

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

ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРА НЕЙРАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК MSI-1 В КОНЕЧНОМ МОЗГУ КРЫСЫ

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, e-mail: iemmorphol@yandex.ru

Цель исследования состояла в изучении распределения клеток, экспрессирующих белок Musashi-1 (Msi-1), считающийся маркером нейральных стволовых клеток, в конечном мозгу крысы. Установлено, что такие клетки концентрируются в субвентрикулярной пролиферативной зоне и диффузно распределены в стриатуме и гиппокампе. Кроме того, интенсивную реакцию на Msi-1 дают нейроны ядра поводка. Полученные результаты не вполне согласуются с существующими представлениями о местах локализации нейральных стволовых клеток в головном мозгу.

Ключевые слова: головной мозг, нейральные стволовые клетки, белок Msi-1

Нейральные стволовые клетки в значительном количестве синтезируют Msi-1 [5] — один из белков группы Musashi, в которую входят регуляторные белки, обладающие способностью связываться с РНК и модулировать экспрессию различных белков, принимающих участие в подготовке к пролиферации и дифференцировке клеток различных тканей [4]. Несмотря на недостаточную информацию о функциях и распределении этого белка в клетках различных тканей, большинством исследователей он рассматривается как маркер нейральных стволовых и прогениторных клеток (НСПК). В последние годы было получено много новых данных о нейрогенезе и нейральных стволовых клетках [1], которые ставят под сомнение специфичность и функциональное значение ранее использовавшихся маркеров НСПК. В связи с этим представляется актуальным изучение распределения Msi-1-иммунопозитивных (Msi-1⁺) клеток в головном мозгу млекопитающих на различных этапах онтогенеза.

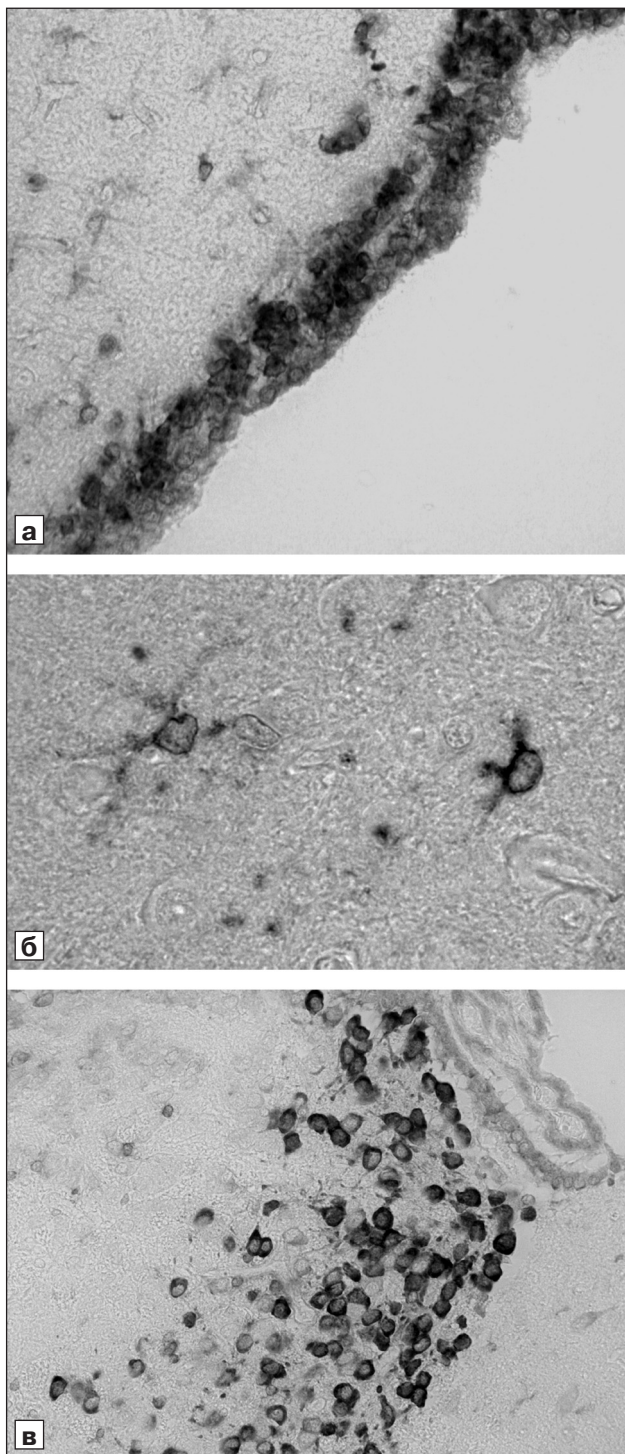
Цель настоящего исследования — морфологическая идентификация клеток, экспрессирующих Msi-1, и изучение их распределения в структурах конечного мозга крысы.

Материал и методы. Эксперименты выполнены на 12 половозрелых крысах-самцах линии Вистар. Содержание и умерщвление животных 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, обезжизняли и заливали в парафин обычным способом.

Морфологическому исследованию подвергали фронтальные срезы головного мозга. Иммуноцитохимическое выявление белка Msi-1 проводили при помощи поликлональных кроличьих антител фирмы Abscam (Великобритания), в качестве вторичных реагентов использовали реактивы из набора Super Sensitive Polymer-HRP Detection Kit HRP/DAB (BioGenex, США). Часть срезов после постановки реакции докрашивали квасцовым гематоксилином. Были поставлены общепринятые контрольные реакции. В качестве положительного контроля был использован головной мозг эмбрионов крыс (14 сут развития), для которого характерна локализация иммунной реакции в пролиферативных зонах, содержащих НСПК.

