

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Институт экспериментальной медицины»

На правах рукописи

Суфиева Дина Азатовна

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

1.5.22 – Клеточная биология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор РАН
Дмитрий Эдуардович Коржевский

Санкт-Петербург

2022 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ГЛАВА 1. ВВЕДЕНИЕ.....	5
Актуальность темы исследования.....	5
Степень разработанности темы исследования.....	6
Научная новизна.....	8
Теоретическая и научно-практическая значимость работы.....	8
Методология и методы исследования.....	9
Положения, выносимые на защиту:.....	10
Степень достоверности и апробации результатов исследования.....	11
Публикации по теме работы.....	11
Структура и объем диссертации.....	12
Личное участие автора.....	12
Финансовая поддержка работы.....	12
ГЛАВА 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
2.1. История изучения таницитов.....	13
2.2. Морфологическая организация области дна третьего желудочка.....	14
2.3. Общая характеристика таницитов.....	17
2.3.1. Классификация таницитов.....	17
2.3.2. Ультроструктурная организация разных типов таницитов.....	19
2.3.3. Цитохимическая и молекулярная организация таницитов.....	24
2.4. Функции таницитов.....	29
2.4.1. Роль таницитов в формировании гематоэнцефалического и гематоликворного барьеров.....	29
2.4.2. Танициты и транспорт различных веществ.....	31
2.4.3. Танициты как хемосенсоры.....	32
2.4.4. Роль таницитов в регуляции секреции нейрогормонов ядрами гипоталамуса.....	35
2.4.5. Танициты как нейральные стволовые клетки медиобазального гипоталамуса.....	37
2.5. Развитие и старение инфундибулярного углубления.....	40
2.5.1. Эмбриональное развитие срединного возвышения. Молекулярные механизмы.....	40
2.5.2. Структурные изменения в срединном возвышении в ходе эмбрионального и раннего постнатального развития.....	42

2.5.3. Старение инфундибулярного углубления.	45
ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	48
3.1. Подготовка материала для гистологического исследования.....	49
3.2. Иммуногистохимическое исследование таницитов.	49
3.2.1. Характеристика используемых в работе маркерных белков.	49
3.2.2. Процедура иммуногистохимического окрашивания для световой микроскопии.	52
3.2.3. Процедура иммуногистохимического окрашивания для конфокальной микроскопии.	53
3.3. Фотографирование объектов при микроскопии в проходящем свете и флуоресцентной микроскопии.....	54
3.4. Морфометрический и статистический анализ.	55
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ	59
4.1. Структурная и цитохимическая характеристика субпопуляций таницитов в раннем постнатальном развитии и при старении.	60
4.1.1. Белки промежуточных филаментов в таницитах	60
4.1.2. Астроцитарный фермент глутаминсинтетаза в таницитах дна третьего желудочка в постнатальном развитии и при старении.	78
4.2. Адгезионные и щелевые клеточные контакты в таницитах в постнатальном онтогенезе.....	81
4.3. Пролиферативный потенциал таницитов в ходе раннего развития и при старении.....	90
4.3.1. Распределение пролиферативных маркеров в различных типах таницитов. Иммуногистохимическая реакция на H3-S10ph.....	90
4.3.2. Распределение маркеров нейральных стволовых клеток (НСК) в выстилке инфундибулярного углубления в постнатальном развитии и при старении.....	92
4.4. Структурно-функциональная организация ядрышка и гетерохроматиновых агрегатов в различных типах таницитов в онтогенезе.	95
4.4.1. Организация ядрышкового аппарата таницитов.	95
4.4.2. Организация гетерохроматиновых агрегатов и их ассоциация с ядрышком.	101
4.5. Пространственные взаимоотношения таницитов и микроглии в инфундибулярном углублении в постнатальном развитии.	104
ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	110
5.1. Дифференцировка таницитов и их отличие от ресничных эпэндимоцитов.	110
5.2. Различие субпопуляций таницитов.	118
5.3. Танициты как нейральные стволовые клетки.	121

5.4. Особенности клеток микроглии инфундибулярного углубления.....	123
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	128
ВЫВОДЫ	129
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	131
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	134

ГЛАВА 1. 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 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 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, 2019; Yoo et al., 2020; Bolborea 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 поверхностного слоя 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 взаимодействуют с разными структурами в медиобазальном гипоталамусе и опосредуют их функции (Prevot et al., 2018; Rodriguez 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 и их

субпопуляционных различий в ходе онтогенеза остаются не освещёнными. Исследования проблемы возрастных изменений таницитов в ходе раннего постнатального развития и старения организма 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 поздних возрастных изменений различных типов таницитов, их барьерных свойств, 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 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 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 et al., 2018; Langlet, 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 et.al., 2005; Bruni, 1998). Было показано, что в процессе как раннего постнатального развития (Redecker, 1989; Sarnat, 1992; Juanes-Mendez et. al., 1992), так и в ходе поздних возрастных изменений

(Zoli 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 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 et al., 2018; Rodriguez et al., 2019), однако это мнение не общепризнано. Существует предположение о том, что разные типы таницитов могут выступать в качестве НСК на разных этапах онтогенеза (Maggi 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, 2014; Hu 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 et al., 2013).

Таким образом, 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, микроскопии сверхвысокого разрешения и метода трехмерных реконструкций. Впервые дана подробная морфологическая 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 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 онтогенеза и при старении. 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 типы 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 (НСК) у взрослых животных в области дна третьего желудочка являются α -танициты, в то время как β -танициты характеризуются ограниченными пролиферативными свойствами. Результаты исследования ядрышкового аппарата и гетерохроматиновых доменов (в том числе околядрышкового гетерохроматина) таницитов позволили судить об уровне синтетической активности и ее возрастной динамики, 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 сутки постнатального развития – ювенильный период; IV – половозрелые животные (4-6 месяцев) ($n = 18$); V – старые животные (20-24 месяца) (Ojeda, Skinner, 2006; Picut et al., 2015; Sengupta, 2013). Для проведения морфологического исследования таницитов применяли метод иммуногистохимии (ИГХ) 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» (протокол № 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 Cx43 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 и 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 журналах, рекомендованных ВАК РФ для опубликования результатов диссертационных исследований, в том числе 6 статей в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных Scopus/Web of Science Core Collection, а также 1 глава в монографии и 15 тезисов докладов, опубликованных 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 иллюстрации, 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, обработка данных и их анализ, интерпретация результатов и их обобщение, подготовка текста диссертации и автореферата выполнены автором лично.

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.22 – Клеточная биология, пунктам 1, 2 и 3.

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.).

ГЛАВА 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Танициты представляют собой специализированные биполярные глиальные клетки. Тела таницитов формируют выстилку инфундибулярного углубления (или воронки гипофиза), расположенного в области дна третьего желудочка, а базальный отросток углубляется в подлежащую нервную ткань, где он оканчивается расширенными терминалями на кровеносных сосудах, в том числе на капиллярах портальной системы гипофиза, либо на мягкой мозговой оболочке (Pasquettaz et al., 2021)

2.1. История изучения таницитов.

Термин «танициты» (от греч. τανύς – удлинённый, вытянутый) был впервые предложен в 1954 году Эрнстом Хорстманом (Horstmann, 1954, цитировано по Rodriguez et al., 2005) при описании у хрящевых рыб группы биполярных клеток, тела которых формировали выстилку желудочка, а отростки оканчивались на мягкой мозговой оболочке (рис. 1А). Тем не менее, впервые морфологическая характеристика таницитов была дана русским нейрогистологом Владимиром Яковлевичем Рубашкиным в его диссертационной работе «К учению о строении невроглии и эпендимы» в 1903 г., где он отметил, что выстилка воронки гипофиза организована по принципу «примордиальной (зародышевой) невроглии» (Рубашкин, 1903) (рис. 1Б). Позже танициты были описаны в работах Сантьяго Рамон-и-Кахаля в 1909 г., который обратил внимание, что эти клетки напоминают радиальную глию и в большом количестве встречаются в головном мозге рыб, амфибий и рептилий, в то время как у птиц и млекопитающих танициты локализуются лишь в определенных областях головного мозга. Одновременно с Рамон-и-Кахалем, итальянский нейроанатом Стерци обратил внимание на необычную организацию инфундибулярного углубления, располагающегося прямо над гипофизом у хрящевых рыб, и описал два типа клеток, образующих выстилку в этой области: клетки, которые морфологически напоминают танициты, и клетки, которые не имеют базального отростка и напоминают типичные кубовидные эпендимные клетки (Sterzi, 1909, цитировано по Prevot et al., 2018).

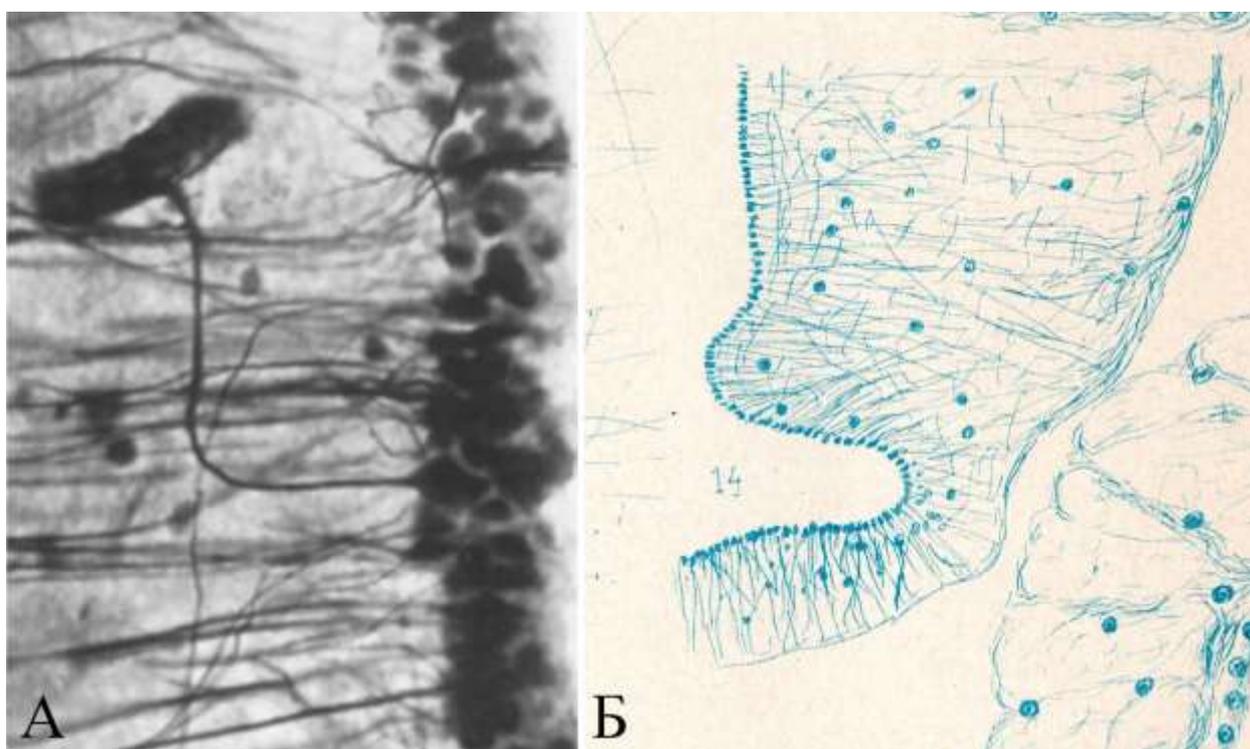


Рисунок 1. А – микрофотография таницитов, полученная Е. Horstman (1954) Увеличение $\times 360$. Б – рисунок инфундибулярного углубления, сделанный В.Я. Рубашкиным (1903).

Начиная с 1970-х годов, танициты вновь стали предметом пристального внимания исследователей в связи с их нетипичной для клеток выстилки морфологией и особыми функциями. Вначале были охарактеризованы основные морфологические, ультраструктурные и цитохимические свойства таницитов, а позднее (в последние десятилетия) установлены молекулярные аспекты функционирования таницитов как одного из ключевых игроков в регуляции нейроэндокринной системы головного мозга.

2.2. Морфологическая организация области дна третьего желудочка.

Организация инфундибулярного углубления, выстилку которой формируют танициты, многокомпонентна, что обуславливает специализацию таницитов по отношению к разным структурам медиобазального гипоталамуса и их многофункциональность.

Третий желудочек (лат. *ventriculus tertius*) – непарный желудочек головного мозга. Он формирует полость промежуточного мозга (*Diencephalon*) и является вторым по размеру среди желудочков (27%), после боковых. Площадь его поверхности у крысы составляет более 20 мм². Рострально третий желудочек соединяется с боковыми желудочками через межжелудочковое отверстие Монро (*foramen interventriculare s. Monroe*), каудально – с водопроводом среднего мозга (*aqueductus cerebri (Sylvii)*). Третий

желудочек заходит в воронку гипофиза, образуя нейрогипофизарное углубление (или углубление воронки, инфундибулярное углубление, *recessus infundibuli*) (Ноздрачев, Поляков, 2001).

В основании инфундибулярного углубления локализуется срединное возвышение (*eminentia mediana hypothalami*), которое является частью нейрогипофиза. Срединное возвышение – эволюционно-консервативная структура у позвоночных, которая сохраняет много примитивных черт, среди которых трехслойная организация. Первая зона (эпендимный слой) состоит из перикарионов таницитов, образующих выстилку инфундибулярного углубления. Вторая зона (внутренняя волокнистая) образована отростками таницитов, питуцитов (нейроглиальными клетками), олигодендроцитов и преимущественно продольно ориентированных (немиелинизированных и единичных миелинизированных) пучков отростков нейросекреторных клеток (Kohnke et al., 2021). Третья зона (дистальная, или палисадная) содержит, главным образом, радиально ориентированные претерминальные отделы нейросекреторных и нервных волокон и базальные отростки таницитов, а также тела и отростки немногочисленных питуцитов. В вентральной области также располагаются фенестрированные капилляры портальной системы гипофиза, на которых оканчиваются расширенные ножки таницитов, питуцитов и терминальные расширения аксонов нейросекреторных клеток. Совокупность всех этих элементов образует зону нейроваскулярных (нейрогемальных) контактов (рис. 2) (Поленов, 1993).

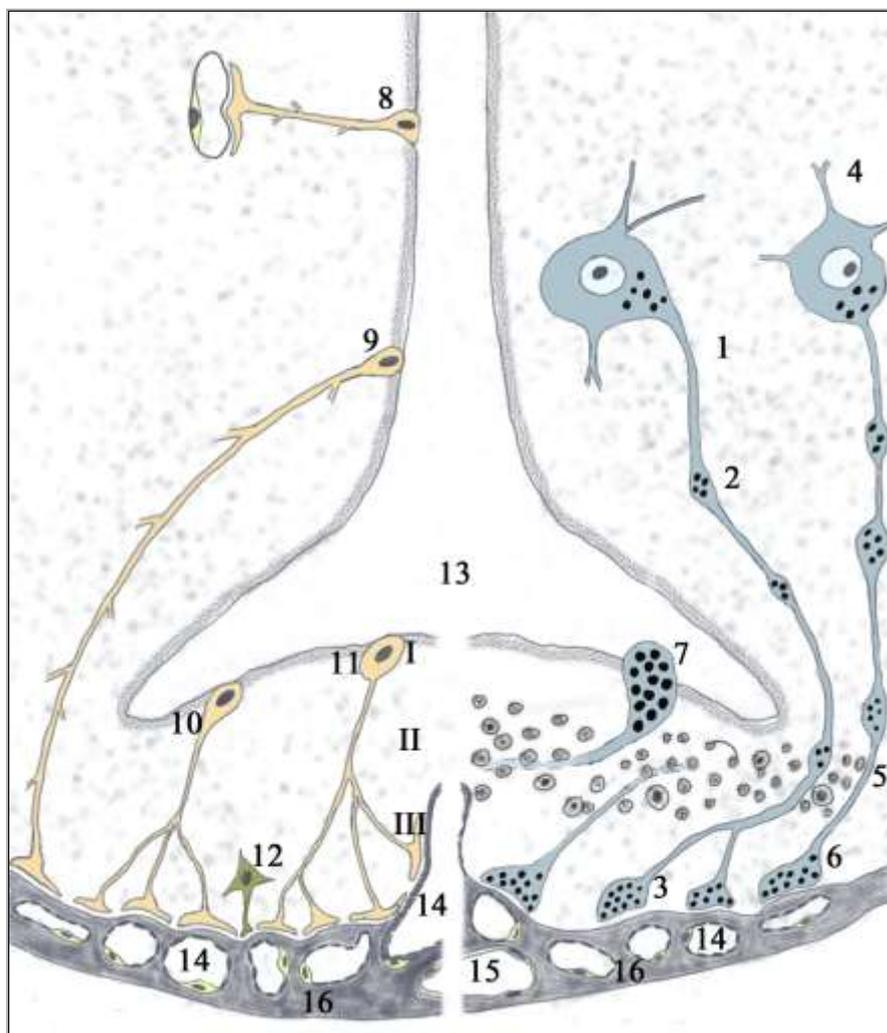


Рисунок 2. Схема, отражающая основной принцип структурной организации медиобазального гипоталамуса и срединного возвышения крысы (источник исходного изображения Поленов, 1993)

Справа – нейросекреторные клетки, слева - глиальные элементы. Три слоя срединного возвышения: I –эпендимный, II – волокнистый (где проходит гипоталамо-гипофизарный тракт), III – наружный с волокнами туберо-инфундибулярного тракта и с зоной нейрогемальных контактов. 1 – моноаминергическая нейросекреторная клетка (например, дофаминергическая нейросекреторная клетка из аркуатного ядра), 2 – ее аксон, 3 – терминали аксона, 4 – пептидергическая (либерин- или статионергическая) нейросекреторная клетка, 5 – ее аксон, 6 – терминали аксона, 7 – терминальные ветви аксонов нонапептидергических нейросекреторных клеток, образующие аксо-вазальный (7') и аксо-вентральный (7'') контакты, 8-11 – танициты, 12 – питуицит, 13 – инфундибулярное углубление, 14 – поверхностные и глубокие петли порталных капилляров, 15 – порталная вена, 16 – туберальная часть передней доли гипофиза.

Латеральные области инфундибулярного углубления сформированы симметрично расположенными ядрами медиобазального гипоталамуса - аркуатным, вентромедиальным, дорсомедиальным. Они отвечают за регуляцию энергетического и водного баланса, циркадных ритмов, репродуктивных функций, реакцию на стресс (Pearson, Placzek 2013).

Аркуатное ядро отвечает за энергетический баланс с участием двух групп нейронов. К первой группе относятся орексигенные (вызывающие аппетит) нейроны, содержащие нейропептид Y (Neuropeptide Y, NPY) и агути-родственный пептид (Agouti-related peptide, AgRP). Ко второй группе относятся анорексигенные (угнетающие аппетит) нейроны, содержащие прогормон проопиомеланокортин (Pro-opiomelanocortin, POMC) и нейропептид CART (Cocaine- and amphetamine-regulated transcript, транскрипт, регулируемый кокаином и амфетамином). Кроме того, POMC-нейроны участвуют в обезболивании и снятии ощущений страха за счет того, что POMC также является источником внутренних опиоидов (α -, β - и γ -эндорфинов). Аркуатное ядро отвечает преимущественно за репродуктивные функции, в которых принимают участие GnRH (Gonadotropin-releasing hormone, гонадотропин-рилизинг гормон), β -эндорфин; дофаминовые нейроны участвуют в ингибировании высвобождения пролактина клетками аденогипофиза. Кроме того, в аркуатном ядре находятся нейроны, содержащие SST (Somatostatin, соматостатин) — гормон ингибирующий секрецию соматотропин-рилизинг фактора (Swaab, 2003). Вентромедиальное ядро содержит SF-1-нейроны (нейроны, экспрессирующие стероидогенный фактор-1) и наряду с аркуатным ядром участвует в энергетическом балансе. Помимо этого, вентромедиальное ядро задействовано в регуляции тревожности, стресса, отвечает за пищевое поведение и репродуктивную функцию (MacClellan, Parker, Tobet, 2006). Дорсомедиальное ядро отвечает за циркадные ритмы (Pearson, Placzek, 2013).

Область инфундибулярного углубления, в силу своей локализации и организации, действует как ключевой интерфейс между нервной и эндокринной системами, который участвует в гипоталамо-гипофизарной регуляции репродукции, стресса, лактации, роста, а также регуляции тиреоидной и метаболической систем. Танициты являются одними из главных клеточных элементов этой нейроэндокринной системы.

2.3. Общая характеристика таницитов.

2.3.1. Классификация таницитов.

Танициты являются гетерогенной клеточной популяцией. Сегодня принято выделять 4 субпопуляции таницитов – α 1-, α 2-, β 1- и β 2-танициты (рис. 3). Впервые данную классификацию предложил академик Ильдар Ганиевич Акмаев в 1973 г. Классификация основана на разной локализации таницитов в инфундибулярном углублении и их морфологических, цитохимических и функциональных особенностях (Akmayev et al., 1973; Akmayev, Fidelina, 1976).

- $\alpha 1$ -танициты выстилают латеральные стенки инфундибулярного углубления, в области вентромедиального ядра (ВМЯ) и частично дорсомедиального ядра (ДМЯ) гипоталамуса, и направляют свои отростки в эти ядра.
- $\alpha 2$ -танициты также выстилают латеральные стенки инфундибулярного углубления, однако они направляют свои отростки в аркуатное ядро (АЯ) гипоталамуса.
- $\beta 1$ -танициты выстилают латеральные стенки дна инфундибулярного углубления. Отростки оканчиваются на пограничной глиальной мембране головного мозга, рядом с капиллярами портальной системы гипофиза, локализованными в срединном возвышении.
- $\beta 2$ -танициты выстилают центральную область срединного возвышения и проецируют свои отростки в среднюю область среднего возвышения и туберальную часть аденогипофиза (Pasquettaz et al., 2021).

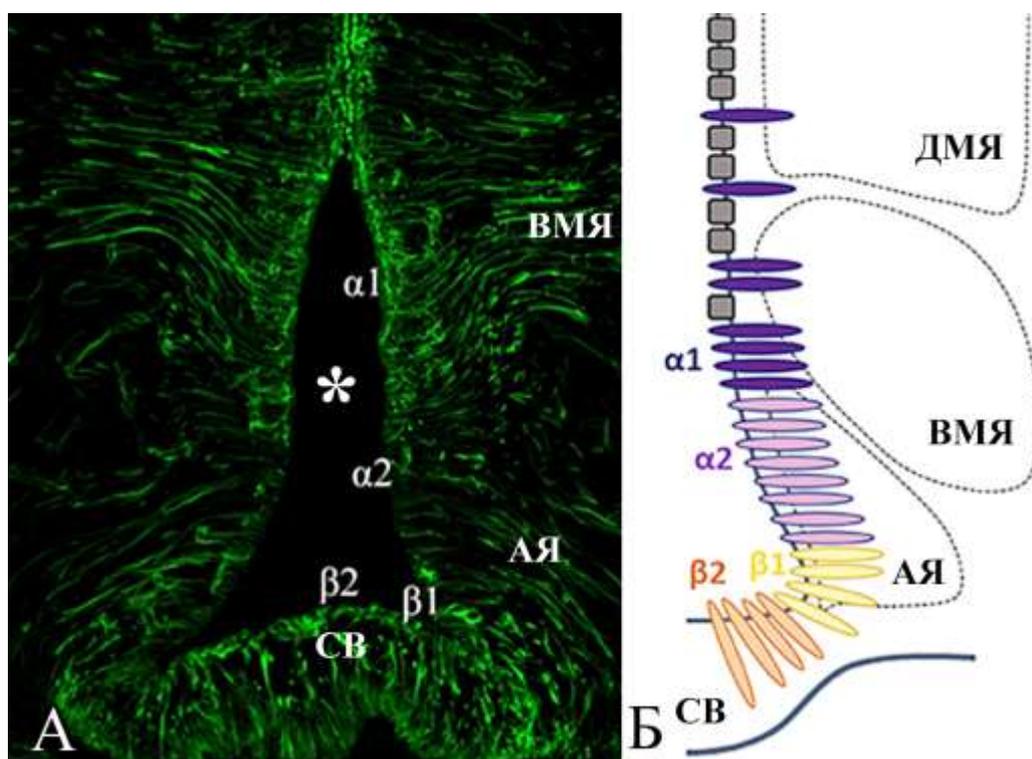


Рисунок 3. Локализация разных типов таницитов в инфундибулярном углублении. А – иммуногистохимическая реакция на виментин (маркер таницитов), конфокальная лазерная микроскопия. Б – схематическое изображение разных типов таницитов. ДМЯ — дорсомедиальное ядро, ВМЯ — вентромедиальное ядро, АЯ – аркуатное ядро, СВ — срединное возвышение.

Несмотря на то, что данная классификация и в настоящее время является общепризнанной, развитие новых подходов в исследовании таницитов, таких как Single cell RNA Sequencing и Droplet Sequencing, привело к осознанию необходимости ее дополнения и модификации (Prevot et al., 2018; Langlet, 2019). Так, было установлено, что

в аркуатном (дорсомедиальная часть), вентромедиальном и дорсомедиальном ядрах гипоталамуса α -танициты контактируют с капиллярами, участвующими в образовании ГЭБ, в то время как β -танициты ассоциированы с проницаемыми капиллярами фененстрированного типа в срединном возвышении. Однако было показано, что проницаемость капилляров в вентромедиальной части аркуатного ядра может меняться в зависимости от метаболического (энергетического) статуса особи. Это приводит к тому, что характеристики таницитов, выстилающих данную область, будут варьировать между фенотипом α - и β -таницитов (Langlet et al., 2013). Несмотря на то, что для выделения подтипов таницитов были установлены специфические характеристики и определены маркерные гены, для многих таких маркеров характерно градиентное распределение вдоль выстилки, а не четкое разделение по субпопуляциям таницитов. Все это может свидетельствовать в пользу гипотезы о том, что танициты представляют собой скорее непрерывный клеточный пласт с плавными переходными зонами между их субпопуляциями, которых может быть определено больше, чем 4 подтипа. Более того, внутри одной субпопуляции танициты могут взаимодействовать с разными типами нервных элементов, что может влиять на их транскрипционный профиль. Это может послужить основанием для выделения более мелких групп таницитов внутри каждой субпопуляции. Также танициты могут демонстрировать дополнительную степень разнообразия внутри каждого типа в зависимости от физиологического состояния организма (Langlet, 2019). Стоит обратить внимание также на то, что большинство исследований сосредоточены на дорсовентральной организации таницитов, в то время как переднезадняя регионализация практически не рассматривалась (Mirzadeh et al., 2017; Pasquettaz et al., 2021).

Составление полной картины молекулярного и функционального профиля таницитов и усовершенствование их классификации является актуальной проблемой, решение которой имеет важное значение для понимания биологии таницитов и их функций в регуляции медиобазального гипоталамуса.

2.3.2. Ультраструктурная организация разных типов таницитов.

α 1-Танициты

Перикарион α 1-таницитов имеет следующие характеристики: 1) хорошо развитый аппарат эндоцитоза, а именно многочисленные гладкие и окаймленные везикулы, связанные с латеральной плазматической мембраной и цистернами комплекса Гольджи, и рециклирующие эндосомы на различных этапах сборки. Аппарат Гольджи образован

несколькими диктиосомами и GERL (комплекс Гольджи-эндоплазматический ретикулум-лизосомы, Golgi – Endoplasmic Reticulum - Lysosomes), ассоциированным с гладкими и окаймленными везикулами; 2) Несколько небольших цистерн шероховатого ЭПР (шЭПР) и многочисленные полирибосомы в основном сосредоточены в апикальной части клетки; 3) гладкий ЭПР (глЭПР) хорошо развит и распределен по всей цитоплазме; 4) вдоль апико-базальной оси клетки локализованы свободно расположенные микрофиламенты и микротрубочки; 5) многочисленные удлинённые митохондрии имеют электронно-плотный матрикс. Интересной особенностью является то, что внешняя мембрана митохондрий находится в тесном контакте с глЭПР (Spacek, Lieberman, 1980) и считается, что система глЭПР-митохондрии задействована в регуляции множества клеточных процессов, включая биосинтез и обмен липидов, кальциевый сигналинг, биоэнергетика клетки и регуляция апоптоза (Liu, Zhu, 2017). Таким образом, $\alpha 1$ -танициты имеют хорошо развитые механизмы эндоцитоза и трансцитоза. Однако вопросы, касающиеся того, какие именно молекулы транспортируются этими клетками, и какова их дальнейшая роль в регуляции работы гипоталамических ядер, до сих пор остаются открытыми.

Апикальная мембрана $\alpha 1$ -таницитов гладкая, без микроворсинок. Некоторые клетки проецируют в полость желудочка 1-2 чувствительные реснички, которые располагаются в инвагинации плазматической мембраны. Такое строение предполагает, что рецепторы, расположенные на мембране чувствительной реснички, будут подвергаться воздействию сигналов СМЖ более длительное время, что, вероятно, необходимо для передачи внутриклеточных сигналов (Mirzadeh et al., 2017).

Базальный отросток имеет три различающихся по строению участка: 1) проксимальный сегмент является местом перехода тела клетки в отросток и характеризуется тем же ультраструктурным строением, что и тело клетки. Также в проксимальном сегменте отростков описаны многочисленные шипикоподобные выступы. 2) Собственно отросток, который проходит через ДМЯ и ВМЯ гипоталамуса, проникает вглубь ткани примерно на 300 мкм. Отростки характеризуются четкообразными утолщениями (диаметром около 3 мкм), чередующимися с тонкими сегментами (диаметром около 1,5 мкм) по всей длине отростка. На ультраструктурном уровне наблюдаются многочисленные пучки микротрубочек и удлинённые митохондрии с трубчатыми кристами. В бисеровидных расширениях отростка в центральной области локализованы микротрубочки и митохондрии, а на периферии располагаются полирибосомы, глЭПР и шЭПР, митохондрии. 3) Терминальный участок отростка имеет грушевидную форму и контактирует с базальной мембраной кровеносных сосудов. Было показано, что каждый

основной отросток разветвляется и формирует 2 и более терминальных окончания. Терминальные окончания имеют ширину 5 мкм и характеризуются разной формой (Pasquettaz et al., 2021). Кроме того, некоторые отростки могут формировать «проходящий» (*en passant*) контакт с кровеносным сосудом, а полноценный контакт образовывать с другими сосудами, расположенными в более глубоких областях ткани. Оба этих типа контакта имеют одинаковое ультраструктурное строение. Они содержат филаментозный материал, заполняющий большую часть цитоплазмы. В этот материал погружены цистерны глЭПР и шЭПР и несколько митохондрий. Микротрубочки присутствуют на протяжении всего отростка, но отсутствуют в терминалях $\alpha 1$ -таницитов. В месте контакта с перикапиллярной базальной мембраной расположены полудесмосомы. Кровеносные сосуды перивентрикулярной области ДМЯ и ВМЯ в основном оплетены терминалями или контактами типа *en passant* $\alpha 1$ -таницитов. Некоторые концевые ножки астроцитов имеют общую поверхность контакта с $\alpha 1$ таницитами (Rodríguez et al., 2019). Было показано, что на шипикоподобных расширениях в проксимальных сегментах отростков $\alpha 1$ -таницитов оканчиваются терминали ГАМКергических и глутаматергических нейронов (Pasquettaz et al, 2021)

$\alpha 2$ -Танициты

$\alpha 2$ -танициты выстилают латеральные стенки нижней части инфундибулярного углубления и направляют свои отростки в АЯ гипоталамуса. Тело $\alpha 2$ -таницитов цилиндрическое. В ядре присутствует много эухроматина. Апикальный полюс $\alpha 2$ -таницитов отличается тем, что здесь локализуются многочисленные полирибосомы и все компоненты для осуществления эндоцитоза, а именно окаймленные везикулы, ранние и поздние (мультивезикулярные) эндосомы и лизосомы. В телах и базальных отростках встречаются липидные включения. Апикальная мембрана характеризуется многочисленными микроворсинками и небольшими выпячиваниями в полость желудочка, содержащими мультивезикулярные тела (рециклирующие эндосомы), которые могут быть источником микросом, присутствующих в СМЖ. У $\alpha 2$ -таницитов присутствуют 1-2 чувствительные реснички (Rodríguez et al., 2005). Проксимальный сегмент базального отростка толстый и характеризуется наличием шиповидных образований, заполненных полирибосомами (они соответствуют шипикам, наблюдаемым на препаратах, окрашенных по Гольджи); дистальная часть гладкая и оканчивается одной или несколькими ветвями, которые контактируют с кровеносными капиллярами аркуатного ядра (Millhouse, 1971; Card, Rafols, 1978; Seress, 1980). Сам отросток на всем протяжении содержит многочисленные митохондрии, микротрубочки, промежуточные филаменты и каналы

глЭПР. Терминали, оплетающие кровеносные капилляры, отличаются от таковых у $\alpha 1$ -таницитов. Они содержат митохондрии и многочисленные трубчатые структуры с умеренной электронной плотностью, а также электронно-светлые и электронно-плотные везикулы, которые предположительно являются секреторными гранулами (Rodríguez et al., 2005). Многочисленные дендриты устанавливают тесный контакт с клеточным телом и начальным сегментом базального отростка $\alpha 2$ -таницитов (Rodríguez et al., 2019). Установлено, что α -танициты формируют контакт не только с кровеносными сосудами (около 70% терминалей), но и с нейронами (в основном NPY- и POMC-нейронами), а также глиальными клетками (астроцитами, олигодендроцитами, NG2-клетками, также известными как полидендроциты, и микроглией). Кроме того, $\alpha 2$ -танициты оплетают своими ножками терминали ГАМКергических и глутаматергических (в меньшей степени) нейронов АЯ гипоталамуса (Pasquettaz et al, 2021).

$\beta 1$ -Танициты

$\beta 1$ -танициты выстилают латеральные стенки дна инфундибулярного углубления. Отростки оканчиваются на внешней пограничной мембране головного мозга, рядом с капиллярами портальной системы гипофиза, локализованными в срединном возвышении. Часть отростков $\beta 1$ -таницитов могут заканчиваться на капиллярах, расположенных в вентромедиальной области АЯ. Проксимальный сегмент этих отростков толстый с шиповидными утолщениями; дистальный сегмент отростка гладкий и заканчивается несколькими короткими ветвями (Seress, 1980; Rodríguez, 1969). Ультраструктурные различия были описаны между $\beta 1$ -таницитами, выстилающими латеральные углубления в дорсальной и вентральных областях. Первые были обозначены как $\beta 1D$ -танициты, а вторые - как $\beta 1V$ -танициты (Rodríguez et al., 1979).

$\beta 1D$ -танициты

$\beta 1D$ -танициты представляют собой цилиндрические клетки с удлиненными ядрами, лежащими на разных уровнях, т.е. имеют многорядную структуру. Тело $\beta 1D$ -таницитов имеет следующие характеристики: 1) апикальная цитоплазма и перикарион содержат субклеточные компартменты эндоцитарного пути; 2) проецируют в желудочек многочисленные микроворсинки, небольшие сферические выпячивания, содержащие мультивезикулярные тела, и более крупные выпячивания, заполненные полирибосомами (Rinne U.K., 1966). 3) некоторые из этих таницитов имеют первичную ресничку (Rodríguez et al., 2005; Акмаев, Попов, 1977).

Проксимальный сегмент базального отростка имеет шиповидные боковые расширения, заполненные полирибосомами. Центральная часть проксимального сегмента заполнена аппаратом Гольджи, глЭПР, митохондриями тубулярного типа, многочисленными микротрубочками и электронно-плотными гранулами диаметром 200-300 нм (Rodríguez et al., 2005).

Описаны три типа терминалей базального отростка $\beta 1$ -таницитов. Терминали I типа содержат элементы, вовлеченные в эндоцитоз/транцитоз. Эти окончания содержат несколько электронно-плотных гранул диаметром 100-130 нм, которые могут соответствовать секреторным везикулам. Окончания II типа содержат многочисленные электронно-плотные гранулы диаметром 100-130 нм и трубчатые образования с электронно-плотным содержимым. Терминали III типа снабжены 1) цистернами с гладкой поверхностью, часто расположенными концентрически; 2) гранулами разных размеров, наполненных нитевидным материалом; 3) частицами β -гликогена (Rodríguez et al., 2005; Rodríguez et al., 2019).

$\beta 1V$ -танициты

Этот тип таницитов образует выстилку латеральных областей срединного возвышения. В этих клетках отсутствуют внутрижелудочковые выпячивания, однако базальные отростки имеют шипикоподобные расширения, заполненные полирибосомами. Отличительной особенностью $\beta 1V$ -таницитов является наличие в перикарионе многочисленных крупных липидных капель, которые связаны с высокоразвитыми глЭПР и шЭПР. $\beta 1V$ -танициты имеют хорошо развитый механизм эндоцитоза/транцитоза и хорошо развитую транспортную систему вдоль базального отростка. Они также демонстрируют морфологические свидетельства секреторной активности, такие как наличие гранул в терминалях и присутствие мультивезикулярных телец (экзосом) на апикальном полюсе клетки. Наличие липидных включений предполагает синтез липидов (вероятно, простагландинов) этими клетками (Rodríguez et al., 1979; Rodríguez et al., 2005).

$\beta 2$ -Танициты

$\beta 2$ -Танициты выстилают центральную область срединного возвышения. Эти клетки имеют плоское клеточное тело и базальный прямой отросток, характеризуемый гладкой поверхностью и дистальным ветвлением, образованным несколькими тонкими, длинными и параллельно идущими ветвями. $\beta 2$ -Танициты проецируют свои отростки в среднюю область срединного возвышения и туберальную часть аденогипофиза (Guerra et al., 2010).

Апикальная плазматическая мембрана гладкая, а перикарион содержит хорошо развитый аппарат эндоцитоза-транцитоза. В базальных отростках наблюдается множество микротрубочек, хорошо развитый глЭПР, рассеянные кластерами липидные капли и скопления β -гликогена. Терминали базального отростка похожи на терминали I типа β 1-таницитов, что наводит на мысль о высокой активности транцитоза и секреции. Большинство из этих терминалей устанавливают контакт с внешней пограничной мембраной, обращенной к портальным капиллярам фенестрированного типа. Здесь, в перикапиллярной области, терминали β 2-таницитов имеют общую поверхность контакта с пептидергическими и аминергическими аксонными терминалями и с концами ножек локальных питуцитов. β 2-танициты обладают способностью секретировать пептиды /белки, хранящиеся в секреторных гранулах (Rinne, 1969; Rodríguez et al., 1979; Peruzzo et al., 2004; Rodríguez et al., 2005).

2.3.3. Цитохимическая и молекулярная организация таницитов.

Не только морфологическая и ультраструктурная организация, но и цитохимическая характеристика таницитов определяет их подразделение на 4 типа. Некоторые белки характерны для всех типов таницитов, и могут быть использованы как их специфические маркеры, например, виментин (белок промежуточных филаментов III типа), DARPP-32 (dopamine- and cyclic adenosine-3':5'-monophosphate (cAMP)-regulated phosphoprotein) (Meister et al., 1988).

Среди белков цитоскелета была показана экспрессия в таницитах глиального фибриллярного кислого белка (Glial fibrillary acidic protein, GFAP), нестина, β 4-тубулина. С применением метода ИГХ было установлено, что танициты содержат следующие белки: аквапорин 7 и 9 (Yaba et al, 2017), транскрипционный фактор Sox2, BLBP (brain lipid-binding protein), Musashi-1, Notch1, Notch2, Lhx2, Rax, Hes5 и ряд других (таблица 1) (Raikwar et al., 2019), ростовые факторы FGF-1, FGF-2, FGF-10, FGF-18 (Haan et al., 2013; Robins et al., 2013). Была показана экспрессия транспортера глутамата/аспартата GLAST, ГАМК (GABA), глутамата, Ca-связывающего белка S-100. α 1-, α 2- и β 1-танициты экспрессируют GLUT1 (транспортер глюкозы 1), в то время как β 2 — нет (Peruzzo et al., 2000). Анализ данных световой и электронной микроскопии показал различия и в распределении ряда ферментов. Так, фермент аденозинтрифосфатаза (АТФаза) в большом количестве присутствует в таницитах, противлежащих вентромедиальному ядру гипоталамуса (α 1 танициты) и не обнаруживаются в других таницитах (Firth, Vock, 1976). И.Г. Акмаев и его сотрудники исследовали наличие нескольких метаболических ферментов в таницитах крысы при нормальных и экспериментальных условиях. Они

обнаружили, что в β -таницитах активность глицерофосфатдегидрогеназы (GPDH), лактатдегидрогеназы (LDH) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G6PD) в 1,5-3 раз выше, чем в α -таницитах (Акмаев et al., 1973). Антитела против рецептора соматостатина (sst2(a)) дают сильную иммунореакцию у α -таницитов, но слабую у β -таницитов (Hashemi et al., 2001). Антитела против белка Rab4 (малая ГТФаза) дают сильную реакцию только у β 2-таницитов (Peguzzo et al., 2004). Различные типы таницитов используют различные механизмы поглощения и транспорта веществ. β 2-Танициты экспрессируют кавеолин-1 на своей апикальной поверхности и на терминалях, контактирующих с портальными капиллярами, β -танициты - только на терминалях, а α -танициты этого белка не содержат. Это свидетельствует о том, что кавеолин-зависимый эндоцитоз осуществляется только в β -таницитах (Peguzzo et al., 2004). Механизм кавеолин-зависимого эндоцитоза может быть вовлечен в эндоцитоз и рециклирование рецепторов ростовых факторов, как потенциальный механизм регуляции уровня клеточного сигналинга (Goodman, Najihosseini, 2015).

Иммуноцитохимическая реакция на белки межклеточных контактов также выявила различия между субпопуляциями таницитов. 1) Адгезионные контакты расположены в апикальной части латеральной плазматической мембраны всех типов таницитов. Они образуют непрерывный пояс вокруг каждой клетки. 2) Десмосомы локализуются вдоль латеральной плазматической мембраны тел α -таницитов, но отсутствуют в базальных отростках. Напротив, базальные отростки β 1- и β 2-таницитов и их терминали, расположенные во внешней области срединного возвышения, соединены десмосомами. Эта уникальная особенность может объяснить образование пучков отростков таницитов. 3) Ранее считалось, что коннексин 43 (Cx43) (белок щелевых контактов) присутствует лишь в α 1-таницитах. Однако исследования последних лет показали, что все субпопуляции таницитов у половозрелых животных характеризуются наличием щелевых контактов. Тем не менее, плотность распределения этих контактов различается среди разных типов таницитов. Так, иммунореактивность Cx43 сильная в α -таницитах и слабая - в β -таницитах (Szilvásy-Szabó et al., 2017). 4) «Неполные» плотные соединения иногда наблюдаются в апикальной области латеральной стенки плазматической мембраны и между базальными отростками α -таницитов. Это соединения, которые не формируют непрерывный пояс по периметру клетки (по типу пчелиных сот), а скорее имеют неорганизованный (диффузный) паттерн распределения. «Неполные» плотные соединения в природе встречаются редко, и их функциональное значение до конца не изучено. 5) β 2-Танициты соединяются плотными контактами, расположенными в апикальной части

латеральной плазматической мембраны. Они экспрессируют окклюдин, ZO-1 и клаудины-1 и -5; эти белки расположены в виде непрерывного пояса вокруг клеточных тел β 2-таницитов. Интересно, что танициты, выстилающие аркуатное ядро, соответствующие α 2- и β 1-таницитам, не экспрессируют клаудин-1, вместо этого они демонстрируют неорганизованный паттерн экспрессии окклюдина, ZO-1 и клаудина-5. 6) Терминали α -таницитов контактируют с базальной мембраной капилляров гипоталамуса, где присутствует ГЭБ; терминали β -таницитов контактируют с внешней пограничной мембраной мозга (*pia mater*), которая отделяет срединное возвышение от базальной мембраны порталных капилляров. В месте контакта между терминалями таницитов и базальной мембраной или внешней пограничной мембраной располагаются полудесмосомы (Rodriguez, 2019).

