

НУКЛЕОЛИН И ЯДРЫШКИ В ЭПЕНДИМОЦИТАХ И ТАНИЦИТАХ ТРЕТЬЕГО ЖЕЛУДОЧКА ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ

© Д. А. Суфиева, О. В. Кирик, Д. Э. Коржевский¹

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376;

¹ *электронный адрес: dek2@yandex.ru*

Целью данной работы было проведение сравнительного исследования организации ядрышкового аппарата эпендимочитов, таницитов и секреторных клеток субкомиссурального органа с помощью иммуногистохимической реакции на нуклеолин и конфокальной лазерной микроскопии. Материалом для исследования послужили фрагменты промежуточного мозга половозрелых крыс-самцов линии Вистар ($n = 6$). Материал был фиксирован в цинк-этанол-формальдегиде — специальном фиксаторе, обеспечивающем высокую сохранность антигенных детерминант. В данной работе оценивали такие параметры, как диаметр ядрышек и их количество на ядро в различных типах клеток, образующих выстилку третьего желудочка. Впервые был проведен сравнительный анализ ядрышек в разных субпопуляциях таницитов и получены данные о распределении в клетках выстилки желудочков белка нуклеолина, локализация и содержание которого отражают функциональный статус клетки. Полученные данные будут способствовать установлению взаимосвязи параметров, характеризующих ядрышковый аппарат, с функциональным состоянием клетки при различных условиях (стресс, малигнизация и другие патологические состояния).

Ключевые слова: ядрышко, нуклеолин, эпендимочиты, танициты, субкомиссуральный орган, иммуногистохимия, конфокальная лазерная микроскопия.

Принятые сокращения: СКО — субкомиссуральный орган, СМЖ — спинномозговая жидкость, ЦВО — циркумвентрикулярные органы.

В настоящее время известно, что для различных областей выстилки третьего желудочка характерна гетерогенность. Так, например, выстилку циркумвентрикулярных органов (ЦВО) — структур, характеризующихся наличием фенестрированных капилляров и отсутствием гематоэнцефалического барьера, образуют высокоспециализированные глиальные клетки — танициты (срединное возвышение) или таницитоподобные клетки (субфорникальный орган, сосудистый орган терминальной пластинки, самое заднее поле) (Langlet et al., 2013), а также эпителиоциты сосудистого сплетения (Joly et al., 2007; Коржевский, 2003). Исключением из этого правила является субкомиссуральный орган (СКО), в котором, во-первых, отсутствуют капилляры фенестрированного типа, во-вторых, выстилка в этой области образована особыми секреторными эпендимными клетками (Guerra et al., 2015).

В средней части третьего желудочка располагаются такие ЦВО, как срединное возвышение и СКО. Срединное возвышение является одним из наиболее охарактеризованных ЦВО. Выстилка желудочка в этой области образована таницитами. Эти клетки в отличие от ресничных эпендимочитов характеризуются наличием длинного базального отростка, контактирующего с капиллярами прилежащей нервной ткани. Танициты в этой области подразделяются на 4 субпопуляции ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ и $\beta 2$ -танициты), различающиеся как своей локализацией в пределах инфундибулярного углубления, так и рядом структур-

ных, цитохимических и функциональных характеристик (Rodriguez et al., 2010).

Другим ЦВО, расположенным в составе выстилки средней части третьего желудочка, является СКО. Известно, что СКО подразделяется на два слоя — эпендимный и гипендимный. Клетки, образующие эти два слоя, выделяют различные вещества (СКО-спондин, транстиретин, фактор роста фибробластов и др.) в кровь и спинномозговую жидкость (СМЖ). Несмотря на многочисленные исследования структурных и цитохимических характеристик клеток, образующих ЦВО, эта структура на сегодняшний день остается одной из наименее изученных (Kaur, Ling, 2017).

Эпендимочиты, танициты и секреторные клетки СКО в связи с их функциональными особенностями характеризуются высокой интенсивностью белкового синтеза. Уровень белкового синтеза коррелирует с организацией ядрышкового аппарата, главной функцией которого является участие в биогенезе рибосом. Так, известно, что размер ядрышка отражает его функциональную активность, а количество ядрышек связано со степенью дифференцировки клетки (Жарская, Зацепина, 2007; Watanabe-Susaki et al., 2014). Вопросы, касающиеся организации ядрышкового аппарата исследуемых типов клеток, остаются на сегодняшний день неизученными. Нуклеолин является одним из главных аргентофильных (Ag-NOR) белков ядрышка, что позволяет использовать его в качестве маркера ядрышек. Данный белок преимущественно локали-

зован в пределах плотного фибриллярного компонента (в меньшей степени — гранулярного компонента) ядрышка; кроме того, этот белок может выявляться также в нуклеоплазме, цитоплазме и в составе плазматической мембраны различных клеток (Зенит-Журавлева, 2012). Известно, что в различных клеточных компартментах нуклеолин выполняет разные функции. Так, согласно литературным данным, ядрышковый нуклеолин вовлечен в регуляцию биогенеза рибосом, цитоплазматический нуклеолин участвует в ядерно-цитоплазматическом транспорте различных белков и рибосомальных субъединиц, а молекулы нуклеолина, локализованные в составе плазматической мембраны, способны связываться с различными лигандами и функционируют как медиаторы внеклеточных сигналов (Tajrish, 2011). Считается, что нуклеолин является одним из ключевых факторов, регулирующих клеточную пролиферацию, что обуславливает высокий уровень экспрессии данного белка в активно пролиферирующих клетках, в том числе в клетках опухолей (Chen, Xu, 2016). Сравнительное изучение ядрышкового аппарата таницитов, секреторных клеток СКО и классических ресничных эпендимоцитов сможет пролить свет на особенности в организации и функционировании этих клеток.

