

© Д.Э. Коржевский, О.В. Кирик, 2008
УДК 612.015.358:611.61.018:595.323.4

Д.Э. Коржевский и О.В. Кирик

БЕЛКИ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФИЛАМЕНТОВ НЕСТИН И ВИМЕНТИН В КЛЕТКАХ ПОЧКИ КРЫСЫ

Отдел морфологии (зав. — чл.-кор. РАН В.А. Отеллин) Института экспериментальной медицины РАН, Санкт-Петербург

Существование в почке клеток, содержащих ряд нейроглиальных маркеров — нестина, виментина и глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) — неожиданный факт, который нуждается в детальном исследовании. В связи с этим цель настоящей работы состояла в иммуноцитохимическом выявлении и определении структур, содержащих эти белки в почке крысы. Иммуноцитохимическую реакцию проводили с использованием моноклональных мышиных антител и поликлональных кроличьих антител. В результате исследования было установлено, что в почечном тельце выявляются как нестин-, так и виментин-иммуноположительные клетки (подоциты). Также виментин был выявлен в клетках наружной стенки капсулы клубочка, единичных клетках проксимального и дистального канальцев нефрона, трубчатых структурах мозгового вещества, в клетках стромы почки. Клетки, содержащие GFAP, в почке не обнаружены. Таким образом, для подоцитов сформированной почки крысы характерно сочетание белков промежуточных филаментов нестина и виментина, что указывает на возможность сходства цитофизиологических свойств этих клеток со свойствами активированных астроцитов ЦНС.

Ключевые слова: почка, подоциты, нестин, виментин, иммуноцитохимия.

Белок промежуточных филаментов — нестин — был впервые обнаружен в нейральных стволовых клетках [15, 16] и в настоящее время считается одним из маркеров нейральных стволовых и других прогениторных клеток [2]. Виментин, другой белок промежуточных филаментов, обнаруживается в широком спектре клеток мезенхимного и нейрального происхождения. Он выполняет в клетках важную структурную и физиологическую функции: распределение этого белка определяет форму ядра и цитоплазмы клетки, способствует их механической стабильности и устойчивости к стрессорным воздействиям [12, 14]. Виментин участвует в обеспечении ядерно-цитоплазматического транспорта веществ в клетке [9].

Недавние противоречивые сообщения об обнаружении у млекопитающих в развивающейся и зрелой почке клеток, экспрессирующих нестин, виментин и глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) [10, 12] — белки промежуточных филаментов нейральных стволовых клеток, радиальных глиоцитов и астроцитов [2, 7, 13], требуют подтверждения и уточнения, поскольку до последнего времени считалось, что экспрессия нестина характерна лишь для полипотентных пролиферирующих (или способных к пролиферации) клеток. Существование в почке клеток, содержащих ряд нейроглиальных маркеров, представляется неожиданным фактом, который нуждается в детальном исследовании.

В связи с этим цель настоящей работы — определение в почке крысы структур, в которых

обнаруживаются белки промежуточных филаментов — нестин, виментин и GFAP.

Материал и методы. Исследованы почки 8 беспородных половозрелых самцов крыс. При умерщвлении животных руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.). Материал фиксировали 2% раствором формалина на 80 ° этаноле, обезвоживали и заливали в парафин по общепринятой методике. Готовили серийные срезы толщиной 5 мкм на ротационном микротоме Leica RM 2125RT (Германия). Часть срезов окрашивали гематоксилином — эозином. Иммуноцитохимически выявляли нестин, виментин и GFAP при помощи моноклональных мышиных антител (Rat-401, BD Pharmingen, США), (V-9, DAKO, Дания) и поликлональных кроличьих антител, вторичных антимышиных и антикроличьих реагентов EnVision+ и LSAB-2 и хромогена DAB+ (DAKO, Дания) в соответствии с опубликованными рекомендациями [3]. После постановки иммуноцитохимических реакций часть срезов докрашивали квасцовым гематоксилином или астровым синим. Для выявления виментина методом конфокальной микроскопии вместо конъюгата стрептавидина и пероксидазы из набора LSAB2 использовали конъюгат стрептавидина и флюоресцин изотиоцианата — FITC (DAKO, Дания). Ядра клеток окрашивали флюоресцентным красителем Neuge Trace — deep red (Molecular Probes, США). После промывки в фосфатном буфере (pH 7,4) срезы заключали в водорастворимую среду DAKO Fluorescence Mounting Medium (DAKO, Дания). Полученные препараты исследовали при помощи конфокального микроскопа LSM5 Pascal (Zeiss, Германия). Флюоресценцию индуцировали гелий-неоновым (длина волны 633 нм) и аргоновым (длина волны 488 нм) лазерами. Получали серию последовательных неперекрывающихся изображений оптических срезов (Z-серию) с интервалом 1 мкм. Для пространственной реконструкции сложной структуры иммунопозитивных клеток и их отростков проводили

совмещение полученных последовательных изображений с помощью программы LSM Image Browser (Zeiss, Германия).

