grafts isolated for long periods in peripheral nerve. Brain Res., 1987, v. 401, № 1, p. 178–184.
15. Eng L.F., Ghirnikar R.S. and Lee Y.L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). Neurochem. Res., 2000, v. 25, № 9, p. 1439–1451.
16. Juliandi B., Abematsu M. and Nakashima K. Epigenetic regulation in neural stem cell differentiation. Dev. Growth. Differ., 2010, v. 52, № 6, p. 493–504.
17. Levitt P. and Rakic P. Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing Rhesus monkey brain. J. Comp. Neurol., 1980, v. 193, p. 815–840.
18. Nie X., Zhang Y.-J., Tian W.D. et al. Improvement of peripheral nerve regeneration by a tissue-engineered nerve filled with ectomesenchymal stem cells. Int. J. Oral Maxillofac. Surg., 2007, v. 36, № 1, p. 32–38.
19. Pixley S.K. and de Vellis J. Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. Brain Res., 1984, v. 317, ion by a tissue-engineered nerve filled with ectomesenchymal stem cells. Int. J. Oral Maxillofac. Surg., 2007, v. 36, № 1, p. 32–38.
20. Richardson P.M. and Issa V.W.K. Transplantation of embryonic spinal and cerebral tissue to sciatic nerves of adult rats. Brain Res., 1984, v. 298, № 1, p. 146–148.
21. Trivedi R., Gupta R.K., Husain N. et al. Region-specific maturation of cerebral cortex in human fetal brain: diffusion tensor imaging and histology. Neuroradiology, 2009, v. 51, № 9, p. 567–576.
22. Tuba A., Kallai L. and Kalman M. A rapid replacement of vimentin-containing radial glia by glial fibrillary acidic protein-containing astrocytes in transplanted telencephalon. J. Neural Transplant. Plast., 1997, v. 6, № 1, p. 21–29.
23. Voight T. Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. J. Comp. Neurol., 1989, v. 289, № 1, p. 74–88.
24. Wen S., Li H. and Liu J. Epigenetic background of neuronal fate determination. Prog. Neurobiol., 2009, v. 87, № 2, p. 98–117.
25. Widestrand A., Fajerson J., Wilhelmsson U. et al. Increased neurogenesis and astrogenesis from neuronal progenitor cells grafted in the hippocampus of GFAP-/Vim-/mice. Stem Cells, 2007, v. 10, p. 2619–2627.
26. Xiong G., Ozaki N. and Sugiura Y. Transplanted embryonic spinal tissues promotes severed sciatic nerve regeneration in rats. Arch. Histol. Cytol., 2009, v. 72, № 2, p. 127–138.

Поступила в редакцию 23.11.10

VIMENTIN AND GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN IN THE CELLS OF ECTOPIC NEUROTARNSPANTS OF RAT NEOCORTEX

Ye.S. Petrova

The purpose of this study was to investigate the expression of intermediate filament proteins (vimentin and glial fibrillary acidic protein — GFAP) in the cells of embryonic rat neocortex at different time points after its allotransplantation into injured sciatic nerve of adult animals. Using immunohistochemical methods, the differentiation of GFAP-positive astrocytes from vimentin-positive radial glial cells was observed in embryonic rat neocortex, grafted into sciatic nerve. It was shown that the differentiation of the embryonic neocortical astrocytes in the transplants took place a few days earlier than in the rat neocortex during normal ontogenesis. Reactive gliosis was demonstrated in the long-term transplants, as indicated by a large number of intensely stained GFAP-positive cells and vimentin-containing astrocytes. These findings suggest that ectopic neurotarnsplants could serve as a model for fundamental studies of the mechanisms of reactive gliosis development.

Key words: *neocortex, glial fibrillary acidic protein, vimentin, embryonic development, neurotransplantation*

Laboratory of the Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous Tissue, Department of General and Special Morphology, Institute of Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences North-Western Branch, St. Petersburg