Целью данной работы явилось проведение сравнительного исследования ядрышкового аппарата эпендимоцитов, таницитов и секреторных клеток СКО с помощью иммуногистохимической реакции на нуклеолин и конфокальной лазерной микроскопии.

Материал и методика

Материалом для исследования послужили фрагменты промежуточного мозга половозрелых крыс-самцов линии Вистар ($n = 6$). При содержании и умерщвлении животных соблюдали международные правила Хельсинкской декларации о гуманном обращении с животными и «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Головной мозг фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде, обезжировали и заливали в парафин обычным способом. Изготавливали фронтальные срезы толщиной 5 мкм на уровне от -3.24 до -4.44 мм по отношению к брегме (Paxinos, Watson, 2007). После стандартной процедуры депарафинирования срезы подвергали тепловому демаскированию. Затем проводили двойную иммуногистохимическую реакцию с использованием мышинных моноклональных антител к виментину (клон V-9, Dako, Дания) в разведении 1 : 100 и кроличьих поликлональных антител к нуклеолину (Abscam, Великобритания) в разведении 1 : 200. Применение реакции на виментин в используемой комбинации позволяет четко идентифицировать клетки эпендимы и определять танициты (Kirik, Korzhenskii, 2013; Суфиева и др., 2016). В качестве вторичных реагентов были использованы моновалентный Fab-фрагмент антикроличьего иммуноглобулина осли, конъюгированный с флуорохромом Rhodamine Red™-X (RRX) в разведении 1 : 50 (Jackson ImmunoResearch, США), и моновалентный Fab-фрагмент антимышиного иммуноглобулина осли, конъюгированный с флуорохромом Cy2 в разведении 1 : 50 (Jackson ImmunoResearch, США). Препараты заключали в водорастворимую среду Fluorescence Mounting Medium (Dako, Дания). Анализ полученных препаратов проводили при помощи флуоресцентного микроскопа Leica DM2500 и конфокального

лазерного микроскопа LSM 710 (Zeiss, Германия). Обработку полученных изображений и трехмерную реконструкцию объектов проводили с помощью компьютерных программ LSM Image Browser и Zen-2012 (Zeiss, Германия). Количественная оценка была проведена для 3 животных. Определение диаметра ядрышек осуществляли в программе ImageJ при исследовании не менее 10 случайно выбранных клеток каждого типа. Подсчет ядрышек в ядре клетки проводили при изучении не менее 10 случайно выбранных клеток для каждого их типа, у которых ядро попало в срез целиком.

Результаты

После проведения двойной иммуногистохимической реакции на виментин и белок С23 можно наблюдать, что выстилка третьего желудочка, образованная эпендимоцитами, представляет собой один слой клеток кубической формы. Ядра эпендимоцитов имеют овальную или округлую форму. Количество ядрышек варьирует от 1 до 4, при этом в 80 % случаев в ядрах клеток присутствуют по 2—3 ядрышка и лишь в 20 % — 1 или 4 ядрышка. Средний диаметр ядрышек составляет 1.6 ± 0.1 мкм (рис. 1). Помимо ядрышек положительную иммуногистохимическую реакцию на нуклеолин наблюдали также и в нуклеоплазме эпендимоцитов. Однако если в ядрышках реакция была высокоинтенсивной и равномерной, то в нуклеоплазме белок был распределен неравномерно в виде небольших скоплений с нечеткими границами, а также локализовался по периферии ядра.

Выстилка дна третьего желудочка в области аркуатного ядра гипоталамуса образована таницитами, которые подразделяются на 4 субпопуляции. Наиболее дорсально располагаются $\alpha 1$ -танициты. В области перехода эпендимоцитов в $\alpha 1$ -танициты выстилка приобретает многорядную структуру, после чего она снова становится однорядной. Латеральные стенки дна третьего желудочка выстилают $\alpha 2$ -танициты, которые направляют свои отростки в аркуатное ядро гипоталамуса. $\beta 1$ -танициты образуют выстилку инфундибулярного углубления, а $\beta 2$ — срединного возвышения. Выстилка, образованная $\beta 1$ -таницитами, также характеризуется многорядной структурой. Тела таницитов имеют удлиненную форму, а от базального полюса отходит единственный отросток, который затем может ветвиться. Отростки контактируют с кровеносными капиллярами прилежащей нервной ткани. Ядра таницитов имеют удлиненную и многолопастную форму (характеризуются наличием инвагинаций и выпячиваний ядерной мембраны) (рис. 2). После иммуногистохимической реакции на нуклеолин можно наблюдать, что количество ядрышек, а также их размеры варьируют в разных субпопуляциях таницитов. Так, для $\alpha 1$ -таницитов характерно присутствие от 1 до 4 ядрышек, при этом в основном встречаются 1—3 ядрышка (97 % случаев) и лишь в единичных клетках (3 %) — 4 ядрышка. Средний диаметр этого субкомпартамента составляет 1.7 ± 0.1 мкм (рис. 1). В $\alpha 2$ -таницитах преимущественно наблюдали 1—2 ядрышка (95 %), в единичных клетках — 3 ядрышка (5 %). Средний диаметр ядрышек в этой субпопуляции таницитов составлял 2.2 ± 0.1 мкм (рис. 3). Для $\beta 1$ -таницитов, как правило, характерно присутствие 1 (60 %) или 2 (40 %) относительно крупных ядрышек, средний диаметр которых составляет 2.4 ± 0.1 мкм (рис. 3). В $\beta 2$ -таницитах также в основном локализуется 1 относительно круп-