Результаты исследования. При анализе препаратов, обработанных моноклональными антителами к нестину, установлено, что в почках крыс интенсивная иммуноположительная реакция выявляется преимущественно в отростчатых клетках, расположенных в почечном тельце в непосредственной связи с капиллярными петлями клубочка (рисунок, а). При использовании иммерсионного объектива ($\times 100$) светового микроскопа в периферических участках клубочка можно наблюдать, что тела нестин-иммунопозитивных клеток располагаются снаружи от капилляра, а от их толстых (около 5 мкм) отростков отходят более тонкие (около 1 мкм и менее), идущие параллельно друг другу и охватывающие капилляр (см. рисунок, б). Создается впечатление, что эндотелиоциты капилляров клубочка не дают положительной реакции на нестин, поскольку в участках, где отчетливо видны отростки иммунопозитивных клеток, охватывающие капилляр, хорошо заметны и щелевидные промежутки между ними, на фоне которых иммунопозитивной реакции каких-либо структур не определяется. В корковом веществе вне почечного тельца, а также в мозговом веществе, сосудах и гладких миоцитах, паранефральной жировой клетчатке и в области ворот почки отчетливая реакция на нестин не определяется.

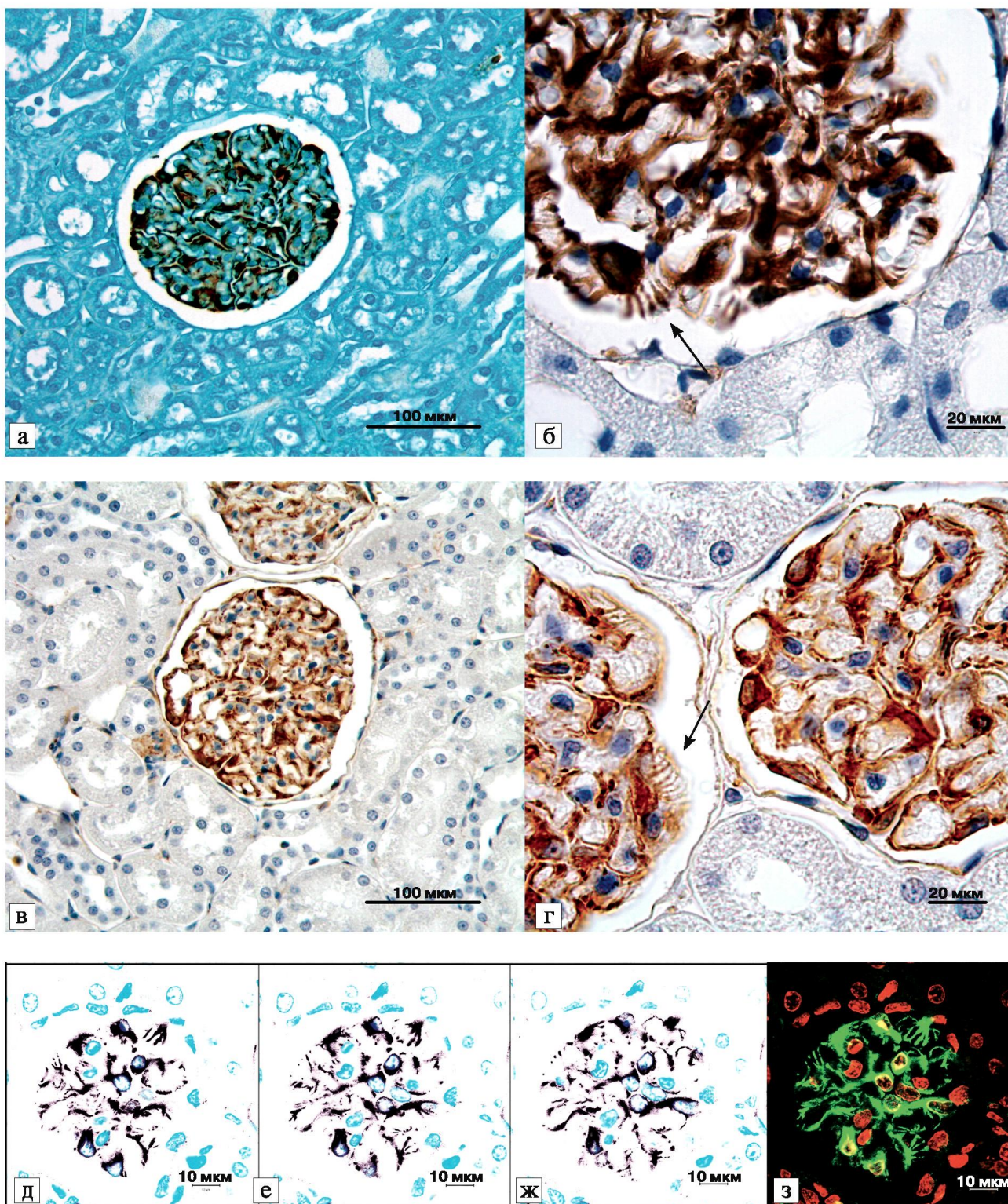
Анализ препаратов, обработанных антителами к виментину, показал более разнообразную картину распределения этого белка в структурах почки по сравнению с таковой при использовании нестина. Так, в почечном тельце интенсивно окрашиваются клетки, аналогичные по строению нестин-положительным клеткам (см. рисунок, в–з). С помощью конфокальной микроскопии удастся определить структуру этих клеток не только на периферии, но и в центральных участках клубочка. Эти клетки имеют крупные овальные ядра, богатые эухроматином. Наиболее интенсивна реакция на виментин в перинуклеарной области и крупных отростках. Группы тонких отростков, отходящих от более толстого отростка, охватывают капилляры (см. рисунок, з). На поперечных сечениях капилляров по периметру располагаются четкообразные утолщения, разделенные небольшими светлыми промежутками, внутри от которых не определяется иммунопозитивных структур. Как правило, слабую реакцию на виментин дают клетки наружной стенки капсулы клубочка (см. рисунок, в, г), однако в некоторых почечных тельцах клетки наружной стенки капсулы не содержат виментина (см. рисунок, д–з).