Таким образом, разные типы таницитов характеризуются своим индивидуальным набором маркеров, в соответствии с выполняемыми ими функциями. Несмотря на накопившиеся данные о различном уровне экспрессии этих маркеров в разных типах таницитов, до сих пор остается открытым вопрос о роли этих белков в функционировании каждой конкретной субпопуляции таницитов и их значения для работы медиобазального гипоталамуса в целом.

Таблица 1. Уровень экспрессии РНК различных маркеров в субпопуляциях таницитов (по Raikwar et al., 2019). – - отсутствие экспрессии; + – очень низкий уровень экспрессии; ++ – низкий уровень экспрессии; +++ – умеренный уровень экспрессии; ++++ – высокий уровень экспрессии; +++++ – очень высокий уровень экспрессии.

Маркер	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\beta 1$	$\beta 2$
Sox2	+++++	+++++	+++++	+++++
Vim	+++++	+++++	+++++	+++++
Fgfr1	++	+	++	++++
Fgfr2	+	+	+	+
Fabp7	++	++	+	+
Cntfr	+	+	+	+
Fgf10	++	++	+	+
GLUT1	+	+	-	-
GLT-1	+	+	-	-
GLAST	-	-	+	+
GKRP	++	++	++	++
Nes	+++	+++	++	+++
Gpr50	+++++	+++	++	+++
Ppp1r1b	+	+	++	+++
6330403K07Rik	+++++	++++	+++	+++
Trhde	+	+	+	+
Rbp1	+	+	+	+
Rax	++	+++	++++	++++
Rab4	-	-	-	+++
Stra6	+	+	+	+
Dio2	+	++	++	++++

Foxj1	+++	+++	+++	+
Gfap	+++	+	+	+
Rarres2	+++++	++	++	+
S100b	+++++	+	+	+
Gja1	+++++	+++++	+++++	+++++
Cntf	-	+	+	+
Prdx6	+++++	+++++	+++++	+++++
Mt1	+++++	+++++	+++++	+++++
Mt2	+++++	+++++	+++++	+++++
Dlk1	+++++	+++++	+++++	+++++
Cdhr4	+	-	+	-
Calb1	+	+	+	+
Tmem212	++	+	+	+
Itih5	++	+	+	+
Flt1	++	+	+	+
Rspo3	+++	+	+	-
Slc17a8	+++++	+	+	-
Lyz2	++	+	+	-
P3h2	+	++	+	+
Frzb	++	+++	++	+
Cldn10	+	+	++	++++
Col25a1	+	+	++	++++
Scn7a	+	+	+	++++
Rgs7bp	+	+	+	+++

Cysltr1	-	+	+	++
Lrrtm3	+	+	+	-

2.4. Функции таницитов.

Субпопуляции таницитов различаются между собой выполняемыми функциями. Это связано в первую очередь с тем, что разные типы таницитов взаимодействуют с разными структурами медиобазального гипоталамуса. Кроме того, уникальная локализация и морфология этих клеток позволяют им осуществлять широкий спектр различных задач, в том числе модулировать и регулировать работу гипоталамических структур, что делает танициты важным звеном в поддержании гомеостаза организма.

2.4.1. Роль таницитов в формировании гематоэнцефалического и гематоликворного барьеров.

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ, BBB, blood-brain barrier) играет ключевую роль в поддержании гомеостаза нервной ткани. В большинстве областей мозга ГЭБ сформирован эндотелиоцитами, перицитами и астроцитами. Белки плотных контактов предотвращают свободное прохождение молекул парацеллюлярным транспортом, и принимают участие в формировании поляризованного рецептор-опосредованного транспорта через эндотелий. В инфундилярном углублении срединное возвышение представляет собой нетипичную для мозга структуру и относится к одному из семи циркумвентрикулярных органов (ЦВО). Главной характеристикой ЦВО является наличие высокопроницаемых фенестрированных капилляров. Из-за отсутствия в данных структурах ГЭБ, ЦВО получили название «мозговых окон». Тем не менее, β -танициты, образующие выстилку срединного возвышения, формируют гематоликворный барьер (ГЛБ, blood-CSF barrier). Это означает, что барьер в данной структуре мозга смещен из области кровеносных сосудов в область клеточных тел таницитов. Было установлено, что фенестрированные капилляры позволяют не только пассивно и быстро диффундировать нейрогормонам, выделяемым нейросекреторными аксонами, в портальное кровообращение аденогипофиза, но также обеспечивают поступление питательных веществ и метаболических сигналов (молекулярной массой до 40 кДа) в мозговую ткань срединного возвышения (Schaeffer et al., 2013). Наличие плотных контактов в виде пчелиных сот (honeycomb-like shape) вокруг тел β -таницитов ограничивает их диффузию в другие области головного мозга. Так, при внутривенном введении красителя голубого Эванса (Evans Blue) распространение было ограничено лишь срединным возвышением, а

внутрижелудочковое введение препятствовало его проникновению в данную структуру со стороны СМЖ. Было показано, что в состав плотных контактов входят такие белки как окклюдины, белок ZO-1, клаудин-5 и клаудин-1. Последний селективно выявляется только в таницитах или таницито-подобных клетках других ЦВО, контактирующих с фенестрированными капиллярами (Langlet et al., 2013).

Помимо формирования ГЛБ танициты инфундибулярного углубления – α -танициты – являются одними из участников формирования ГЭБ в дорсомедиальном, вентромедиальном и аркуатном ядрах гипоталамуса. С помощью электронной микроскопии было установлено, что в ДМЯ и ВМЯ капилляры оплетены терминалями α 1-таницитов, проходящими отростками таницитов (*en passant* контакты) и частично терминалями астроцитов. В области АЯ капилляры оплетены терминалями α 2-таницитов. В апикальной части α 1- и α 2-таницитов формируются плотные контакты, расположенные, как правило, диффузно. Плотные контакты в данной области выстилки образованы такими белками плотных контактов, как окклюдины, белок ZO-1, клаудин-5. Помимо вышеперечисленных белков, в области сосудов наблюдается также экспрессия клаудина 3, характерного для всех сосудов, где присутствует ГЭБ. Примечательно, что при внутрижелудочковом введении красителя голубого Эванса (Evans Blue), АЯ проницаемо для данного красителя, в то время как соседние структуры (срединное возвышение, ВМЯ и ДМЯ) – нет. Авторы предполагают, что это может указывать на наличие парацеллюлярного транспорта между телами α 2-таницитов и/или присутствие диффузионного барьера между АЯ и соседними структурами. Природа этого барьера до сих пор остается не установленной. Отсутствие парацеллюлярного транспорта между телами α 1-таницитов, несмотря на диффузно расположенные плотные контакты как в α 2-таницитах, авторы связывают с присутствием между телами α 1-таницитов эпендимоцитов, для которых характерно 1) присутствие плотных контактов вокруг всего клеточного тела по типу пчелиных сот, препятствующих свободной диффузии молекул; 2) наличие ресничек на апикальной поверхности, биение которых приводит в движение поток спинномозговой жидкости и, таким образом, может ограничивать обмен молекулами между СМЖ и выстилкой третьего желудочка в области ДМЯ и ВМЯ гипоталамуса (Mullier et al., 2010).

Кроме того, стоит отметить, что было продемонстрировано участие таницитов, выстилающих область вентромедиальной части аркуатного ядра, в изменении проницаемости сосудов в этой области, для поддержания энергетического гомеостаза организма. Было установлено, что смещение энергетического баланса, в частности

голодание, вызывает временные обратимые структурные изменения в организации барьерных структур в области срединного возвышения и аркуатного ядра. Так, Langlet F. и соавт. (Langlet et al., 2013) показали, что при голодании в области аркуатного ядра происходит ряд изменений, а именно: 1) диффузно расположенные контакты в области α 2-таницитов становятся организованными по принципу пчелиных сот, окружая тела таницитов по всему периметру апикальной части клетки, и начинают экспрессировать клаудин 1, характерный для β -таницитов; 2) под воздействием синтезируемых таницитами VEGF-A на рецепторы VEGFR1 и VEGFR2 в эндотелии увеличивается проницаемость сосудов в области срединного возвышения и вентромедиальной части аркуатного ядра. Это позволяет метаболическим сигналам (глюкоза, лептин, грелин) беспрепятственно поступать из кровотока к нейронам АЯ, отвечающим за энергетический гомеостаз, и влиять непосредственно на пищевое поведение.

Таким образом, танициты являются основными элементами не только в составе ГЭБ и ГЛБ в инфундибулярном углублении, но и ключевыми игроками в регуляции проницаемости барьерных структур для поддержания энергетического гомеостаза организма.

2.4.2. Танициты и транспорт различных веществ.

Поглощение веществ клетками может осуществляться двумя способами: клатрин- или кавеолин-опосредованным эндоцитозом. Различные типы таницитов используют разные механизмы эндоцитоза и демонстрируют заметные различия в отношении экспрессии и субклеточного расположения белков, участвующих в эндоцитозе и трансцитозе, таких как кавеолин-1, клатрин, ARF6 и Rab4 (Peruzzo et al., 2004).

Было показано, что кавеолин-1 присутствует на апикальной и базальной полюсах β 2-таницитов, а в β 1-таницитах он локализуется лишь в терминалях этих клеток. Это указывает на то, что β 1- и β 2-танициты осуществляют кавеолин-опосредованный эндоцитоз на базальном полюсе, в области контакта с портальными капиллярами, тогда как β 2-танициты также участвуют в кавеолин-опосредованном эндоцитозе на апикальном полюсе, контактирующим с полостью желудочка. Клатрин-опосредованный транспорт характерен для всех типов таницитов и осуществляется как в апикальной (Peruzzo et al., 2004), так и в базальной части клетки. В частности, по клатрин-зависимому механизму осуществляется интернализация (эндоцитоз) активированных рецепторов, находящихся на поверхности клетки.

Кроме того, было показано, что танициты способны к трансцитозу и осуществляют двунаправленный транспорт различных веществ из СМЖ в кровь и наоборот. В частности, был описан механизм, по которому транспортируется гормон лептин из кровотока через СМЖ к нейронам аркуатного ядра. Использование флуоресцентномеченого лептина показало, что переносимый с кровью лептин, благодаря малому размеру молекулы (16 кДа) способен свободно поступать через фенестрированные капилляры портального кровообращения в срединном возвышении и поглощается таницитами. Этот процесс требует активации LepR сигнального пути. После интернализации терминальными концами β -таницитов лептин в везикулах, окаймленных клатрином, транспортируется к апикальному полюсу таницитов и высвобождается ERK-зависимым механизмом в полость третьего желудочка. Дальше лептин может достигать медиобазального гипоталамуса и других областей мозга, прилегающих к желудочкам, и воздействовать на лептин-чувствительные нейроны (Duquenne et al., 2021; Balland et al., 2014).

Представление таницитов как промежуточного звена, выступающего в качестве шатла для транспорта периферических метаболических гормонов в мозг, подтверждается исследованиями, демонстрирующими, что циркулирующий в крови грелин также переносится в спинномозговую жидкость таницитами (Collden et al., 2014; Cabral, De Francesco, Perello, 2015). Это указывает на то, что аналогичный путь может быть использован другими метаболическими сигналами, передаваемыми через кровь.

Также показано, что танициты экспрессируют рецепторы некоторых гонадных стероидных гормонов (Parkash et al., 2015), однако вопрос о том, участвуют ли эти клетки в транспорте гормонов через мозговой барьер, до сих пор остается открытым.

2.4.3. Танициты как хемосенсоры.

Физиологический контроль массы тела требует мониторинга и интеграции многих сигналов (гормонов, метаболитов), которые предоставляют информацию с периферии (желудок, поджелудочная железа, жировые отложения и т.д.) в мозг (Morton et al. 2006). Одними из ключевых сигналов являются циркулирующие в крови метаболиты, такие как глюкоза, свободные жирные кислоты и аминокислоты. Ряд исследований указывают, что танициты могут выступать в качестве глюкосенсорных клеток.

Роль таницитов в рецепции метаболитов была первоначально предложена исследователями, показавшими, что разрушение стенок третьего желудочка, содержащих танициты, нарушает нормальную пищевую реакцию в ответ на гипогликемию, которая может быть восстановлена после регенерации этих клеток (Sanders et al. 2004). Позже

было продемонстрировано, что танициты обладают одинаковыми свойствами с одними из наиболее хорошо охарактеризованных глюкосенсорных клеток – β -клетками поджелудочной железы, секретирующими инсулин в ответ на повышение уровня глюкозы в крови (Schuit et al., 2001). В β -клетки поджелудочной железы глюкоза поступает через переносчик глюкозы 2 (GLUT2) и фосфорилируется глюкокиназой (GK), чтобы через гликолитический путь привести к выработке энергии в форме аденозинтрифосфата (АТФ). Это ведет к увеличению внутриклеточного отношения АТФ к аденозин-5'-дифосфату (АДФ), что вызывает закрытие АТФ-чувствительных калиевых каналов (K_{ATP} каналы), расположенных на клеточной мембране. Закрытие каналов K_{ATP} вызывает деполяризацию мембраны и последующее поступление Ca^{2+} через потенциал-управляемые каналы, это запускает экзоцитоз секреторных везикул инсулина. Было показано, что GLUT2, GK и K_{ATP} каналы экспрессируются в таницитах. Это привело к идее, что танициты воспринимают глюкозу по тому же механизму, что и β -клетки поджелудочной железы (Salgado et al., 2014).

Кроме того, на переживающих срезах мозга Frayling С. и соавт. (2011) показали, что при селективной стимуляции таницитов глюкозой или неметаболизируемыми субстратами транспортеров глюкозы (GLUTs) и котранспортеров Na^+ /глюкозы с помощью патч-пипетки эти клетки реагируют устойчивым увеличением внутриклеточного Ca^{2+} . В свою очередь, увеличение внутриклеточного Ca^{2+} запускает выброс АТФ во внеклеточное пространство (вероятно, через гемиканалы, сформированные Cx43). АТФ активирует пуринергические рецепторы P2Y1, расположенные на самих таницитах (Orellana et al., 2012). Активация рецепторов P2Y1 инициирует распространение межклеточных кальциевых волн через соседние танициты (Frayling et al., 2011). Учитывая, что ранее было показано, что АТФ и его метаболит аденозин модулируют активность нейронов в мозговых центрах питания за счет активации пуринергических рецепторов и влияют на пищевое поведение (Xu et al., 2016; Kittner et al., 2006), этот паракринный фактор, высвобождаемый таницитами в ответ на глюкозу, был предложен в качестве главного возможного кандидата для информирования нейронов NPY/AgRP и POMC о внеклеточных изменениях концентрации энергетических метаболитов (Dale, 2011). Есть некоторые свидетельства того, что агонисты и антагонисты P2Y1 при введении в третий желудочек могут изменять пищевое поведение (Kittner et al., 2006).

Описаны и другие механизмы, через которые может происходить контроль концентрации глюкозы в СМЖ. Последние исследования показали, что танициты имеют рецепторы, чувствительные к сладкому – TAS1R2. Они относятся к рецепторам,

связанным с G-белками, и могут связывать глюкозу и ряд непищевых подсластителей, таких как сукралоза, ацесульфам К и RebA. На переживающих срезах мозга было показано, что локальное воздействие на тела $\alpha 2$ -таницитов этих веществ вызывает повышение внутриклеточного Ca^{2+} , которое распространяется на соседние клетки в виде Ca^{2+} волн. Распространение Ca^{2+} волн приводит к высвобождению АТФ таницитами и вызывает активацию рецепторов P2Y1. Было продемонстрировано, что доля таницитов, отвечающих на введение глюкозы, уменьшается более чем на половину у мышей, нокаутных по TAS1R2. Так, у дикого типа 53% таницитов отвечают кальциевыми волнами на введение глюкозы, в то время как у мышей-нокаут по гену *Tas1r2* – только 22%. Стоит отметить, что нокаут по этому рецептору не подавляет полностью чувствительность таницитов к глюкозе. Предполагается, что рецептор сладкого вкуса опосредует чувствительность к глюкозе примерно в 60% таницитов, чувствительных к глюкозе, в то время как остальные 40% таницитов, чувствительных к глюкозе, используют какой-то другой механизм (Masuda et al., 2012; Benford et al., 2017).

Помимо АТФ танициты также могут высвобождать метаболит глюкозы – лактат – для информирования нейронов аркуатного ядра об изменении внеклеточной концентрации глюкозы. Это может быть подтверждено тем, что танициты имеют функциональные транспортеры монокарбоксилатов MCT1 и MCT4 (Elizondo-Vega et al., 2020), которые обеспечивают отток лактата из клетки, в то время как соседние орексигенные NPY/AgRP и анорексигенные POMC нейроны в АЯ содержат на своих мембранах MCT2, обеспечивающий поступление лактата в клетки (Cortes-Campos et al., 2013)

Помимо глюкозы, танициты чувствительны к аминокислотам. В таницитах было показано присутствие как минимум двух видов рецепторов, чувствительных к аминокислотам – TAS1R1/TAS1R3 и mGluR4. Аминокислоты, такие как Arg, Lys и Ala, вызывают Ca^{2+} -волны в таницитах, это приводит к высвобождению АТФ через паннексин 1 и CaHM1, который воздействует на P2-рецепторы нейронов АЯ (Lazutkeite et al., 2017).

Таким образом, танициты чувствительны к изменениям концентрации глюкозы и аминокислот. На сегодняшний день не установлено, способны ли танициты улавливать изменения в содержании жирных кислот в СМЖ/крови. Тем не менее, данные исследования демонстрируют важную интегративную роль этих клеток в регуляции пищевого поведения.

2.4.4. Роль таницитов в регуляции секреции нейрогормонов ядрами гипоталамуса.

Танициты контролируют не только поступление веществ из кровотока и СМЖ в мозговую ткань, но и регулируют высвобождение нейрогормонов клетками гипоталамуса в портальную систему гипофиза. Было установлено, что прямой контакт терминалей нейронов, синтезирующих гонадотропин-рилизинг гормон (GnRH), с капиллярами портальной системы гипофиза контролируется обратимыми изменениями в срединном возвышении во время эстрального цикла (Prevot et al., 1998; Prevot, 1999). В день диэструса, когда выработка гонадотропина низка, секреторные нервные окончания GnRH-нейронов полностью окружены ножками β 1-таницитов, которые создают физический диффузионный барьер, преграждая аксонам прямой доступ к капиллярам и препятствуя высвобождению GnRH в портальное кровообращение. В фазу проэструса, когда происходит преовуляторный выброс GnRH/лютеинизирующего гормона (LH), отростки β 1-таницитов претерпевают структурное ремоделирование, что приводит к освобождению терминалей аксонов и установлению ими прямого нейрогемального контакта (то есть контакта между аксональной мембраной GnRH нейронов и базальной пластинкой, окружающей перикапиллярное пространство сосудов портальной системы гипофиза). Последние исследования продемонстрировали, что установление нейрогемального контакта GnRH нейронами и пластичность таницитов срединного возвышения являются ключевыми факторами в контроле репродуктивной функции. Был установлен молекулярный механизм данного взаимодействия. Показано, что TGF α и TGF β (transforming growth factor α and β) играют критическую роль в ремоделировании отростков таницитов, но имеют противоположные эффекты. На телах таницитов локализуются рецепторы к эстрогенам, которые могут вызывать экспрессию и секрецию TGF α в день проэструса. TGF α косвенно стимулирует секрецию GnRH, посредством стимуляции секреции PGE $_2$ глиальными клетками по паракринному механизму. PGE $_2$, в свою очередь, воздействует на GnRH-нейроны, индуцируя выброс гормона, а также на отростки таницитов, стимулируя их сокращение (ретракцию) за счет ремоделирования актинового цитоскелета. Кроме того, TGF α при взаимодействии с рецепторами на мембране таницитов сначала вызывает активацию eгbV1-сигнального пути, а затем PGE $_2$ -зависимую продукцию TGF β . TGF β в свою очередь инициирует ретракцию отростков таницитов, которая также требует активности металлопротеиназ (MMPs) в срединном возвышении, что приводит к потере адгезии отростков таницитов с субстратом (Prevot et al, 2003; Prevot et al., 2010).

Также была показана роль таницитов в регуляции гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси (Fekete, Lechan, 2014). Танициты экспрессируют высокоспецифичный эктофермент, расщепляющий тиреолиберин (Thyrotropin-releasing hormone, TRH) - Trhde, *tyroglutamyl peptidase II* - фермент, который контролирует деградацию TRH (Sánchez et al., 2009). Это дает основание полагать, что танициты могут напрямую регулировать биодоступность TRH до его прохождения в портальную систему кровообращения. Кроме того, танициты являются основными клетками в головном мозге, экспрессирующими дейодиназу 2-го типа (*deiodinase-2, Dio-2*) - фермент, катализирующий превращение прогормона T4 в активную форму T3. Также танициты имеют два типа транспортеров, участвующих в транспорте T3 и T4 – органический анион-транспортирующий полипептид 1C1 (OATP1C1) (Nakao et al., 2006) и транспортер монокарбоксилата 8 (MCT8) (Roberts et al., 2008). Захватывая T4 из кровотока или СМЖ и превращая его в T3, танициты могут участвовать в регуляции негативной обратной связи для ингибирования синтеза TRH. Была показана роль T3, продуцируемого таницитами, в поддержании энергетического гомеостаза организма (Lazcano et al., 2015). Так, голодание приводит к усилению экспрессии Dio-2 в таницитах срединного возвышения, что провоцирует увеличение содержания T3 в гипоталамусе (Coppola et al., 2005). Установлено, что это является критическим фактором для орексигенного ответа нейронов NPY и AgRP на голодание. Также было показано, что центральное введение T3 усиливает потребление пищи крысами (Herwig et al., 2008).

Кроме того, аксоны нейронов, синтезирующих TRH, оплетены ножками $\beta 2$ -таницитов. В работе Müller-Fielitz H. и соавт. (2017) было показано, что активация TRH-рецептора 1 на таницитах селективно повышает уровень внутриклеточного кальция в таницитах посредством активации $G\alpha_{q/11}$ –связанного пути. Это способствует росту отростков таницитов в направлении сосудов портальной системы гипофиза и формированию физического барьера для терминалей аксонов TRH-нейронов и активации фермента Trhde (Müller-Fielitz et al., 2017).

Посредством регуляции гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси, танициты также принимают участие в физиологическом ответе организма на изменение длины светового дня (Nanon et al., 2008; Ebling, 2015). Это важно как для размножения, так и для накопления жировых запасов у сезонных животных - птиц (Yoshimura et al., 2003), грызунов (Watanabe et al., 2004; Herwig et al., 2013) и овец (Sáenz de Miera et al., 2013; Lomet et al., 2018)

Таким образом, будучи промежуточным регуляторным звеном между гипоталамусом и аденогипофизом, танициты играют ключевую роль в контроле

поступления нейрогормонов в портальную систему гипофиза, что важно для нормального функционирования всех систем организма, особенно для регуляции пищевого поведения, репродуктивной функции, и в целом для выживания особи.

2.4.5. Танициты как нейральные стволовые клетки медиобазального гипоталамуса.

Долгое время считалось, что в головном мозге существует две нейрогенные зоны – субвентрикулярная зона (SVZ) боковых желудочков и субгранулярная зона (SGZ) зубчатой извилины гиппокампа. В последние десятилетия были обнаружены другие области мозга, характеризующиеся клеточной пролиферацией в постнатальном онтогенезе, такие как гипоталамус, полосатое тело, черное вещество, кора головного мозга и миндалина (Jurkowski et al., 2020).

Evans и соавт. в 2002 году впервые показали, что в области гипоталамуса вокруг желудочков локализуются клетки, способные к пролиферации (Evans et al., 2002). Xu и соавт. (2005) продемонстрировали, что этими пролиферирующими клетками в гипоталамусе являются танициты. Они обладают способностью к медленной пролиферации, которая усиливается при введении FGF-2, а также способностью к формированию нейросфер *in vitro* (Xu et al., 2005).

Морфологически танициты напоминают радиальные глиоциты. В процессе развития коры радиальные глиальные клетки являются прогениторными клетками (клетками-предшественниками нейронов) и их отростки образуют каркас для миграции нейробластов (Kriegstein, Alvarez-Buylla, 2009; Etienne-Manneville, 2012; Barry, Pakan, McDermott, 2014). Радиальные глиальные клетки высвобождают АТФ, который контролирует пролиферацию нейронов. Действительно, АТФ регулирует пролиферацию нейральных предшественников в сетчатке, во внутреннем ухе (улитке) и субвентрикулярной зоне (СВЗ) (Weissman, 2004). В данном случае АТФ действует через рецепторы P2Y1, стимулируя Ca²⁺-волны в прогениторных клетках. Экспрессия отдельных эктонуклеотидаз, деградирующих внеклеточный АТФ, ассоциирована с популяцией стволовых клеток (Zimmermann, 2011). Танициты характеризуются наличием сигнальной системы, ассоциированной со стволовыми клетками: они могут высвобождать АТФ, имеют P2Y1 рецепторы, экспрессируют эктонуклеотидазы и отвечают на активацию этих рецепторов интенсивными Ca²⁺-волнами, а их отростки могут выступать в качестве скаффолда для мигрирующих нейробластов. В настоящее время известно, что танициты экспрессируют ряд маркеров нейральных стволовых клеток (НСК): нестин, виментин,

sox2, BLBP, транспортер глутамата/аспартата (GLAST), Musashi-1, GFAP. Эти маркеры встречаются в таницитах у представителей разных видов млекопитающих: у грызунов (крысы (Berger, Hediger, 2001; Xu et al., 2005; Pérez-Martín et al., 2010), мыши (Robins, 2013; Naan et al., 2013; Pellegrino et al., 2018), сибирского хомяка (Barrett et al., 2006; Nilaweera et al., 2011; Bolborea et al., 2011), монгольской песчанки (Redecker, 1989)), овец (Batailler et al., 2014), приматов (*Aotus trivargatus*, *Macaca Fasciculata* (Meister et al., 1988), серого мышиноного лемура (Pellegrino et al., 2018)) и у человека (Pellegrino et al., 2018)). У половозрелых животных танициты экспрессируют гены, которые характерны для прогениторных клеток, такие как *Fabp7*, *Slc1a3*, *Notch1*, *Notch2*, *Hes5*, *Lhx2*, *Rax*, *USG148*, *Prss56* (Langlet et al., 2019).

В многочисленных исследованиях было показано, что танициты способны к пролиферации как *in vitro* (Bennett et al., 2009; Robins et al., 2013), так и *in vivo* (Xu et al., 2005; Naan et al., 2013; Miranda-Angulo et al., 2014). Однако, пролиферативная активность таницитов ниже по сравнению с клетками нейрогенных ниш SVZ и SGZ (Rodriguez et al., 2019). Различные субпопуляции таницитов гетерогенны в отношении экспрессии маркеров НСК, пролиферативных свойств и направления дифференцировки. Так, α -танициты пролиферируют и затем дифференцируются в танициты (т.е. формируют самообновляющуюся клеточную популяцию), в астроциты и, в меньшей степени, в нейроны гипоталамуса (Rodriguez et al., 2005; Robins et al., 2013; Yulyaningsih et al., 2017). FGF10⁺-танициты (которые соответствуют β -таницитам) главным образом дифференцируются в нейроны (Naan et al., 2013). Было установлено, что в раннем постнатальном развитии активно пролиферирующими клетками в инфундибулярном углублении являются β 2-танициты, которые дифференцируются преимущественно в нейроны, локализующиеся в срединном возвышении (Lee et al., 2012; Naan et al., 2013). У взрослых животных танициты дифференцируются в нейроны и, в меньшей степени, в глиоциты, которые мигрируют в более дорсальные области гипоталамуса – аркуатное, вентромедиальное, дорсомедиальное, латеральное и заднее ядра гипоталамуса (Chaker et al., 2016; Prevot et al., 2018). Эти различия являются результатом разного транскриптомного профиля, характерного для каждого типа таницитов, и могут быть связаны с их разным происхождением в ходе эмбрионального развития. Так, танициты, выстилающие латеральные стенки инфундибулярного углубления и соответствующие α -таницитам, происходят из клеток вентральной стенки нервной трубки, экспрессирующих Shh (Sonic Hedgehog), экспрессия которого в этих клетках сохраняется и у взрослых животных (Langlet, 2019). В исследованиях *in vitro* было показано, что именно α -

танициты, в отличие от β -таницитов, способны формировать нейросферы (Robins et al., 2013). В настоящее время предполагается, что α -танициты являются истинными НСК у половозрелых животных, в то время как β -танициты представляют собой скорее коммитированные прогениторные клетки (Rodríguez et al., 2019).

В настоящее время молекулярный контроль прогениторных свойств таницитов остается в значительной степени не исследованным. FGF2 и инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF1) - два фактора роста, которые регулируют пролиферацию и нейрогенез в SVZ и SGZ (Galvez-Contreras et al., 2012; Nieto-Estévez, Defterali, Vicario-Abejón, 2016), стимулируют пролиферацию α -таницитов взрослых грызунов (Robins et al., 2013; Pérez-Martín et al., 2010; Jourdon et al., 2016). Более того, внутрижелудочковое введение IGF1 у взрослых крыс увеличивает количество новых нейронов гипоталамуса, но еще предстоит определить, является ли это следствием усиления нейрогенеза таницитов (Pérez-Martín et al., 2010). Было показано, что такой физиологический стимул как длина светового дня влияет на пролиферативную активность нейрогенной ниши гипоталамуса. У овец нейроанатомические особенности гипоталамической ниши подвержены влиянию длины светового дня. Во время короткого фотопериода, когда животные сексуально активны, выстилка, образованная таницитами, экспрессирующими Sox2, является более толстой, отростки таницитов демонстрируют структурную реорганизацию, пролиферация клеток гипоталамуса и экспрессия маркера нейробластов даблкортина (doublecortin, DCX) увеличиваются по сравнению с длительным фотопериодом, который соответствует периоду полового покоя (Butruille et al., 2017). Эти исследования позволяют предположить, что период половой активности связан с усилением нейрогенеза в области гипоталамуса. Также было показано, что внутрижелудочковое введение BDNF увеличивает пролиферацию клеток в гипоталамусе. Rojczyk E. и соавт. продемонстрировали, что нейролептики (оланзапин, хлорпромазин и галоперидол) при длительном многократном введении увеличивают число Ki-67-позитивных клеток в гипоталамусе взрослых самцов крыс (Rojczyk et al., 2015), что имеет важное клиническое значение. Авторы, однако, не обозначили пролиферирующие клетки как танициты.

Функциональное значение нейрогенеза таницитов заключается в том, что танициты дифференцируются в нейроны, которые затем интегрируются в нейронные сети аркуатного ядра гипоталамуса, то есть важны для поддержания энергетического/метаболического статуса организма. Также, танициты способны к глиогенезу, давая начало астроцитам, заселяющим медиобазальный гипоталамус, участвующий в метаболическом контроле (Kim et al., 2014; Sharif, Prevot, 2017; Prevot et

al., 2018). Все вышесказанное позволяет предполагать, что танициты вносят вклад в пластичность контуров энергетического гомеостаза, производя как новые нейроны, так и окружающую их модулирующую глиальную среду для энергетических центров организма в гипоталамусе.

Несмотря на пристальный интерес исследователей к пролиферативному потенциалу таницитов, многие вопросы остаются не изученными. Как меняется пролиферативная активность различных субпопуляций таницитов на протяжении постнатального развития и при старении? Какие еще факторы влияют на ее активность? Какие фармакологические агенты могут направленно стимулировать или подавлять нейрогенез в таницитах? Ответы на эти вопросы позволят пролить свет на возможные механизмы обновления клеточного состава нейронов медиобазального гипоталамуса и откроют пути стимуляции нейрогенеза для таргетного воздействия и потенциального лечения ряда заболеваний.

2.5. Развитие и старение инфундибулярного углубления.

2.5.1. Эмбриональное развитие срединного возвышения. Молекулярные механизмы.

Гипоталамус развивается из вентральной области ростральной части промежуточного мозга. Развитие гипоталамуса начинается в раннем эмбриогенезе, еще на стадии нервной пластинки. Паттерн формирования будущего гипоталамуса определяется за счет различного влияния морфогенов. Индукцией к формированию гипоталамуса является продукция морфогенов Shh (Sonic Hedgehog) и Nodal подлежащей прехордальной пластинкой (prechordal plate). Мыши, мутанты по этому гену, не способны формировать никакую из структур гипоталамуса (Alvarez-Bolado, Paul, Blaess, 2012; Maggi, Zasso, Conti, 2015). В эмбриогенезе одними из основных регуляторов формирования гипоталамуса являются Shh, BMP и Wnt сигнальные пути. Было показано, что в рострокаудальной регионализации гипоталамуса ключевую роль играют активация и ингибирование Wnt сигнального пути в разных областях мозга. Так, Wnt путь, опосредуемый транскрипционным фактором Lef/Tcf, активен в каудальной области и ответственен за формирование задней области гипоталамуса (Lee et al., 2006), а активность его антагониста/ингибитора Dickkopf1 в ростральной области будущего гипоталамуса отвечает за формирование передних структур мозга (Mukhopadhyay et al., 2001). Для формирования медиобазального гипоталамуса важным является экспрессия транскрипционного фактора Six3 в этой области. Этот сигнальный путь участвует в

создании дискретных зон экспрессии определенных лигандов, в частности тех, которые влияют на профиль активности Shh, BMP и Fgf, которые также важны для регионализации гипоталамуса в процессе эмбриогенеза (Lagutin et al., 2003; Pearson, Placzek, 2013).

В дорсовентральной регионализации принимают участие BMP и Shh сигнальные пути. Активность Shh необходима для формирования вентральной пластинки в области будущего гипоталамуса. Здесь клетки активно пролиферируют, что способствует значительному увеличению в объеме этой области. Shh сигнальный путь ответственен за формирование туберальной и маммилярной областей гипоталамуса, при этом клетки-предшественники мигрируют в медиоатеральном направлении (радиально), но не мигрируют в росто-каудальной плоскости (тангенциально) (Alvarez-Bolado, Paul, Blaess, 2012). Кроме того, согласно ряду исследований, в определенных областях вентральной пластинки Shh регулирует активность экспрессии генов-предшественников, таких как Nkx2.1, Nkx2.2, Six3 – на ранних этапах и Dbx1 и Sim1 – на поздних. За формирование дорсальной области отвечает активность BMP в клетках этой области. BMP работает как антагонист Shh, за счет активации репрессора Shh - Tbx2 (Pearson, Placzek, 2013). Однако, при формировании гипоталамуса Shh/ BMP сигнальные пути имеют не только различный пространственный паттерн активности, но и временной (Shh – ранний, BMP – поздний), что необходимо для установления район-специфического транскрипционного профиля (Szareck et.al., 2010)

Ключевым моментом в эмбриональном развитии гипоталамуса является формирование воронки гипофиза, из которой потом будет развиваться срединное возвышение и нейрогипофиз. Развитие инфундибулярного углубления запускается сигналами, поступающими от туберальной части вентральной пластинки и кармана Ратке (предшественника аденогипофиза). В исследованиях на цыплятах было показано, что воронка гипофиза состоит из клеток, экспрессирующих FGF, которые подразделяются на две группы. Одна группа, так называемые «воротничковые клетки», демонстрируют свойства НСК, потомки которых впоследствии формируют основную часть развивающейся воронки гипофиза. Вторая группа – неворотничковые клетки – располагается в вентральной части воронки в виде узкой полосы. Обе группы клеток экспрессируют глиальные маркеры. Экспрессия FGF является критичным для формирования воронки гипофиза. Так, нокаутные мыши по FGF-10 не способны формировать воронку гипофиза, клетки которой погибают путем апоптоза. Fgf-сигнальный путь также необходим для поддержания пролиферации воротничковых клеток, поскольку ингибирование данного сигнального пути приводит к гибели как

воротничковых клеток, так и прогениторных клеток – потомков воротничковых клеток. Также было показано, что ряд транскрипционных факторов, таких как *Hesx1*, *Lhx2*, *Nkx2.1*, *Rax*, *Tbx3*, *Hes1*, *Hes5*, *Sox2*, *Sox3*, *SoxB1*, важны для формирования и регионализации инфундибулярного углубления (Pearson, Placzek, 2013; Burbridge, Stewart, Placzek, 2016). Отмечено, что FGF играет критическую роль в контроле прорастания аксонов нейросекреторных клеток гипоталамуса по направлению к срединному возвышению, а также опосредует его васкулогенез. Таким образом, FGF-продуцирующие клетки формирующейся воронки гипофиза, посредством синтеза FGF, обеспечивают скоординированный рост аксонов нейросекреторных клеток и капилляров к одной общей мишени – срединному возвышению (Burbridge, Stewart, Placzek, 2016; Tsai et al., 2011; Rizzoti, Lovell-Badge, 2017).

Танициты и питуициты образуют глиальную составляющую воронки гипофиза. Согласно Pearson С.А. и Placzek М. поскольку танициты и питуициты экспрессируют ряд общих маркеров, таких как клеточный белок, связывающий ретиноевую кислоту, GFAP, нестин в эмбриональном инфундибулюме, то они имеют общее происхождение от инфундибулярных клеток. Но вопрос о том, какая линия ранних прогениторов (воротничковые, потомки воротничковых клеток или неворотничковые клетки) дают начало таницитам и питуицитам остается открытым. Авторы также предполагают, что поскольку временная экспрессия *Fgf-10* необходима для формирования радиальной глии из нейроэпителиальных клеток, которая в будущем будет формировать кору головного мозга, то возможно, что *Fgf*-сигналинг также важен и для образования радиальной глии в области медиобазального гипоталамуса из инфундибулярных клеток (Pearson, Placzek, 2013). Было показано, что для формирования таницитов необходимо ингибирование Wnt-сигнального пути в клетках радиальной глии. Также была показана ключевая роль транскрипционного фактора *Lhx2* в дифференцировке таницитов (посредством активации транскрипционного фактора *Rax* и *Rax*-зависимой спецификации генов таницитов, при ингибировании которой клетки дифференцируются в эпендимоциты). (Salvatierra et al., 2014; Burbridge et al., 2016)

2.5.2. Структурные изменения в срединном возвышении в ходе эмбрионального и раннего постнатального развития.

При исследовании структурной организации инфундибулярного углубления в развитии было показано, что у грызунов (у крысы на 15-ый день эмбрионального развития, а у мыши - на 12-ый день эмбрионального развития) срединное возвышение состоит из 6-10 слоев клеток, организованных в виде многослойного эпителия. Самые

дорсальные клетки выстилают дно третьего желудочка, в то время как самые вентральные из них опираются на базальную пластинку, обращенную к соединительной ткани, где уже присутствует небольшое количество капилляров. Нервные волокна на этом этапе в данной области отсутствуют. На ультраструктурном уровне эти эпендимные клетки обладают чертами, типичными для незрелых клеток: они содержат много свободных рибосом, некоторое количество митохондрий и характеризуются заметной нехваткой других органелл. Однако клетки, обращенные к просвету желудочков, имеют выпячивания в полость на своей апикальной поверхности и формируют клеточные контакты с соседними клетками (Mongoe, Paull, 1974).

На 16 день эмбрионального развития в срединное возвышение начинают прорастать отдельные аксоны, а чаще небольшие группы аксонов, которые проникают между вентрально расположенными эпендимными клетками. Это приводит к созданию области, которая состоит из широких цитоплазматических отростков эпендимных клеток, разделяющих небольшие группы врастающих аксонов, и которая может рассматриваться как будущая внешняя (вентральная) зона (external zone) срединного возвышения (Ugrumov, 1992). В следующие два дня (у крыс – 17-18-ый день эмбрионального развития) наблюдается значительное расширение вентральной зоны срединного возвышения. Эпендимные клетки представлены веретеновидными клетками с апикальным отростком, овальным телом и длинным базальным отростком, которые, по всей вероятности, являются радиальной глией (Mori, Buffo, Götz, 2005). В это время количество эпендимных клеток резко возрастает, они быстро дифференцируются и по количеству и составу органелл приближаются к дефинитивным эпендимоцитам. Таким образом, хорошо развитый аппарат Гольджи, везикулярные и трубчатые образования с гладкой мембраной, филаменты, микротрубочки, небольшое или умеренное количество шероховатого эндоплазматического ретикулума, липидных капель и лизосом характерны для поздних неонатальных и взрослых клеток эпендимы. Кроме того, специфические плеоморфные плотные включения, иногда называемые гранулами, которые особенно заметны в расширенных ножках эпендимных клеток взрослых, также были обнаружены у плода на поздних сроках развития и у новорожденных крысят. Тот факт, что эпендимные клетки развивающегося срединного возвышения приобретают типичные ультраструктурные особенности до рождения, предполагает, что, вероятно, эти клетки начинают выполнять свои функции уже на 17-18 день эмбрионального развития (Mongoe, 1974). Также на этом сроке наблюдается активное прорастание первичных капилляров в этой области (Daikoku, Kotsu, Hashimoto, 1971). Капилляры демонстрируют основные характеристики первичных

капилляров портальной системы: содержат фенестрированный эндотелий, базальную пластинку и окружающее периваскулярное пространство, содержащее элементы соединительной ткани. Использование меченых молекул (ферритин, пероксидаза хрена, лантан) показало минимальную роль пиноцитоза в проницаемости капилляров у плода, которые становятся проницаемыми для этих меченых молекул благодаря фенестрам с 18-го дня эмбрионального развития, но после рождения роль пиноцитоза значительно возрастает (к рождению количество пиноцитозных везикул увеличивается в 10 раз). Количество аксонов на этом сроке также растет и достигает нескольких десятков. Они разделены между собой тонкими отростками эпендимных клеток (Ugrumov, Mitskevich, 1980; Ugrumov et al., 1986).