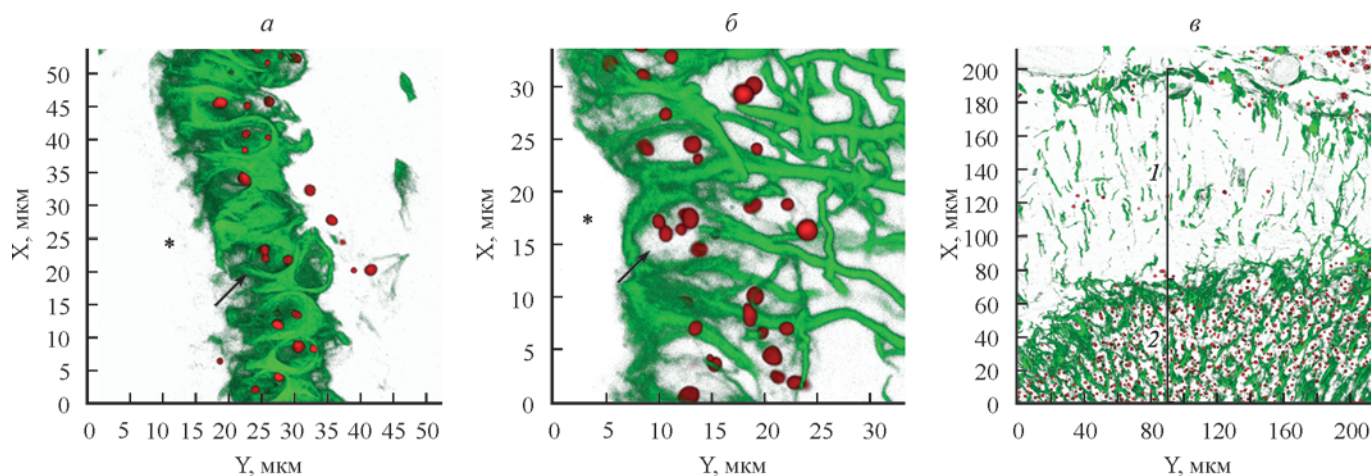


Рис. 1. Выстилка третьего желудочка головного мозга крысы. Трехмерная реконструкция клеточных элементов.

Двойная иммуногистохимическая реакция на виментин (визуализация с помощью флуорохрома Cy2, *зеленый цвет*) и нуклеолин (визуализация с помощью флуорохрома RRX, *красный цвет*). Конфокальная лазерная микроскопия. *a* — эпендимциты третьего желудочка; *b* — α 1-танициты дна третьего желудочка; *в* — гипендимный (1) и эпендимный (2) слой субкоммиссурального органа. Величина Z-серии — 10 (*a*) и 5 (*b*, *в*) мкм, количество оптических срезов — 34 (*a*), 16 (*b*) и 14 (*в*). Объективы C-Apochromat 63 \times /1.20 W Korr M27 (*a*, *b*) и LD C-Apochromat 40 \times /1.1 W Korr M27 (*в*). Реконструкция осуществлена в программном модуле ZEN 2012 (Zeiss, Германия). Звездочкой отмечена полость третьего желудочка, стрелками указаны ядрышки.

ное ядрышко (63 %), реже 2 (37 %). Средний диаметр ядрышек составляет 2.2 ± 0.1 мкм для данной субпопуляции таницитов (рис. 3). Так же как и в эпендимocyтaх, реакцию наблюдали и в нуклеоплазме таницитов, где белок был распределен неравномерно, в виде глыбок, а также по периферии ядра (рис. 2).