В проксимальном и дистальном канальцах нефрона среди эпителиоцитов встречаются единичные клетки, содержащие виментин, который располагается как перинуклеарно, так и в непосредственной близости от плазмолеммы. По морфологическим характеристикам эти клетки не отличаются от соседних эпителиоцитов. В мозговом веществе почки выявляются группы трубчатых структур, клетки, цитоплазма которых дает равномерно-интенсивную реакцию на виментин.

В строме почки, в корковом и в мозговом веществе встречаются единичные виментин-положительные отростчатые и округлые клетки, расположенные в пространствах между канальцами. В сосудах почки иммуноположительными к виментину оказываются как клетки внутренней оболочки (вероятно, эндотелиоциты), так и отдельные клетки средней оболочки, отчетливо различимые в артериях (вероятно, гладкие миоциты). Кроме того, виментин содержится в цитоплазме единичных небольших округлых клеток (лимфоцитов), обнаруживающихся в интерстициальной ткани почки.

Обработка препаратов почки крысы поликлональными антителами к GFAP в соответствии со стандартными и адаптированными для максимального выявления этого белка протоколами не позволила выявить в корковом и мозговом веществе каких-либо GFAP-позитивных клеток. Использование комбинации методических подходов, направленных на повышение чувствительности иммуноцитохимической реакции (высокотемпературная обработка срезов, увеличение сроков инкубации срезов с первичными антителами и продолжительности обработки в растворе диаминобензидина), приводило к развитию фоновой окраски препаратов с незначительно более высокой интенсивностью в отдельных участках почечных телец. Полученные результаты не дают основания для заключения о существовании GFAP-позитивных структур в корковом и мозговом веществе почки.

Обсуждение полученных данных. В настоящее время изучению нестина как маркера нейральных стволовых клеток и как особого компонента цитоскелета уделяется большое внимание. Обнаружено, что, помимо клеток ЦНС, нестин экспрессируют недифференцированные и делящиеся клетки мышечных тканей [19, 21]. Представленные в настоящей работе данные о выявлении белков промежуточных филаментов нестина и виментина в клетках почечного тельца, расположенных вдоль капиллярных петель и имеющих цитоплазматические отростки, охваты-



Почечные тельца коркового вещества почки крысы.