Результаты исследования. У исследованных животных белок Msi-1 выявляется в большинстве эпендимоцитов боковых желудочков, в небольшой группе эпендимоцитов III желудочка и в эпендимоцитах водопровода. При этом наблюдается локализация этого белка как в ядрах, так и в цитоплазме клеток. Также Msi-1⁺ являются клетки субэпендимной зоны боковых желудочков (рисунок, а), за исключением небольших групп (от 2 до 10) близкорасположенных друг к другу овальных клеток, имеющих узкий ободок цитоплазмы и богатое гетерохроматином ядро. Эти клетки обычно расположены непосредственно под эпендимой. Слабая иммунопозитивная реакция (преимущественно цитоплазмы) наблюдается в клетках сосудистого сплетения III и боковых желудочков мозга.

Среди клеток стриатума встречаются Msi-1⁺-клетки различной формы (как с отростками, так и без них) с локализацией иммунной



Msi-1-иммунопозитивные клетки головного мозга крысы.

а — участок субвентрикулярной зоны (латеральная стенка бокового желудочка); б — отростчатые клетки гиппокампа с локализацией антигена преимущественно в цитоплазме; в — клетки ядра поводка. Иммуноцитохимическая реакция на белок Msi-1 (без подкраски). Ув.: а, в — 400; б — 1000.

реакции в цитоплазме (реже в ядре). Похожие Msi-1⁺-клетки (преимущественно отростчатые) обнаруживаются и в гиппокампе (см. рисунок, б), причем концентрации таких клеток в субгранулярном слое зубчатой извилины не отмечено. В

цитоплазме отростчатых клеток стриатума и гиппокампа продукт реакции имеет преимущественно мелкогранулярный вид (в отличие от такового в эпендимоцитах, в цитоплазме которых он в основном распределен равномерно).

Интенсивная реакция на Msi-1 регистрируется в цитоплазме значительной части клеток (в основном — дифференцированных нейронов) ядра поводка (*nucl. habenulae*). Эти клетки (см. рисунок, в) проявляют более интенсивную реакцию на Msi-1, чем другие Msi-1⁺-клетки головного мозга исследованных животных. Единичные иммунопозитивные нейроны встречаются и в гипоталамусе.

Обсуждение полученных данных. Полученные данные свидетельствуют о том, что белок Msi-1 у крыс в постнатальном онтогенезе синтезируется в большей мере дифференцированными клетками (нейроны, эпендимоциты), чем клетками, которые рассматривают в качестве стволовых и прогениторных (НСПК, «нейрогенные» астроциты [6]). Установленная в настоящей работе локализация этих клеток не вполне согласуется с существующими представлениями о местонахождении НСПК в головном мозгу [1, 5]. Так, наряду с субвентрикулярной зоной, где следует ожидать присутствие НСПК, и клетки которой, как было обнаружено ранее [2], могут содержать и другой предполагаемый маркер НСПК — нестин, Msi-1⁺ являются и эпендимоциты, однако их способность участвовать в нейрогенезе составляет предмет для научной дискуссии [3, 4]. Исходя из существующих знаний о функциях Msi-1, представляется затруднительным объяснить высокую экспрессию Msi-1 в зрелых нейронах ядра поводка, от которых трудно ожидать трансформации в прогениторные клетки. Тем не менее, полученные результаты достоверны, о чем свидетельствуют полное отсутствие фоновой окраски в обработанных препаратах и характерная локализация иммунной реакции в положительном контроле (эмбриональном мозге крысы).

Таким образом, адекватность использования Msi-1 для выявления нейральных стволовых клеток в головном мозгу крысы может быть подвергнута сомнению. Установленные факты следует учитывать при использовании белка Msi-1 в качестве маркера НСПК. Они нуждаются в объяснении, которое можно будет дать только в ходе дальнейшего изучения функций белков из группы Musashi.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д.Э. Нейрогенез и нейральные стволовые клетки. Мед. академ. журн., 2010, т. 10, № 4, с. 175–182.
2. 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.
3. 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.
4. Sakakibara S., Nakamura Y., Satoh H. and Okano H. RNA-binding protein Musashi2: Developmentally regulated expression in neural precursor cells and subpopulations of neurons in mammalian CNS. J. Neurosci., 2001, v. 21, № 20, p. 8091–8207.
5. Yagita Y., Kitagawa K., Sasaki T. et al. Differential expression of Musashi 1 and nestin in the adult rat hippocampus after ischemia. J. Neurosci. Res., 2002, v. 69, № 6, p. 750–756.
6. Zheng T., Marshall G.P., Laywell E.D. and Steindler D.A. Neurogenic astrocytes transplanted into the adult mouse lateral ventricle contribute to olfactory neurogenesis, and reveal a novel intrinsic subependymal neuron. Neuroscience, 2006, v. 142, № 1, p. 175–185.

Поступила в редакцию 23.11.10
Получена после доработки 08.02.11

NEURAL STEM CELL MARKER MSI-1 EXPRESSION IN RAT TELENCEPHALON

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

The aim of the study was to examine the distribution of cells expressing Msi-1 (Musashi-1) protein which is believed to be a marker of neural stem cells, in rat telencephalon. These cells were found to be concentrated in the subventricular proliferative zone and diffusely scattered in striatum and hippocampus. Moreover, neurons with extensive Msi-1 reaction were found in habenular nuclei. The data obtained are not in full agreement with current views on the localization of neural stem cells in the brain.

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

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; Laboratory of Comparative Respiratory Physiology, RAS I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, St. Petersburg