Эпендимный слой СКО представляет собой мощный пласт клеток, которые образуют многорядную структуру. При этом тела клеток эпендимного слоя располагаются не у полости желудочка, а в глубине структуры, и кон-

такт с СМЖ осуществляют своими апикальными частями клеток (рис. 3). Гипендимный слой, который располагается глубже, характеризуется наличием небольшого числа клеток, распределенных в СКО крыс неупорядоченно. Также в гипендимном слое видны отдельные идущие параллельно друг другу отростки секреторных биполярных клеток эпендимного слоя, которые контактируют с близлежащими капиллярами нервной ткани, а также с сосудами оболочки мозга (рис. 1). Ядра секреторных клеток как эпендимного, так и гипендимного слоев характеризуются овальной формой. При иммуногистохимической реакции на нуклеолин можно наблюдать, что в эпендимном слое в ядрах клеток, как правило, встречаются 2—3 ядрышка (75 %), реже 1 или 4 ядрышка (25 %), средний диаметр которых составляет 1.4 ± 0.1 мкм. В ядрах клеток гипендимного слоя преимущественно локализуется 1 ядрышко (80 %), в единичных случаях встречаются 2 ядрышка (20 %). Средний диаметр ядрышек составляет 1.6 ± 0.1 мкм. Слабую реакцию на нуклеолин наблюдали в нуклеоплазме клеток. В клетках эпендимного слоя белок был распределен относительно равномерно, в то время как в клетках гипендимного слоя нуклеолин преимущественно локализовался по периферии ядра. Количественные характеристики ядрышек исследуемых типов клеток суммированы в таблице.

Количественные характеристики ядрышек эпендимocyтoв, таницитов и секреторных клеток СКО

Тип клеток	Количество ядрышек на ядро	Средний диаметр наиболее крупного ядрышка, мкм
Эпендимocyтa	1—4	1.6 ± 0.1
α 1-танициты	1—4	1.7 ± 0.1
α 2-танициты	1—3	2.2 ± 0.1
β 1-танициты	1—2	2.4 ± 0.1
β 2-танициты	1—2	2.2 ± 0.1
Эпендимный слой СКО	1—4	1.4 ± 0.1
Гипендимный слой СКО	1—2	1.6 ± 0.1

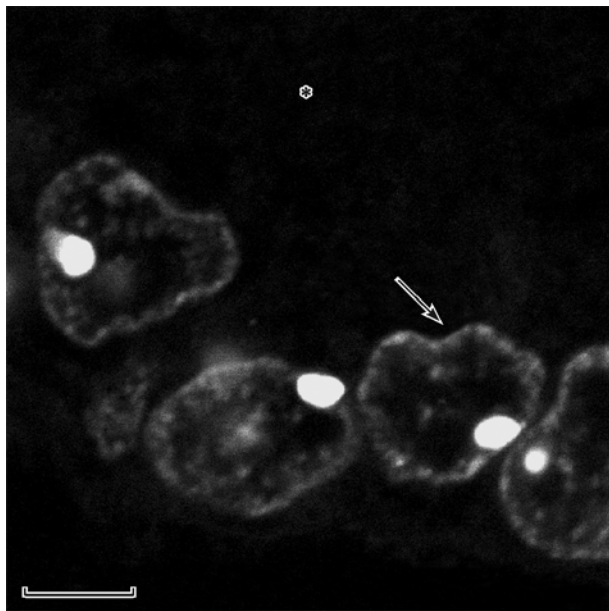


Рис. 2. Распределение нуклеолина в таницитах.

Имуногистохимическая реакция на нуклеолин (визуализация с помощью флуорохрома RRX). Конфокальная лазерная микроскопия. Одиночный оптический срез. Объектив Plan-Apochromat 100 \times /1.40 Oil DIC M27 (масляная иммерсия). Масштабный отрезок — 5 мкм. Звездочкой отмечена полость третьего желудочка, стрелка указывает на инвагинацию ядерной мембраны таницита.