а, б — нестин-иммунопозитивные клетки; в, г — виментин-иммунопозитивные клетки; д–ж — три последовательных (через 1 мкм) оптических среза и результат их проекции на плоскость (з), полученные с помощью конфокального микроскопа. Стрелки — группы тонких отростков иммунопозитивных клеток, охватывающие капилляры. Иммуноцитохимическая реакция на нестин (а, б) и виментин (в, г–з) с докраской астровым синим (а), квасцовым гематоксилином (б–г) и ядерным красителем Neuro Trace (д–ж). д–ж — изображение инвертировано.

вающие капилляр, позволяют идентифицировать эти клетки исходя из их структурной организации как подоциты, составляющие внутреннюю стенку капсулы клубочка и являющиеся высокодифференцированными клетками. Следует отметить, что размеры отростков подоцитов, определяемые при конфокальной микроскопии и микроскопии в проходящем свете, по-видимому, больше, чем описанные при электронной микроскопии [1]. Это может быть связано как с более распространенным отложением гранул красителя, так и с высокой интенсивностью флюоресценции иммунопозитивных структур. Кроме того, наличие больших промежутков между отростками указывает на то, что при световой микроскопии удастся наблюдать только более крупные цитоподии (цитопедикюлы [1]), тогда как дистальные участки отростков, содержащие меньше белков промежуточных филаментов, не выявляются.

Полученные данные подтверждают мнение E. Bertelli и соавт. [8] о том, что подоциты действительно синтезируют нестин. Проведенное исследование не обнаружило нестина в эндотелии капилляров клубочка. Возможность существования в составе цитоскелета эндотелиоцитов нестина существует [4], однако без электронно-микроскопического исследования в сочетании с иммуноцитохимическим либо конфокально-микроскопическим исследованием с двойной меткой, решить вопрос о присутствии нестина в эндотелии капилляров клубочка окончательно не представляется возможным. Обычно экспрессия нестина изменяется в ходе дифференцировки клеток. При этом по мере дифференцировки клетки происходит подавление экспрессии нестина другими белками промежуточных филаментов [18, 21]. Подоциты, вероятно, представляют собой редкий тип дифференцированных клеток, в которых экспрессия нестина сохраняется. К клеткам этой группы можно отнести также клетки надпочечника [9, 20] и клетки Лейдига [17]. Вопрос о функции, выполняемой нестином в перечисленных клетках, остается открытым. Присутствие нестина в дифференцированных клетках может быть связано с особенностями их функций, требующих сложной и однотипной организации цитоскелета.

Сходное распределение нестина и виментина в клетках почечного тельца, вероятно, связано с неспособностью нестина к формированию гомодимеров при построении промежуточных филаментов [2]. Сочетание виментина и нестина характерно и для активированных астроцитов головного мозга [4]. При этом в части активированных астроцитов обнаруживается сочетание виментина с GFAP. В настоящем исследовании

убедительных свидетельств в пользу наличия GFAP в клетках почечного тельца нет, несмотря на применение высокочувствительных методов детекции связавшихся первичных антител [5, 6], что дает основание для заключения об отсутствии в подоцитах почки крысы GFAP в количестве, сопоставимом с таковым в цитоплазме астроцитов головного мозга. Эти данные противоречат результатам исследования G.H. Bunatian и соавт. [10], которые были получены с использованием других антител, на молодых животных и в культуре ткани. Это противоречие может объясняться существованием перекрестной реактивности у применявшихся [10] первичных антител, а также особенностью цитоскелета подоцитов молодых животных. Кроме того, экспрессия белков промежуточных филаментов, наблюдаемая в клетках, культивируемых *in vitro*, может отличаться от экспрессии белков в этих клетках *in situ*.

Таким образом, для подоцитов почки крысы характерно сочетание белков промежуточных филаментов нестина и виментина, что указывает на возможность сходства цитофизиологических свойств этих клеток со свойствами активированных астроцитов ЦНС. В то же время это сходство цитоскелетной организации не полное, в связи с отсутствием сопоставимых количеств третьего белка промежуточных филаментов, определяемого в активированных астроцитах — GFAP.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект — 05-04-49397).

ЛИТЕРАТУРА

1. Валькович Э.И. и Скворцова М.Ю. Дифференцировка эпителиев капсулы капиллярных клубочков почек у крыс в онтогенезе. Морфология. 1997, т. 112, вып. 4, с. 67–72.
2. Гиляров А.В. Нестин в клетках центральной нервной системы. Морфология, 2007, т. 131, вып. 1, с. 85–90.
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. 78–80.
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. Коржевский Д.Э. и Отеллин В.А. Иммуноцитохимическое выявление астроцитов в срезах головного мозга в сочетании с окраской по Нисслю. Морфология, 2004, т. 125, вып. 3, с. 100–102.
6. Коржевский Д.Э. и Юмкина Е.А. Применение методов теплового демаскирования антигенов на парафиновых срезах головного мозга крысы. Морфология, 2005, т. 127, вып. 2, с. 76–77.
7. Отеллин В.А., Коржевский Д.Э., Косткин В.Б. и др. Нейропротекторный эффект креатина при ишемии головного мозга. Докл. РАН, 2003, т. 390, № 3, с. 406–408.