Начиная с 18-го дня эмбрионального развития апикальный полюс эпендимных клеток становится короче и шире. Клетки соединены между собой плотными контактами, встречаются также щелевые и адгезионные контакты. На преимущественно гладкой апикальной поверхности начинают появляться многочисленные луковичные выступы и микроворсинки, направленные в просвет желудочка. Отростки эпендимных клеток до 18-го дня эмбрионального развития полностью покрывают базальную мембрану первичной капиллярной сети, а после этого срока площадь такого контакта уменьшается до 65% вследствие прорастания в эту область аксонов (Ugrumov, 1992). За 2-3 дня до рождения (19-ый день эмбрионального развития) эти аксоны устанавливают нейрогемальный контакт с капиллярами срединного возвышения. По мере развития капилляров и капиллярных петель вдоль них образуется еще больше окончаний, так что у взрослых животных периваскулярная зона контакта следует разветвлениям петель вглубь срединного возвышения. За счет этого общая площадь контактной зоны увеличивается. Несмотря на то, что большинство аксонов устанавливают нейрогемальный контакт, часть отростков проникают между эпендимными клетками в полость желудочка, что свидетельствует о выбросе нейрогормонов (серотонина, катехоламинов, после рождения также наблюдаются аксоны, содержащие рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона или люлиберин) в СМЖ и их широком распространении в головном мозге (Ugrumov, Mitskevich, 1981).

Внешняя зона (external zone) срединного возвышения, где устанавливаются нейрогемальные контакты, у плода довольно узкая относительно всего срединного возвышения. Оставшаяся часть, которая простирается от клеточных тел эпендимы до вентральных областей и обозначается как палисадная зона, у плода и новорожденных крыс заметно отличается от той же области у половозрелых животных. На

ультраструктурном уровне видно, что на поздних этапах эмбриогенеза аксональные цилиндры являются доминирующим компонентом. Большинство из них имеют малый диаметр, аксональные цилиндры большего диаметра встречаются редко. Наиболее примечательным является чрезвычайно малое количество видимых везикул с плотной сердцевинкой. Такая организация сохраняется в течение первых 5 дней постнатального развития (Monroe et al., 1972). У взрослых животных в палисадной зоне срединного возвышения хотя и локализуется множество аксональных цилиндров такого же диаметра, как и у плода, но также содержится множество расширенных аксонов, в которых присутствует большое количество везикул с плотной сердцевинкой. Monroe и соавт. (1972) отметили наличие единичных плохо развитых синаптоидных контактов у новорожденных крыс (1-5 дни постнатального развития) (Monroe et al., 1972). К 34-39 дню постнатального развития крысы имеют хорошо развитые синаптоидные контакты, однако формируются ли они постепенно или это происходит на определенном сроке развития, остается не изученным.

В последние дни эмбрионального развития и у новорожденных крысят капиллярное ложе расширяется, увеличивается число фенестр, капилляры больше прилегают к поверхностной вентральной области срединного возвышения. У крыс и мышей капиллярные петли начинают углубляться в срединное возвышение только после рождения, обычно появляются во второй половине первой постнатальной недели и становятся более многочисленными в течение второй недели (до 10 дня постнатального развития). В процессе развития эндотелий истощается, что приводит к увеличению просвета капилляров. Эксперименты с радиоактивно мечеными сфероцитами продемонстрировали, что скорость циркуляции через гипофизарную портальную систему достигает взрослого уровня к 4-му дню постнатального развития (Ugrumov, 1992). Предполагается, что установление функциональной связи между нейросекреторными клетками гипоталамуса и гормон-синтезирующими клетками анденогипофиза происходит с 18-го дня эмбрионального развития по 4-е сутки постнатального развития, то есть одновременно с развитием срединного возвышения (Ugrumov, 1992).

2.5.3. Старение инфундибулярного углубления.

В ряде работ было показано, что в ходе старения танициты подвергаются структурным изменениям (Zoli et al., 1995; Yin, Gore, 2010; Koorman et al., 2017). Так, Золи и соавт. (1995) показали, что количество белка GFAP у 24-месячных крыс увеличивается в 3 раза по сравнению с половозрелыми животными, а число таницитов уменьшается (Zoli et al., 1995). В другом исследовании, выполненном на образцах

головного мозга человека, не было обнаружено различий в количестве таницитов у лиц молодого и пожилого возраста (Коорман, 2017). Однако в работах, посвященных изучению возрастных особенностей таницитов, дезорганизация отростков этих клеток отмечалась во всех исследованиях (Zoli et al., 1995; Yin, Gore, 2010; Коорман et al., 2017). В работе Brawer и Walsh (1982) было показано, что в таницитах с возрастом накапливаются липидные скопления, состоящие из нейтральных жиров, увеличивается число дегенерирующих мембранных структур, лизосом. Авторы предполагают, что при старении танициты участвуют в фагоцитозе дегенерирующих аксонов в срединном возвышении (Brawer, Walsh, 1982).

Известно, что процесс, лежащий в основе старения организма, включает не связанные с инфекцией воспалительные изменения гипоталамуса, опосредованные ядерным фактором κB (NF κB). Было показано, что этот фактор экспрессируется в таницитах при воспалении (Cai, Khor, 2019; Böttcher et al., 2020). Однако это воспаление можно снять системными инъекциями GnRH. В связи с этим, существует предположение, что воспалительные эффекты при старении могут быть вызваны ухудшением секреции GnRH в срединном возвышении, что вызвано нарушениями связи между таницитами и нейронами GnRH в области первичной капиллярной сети. Действительно, электронно-микроскопические исследования, проведенные на крысах, показывают, что старение ассоциировано с изменениями структурных взаимоотношений между нервными окончаниями GnRH-нейронов и расширенными терминалями таницитов и значительным уменьшением их взаимодействия (Yin et al., 2009). Электронно-микроскопические исследования, выполненные на самках низших приматов, показывают, что терминали таницитов значительно увеличены в срединном возвышении у старых животных по сравнению с молодыми особями (Naugle et al., 2016). Предполагается, что изменение взаимодействия между нейросекреторными нейронами GnRH и глиальными клетками срединного возвышения способствует старению нейронной сети GnRH и повышает возможность того, что эти изменения могут приводить к возникновению возрастных расстройств, включая снижение когнитивных функций (Prevot et al., 2018).

Было также показано, что старение изменяет барьер, сформированный таницитами, приводя к нарушению структурной целостности гематоликворного барьера в срединном возвышении (Scott, Sladek, 1981). Поскольку известно, что у пожилых животных наблюдаются изменения в нейроэндокринном контроле энергетического гомеостаза, включая ослабленную реакцию на голодание, можно предположить, что изменения

проницаемости гемато-гипоталамического барьера могут способствовать возникновению возрастных метаболических заболеваний.

Заключение.

Таким образом, несмотря на пристальное внимание исследователей, в настоящее время многие вопросы клеточной биологии таницитов продолжают оставаться открытыми. Накапливающиеся экспериментальные данные свидетельствуют о высокой структурной, цитохимической и функциональной гетерогенности таницитов, что требует уточнения существующей классификации этих клеток. Многие аспекты, связанные с эмбриональным развитием и возрастными изменениями таницитов, остаются сегодня неосвещенными, что обуславливает необходимость проведения сравнительно-онтогенетического исследования с применением современных методов морфологического анализа. Нерешенным остается вопрос о пролиферативном потенциале разных типов таницитов и его изменении в ходе постнатального развития, что важно для понимания роли этих клеток в процессах взрослого нейрогенеза. Слабо изученной является внутриядерная структура таницитов, в том числе организация их ядрышек и гетерохроматинового компартмента. Мало внимания уделяется исследованию взаимодействия таницитов с другими типами глии. Получение всех этих сведений будет способствовать расширению имеющихся представлений о структурно-функциональных особенностях таницитов и уточнению роли этих клеток в регуляции работы медиобазального гипоталамуса и организма в целом в норме и при патологии.

ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

В исследовании были использованы крысы линии Вистар (n=104). Крысы содержались в виварии с естественным циклом день/ночь и свободным доступом к еде и воде. 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» (выписка из протокола № 3/17 от 30.11.2017 г.).

С целью изучения таницитов дна третьего желудочка на разных стадиях постнатального онтогенеза образцы головного мозга были взяты у крыс 5 возрастных групп (см. таблицу 2): 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). Получение крысят с датированным сроком рождения было осуществлено согласно рекомендациям, данным в справочно-методическом пособии А.П. Дыбана «Объекты биологии развития» (Дыбан, 1975).

Таблица 2. Стадии постнатального развития крысы (Picut et al., 2015; Sengupta, 2013).

Стадия развития	Постнатальный день развития
Неонатальный период	P0-P7
Неполовозрелый (инфантильный) период	P8-P20
Ювенильный период	P21-P32
Пубертатный период	Препубертатный период – P33-P55 Поздний пубертатный период – P56-P70
Половозрелое животное	P70 – P600
Старое животное	Начиная с P600 (20 месяцев)

3.1. Подготовка материала для гистологического исследования.

Образцы головного мозга крыс помещали в фиксатор, в качестве которого использовали раствор цинк-этанол-формальдегида (Коржевский и соавт., 2012). Материал фиксировали в течение 24 ч при комнатной температуре, после чего образцы обезживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Последовательно 96% этанол (первая смена - 10 ч, вторая, третья и четвертая смены - по 5 ч каждая), абсолютный спирт (24 ч), смесь абсолютного спирта/ксилола в соотношении 1:1 (5 ч), две смены ксилола (по 5 ч каждая). После этого образцы пропитывали чистым парафином (первая смена - 4 ч, вторая смена - 5 ч при температуре 60°C) и заливали в парафиновые блоки (НеваРеактив, Россия; Histomix, БиоВитрум, Россия). На ротационном микротоме Microm HM 325 (Thermo Scientific, США) изготавливали гистологические срезы толщиной 5 и 10 мкм, которые наклеивали на предметные стекла, покрытые поли-L-лизинном (Menzel, Германия), или силанизированные стекла марки Histobond (Marienfeld, Германия). Толстые срезы (10 мкм) наклеивали на стекла марки SuperFrost Plus Gold (Menzel, Германия). Для обзорных окрасок применяли стекла (Menzel, Германия), обработанные специальным адгезивом на основе бычьего сывороточного альбумина (патент RU 2386137 C1).

3.2. Иммуногистохимическое исследование таницитов.

Танициты инфундибулярного углубления изучали с помощью методов иммуногистохимии с использованием широкой панели поли- и моноклональных антител (табл.3). Для визуализации иммуногистохимической реакции применяли световую, флуоресцентную и конфокальную лазерную микроскопию.

3.2.1. Характеристика используемых в работе маркерных белков.

I. Структурные белки

- *Виментин* – белок промежуточных филаментов III типа. Используется как маркер клеток мезенхимного происхождения или клеток, претерпевших эпителиально-мезенхимальную трансформацию (Castro-Muñozledo et al., 2017). В ЦНС является маркером клеток-предшественников, а также выявляет танициты и эпендимоциты (Mirando-Angulo et al., 2014).

- *Глиальный фибриллярный кислый белок* (ГФКБ, Glial fibrillary acidic protein, GFAP) – белок промежуточных филаментов III типа. Является маркером как зрелых, так и дифференцирующихся астроцитов, однако встречается и в ряде других клеток ЦНС,

например, в незрелых олигодендроцитах, шванновских клетках, а также в таницитах (Yang, Wang, 2015; Holmes et al., 2016).

- *Нестин* – белок промежуточных филаментов VI типа. Известен как маркер нейральных стволовых и прогениторных клеток (Matsuda et al., 2013).

II. Белки клеточных контактов

- *Бета-катенин* (β -катенин) – белок межклеточных контактов. Входит в состав опоясывающей десмосомы (zonula adherens). Также является важным компонентом Wnt-сигнального пути, выступая в качестве транскрипционного фактора (Clevers, 2006).

- *Коннексин 43* (Cx43) – основной белок щелевых контактов астроцитов. Также встречается в составе щелевых контактов эпендимоцитов, микроглиоцитов и таницитов (Giaume et al., 2013).

III. Пролиферативные маркеры и маркеры нейрональных стволовых/прогениторных клеток (НСПК)

- *PCNA* (proliferative cell nuclear antigen) – является одним из общепризнанных маркеров пролиферирующих клеток. Синтезируется во всех фазах клеточного цикла, за исключением G0. Однако пик синтеза приходится на S-фазу клеточного цикла (Juríková et al., 2016).

- *Гистон 3, фосфорилированный по серину 10* (H3S10ph) – участвует в конденсации и сегрегации хромосом во время митоза, в связи с чем используется как маркер активно пролиферирующих клеток (Haruki et al., 2012; Sawicka, Seiser, 2012; Komar, Juszczynski, 2020).

IV. Маркеры нейральных стволовых клеток.

- *Musashi-1* (Msi-1) – РНК-связывающий белок, является маркером пролиферирующих и мультипотентных нейральных стволовых/прогениторных клеток. Экспрессия Msi-1 подавляется в пост-митотических клетках (Forouzanfar et al., 2020).

- *Sox2* (*SRY-box2*) – транскрипционный фактор, который необходим для поддержания плюрипотентности эмбриональных и нейральных стволовых клеток (Zhang, Cui, 2014).

V. Ядрышковые белки

- *Нуклеолин* (белок C23) – один из главных белков ядрышка эукариот, локализуется в фибриллярном и гранулярном компонентах ядрышка и участвует в биогенезе рибосомных частиц (Ginistry et al., 1999; Jia et al., 2017).

- *Нуклеофосмин* (белок B23) – один из главных белков ядрышка многоклеточных организмов. Локализуется в основном в гранулярном компоненте

ядрышка. Является шапероном гистонов и участвует в биогенезе рибосом и ремоделировании хроматина (Lindsröm, 2011; Frehlick, Eirín-López, Ausió, 2007).

VI. Ядерные белки

- *Гистон 4, триметилированный по лизину 20 (H4K20me3)* – маркер репрессированного хроматина (Jørgensen et al., 2013).

VII. Ферменты

- *Глутаминсинтетаза (ГС, Glutamine synthetase, GS)* – фермент, катализирующий реакцию между аммонием и глутаматом с образованием глутамина. Является специфическим биохимическим маркером астроцитов. Помимо астроцитов, присутствие GS было показано в некоторых олигодендроцитах и нейронах, а также в эпендимных клетках (Сухорукова, Гусельникова, 2015).

VIII. Микроглиальные маркеры

- *Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1)* – Ca^{2+} -связывающий белок, является селективным маркером микроглии. Выявляет покоящуюся и активированную формы микроглии (Novens et al., 2014).

3.2.2. Процедура иммуногистохимического окрашивания для световой микроскопии.

Окрашивание препаратов проводили по следующей схеме:

1) Препараты депарафинировали и регидратировали по стандартной методике, а именно: удаляли парафин в двух сменах ксилола (по 10 мин каждая), регидратировали срезы в спиртах нисходящей концентрации (две смены 96% этанола по 5 мин, одна смена 80% этанола - 5 мин) и промывали в дистиллированной воде (5 мин).

2) Помещали препараты в модифицированный цитратный буфер S1700 (Dako, Дания), предварительно нагретый в термостате до 60°. Тепловое демаскирование антигена проводили в пароварке в течение 20-25 мин.

3) Промывали срезы в дистиллированной воде в течение 5 мин и помещали их в 3% раствор пероксида водорода (H_2O_2) на 10 мин для блокировки эндогенной пероксидазы.

4) Препараты промывали от H_2O_2 в дистиллированной воде и помещали в раствор 0,01М фосфатно-солевого буфера (PBS, Биолот, Россия) (pH 7,4) на 5 мин.

5) Жидкость вокруг срезов убирали фильтровальной бумагой, после чего срезы обводили гидрофобным маркером для предотвращения растекания реагентов по предметному стеклу (Dako Pen, Dako, Дания).

6) Для блокировки неспецифического связывания вторичных антител на препараты наносили необходимое количество блокировочного раствора (Protein block DP-125, Spring Bioscience, США) и оставляли при комнатной температуре на 10 мин.

7) Удаляли со срезов излишки блокировочного раствора и, не промывая препараты, наносили раствор первичных антител, равномерно распределив его по срезу покачиванием. Препараты помещали во влажные камеры и инкубировали при температуре 27°C. Разведение первичных антител и оптимальное время инкубации указаны в таблице 3.

8) После инкубации в первичных антителах, препараты промывали в двух сменах PBS (по 5 мин каждая). Затем на срезы наносили анти—кроличьи или анти—мышинные вторичные реагенты, конъюгированные с полимером и пероксидазой хрена (см. таблицу 4) для связывания соответствующих первичных антител. Инкубацию проводили во влажных камерах в термостате при 27°C в течение 30-40 мин.

9) Препараты промывали в двух сменах PBS (по 5 мин каждая). Затем на срезы наносили необходимое количество рабочего раствора 3,3-диаминобензидинтетрагидрохлорида (из набора DAB+) (Dako, Дания) для выявления продукта иммуногистохимической реакции. Образование окрашенного продукта реакции происходило в течение 1-3 мин. После достижения оптимальной окраски срезов, контроль которой осуществляли под микроскопом,

препараты промывали в 3%-м растворе пероксида водорода и дистиллированной воде (3 смены по 5 мин).

10) Часть срезов подкрашивали квасцовым гематоксилином (Биовитрум, Россия) в течение 40-60 сек, после чего промывали в слабощелочной воде (100 мкл 10%-го раствора аммиака на 100 мл дистиллированной воды).

11) Препараты промывали в дистиллированной воде (2 смены по 5 мин), обезвоживали в изопропиловом спирте (2 смены по 5 мин) и смеси изопропилового спирта и ксилола (1:1) (5 мин), просветляли в ксилоле (две смены по 10 мин) и заключали в перманентную среду Cytoseal 60 (Thermo Scientific, США).

Контроль использованных в работе антител осуществляли следующим образом. В качестве положительного контроля окрашивали препараты ткани, для которой известно, что искомым антиген содержится в ней в достаточном количестве для его иммуногистохимического выявления. В качестве негативного контроля использовали срезы, на которые вместо первичных антител наносили среду для их разбавления антител.

3.2.3. Процедура иммуногистохимического окрашивания для конфокальной микроскопии.

В настоящем исследовании конфокальная микроскопия применялась с целью изучения трехмерной организации таницитов, колокализационного анализа, а также изучения мелких клеточных структур (щелевых контактов, ядрышек).

Для ИГХ исследования таницитов с помощью конфокального лазерного микроскопа препараты обрабатывали по следующей схеме:

- 1) Препараты депарафинировали и регидратировали по общепринятой методике.
- 2) Проводили демаскирование антигена в модифицированном цитратном буфере S1700 (Dako, Дания) в пароварке в течение 20-25 мин.
- 3) Промывали срезы в дистиллированной воде (5 мин) и помещали в PBS на 5 мин.
- 4) Убрав излишки воды с препаратов, обводили срезы гидрофобным маркером (Dako Pen, Dako, Дания).
- 5) Для блокировки неспецифического связывания антител на препараты наносили необходимое количество блокировочного раствора (Protein block DP-125, Spring Bioscience, США) и оставляли при комнатной температуре на 10 мин.
- 6) Сливали излишки блокировочного раствора и, не промывая препараты, наносили на срезы раствор первичных антител (для постановки монореакции), либо смесь (в соотношении 1:1) растворов двух первичных антител (для постановки двойного

иммуноокрашивания). Препараты инкубировали во влажной камере в термостате при 27°C в течение 3-4 суток (точное время инкубации указано в таблице 3).

7) После инкубации в первичных антителах препараты промывали в двух сменах PBS (по 5 мин каждая), и наносили вторичные реагенты (см. табл. 4). Для выявления мышинных первичных антител применяли Fab-фрагмент анти—мышинного иммуноглобулина осла, меченный биотином-SP, для выявления кроличьих первичных антител — моновалентный Fab-фрагмент анти—кроличьего иммуноглобулина осла, конъюгированный с флуорохромом Rhodamine Red™-X (RRX), либо использовали реагент из набора LSAB 2, который состоит из смеси анти—мышинных и анти—кроличьих антител, меченных биотином. В случае постановки двойного иммуноокрашивания на срезы наносили смесь (1:1) Fab-фрагмента анти—мышинного иммуноглобулина осла, меченного биотином-SP, и моновалентного Fab-фрагмента анти—кроличьего иммуноглобулина осла, конъюгированного с флуорохромом RRX. Во вторичных реагентах препараты инкубировали 3,5 часа во влажной камере в термостате при температуре 27°C.

8) Ядра клеток в части препаратов выявляли с помощью флуоресцентного ядерного красителя SYTOX Green. Данный краситель добавляли в инкубационный раствор на этапе обработки вторичными антителами таким образом, чтобы конечное разведение красителя в растворе составило 1:100.

9) Препараты промывали в двух сменах PBS (по 5 мин каждая). Для выявления биотинилированных антител на срезы наносили конъюгат стрептавидина с флуорохромом (Cy2 или Cy3) и инкубировали в течение 40 мин в термостате при 27°C.

10) Полученные препараты промывали последовательно в PBS (5 мин) и дистиллированной воде (5 мин), после чего заключали в водорастворимую среду Fluorescence Mounting Medium (Dako, Дания) или ProLong™ Gold Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific, США).

3.3. Фотографирование объектов при микроскопии в проходящем свете и флуоресцентной микроскопии.

Анализ и фотографирование полученных гистологических препаратов проводили на световом микроскопе Leica DM750 (Германия), оснащенном фотокамерой ICC50 (Leica, Германия). Применяли программу обработки изображений LAS EZ (Leica, Германия).

Исследование флуоресцентно окрашенных препаратов проводили с использованием конфокальных лазерных микроскопов LSM710 (Zeiss, Германия) и LSM800 (Zeiss, Германия), оснащенного системой Airyscan. Флуоресценцию индуцировали лазерами с длиной волны 488 нм (для флуорохрома для Cy2 и флуоресцентного ядерного красителя SYTOX Green), и 561 нм

(для флуорохромов Cy3 и RRX). Была использована комбинация фильтров MBS 488/561. При работе с микроскопом LSM710 были применены объективы C-Apochromat 40×/1.1 W Corr M27 (водная иммерсия), C-Apochromat 63×/1.20 W Corr M27 (водная иммерсия), Plan-Apochromat 100×/1.40 Oil DIC M27 (масляная иммерсия); при работе с микроскопом LSM 800 использовали объективы Plan-Apochromat 20×/0.8 M27 и Plan-Apochromat 63×/1.40 Oil DICM27 (масляная иммерсия). Обработку полученных изображений и построение трехмерных реконструкций проводили в программах Zen 2012 (black edition), Zen 2.6 (blue edition), LSM Image Browser (Zeiss, Германия).

3.4. Морфометрический и статистический анализ.

Измерение длины отростков α 1- и β 2-таницитов производили в программе Fiji (<https://imagej.net/software/fiji/>) (Schindelin et al., 2012). Данные представлены в виде средней \pm стандартная ошибка средней.

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. В тех случаях, когда ядрышек в ядре было больше одного, средний диаметр ядрышек рассчитывали для наибольшего ядрышка. Данные представлены в виде средней \pm стандартная ошибка средней. Для количества ядрышек помимо абсолютных значений рассчитывали также медиану (M_e).

Для оценки возрастных изменений в количестве микроглиоцитов в инфундибулярном углублении подсчет производился по трем полям зрения для каждого случая. 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 $p < 0,05$.

Таблица 3. Характеристика использованных в работе первичных антител.

№	Первичные антитела					
	Изучаемый антиген	Характеристика антитела	Фирма	Используемое разведение	Время инкубации для световой микроскопии	Время инкубации для флуоресцентной микроскопии
1	Нестин	мышинные моноклональные (клон Rat-401)	BD Pharmingen, США	1:400	48 ч	-
2	GFAP (glial fibrillary acidic protein)	кроличьи поликлональные (RTU)	Дакко, Дания (сейчас Agilent, США)	Разведение производителя	12 ч	72 ч
3		мышинные моноклональные (клон SPM 507)	Spring Bioscience, США	1:100	12 ч	-
4	виментин	Мышинные моноклональные (клон V-9)	Дакко, Дания (сейчас Agilent, США)	1:100	12 ч	72 ч
5	GS	мышинные моноклональные (клон GS-6)	Chemicon, США	1:100	12 ч	72 ч
6	Cx43	мышинные моноклональные (клон F-7)	Santa Cruze Biotechnology, США	1:200	12 ч	72 ч
7	β -катенин	Кроличьи поликлональные	Абсам, Великобритания	1:100	80 мин*	72 ч
9	Iba-1	Кроличьи поликлональные	Biocare medical, США	1:1000	48 ч	72 ч
10	PCNA (proliferative cell nuclear	мышинные моноклональные (клон	Абсам, Великобритания	1:80	12 ч	-

	antigen)	PC10)				
11	H3-S10ph	Кроличы поликлональн ые	Абсам, Великобритан ия	1:1200	48 ч	-
12	Sox2	Кроличы поликлональн ые	Абсам, Великобритан ия	1:500	12 ч	-
13	Musashi-1	Кроличы моноклональн ые (клон EP1302)	Абсам, Великобритан ия	1:200	12 ч	-
14	Нуклеолин (белок С23)	Кроличы поликлональн ые	Абсам, Великобритан ия	1:400	12 ч	96 ч
15	Нуклеофос мин (белок В23)	Мышинные моноклональн ые (клон FC82291)	Sigma-Aldrich, США	1:100	12 ч	96 ч
16	Гистон H4K20me3	Кроличы поликлональн ые	Абсам, Великобритан ия	1:500	-	72 ч

*- при температуре инкубации 40°C

Таблица 4. Характеристика использованных в работе вторичных реagens

Вторичные реагенты для световой микроскопии			
№	Описание	Фирма	Используемое разведение
1	Набор Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System	Spring Bioscience, США	Разведение производителя
2	MACH2 Universal HRP Polymer Kit for mouse or rabbit	Biocare medical, США	Разведение производителя
3	MACH2 Mouse HRP Polymer	Biocare medical, США	Разведение производителя
Вторичные реагенты для конфокальной микроскопии			
4	Моновалетный Fab-фрагмент	Jackson Immunoresearch, США	1:50

	антикроличьего иммуноглобулина осли, конъюгированный с флуорохромом Rhodamine Red™-X (RRX)		
5	Fab-фрагмент антимышиного иммуноглобулина осли, меченный биотином-SP	Jackson ImmunoResearch, США	1:100
6	Биотинилированные антитела из набора LSAB 2	Dako, Дания (сейчас Agilent, США)	Разведение производителя
7	Конъюгат стрептавидина с флуорохромом Cy2	Jackson ImmunoResearch, США	1:200
8	Конъюгат стрептавидина с флуорохромом Cy3	InvitroGen, США	1:100
9	Ядерный краситель Sytox Green	InvitroGen, США	1:100

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ

Эпендима, выстилающая полости желудочков, представляет собой один слой клеток кубической формы (эпендимоцитов). Выстилка инфундибулярного углубления образована двумя популяциями глиальных клеток - реснитчатыми эпендимоцитами и таницитами. Эпендимоциты формируют выстилку дорсальной области третьего желудочка, а танициты выстилают латеральные стенки и дно третьего желудочка (рис. 4). При окраске по методу Ниссля в выстилке инфундибулярного углубления прослеживаются ядра эпендимоцитов и таницитов, которые отличаются друг от друга лишь формой: ядра эпендимоцитов округлые, таницитов – вытянутые. Однако выявить какие-либо структурные особенности данной области при окраске по методу Ниссля не представляется возможным (рис. 4А). При постановке иммуногистохимической реакции на белок промежуточных филаментов виментин можно наблюдать, что танициты, в отличие от эпендимоцитов, имеют длинный базальный отросток, который в разных участках инфундибулярного углубления направлен в разные структуры медиобазального гипоталамуса, а также имеет ряд характерных морфологических отличий в разных зонах дна третьего желудочка (рис. 4Б).

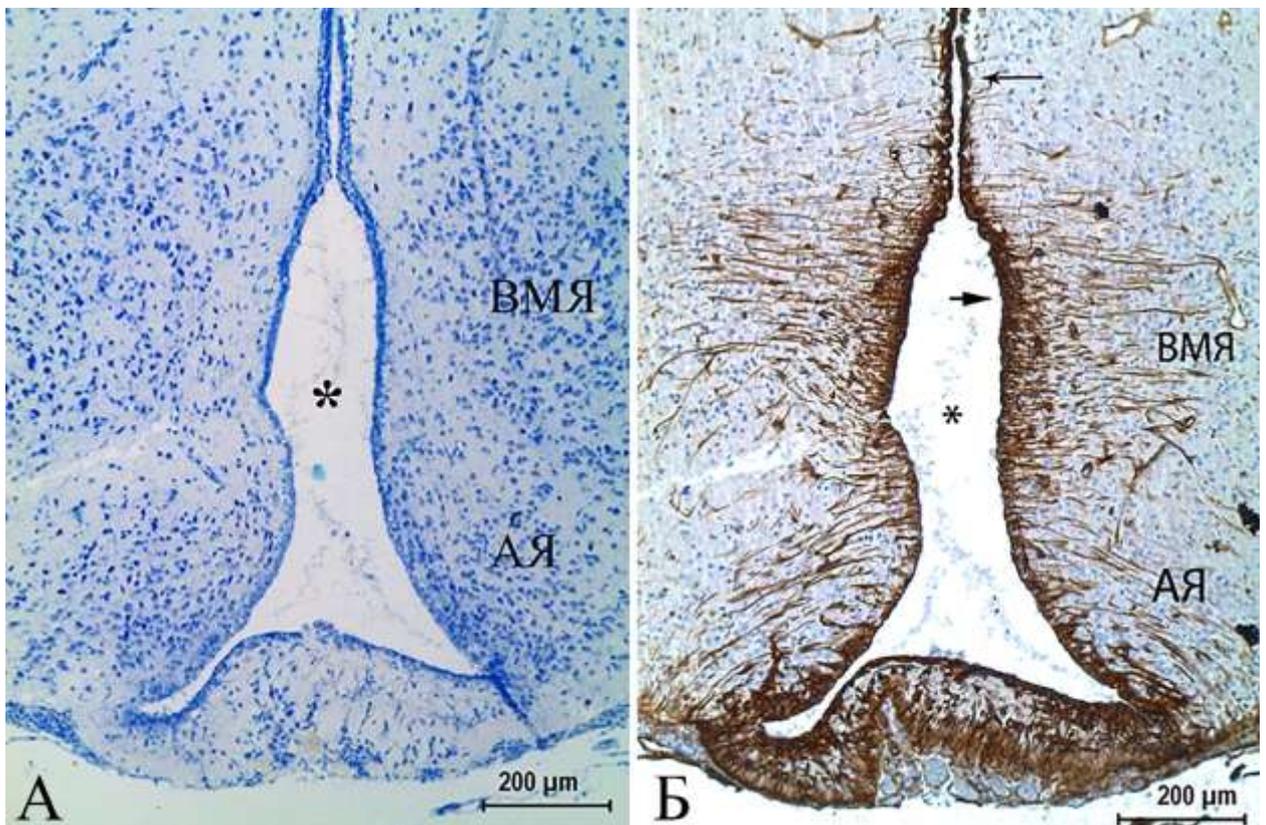


Рисунок 4. Типичная организация дна третьего желудочка у крысы. А – окраска по методу Ниссля, Б - иммуногистохимическая реакция на виментин. Подкраска ядер квасцовым гематоксилином. Длинная стрелка указывает на дорсально расположенные эпендимоциты, короткая стрелка – на отростчатые танициты (субпопуляция $\alpha 1$ -таницитов). ВМЯ –

вентромедиальное ядро, АЯ – аркуатное ядро. Звездочкой отмечена полость третьего желудочка.

Методическая статья о преимуществах использования иммуногистохимических методов в изучении выстилки желудочков мозга была опубликована: 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. (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).

4.1. Структурная и цитохимическая характеристика субпопуляций таницитов в раннем постнатальном развитии и при старении.

4.1.1. Белки промежуточных филаментов в таницитах

Иммуногистохимическая реакция на виментин. Исследование препаратов, окрашенных на белок промежуточных филаментов III типа виментин, показало, что изучаемый белок локализуется в телах и отростках всех типов таницитов на всех исследованных сроках. Тела $\alpha 1$ -таницитов вытянутые, а базальные отростки длинные и извилистые и идут параллельно друг другу (рис. 5А). Отростки $\alpha 1$ -таницитов направлены в вентромедиальное ядро гипоталамуса и оканчиваются расширенными терминалями на кровеносных сосудах подлежащей нервной ткани (рис. 5Б). На 7 сутки постнатального развития $\alpha 1$ -танициты характеризуются наличием многочисленных шипикоподобных расширений в проксимальных отделах отростков (рис. 5В), также встречаются бисеровидные расширения по всей длине отростков. Длина наиболее глубоко проникающих отростков составляет $543,5 \pm 43,42$ мкм. К 14 суткам постнатального развития, как и на более поздних этапах развития, отростки таницитов становятся гладкими и ровными по всей длине и разветвленными в проксимальных отделах (рис. 5Г, 6А). Длина отростков составляет на этом сроке развития $464 \pm 28,55$ мкм, к первому месяцу развития - $472,9 \pm 19,12$ мкм, а у взрослых животных - $526,3 \pm 16,68$ мкм. У старых крыс отростки $\alpha 1$ -таницитов становятся еще более разветвленными как в проксимальных, так и дистальных частях (рис. 6Б). Их длина составляет $476,3 \pm 33,65$ мкм. Длина отростков $\alpha 1$ -таницитов с возрастом не изменяется (рис. 7).

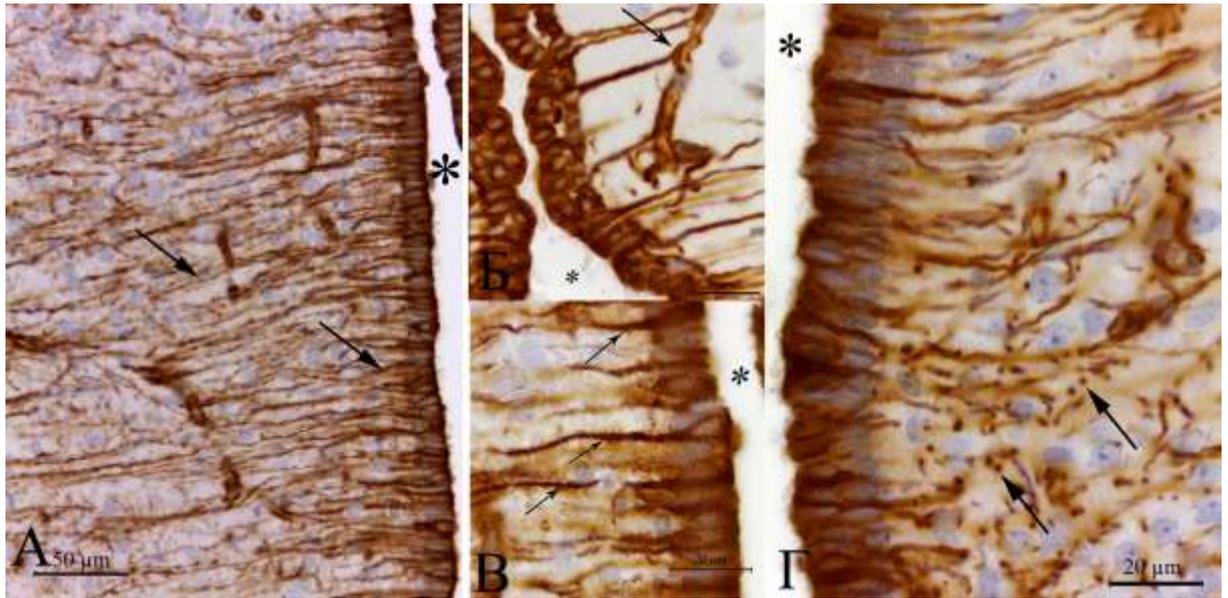


Рисунок 5. $\alpha 1$ -танициты в раннем постнатальном развитии. Иммуногистохимическая реакция на виментин. А, Б, В – 7 сутки постнатального развития, Г – 14 сутки постнатального развития. А – тонкие извилистые отростки $\alpha 1$ -таницитов. Б – отростки, контактирующие с кровеносным сосудом, стрелка указывает на расширенную терминаль, обхватывающую кровеносный сосуд. В – Шипикоподобные расширения в проксимальных отделах отростков (стрелка). Г – отростки $\alpha 1$ -таницитов разветвляются и начинают формировать отростки более мелких порядков. Стрелка указывает на отростки, перерезанные поперек. Звездочкой отмечена полость третьего желудочка.

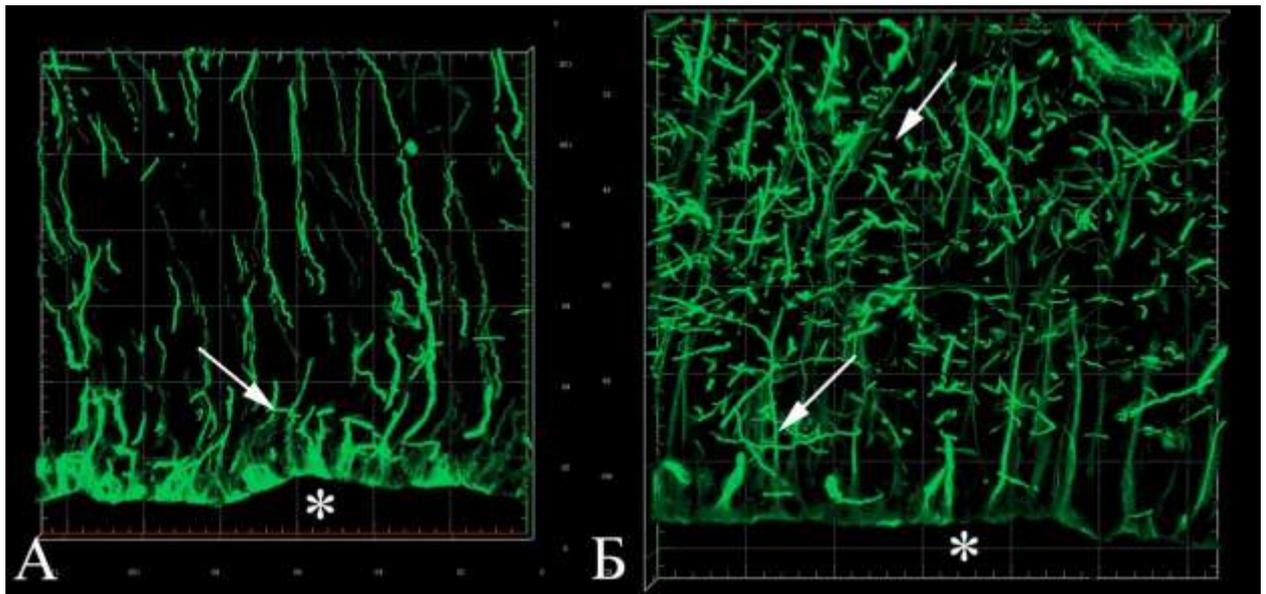


Рисунок 6. Разветвление отростков $\alpha 1$ -таницитов при старении. Иммуногистохимическая реакция на виментин. А — 14 сутки постнатального развития, Б – старые (23 месяца) животные. Конфокальная лазерная микроскопия. 3D-реконструкция 14 (А) и 20 (Б) оптических срезов. Стрелка указывает на разветвления отростков таницитов. Звездочкой отмечена полость третьего желудочка. Размер сетки – $20 \times 20 \mu\text{m}$.

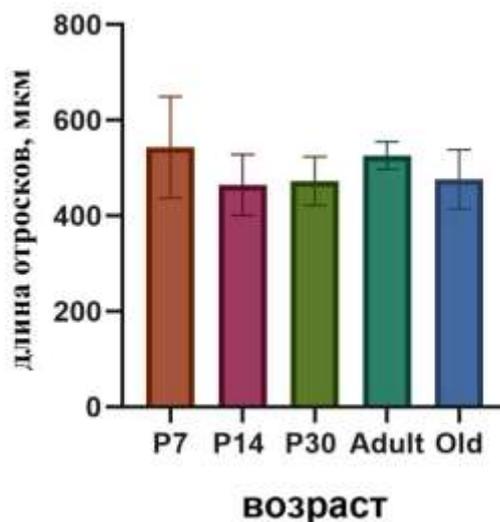


Рисунок 7. Длина отростков $\alpha 1$ -таницитов в постнатальном онтогенезе и при старении. Столбчатая диаграмма. Длина отростков с возрастом статистически не изменяется (при использовании критерия Краскела-Уоллиса).

$\alpha 2$ -танициты образуют выстилку в области аркуатного ядра гипоталамуса и их отростки идут дугообразно, оканчиваются либо на кровеносных сосудах аркуатного ядра, либо на мягкой мозговой оболочке. На 7 и 14 сутки постнатального развития отростки этих клеток ровные, тонкие, извилистые и идут параллельно друг другу (рис. 8А). В течение первого месяца постнатального развития многие отростки $\alpha 2$ -таницитов начинают формировать пучки отростков по всей их длине (рис. 8Б, В). У старых крыс происходит дезорганизация отростков, которая проявляется в том, что отростки почти не формируют пучков и становятся более разветвленными. Кроме того, у старых крыс виментин в телах $\alpha 2$ -таницитов локализуется лишь в апикальной области клеточных тел и иногда вдоль латеральных стенок, а не занимает всю перинуклеолярную область, как на более ранних этапах онтогенеза (рис. 8Г, 9).

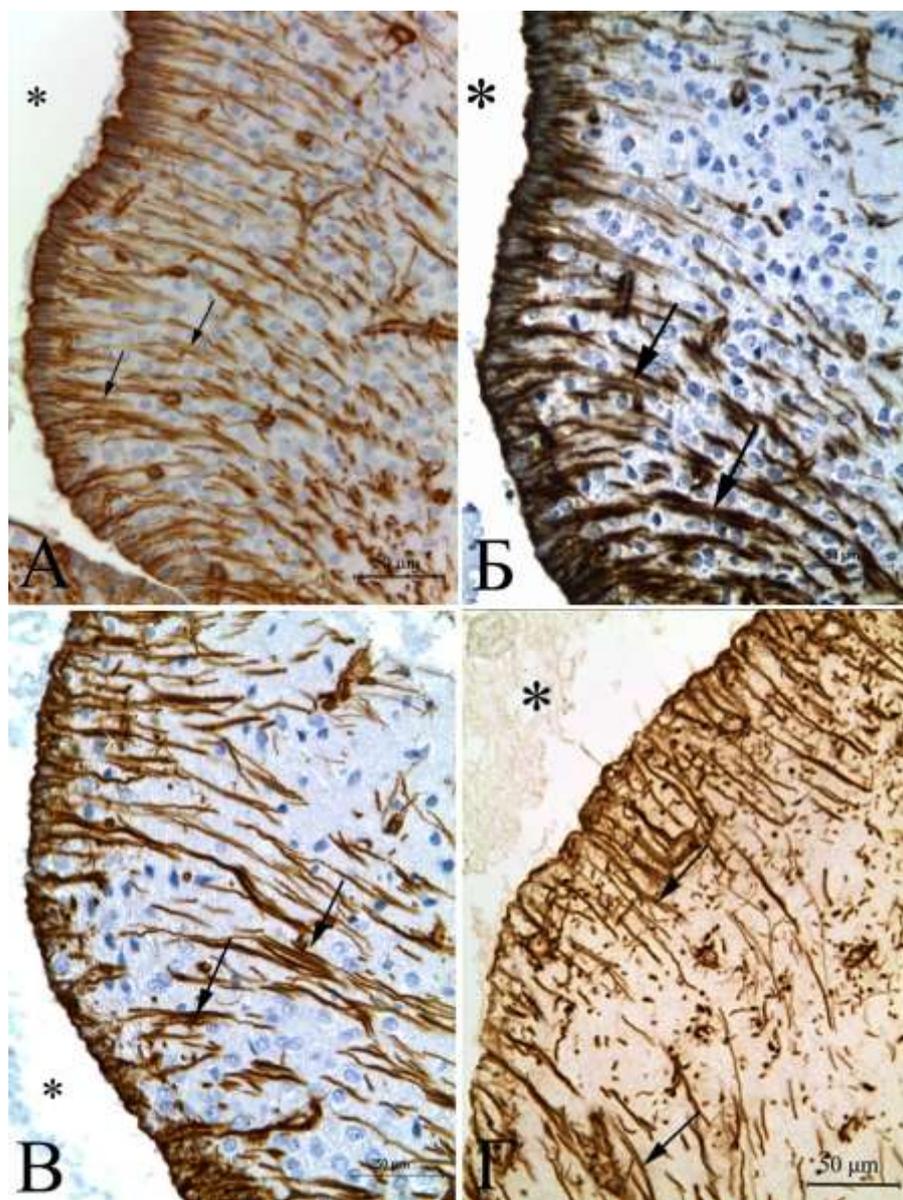


Рисунок 8. Отростки $\alpha 2$ -таницитов в ходе постнатального развития и при старении. Иммуногистохимическая реакция на виментин. А — 14 сутки постнатального развития; Б – 30 сутки постнатального развития; В – взрослое животное (4-6 месяцев); Г – старое животное (20-24 месяца). Стрелка указывает на отростки таницитов. Звездочкой отмечена полость третьего желудочка.

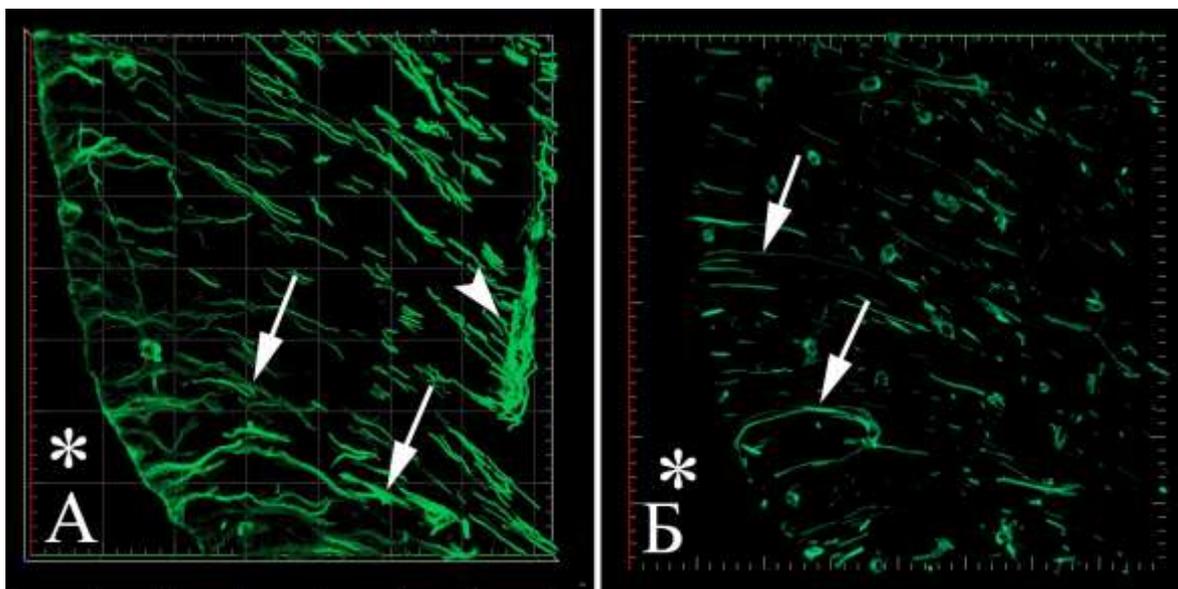


Рисунок 9. Изменение содержания виментина в $\alpha 2$ -таницитах в ходе старения. А – 14 сутки постнатального развития, Б – старые животные. Конфокальная лазерная микроскопия. 3D –реконструкция 14 (А) и 13 (Б) оптических срезов. Стрелкой отмечены отростки таницитов, головка стрелки указывает на кровеносный сосуд, оплетенный отростками таницитов. Звездочкой отмечена полость третьего желудочка. Размер сетки - 20x20 μm .

$\beta 1$ -Танициты выстилают латеральные стенки инфундибулярного углубления. Отростки этих таницитов характеризуются тем, что дистальные области каждого из отростков разветвляются на множество более мелких, параллельно идущих отростков, которые оканчиваются расширенными терминалями либо на мягкой мозговой оболочке, либо на фенестрированных сосудах, расположенных в латеральных областях срединного возвышения. На ранних этапах развития (7 и 14 сутки постнатального развития) отростки $\beta 1$ -таницитов короткие, в проксимальных областях образуют небольшие пучки (рис. 10А, Б), которые, начиная с 30 суток постнатального развития и у взрослых животных, становятся крупнее и толще (рис. 10В, Г). Кроме того, тела и отростки более интенсивно окрашиваются на виментин. У старых крыс отростки практически не формируют пучков, реакция на виментин ослабевает. Также в *zona interna* срединного возвышения наблюдается разветвление проксимальных отделов отростков $\beta 1$ -таницитов, которые характеризуются варикозоподобными расширениями (рис. 11А, Б).

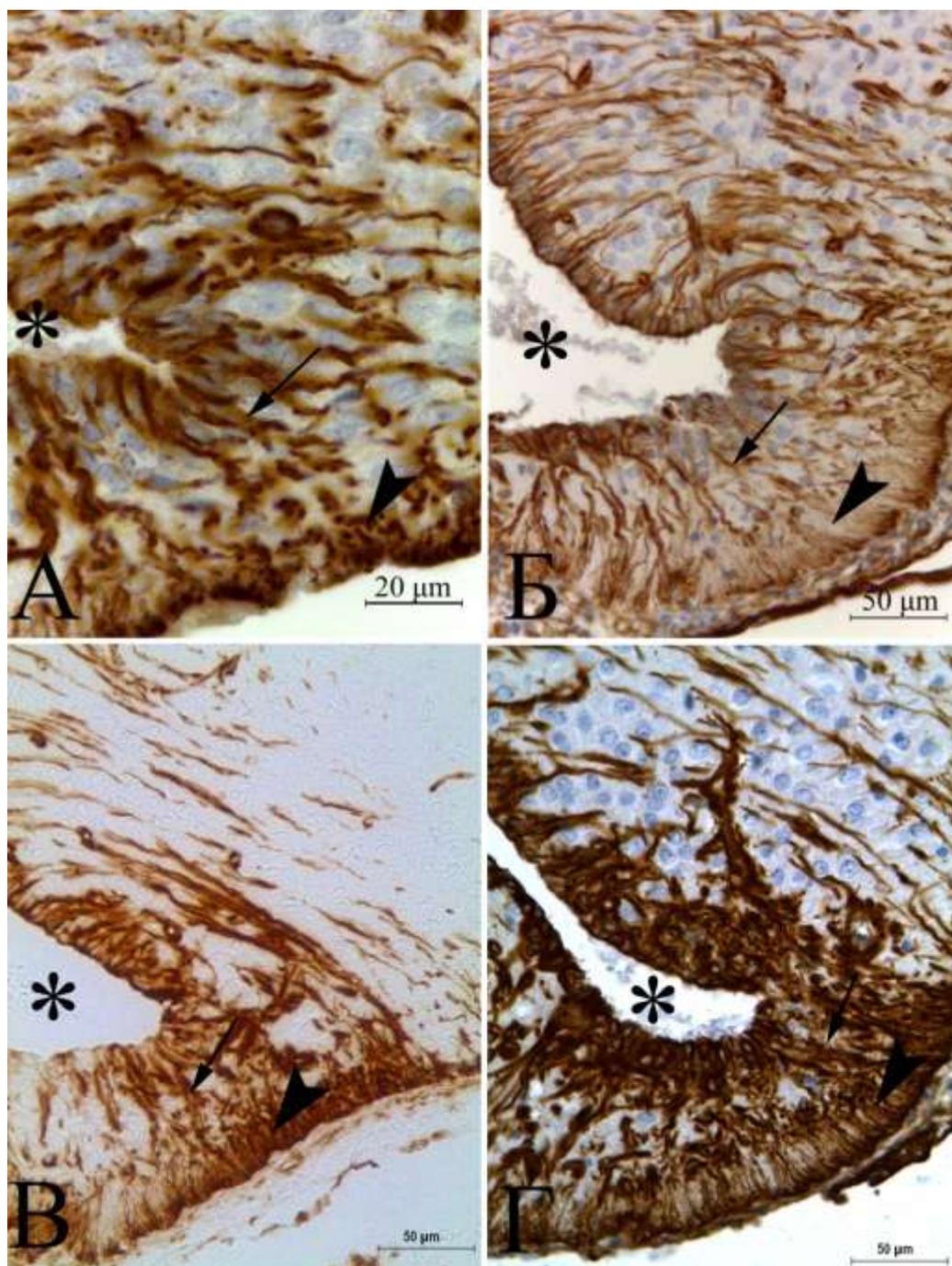


Рисунок 10. β 1-Танициты в раннем постнатальном онтогенезе. Иммуногистохимическая реакция на виментин. А – P7, Б — P14, В – P30 сутки постнатального развития, Г – взрослые животные. Стрелкой отмечены проксимальные участки отростков, формирующие пучки; головкой стрелки отмечены дистальные зоны, характеризующиеся мелкими параллельно идущими отростками. Звездочка – полость третьего желудочка.

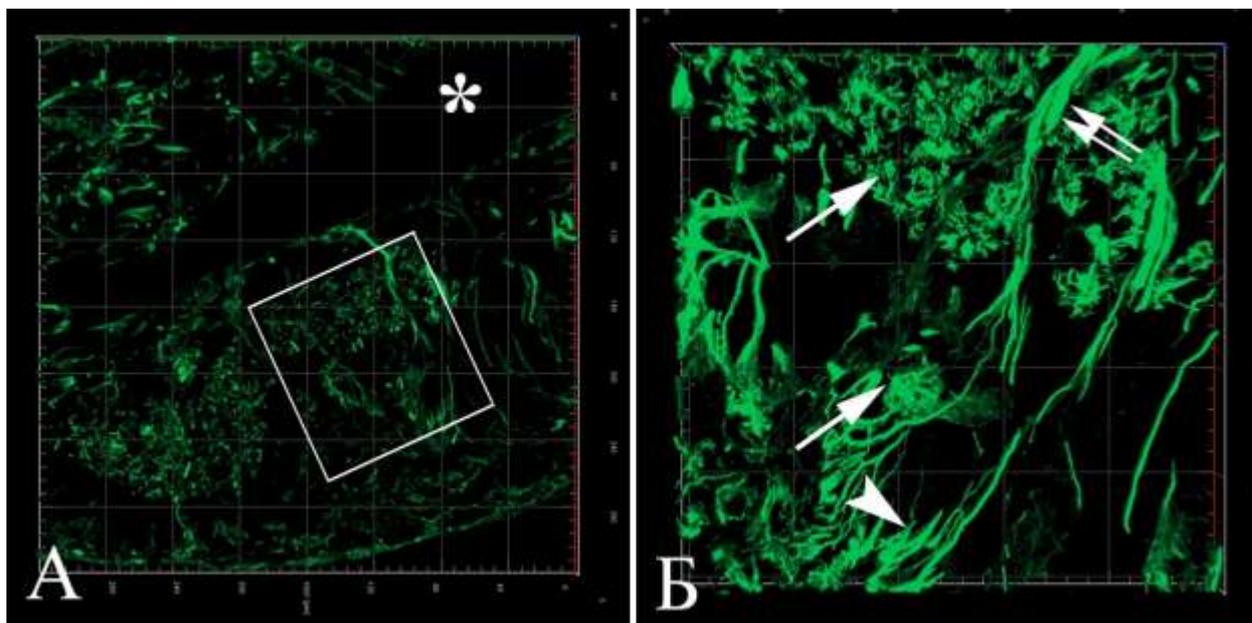


Рисунок 11. Отростки $\beta 1$ -таницитов у старых крыс. Иммуногистохимическая реакция на виментин. Конфокальная лазерная микроскопия. 3D-реконструкция 24 оптических срезов. А- $\beta 1$ -танициты срединного возвышения; Б – увеличенный фрагмент отростков $\beta 1$ -таницитов. Стрелкой отмечены варикозоподобные расширения отростков таницитов, двойные стрелки – пучки отростков $\beta 1$ -таницитов, головка стрелки – дистальные разветвленные участки отростков. Звездочка - полость желудочка. Размер сетки – $20 \times 20 \mu\text{m}$.

Выстилка срединного возвышения сформирована $\beta 2$ -таницитами. Их отростки, как и у $\beta 1$ -таницитов, в проксимальных участках гладкие, а в дистальных частях разветвляются на множество мелких отростков и оканчиваются на фенестрированных капиллярах портальной системы гипофиза. В первые две недели отростки этих клеток короткие ($78,75 \pm 4,24 \mu\text{m}$ – на 7 сутки онтогенеза ($p=0.0029$ при сравнении со взрослыми животными), и $107,8 \pm 10,31 \mu\text{m}$ – на 14 сутки развития) и почти не формируют пучков отростков (рис. 12А, 15). Начиная с 30 суток, отростки $\beta 2$ -таницитов удлиняются ($120,0 \pm 6,4 \mu\text{m}$) и формируют мощные пучки (рис. 12Б). У взрослых животных длина отростков составила $141,6 \pm 13,57 \mu\text{m}$, отростки формируют мощные пучки в проксимальных участках (рис. 12В, 24Б). У старых крыс наблюдается дезорганизация отростков (рис. 12Г, 14А, Б), что проявляется в том, что они практически не формируют пучков и распадаются на мелкие отдельные отростки. Также наблюдается увеличение количества и диаметра кровеносных сосудов в этой области. Длина отростков $\beta 2$ -таницитов у старых животных составила $208,3 \pm 18,19 \mu\text{m}$ (статистически значимое увеличение при сравнении со всеми остальными исследованными сроками) (рис. 15).

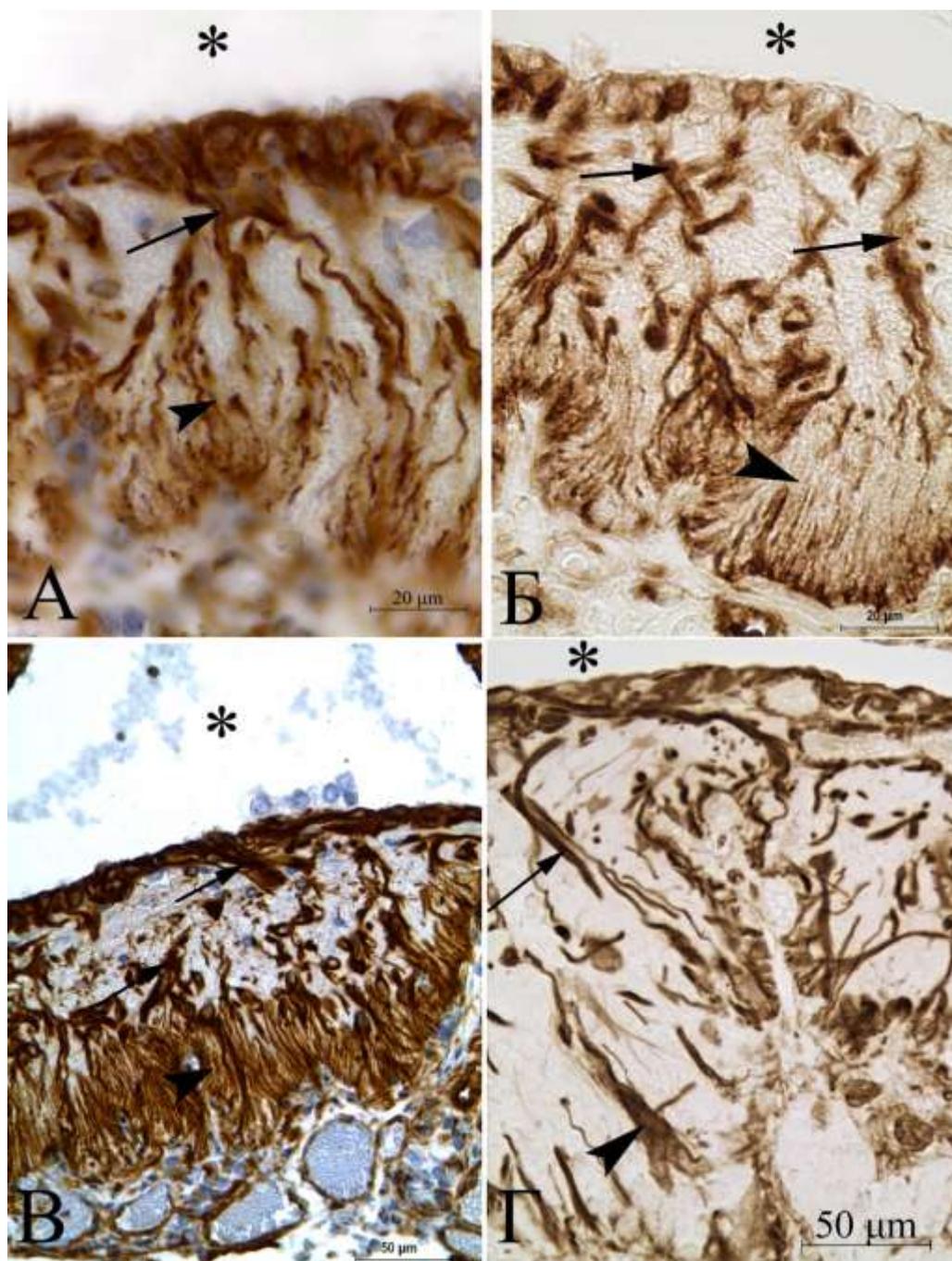


Рисунок 12. Организация $\beta 2$ -таницитов в постнатальном онтогенезе. Иммуногистохимическая реакция на виментин. А – 14 сутки постнатального развития, Б – 30 сутки постнатального развития, В – взрослое животное, Г – старое животное. Стрелки указывают на проксимальные отделы отростков, формирующие пучки; головка стрелки - на дистальные отделы, характеризующиеся мелкими параллельно идущими отростками. Звездочка – полость третьего желудочка.

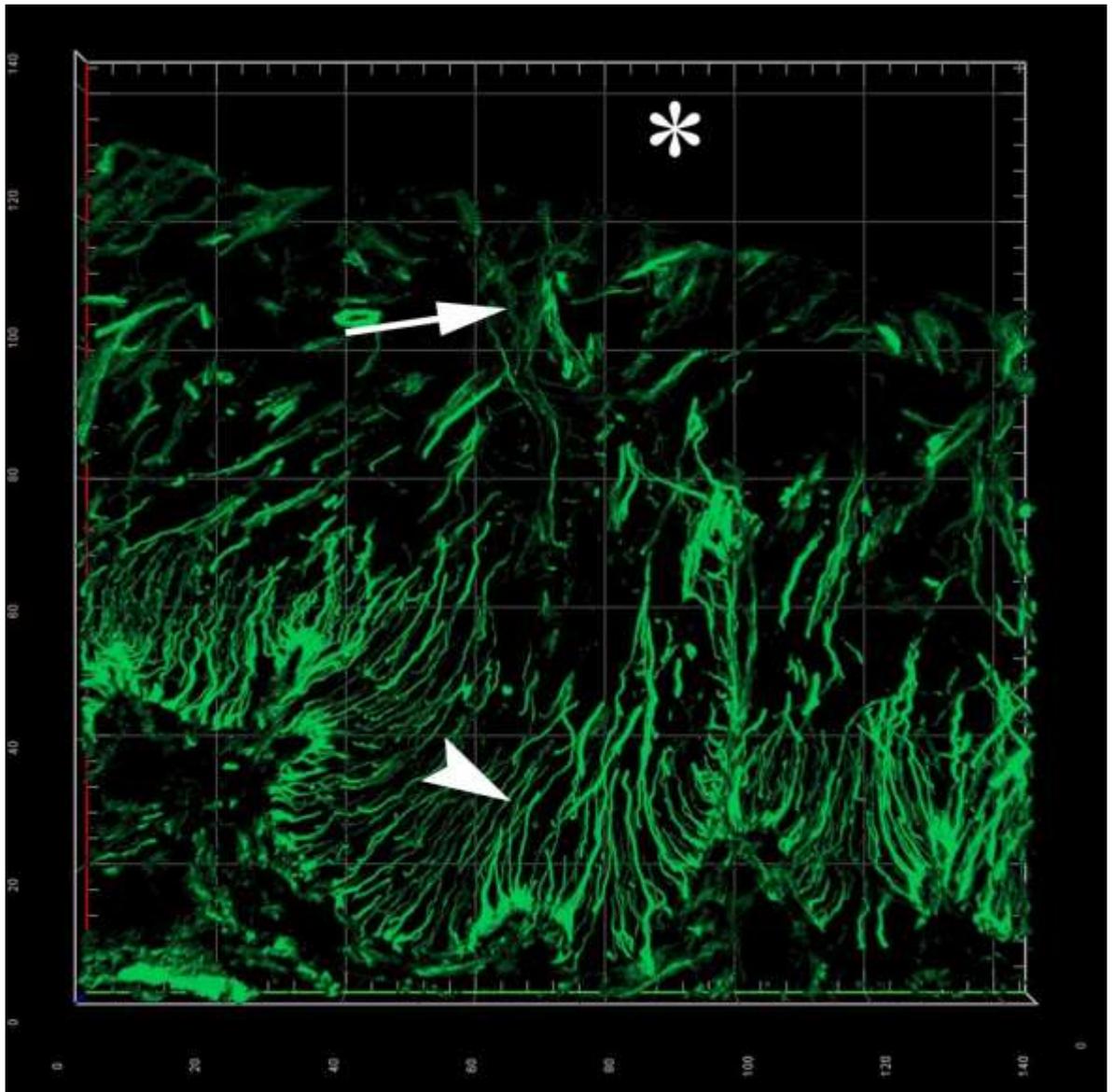


Рисунок 13. Организация отростков $\beta 2$ -таницитов у молодых животных. 14 сутки постнатального развития. Трехмерная реконструкция 14 оптических срезов. Конфокальная лазерная микроскопия. Стрелкой отмечены проксимальные отделы отростков, формирующие небольшие пучки; головка стрелки – дистальные отделы отростков. Звездочка — полость третьего желудочка. Размер сетки - 20x20 μm .

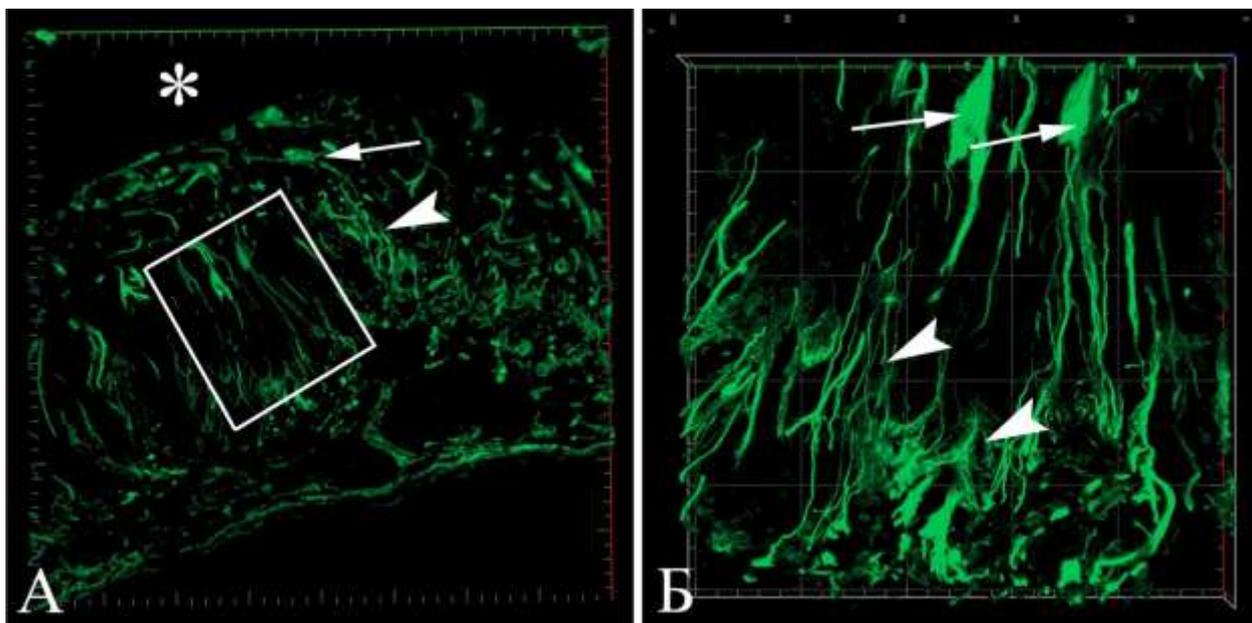


Рисунок 14. Отростки $\beta 2$ -таницитов у старых животных. Трехмерная реконструкция 25 оптических срезов. Конфокальная лазерная микроскопия. А – срединное возвышения, Б – увеличенный фрагмент рис. А. Стрелка указывает на проксимальные участки отростков, головка стрелки - на дистальные части отростков. Звездочка –полость третьего желудочка. Размер сетки - 20x20 μm .

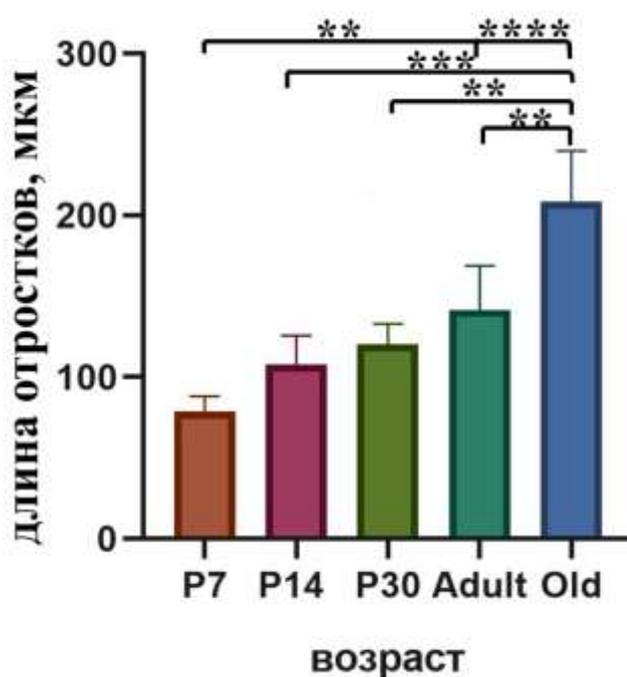


Рисунок 15. Динамику изменения длины отростков $\beta 2$ -таницитов с возрастом. Столбчатая диаграмма. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ по критерию Данна.

Часть представленных результатов опубликована в статье 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. (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.– V. 52, I. 6.– С. 490-498).

Иммуногистохимическая реакция на глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP). Иммуногистохимическое исследование на GFAP, белок промежуточных филаментов III типа, выявило, что на 7 и 14 сутки постнатального развития высокоинтенсивная реакция наблюдается в отдельных $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -таницитах, при этом иммунопозитивные клетки располагались преимущественно кластерами. Продукт ИГХ-реакции локализовался как в телах, так и в отростках этих клеток (рис. 16А, Б). В $\beta 1$ -таницитах GFAP выявлялся лишь в единичных клетках и локализовался в их телах. В $\beta 2$ -таницитах реакция отсутствовала (рис. 17А). В срединном возвышении положительная реакция на GFAP выявлялась, начиная с 14 суток постнатального развития в звездчатых клетках в *zona interna* и слабая реакция прослеживалась в дистальных отделах отростков $\beta 2$ -таницитов (рис. 17Б).

К концу первого месяца развития все $\alpha 1$ -танициты становятся GFAP-иммуноположительными. Белок выявлялся в телах и отростках этих клеток. В $\alpha 2$ -таницитах реакция прослеживалась, главным образом, в отростках и расширенных терминалях. В β -таницитах реакция была слабой и присутствовала лишь в отростках этих клеток. Высокоинтенсивная реакция наблюдалась в астроцитах, выстилающих субэпендимную область, и в звездчатых клетках срединного возвышения (рис. 18). Также окрашивалась область пограничной периваскулярной глиальной мембраны, за исключением зоны фенестрированных капилляров срединного возвышения.

У взрослых животных GFAP локализовался в телах, отростках и расширенных терминалях $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -таницитов (рис. 16В). Наибольшее его количество наблюдалось в отростках и расширенных терминалях этих клеток (рис. 19А). В $\beta 1$ - и $\beta 2$ -таницитах изучаемый белок присутствовал лишь в дистальных и терминальных отделах отростков этих клеток (рис. 19Б). В звездчатых клетках срединного возвышения и субэпендимных астроцитах реакция была высокоинтенсивной (рис. 16Б, 17В).

У старых крыс характер распределения GFAP не изменяется. Однако, помимо тел $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -таницитов у старых животных GFAP наблюдался также в телах β -таницитов (рис. 17Г).

Кроме того, с возрастом наблюдалось значительное усиление реакции в исследуемых клетках. В α -таницитах наблюдалось разветвление проксимальных отделов отростков (рис. 16Г). Интенсивно окрашивались звездчатые клетки *zona interna* в области срединного возвышения.

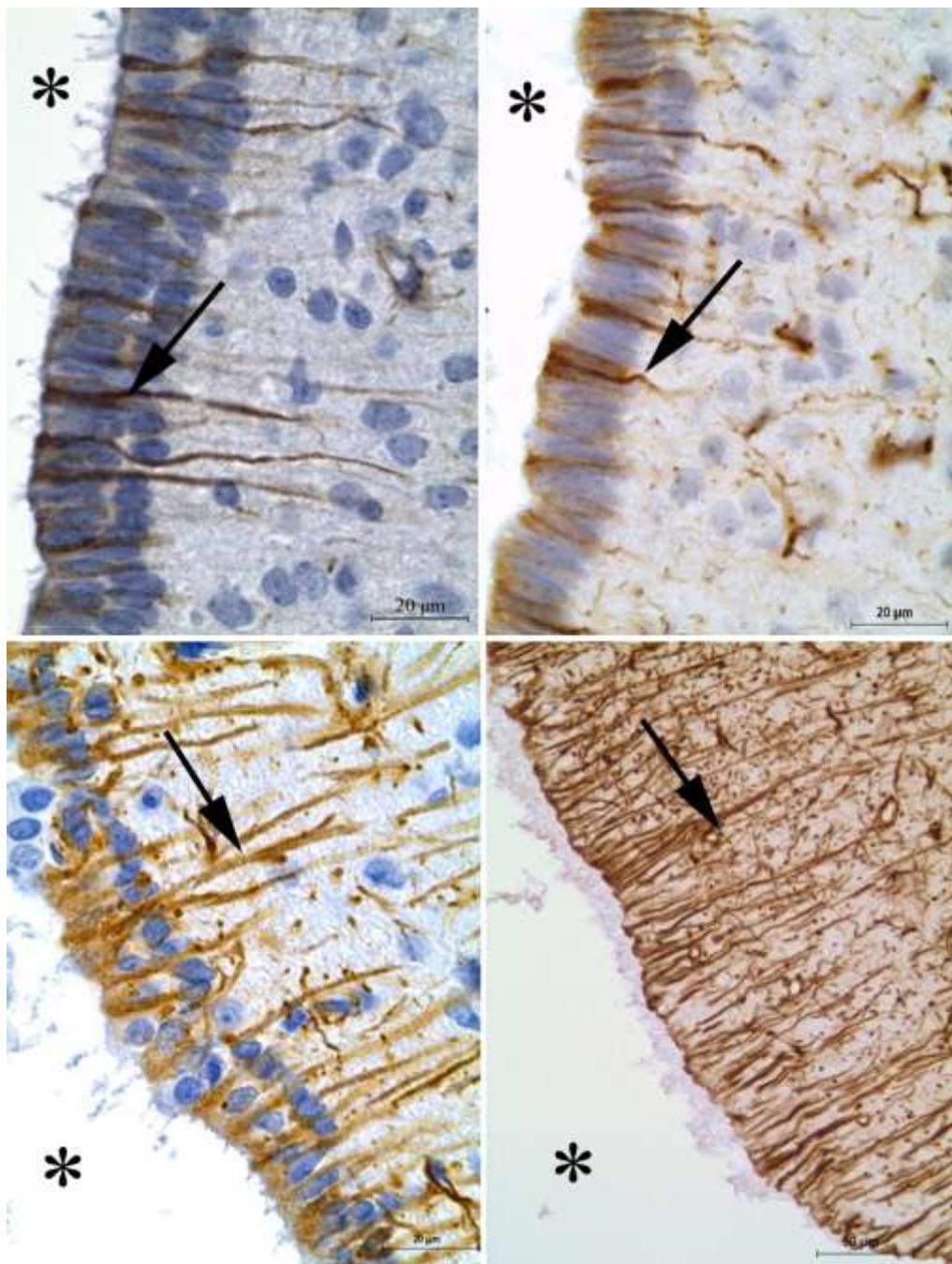


Рисунок 16. Распределение GFAP в выстилке, образованной α -таницитами. А – 7 суток постнатального развития, Б – 14 суток постнатального развития, В – взрослое животное, Г – старое животное. Стрелка указывает на отростки таницитов. Звездочка — полость третьего желудка.

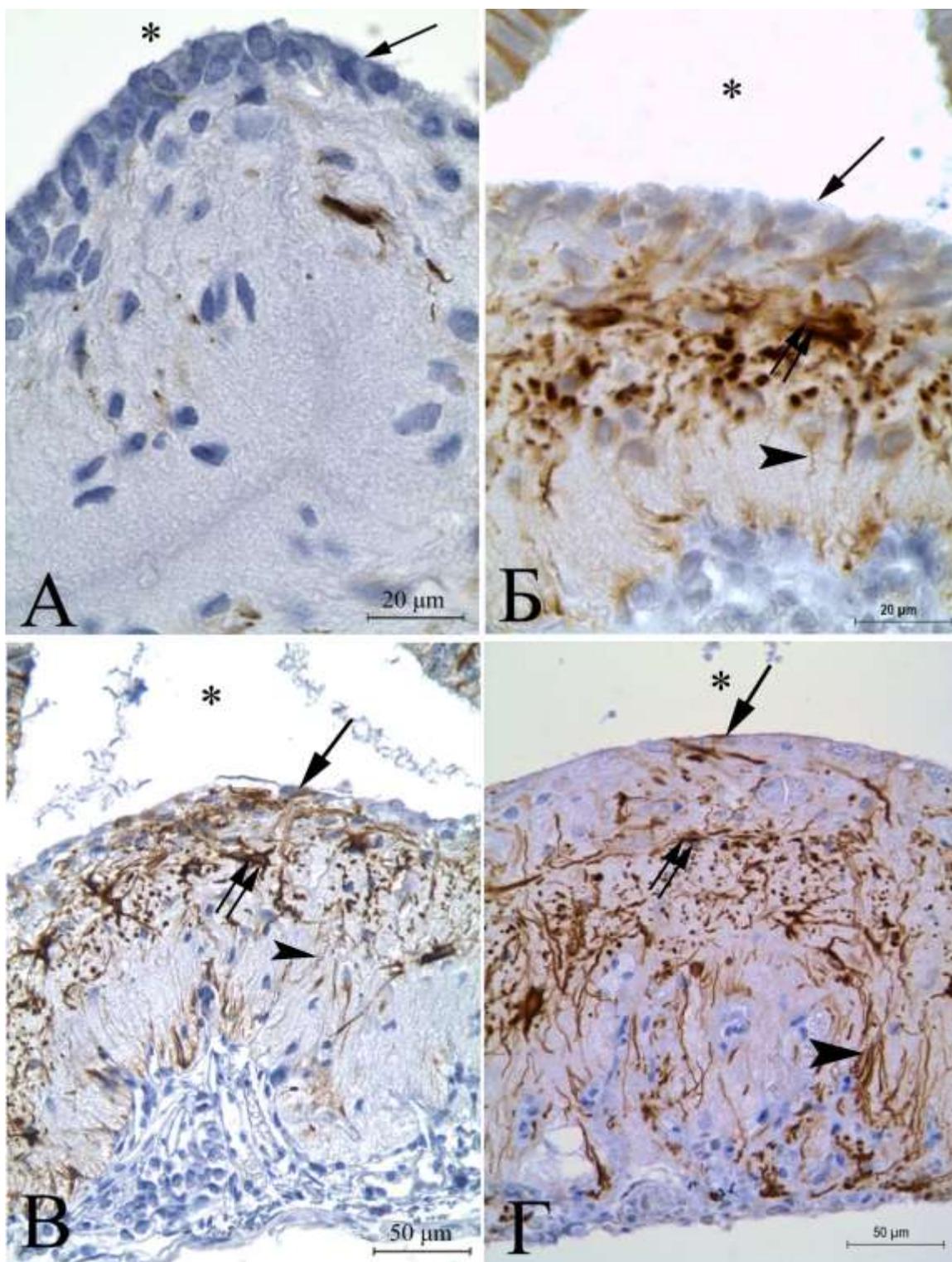


Рисунок 17. Распределение GFAP в выстилке, образованной $\beta 2$ -таницитами. А – 7 сутки постнатального развития, Б – 14 сутки постнатального развития, В – взрослое животное, Г – старое животное. Стрелка указывает на тела таницитов, головка стрелки – на дистальные отделы отростков таницитов; двойная стрелка – звездчатые клетки *zona interna*. Звездочка – полость третьего желудочка.

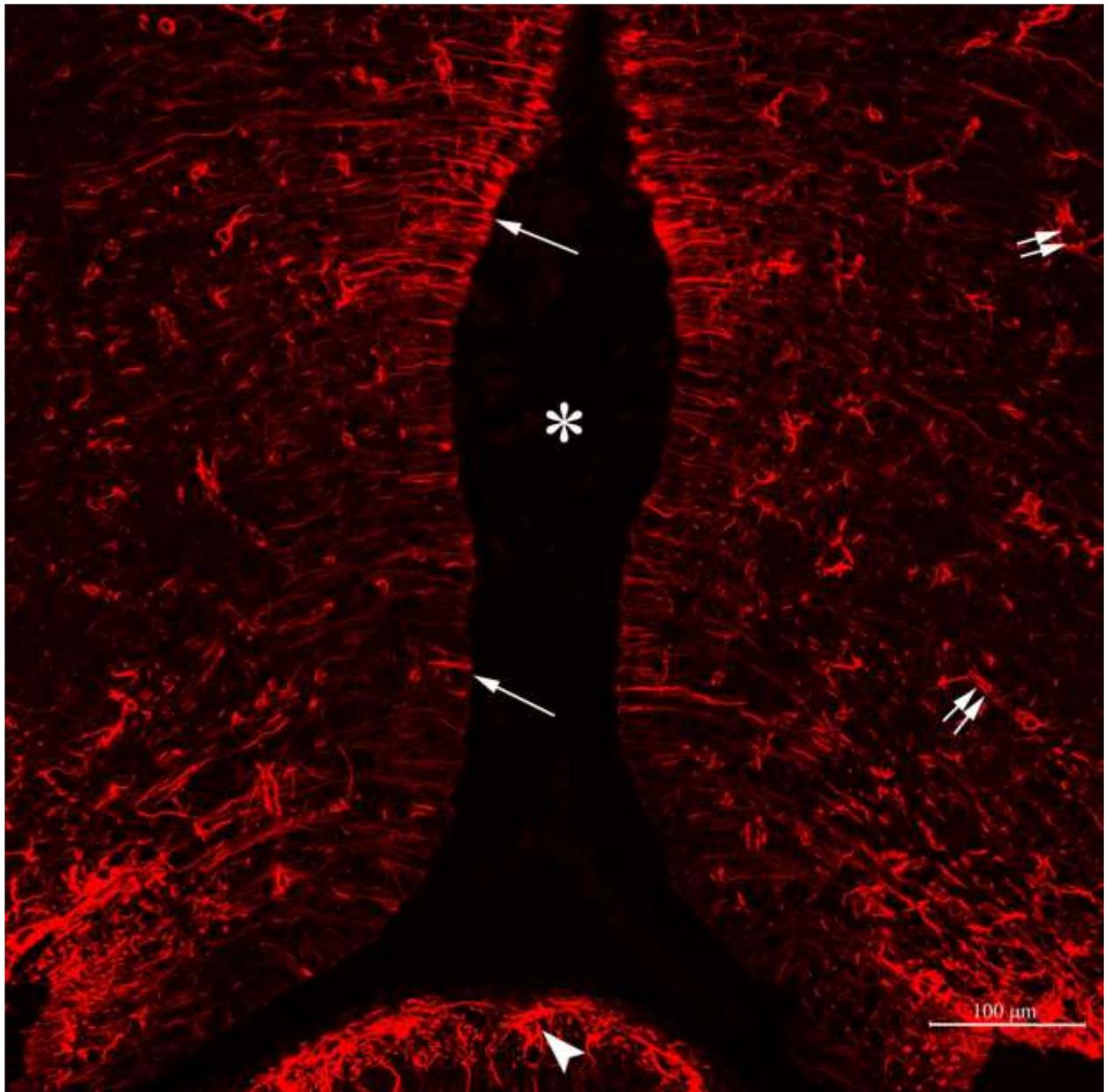


Рисунок 18. Распределение GFAP в инфундибулярном углублении. 30 сутки постнатального развития. Конфокальная лазерная микроскопия. Одиночный оптический срез. Стрелки указывают на иммунопозитивные α -танициты, головка стрелки - иммунопозитивные звездчатые клетки *zona interna*, двойные короткие стрелки - область пограничной периваскулярной глиальной мембраны.