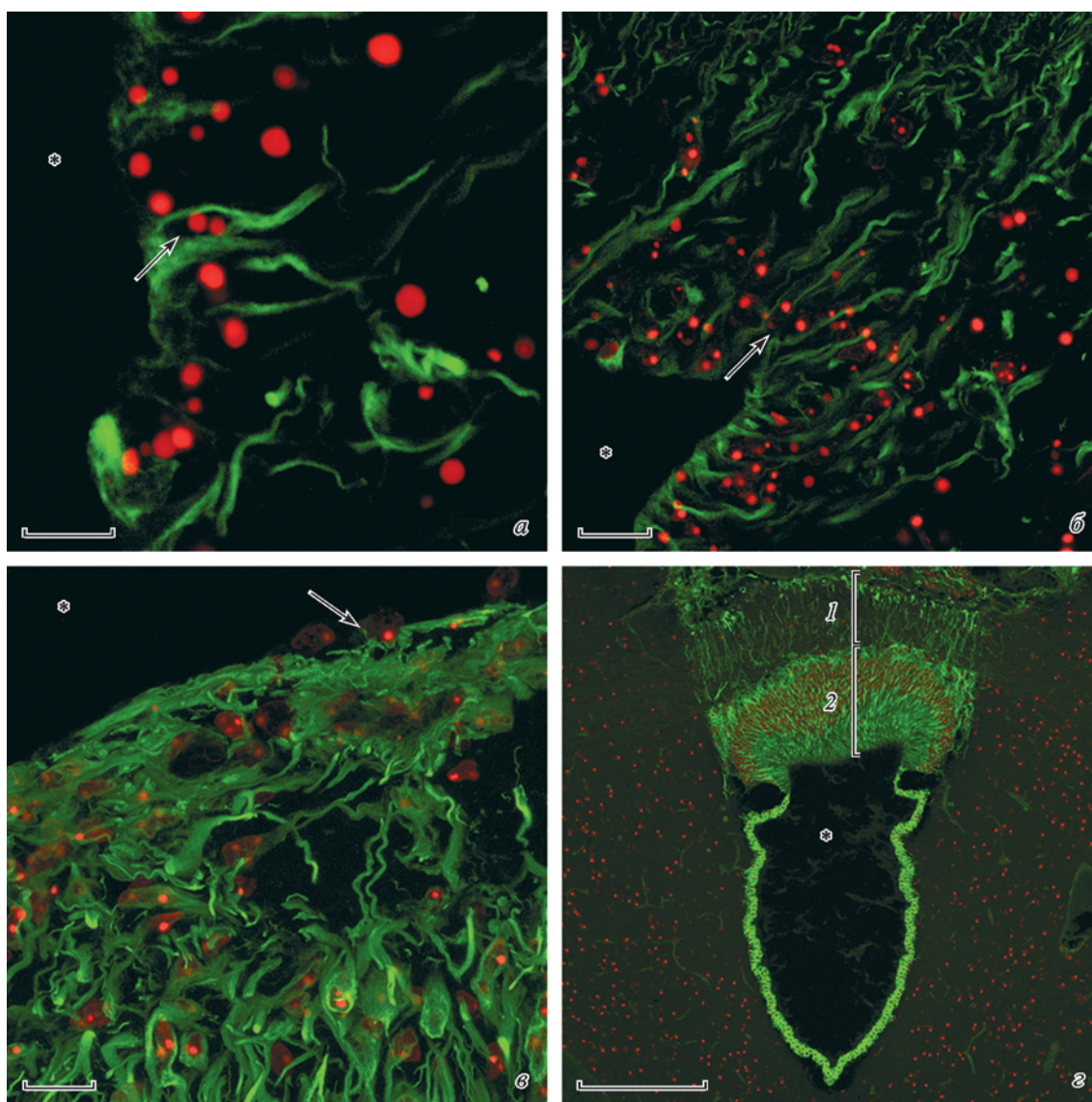


Рис. 3. Танициты и секреторные клетки субкомиссурального органа.

Двойная иммуногистохимическая реакция на виментин (зеленый цвет) и нуклеолин (красный цвет). Конфокальная лазерная микроскопия. *a* — $\alpha 2$ -танициты, *б* — $\beta 1$ -танициты, *в* — $\beta 2$ -танициты. Изображения являются суперпозицией 10 оптических срезов, выполненных с интервалом 0.3 мкм. Объектив C-Apochromat 63 \times /1.20 W Korr M27, zoom — 2.5 (*a*), 1.0 (*б*, *в*). *г* — субкомиссуральный орган. Одиночный оптический срез. Объектив EC Plan-Neofluar 10 \times /0.30 M27. Масштабные отрезки — 10 (*a*), 20 (*б*, *в*) и 200 (*г*) мкм. Звездочкой отмечена полость желудочка, стрелками указаны ядрышки, 1 — гипендимный, 2 — эпендимный слой субкомиссурального органа.

Обсуждение

Ядрышко является эволюционно-консервативным доменом клеточного ядра и присутствует в подавляющем большинстве эукариотических клеток. Данная структура вовлечена в формирование субъединиц рибосом, а также в регуляцию клеточного цикла, апоптоза и старения (Németh, Längst, 2013). На сегодняшний день известно, что размеры ядрышек и их количество в различных клетках одного организма варьируют в зависимости от синтетической активности клетки, а также от степени ее дифференцировки (Téré et al., 2004). Так, было показано, что в процессе дифференцировки клетки эти субкомпарменты ядра имеют тенденцию сливаться в более крупные ядрышки. Также была продемонстрирована положительная корреляция между размером ядрышка и синтетической активностью клетки (Wallace, 1963; Pena et al., 2001). Од-

нако, как правило, эти исследования были проведены в контексте связи этих параметров с различными онкологическими заболеваниями (Derenzini et al., 2009). Поэтому ряд вопросов, касающихся механизма формирования разного количества ядрышек и взаимосвязи функциональной активности клетки с синтетическими процессами, до сих пор остаются открытыми. В связи с этим в литературных источниках все чаще отмечается проблема необходимости проведения сравнительного анализа этих параметров для различных типов клеток как в норме, так и при патологии (Farley et al., 2015). Необходимо отметить, что ядрышковый аппарат в нервной ткани стал предметом тщательного исследования лишь в последнее десятилетие, в связи с накоплением данных о роли нуклеолярного стресса в патогенезе нейродегенеративных заболеваний (Hetman, Pietrzak, 2012; Parlato, Kreiner, 2013). Однако данные исследования сфокусированы на изучении роли

ядрышка в нейронах, в то время как глиальные клетки остаются практически неохарактеризованными. Среди литературных источников присутствуют лишь единичные работы, посвященные изучению ядрышкового аппарата глиальных клеток (астроцитов), которые были рассмотрены в связи с развитием онкологических заболеваний (глиобластом) и прионного заболевания — болезни Крейтцфельда—Якоба (Lafarga et al., 1993; Holmberg Olausson et al., 2015). Таким образом, изучение морфологических особенностей ядрышка в нервной ткани и особенно в глии является одной из актуальных задач современной нейробиологии. В рамках настоящего исследования нами был изучен ядрышковый аппарат в трех различных типах глиальных клеток (эпендимоцитах, таницитах и секреторных клетках СКО), участвующих в образовании выстилки средней части третьего желудочка головного мозга крысы при нормальных условиях.

В данной работе было показано, что разные типы исследуемых клеток различаются как по размерам ядрышек, так и по их количеству. Кроме того, наблюдается вариабельность по этим параметрам и в пределах одного типа клеток. Так, в разных субпопуляциях таницитов средний диаметр ядрышек варьирует от 1.7 до 2.4 мкм, а число ядрышек — от 1—2 до 1—4 на клетку. По всей видимости, эти различия отражают особенности функционирования исследованных клеток. Несмотря на то что танициты являются мономорфной группой, их подразделение на 4 субпопуляции связано с тем, что разные субпопуляции таницитов взаимодействуют с разными структурами медиобазального гипоталамуса и соответственно выполняют различные функции, что в первую очередь проявляется в синтетической активности этих клеток. В настоящей работе было показано, что наблюдается уменьшение числа ядрышек и увеличение их размеров от дорсально расположенных $\alpha 1$ к наиболее вентрально расположенным $\beta 2$ -таницитам. Такое распределение может иметь несколько обоснований. Во-первых, согласно имеющимся в литературе данным, субпопуляция $\alpha 1$ -таницитов отличается от других типов таницитов наличием щелевых контактов, при этом все типы таницитов лишены ресничек. Функциональное значение щелевых контактов в субпопуляции $\alpha 1$ -таницитов до сих пор остается открытым. Предполагают, что $\alpha 1$ -танициты в отличие от других типов таницитов не выполняют транспортную и секреторную функции (Rodriguez et al., 2010). Следовательно, синтетическая активность этих клеток должна быть ниже по сравнению с другими типами таницитов. Нами было показано, что именно эта клеточная субпопуляция характеризуется наименьшим диаметром ядрышек, что может свидетельствовать в пользу предположения о сниженной активности их биосинтетического аппарата. Во-вторых, поскольку в литературных источниках существуют данные о корреляции между степенью дифференцировки клеток и количеством ядрышек (Wallace, 1963), имеется вероятность того, что выявленные различия числа и размеров ядрышек могут быть связаны с различным пролиферативным потенциалом разных субпопуляций таницитов. На сегодняшний день высказано предположение о том, что $\alpha 2$ -танициты во взрослом мозге являются нейральными стволовыми клетками, которые способны давать начало как нейронам, так и глии (Goodman, Najjhosseini, 2015). Это может объяснить присутствие более многочисленных и мелких ядрышек в ядрах α -таницитов, обладающих большим пролиферативным потенциалом, чем β -танициты.

В СКО клетки эпендимного и гипендимного слоев также различаются по числу и размерам ядрышек. Согласно литературным данным, СКО относится к ЦВО секреторного типа, клетки которого выделяют различные вещества в СМЖ (клетки эпендимного слоя), в кровь и субарахноидальное пространство (клетки эпендимного и гипендимного слоев) (Grondona et al., 2012; Kaur, Ling, 2017). Однако нами было установлено, что клетки СКО характеризуются относительно мелкими ядрышками, что свидетельствует о низкой синтетической активности этих клеток. На сегодняшний день существуют данные о том, что СКО помимо секреторных функций также выполняет и рецепторную функцию. Этот орган характеризуется наличием многочисленных рецепторов к различным нейропептидам и нейротрансмиттерам (Nurnberger, Schoniger, 2001). Считается, что такая богатая и разнообразная иннервация необходима для регуляции секреторной активности клеток СКО в процессе онтогенеза и в ответ на мозговую активность (сон—бодрствование, цикл гибернации). Согласно литературным данным, у человека и у летучих мышей СКО функционирует лишь в эмбриогенезе и подвергается регрессии после рождения. Однако у крыс этот ЦВО функционирует на протяжении всей жизни (Miranda et al., 2001). Предполагаемая низкая синтетическая активность клеток СКО у взрослых крыс (исходя из диаметров их ядрышек), возможно, связана с тем, что либо секреторная функция является для этих клеток не основной, либо во взрослом мозге секреторная деятельность СКО отсутствует.

В эпендимоцитах по сравнению с синтетически высокоактивными таницитами ядрышки относительно небольшие. Известно, что основной ролью этих клеток является формирование ликворо-энцефалического барьера, а также участие в транспорте различных веществ (например, глюкозы) из СМЖ в нервную ткань и детоксикации тяжелых металлов (Del Bigio, 2010). Несмотря на то что эти клетки могут синтезировать различные вещества (например, ростовые факторы, белок S100), полученные данные о диаметре ядрышек могут косвенно указывать на невысокий уровень синтетических процессов в этих клетках.

Помимо ядрышек реакцию на нуклеолин наблюдали также и в нуклеоплазме всех исследуемых типов клеток, но не в цитоплазме и в области плазматической мембраны. Эти наблюдения могут быть обусловлены тем, что содержание нуклеолина в цитоплазме и на плазматической мембране ниже порогового уровня, необходимого для определения его с помощью методов иммуноцитохимии и конфокальной лазерной микроскопии. Однако эти данные могут быть связаны и с тем, что в изученных клетках нуклеолин главным образом принимает участие в ядрышковых и ядерных процессах и не участвует в ядерно-цитоплазматическом транспорте и передаче межклеточных сигналов. В нуклеоплазме белок C23 распределялся неравномерно, в виде глыбок с нечеткими границами, либо был приурочен, как правило, к периферии ядра. Известно, что нуклеолин может выступать в качестве шаперона гистонов, участвуя в ремоделировании структуры хроматина (Tajrishi et al., 2011). С этой точки зрения неоднородность распределения изучаемого белка может быть объяснена локальным изменением транскрипционной активности в отдельных зонах хроматина данных клеток.

Ядрышковый аппарат на сегодняшний день является одним из интенсивно изучаемых структур клеточного ядра, однако до сих пор в литературных источниках существуют лишь единичные работы, посвященные изу-

чению ядрышка в клетках выстилки ликвороносных пространств, которые детально изучали лишь с помощью электронной микроскопии. Настоящее исследование представляет собой сравнительный анализ ядрышек с применением современных иммуногистохимических методов и конфокальной лазерной микроскопии, что позволяет с высокой точностью оценить такие параметры, как число ядрышек и их диаметр. В данной работе была показана гетерогенность в организации ядрышкового аппарата различных типов клеток, образующих выстилку третьего желудочка. Впервые был проведен сравнительный анализ размеров и числа ядрышек в различных субпопуляциях таницитов, а также получены данные о распределении в клетках выстилки желудочков такого многофункционального белка, как нуклеолин, локализация и содержание которого отражают функциональный статус клетки. Полученные данные будут способствовать установлению взаимосвязи параметров, характеризующих ядрышковый аппарат с функциональным состоянием клетки при различных условиях (стресс, малигнизация и другие патологические состояния).

Список литературы

- Жарская О. О., Зацепина О. В. 2007. Динамика и механизмы реорганизации ядрышка в митозе. Цитология. 49 (5) : 355—369. (Zharskaya O. O., Zatschina O. V. 2007. Dynamics and mechanisms of the nucleolus reorganization during mitosis. Tsitologiya. 49 (5) : 355—369.)
- Зенит-Журавлева Е. Г., Полковниченко Е. М., Лушников А. А., Трещалина Е. М., Райхлин Н. Т. 2012. Нуклеофозмин и нуклеолин: кодирующие гены и экспрессия в различных тканях животных и человека. Молекуляр. мед. 4 : 24—31. (Zenit-Zhuravleva E. G., Polkovnichenko E. M., Lushnikova A. A., Treshchalina E. M., Buksaeva I. A., Raikhlin N. T. 2012. Nucleophosmin and nucleolin: encoding genes and expression in various human and animal tissues. Mol. Med. (Russia). 4 : 24—31.)
- Коржевский Д. Э. 2003. Сосудистое сплетение головного мозга и структурная организация гематоликворного барьера у человека. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2 (1) : 5—14. (Korzhevskii D. E. 2003. Choroid plexus and structural organization of blood-CSF barrier in human. Regional Haemodynamics and Microcirculation. 2 (1) : 5—14.)
- Суфиева Д. А., Кирик О. В., Алексеева О. С., Коржевский Д. Э. 2016. Белки промежуточных филаментов в таницитах третьего желудочка головного мозга крысы в постнатальном онтогенезе. Журн. эволюц. биохим. и физиол. 52 (6) : 436—443. (Sufieva D. A., Kirik O. V., Alekseeva O. S., Korzhevskii D. E. 2016. Intermediate filament proteins in tanyocytes of the third cerebral ventricle in rats during postnatal ontogenesis. J. Evol. Biochem. Physiol. 52 (6) : 490—498.)
- Chen Z., Xu X. 2016. Roles of nucleolin. Focus on cancer and anti-cancer therapy. Saudi Med. J. 37 : 1312—1318.
- Del Bigio M. R. 2010. Ependymal cells: biology and pathology. Acta Neuropathol. 119 : 55—73.
- Derenzini M., Brighenti E., Donati G., Vici M., Ceccarelli C., Santini D., Taffurelli M., Montanaro L., Treré D. 2009. The p53-mediated sensitivity of cancer cells to chemotherapeutic agents is conditioned by the status of the retinoblastoma protein. J. Pathol. 219 : 373—382.
- Farley K. I., Surovtseva Y., Merkel J., Baserga S. J. 2015. Determinants of mammalian nucleolar architecture. Chromosoma. 124 : 323—331.
- Goodman T., Hajihosseini M. K. 2015. Hypothalamic tanyocytes — masters and servants of metabolic, neuroendocrine, and neurogenic functions. Front. Neurosci. 9 : 2—9.
- Grondona J. M., Hoyo-Becerra C., Visser R., Fernández-Llèbrez P., López-Avalos M. D. 2012. The subcommissural organ and the development of the posterior commissure. Int. Rev. Cell Mol. Biol. 296 : 63—137.
- Guerra M. M., González C., Caprile T., Jara M., Vio K., Muñoz R. I., Rodríguez S., Rodríguez E. M. 2015. Understanding how the subcommissural organ and other periventricular secretory structures contribute via the cerebrospinal fluid to neurogenesis. Front Cell Neurosci. 9 : 1—17.
- Hetman M., Pietrzak M. 2012. Emerging roles of the neuronal nucleolus. Trends Neurosci. 35 : 305—314.
- Holmberg Olausson K., Elsir T., Moazemi Goudarzi K., Nistér M., Lindström M. S. 2015. NPM1 histone chaperone is upregulated in glioblastoma to promote cell survival and maintain nucleolar shape. Sci. Rep. 5 : 1—15.
- Joly J. S., Osório J., Alunni A., Auger H., Kano S., Rétaux S. 2007. Windows of the brain: towards a developmental biology of circumventricular and other neurohemal organs. Semin. Cell Develop. Biol. 18 : 512—524.
- Kaur C., Ling E. A. 2017. The circumventricular organs. Histol. Histopathol. 32 : 879—892.
- Kirik O. V., Korzhevskii D. E. 2013. Vimentin in ependymal cells and subventricular proliferative zone cells of rat telencephalon. Bull. Exp. Biol. Med. 154 : 553—557.
- Lafarga M., Berciano M. T., Saurez I., Andres M. A., Berciano J. 1993. Reactive astroglia-neuron relationships in the human cerebellar cortex: a quantitative, morphological and immunocytochemical study in Creutzfeldt—Jakob disease. Int. J. Develop. Neurosci. 11 : 199—213.
- Langlet F., Mullier A., Bouret S. G., Prevot V., Dehouck B. 2013. Tanyocyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. J. Comp. Neurol. 521 : 3389—3405.
- Miranda E., Almonacid J. A., Rodriguez S., Perez J., Hein S., Cifuentes M., Fernández-Llèbrez P., Rodríguez E. M. 2001. Searching for specific binding sites of the secretory glycoproteins of the subcommissural organ. Microsc. Res. Tech. 52 : 541—551.
- Németh A., Längst G. 2013. Chromatin organization and the mammalian nucleolus. In: Proteins of the nucleolus. Regulation, translocation, & biomedical functions. Netherlands: Springer. 119—148.
- Nurnberger F., Schoniger S. 2001. Presence and functional significance of neuropeptide and neurotransmitter receptors in subcommissural organ cells. Microsc. Res. Tech. 52 : 534—540.
- Parlato R., Kreiner G. 2013. Nucleolar activity in neurodegenerative diseases: a missing piece of the puzzle? J. Mol. Med. (Berlin). 91 : 541—547.
- Paxinos G., Watson C. 2007. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th Edition. Elsevier Inc. 456 p.
- Pena E., Berciano M. T., Fernandez R., Ojeda J. L., Lafarga M. 2001. Neuronal body size correlates with the number of nucleoli and Cajal bodies, and with the organization of the splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons. J. Comp. Neurol. 430 : 250—263.
- Rodriguez E. M., Blázquez J. L., Guerra M. 2010. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieu: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. Peptides. 31 : 757—776.
- Tajrishi M. M., Tuteja R., Tuteja N. 2011. Nucleolin. The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. Commun. Integr. Biol. 4 : 267—275.
- Treré D., Ceccarelli C., Montanaro L., Tosti E., Derenzini M. 2004. Nucleolar size and activity are related to pRb and p53 status in human breast cancer. J. Histochem. Cytochem. 52 : 1601—1607.
- Wallace H. 1963. Nucleolar growth and fusion during cellular differentiation. J. Morphol. 112 : 261—278.
- Watanabe-Susaki K., Takada H., Enomoto K., Miwata K., Ishimine H., Intoh A., Ohtaka M., Nakanishi M., Sugino H., Asashima M., Kurisaki A. 2014. Biosynthesis of ribosomal RNA in nucleoli regulates pluripotency and differentiation ability of pluripotent stem cells. Stem Cells. 32 : 3099—3111.

NUCLEOLIN AND NUCLEOLUS IN EPENDYMOCYTES AND TANYCYTES
OF THE RAT BRAIN THIRD VENTRICLE*D. A. Sufieva, O. V. Kirik, D. E. Korzhevskii¹*

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376;

¹ e-mail: dek2@yandex.ru

The purpose of this work was to conduct a comparative study of the organization of the nucleolus apparatus of ependymocytes, tanyocytes and secretory cells of the subcommissural organ using immunocytochemical reaction to nucleolin and confocal laser microscopy. As a material for the study, the brain of adult male Wistar rats was used (n = 6). The material obtained was fixed in zinc-ethanol-formaldehyde, a fixative providing high preservation of antigenic determinants. In this work, diameter of nucleoli and their number per nucleus were estimated in cells forming the lining of the third ventricle. For the first time, a comparative analysis of nucleoli organization in different types of tanyocytes was carried out. Besides, novel data were obtained on distribution of nucleolin in cells of ventricular lining, the localization and content of which reflects the functional status of the cell. These data will contribute to the establishment of interrelation of the parameters, characterizing the nucleolus organization, and functional status of the cell under various conditions (stress, malignancy and other pathological conditions).

Key words: nucleolus, nucleolin, ependymocytes, tanyocytes, subcommissural organ, immunocytochemistry, confocal laser microscopy.