8. Bertelli E., Regoli M., Fonzi L. et al. Nestin expression in adult and developing human kidney. *J. Histochem. Cytochem.*, 2007, v. 55, № 4, p. 411–421.
9. Bertelli E., Regoli M., Lucattelli M. et al. Nestin expression in rat adrenal gland. *Histochem. Cell Biol.*, 2002, v. 117, p. 371–377.
10. Buniatian G.H., Hartman H-J., Traub P. et al. Glial fibrillary acid protein — positive cells of the kidney are capable of raising a protective biochemical barrier similar to astrocytes: expression of metallothionein in podocytes. *Anat. Rec.*, 2002, v. 267, p. 296–306.
11. Chen J., Boyle S., Zhao M. et al. Differential expression of the intermediate filament protein nestin during renal development and its localization in adult podocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2006, v. 17, № 5, p. 1283–1291.
12. Goldman R.D., Chou Y.H., Dessev C. et al. Dynamic aspects of cytoskeletal and karyoskeletal intermediate filament system during the cell cycle. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1991, v. 56, p. 629–642.
13. Hausmann R., Riess R., Fieguth A. and Betz P. Immunohistochemical investigations on the course of astroglial GFAP expression following human brain injury. *Int. J. Legal. Med.*, 2000, v. 1136, № 2, p. 70–75.
14. Helmke B.P., Goldman R.D. and Davies P.F. Rapid displacement of vimentin intermediate filaments in living endothelial cell exposed to flow. *Circ. Res.*, 2000, v. 86, № 7, p. 745–752.
15. Hockfield S. and McKay R.D.G. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J. Neurosci.*, 1985, v. 5, p. 3310–3328.
16. Lendahl U., Zimmerman L. and McKay R.D. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 1990, v. 60, № 4, p. 585–595.
17. Lobo M.V., Arenas M.I., Alonso F.J. et al. Nestin, a neuroectodermal stem cell marker molecule, is expressed in Leydig cells of the human testis and in some specific cell types from human testicular tumors. *Cell Tiss.*, 2004, v. 316, p. 369–376.
18. Lothian C. and Lendahl U. An evolutionarily conserved region in the second intron of the human nestin gene directs gene expression to CNS progenitor cells and early neural crest cells. *Eur. J. Neurosci.*, 1997, v. 9, p. 452–462.
19. Sejersen T. and Lendahl U. Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development. *J. Cell Sci.*, 1993, v. 106, p. 1292–1300.
20. Toti P., Regoli M., Nesi G. et al. Nestin expression in normal adrenal gland and adrenocortical tumors. *Histol. Histopathol.*, 2005, v. 20, p. 1115–1120.
21. Zimmerman L., Parr B., Lendahl U. et al. Independent regulatory elements in the nestin gene direct trans gene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron.*, 1994, v. 12, p. 11–24.

Поступила в редакцию 07.05.07
Получена после доработки 13.06.07

INTERMEDIATE FILAMENT PROTEINS NESTIN AND VIMENTIN IN THE CELLS OF RAT KIDNEY

D.E. Korzhevskiy and O.V. Kirik

The data on the presence of the kidney cells can contain neuroglial markers (nestin, vimentin, glial fibrillar acidic protein — GFAP) appeared unexpected and require a detailed investigation. Therefore, the purpose of the current study was to demonstrate the structures containing these proteins in the rat kidney by means of immunocytochemistry. Immunocytochemical staining was performed using the antimouse monoclonal and antirabbit polyclonal antibodies. It was demonstrated that the renal corpuscle contained both nestin- and vimentin-immunopositive cells (podocytes). Vimentin was also detected in the cells of parietal epithelium of the glomerular capsule, single cells of proximal and distal tubular epithelium, medullary tubular structures, and in the stromal cells. No GFAP-positive cells were detected in the kidney. Thus, the combination of nestin and vimentin was found to be typical for adult rat kidney podocytes. This suggests probable similarity of cytophysiological properties of podocytes and activated CNS astrocytes.

Key words: *kidney, podocytes, nestin, vimentin, immunocytochemistry.*

Department of Morphology, RAMS Scientific Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg.