

На правах рукописи

СУФИЕВА

Дина Азатовна

**СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И ЦИТОХИМИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ТАНИЦИТОВ ТРЕТЬЕГО ЖЕЛУДОЧКА
ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ**

1.5.22 – Клеточная биология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2022 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении
«Институт экспериментальной медицины»

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук,
профессор РАН

Коржевский Дмитрий Эдуардович

Официальные оппоненты:

Одинцова Ирина Алексеевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой гистологии с курсом эмбриологии Федерального государственного бюджетного военного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Романова Ирина Владимировна — доктор биологических наук, заведующая лабораторией интегративной нейроэндокринологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт Петербургский государственный университет»

Защита состоится «__» _____ 2023 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.158.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу 197022, Санкт-Петербург, Каменноостровский проспект, д. 69/71.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу 197022, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д.12 и на сайте <https://iemspb.ru/science/diss/diss001-022-02/>

Автореферат разослан «__» _____ 202_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук, доцент

Алешина Галина Матвеевна

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Танициты представляют собой высокоспециализированные глиальные клетки, образующие выстилку дна третьего желудочка. Эти клетки имеют биполярную форму и морфологически напоминают радиальную глию. Их тела формируют выстилку инфундибулярного углубления, а базальные отростки проникают в подлежащую нервную ткань и оканчиваются на кровеносных сосудах, в том числе на фенестрированных капиллярах портальной системы гипофиза (Rodriguez E. et al., 2019). Танициты являются многофункциональными клетками. Они участвуют в формировании гематоэнцефалического и гематоликворного барьеров, осуществляют двунаправленный транспорт многих веществ (гормонов, метаболитов, ростовых факторов, сигнальных молекул) между кровью, спинномозговой жидкостью (СМЖ) и нервной тканью, регулируют высвобождение рилизинг-факторов в портальную систему гипофиза, а также, имея свойства нейральных стволовых клеток (НСК), участвуют в обновлении клеточного состава (нейронов и глии) подлежащих ядер гипоталамуса, отвечающих за энергетический баланс организма и пищевое поведение. Таким образом, танициты являются важным регуляторным и модулирующим звеном в медиобазальном гипоталамусе, дисфункция которого может привести к развитию ряда заболеваний, связанных с нарушениями метаболизма и энергетического обмена (Langlet F., 2019; Yoo S. et al., 2020; Volborea M. et al., 2020).

Выделяют 4 типа таницитов: $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\beta 1$ - и $\beta 2$ -танициты. Они различаются локализацией в инфундибулярном углублении. Так, α -танициты выстилают вентролатеральные стенки третьего желудочка и направляют свои отростки в вентромедиальное ($\alpha 1$ -танициты) и аркуатное ($\alpha 2$ -танициты) ядра гипоталамуса, $\beta 1$ -танициты выстилают латеральные области инфундибулярного углубления, $\beta 2$ -танициты образуют выстилку стенки срединного возвышения, где локализуются капилляры фенестрированного типа. Также субпопуляции таницитов характеризуются отличиями в ряде структурных, цитохимических и функциональных характеристик, что обусловлено тем, что каждый тип таницитов взаимодействует с разными структурами в медиобазальном гипоталамусе и опосредует их функции (Prevot V., et al., 2018, Rodriguez E., et al., 2019).

На протяжении всей истории изучения таницитов фокус исследований был направлен, в основном, на изучение свойств и функций этих клеток у взрослых животных, в то время как вопросы раннего постнатального развития и старения таницитов, а также их субпопуляционных различий в ходе онтогенеза остаются не освещёнными. Исследования проблемы возрастных изменений таницитов и влияния этих изменений на функционирование медиобазального гипоталамуса обладают высокой актуальностью. Анализ барьерных свойств таницитов, как одних из главных участников формирования гематоэнцефалического и гематоликворного барьеров, также остается значимой задачей. В этом свете, актуально исследование

взаимодействия таницитов и микроглии (иммунных клеток ЦНС), которые выполняют общую протекторную функцию в областях, лишенных гематоэнцефалического барьера.

Таким образом, анализ раннего развития и возрастных изменений различных типов таницитов поможет заполнить пробелы в современном представлении об организации и функционировании этих клеток, что представляет собой важную задачу для современной клеточной биологии.

Степень разработанности темы исследования. Область срединного возвышения, выстилка которой образована таницитами, является эволюционно консервативной структурой медиобазального гипоталамуса, которая встречается уже у такой древней группы позвоночных животных как круглоротые (Cyclostomata) (Belenky M.A., et al, 1979). У млекопитающих принято выделять 4 субпопуляции таницитов – $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\beta 1$ - и $\beta 2$ -танициты, которые различаются локализацией в инфундибулярном углублении, морфологией, структурными, цитохимическими и функциональными признаками (Rodriguez E. et al., 2019). Тем не менее, сегодня с развитием современных методов, таких как секвенирование РНК одиночных клеток (single-cell RNA sequencing, scRNA-seq) и droplet-sequencing (Drop-Seq), все больше исследователей склоняются к тому, что танициты представляют собой более разнородную клеточную популяцию (Prevot V. et al., 2018; Langlet F. 2019).

Нет единого мнения и относительно возрастных изменений таницитов. В литературных источниках присутствуют лишь единичные работы, посвященные развитию таницитов в эмбриогенезе, раннем постнатальном периоде, а также при старении. Согласно последним данным, танициты являются потомками клеток радиальной глии, и их дифференцировка происходит, начиная с 20-21 дня эмбриогенеза у крыс, и продолжается вплоть до 30 суток постнатального развития (Rodriguez E.M., et.al., 2005; Bruni J.E., 1998). Было показано, что в процессе как раннего постнатального развития (Redecker P., 1989; Sarnat H.B., 1992; Juanes-Mendez J.A. et al., 1992), так и в ходе поздних возрастных изменений (Zoli M. et al., 1995) танициты претерпевают ультраструктурные и цитохимические перестройки.

Противоречивы сведения и о пролиферативном потенциале таницитов. Установлено, что танициты способны к пролиферации и дифференцировке в нейроны и глию (астроглию и олигодендроглию) как *in vitro*, так и *in vivo* (Robins S. et al., 2013). Субпопуляции таницитов неоднородны по экспрессии маркеров НСК, пролиферативному потенциалу и линиям дифференцировки прогениторных клеток. В настоящее время превалирует мнение о том, что у половозрелых животных α -танициты являются истинными НСК, в то время как β -танициты представляют собой коммитированные нейральные прогениторные клетки (Prevot V. et al., 2018; Rodriguez E. et al., 2019), однако это мнение не общепризнанно. Существует предположение о том, что разные типы таницитов могут выступать в качестве НСК на разных этапах онтогенеза (Maggi R. et al., 2015). Таким образом, на сегодня нет единого

представления о том, как меняется пролиферативный потенциал разных типов таницитов на различных этапах постнатального развития.

В последнее время появляется все больше данных о регуляторной роли таницитов в осуществлении нейроэндокринных функций организма (Langlet F., 2014; Hu J. et al., 2019), однако механизмы требуют детального изучения. Малоизученным, но не менее важным вопросом остается исследование барьерных свойств срединного возвышения - области головного мозга, характерной особенностью которой является отсутствие гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) (Langlet F. et al., 2013).

Несмотря на то, что танициты привлекают пристальное внимание исследователей, что способствует постоянному уточнению свойств и функций этих клеток, многие вопросы клеточной биологии таницитов все еще остаются открытыми и требуют детального изучения.

Целью данной работы стало проведение сравнительного исследования субпопуляций таницитов инфундибулярного углубления головного мозга крысы в ходе постнатального онтогенеза с использованием современных методов иммуногистохимии и конфокальной лазерной микроскопии.

Для этого были поставлены следующие **задачи исследования**:

- 1) Изучить возрастные изменения цитохимической и структурной организации субпопуляций таницитов.
- 2) Выполнить анализ пролиферативного потенциала таницитов на разных стадиях постнатального онтогенеза.
- 3) Охарактеризовать структурно-функциональную организацию ядрышек таницитов в раннем постнатальном онтогенезе и при старении.
- 4) Исследовать особенности пространственных взаимоотношений таницитов и микроглии инфундибулярного углубления.

Научная новизна. Данная работа представляет собой первое комплексное сравнительно-онтогенетическое исследование субпопуляций таницитов дна третьего желудочка, выполненное с применением современных иммуногистохимических методов, конфокальной лазерной микроскопии и метода трехмерных реконструкций. Впервые дана подробная характеристика изменений отростков таницитов в раннем постнатальном онтогенезе и при старении. Установлен цитохимический профиль для ряда белков каждой из популяций таницитов на изученных сроках. Показано, что пролиферативный потенциал субпопуляций таницитов меняется в ходе постнатального онтогенеза: β -танициты теряют некоторые свойства НСК к первому месяцу постнатального развития, в то время как α -танициты характеризуются наличием основных признаков НСК на протяжении всего постнатального онтогенеза, в том числе при старении. Впервые изучено распределение маркерных белков адгезионных и щелевых контактов в субпопуляциях таницитов на протяжении постнатального онтогенеза, отмечено уникальное для таницитов как клеток выстилки

распределение этих клеточных контактов. Впервые описана морфология ядрышек таницитов, определены их количество и размеры, типичные для каждой из субпопуляций таницитов на разных сроках постнатального развития. Продемонстрирован характер изменения распределения гетерохроматиновых доменов, в том числе околядрышкового гетерохроматина, в ходе постнатального развития. Впервые проанализированы пространственные и функциональные взаимоотношения микроглии и таницитов. Описаны разные варианты микроглии инфундибулярного углубления, характерные для каждого из изученных сроков постнатального онтогенеза, показана их возрастная динамика и взаимосвязь с таницитами.

Теоретическая и научно-практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы состоит в получении приоритетных данных о структурно-функциональных особенностях субпопуляций таницитов на различных сроках постнатального онтогенеза и при старении. Полученные результаты значительно расширяют имеющиеся представления о дифференцировке таницитов в первый месяц постнатального развития и о деструктивных изменениях, характерных для таницитов в ходе старения. Данные о пролиферативном потенциале таницитов позволили уточнить, что нейральными стволовыми клетками у взрослых животных в области дна третьего желудочка являются α -танициты, в то время как β -танициты характеризуются ограниченными пролиферативными возможностями. Результаты исследования ядрышкового аппарата и гетерохроматиновых доменов (в том числе околядрышкового гетерохроматина) таницитов позволили судить об уровне синтетической активности и ее возрастной динамике, характерных для разных субпопуляций таницитов. Данные по изменению распределения и организации гетерохроматиновых доменов дали возможность оценить функциональную активность генома в различных субпопуляциях таницитов в ходе постнатального развития и при старении. Получены новые сведения о взаимодействии разных типов глии в инфундибулярном углублении в онтогенезе, которые также способствуют пониманию процесса формирования местных защитных механизмов.

Разработанные в ходе данного исследования протоколы и подходы иммуногистохимического (ИГХ) анализа для световой и конфокальной лазерной микроскопии опубликованы и полностью готовы к внедрению в практику научно-исследовательских лабораторий.

Методология и методы исследования. При проведении научно-исследовательской работы в рамках представленной диссертации были применены различные методические подходы. С целью изучения таницитов на разных стадиях постнатального онтогенеза был взят головной мозг крыс линии Вистар пяти возрастных групп, которые были выделены в соответствии с принятой классификацией: I – 7 сутки постнатального развития, который относится к неонатальному периоду; II – 14 сутки постнатального развития – неполовозрелый

(инфантильный) период; III – 30 суток постнатального развития – ювенильный период; IV – половозрелые животные (4-6 месяцев); V – старые животные (20-24 месяца) (Ojeda S. R., Skinner M. K., 2006; Picut C.A. et al., 2015; Sengupta P., 2013). Для проведения морфологического исследования таницитов применяли метод иммуногистохимии с использованием широкой панели антител и визуализацией методами световой, флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии. Выбор метода обусловлен тем, что ИГХ позволяет выявлять как тела, так и отростки таницитов, что невозможно при использовании стандартных гистологических окрасок, а построение трехмерных реконструкций дает возможность анализировать объекты сложной формы, в частности изучать отростки таницитов. Кроме того, применение конфокальной микроскопии позволяет изучать объекты небольшого размера (ядрышки клеток), а также анализировать пространственное распределение одновременно двух и более маркеров. Построение трехмерных реконструкций проводили в программах Zen 2012 (black edition), Zen 2.6 (blue edition), LSM Image Browser (Zeiss, Германия). Морфометрический анализ был проведен с применением общедоступной программы Fiji (<https://imagej.net/software/fiji/>). Статистический анализ производился в программе Graph Pad Prism 8 (GraphPad Software Inc., США). Работа рассмотрена и одобрена локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (выписка из протокола № 3/17 от 30.11.2017 г.).

Положения, выносимые на защиту:

1. Исходя из цитохимического профиля экспрессии цитоспецифичных белков, окончание дифференцировки таницитов завершается к концу первого месяца постнатального развития. В $\alpha 2$ - и β -таницитах при этом происходит преобразование ювенильного типа организации отростков в зрелый вариант. При старении цитохимический профиль таницитов не изменяется, однако происходит дезорганизация отростков этих клеток.
2. Паттерн распределения адгезионных и щелевых клеточных контактов (согласно локализации маркерных белков Sx43 и β -катенина) уникален для субпопуляций таницитов и формируется в первые две недели постнатального развития, оставаясь неизменным при старении.
3. В первую неделю постнатального развития все типы таницитов демонстрируют способность к пролиферации. α -Танициты сохраняют свойства нейральных стволовых клеток на протяжении всего постнатального онтогенеза, в то время как β -танициты с возрастом перестают экспрессировать маркеры нейральных стволовых клеток.
4. Организация ядрышкового аппарата различается в субпопуляциях таницитов в ходе постнатального развития. С возрастом размеры ядрышек таницитов увеличиваются, а их количество уменьшается.
5. В области дна третьего желудочка присутствуют разные варианты клеток микроглии. Каждый вариант клеток микроглии взаимодействует с определенной субпопуляцией таницитов. Микроглия срединного возвышения, в

отличие от других областей дна третьего желудочка, сохраняет активированное состояние на протяжении всего постнатального онтогенеза.

Степень достоверности и апробации результатов исследования. Высокая степень достоверности полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментального материала (n=104), применением современных методов исследования, среди которых иммуногистохимия, конфокальная лазерная микроскопия и трехмерная реконструкция, а также использованием адекватных методов морфометрического и статистического анализа данных.

Результаты исследования были представлены в качестве устных и стендовых докладов на XX школе-конференции молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии (Москва, 2016), II Всероссийской конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные проблемы нейронаук: функциональная асимметрия, нейропластичность и нейродегенерация» (Москва, 2016), Международной конференции «25th Wilhelm Bernhard Workshop on the Cell Nucleus» (Nizhny Novgorod, Russia, 2017), 24-ой Всероссийской научной конференции «Гистогенез, реактивность и регенерация тканей» (Санкт-Петербург, 2018), XIV Международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2018), FENS Forum of Neuroscience (Berlin, Germany, 2018), XXII школе-конференции молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии (Москва, 2018), IV международной научной конференции «Постгеномные технологии: от теории к практике» (Воронеж, 2018), XXV Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины-2019» (Санкт-Петербург, 2019), VIII съезде научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов (Воронеж, 2019), XXIII Школе-конференции молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (Москва, 2019), 11th EFIS-EJI South Eastern European Immunology School (SEEIS2019) (Pristina, Kosovo, 2019), XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease (Porto, Portugal, 2019), 20th International Summer School on Immunology. Immune System: Genes, Receptors and Regulations (Hvar, Croatia, 2019), 25-ой Всероссийской научной конференции «Гистогенез, реактивность и регенерация тканей» (Санкт-Петербург, 2021).

Публикации по теме работы. По теме диссертации опубликовано 24 научные работы. Из них 8 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ для опубликования результатов диссертационных исследований, и в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных Scopus/Web of Science Core Collection. Также опубликованы 1 глава в монографии и 15 тезисов докладов, представленных в сборниках материалов конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация написана в соответствии с ГОСТом Р 7.0.11-2011 и состоит из глав: введение, обзор литературы, материалы и

методы, результаты исследования, обсуждение результатов, заключение, выводы, список сокращений, список литературы. Работа изложена на 156 страницах, содержит 5 таблиц и 55 иллюстраций, в том числе 4 рисунка, 4 графика и диаграммы, 47 микрофотографий. Библиографический указатель содержит 214 источников, в том числе 11 на русском языке и 203 на иностранных языках.

Личное участие автора. Планирование, подготовка и проведение экспериментов, получение материала для гистологического исследования, отработка и постановка иммуногистохимических реакций, анализ полученных препаратов с применением методов световой, флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии, получение микрофотографий препаратов, проведение морфометрического анализа и статистической обработки полученных данных, интерпретация результатов и их обобщение, подготовка текста диссертации и автореферата выполнены автором лично.

Финансовая поддержка работы. Проведенное исследование входит в научные планы ФГБНУ «ИЭМ». Часть исследований выполнена при поддержке РФФИ (проект № 18-315-00134, руководитель – Суфиева Д.А., исполнители - Разенкова В.А., Плешакова И.М., Антипова М.В.).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Характеристика исследованного материала. В исследовании были использованы крысы линии Вистар (n=104). С целью изучения таницитов дна третьего желудочка на разных стадиях постнатального онтогенеза образцы головного мозга были взяты у крыс 5 возрастных групп: I – 7 сутки постнатального развития (n = 18); II – 14 сутки постнатального развития (n = 18); III – 30 сутки постнатального развития (n = 18); IV – половозрелые крысы-самцы (4-6 месяцев) (n = 18); V – старые крысы-самцы (20-24 месяца) (n = 18). Остальные животные были использованы для отработки методик. Получение крысят с датированным сроком рождения было осуществлено согласно рекомендациям, данным в справочно-методическом пособии А.П. Дыбана «Объекты биологии развития» (Дыбан А.П., 1975). Содержание животных и все экспериментальные манипуляции осуществлялись с учетом международных правил Хельсинкской декларации о гуманном обращении с животными и «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ №755 от 12.08.1977г. МЗ СССР). На проведение исследования получено положительное заключение локального этического комитета ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 3/17 от 30.11.2017 г.).

Подготовка материала для гистологического исследования. Образцы головного мозга крыс помещали в фиксатор, в качестве которого использовали раствор цинк-этанол-формальдегида (Коржевский Д.Э. и соавт., 2012), проводили и заливали в парафин по общепринятой методике. На ротационном микротоме Microm

HM 325 (Thermo Scientific, США) изготавливали гистологические срезы толщиной 5 и 10 мкм.

Иммуногистохимическое исследование таницитов. Для иммуногистохимического выявления таницитов использовали широкую панель поли- и моноклональных антител:—мышинные антитела против виментина (клон V-9), нестина (клон Rat-401), глутаминсинтетазы (GS) (клон GS-6), коннексина 43 (Cx43) (клон F-7), PCNA (клон PC10), нуклеофосмина (клон FC82291), кроличьи моноклональные антитела против Musashi-1 (клон EP1302), а также кроличьи поликлональные антитела против глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), β -катенина, Iba-1 (маркера микроглии), гистона 3, фосфорилированного по серину 10 (H3-S10ph), Sox 2, нуклеолина, гистона 4, триметилированного по лизину 20 (H4K20me3). Для световой микроскопии в качестве вторичных реагентов использовали антикроличьи или антимышинные вторичные реагенты, конъюгированные с полимером и пероксидазой хрена. Для выявления продукта ИГХ реакции применяли рабочий раствор 3,3-диаминобензидинтетрагидрохлорида (из набора DAB+) (Dako, Дания). Часть срезов подкрашивали квасцовым гематоксилином (Бивитрум, Россия) с подсинением в аммиачной воде. В качестве вторичных реагентов для конфокальной микроскопии были использованы следующие реагенты: для выявления мышинных первичных антител применяли Fab-фрагмент антимышиного иммуноглобулина осли, меченный биотином-SP (Jackson Immunoresearch, США), для выявления кроличьих первичных антител - моновалентный Fab-фрагмент антикроличьего иммуноглобулина осли, конъюгированный с флуорохромом Rhodamine Red™-X (RRX) (Jackson Immunoresearch, США), либо реагент из набора LSAB 2 (Agilent, США), который состоит из смеси антимышинных и антикроличьих антител, меченных биотином. В случае постановки двойного иммуноокрашивания на срезы наносили смесь (1:1) Fab-фрагмента антимышиного иммуноглобулина осли, меченного биотином-SP, и моновалентного Fab-фрагмента антикроличьего иммуноглобулина осли, конъюгированного с флуорохромом RRX. Для выявления биотинилированных антител на срезы наносили конъюгат стрептавидина с флуорохромом Cy2 (Jackson Immunoresearch, США) или Cy3 (InvitroGen, США). Ядра клеток в части препаратов выявляли с помощью флуоресцентного ядерного красителя SYTOX Green (InvitroGen, США).

Фотографирование объектов при микроскопии в проходящем свете и флуоресцентной микроскопии. Анализ и фотографирование полученных гистологических препаратов проводили на световом микроскопе Leica DM750 (Германия), оснащённом фотокамерой ICC50 (Leica, Германия). Применяли программу управления камерой LAS EZ (Leica, Германия). Исследование флуоресцентно окрашенных препаратов проводили с использованием конфокальных лазерных микроскопов LSM710 (Zeiss, Германия) и LSM800 (Zeiss, Германия), оснащённого системой Airyscan. Первичный анализ полученных изображений и

построение трехмерных реконструкций проводили в программах Zen 2012 (black edition), Zen 2.6 (blue edition), LSM Image Browser (Zeiss, Германия).

Морфометрический и статистический анализ. Определение диаметра ядрышек и их количества осуществляли в программах ZEISS Zen lite и Fiji при исследовании не менее 10 случайно выбранных клеток каждого типа таницитов для каждого срока. Данные представляли в виде средней \pm стандартная ошибка средней. Для количества ядрышек помимо абсолютных значений рассчитывали также медиану (Me). Количество клеток микроглии определяли на единицу площади (1 мм^2). Данные представлены в виде средней \pm стандартная ошибка средней. Статистический анализ был выполнен в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., США). При сравнении групп применяли непараметрический критерий Краскела-Уоллиса и апостериорный критерий Данна. Значимым считали различия групп при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структурная и цитохимическая организация субпопуляций таницитов в ходе постнатального онтогенеза. Для исследования структурной организации таницитов в качестве маркера был использован белок промежуточных филаментов III типа виментин. Было установлено, что виментин локализуется в телах и отростках всех типов таницитов на всех исследованных сроках. На 7 сутки постнатального развития $\alpha 1$ -танициты характеризуются наличием многочисленных шипикоподобных расширений в проксимальных отделах отростков, также встречаются бисеровидные расширения по всей длине отростков. К 14 суткам постнатального развития, как и на более поздних этапах развития, отростки таницитов становятся гладкими и ровными по всей длине, и слабо разветвленными в проксимальных отделах (рис. 1А). Отростки $\alpha 2$ -таницитов в течение первого месяца постнатального онтогенеза ровные, тонкие, извилистые и идут параллельно друг другу, однако начиная с первого месяца постнатального развития начинают формировать пучки отростков по всей их длине. В первые две недели развития отростки $\beta 1$ - и $\beta 2$ -таницитов короткие, в проксимальных областях образуют небольшие пучки. Начиная с 30-х суток постнатального развития и у взрослых животных, пучки отростков этих клеток становятся крупнее и толще (рис. 1В). При старении отростки $\alpha 1$ -таницитов становятся еще более разветвленными как в проксимальных, так и дистальных частях (рис. 1Б). В $\alpha 2$ -таницитах происходит дезорганизация отростков, которая проявляется в том, что отростки почти не формируют пучков и становятся более разветвленными в проксимальных отделах. Отростки $\beta 1$ - и $\beta 2$ -таницитов практически не формируют пучков и распадаются на мелкие отдельные отростки. Также в *zona interna* срединного возвышения наблюдается разветвление проксимальных отделов отростков $\beta 1$ -таницитов, которые характеризуются варикозоподобными расширениями (рис. 1Г).

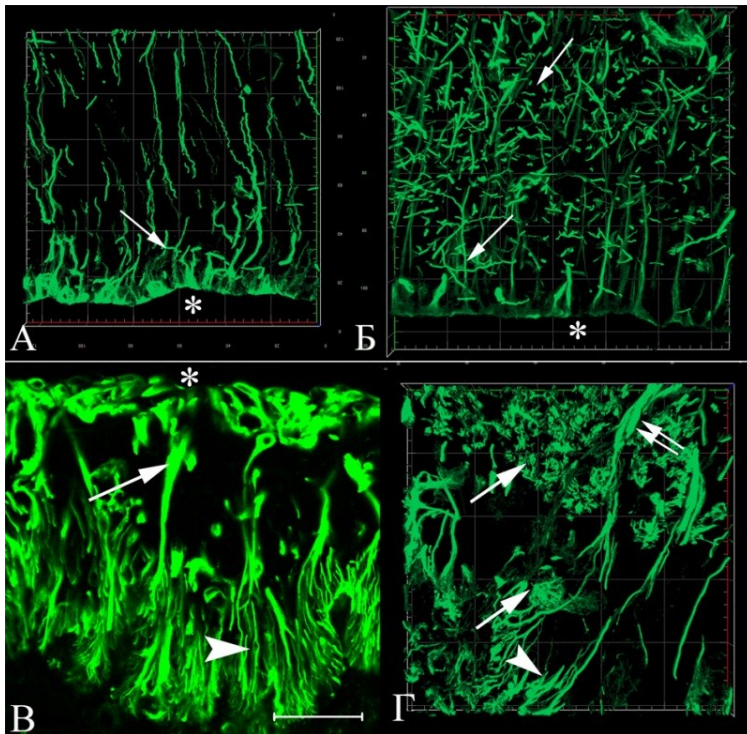


Рисунок 1. Возрастные изменения в структуре отростков таницитов. ИГХ-реакция на виментин. Конфокальная лазерная микроскопия, 3D-реконструкция. А, Б - $\alpha 1$ -танициты. А - 14 сутки постнатального развития, Б - старые животные. Стрелка указывает на разветвления отростков. В, Г - β -танициты. В - половозрелое животное; стрелка указывает на проксимальные отделы таницитов, формирующие пучки отростков; головка стрелки - распадающиеся на мелкие ветви дистальные отделы отростков. Г - старое животное; двойная стрелка указывает на пучки отростков, стрелка - на варикозоподобные расширения, головка стрелки - на дистальные отделы отростков. Звездочка - полость третьего желудочка.

Для изучения цитохимических характеристик таницитов на разных этапах постнатального развития в качестве маркеров были использованы белки промежуточных филаментов III типа (GFAP) и VI типа (нестин), а также один из основных астроцитарных маркеров - фермент глутаминсинтетаза. Анализ GFAP в таницитах показал, что на 7 сутки постнатального развития этот белок присутствует в телах и отростках отдельных $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -таницитов (при этом GFAP⁺-клетки располагались преимущественно кластерами) (рис. 2А) и единичных $\beta 1$ -таницитах. К 14-м суткам постнатального развития все α -танициты были GFAP⁺, в то время как в β -таницитах реакция идентифицировалась в отростках этого типа клеток лишь к первому месяцу развития. У взрослых и старых животных характер распределения GFAP не изменялся (рис. 2Б).

Нестин в первую неделю постнатального развития выявлялся в отростках β -таницитов, в α -таницитах реакция отсутствовала. Начиная с 14 суток постнатального развития этот белок прослеживался, наряду с β -таницитами, также и в отростках α -таницитов (рис. 2В).

Исследование глутаминсинтетазы (GS) показало, что на 7 и 14 сутки постнатального развития в области $\alpha 1$ -таницитов встречались единичные GS⁺-клетки (рис. 2Г). Начиная с первого месяца постнатального развития $\alpha 1$ -танициты, так же как и $\beta 2$ -танициты на всех исследованных сроках (рис. 2Е), являются GS-иммунонегативными клетками. В $\alpha 2$ - и $\beta 1$ -таницитах этот фермент присутствует на всех исследованных сроках (рис. 2Д).

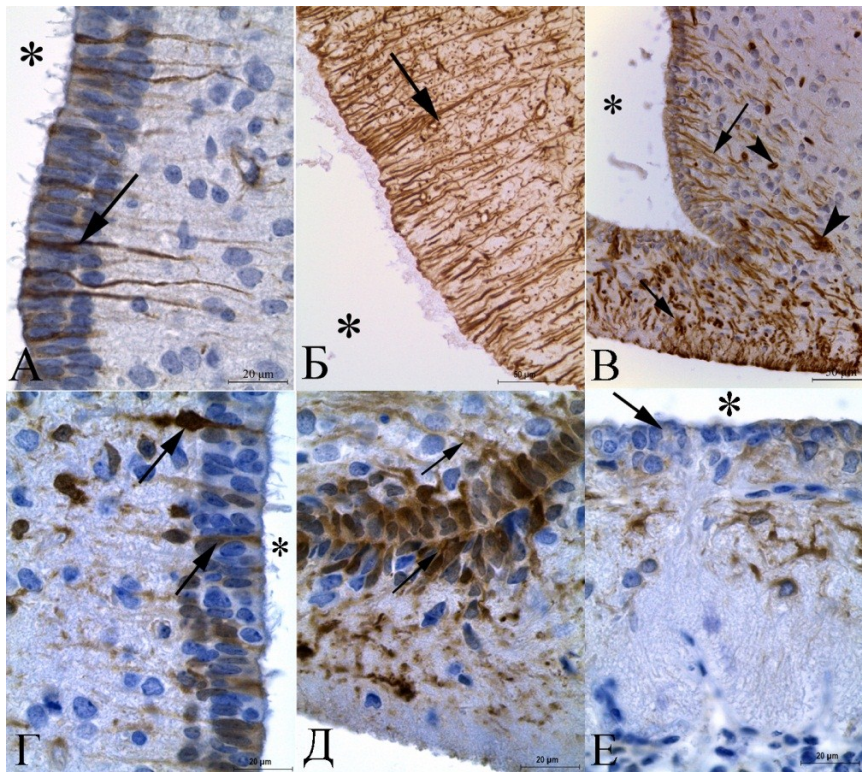


Рисунок 2. Цитохимические характеристики таницитов. А, Б – ИГХ реакция к GFAP, α -танициты. А – 7 сутки постнатального развития, Б – старое животное. В – ИГХ реакция к нестину, 14 сутки постнатального развития. Г, Д, Е – ИГХ реакция к GS, Г, Д - 7 сутки постнатального развития, Е – 30 сутки постнатального развития; $\alpha 1$ – танициты (Г), $\beta 1$ -танициты (Д) и $\beta 2$ -танициты (Е). Стрелка указывает на отростки и тела таницитов, головка стрелки – на нестин⁺ кровеносные сосуды. Звёздочкой отмечена полость третьего желудочка.

Полученные данные указывают на то, что в ходе первого месяца постнатального развития отростки таницитов подвергаются структурной реорганизации – становятся гладкими, слабо разветвленными и формируют пучки. В ходе старения происходит их дезорганизация – проксимальные и дистальные отделы отростков разветвляются (в α -таницитах), практически не образуют пучков ($\alpha 2$ - и β -танициты), формируют варикозоподобные расширения ($\beta 1$ -танициты). Также к концу первого месяца постнатального развития происходит окончательная дифференцировка таницитов и устанавливается профиль синтеза белков, характерный для таницитов взрослых животных. При старении цитохимический профиль таницитов не изменяется.

Адгезионные и щелевые клеточные контакты в таницитах в постнатальном онтогенезе. В ходе ИГХ анализа было установлено, что β -катенин, участвующий в формировании адгезионных контактов, на 7 и 14 сутки развития локализуется в апикальной части латеральных стенок α -таницитов, а также прослеживается по всей длине отростков β -таницитов (рис. 3А). К 30 суткам в α -таницитах этот белок появляется также в отростках этих клеток, участвуя в формировании пучков отростков таницитов. Такое распределение белка сохраняется и у взрослых животных, однако у старых животных реакция на β -катенин в отростках ослабевает, что сопровождается их дезорганизацией (отростки не формируют пучки). Это может указывать на то, что наличие адгезионных контактов является одним из ключевых факторов, наряду с промежуточными филаментами, в механической стабилизации отростков таницитов, а также в формировании ими пучков.

Белок коннексин 43 (Cx43), формирующий щелевые контакты, встречался во всех субпопуляциях таницитов на всех исследованных сроках. Тем не менее, распределение и плотность расположения щелевых контактов различалась в субпопуляциях таницитов. Наибольшее число щелевых контактов идентифицировалось в $\alpha 1$ -таницитах, меньше - в $\alpha 2$ -таницитах, в то время как в $\beta 1$ - и $\beta 2$ -таницитах Cx43⁺-гранулы встречались редко. Щелевые контакты локализовались на апикальной поверхности $\alpha 1$ -таницитов, на латеральной поверхности клеточной стенки, вдоль отростков и в расширенных ножках α - и β -таницитов (рис. 3Б). Характер распределения Cx43 не изменялся при старении. Присутствие Cx43 в апикальной части $\alpha 1$ -таницитов, где невозможно образование щелевых контактов, может указывать на формирование ими гемиканалов, которые могут служить для транспорта малых молекул между СМЖ и цитоплазмой таницитов, что обеспечивает контроль состава СМЖ. Также Cx43 был обнаружен в ножках таницитов, которыми они оплетают кровеносные сосуды, что позволяет им контролировать состав крови. Наличие гемиканалов на апикальной и базальной частях клетки указывает на возможность двунаправленного регулируемого транспорта веществ между СМЖ и кровью. Характер распределения изученных маркеров является уникальным для таницитов как клеток выстилки, формируется в первые две недели развития и не меняется при старении.

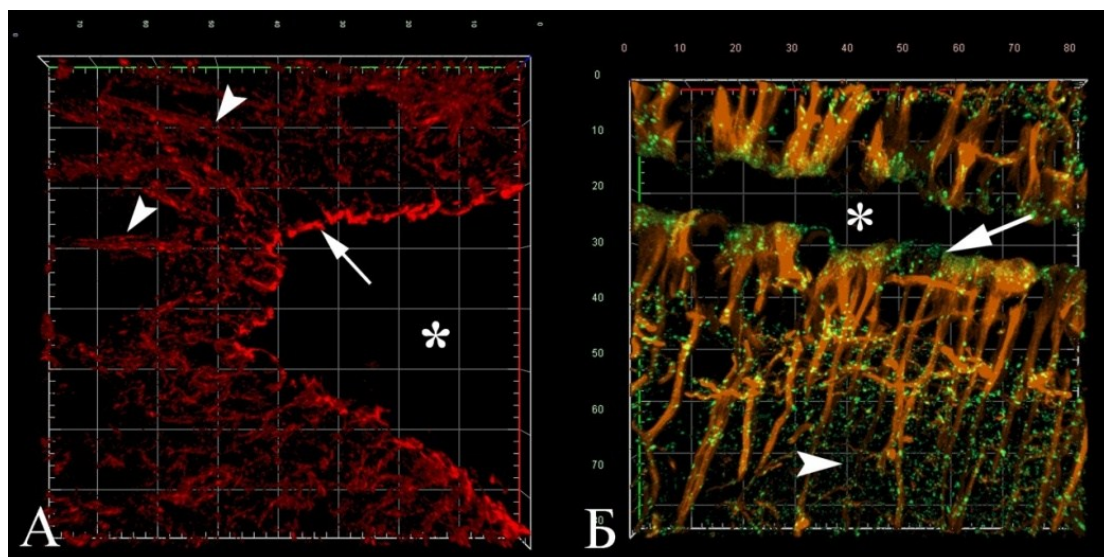


Рисунок 3. Распределение адгезионных (А) и щелевых (Б) контактов в таницитах. А – ИГХ реакция к β -катенину, $\beta 1$ -танициты; стрелка указывает на адгезионные контакты в апикальной части латеральной стенки клетки, головки стрелок – на адгезионные контакты вдоль отростков. Б – ИГХ реакция к Cx43, $\alpha 1$ -танициты. Стрелка указывает на гемиканалы в апикальной части таницитов, головка стрелки – на Cx43⁺-гранулы в нервной ткани. Звездочка – полость третьего желудочка. Размер сетки – 10x10 μm .

Пролиферативный потенциал субпопуляций таницитов в ходе постнатального онтогенеза. При ИГХ исследовании пролиферативного маркера гистона 3, фосфорилированного по серину 10 (H3-S10ph), — маркера митотически делящихся

клеток — было установлено, что данный белок в выстилке дна третьего желудочка выявляется в ядрах единичных клеток всех субпопуляций таницитов только в первую неделю постнатального развития (рис. 4А). Анализ пролиферативного маркера PCNA (данный маркер присутствует во всех фазах клеточного цикла, но его пик приходится на S-фазу) показал, что в первую неделю постнатального онтогенеза в выстилке инфундибулярного углубления этот белок выявляется во всех типах таницитов. Начиная с 14 суток постнатального развития, PCNA присутствует только в $\alpha 1$ -таницитах и единичных $\alpha 2$ -таницитах, которые могут располагаться либо одиночно, либо группами (рис. 4Б).

Исследование маркеров нейральных стволовых/прогениторных клеток (НСПК) — Sox2 и Musashi-1 (Msi-1) — продемонстрировало, что Sox2 выявляется в ядрах всех субпопуляций таницитов на всех исследованных сроках. В первый месяц постнатального развития реакция высокоинтенсивная как в α -, так и в β -таницитах. У взрослых и старых животных интенсивная реакция сохраняется в $\alpha 1$ -таницитах, в то время как в остальных типах таницитов наблюдается умеренная реакция (рис. 4В). Msi-1 в первые две недели постнатального развития присутствует во всех типах таницитов. Однако к первому месяцу постнатального онтогенеза иммунореактивность к данному белку в β -таницитах уменьшается, и у взрослых и старых животных Msi-1⁺-клетками являются лишь α -танициты (рис. 4Г). При этом интенсивность реакции в $\alpha 1$ -таницитах значительно выше, чем в $\alpha 2$ -таницитах.

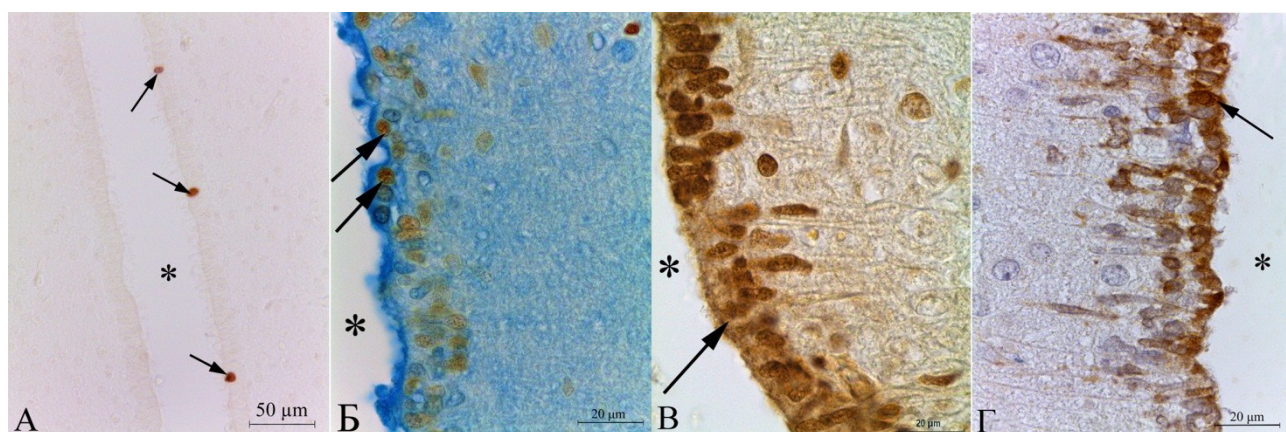


Рисунок 4. Проллиферативные маркеры и маркеры НСПК в таницитах. А, Б, В, Г — область α -таницитов. А — ИГХ реакция к H3-S10ph, 7 сутки постнатального развития. Б — ИГХ реакция к PCNA, старое животное. В — ИГХ реакция к Sox2, взрослое животное. Г — ИГХ реакция к Msi-1, старое животное. Стрелки указывают на иммуноположительные танициты. Звездочка — полость третьего желудочка.

Полученные данные могут указывать на то, что в первую неделю постнатального онтогенеза для всех типов таницитов характерна пролиферативная активность. Начиная со второй недели развития, пролиферативный потенциал таницитов падает. Тем не менее, присутствие PCNA и маркеров НСПК в таницитах указывает на то, что эти клетки не вышли из клеточного цикла. К концу первого месяца постнатального развития β -танициты постепенно утрачивают цитохимические признаки НСК, и у

половозрелых животных для них характерна экспрессия лишь отдельных маркеров НСК, что может указывать на их ограниченную способность к пролиферации. В α -таницитах свойства НСК сохраняются на протяжении всего постнатального развития и при старении.

Структурно-функциональная организация ядрышка и гетерохроматиновых агрегатов в различных типах таницитов в онтогенезе.

При изучении ядрышка в таницитах было установлено, что эти клетки различаются по количеству ядрышек и их среднему диаметру как среди субпопуляций таницитов, так и в возрастном аспекте (рис 5). Было показано, что для всех типов таницитов характерно увеличение размеров этой субъядерной структуры в раннем постнатальном развитии (при $p < 0,05$). Максимальный размер ядрышка наблюдается у взрослых животных, в то время как при старении средний диаметр наибольшего ядрышка уменьшается (рис 5). Ядрышки таницитов в подавляющем большинстве случаев локализовались на периферии ядра, часто контактируя с ядерной оболочкой (рис. 6).

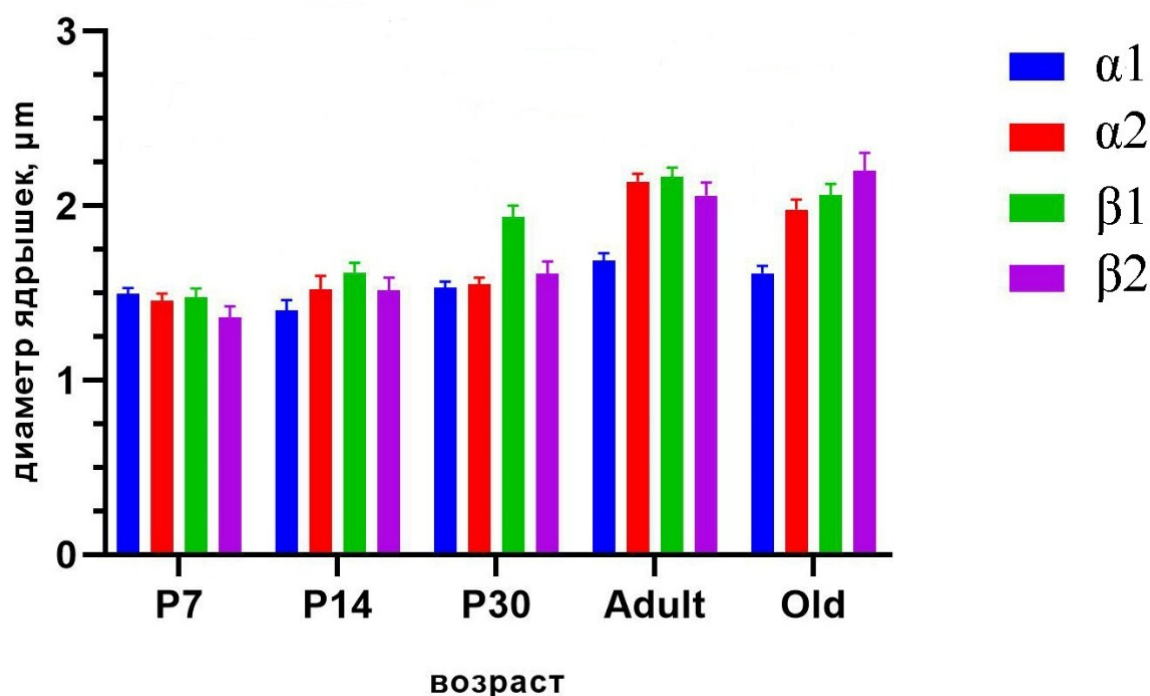


Рисунок 5. Столбчатая диаграмма, отражающая возрастную динамику в размерах ядрышка различных субпопуляций таницитов. Данные представлены в виде средней \pm ошибка средней.

Анализ распределения конститутивного гетерохроматина с помощью ИГХ реакции к гистону 4, триметилированному по лизину 20 ($H4K20me3$), и нуклеофосмину показал, что гетерохроматин в таницитах распределен в виде отдельных скоплений округлой формы, которые преимущественно локализируются по периферии ядра (рис. 6). Было

выявлено, что характерным признаком для всех типов таницитов является увеличение размеров самих гетерохроматиновых глобул в раннем развитии. При старении в α -таницитах значительно увеличивается содержание гетерохроматина как по периферии ядер клеток, так и в центральных областях ядра, а в $\alpha 1$ -таницитах может формироваться сплошной периферический гетерохроматиновый слой (рис. 6А). Содержание гетерохроматиновых скоплений при старении в $\beta 1$ - и $\beta 2$ -таницитах меняется незначительно (рис. 6Б).

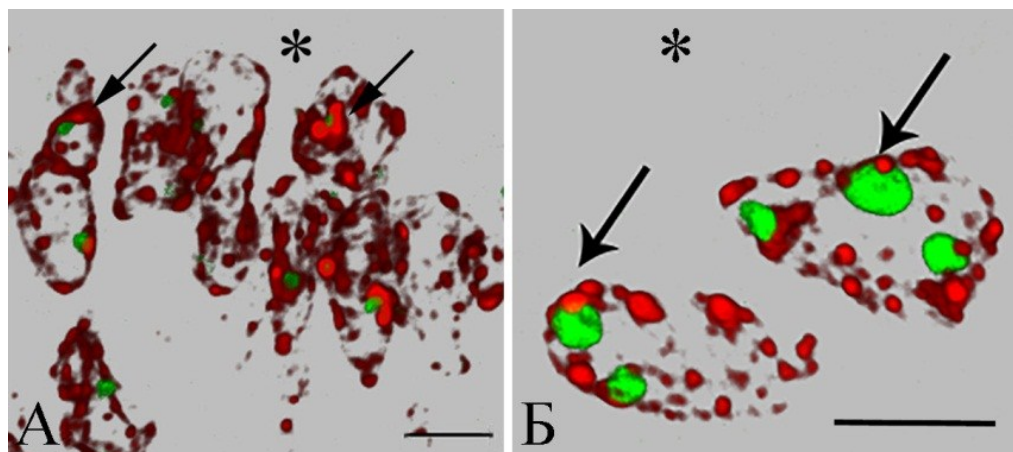


Рисунок 6. Распределение ядрышек и конститутивного гетерохроматина в ядрах таницитов. А - $\alpha 1$ -танициты, Б - $\beta 2$ -танициты. Старое животное. Двойная иммуногистохимическая реакция на H4K20me3 (красный цвет) и нуклеофосмин (зеленый цвет). Конфокальная лазерная микроскопия. 3D-реконструкция. Масштабный отрезок равен 5 μm .

Полученные данные указывают на то, что для каждого типа таницитов характерна специфическая для него организация ядрышкового аппарата (число и размер ядрышек), что может говорить о разном уровне белок-синтетической активности как среди разных типов таницитов, так и на различных этапах постнатального развития. Гетерохроматизация всех типов таницитов в раннем развитии может указывать на процессы дифференцировки и специализации этих клеток.

Пространственные взаимоотношения таницитов и микроглии в инфундибулярном углублении в постнатальном развитии. В ходе постнатального онтогенеза были определены различные типы микроглии, которые отличались локализацией в области инфундибулярного углубления и пространственными взаимоотношениями с таницитами, а также морфологическими и функциональными признаками. Было установлено, что в первые две недели развития микроглия в этой области многочисленна и активирована, а число этих клеток возрастает. Позднее число активированных микроглиоцитов уменьшается. У взрослых животных помимо типичных рамифицированных микроглиоцитов, локализованных в нервной ткани, была выявлена популяция субэпендимных микроглиоцитов, которые локализовались непосредственно под телами α -таницитов. Их отростки были всегда направлены вдоль выстилки, а у некоторых из этих клеток отростки проникали через эпендимный

пласт и контактировали с СМЖ (рис. 7А). Срединное возвышение, выстилка которого образована β -таницитами, характеризуется своим уникальным типом микроглии. Было показано, что на всех исследованных сроках микроглия в срединном возвышении представлена амебоидным типом, что указывает на то, что она чрезвычайно активна, несмотря на отсутствие видимых признаков патологии (рис. 7Б). Активированное состояние микроглии может указывать на захват этими клетками нейротоксичных молекул или фагоцитоз разрушающихся клеток. Таким образом, микроглия задействована в поддержании гомеостаза нервной ткани в областях, лишенных ГЭБ. Было показано, что на определенных этапах онтогенеза, а именно в первый месяц постнатального развития и у старых животных, в области инфундибулярного углубления встречались супраэпендимные макрофаги (рис. 7В). Вероятно, присутствие этих клеток в полости желудочка указывает их на высокую активность на данных этапах онтогенеза, что необходимо для эффективного удаления клеточных элементов и продуктов их распада из полости желудочка.

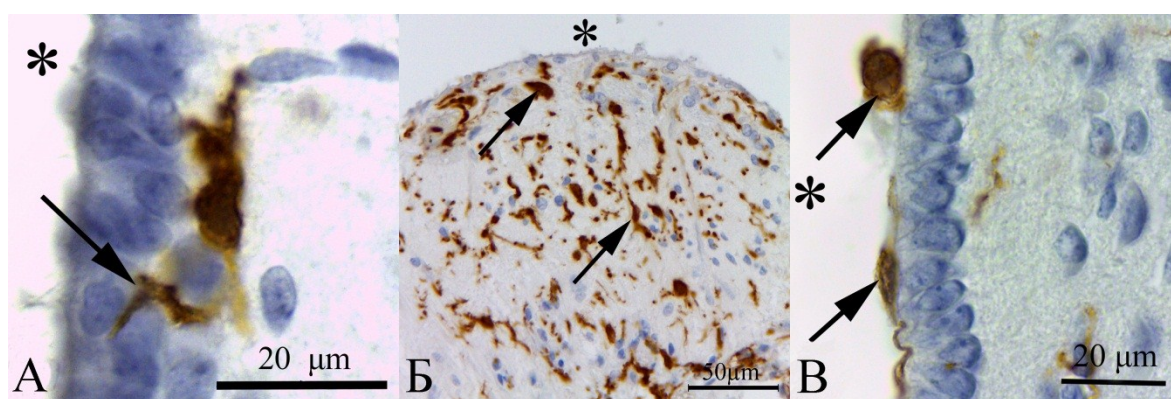


Рисунок 7. Разные типы микроглии в инфундибулярном углублении. А – субэпендимная микроглия, Б – активированная микроглия срединного возвышения, В – супраэпендимные Iba⁺-клетки. Звездочка – полость третьего желудочка.

Таким образом, было установлено, что на разных стадиях постнатального онтогенеза в инфундибулярном углублении присутствуют разные варианты микроглии, которые различаются по локализации, степени активации, пространственным взаимоотношениям с таницитами, а также морфологическим и функциональным признакам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данное исследование представляет собой первый сравнительно-онтогенетический анализ субпопуляций таницитов головного мозга крысы. Был получен ряд новых данных о клеточных характеристиках таницитов в развитии. В ходе исследования было продемонстрировано, что разные типы таницитов обладают цитохимической и функциональной спецификой. Так, для α -таницитов типична значительная экспрессия GFAP, а для β -таницитов – экспрессия нестина. Глутаминсинтетаза присутствует только в $\alpha 2$ - и $\beta 1$ -таницитах, что свидетельствует о возможной роли этих клеток в предотвращении эксайтотоксичности. Характер распределения межклеточных

контактов таницитов уникален и отличается от межклеточных контактов эпендимоцитов. В $\alpha 2$ - и β -таницитах адгезионные контакты присутствуют не только в апикальной части клетки, но и вдоль всей длины отростка. Щелевые контакты (Cx43⁺) типичны для всех типов таницитов, но только в $\alpha 1$ -таницитах они локализируются в области апикальной и базальной поверхностей клетки, что может указывать на дополнительный механизм двунаправленного транспорта малых молекул и контроля состава СМЖ. Для каждого типа таницитов характерна специфическая для него организация ядрышкового аппарата. В α -таницитах в онтогенезе сохраняется экспрессия пролиферативных маркеров и маркеров НСК, в то время как в β -таницитах сохраняется лишь ограниченный набор маркеров НСК (Sox2, нестин). Это указывает на важную роль α -таницитов в постнатальном нейрогенезе. Установлено тесное взаимодействие таницитов с микроглией срединного возвышения. В рамках данной работы описаны несколько вариантов микроглиальных клеток области инфундибулярного углубления. Данные о структурных, цитохимических и функциональных отличиях таницитов от других клеток макроглии свидетельствуют о необходимости дальнейших исследований, направленных на установление тканевой идентичности этого типа глиальных клеток.

ВЫВОДЫ

- 1) В течение первого месяца постнатального онтогенеза $\alpha 1$ -танициты характеризуются синтезом фермента глутаминсинтетазы, что не типично для этих клеток на более поздних стадиях развития. GFAP присутствует лишь в отдельных α - и $\beta 1$ -таницитах, в то время как после 30-х суток постнатального развития этот белок промежуточных филаментов выявляется во всех субпопуляциях таницитов. Нестин локализуется только в β -таницитах в первую неделю развития, однако со второй недели встречается во всех субпопуляциях таницитов. К концу первого месяца постнатального онтогенеза происходит окончательное установление профиля синтеза белков, характерных для таницитов взрослых животных, что свидетельствует об окончании процесса клеточной дифференцировки. При старении цитохимический профиль изучаемых белков в таницитах не изменяется.
- 2) Отростки таницитов подвергаются реорганизации в раннем постнатальном онтогенезе и в ходе старения. В течение первого месяца постнатального развития отростки $\alpha 2$ - и β -таницитов в проксимальных отделах формируют пучки. В ходе возрастных изменений отростки таницитов подвергаются дезорганизации: пучки распадаются на отдельные отростки, которые становятся извилистыми; отростки α -таницитов в проксимальных отделах разветвляются, формируя отростки 2-го и 3-го порядков, а отростки β -таницитов образуют варикозоподобные расширения.
- 3) Паттерн распределения адгезионных и щелевых клеточных контактов во всех субпопуляциях таницитов формируется в первые две недели постнатального развития и не изменяется при старении. Характер распределения клеточных

контактов у таницитов уникален и отличается от межклеточных контактов эпендимоцитов: адгезионные и щелевые контакты формируются не только вдоль латеральной стенки таницитов, но и по всей длине их отростков; коннексин-43 присутствует не только на латеральной, но и на апикальной поверхности α 1-таницитов, что может указывать на образование гемиканалов.

- 4) В первую неделю постнатального развития все типы таницитов способны к пролиферации. В ходе дальнейшего развития пролиферативный потенциал β -таницитов понижается, и они утрачивают цитохимические признаки нейральных стволовых клеток (НСК). В α -таницитах все изученные маркеры НСК (PCNA, Sox2, Musashi-1, нестин) сохраняются на протяжении постнатального онтогенеза.
- 5) Танициты характеризуются межпопуляционными различиями в организации ядрышкового аппарата, что свидетельствует о различиях их функционального статуса. В ходе постнатального развития размеры ядрышек α 2- и β -таницитов увеличиваются, а их количество уменьшается, что может объясняться увеличением белок-синтетической активности этих клеток.
- 6) Характер распределения гетерохроматиновых скоплений в ядрах таницитов меняется в ходе постнатального развития. Для всех типов таницитов характерно увеличение размеров гетерохроматиновых глобул в раннем развитии, что может указывать на процессы специализации клеток. При старении в α -таницитах увеличивается содержание гетерохроматина как по периферии ядер клеток, так и в центральных областях ядра, в то время как в β -таницитах гетерохроматиновые скопления при старении не увеличиваются.
- 7) Микроглия области инфундибулярного углубления представлена разными структурными вариантами. Каждый вариант микроглиальных клеток взаимодействует с определенной субпопуляцией таницитов: для α -таницитов характерна ассоциация с субэпендимной микроглией и супраэпендимными макрофагами, для β -таницитов типично взаимодействие с уникальной формой активированной микроглии срединного возвышения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в ведущих научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, и изданиях, входящих в зарубежные базы данных:

1. Кирик, О.В. Трехмерная визуализация эпендимы и таницитов головного мозга / О.В. Кирик, А.В. Назаренкова, Д.А. Суфиева // Морфология.– 2014.– Т. 145, № 1.– С. 63-66. - *RSCI*. (Переводная версия статьи: Kirik, O.V. Three-Dimensional Visualization of the Ependyma and Tanocytes in the Brain / O.V. Kirik, A.V. Nazarenkova, D.A. Sufieva // Neuroscience and Behavioral Physiology.– 2015.– V. 45.– P.127-130 – *Scopus*).
2. Суфиева, Д.А. Белки промежуточных филаментов в таницитах третьего желудочка головного мозга крысы в постнатальном онтогенезе / Д.А. Суфиева, О.В. Кирик, О.С. Алексеева, Д.Э. Коржевский // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2016.– Т. 52, № 6– С. 436-443 — *RSCI*. (Переводная версия статьи: Sufieva, D.A. Intermediate filament proteins in tanocytes of the third cerebral ventricle in rats during postnatal ontogenesis / D.A. Sufieva, O.V. Kirik, O.S. Alekseeva, D.E. Korzhevskii // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2016.– Т. 52, № 6.– С. 490-498 — *Web of Science*).
3. Кирик, О.В. GFAP-иммунопозитивные клетки в составе эпендимы III желудочка головного мозга крысы / О.В. Кирик, Д.А. Суфиева // Медицинский академический журнал.– 2017.– Т. 17, № 2.– С. 33-37 — *RSCI*.
4. Суфиева, Д.А. Нуклеолин и ядрышки в эпендимocyтах и таницитах третьего желудочка головного мозга крысы / Д.А. Суфиева, О.В. Кирик, Д.Э. Коржевский // Цитология.– 2018.– Т. 60, №1.– С. 30-36 – *RSCI*. (Переводная версия статьи: Sufieva, D.A. Nucleolin and Nucleoli in Ependymocytes and Tanocytes of the Third Ventricle of the Rat Brain / D.A. Sufieva, O.V. Kirik, D.E. Korzhevskii // Cell and Tissue Biology.– 2018.– V. 12, № 2.– P. 162-172 — *Scopus*).
5. Суфиева, Д.А. Астроцитарные маркеры в таницитах третьего желудочка головного мозга крысы в постнатальном онтогенезе и при старении / Д.А. Суфиева, О.В. Кирик, Д.Э. Коржевский // Онтогенез.– 2019.– Т. 50, № 3.– С. 205-214 – *RSCI*. (Переводная версия статьи: Sufieva, D.A. Astrocyte Markers in the Tanocytes of the Third Ventricle in Postnatal Development and Aging in Rats / D.A. Sufieva, O.V. Kirik, D.E. Korzhevskii // Russian Journal of Developmental Biology.– 2019.– V. 50, I. 3.– P. 146-153 – *Web of Science*).
6. Коржевский, Д.Э. Иммуногистохимические маркеры для нейробиологии / Д.Э. Коржевский, И.П. Григорьев, В.В. Гусельникова, Е.А. Колос, Е.С. Петрова, О.В. Кирик, Д.А. Суфиева, В.А. Разенкова, М.В. Антипова, М.В. Черныш // Медицинский академический журнал.– 2019.– Т.19, № 4.– С. 7-24 — *RSCI*.
7. Суфиева, Д.А. Микроглия и танициты области инфундибулярного углубления головного мозга крысы в раннем постнатальном онтогенезе и при старении / Д.А. Суфиева, В.А. Разенкова, М.В. Антипова, Д.Э. Коржевский // Онтогенез.– 2020.–

Т. 51, № 3.– С. 225-234 – *RSCI*. (Переводная версия статьи: **Sufieva, D.A.** Microglia and Tanycytes of the Infundibular Recess of the Brain in Early Postnatal Development and during Aging / **D.A. Sufieva**, V.A. Razenkova, M.V. Antipova, D.E. Korzhevskii // Russian journal of developmental biology.– 2020.– V. 51.– P. 189-196 — *Web of Science*).

8. **Суфиева, Д.А.** Морфологическая характеристика ядрышка и гетерохроматиновых агрегатов таницитов головного мозга крысы / **Д.А. Суфиева**, И.М. Плешакова, Д.Э. Коржевский // Биологические мембраны.– 2021.– Т. 38, № 5.– С. 363-373 — *RSCI, Web of Science, Scopus*). (Переводная версия статьи: **Sufieva, D.A.** Structural Characteristic of Nucleolus and Heterochromatin Aggregates of Rat Brain Tanycytes / **D.A. Sufieva**, I.M. Pleshakova, D.E. Korzhevskii // Biochem. Moscow Suppl. Ser. A.– 2021.– V. 15.– P. 319–328 — *Web of Science*).

Статьи, опубликованные в других изданиях:

1. Глава в монографии. Кирик, О.В. Изучение выстилки желудочков головного мозга с использованием методов конфокальной лазерной микроскопии / О.В. Кирик, **Д.А. Суфиева**, А.В. Назаренкова, Д.Э. Коржевский // Молекулярная морфология. Методы флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии. Под редакцией Д.Э. Коржевского.– СПб.: СпецЛит, 2014.– Гл. 6. – С. 81-86.

Тезисы докладов основные:

1. **Суфиева, Д.А.** Белки промежуточных филаментов в таницитах третьего желудочка головного мозга крысы в постнатальном онтогенезе / Д.А. Суфиева // XX школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии: Тез. Докл. (Москва, 31 октября -1 ноября, 2016). – Москва, 2016. – С. 49.

2. **Sufieva, D.A.** Nucleolin in Tanycytes of the Rat Third Ventricle Floor / D.A. Sufieva // 25th Wilhelm Bernhard Workshop on the Cell Nucleus: тез. докл. (Nizhny Novgorod, Russia, June 19th– June 22nd 2017). – Nizhny Novgorod, Russia, 2017. – P. 105.

3. **Суфиева, Д.А.** PCNA в клетках эпендимы и таницитах третьего желудочка головного мозга крысы / Д.А. Суфиева // Вопросы морфологии XXI века: Сборник трудов / Под редакцией И.А. Одинцовой, С.В. Костюкевича. – СПб: ООО «Издательство ДЕАН», 2018. – С. 238-240.

4. **Суфиева, Д.А.** Белки клеточных контактов бета-катенин и коннексин 43 в таницитах третьего желудочка головного мозга крысы в постнатальном онтогенезе / Д.А. Суфиева // XIV Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии: Труды конгресса, Судак, 30 мая – 10 июня 2018 года /. – М: ООО "МАКС Пресс", 2018. – С. 444.

5. **Sufieva, D.A.** Age-related Changes of Microglia in the Infundibular Recess of Hypothalamus of the Rat Brain / D.A. Sufieva // FENS Forum of Neuroscience: тез. докл. (Berlin, Germany, 7-11 July 2018). – Berlin, 2018. – P. 371.

6. Разенкова, В.А. Возрастные изменения активности микроглиоцитов в области дна третьего желудочка крыс / В.А. Разенкова, **Д.А. Суфиева** // XXII школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии: тез. докл. (Москва, 29-30 октября 2018 г.). – Москва, 2018. – С. 26-27.
7. Плешакова, И.М. Морфофункциональные характеристики структурной организации клеточного ядра таницитов / И.М. Плешакова, **Д.А. Суфиева** // XXII школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии: тез. докл. (Москва, 29-30 октября 2018 г.). – Москва, 2018. – С. 28.
8. Плешакова, И.М. Структурная организация ядра и ядрышка таницитов / И.М. Плешакова, **Д.А. Суфиева** // IV международная научная конференция «Постгеномные технологии: от теории к практике»: тез. докл. (Воронеж, 2-3 октября 2018г.). – Воронеж, 2018. – С. 100-101.
9. **Суфиева, Д.А.** Белки цитоскелета и эзрин в клетках выстилки дна третьего желудочка в постнатальном онтогенезе и при старении / Д.А. Суфиева // XXV Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием "Актуальные проблемы биомедицины-2019": тез. докл. (Санкт-Петербург, 28-29 марта 2019 г.). – Санкт-Петербург, 2019. – С. 192-193.
10. **Суфиева, Д.А.** Пролиферативные маркеры PCNA и фосфорилированный гистон H3 (H3 S10ph) в таницитах дна третьего желудочка мозга крысы / Д.А. Суфиева // мат докл. VIII съезда научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов: Морфология.– 2019.– Т. 155, №2.– С. 275 .
11. **Sufieva, D.A.** Connexin 43 in tanycytes of the third ventricle floor in early postnatal development / D.A. Sufieva // XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease: Glia. – 2019. – V. 67, I. S1. – P. E747 – *Web of Science*.
12. **Sufieva, D.A.** Median Eminence Microglia during Early Postnatal Development and Aging / D.A. Sufieva // 20th International Summer School on Immunology Immune System: genes, Receptors and Regulations: тез. докл. (Hvar, Croatia, September 21st - 28th 2019). – Hvar, Croatia, 2019. – P. 101.
13. Razenkova, V.A. Microglia associated with tanycytes in the infundibular recess of hypothalamus / V.A. Razenkova, **D.A. Sufieva** // 11th EFIS-EJI South Eastern European Immunology School (SEEIS2019): тез. докл. (Pristina, Kososvo, September 27-30th 2019). – Pristina, Kososvo, 2018. – P. 18.
14. Антипова, М.В. Пролиферативные маркеры PCNA и фосфорилированный по серину 10 гистон H3 (H3S10 ph) в таницитах дна третьего желудочка в раннем постнатальном онтогенезе и при старении / М.В. Антипова, **Д.А. Суфиева** // XXIII Школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии: тез. докл. (Москва, 30-31 октября 2019 г.). – Москва, 2019. – С. 56-57.
15. **Суфиева, Д.А.** Организация ядрышкового аппарата таницитов дна третьего желудочка головного мозга крысы в постнатальном онтогенезе и при старении /

Д.А. Суфиева //Вопросы морфологии XXI века: Сборник трудов / Под редакцией И.А. Одинцовой, С.В. Костюкевича. – СПб: ООО «Издательство ДЕАН», 2021. – С. 176-177.

Список сокращений:

НСК – нейральные стволовые клетки

НСПК – нейральные стволовые/прогениторные клетки

СМЖ – спинно-мозговая жидкость

GFAP (glial fibrillary acidic protien) - глиальный фибриллярный кислый белок

GS (glutamine synthetase) — глутаминсинтетаза

H3S10ph – гистон 3, фосфорилированный по серину 10

H4K20me3 – гистон 4, триметилированный по лизину 20

Msi-1 – Musashi-1

PCNA (proliferative cell nuclear antigen) – ядерный антиген пролиферирующих клеток