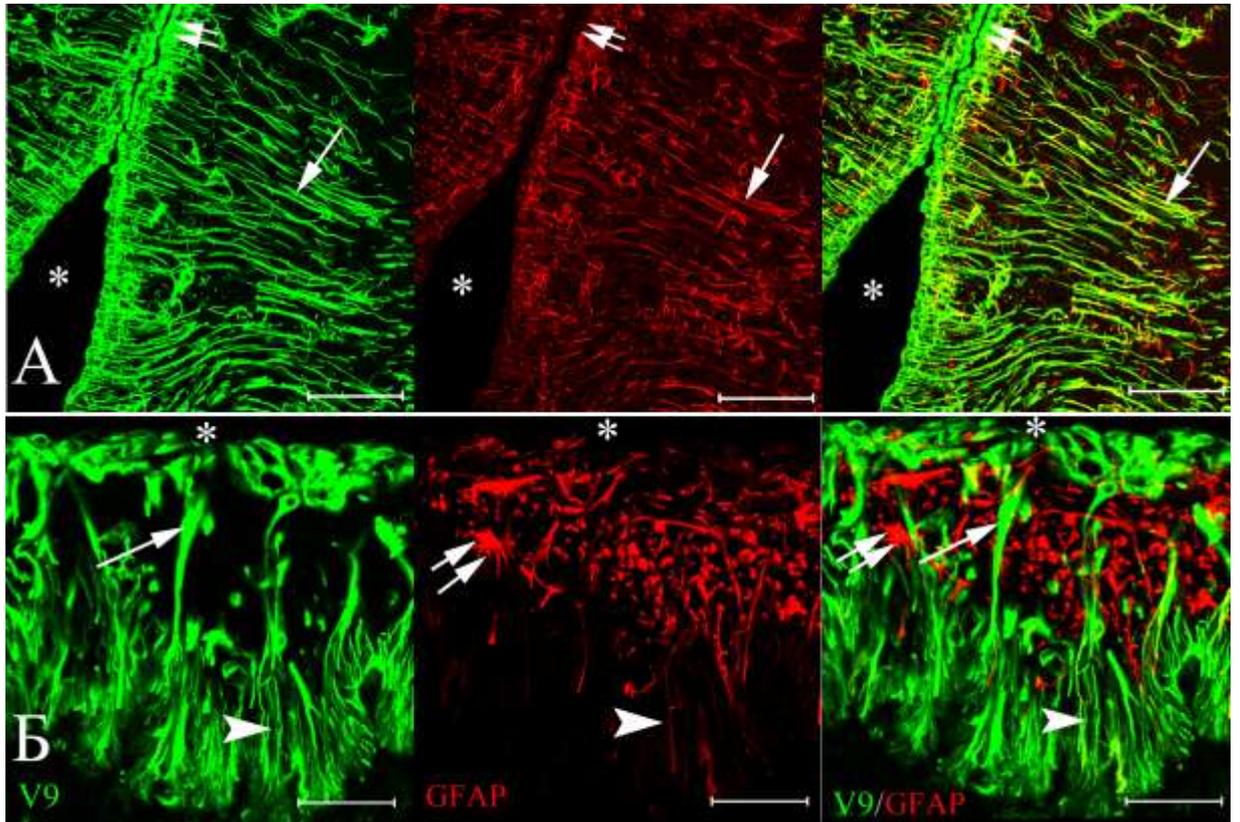


Рисунок 19. Распределение белков промежуточных филаментов III типа виментина и GFAP в таницитах. Двойная иммуногистохимическая реакция на виментин (зеленый цвет) и GFAP (красный цвет). Взрослое животное. А – $\alpha 1$ -танициты. Стрелка указывает на отростки таницитов иммунопозитивные на оба белка цитоскелета. Область колокализации представлена желтым цветом. Двойная короткая стрелка указывает на $V9^+ GFAP^-$ эндимоциты. Б – $\beta 2$ -танициты. Стрелка указывает на проксимальные отделы таницитов, формирующие пучки отростков. Головка стрелки указывает на дистальные отделы отростков, содержащие GFAP. Двойной короткой стрелкой отмечены звездчатые клетки *zona interna*. Звездочка – полость третьего желудочка. Масштабный отрезок равен 50 μm .

Часть результатов данной подглавы представлена в публикациях:

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. (Переводная версия статьи: Sufieva, D.A. Intermediate filament proteins in tanycytes 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.– V. 52, I. 6.– С. 490-498).

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. (Переводная версия статья: Sufieva, D.A. Astrocyte Markers in the Tanycytes of the Third Brain Ventricle in Postnatal Development and

Иммуногистохимическая реакция на нестин. Иммуногистохимическая реакция на нестин, белок промежуточных филаментов VI типа, показала, что на 7 сутки постнатального развития нестин-иммуноположительными клетками являются $\alpha 2$ -, $\beta 1$ - и $\beta 2$ -танициты (рис. 20А, В). В $\alpha 2$ -таницитах реакция слабая и наблюдается преимущественно в телах и проксимальных отделах отростков. В $\beta 1$ - и $\beta 2$ -таницитах реакция умеренная, продукт реакции локализуется преимущественно в отростках этих клеток, в отдельных клетках нестин локализуется в телах этих субпопуляций таницитов (рис. 20В). На 14 день постнатального развития слабая реакция проявляется в телах и отростках $\alpha 1$ -таницитов (рис. 20Б). В $\alpha 2$ -, $\beta 1$ - и $\beta 2$ - таницитах реакция усиливается. Продукт реакции локализуется в отростках и расширенных терминалях этих клеток (рис. 20Г).

У 30-дневных животных характер распределение нестина не меняется, однако усиливается интенсивность реакции (рис. 21А, Г). У взрослых животных нестин локализуется как в телах, так и в отростках всех субпопуляций таницитов. Интенсивность реакции усиливается по сравнению с 30-дневными животными (рис. 21Б, Д). Иммунопозитивными к нестину являются также эндотелиоциты кровеносных сосудов, за исключением фенестрированных капилляров срединного возвышения. У старых крыс в $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -таницитах реакция умеренная, в то время как в $\beta 1$ - и $\beta 2$ - таницитах реакция интенсивная. Продукт реакции в α -таницитах локализуется преимущественно в отростках клеток, в β -таницитах - в телах и отростках (рис. 21В, Е). В отличие от других исследуемых промежуточных филаментов (виментина и GFAP), при окраске на нестин у старых крыс практически не наблюдаются разветвления отростков α -таницитов, то есть выявляются лишь главные, а не второстепенные отростки (рис. 21).

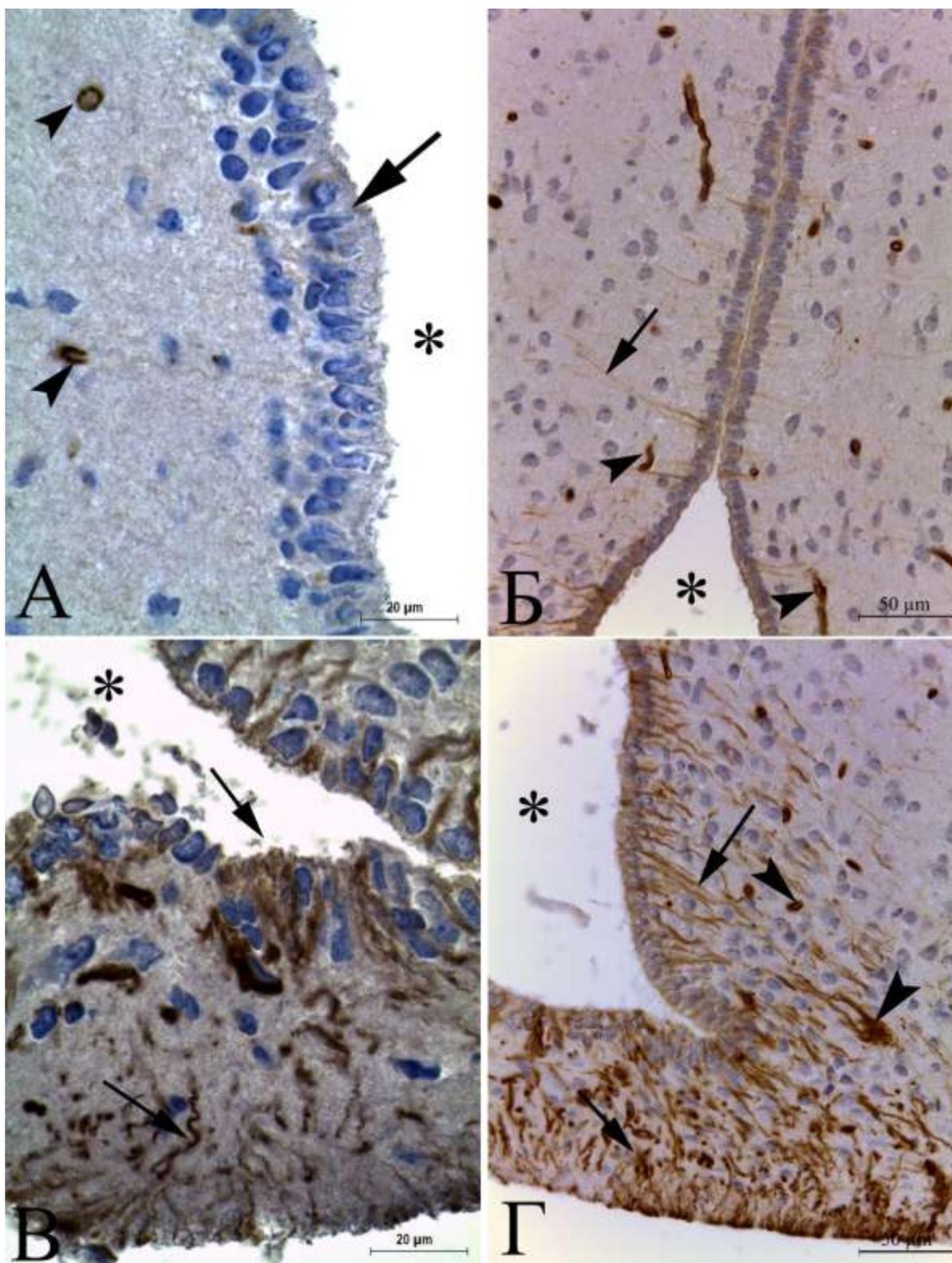


Рисунок 20. Распределение нестина в таницитах у крысят. А, В – 7 сутки постнатального развития; Б, Г – 14 сутки постнатального развития. А, Б – $\alpha 1$ -танициты; В, Г – $\beta 1$ танициты. Стрелка указывает на тела и отростки таницитов. Головка стрелки – нестин-иммуноположительные сосуды. Звездочкой отмечена полость третьего желудочка.

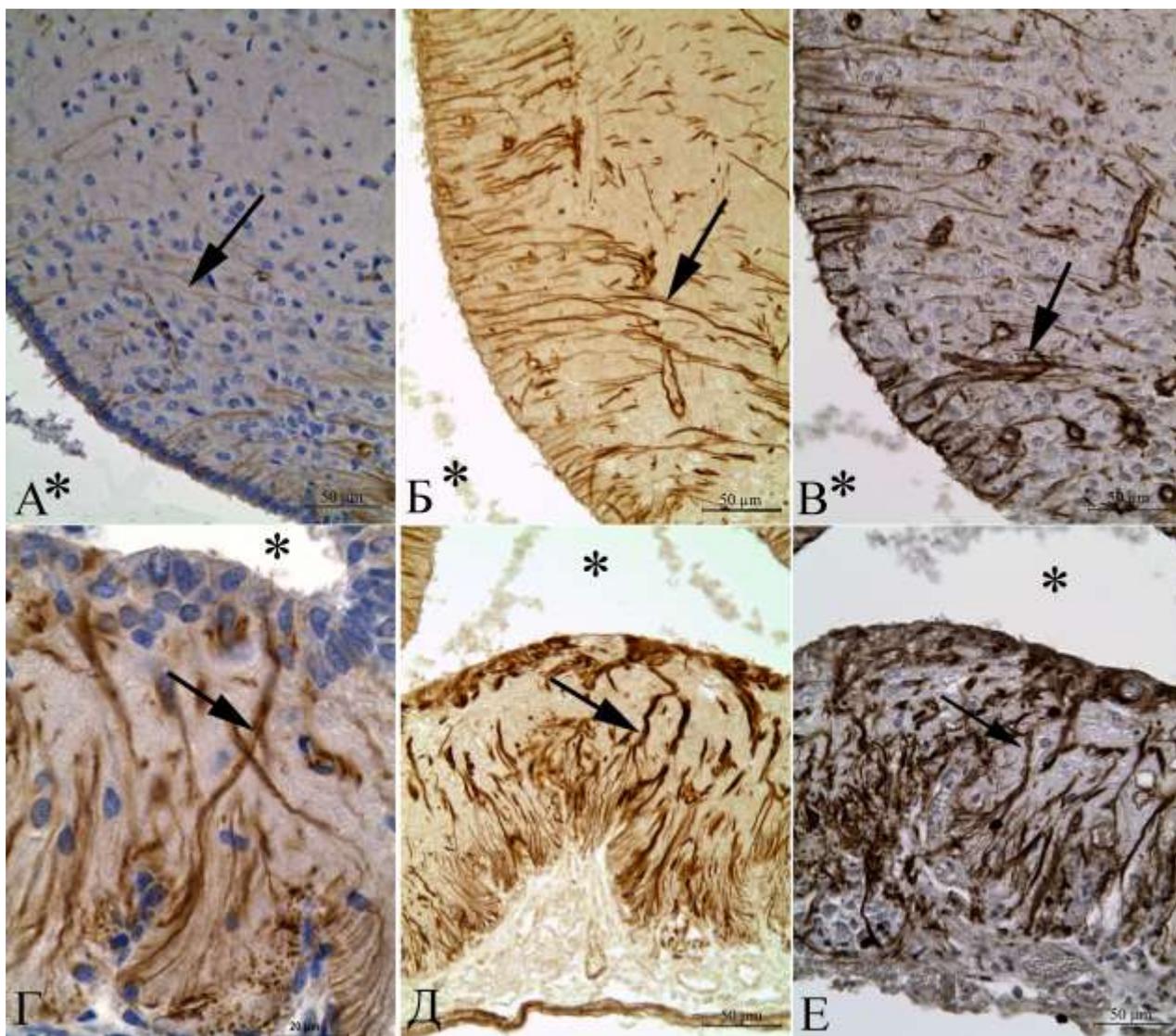


Рисунок 21. аспределение нестина в таницитах дна третьего желудочка. А, Г – 30 суток постнатального развития; Б, Д – взрослые животные; В, Е – старые животные. А-В – α -танициты; Г-Е – β 2-танициты. Стрелка указывает на отростки таницитов. Звездочкой отмечена полость третьего желудочка.

Часть этих данных опубликована в статье: 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. (Переводная версия статьи: Sufieva, D.A. Intermediate filament proteins in tanycytes 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.– V. 52, I. 6.– С. 490-498).

4.1.2. Астроцитарный фермент глутаминсинтетаза в таницитах дна третьего желудочка в постнатальном развитии и при старении.

На 7 сутки постнатального развития в области $\alpha 1$ -таницитов встречались единичные GS-иммунопозитивные клетки. Интенсивность реакции в этих клетках варьировала от слабой до высокоинтенсивной. Окрашивались тела этих клеток и проксимальные отделы отростков (рис. 22А). Высокоинтенсивная реакция наблюдалась в телах и проксимальных отделах отростков $\alpha 2$ - и $\beta 1$ -таницитов (рис. 22Б, Г). В $\beta 2$ -таницитах реакция отсутствовала. В подлежащей нервной ткани положительную реакцию на GS давали астроциты, в средней области срединного возвышения (*zona interna*) встречались отдельные GS-иммунопозитивные звездчатые клетки (предположительно, астроциты) (рис. 22Г).

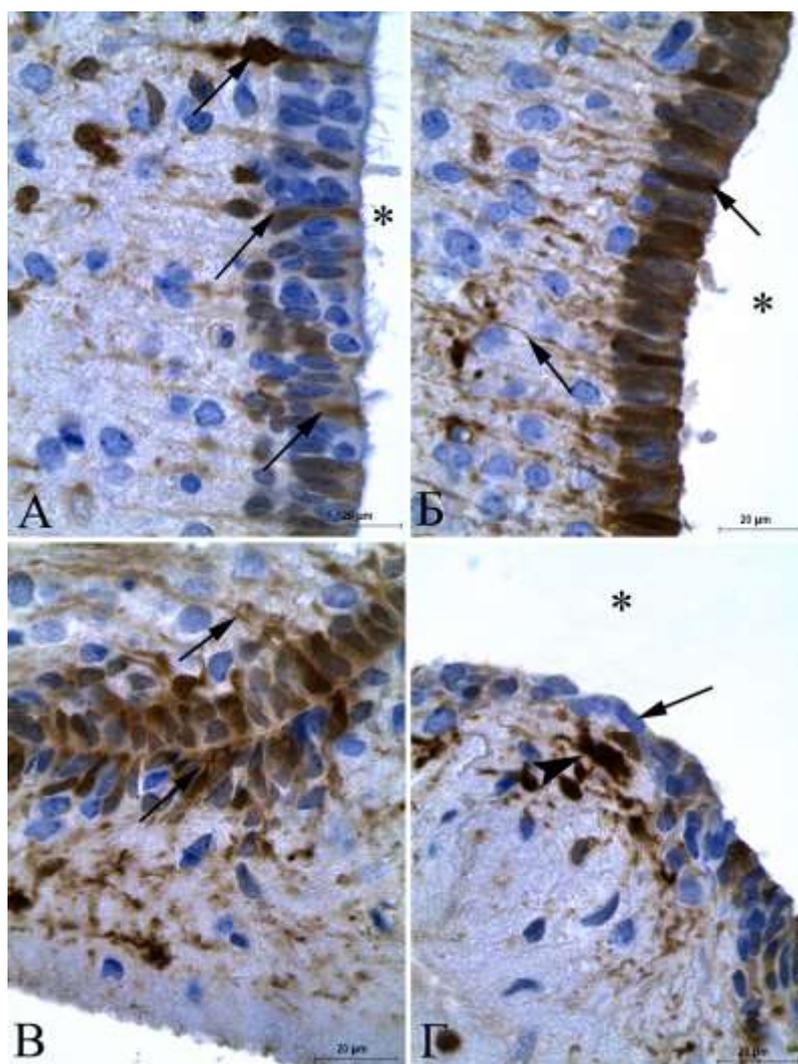


Рисунок 22. Распределение глутаминсинтетазы в выстилке инфундибулярного углубления. 7 сутки постнатального развития. А – $\alpha 1$ -танициты, Б – $\alpha 2$ -танициты, В – $\beta 1$ -танициты, Г – $\beta 2$ -танициты. Стрелка указывает на тела и отростки таницитов, головка стрелки – на звездчатые клетки срединного возвышения. Звездочка – полость третьего желудочка.

На 14 сутки постнатального онтогенеза характер распределения белка GS в выстилке инфундибулярного углубления не изменился. Однако в области $\alpha 1$ -таницитов реакция была слабой и сохранилась лишь в телах этих клеток.

К первому месяцу развития GS выявлялась в $\alpha 2$ - и $\beta 1$ -таницитах (рис. 23). В $\alpha 2$ -таницитах реакция была очень слабой и наблюдалась лишь в телах этих клеток. В $\beta 1$ -таницитах продукт реакции локализовался в телах и проксимальных отделах отростков этих клеток, реакция была интенсивной, но слабее по сравнению с более ранними сроками развития. GS-иммунопозитивными являлись астроциты и звездчатые клетки в срединном возвышении.

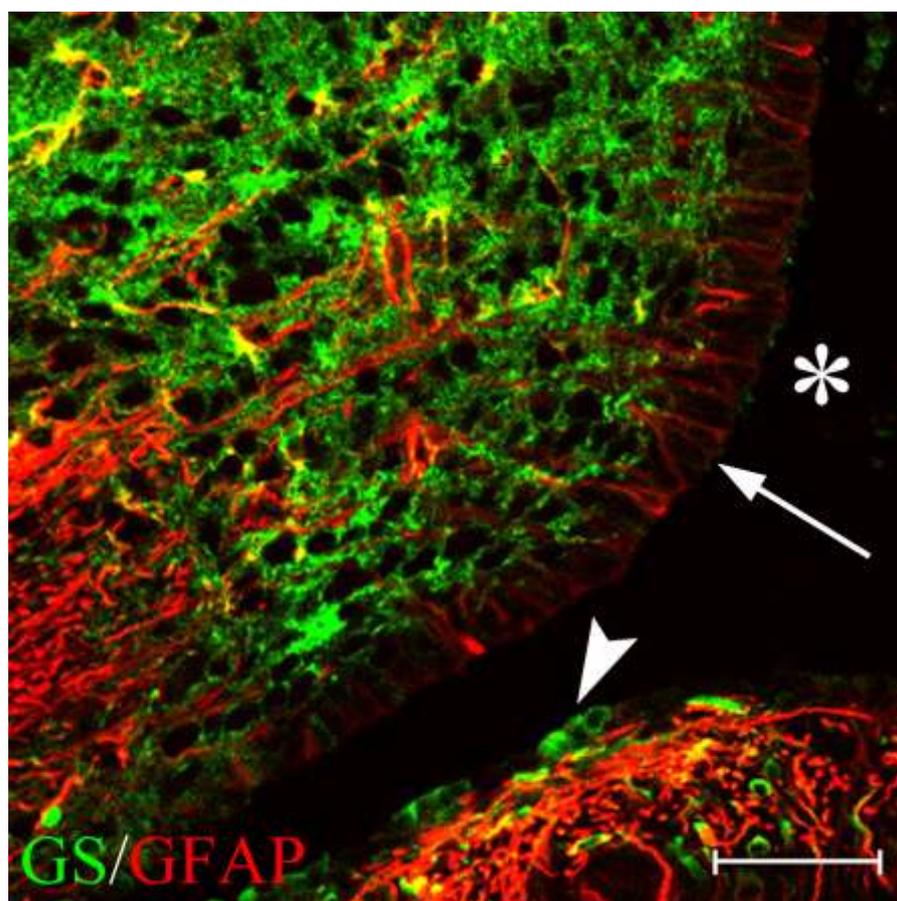


Рисунок 23. Глутаминсинтетаза в таницитах дна третьего желудочка. 30 сутки постнатального развития. Двойная иммуногистохимическая реакция на GFAP (красный цвет) и глутаминсинтетазу (зеленый цвет). Конфокальная лазерная микроскопия. Одиночный оптический срез. Стрелка указывает на тела $\alpha 2$ -таницитов, головка стрелки на GS+ $\beta 1$ -танициты. Звездочка — полость третьего желудочка. Масштабный отрезок равен 50 мкм.

У взрослых животных GS-иммуноположительными клетками являлись $\alpha 2$ -, $\beta 1$ - и единичные $\beta 2$ -танициты. Продукт реакции локализовался в телах ($\alpha 2$ -, $\beta 1$ - и $\beta 2$ -танициты) и проксимальных отделах отростков ($\beta 1$ -танициты). В $\alpha 2$ - и $\beta 2$ -таницитах интенсивность реакции была слабой, но сопоставимой с таковой в астроцитах, в то время как в $\beta 1$ -таницитах реакция на GS была высокоинтенсивной (рис 24).

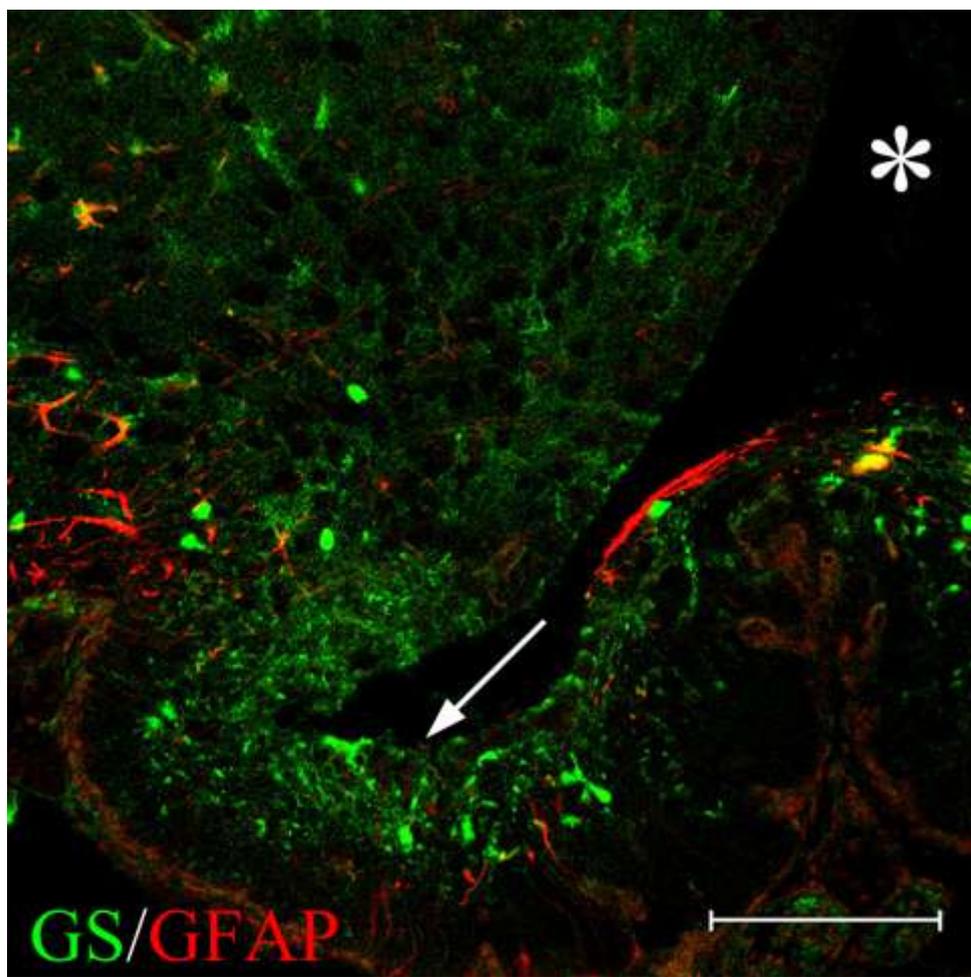


Рисунок 24. Распределение GS в инфундибулярном углублении взрослых животных. Двойная иммуногистохимическая реакция на GFAP (красный цвет) и глутаминсинтетазу (зеленый цвет). Конфокальная лазерная микроскопия. Одиночный оптический срез. Стрелка указывает на тела $\beta 2$ -таницитов. Звездочка — полость третьего желудочка. Масштабный отрезок равен 100 мкм

У старых животных GS выявлялась только в $\alpha 2$ - и $\beta 1$ -таницитах. Интенсивность реакции была умеренной, сопоставимой с таковой у астроцитов. Помимо GS⁺ звездчатых клеток в срединном возвышении, в области проксимальных отделов отростков $\beta 1$ -таницитов выявлялось значительное число клеток округлой формы, которые давали высокоинтенсивную реакцию на GS (рис. 25).

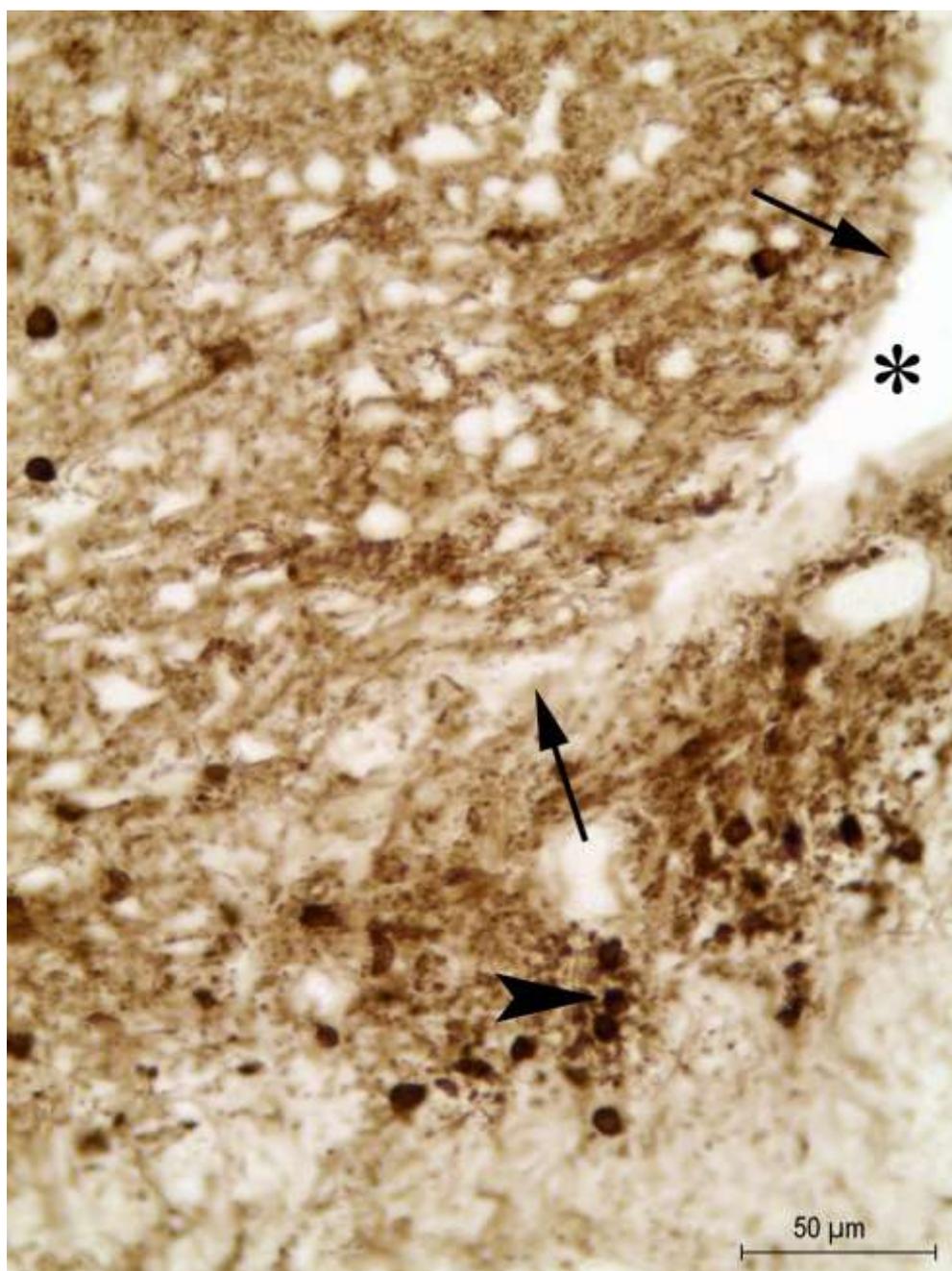


Рисунок 25. Распределение GS в инфундибулярном углублении старых животных (23 месяца). Стрелкой отмечены тела $\alpha 2$ - и $\beta 1$ -таницитов. Головка стрелки – GS-иммуноположительные клетки. Звездочка – полость третьего желудочка.

4.2. Адгезионные и щелевые клеточные контакты в таницитах в постнатальном онтогенезе.

Иммуногистохимическая реакция на белок адгезионных контактов β -катенин. При изучении распределения β -катенина было выявлено, что у молодых животных высокоинтенсивная реакция в α -таницитах прослеживается на апикальной поверхности латеральной стенки клеток, как и в эпендимоцитах, и формирует непрерывное кольцо вокруг

клетки в виде «пчелиных сот» (рис. 26А, Б). Однако в отличие от эпендимоцитов слабая реакция наблюдается и вдоль латеральной стенки таницитов (рис. 26А). В $\alpha 2$ -таницитах слабая реакция также прослеживается вдоль отростков этих клеток. В β -таницитах высокоинтенсивная реакция на этот белок присутствует на апикальной поверхности латеральных стенок и умеренная - по всей длине отростков клеток (рис. 27). Умеренная реакция наблюдается и в кровеносных сосудах подлежащей нервной ткани.

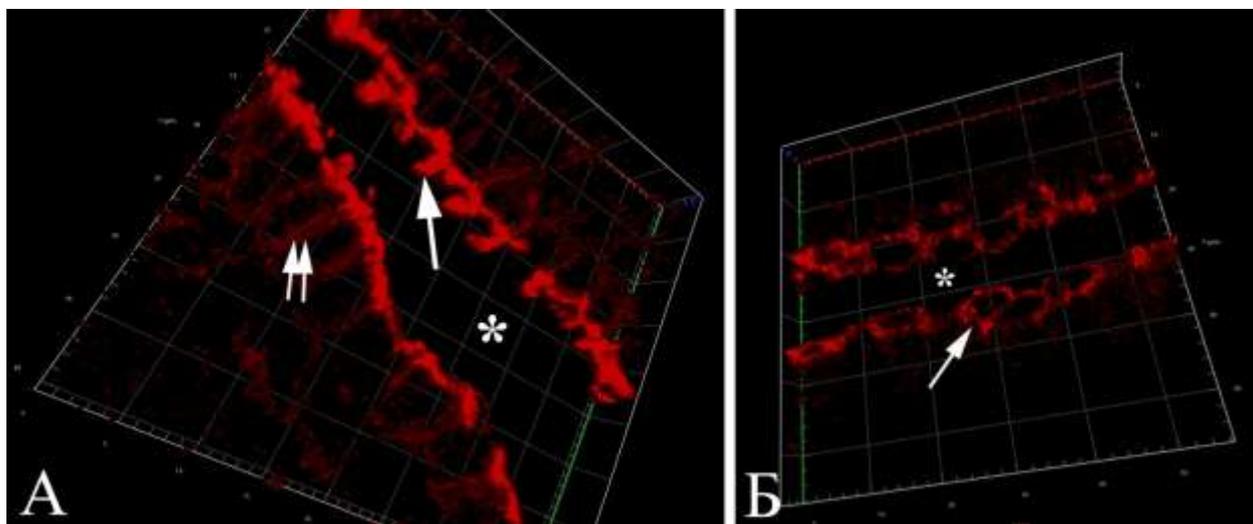


Рисунок 26. Характер распределения β -катенина в выстилке дна третьего желудочка у молодых крыс (14 сутки постнатального развития). Трехмерная реконструкция 21 (А) и 28 (Б) оптических срезов. Конфокальная лазерная микроскопия. А – область $\alpha 1$ -таницитов, Б – эпендимоциты. Стрелка указывает на β -катенин в апикальной части клетки, двойная стрелка – вдоль латеральных стенок. Звездочка- полость желудочка. Размер сетки – $10 \times 10 \mu\text{m}$.

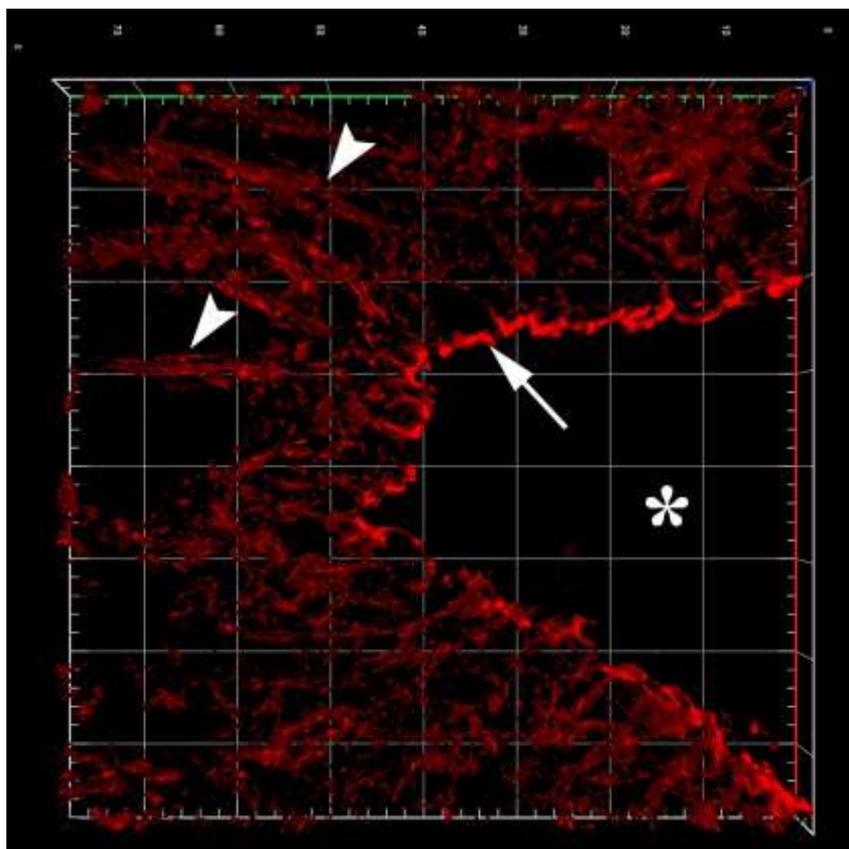


Рисунок 27. Характер распределения β -катенина в инфундибулярном углублении. Область β 1-таницитов. 14 сутки постнатального развития. Трехмерная реконструкция 25 оптических срезов. Конфокальная лазерная микроскопия. Стрелка указывает на β -катенин в апикальной части клетки, головка стрелки – вдоль отростков таницитов. Звездочка – полость желудочка. Размер сетки – $10 \times 10 \mu\text{m}$

Начиная со второй недели развития, слабая реакция на β -катенин прослеживается в проксимальных отделах отростков α 1-таницитов. В α 2-таницитах и β -таницитах характер распределения и интенсивность реакции β -катенина не изменяется (рис. 28 А-В).

У старых крыс характер распределения белка не изменяется, однако в β -таницитах (особенно в β 2-таницитах) умеренная реакция сохраняется лишь в проксимальных отделах отростков и часто имеет прерывистый характер, в то время как в дистальных ее частях реакция становится слабой (рис. 28 Г-Е).

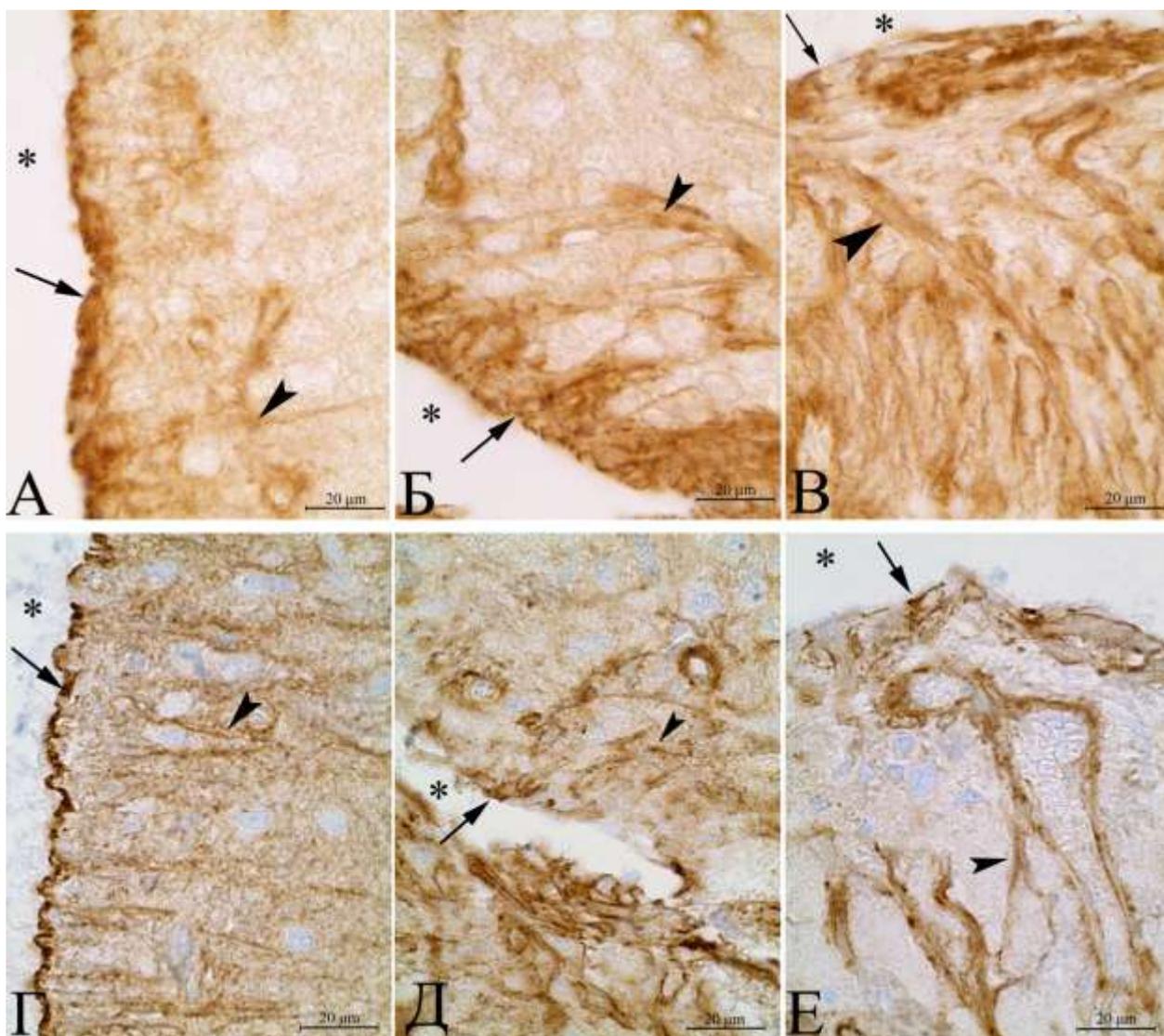


Рисунок 28. β -катенин в выстилке инфундибулярного углубления. А-В – взрослое животное, Г-Е – старое животное. А, Г – область α 2-таницитов, Б, Д – область β 1-таницитов, В, Е – область β 2-таницитов. Стрелка указывает на β -катенин в апикальной части клетки, головка стрелки – на β -катенин вдоль отростков.

Иммуногистохимическая реакция на белок щелевых контактов коннексин 43 (Cx43). Иммуногистохимическое исследование распределения Cx43 в таницитах показало, что на 7 и 14 сутки постнатального онтогенеза интенсивно окрашивались $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ - танициты, в $\beta 1$ - и $\beta 2$ -таницитах реакция была слабой (Рис. 29). Продукт реакции локализовался на апикальной поверхности α -таницитов и вдоль латеральной стенки α - и β -таницитов (рис. 30, фрагмент 2). Отдельные гранулы встречались вдоль отростков α -таницитов (рис. 30, фрагмент 1). Распределение носило мелкогранулярный характер. Гранулы характеризовались преимущественно округлой, реже овальной формой. В подлежащей нервной ткани контурировались кровеносные сосуды (рис. 29, 31), за исключением фенестрированных капилляров срединного возвышения.

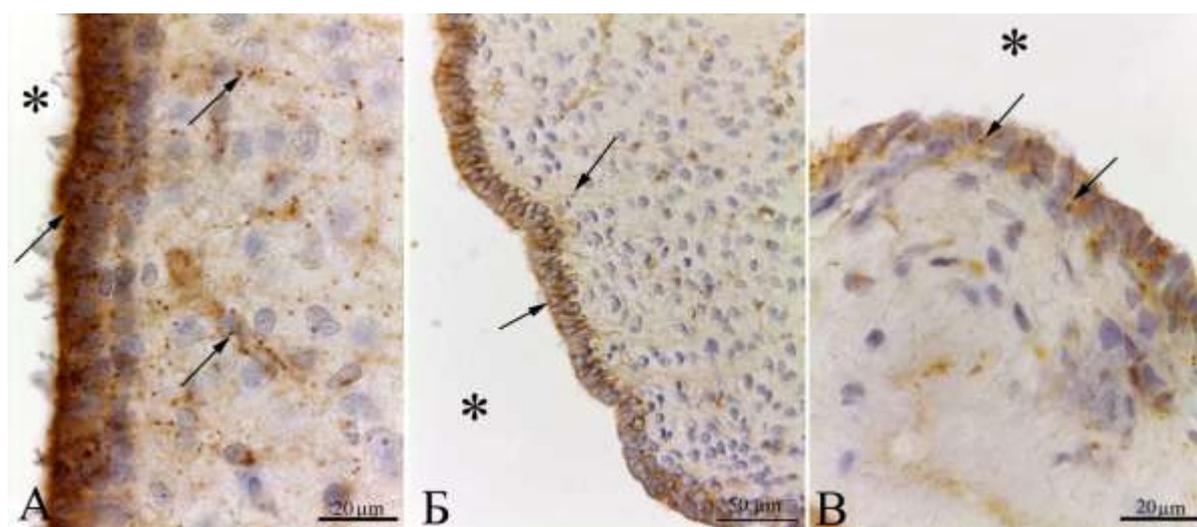


Рисунок 29. Распределение щелевых контактов в выстилке инфундибулярного углубления молодых животных. 7 сутки постнатального развития. А – $\alpha 1$ -танициты, Б – $\alpha 2$ -танициты, В – $\beta 2$ -танициты. Стрелкой отмечены Cx43⁺ гранулы. Звездочка – полость третьего желудочка.

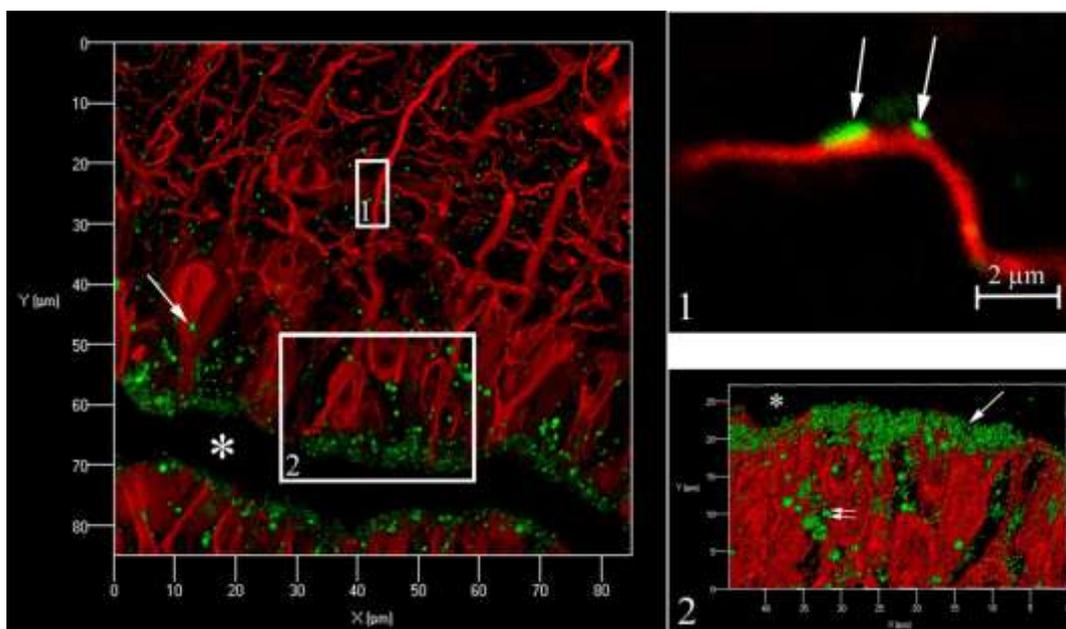


Рисунок 30. Трехмерная реконструкция распределения Sx43 в выстилке третьего желудочка. Область $\alpha 1$ -таницитов. 7 сутки постнатального развития. Двойная иммуногистохимическая реакция к GFAP (красный цвет) и Sx43 (зеленый цвет). Конфокальная лазерная микроскопия. 3D-реконструкция 47 оптических срезов. Режим построения трехмерной реконструкции – Mixed (общая фотография и вкладка 1) и Shadow (вкладка 2). Размер сетки – 10x10 μm .

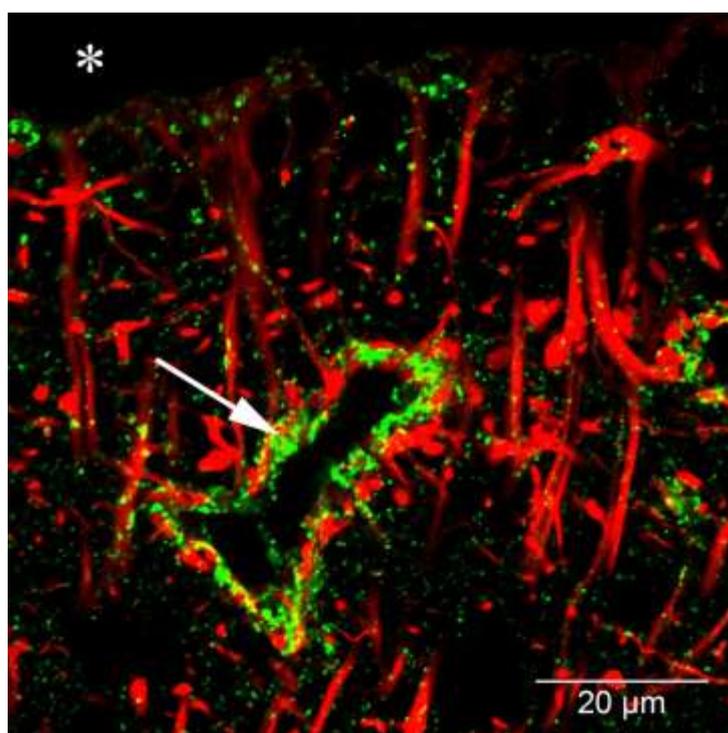


Рисунок 31. Распределение Sx43 в выстилке, сформированной $\alpha 1$ -танцитами. Двойная иммуногистохимическая реакция к GFAP (красный цвет) и Sx43 (зеленый цвет). Конфокальная лазерная микроскопия. Одиночный оптический срез. Стрелка указывает на щелевые контакты в области кровеносных сосудов. Звездочка – полость желудочка.

У одномесячных крысят Сх43 интенсивно окрашивал $\alpha 1$ -таницита и локализовался на апикальной поверхности мембраны и вдоль латеральной поверхности клеток (рис. 32А, 33). В $\alpha 2$ -таницитах Сх43 располагался вдоль латеральной поверхности клеточной мембраны, однако реакция была значительно слабее по сравнению с $\alpha 1$ -таницитами (рис. 32Б), и в дистальных отделах отростков и расширенных ножках, где реакция была высокоинтенсивной. Также в нервной ткани выявлялись многочисленные диффузно распределенные Сх43⁺ гранулы (рис. 32А, 32Б, 33). В β -таницитах реакция не наблюдалась. Кроме того, Сх43-иммуноположительными являлись астроциты и звездчатые клетки срединного возвышения (рис. 32В).

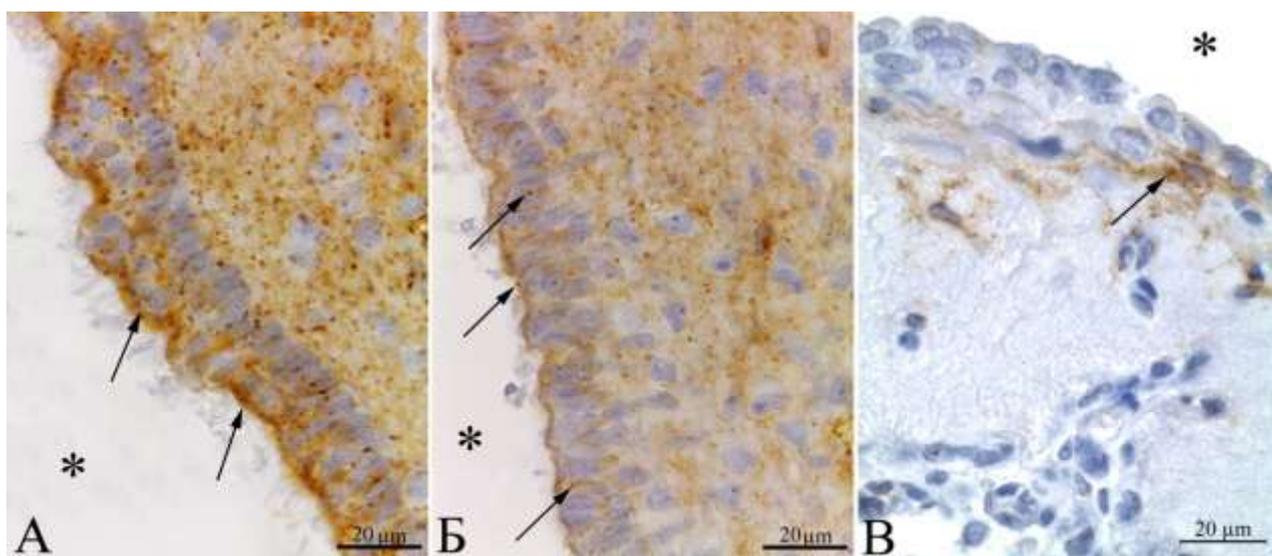


Рисунок 32. Распределение Сх43-иммуноположительных гранул в выстилке дна третьего желудочка. 30 сутки постнатального развития. А – $\alpha 1$ -танициты, Б – $\alpha 2$ -танициты, В – $\beta 2$ -танициты. Стрелка указывает на щелевые контакты. Звездочка – полость третьего желудочка.

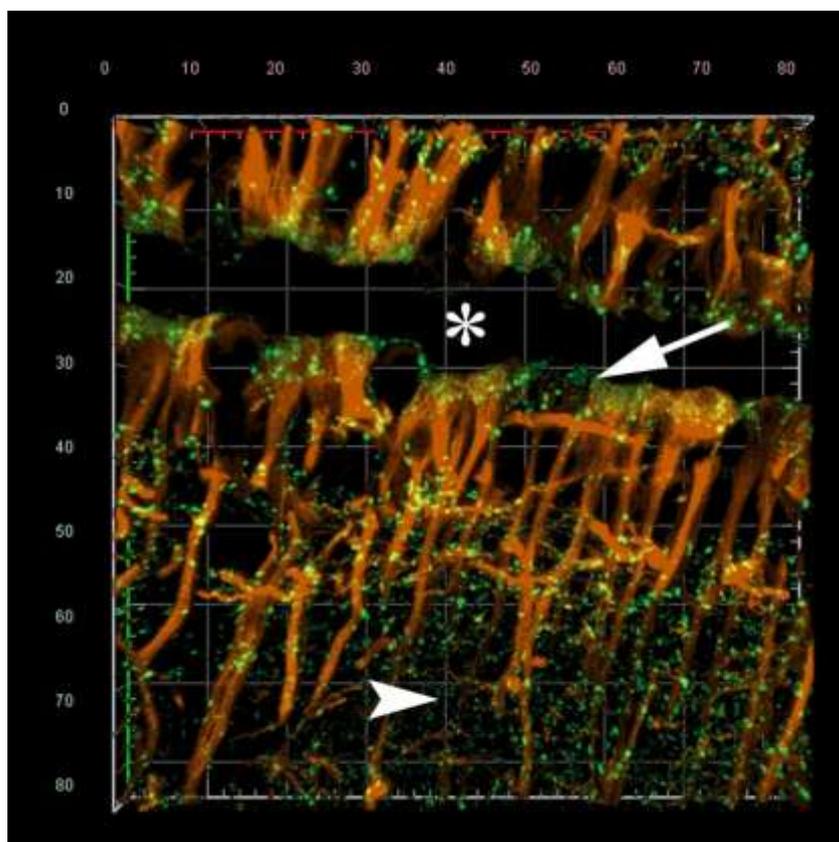


Рисунок 33. Трехмерная реконструкция распределения Sx43 в области $\alpha 1$ -таницитов. 30 сутки постнатального развития. Двойная иммуногистохимическая реакция на GFAP (оранжевый цвет) и Sx43 (зеленый цвет). Конфокальная лазерная микроскопия. 3D реконструкция 33 оптических срезов. Стрелка указывает на щелевые контакты в апикальной части таницитов, головка стрелки – на щелевые контакты в подлежащей нервной ткани. Звездочка – полость желудочка. Размер сетки - $10 \times 10 \mu\text{m}$.

У половозрелых и старых крыс положительная ИГХ-реакция на Sx43 наблюдалась в $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -таницитах (рис. 34А, Б, Г, Д). Характер распределения ИГХ-реакции совпадает с таковым у 30-дневных крысят. Отдельные Sx43⁺ гранулы выявлялись вдоль латеральных стенок, в дистальных отделах отростков и ножках $\beta 1$ - и $\beta 2$ -таницитов (рис. 34В, Е). В подлежащей нервной ткани контурировались кровеносные сосуды, за исключением фенестрированных капилляров срединного возвышения. Положительная реакция наблюдалась также в астроцитах и звездчатых клетках *zona interna* срединного возвышения (рис. 34В, Г).

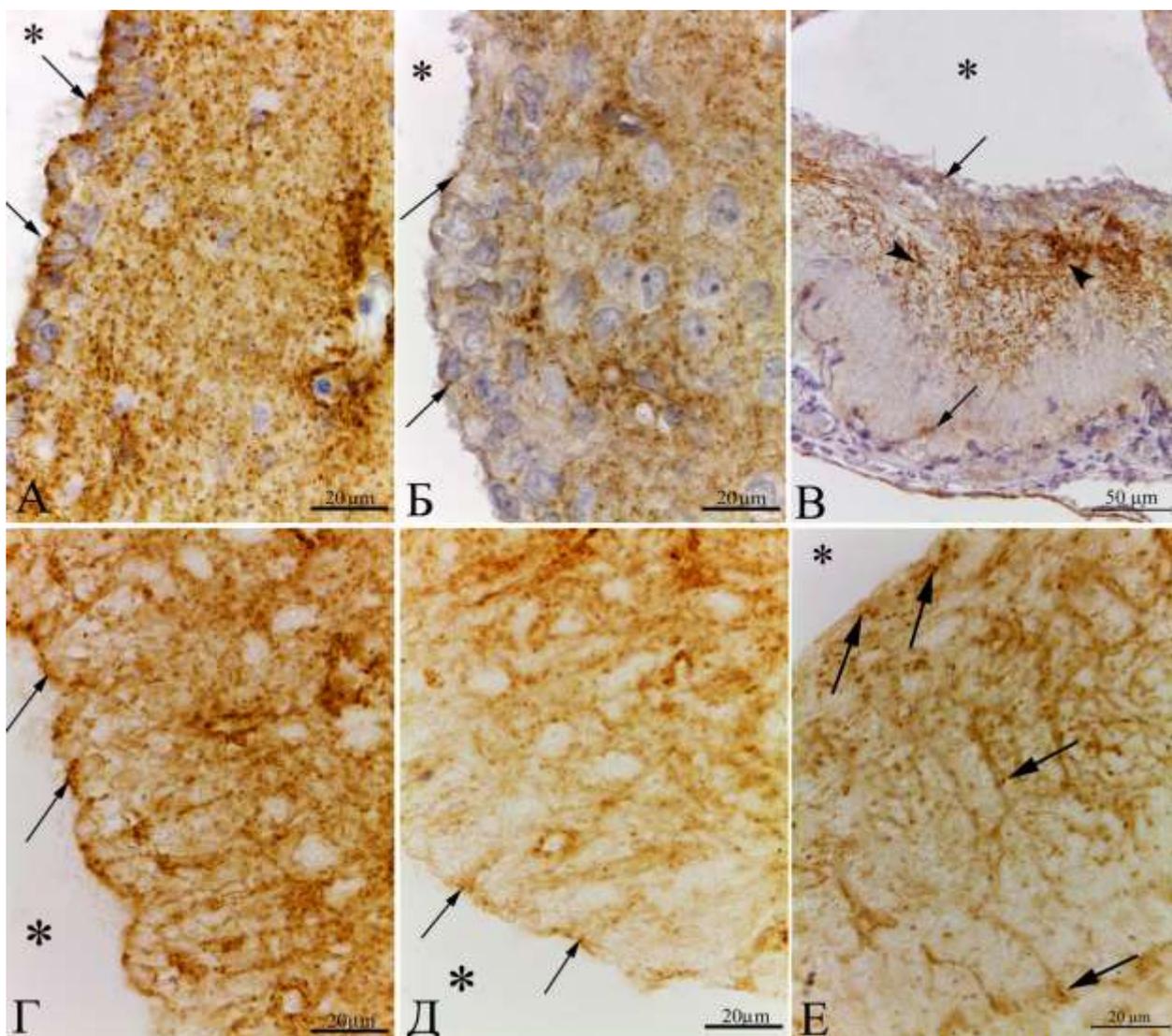


Рисунок 34. Щелевые контакты в инфундибулярном углублении. А-В – взрослое животное, Г- Е – старое животное. А, Г – $\alpha 1$ -танициты, Б, Д – $\alpha 2$ -танициты, В, Е – $\beta 2$ -танициты. Стрелка – Сх43-иммуноположительные гранулы в таницитах, головка стрелки- Сх43⁺ звездчатые клетки срединного возвышения. Звездочка – полость желудочка.

Результаты подглав 4.1 и 4.2 опубликованы в статье: 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. (Переводная версия статья: Sufieva, D.A. Astrocyte Markers in the Tanycytes of the Third Brain Ventricle in Postnatal Development and Aging in Rats / D.A. Sufieva, O.V. Kirik, D.E. Korzhevskii // Russ J Dev Biol.– 2019.– V. 50.– P. 146–153).

4.3. Проллиферативный потенциал таницитов в ходе раннего развития и при старении.

4.3.1. Распределение пролиферативных маркеров в различных типах таницитов. Иммуногистохимическая реакция на H3-S10ph.

При иммуногистохимическом исследовании пролиферативного маркера H3-S10ph (маркер митотически делящихся клеток) было установлено, что данный белок в выстилке дна третьего желудочка выявляется в ядрах единичных клеток всех субпопуляций таницитов и только в первую неделю постнатального развития (рис. 35). Отдельные H3-S10ph иммуноположительные клетки встречаются в области срединного возвышения. На более поздних этапах постнатального развития данный маркер в таницитах не идентифицировался.

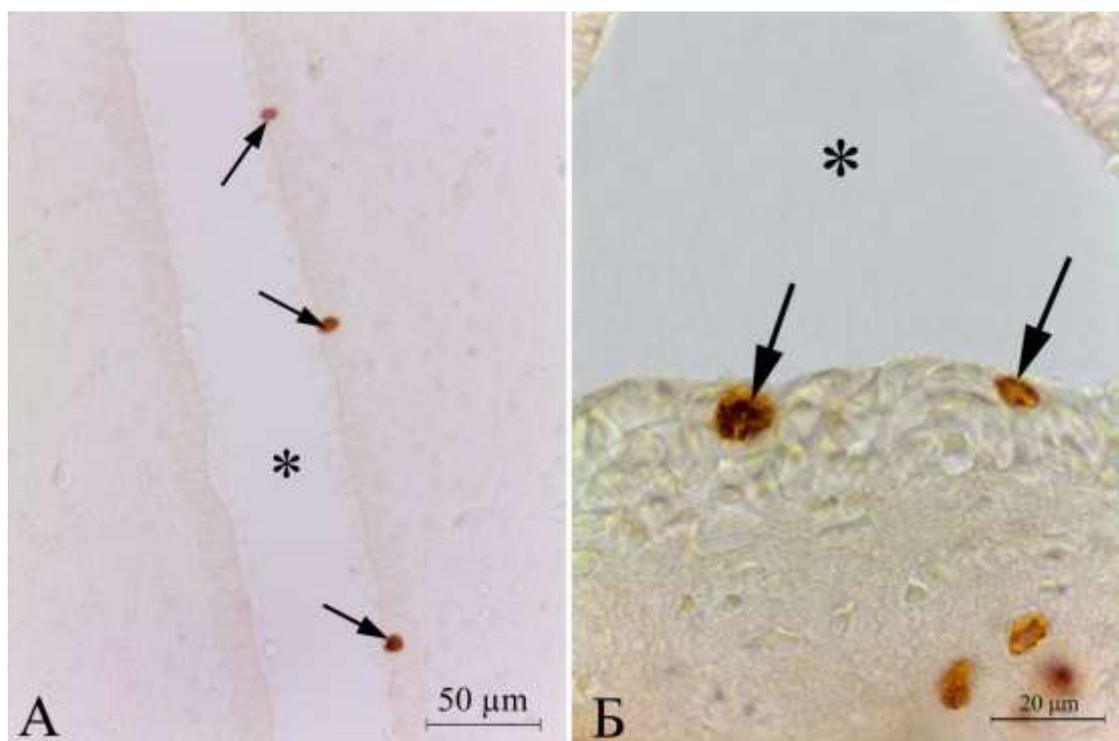


Рисунок 35. H3-S10ph в таницитах молодых животных. 7 сутки постнатального развития. А – область α 1-таницитов, Б – β 2-танициты. Стрелки указывают на H3-S10ph-иммуноположительные танициты. Звездочка - полость желудочка.

Иммуногистохимическая реакция на PCNA. Исследование пролиферативного маркера PCNA (данный маркер присутствует во всех фазах клеточного цикла, но его пик приходится на S-фазу) показало, что в первую неделю постнатального онтогенеза в выстилке инфундибулярного углубления этот белок выявляется, главным образом, в α 1-таницитах (рис. 36А). Единичные иммунопозитивные клетки идентифицируются в α 2- и β -таницитах. Реакция высокоинтенсивная, либо умеренная и выявляется в ядрах клеток (рис. 36Б). Также отдельные иммунопозитивные клетки наблюдаются в подлежащей нервной ткани. Начиная с 14 суток постнатального развития, у 30-дневных и взрослых животных PCNA присутствует в α 1-

таницитах и единичных $\alpha 2$ -таницитах, которые могут располагаться либо одиночно, либо группами (рис. 37А). В подлежащей нервной ткани встречаются отдельные PCNA+ клетки, но их число меньше по сравнению с 7-дневными крысятами. У старых крыс PCNA наблюдается в $\alpha 1$ -таницитах. В некоторых клетках реакция носит интенсивный или умеренный характер, однако в большинстве клеток реакция слабая или отсутствует (рис. 37Б). В единичных случаях встречаются PCNA-иммунопозитивные $\alpha 2$ -танициты. В нервной ткани в ядрах отдельных клеток наблюдается положительная реакция на изучаемый маркер.

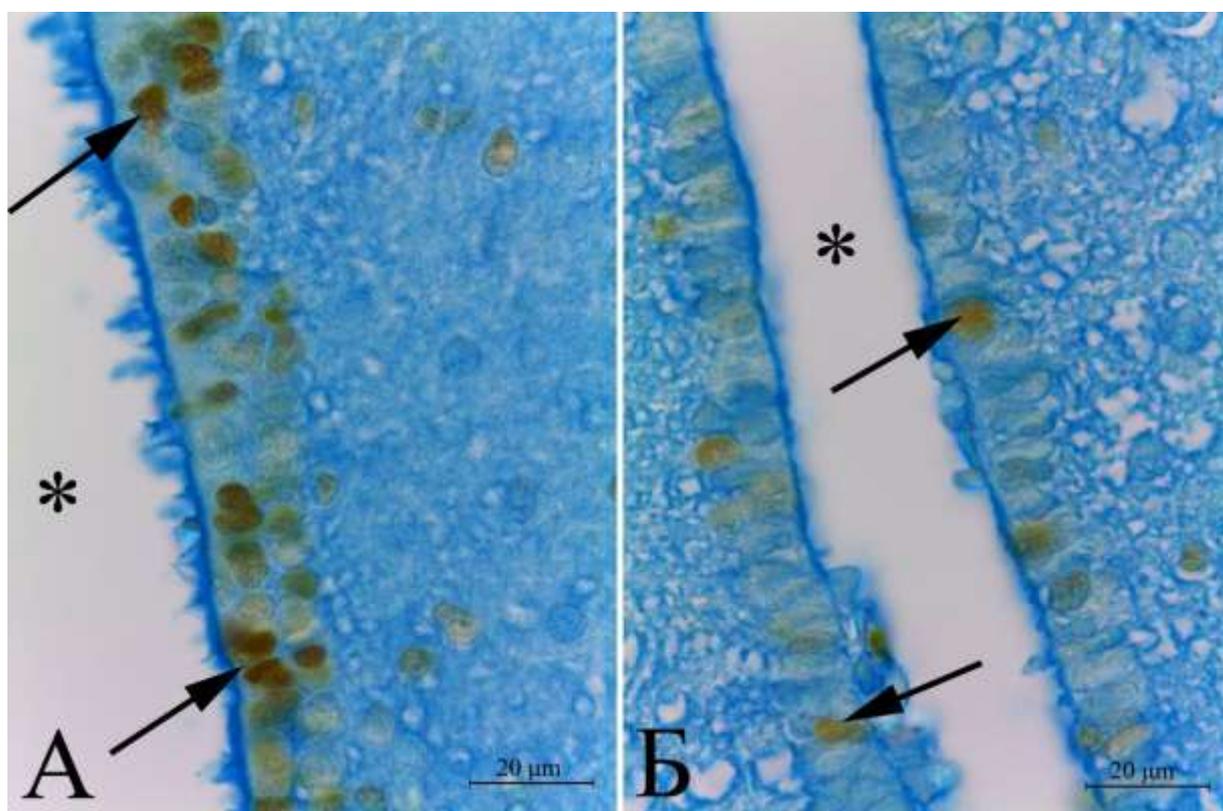


Рисунок 36. Распределение PCNA в выстилке дна третьего желудочка. 7 сутки постнатального развития. А – область $\alpha 1$ -таницитов, Б – область $\alpha 2$ -таницитов. Стрелка указывает на PCNA-иммуноположительные клетки. Звездочка — полость третьего желудочка.

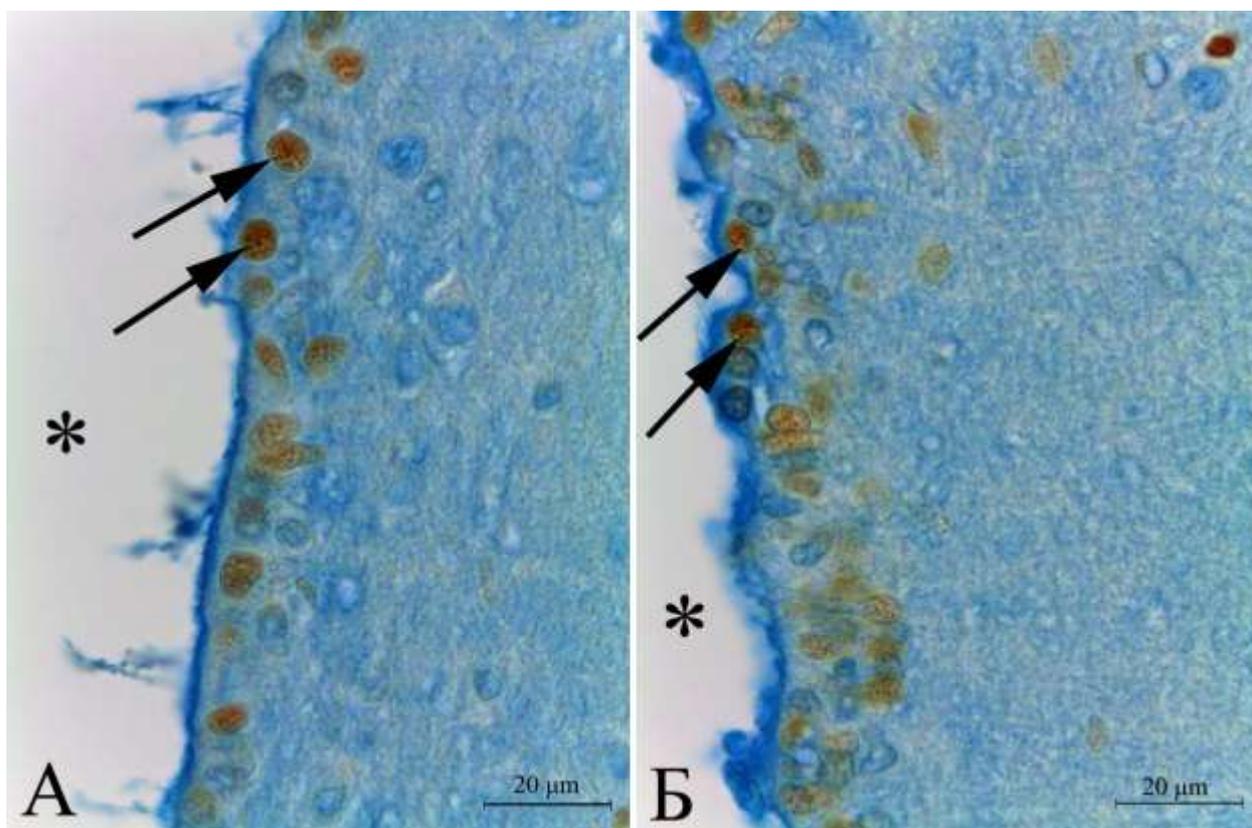


Рисунок 37. Распределение PCNA в выстилке дна третьего желудочка. Область $\alpha 1$ -таницитов. А - взрослое животное, Б – старое животное. Стрелка указывает на PCNA-иммуноположительные клетки. Звездочка — полость третьего желудочка.

4.3.2. Распределение маркеров нейральных стволовых клеток (НСК) в выстилке инфундибулярного углубления в постнатальном развитии и при старении.

Иммуногистохимическая реакция на Sox2. Иммуногистохимическое исследование Sox2 показало, что данный маркер НСК 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 (рис. 38А, Г). У взрослых и старых животных интенсивная реакция сохраняется в $\alpha 1$ -таницитах, в то время как в остальных типах таницитов наблюдается умеренная реакция (рис. 38Б, В, Д, Е). В подлежащей нервной ткани положительно окрашиваются ядра отдельных клеток.

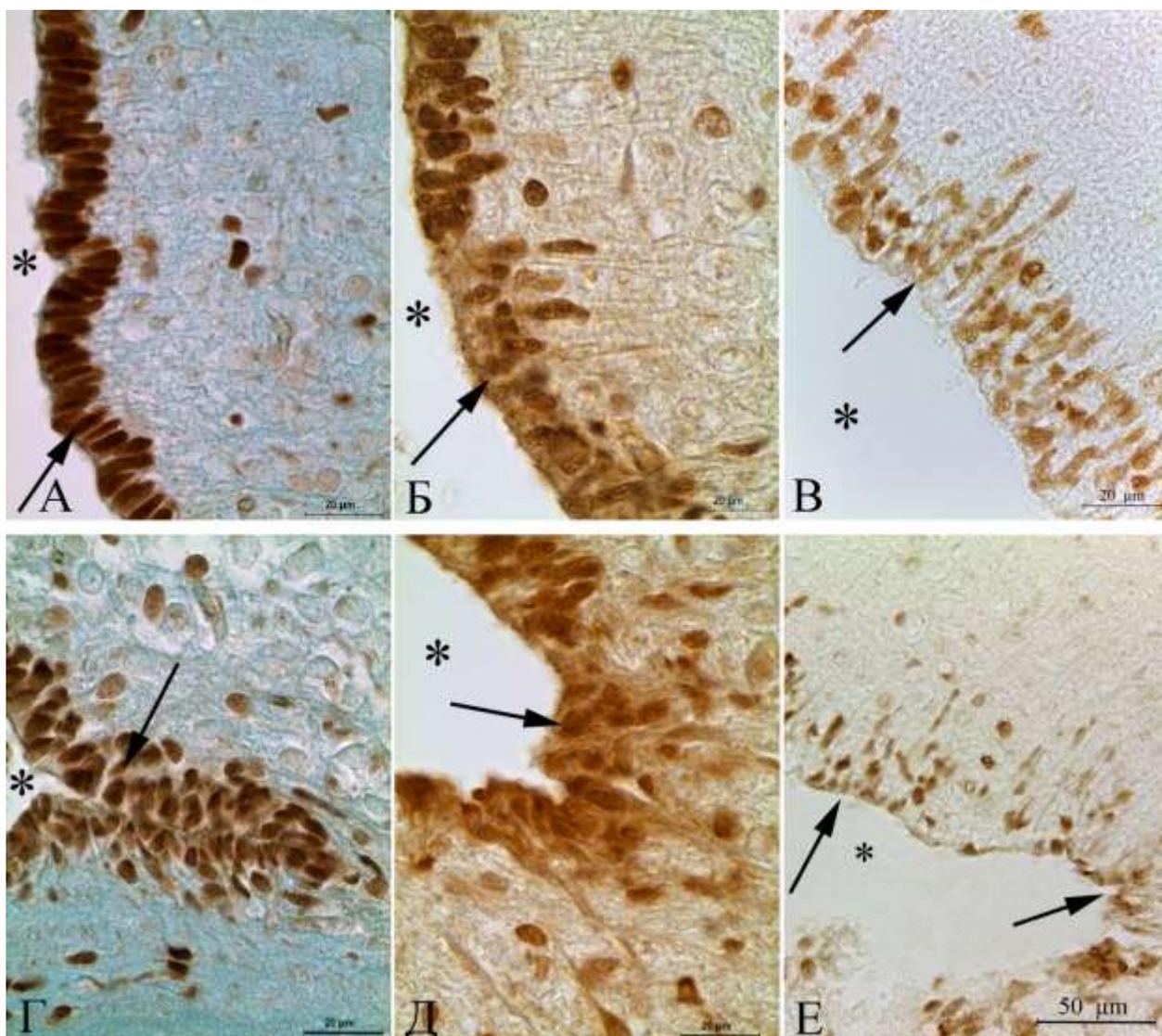


Рисунок 38. Распределение Sox2 в субпопуляциях таницитов в ходе постнатального развития. А, Г – 14 сутки постнатального развития, Б, Д – взрослое животное, В, Е – старое животное. А-В – α -танициты; Г-Е – β 1-танициты. Стрелка указывает на Sox2+ ядра таницитов. Звездочкой отмечена полость желудочка.

Иммуногистохимическая реакция на Musashi-1. Анализ препаратов после постановки ИГХ-реакции к Musashi-1 выявил, что в первые две недели постнатального развития данный маркер присутствует во всех типах таницитов. Продукт реакции локализуется в телах и проксимальных участках отростков (рис. 39А, Б). К концу первого месяца постнатального онтогенеза иммунореактивность к данному белку в β -таницитах уменьшается (рис. 39В, Г), у взрослых, и старых животных Musashi-1-иммунопозитивными остаются лишь α -танициты. При этом интенсивность реакции в α 1-таницитах значительно выше, чем в α 2-таницитах (рис. 40).

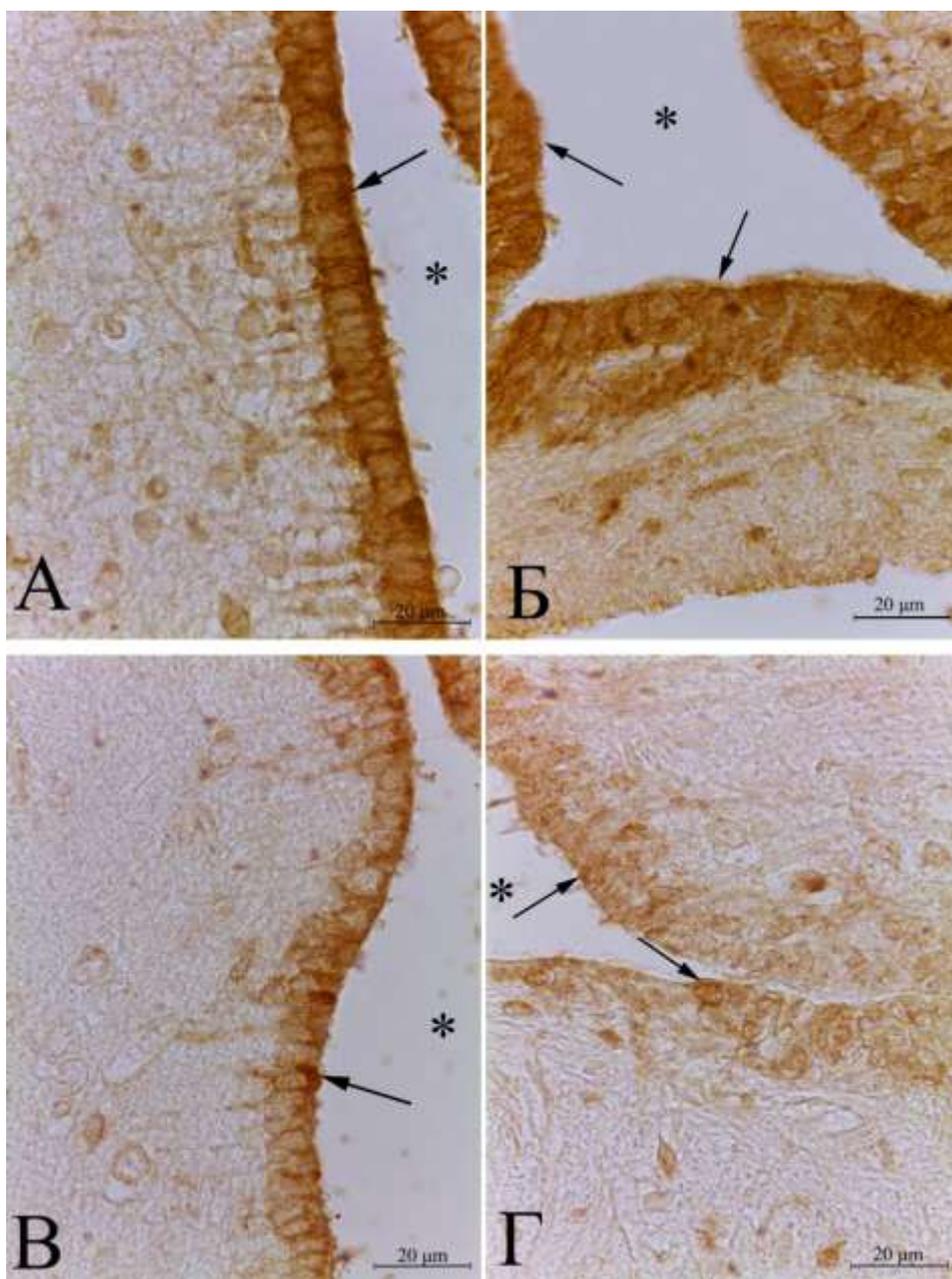


Рисунок 39. Распределение маркера НСК Musashi-1 в выстилке инфундибулярного углубления у молодых крыс. А, Б – 7 сутки постнатального развития. В, Г – 30 сутки постнатального развития. А, В – $\alpha 1$ -танициты, Б, Г – β -танициты. Стрелка указывает на танициты, звездочка – полость желудочка.

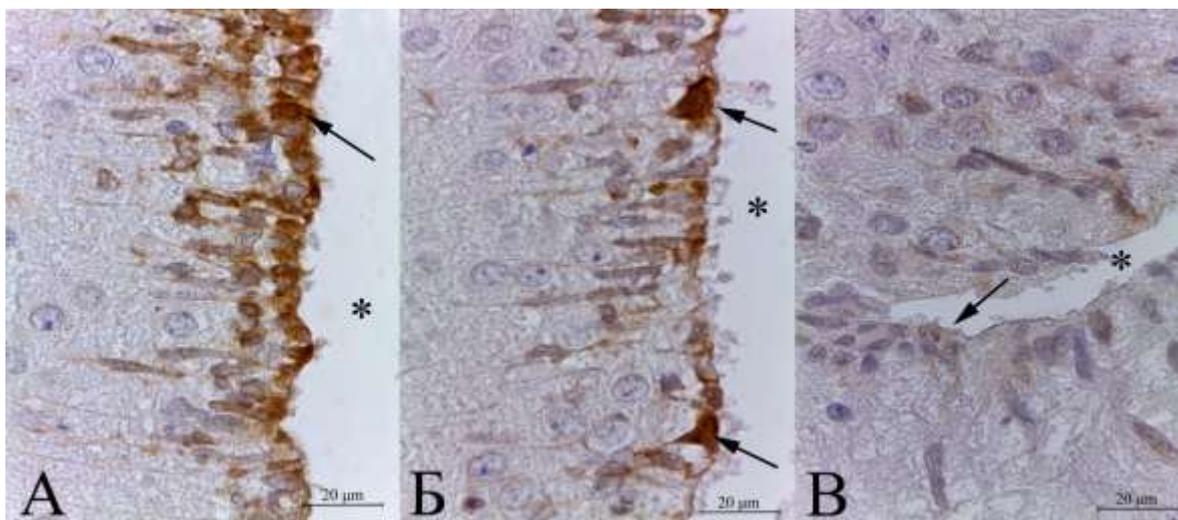


Рисунок 40. Распределение маркера НСК Musashi-1 в выстилке инфундибулярного углубления у старых крыс. А - $\alpha 1$ -танициты, Б – $\alpha 2$ -танициты, В – $\beta 1$ -танициты. Стрелка указывает на танициты, звездочка – полость желудочка.

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

4.4.1. Организация ядрышкового аппарата таницитов.

При постановке двойной ИГХ-реакции на виментин и нуклеолин было установлено, что у молодых и взрослых животных для $\alpha 1$ -таницитов характерно присутствие от 1 до 4 ядрышек. В основном наблюдалось 1-3 ядрышка (97% случаев) и лишь в единичных клетках встречалось 4 ядрышка (3% случаев). У старых животных, как правило, число ядрышек составляло 1-2, редко 3. В $\alpha 2$ -таницитах у 7- и 14-дневных крысят число ядрышек составляло 1-3, в то время как начиная с первого месяца постнатального развития для этих клеток характерно присутствие 1-2 ядрышек. Для старых животных в подавляющем большинстве случаев было характерно наличие 1 ядрышка. Для $\beta 1$ - и $\beta 2$ -таницитов типично наличие 1-2 ядрышек (таблица 5, рис. 41). Ядрышки таницитов в подавляющем большинстве случаев локализовались на периферии ядра, часто контактируя с ядерной оболочкой.

При измерении диаметра наибольшего из ядрышек было установлено, что диаметр ядрышек изменяется с возрастом. Для всех типов таницитов характерно увеличение размеров этой субъядерной структуры в раннем постнатальном развитии. Максимальный размер ядрышка наблюдается у взрослых животных, в то время как при старении средний диаметр наибольшего ядрышка уменьшается (таблица 5, рис. 42).

Таблица 5. Морфофункциональные характеристики ядрышек различных популяций таницитов в ходе постнатального онтогенеза и при старении.

Субпопуляция таницитов		$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\beta 1$	$\beta 2$
Количество ядрышек	P7	1-3 (редко 4)	1-3	1-2 (редко 3)	1-2
	P14	1-3	1-3	1-2	1-2 (редко 3)
	P30	1-3 (редко 4)	1-2	1-2	1-2 (редко 3)
	4-5 мес	1-3 (редко 4)	1-2 (редко 3)	1-2	1 (редко 2)
	20-23 мес	1-2 (редко 3)	1 (редко 2)	1 (редко 2)	1 (редко 2)
Среднее значение диаметра наибольшего ядрышка, мкм	P7	1,42±0,05	1,38±0,05	1,46±0,07	1,19±0,04
	P14	1,16±0,05	1,3±0,07	1,63±0,1	1,37±0,09
	P30	1,51±0,05	1,58±0,04	1,77±0,12	1,43±0,07
	4-5 мес	1,7 ±0,05	2,2± 0,05	2,4 ± 0,07	2,2 ± 0,1
	20-23 мес	1,67±0,16	1,96±0,09	1,94±0,11	1,98±0,31

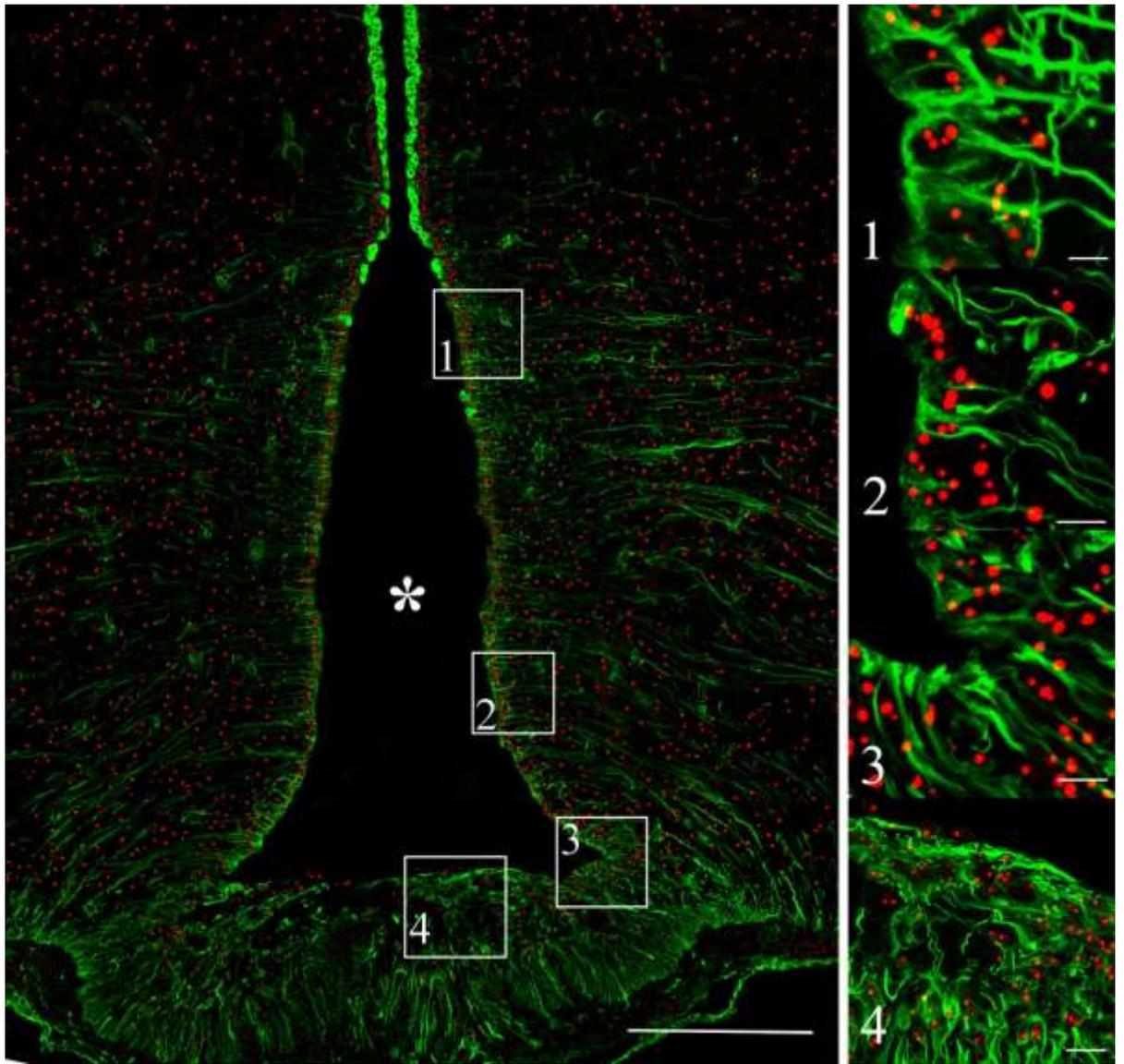


Рисунок 41. Ядрышки различных субпопуляций таницитов. Взрослое животное. Двойная иммуногистохимическая реакция на виментин (зеленый) и нуклеолин (красный). Одиночный оптический срез. Масштабный отрезок равен 200 мкм. Увеличенные фрагменты: 1 – α 1-танициты; 2 – α 2-танициты; 3 – β 1-танициты; 4 – β 2-танициты. Проекция 16 (1 фрагмент), 26 (2 фрагмент), 21 (3 фрагмент) и 36 (4 фрагмент) оптических стеков. Объектив С-Арочromat 63x/1.20 W Konig M27. Водная иммерсия. Масштабный отрезок равен 5 мкм (1 фрагмент), 10 мкм (2 и 3 фрагменты) и 20 мкм (4 фрагмент). Звездочка – полость третьего желудочка.

Диаметр наибольшего ядрышка также варьирует среди разных типов таницитов в пределах одной возрастной группы. Так, у 14-дневных крысят статистически достоверно различались размеры ядрышки у α 1- и β 1-таницитов ($p=0,0071$). У 30-дневных крысят диаметр ядрышек α 1- и α 2-таницитов статистически различался при сравнении с диаметром ядрышек β 1-таницитов ($p<0,0001$ для обоих типов таницитов), а также различались размеры ядрышек β 1 и β 2 таницитов ($p=0,0006$). У взрослых и старых крыс разница наблюдалась между размерами ядрышек α 1-таницитов с другими типами таницитов (α 2, β 1 и β 2) ($p<0,0001$ для всех групп

сравнения, за исключением $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -таницитов у старых животных, здесь $p = 0.0003$). У 7-дневных крысят статистически значимой разницы между размерами ядрышек не наблюдалось. Данные по количеству ядрышек и их размеру на разных этапах постнатального онтогенеза представлены в таблице 1, статистическая разница между группами отражена на рисунке 42.

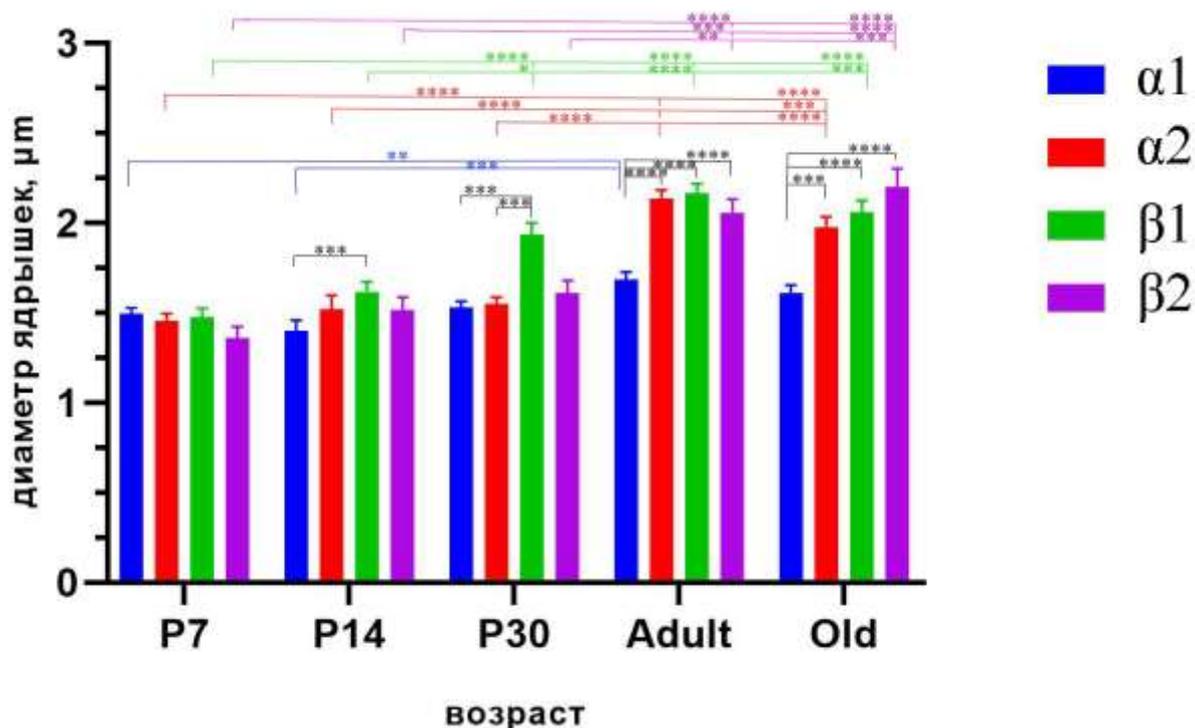


Рисунок 42. Возрастная динамика в размерах ядрышка различных субпопуляций таницитов. Столбчатая диаграмма. Черная линия показывает статистически значимую разницу между разными типами таницитов в пределах одного возраста. Цветные линии показывают статистически значимую разницу в диаметре ядрышек в каждой из популяций таницитов (в соответствии с легендой) между разными возрастными группами. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ по критерию Данна.

Для изучения структурно-функциональной организации ядрышка была поставлена двойная ИГХ-реакция к основным аргентофильным белкам ядрышка, которые определяют окраску ядрышка при использовании метода серебрения (метод Ag-NOR) – нуклеолину (белок С23) и нуклеофосмину (белок В23). Было установлено, что характер распределения этих двух белков в ядре и ядрышке отличается. Нуклеолин, как правило, распределён в форме тора, или двояковогнутого диска, в то время как центральная часть ядрышка либо не окрашивается, либо окрашивается, но очень слабо (рис. 43, 45). Также во всех типах таницитов белок С23 присутствует в виде отдельных скоплений в нуклеоплазме (рис. 43).

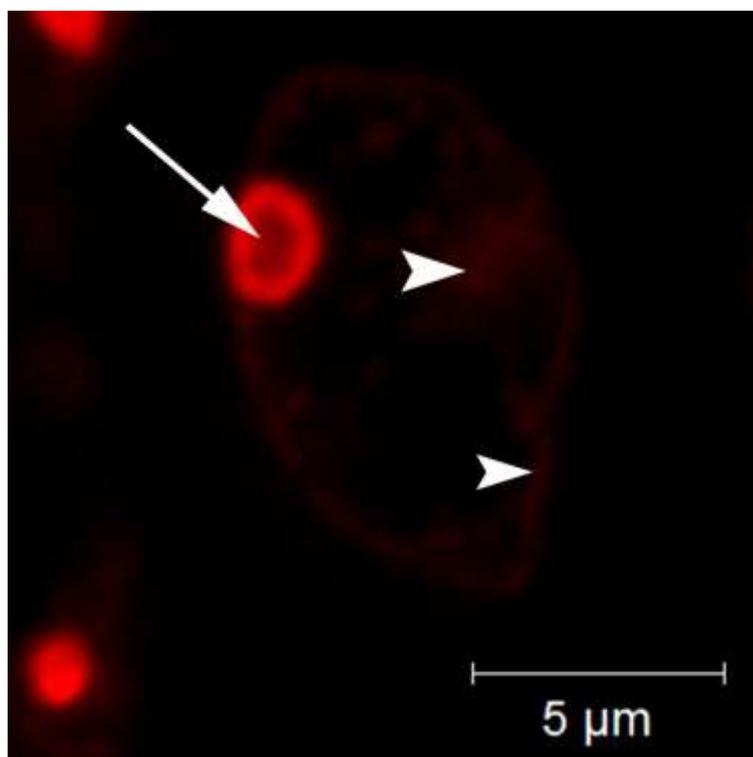


Рисунок 43. Распределение нуклеолина в ядрах таницитов. Область $\alpha 1$ -таницитов. Иммуногистохимическая реакция к нуклеолину. Конфокальная лазерная микроскопия. Одиночный оптический срез. Стрелка указывает на ядрышко. Головка стрелки – скопления нуклеолина в нуклеоплазме.

Нуклеофосмин локализуется только в ядрышках таницитов. Кроме того, характер распределения нуклеофосмина в этих субъядерных структурах сильно отличается между разными ядрышками даже в пределах одной клетки. Как правило, белок B23 распределен в виде кольца по периферии ядрышка (рис. 44А). Реже этот белок может локализоваться в пределах ядрышка в виде двояковогнутого диска (рис. 44Б), подковы (рис. 44В), отдельных глобул (рис. 44Г), а также распределяться в виде структуры округлой формы с поверхностной бороздой (рис. 44Д, Е). При старении характер распределения не меняется, однако центральная часть ядрышка становится более выраженной, где нуклеолин и нуклеофосмин практически не присутствуют (рис. 44А). Также стоит отметить, что пик интенсивности флуоресценции этих белков не совпадает: пик интенсивности флуоресценции нуклеолина располагается ближе к центру, по сравнению с нуклеофосмином, который тяготеет к периферии ядрышка (рис. 45).

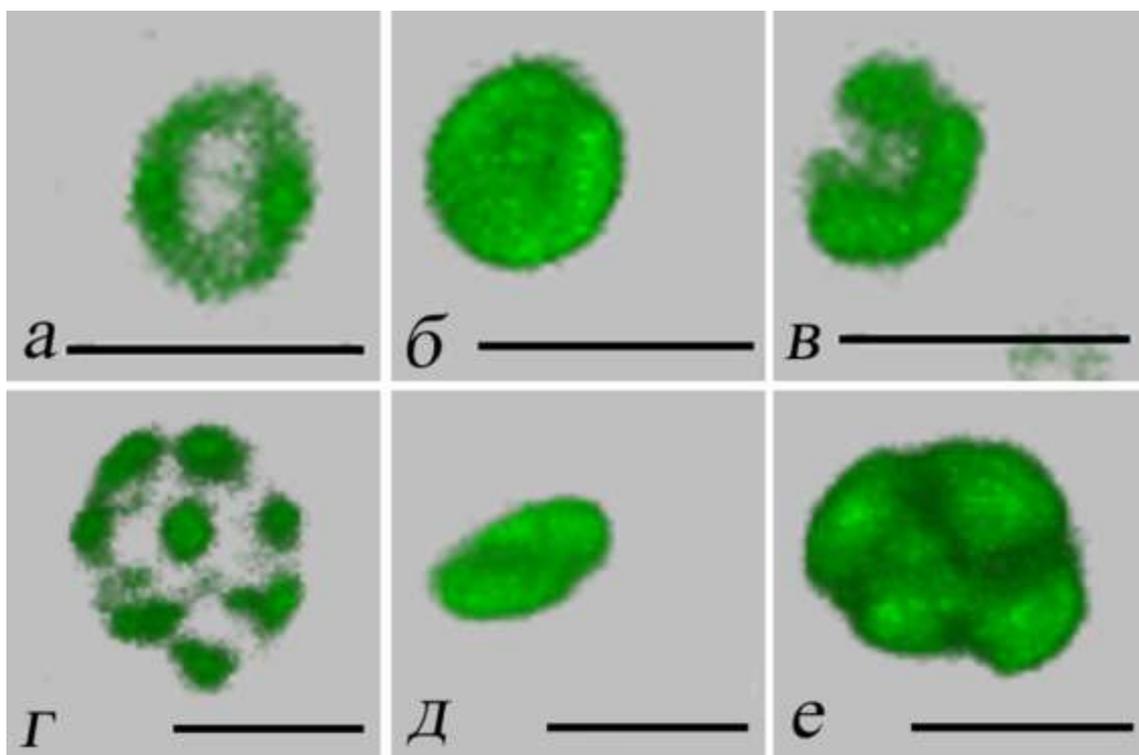


Рисунок 44. Распределение нуклеофосмина в ядрышках таницитов. Конфокальная лазерная микроскопия. Трехмерная реконструкция. А, Б, В – α 1-танициты, старые животные; Г, Е – β 1-танициты, старые животные; Д – α 1-танициты, 7 суток постнатального развития. Масштабный отрезок равен 2 мкм.

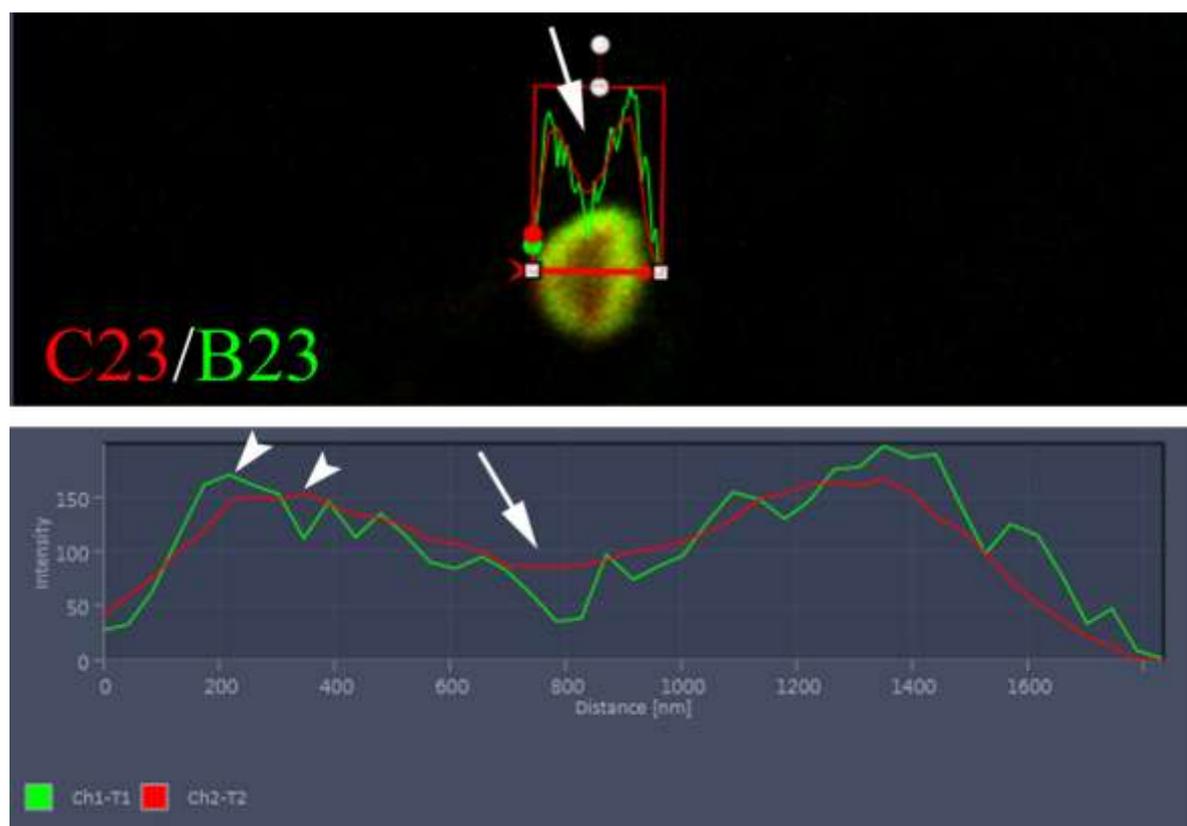


Рисунок 45. Профиль интенсивности флуоресценции аргентофильных белков в ядрышке таницитов. Двойная иммуногистохимическая реакция на нуклеолин (красный цвет) и

нуклеофосмин (*зеленый цвет*). Старое животное (20-24 месяца). Конфокальная лазерная микроскопия. Одиночный оптический срез. Стрелкой отмечена область наименьшей флуоресценции обоих белков. Головка стрелки указывает на пики флуоресценции зеленого и красного каналов.

4.4.2. Организация гетерохроматиновых агрегатов и их ассоциация с ядрышком.

Для изучения распределения конститутивного гетерохроматина в таницитах и его пространственных взаимоотношений с ядрышком была поставлена двойная ИГХ-реакция к H4K20me3 и нуклеофосмину. Конститутивный гетерохроматин в таницитах распределен в виде отдельных скоплений округлой формы, которые преимущественно локализируются по периферии ядра. Однако в центральной области ядра встречаются диффузно распределенные глыбки небольшого размера (рис. 46).

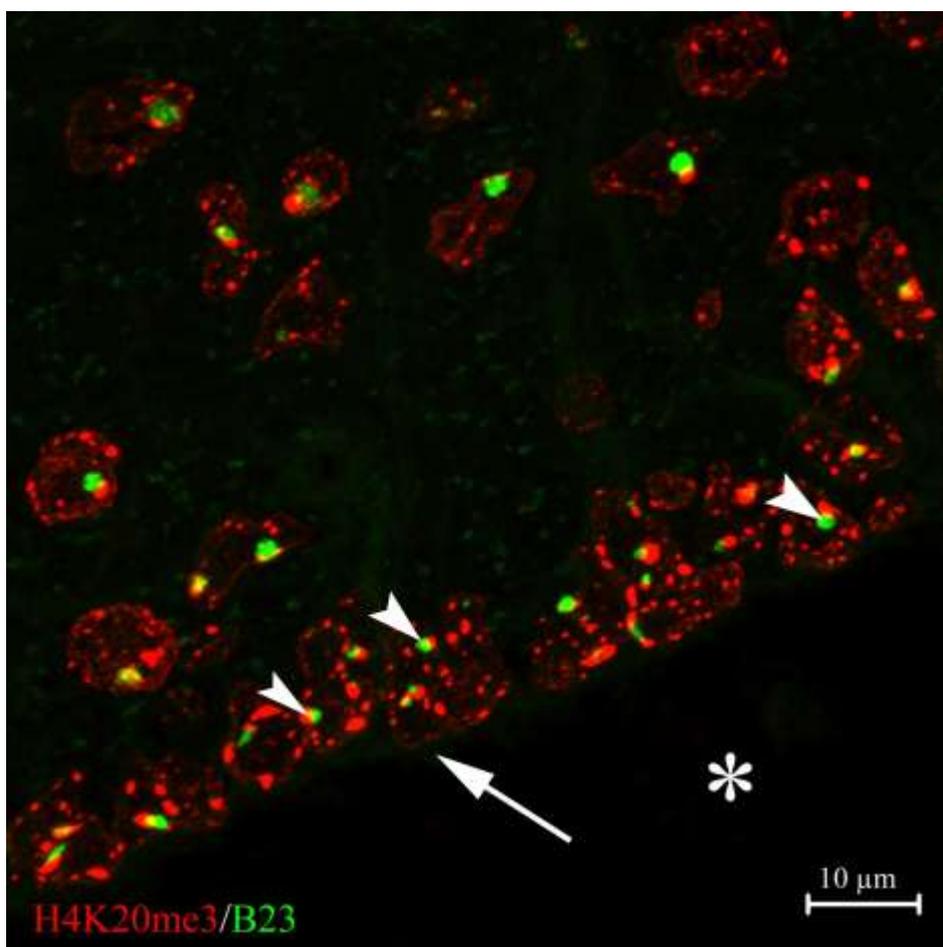


Рисунок 46. Распределение конститутивного гетерохроматина в ядрах таницитов. Область $\alpha 2$ -таницитов. Взрослое животное. Двойная иммуногистохимическая реакция на H4K20me3 (*красный цвет*) и нуклеофосмин (*зеленый цвет*). Конфокальная лазерная микроскопия. Проекция 22 оптических срезов. Стрелка указывает на ядра таницитов, головка стрелки – ядрышки таницитов. Звездочка — полость третьего желудочка.

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 формировать сплошной периферический гетерохроматиновый слой (рис. 49). Содержание гетерохроматиновых скоплений при старении в $\beta 1$ - и $\beta 2$ -таницитах меняется незначительно.

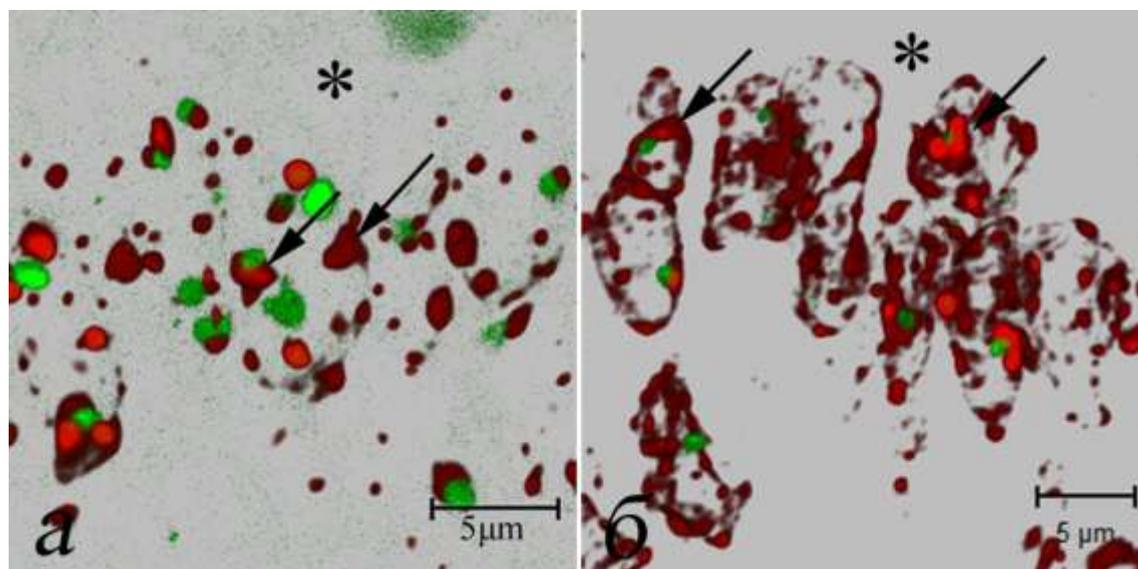


Рисунок 47. Изменение содержания гетерохроматиновых скоплений в $\alpha 1$ -таницитах с возрастом. Двойная иммуногистохимическая реакция на H4K20me3 (красный цвет) и нуклеофосмин (зеленый цвет). Трехмерная реконструкция 28 (а) и 29 (б) оптических срезов (режим Transparent). Объектив alpha Plan-Apochromat 100x/1.46 Oil DIC M27 (масляная иммерсия). а – 7 сутки постнатального развития, б – старое животное (20-24 месяца). Стрелки указывают на гетерохроматиновые скопления, ассоциированные с ядрышком. Звездочка – полость желудочка.

При изучении пространственного расположения гетерохроматиновых агрегатов относительно ядрышек было установлено, что в первую неделю развития и у старых животных в $\alpha 1$ -таницитах почти все ядрышки погружены в гетерохроматин и окружены им со всех сторон (рис. 47А, Б). В $\alpha 2$ - , $\beta 1$ - и $\beta 2$ -таницитах в первую неделю развития, а также во всех типах таницитов на более поздних сроках развития наблюдается наличие околядрышкового гетерохроматина, который примыкает к ядрышку с одной из сторон в виде небольшой глобулы (рис. 47, 48А). В области примыкания гетерохроматина к ядрышку в подавляющем большинстве случаев формируется зона перекрывания (колокализации) нуклеофосмина и H4K20me3. Как правило, это зона небольшая и находится на границе соприкосновения этих двух белков (рис. 49). В единичных случаях встречается околядрышковый гетерохроматин, который формирует впячивание вглубь ядрышка (рис. 48Б).

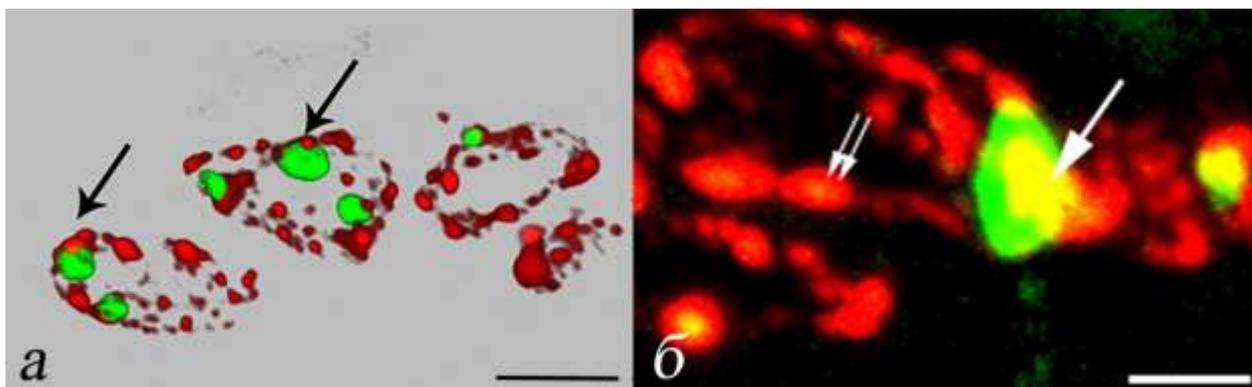


Рисунок 48. Околоядрышковый гетерохроматин в $\beta 2$ -таницитах. Двойная иммуногистохимическая реакция на H4K20me3 (красный цвет) и нуклеофосмин (зеленый цвет). Трехмерная реконструкция 24 оптических срезов (*a*- режим Transparent; *б* - модуль Maximum). *a* - Стрелки указывают на околоядрышковый гетерохроматин. Масштабный отрезок равен 5 мкм. *б* – Стрелкой отмечен околоядрышковый гетерохроматин, формирующий впячивание вглубь ядрышка. Двойной стрелкой отмечены гетерохроматиновые скопления на периферии ядра таницитов. Масштабный отрезок равен 2 мкм.

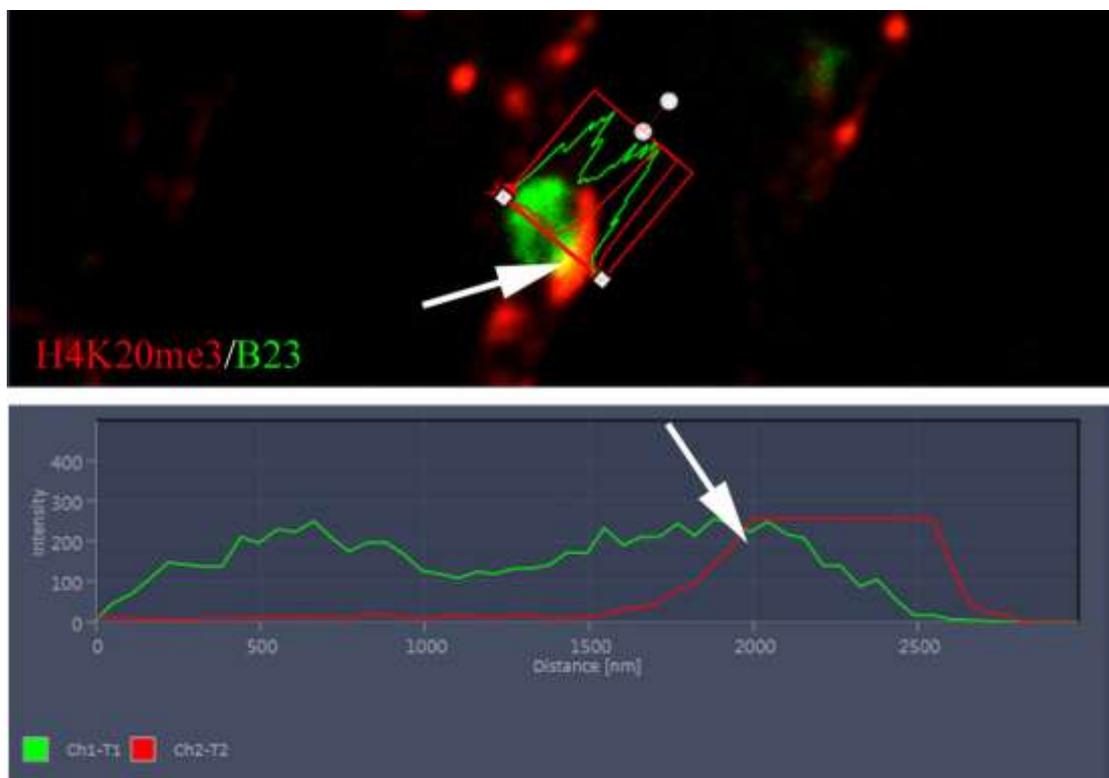


Рисунок 49. Профиль интенсивности флуоресценции H4K20me3 (красный цвет) и нуклеофосмина (зеленый цвет) в ядрышке таницитов. Старое животное (20-24 месяца). Конфокальная лазерная микроскопия. Одиночный оптический срез. Стрелкой отмечена область колокализации (желтый цвет).

Результаты данной главы представлены в статьях:

Суфиева, Д.А. Нуклеолин и ядрышки в эпендимоцитах и таницитах третьего желудочка головного мозга крысы / Д.А. Суфиева, О.В. Кирик, Д.Э. Коржевский // Цитология.– 2018.– Т.

60, № 1.– С. 30-36. (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, I. 2.– P. 167-173).

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 (Переводная версия статьи: Sufieva, D.A. Structural Characteristic of Nucleolus and Heterochromatin Aggregates of Rat Brain Tanocytes / D.A. Sufieva, I.M. Pleshakova, D.E. Korzhevskii // Biochem. Moscow Suppl. Ser. A.– 2021.– V. 15.– P. 319–328).

4.5. Пространственные взаимоотношения таницитов и микроглии в инфундибулярном углублении в постнатальном развитии.

Иммуногистохимическое исследование маркера микроглии Iba-1 выявило, что на 7 и 14 сутки постнатального развития микроглиоциты в области дна третьего желудочка характеризуются округлой сомой и короткими, утолщенными отростками, что свидетельствует об их активированном состоянии. Анализ морфологических признаков и пространственных взаимоотношений микроглии с таницитами позволяет выделить несколько типов микроглиоцитов в зависимости от их локализации. Непосредственно под телами клеток, формирующими выстилку, локализуются субэпендимные микроглиоциты (рис. 50А, Б) – веретеновидные, как правило, биполярные клетки, главные отростки которых отходят от разных полюсов клетки и вытянуты вдоль эпендимного пласта. Главные отростки далее по длине могут ветвиться на отростки более мелкого порядка. Некоторые такие отростки могут проникать через эпендимный пласт и контактировать с СМЖ (рис. 50Б). Область перехода выстилки, образованной эпендимоцитами, в выстилку, сформированную $\alpha 1$ -таницитами, характеризуется двурядной структурой, и микроглиоциты в данной области всегда локализуются между эпендимоцитами и $\alpha 1$ -таницитами и морфологически напоминают субэпендимную микроглию (рис. 51Б). На апикальном полюсе клеток выстилки непосредственно в полости третьего желудочка на этих сроках онтогенеза встречаются супраэпендимные макрофаги (рис. 50А, В). Эти клетки имеют округлую или овальную сому и не имеют отростков. Иногда встречаются клетки веретеновидной формы с двумя полярно отходящими отростками (рис. 50В). В подлежащей нервной ткани микроглия на этих сроках развития характеризуется округлой сомой и короткими, утолщенными, слабоветвящимися отростками. Такая морфология свойственна для микроглии в переходном (между амeboидной и рамифицированной формами) состоянии. В срединном возвышении локализуются амeboидные

микроглиоциты – клетки с округлой сомой и короткими неветвящимися отростками, либо без отростков. В области фенестрированных капилляров выявляются микроглиоциты с округлой сомой, которые находятся в тесном контакте с кровеносными сосудами.

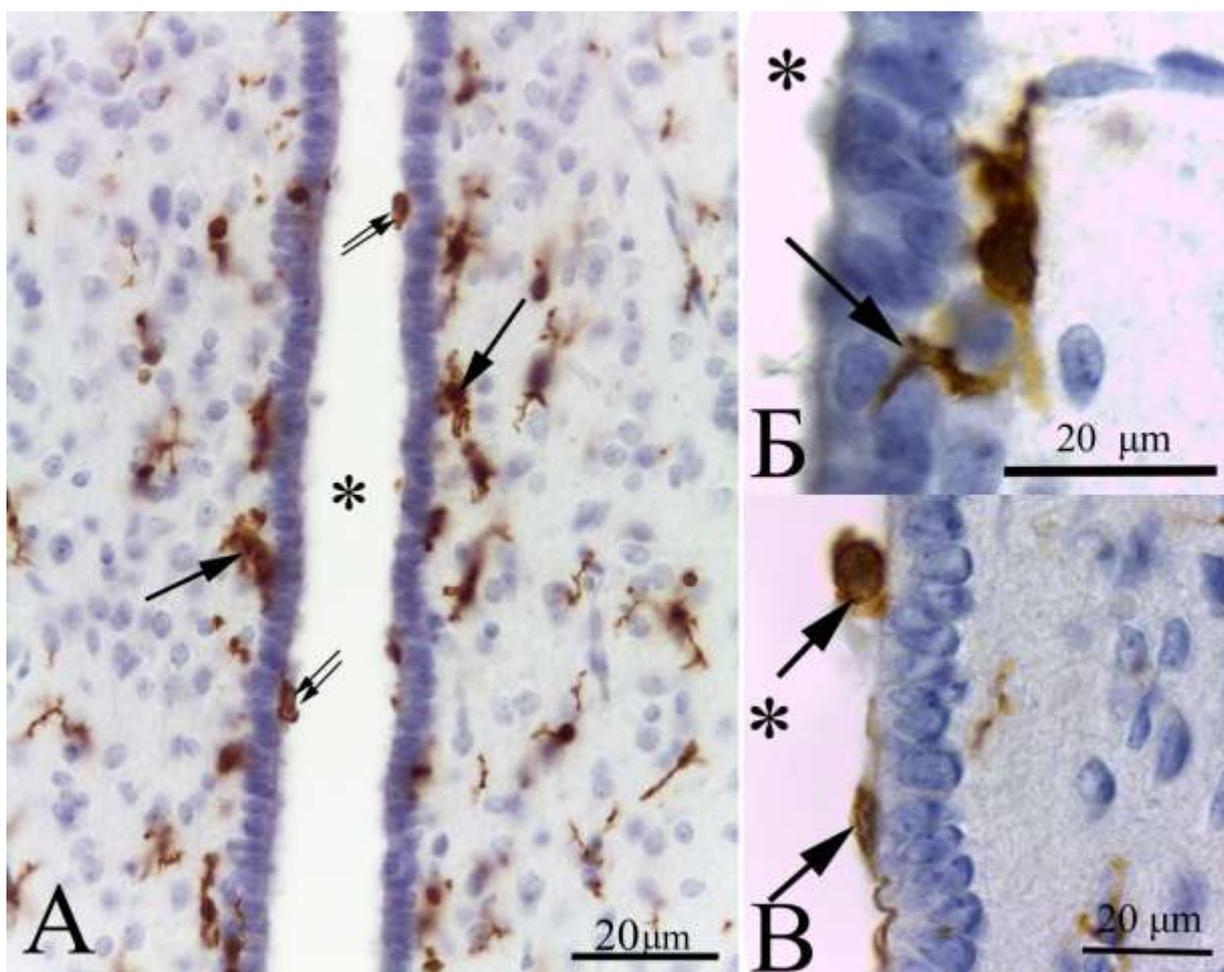


Рисунок 50. Микроглия в инфундибулярном углублении молодых крыс. А, Б – 7 сутки постнатального развития, В – 14 сутки постнатального развития. Иммуногистохимическая реакция на Iba-1, подкраска ядер квасцовым гематоксилином. А – различные типы микроглии в области $\alpha 1$ -таницитов, стрелка указывает на субэпендимные микроглиоциты, двойная стрелка – супраэпендимные микроглиоциты. Б – субэпендимный микроглиоцит, стрелка указывает на отросток, проникающий через эпендимный пласт. В – супраэпендимные макрофаги (указано стрелкой). Звездочка – полость желудочка.

У одномесячных крысят микроглия в нервной ткани представлена рамифицированной формой. Эти клетки имеют небольшую сому округлой или овальной формы и длинные, тонкие, разветвленные отростки. Однако встречаются отдельные клетки переходной формы (рис. 51А). Для этого срока развития характерно присутствие субэпендимной микроглии, но их количество значительно меньше по сравнению с более ранними сроками развития (рис. 51Б). Встречались единичные супраэпендимные макрофаги (рис. 51А). В срединном возвышении микроглия характеризовалась амебоидным, реже - переходным типом (рис. 51В). Кроме того, отчетливо

идентифицировался еще один тип микроглии – типичные периваскулярные микроглиоциты, которые локализуются вдоль фенестрированных капилляров *zona externa* срединного возвышения. Эти клетки небольшого размера, вытянутые вдоль базальной мембраны кровеносного сосуда, и, как правило, не имеют отростков (рис. 51B).

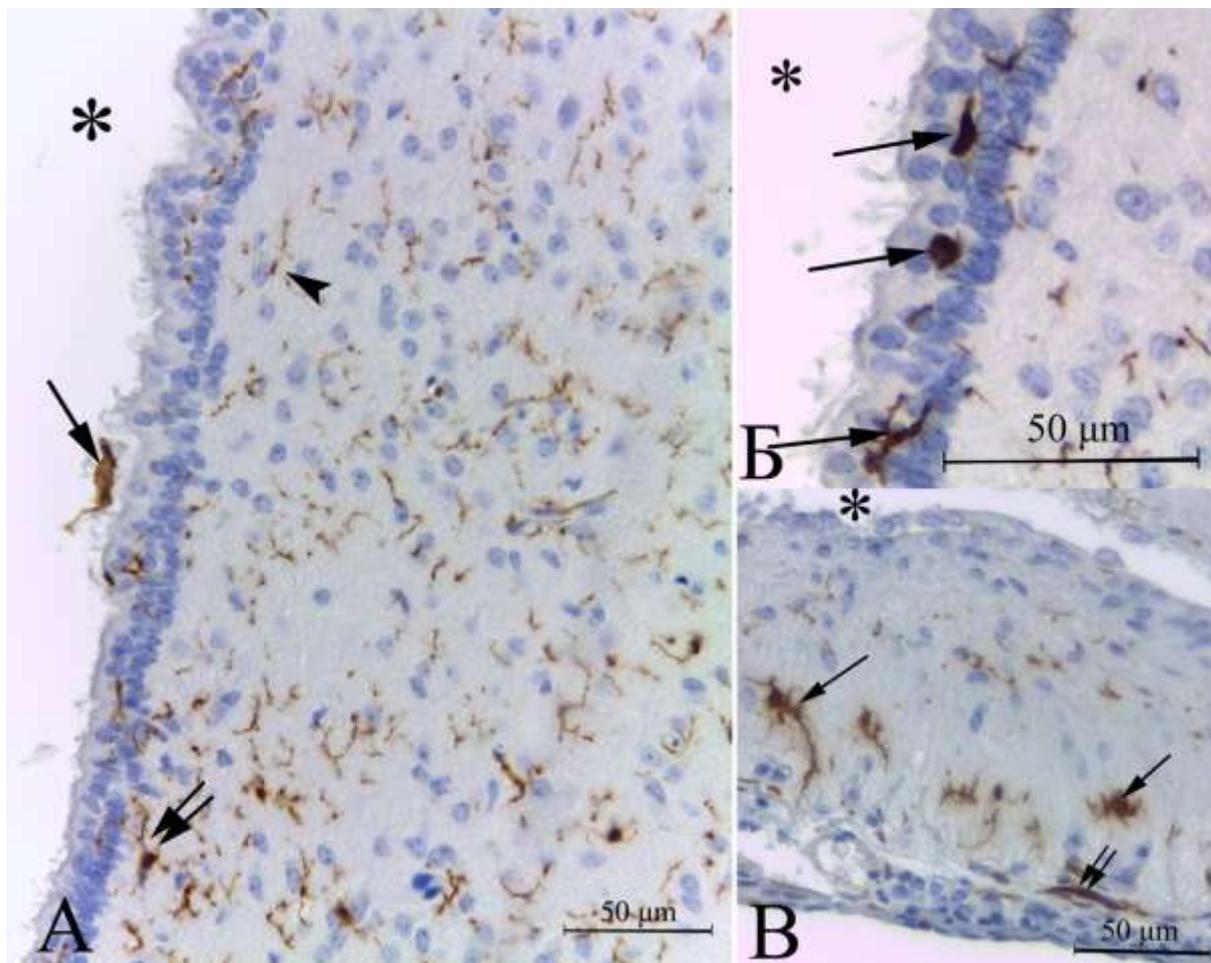


Рисунок 51. Различные типы микроглии в выстилке дна третьего желудочка. 30 сутки постнатального развития. А – область α -таницитов; стрелка указывает на супраэпендимный макрофаг, двойная стрелка – микроглия переходной формы, головка стрелки – рамифицированная микроглия. Б – зона перехода выстилки, образованной эпендимоцитами, в выстилку, сформированную таницитами; стрелка указывает на субэпендимную микроглию. В – срединное возвышение, стрелка указывает на активные формы микроглии, двойная стрелка – периваскулярный микроглиоцит. Звездочка – полость третьего желудочка.

Для половозрелых животных характерна рамифицированная микроглия, которая диффузно распределена по нервной ткани (рис. 52А). Встречались единичные субэпендимные микроглиоциты (рис. 53). Супраэпендимные макрофаги не обнаружили. В срединном возвышении микроглия представлена активированными формами – амебоидной и переходной. В *zona externa* было отмечено присутствие периваскулярных микроглиоцитов (рис. 52В).

У старых животных в нервной ткани инфундибулярного углубления наблюдалась активированная микроглия – амебоидного и переходного типов (рис. 52Б). Были идентифицированы все типы микроглии, характерные для молодых животных – субэпендимная микроглия и супраэпендимные макрофаги. В срединном возвышении наблюдалась амебоидная и периваскулярная микроглия, при этом переходные формы практически отсутствовали (рис. 52Г).

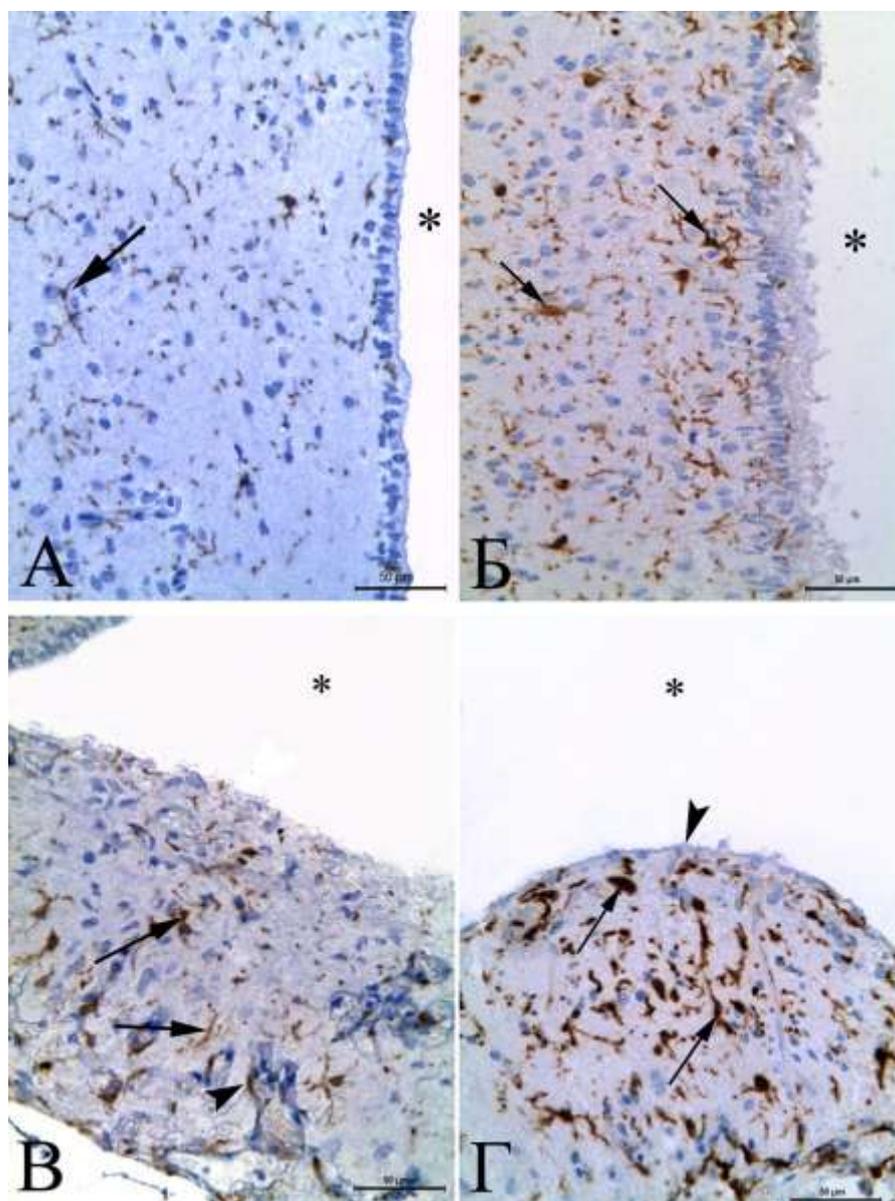


Рисунок 52. Микроглия в выстилке дна третьего желудочка. А, Б – взрослое животное, В, Г – старое животное. Стрелка указывает на микроглиоциты, головка стрелки – периваскулярные микроглиоциты срединного возвышения. Звездочка – полость желудочка. /

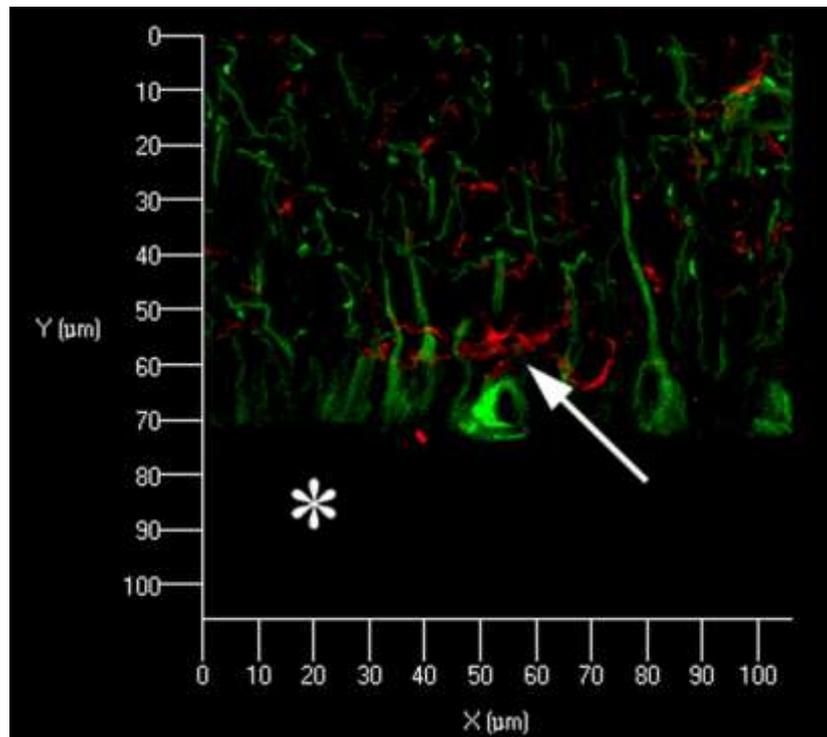


Рисунок 53. Субэпендимный микроглиоцит, трехмерная реконструкция. Взрослое животное. Двойная иммуногистохимическая реакция к Iba-1 (красный цвет) и виментину (зеленый цвет). Конфокальная лазерная микроскопия. Звездочка – полость третьего желудочка.

Было установлено, что количество клеток микроглии изменяется в процессе постнатального онтогенеза и при старении. В ходе раннего развития число клеток растет и достигает своего пика к 14 суткам постнатального развития. Затем число клеток уменьшается и снова растет (почти в 4 раза) у старых крыс (рис. 54). При подсчете количества супраэпендимных макрофагов было выявлено, что их максимальное число приходится на 7 и 14 сутки постнатального развития ($p < 0,05$ при сравнении с 30-дневными животными и $p < 0,01$ при сравнении со взрослыми крысами). Количество субэпендимных микроглиоцитов также варьировала с возрастом. Было установлено, что популяция субэпендимной микроглии максимальна у 7-дневных крысят и у старых животных ($15 \pm 4,2$ и $14,3 \pm 0,3$, соответственно). На других исследованных сроках среднее число субэпендимных микроглиоцитов варьировало в пределах от $5,0 \pm 1,2$ на 14 сутки постнатального развития до $5,8 \pm 2$ у 30-дневных и взрослых животных. Однако при проведении однофакторного дисперсионного анализа статистически значимых различий между исследованными группами выявлено не было.

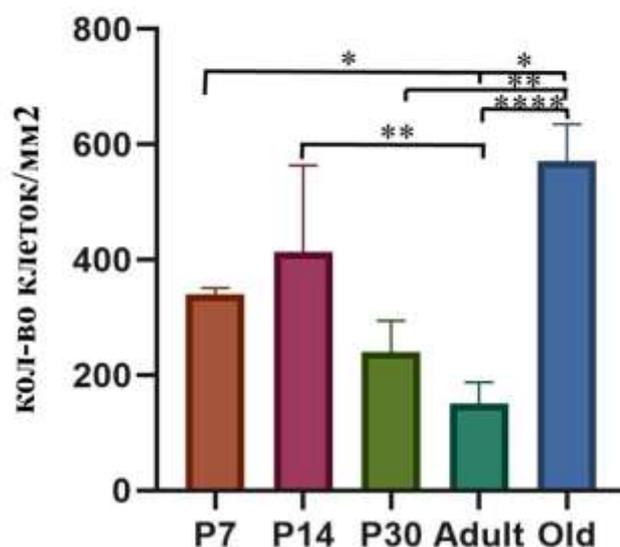


Рисунок 54. Динамика изменения числа микроглиоцитов инфундибулярного углубления в ходе постнатального онтогенеза и при старении. Столбчатая диаграмма. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ по критерию Данна.

Данный материал опубликован в статье: 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. (Переводная версия статьи: Sufieva, D.A. Microglia and Tanocytes 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).

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.

5.1. Дифференцировка таницитов и их отличие от ресничных эпэндицитов.

Танициты стали предметом активного изучения лишь в последние десятилетия. В связи с этим не удивительно, что существует значительный пробел в современных знаниях о том, как формируются эти клетки, когда происходит функциональная дифференцировка разных типов таницитов и какие возрастные изменения они претерпевают. В ходе проведенного исследования нами были охарактеризованы возрастные изменения структурно-функциональной организации всех известных субпопуляций таницитов на протяжении всего постнатального онтогенеза. В результате был определен ряд структурных и цитохимических признаков дифференцировки субпопуляций таницитов в ходе раннего развития, а также описаны изменения, которым подвергаются эти клетки в ходе нормального старения. Было продемонстрировано, что у взрослых животных $\alpha 2$ - и β -танициты формируют пучки отростков в проксимальных отделах. Ранее, Peruzzo и соавт. (2004) на электронно-микроскопическом уровне показали, что у взрослых животных отростки $\beta 1$ - и $\beta 2$ -таницитов формируют пучки отростков. Авторы подчеркнули, что такие пучки формируются с помощью адгезионных контактов и десмосом, которые локализуются вдоль клеточных тел, отростков и терминалей таницитов (Peruzzo et al., 2004). В соответствии с этими данными, при проведении иммуноокрашивания на белок межклеточных контактов β -катенин, нами было обнаружено, что, адгезионные контакты присутствуют вдоль латеральной стенки всех типов таницитов. Интересно, что вдоль отростков (по всей их длине) β -катенин присутствует только в $\alpha 2$ - и β -таницитах (в $\alpha 1$ -таницитах слабая реакция прослеживается лишь в проксимальных отделах). Также в настоящем исследовании впервые было установлено, что в течение первого месяца постнатального развития отростки таницитов претерпевают реорганизацию. В течение первых двух недель отростки таницитов тонкие и идут параллельно друг другу, но, начиная с первого месяца постнатального онтогенеза, в $\alpha 2$ - и β -таницитах можно наблюдать формирование пучков отростков, характерных для взрослых животных. При старении была отмечена дезорганизация отростков таницитов, которая характеризуется следующими признаками: 1) отростки становятся более извилистыми; 2) в α -таницитах происходит сильное разветвление отростков (формирование отростков более мелкого порядка) в проксимальных отделах; 3) $\alpha 2$ - и β -танициты практически не формируют пучков отростков; 4) в проксимальных отделах $\beta 1$ -таницитов наблюдаются варикозоподобные расширения отростков. Ранее, рядом авторов были описаны признаки дезорганизации отростков таницитов при старении. Так, Zoli и соавт. продемонстрировали, что при старении отростки таницитов становятся более извилистыми. Авторы отметили снижение количества таницитов с возрастом (Zoli et al., 1995). В работе Koortman и соавт. (2017), где

изучались танициты у женщин разных возрастных групп, было показано, что при старении в области β -таницитов отростки теряют свою параллельную организацию и часто формируют пересечения. Однако различий в количестве клеток у взрослых и пожилых людей выявлено не было (Koorman, 2017). Yin и соавт. (2009) отметили, что отростки β -таницитов при старении становятся толще и теряют перпендикулярную организацию, а количество терминалей нейроэндокринных клеток (в частности, выделяющих GnRH), оканчивающихся на капиллярах срединного возвышения, уменьшается. Кроме того, дезорганизационные процессы характерны и для перикапиллярного пространства, базальная мембрана которого при старении становится более извилистой и менее четко очерченной. Предполагается, что это влияет на высвобождение нейрого르몬ов в портальную систему гипофиза (Yin et al., 2009; Yin, Gore, 2010). Вероятно, расширение терминалей таницитов, их разветвление, формирование варикозоподобных расширений обусловлены увеличением площади периваскулярного пространства в ходе старения. С этой точки зрения, структурные изменения отростков таницитов могут быть рассмотрены как компенсаторный механизм.

Проведенное нами исследование позволило также показать, что танициты претерпевают и ряд цитохимических изменений в раннем развитии. Было установлено, что в течение первого месяца постнатального развития устанавливается профиль синтеза некоторых белков в таницитах. Так, при изучении белка промежуточных филаментов III типа GFAP было продемонстрировано, что в первую неделю онтогенеза этот белок присутствует лишь в отдельных $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - и $\beta 1$ -таницитах, в то время как к первому месяцу постнатального развития реакция распространяется на все клетки этих субпопуляций таницитов, а также на отростки $\beta 2$ -таницитов. Ранее, на монгольской песчанке (*Meriones unguiculatus*) было показано, что в таницитах в ходе раннего развития среди таницитов увеличивается число GFAP⁺-клеток. Также наблюдается утолщение отростков таницитов. Предполагается, что в таницитах, как и в астроцитах, появление и накопление этого белка связано с уровнем созревания/дифференцировки клетки (Landry et al., 1990). Стоит отметить, что у крыс, для которых *Meriones unguiculatus* являются близкородственным видом, распределение GFAP в популяциях таницитов характеризуется рядом особенностей. Так, у песчанок GFAP⁺-клетками являются β -танициты, в то время как в α -таницитах реакция значительно слабее. В настоящем исследовании данные по распределению этого белка промежуточных филаментов у крыс в субпопуляциях таницитов противоположены (GFAP⁺ клетками являются α -танициты), что может говорить о межвидовых различиях у животных, относящихся к одному семейству (Redecker, 1989). У крысы, как было показано в проведенном нами исследовании, в $\alpha 1$ -таницитах GFAP локализуется как в телах, так и в отростках клеток на всех изученных сроках,

в то время как в $\alpha 2$ -таницитах на ранних сроках GFAP наблюдается в телах и отростках, а с 30 суток постнатального развития данный белок локализуется, главным образом, в отростках и ножках $\alpha 2$ -таницитов. В $\beta 1$ -таницитах на 7 сутки развития GFAP выявлялся только в телах клеток. Начиная с первого месяца развития, как и в $\beta 2$ -таницитах, GFAP преимущественно локализуется в отростках и расширенных ножках $\beta 1$ -таницитов. Такое распределение GFAP в субпопуляциях таницитов крысы может быть связано с тем, что танициты характеризуются наличием длинного базального отростка, и преимущественная локализация GFAP в отростках может указывать на необходимость дополнительной механической стабилизации отростков и ножек таницитов. Кроме того, поскольку промежуточные филаменты – это динамичные структуры, можно полагать, что они важны для изменения формы ножек таницитов. При старении, помимо структурных изменений в таницитах, наблюдается значительное усиление синтеза GFAP в этих клетках. Ранее Zoli и соавт. было показано, что количество GFAP у 24-месячных крыс увеличивается в 3 раза по сравнению с половозрелыми животными (Zoli et al., 1995). По-видимому, усиление синтеза GFAP и разветвление отростков таницитов являются компенсаторными реакциями на возрастную деструкцию отростков этих клеток.

Исследование нестина - белка промежуточных филаментов VI типа, который считается маркером нейральных стволовых клеток в ЦНС (Bernal et al., 2018) - показало, что профиль синтеза этого белка меняется в раннем постнатальном онтогенезе. Так, в первую неделю развития этот белок цитоскелета присутствует только в $\alpha 2$ - и β -таницитах, но с 14 суток постнатального развития нестин становится характерным для всех субпопуляций таницитов, и с возрастом наблюдается усиление синтеза этого белка. Нестин также отличается по субклеточной локализации среди различных типов таницитов. Так, в α -таницитах этот белок локализуется в отростках, в то время как в β -таницитах он присутствует не только в отростках, но и в телах этих клеток. Известно, что нестин способствует более легкой сборке и разборке промежуточных филаментов, что ведет к их большей пластичности (Hendrickson et al., 2018). Это предполагает, что в таницитах нестин играет именно структурную роль, образуя гетеродимеры с виментином, и его присутствие или отсутствие в клетке не связано с ее пролиферативной активностью. По-видимому, большее содержание нестина в β -таницитах сопряжено с необходимостью этих клеток ремоделировать отростки для регуляции поступления релизинг-факторов в портальную систему гипофиза. Кроме того, при старении нестин, в отличие от виментина и GFAP, локализуется только в главных отростках и отсутствует в отростках меньшего порядка. Вероятно, в таницитах нестин необходим для механической стабильности именно крупных и длинных отростков этих клеток.

В ходе раннего постнатального развития таницитов наблюдаются изменения в распределении глутаминсинтетазы. Глутаминсинтетаза (GS) – фермент, который участвует в детоксикации аммония путем катализа реакции превращения аммония и глутамата в глутамин, а также задействован в метаболизме гамма-аминомасляной кислоты (Zhou et al., 2020). Этот фермент участвует в поддержании гомеостаза нервной ткани, предохраняя нейроны от эксайтотоксичности (Suarez et al., 2002; Коржевский и др., 2016; Kolos, Korzhevskii, 2018). В мозге GS локализован, главным образом, в астроцитах, но присутствует также в радиальной глии, некоторых эпендимоцитах у низших позвоночных и в олигодендроцитах (Коржевский и др., 2016; Zhou et al., 2020). У крысы на 14 день эмбрионального развития GS начинает синтезироваться клетками нейроэпителлия, а на 16 день – клетками радиальной глии (Suarez et al., 2002). Было показано, что в ходе онтогенеза активность GS постепенно увеличивается, достигая показателя, характерного для взрослого мозга, к 20 суткам постнатального развития. Причем это увеличение связывают не с пролиферацией астроцитов, а с их дифференцировкой (Suarez et al., 2002). При иммуногистохимическом изучении GS в таницитах нами было отмечено, что в первую неделю постнатального развития в области $\alpha 1$ -таницитов локализуются GS-иммунопозитивные биполярные клетки, в то время как на более поздних сроках постнатального развития этот тип таницитов характеризовался негативной реакцией на GS. По всей видимости, GS^+ биполярными клетками на 7 сутки развития являются радиальные глиоциты, которые еще окончательно не дифференцировались в GS-негативные $\alpha 1$ -танициты на этом сроке развития (Akimoto et al., 1993; Suarez et al., 2002). Также было установлено, что GS присутствует в $\alpha 2$ - и $\beta 1$ -таницитах на всех исследованных сроках. Возможно, это обусловлено важной ролью этих субпопуляций таницитов в функционировании нейронов аркуатного ядра.

Исследование ядрышек таницитов также показало возрастные различия в организации этой субъядерной структуры. Было установлено, что в раннем развитии количество ядрышек в таницитах не меняется, однако при старении наблюдается уменьшение их числа. Кроме того, с возрастом для таницитов характерно увеличение размеров этой субъядерной структуры. Известно, что ядрышко-организующие районы (nucleolar organizer regions, NORs), число которых определяет максимально возможное число ядрышек в клетке, имеют тенденцию с возрастом объединяться и формировать более крупные ядрышки (Pena et al., 2001). Также была продемонстрирована зависимость размера ядрышек и синтетической активности клетки, а также числа ядрышек и степени дифференцировки клетки (Жарская, Зацепина, 2007; Watanabe-Susaki et al., 2014). Это может свидетельствовать о том, что уменьшение числа ядрышек таницитов с возрастом происходит вследствие слияния ядрышек в более крупные, а также с закономерным увеличением синтетической активности по мере становления и формирования клеток в ходе раннего постнатального развития. Кроме того, было продемонстрировано, что

различные субпопуляции таницитов различаются между собой по количеству и размерам ядрышек. Начиная с 30-х суток постнатального развития, самое крупное ядрышко присутствует в β 1-таницитах, в то время как размеры ядрышек других типов исследуемых клеток статистически не различались. У взрослых и старых животных крупные ядрышки встречаются в α 2-, β 1- и β 2-таницитах. Это может указывать на то, что для β 1-таницитов высокая синтетическая активность характерна еще в раннем постнатальном развитии, в то время как для α 2- и β 2-таницитов она свойственна для более поздних сроков развития.

При анализе распределения гетерохроматиновых доменов в таницитах было показано, что с возрастом наблюдается увеличение количества и размеров гетерохроматиновых скоплений в ядрах α 1-таницитов, при этом в β -таницитах содержание гетерохроматина с возрастом меняется незначительно. Увеличение содержания гетерохроматиновых доменов может свидетельствовать о том, что ряд ранее активных геномных участков замалчивается, что приводит к дифференцировке и специализации клетки (Kidder et al., 2017; Allshire, Madhani, 2018). В синтетически активных клетках эухроматин занимает большую часть генома, так как с нее считывается информация для синтеза белков. α 2- и β -танициты являются синтетически активными клетками, в то время как считается, что α 1-танициты, как полагают, выполняют исключительно транспортную функцию (Rodriguez et al., 2019). Это может обуславливать более высокий уровень гетерохроматизации в α 1-таницитах по сравнению с остальными типами таницитов. В литературных источниках данные об изменении содержания конститутивного гетерохроматина при старении противоречивы. Согласно одним данным, при старении происходит значительное снижение гетерохроматизации в клетках различных типов - так называемая «модель старения с потерей гетерохроматина» (heterochromatin loss model of aging) (Wang et al., 2016; Lee et al., 2020). Однако, в исследовании Т. Lezhava (2001) было показано, что при старении в лимфоцитах человека происходит интенсивная гетерохроматизация хромосом. Предполагается, что в данном случае возрастное (после 70 лет) накопление хромосомных aberrаций и анеуплоидий происходит вследствие активной гетерохроматизации ДНК и невозможности физического доступа репаративных ферментов к этим участкам. Прогрессивное усиление гетерохроматизации при старении способствует инаktivации ряда ранее функционирующих «активных генов». Это приводит к блоку определенных этапов метаболических процессов клеточных систем, которые происходят в норме, в результате чего недостаток многих специфических ферментов рано или поздно приводит к патологиям старения (Lezhava, 2001). Вероятно, α -танициты также являются тем типом клеток, которые подвергаются гетерохроматизации при старении, что может отражаться на их функциях. В этом отношении, при старении β -танициты характеризуются стабильностью организации изучаемых компарментов клеточного ядра, что может быть связано с их уникальной локализацией в

области срединного возвышения, где располагаются капилляры фенестрированного типа (лишенные ГЭБ). Вероятно, это необходимо для поддержания нормального функционирования не только самих β -таницитов, но и адекватной работы гипоталамо-гипофизарной оси в целом.

Таким образом, танициты подвергаются возрастным изменениям как в раннем постнатальном развитии (в течение первого месяца жизни крысы), так и при старении. В течение первого месяца происходит дифференцировка субпопуляций таницитов. Данные, которые были получены в настоящем исследовании, указывают на то, что по изученным цитохимическим маркерам $\alpha 1$ -танициты дифференцируются позже, чем $\alpha 2$ - и β -танициты. Однако, для $\alpha 2$ - и β -таницитов, в отличие от $\alpha 1$ -таницитов, характерны структурные изменения в раннем развитии. При старении цитохимический профиль таницитов не изменяется. Тем не менее, во всех типах таницитов происходят структурные изменения отростков.

Танициты, будучи клетками выстилки, часто относят к подтипу эпендимоцитов (Hu et al., 2019; Mathew, 2008; MacDonald et al., 2021). Танициты, как и эпендимоциты, образуют непрерывный пласт клеток и формируют физический барьер между СМЖ и нервной тканью. Оба типа клеток происходят из радиальной глии (MacDonald et al., 2021), являются поляризованными клетками за счет формирования апикально-базальной оси клеточными контактами (плотными и адгезионными) (Mathew, 2008; Jiménez et al., 2014), а также участвуют в транспорте различных веществ между СМЖ и нервной тканью с помощью различных транспортеров, располагающихся на мембране (Albertini, Bianchi, 2010). И для таницитов, и для эпендимоцитов характерно присутствие щелевых контактов, образованных Cx43, посредством которых осуществляется обмен малыми молекулами (Ca^{2+} , глюкоза, цАМФ, АТФ, инозитол-3-фосфат). Кроме того, танициты и эпендимоциты характеризуются рядом общих цитохимических характеристик (Mathew, 2008; Jiménez et al., 2014; MacDonald et al., 2021).

Несмотря на наличие общих признаков, большинство авторов все же выделяет танициты в отдельный тип глиальных клеток (Prevot et al., 2018; Rodriguez et al., 2019; Langlet, 2019; Bolborea, Dale, 2013). Действительно, танициты отличаются от других типов глии рядом уникальных свойств. Танициты, в отличие от кубовидных или столбчатых эпендимоцитов, сохраняют морфологию радиальной глии – биполярную форму и длинный базальный отросток. За счет своей уникальной локализации в области срединного возвышения, где располагаются капилляры фенестрированного типа, и особой морфологии, они участвуют в формировании гематоэнцефалического и гематоликворного барьеров. Танициты, в отличие от эпендимоцитов, лишены ресничек и не участвуют в циркуляции СМЖ (Prevot et al., 2018). На своей апикальной поверхности танициты имеют ворсинки, а также сохраняют 1-2 чувствительные реснички, которые располагаются в инвагинации плазматической мембраны. Такое строение предполагает, что рецепторы, расположенные на мембране чувствительной реснички, будут

подвергаться воздействию сигналов СМЖ более длительное время, что, вероятно, необходимо для передачи внутриклеточных сигналов (Mirzadeh et al., 2017). Танициты характеризуются наличием щелевых и адгезионных контактов, однако их локализация и функции уникальны и отличаются от таковых у клеток эпандимы и астроцитов (Szilvasy–Szabo et al., 2017; Rodriguez et al., 2019). В эпандимocyтах щелевые контакты располагаются на латеральной стенке, где они формируют контакты между телами эпандимocyтов для синхронизации биения ресничек, и на базальной поверхности мембраны клетки, где они формируют панглиальный синцитий с подлежащими астроцитами для регулирования водного и ионного транспорта (Jiménez et al., 2014). В таницитах, помимо латеральной стенки, щелевые контакты локализованы вдоль отростков таницитов, а также в базальных ножках всех типов таницитов и на апикальной поверхности $\alpha 1$ -таницитов. Щелевые контакты в таницитах были показаны как *in vivo*, так и *in vitro* (на клеточных культурах $\beta 1$ -таницитов). Долгое время считалось, что Сх43 встречается только в $\alpha 1$ -таницитах, и вопрос функционального значения щелевых контактов именно в этих клетках оставался открытым (Rodriguez et al., 2010). В исследовании, проведенном на клеточных культурах, было показано, что щелевые контакты участвуют в высвобождении АТФ в межклеточное пространство в ответ на введение глюкозы, где АТФ, связываясь с P2Y1 рецепторами, опосредует внутриклеточный Ca^{2+} -сигналинг в таницитах (Orellana et al., 2012). Авторами было продемонстрировано, что танициты чувствительны к изменениям концентрации глюкозы в СМЖ и отвечают на этот сигнал генерацией Ca^{2+} -волн. Предполагается, что посредством щелевых контактов танициты взаимодействуют друг с другом и могут обмениваться информацией для координации их функций (Pasquettaz et al., 2021), например, для обеспечения импульсного высвобождения тропных гормонов гипофиза в порталное кровообращение (Yin, Gore, 2010; Szilvasy–Szabo et al., 2017). Интересно отмеченное нами присутствие Сх43 в апикальной части клеток, где щелевые контакты не формируются. Наличие здесь Сх43 может указывать на то, что в данном случае формируются гемиканалы, которые могут служить для транспорта малых молекул между цитоплазмой таницитов и СМЖ, обеспечивая контроль состава СМЖ. Также Сх43 был обнаружен в ножках таницитов, которыми они оплетают кровеносные сосуды. Предполагается, что это позволяет таницитам осуществлять мониторинг состава крови. Кроме того, наличие гемиканалов на апикальной и базальной частях клетки указывают на возможность двунаправленного регулируемого транспорта веществ между СМЖ и кровью через танициты (Szilvasy–Szabo et al., 2017). В ряде работ была показана роль щелевых контактов и гемиканалов в регуляции пролиферации НСК (Pearson et al., 2005; Wiencken-Barger et al., 2007; Genet et al., 2018). Так, в работе Recabal A. и соавт. (2018) было показано, что Сх43 в таницитах важен для регуляции пролиферативной активности этих клеток (Recabal et al., 2018). В развивающемся мозге Сх43 важен для миграции,

создавая адгезионную платформу для радиальной миграции нейробластов вдоль отростков радиальной глиии. Кроме того, Cx43 необходим для переключения миграции нейробластов с тангенциальной на радиальную (Elias et al., 2010). Известно, что отростки таницитов, как и отростки радиальной глиии, могут выступать в качестве скаффолда для миграции клеток-предшественников, и локализация Cx43 вдоль отростков таницитов (особенно α -таницитов) может свидетельствовать в пользу их роли в миграции клеток-предшественников вдоль отростков таницитов в инфундибулярном углублении. Все это может обуславливать различную плотность и характер расположения щелевых контактов среди субпопуляций таницитов.

Адгезионные контакты в клетках эпендимы располагаются в апикальной части латеральной стенки по периметру клетки (так называемые «пчелиные соты»). В таницитах адгезионные контакты локализуются, главным образом, в апикальной части латеральных стенок по периметру клетки, но также присутствуют вдоль всей латеральной стенки и отростков этих клеток, что необходимо не только для скрепления клеток между собой и формирования апикально-базальной полярности (как у эпендимоцитов) (Bustamante et al., 2019), но и для формирования пучков отростков и их механической стабилизации.

Танициты считаются синтетически активными клетками. Этим обусловлен тот факт, что их ядрышковый аппарат характеризуется наличием 1-3 ядрышек, относительно крупных для глиальных клеток (за исключением α 1-таницитов, которые характеризуется присутствием 1-4 ядрышек относительно небольшого размера). В этом отношении ядрышковый аппарат α 1-таницитов характеризуется теми же признаками, что и у эпендимоцитов (Суфиева и соавт., 2018). Можно предположить, что такая организация ядрышка связана с тем, что для α 1-таницитов и эпендимоцитов типична невысокая синтетическая активность, так как эти клетки в основном выполняют транспортную, а не белок-синтетическую функцию.

Танициты совмещают в себе ряд характеристик радиальной глиии и астроцитов, в связи с чем танициты часто причисляют к подтипу астроцитов (García-Cáceres et al., 2019) или радиальной глиии (Goodman, Hajihosseini, 2015). В частности, танициты, дифференцируясь из радиальной глиии, сохраняют ее основную морфологическую особенность - биполярность. Танициты (как и радиальные глиоциты) характеризуются присутствием ряда астроцитарных маркеров – белка промежуточных филаментов GFAP (он отсутствует в радиальной глиии у грызунов), белка щелевых контактов Cx43, фермента GS, белка S100b, GLAST и некоторых других (Rodríguez et al., 2005; Mori et al., 2005). Перечисленные маркеры являются основными и наиболее часто используемыми при изучении астроцитов. Тем не менее, несмотря на ряд общих черт, танициты характеризуются рядом своих уникальных характеристик, и выполняют отличные от астроцитов и радиальных глиоцитов функции. В частности, уникальной для

таницитов чертой является формирование гематоликворного барьера в области срединного возвышения, контроль высвобождения тропных гормонов нейросекреторными клетками гипоталамуса, генерация активных форм гормонов щитовидной железы в головном мозге (Prevot et al., 2018; García-Cáceres et al., 2019).

Таким образом, важно подчеркнуть, что несмотря на наличие некоторых общих признаков с эпендимными клетками, астроцитами и радиальной глией, танициты все же существенно от них отличаются. Они характеризуются своим уникальным набором морфологических, цитохимических и функциональных признаков, который отличает танициты от любых других типов глиальных клеток, что дает все основания выделить их в отдельный тип клеток макроглии.

5.2. Различие субпопуляций таницитов.

Танициты являются гетерогенной популяцией клеток. В настоящее время выделяют 4 типа таницитов: $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\beta 1$ - и $\beta 2$ -танициты (согласно классификации, которая впервые была предложена И.Г. Акмаевым). При выделении типов таницитов И.Г. Акмаев основывался на их различной локализации в инфундибулярном углублении, морфологических (направление отростков) и цитохимических/биохимических признаках (активность некоторых ферментов, связанных с обменом аминокислот, углеводов и жиров, а также с превращением субстратов в цикле Кребса (Akmaev et al., 1973)). Появление и развитие новых методов и подходов, таких как Single cell RNA Sequencing и Droplet Sequencing, привело к осознанию того, что разнообразие таницитов значительно более высоко, чем считалось ранее. Несмотря на то, что для выделения подтипов таницитов были установлены специфические характеристики и определены маркерные гены, для многих таких маркеров характерно градиентное распределение вдоль выстилки, а не четкое разделение по субпопуляциям таницитов (Langlet, 2019). Эти данные могут указывать на то, что танициты представляют собой скорее непрерывный клеточный пласт с плавными переходными зонами между их субпопуляциями.

В настоящем исследовании танициты подразделяются на 4 подтипа в соответствии с общепризнанной и, на данный момент, единственной классификацией этих клеток. При анализе морфологических особенностей таницитов, таких как характер направления отростков и формирование пучков отростков, возможно четкое подразделение таницитов на эти 4 подтипа (по крайней мере, у половозрелых животных). Это также справедливо для ряда маркерных белков, например, глутаминсинтетазы (локализуется в $\alpha 2$ - и $\beta 1$ -таницитах), Sx43 (встречается во всех типах таницитов, но только в $\alpha 1$ -таницитах образует гемиканалы на апикальной поверхности клетки), PCNA и Msi-1 (позволяет выделить α -танициты). Такие маркеры как GFAP, нестин, β -катенин встречаются во всех типах таницитов, но их субклеточная

локализация различается по субпопуляциям. Так, GFAP локализуется в отростках и телах α -таницитов, в то время как в β -таницитах встречается только в отростках и расширенных ножках этих клеток. При реакции на нестин картина противоположенная: как правило, в β 2-таницитах интенсивная реакция наблюдается в телах и отростках, а в других типах таницитов только в отростках этих клеток. Белок адгезионных контактов β -катенин локализуется по всей длине отростков только в α 2- и β -таницитах. Тем не менее, четкой и однозначной границы между различными типами таницитов при исследовании распределения этих белков в субпопуляциях таницитов не наблюдалось. Такие маркеры как виментин и Sox2 встречаются во всех типах таницитов с одинаковой интенсивностью иммуногистохимической реакции, что не позволяет выявить подтипы таницитов, не ориентируясь на морфологические признаки - локализацию в инфундибулярном углублении или направлении отростков. При изучении ядрышка четкой границы между таницитов не наблюдается, присутствует скорее плавный переход от одной субпопуляции к другой. Организация ядрышек разных типов таницитов в целом не отличалась. Тем не менее, при анализе диаметра наибольшего ядрышка и проведении статистического анализа было показано, что α 1-танициты статистически отличаются от других типов таницитов по размерам, а также количеству ядрышек. Субпопуляции таницитов также различаются и по количеству ядрышек. Поскольку количество ядрышек коррелирует со степенью дифференцировки клетки, то присутствие разного числа ядрышек может указывать и на разную способность таницитов к пролиферации. Присутствие большего числа мелких ядрышек во всех субпопуляциях таницитов на ранних сроках свидетельствует в пользу того, что у молодых животных все типы таницитов пролиферативно активны. У взрослых и старых животных такие характеристики сохраняются лишь в α -таницитах (в α 1-таницитах в большей степени), что наблюдалось в настоящей работе при исследовании пролиферативных свойств таницитов и подтверждается литературными источниками (Robins et al., 2013; Saaltink et al., 2012).

Обнаруженные различия в распределении отдельных маркеров в субпопуляциях таницитов обусловлены тем, что разные типы таницитов взаимодействуют с разными структурами медиобазального гипоталамуса, опосредуя их функции. Так, например, локализация GS только в α 2- и β 1-таницитах может быть связана с тем, что именно эти две субпопуляции таницитов прилежат к аркуатному ядру гипоталамуса, которое отвечает за энергетический баланс организма. Было показано, что аркуатное ядро, в отличие от вентромедиального и дорсомедиального ядер, характеризуется тем, что оно «закрыто» для прилежащих структур. Так, при введении таких веществ как трипановый синий или пероксидаза хрена в аркуатное ядро, эти вещества распределяются в пределах этого ядра, не проникая в прилежащие вентромедиальное ядро и срединное возвышение, и наоборот, при

введении этих веществ в соседние ядра гипоталамуса или срединное возвышение, в аркуатном ядре они не обнаруживаются. При этом, аркуатное ядро более «открыто» для различных веществ СМЖ по сравнению с вентромедиальным и дорсомедиальным ядрами, что приводит к формированию особого микроокружения для нейронов аркуатного ядра (Rodríguez et al., 2010). Учитывая все вышеизложенное, можно предположить, что нейроны аркуатного ядра гипоталамуса нуждаются в более активных защитных механизмах. Это не противоречит тому факту, что $\alpha 2$ - и $\beta 1$ -танициты, наряду с астроцитами, принимают активное участие в синтезе GS, который необходим для детоксикации аммония и регуляции баланса глутамат/глутамин для предохранения нейронов от гибели путем эксайтотоксичности. Возможно и другое объяснение. При исследовании GS, проведенном на сибирских хомяках (*Phodopus sungorus*), было продемонстрировано, что уровень синтеза GS в таницитах зависит от длины светового дня. В длинный фотопериод уровень синтеза GS значительно выше по сравнению с коротким фотопериодом. Авторы предполагают, что поскольку танициты оплетают своими ножками кровеносные сосуды и могут быть вовлечены в регуляцию транспорта различных веществ через гематоэнцефалический барьер, то, вероятно, эти клетки участвуют в транспорте нейтральных аминокислот из крови в нервную ткань, снабжая нейроны аркуатного ядра энергетическим субстратом (Nilaweera et al., 2011).

Щелевые контакты в таницитах присутствуют во всех субпопуляциях таницитов на всех исследованных сроках. Однако их плотность распределения и локализация варьировали среди разных типов таницитов. Так, наибольшая плотность распределения Sx43⁺-гранул наблюдалось в $\alpha 1$ -таницитах (чуть меньше в $\alpha 2$ -таницитах), в то время как в β -таницитах щелевые контакты были единичны. Также различалась и локализация Sx43 среди субпопуляций таницитов. Для всех типов таницитов было типично присутствие щелевых контактов на латеральной поверхности клеток, вдоль отростков и на терминалях, и лишь $\alpha 1$ -танициты характеризовались наличием гемиканалов на апикальной поверхности клетки.

Таким образом, по морфологическим и ряду изученных цитохимических признаков действительно можно идентифицировать 4 подтипа таницитов. Однако, распределение некоторых маркеров все же не имеет четких границ при переходе от одной субпопуляции к другой. Вероятно, маркерные белки, строго специфичные для определенных типов таницитов и не встречающиеся в других типах этих клеток, определяют узкую функциональную специализацию субпопуляции, завязанную на работе подлежащих структур медиобазального гипоталамуса. Наоборот, постепенно сменяющийся уровень экспрессии/локализации характерны для тех белков, которые функционально универсальны для всех типов таницитов.

5.3. Танициты как нейральные стволовые клетки.

В настоящее время у исследователей не вызывает сомнений наличие пролиферативного потенциала у таницитов взрослых животных. Танициты сохраняют морфологию радиальной глии, а их отростки могут выступать в качестве скаффолда для миграции нейробластов. Кроме того, танициты экспрессируют ряд пролиферативных маркеров и маркеров НСК, а также включают метку BrdU/EdU (Goodman, Hajihosseini, 2015). Однако, вопрос о том, как изменяется пролиферативный потенциал таницитов в ходе постнатального онтогенеза, и какой тип таницитов является источником истинных НСК до сих пор остается открытым и активно обсуждаемым среди исследователей таницитов.

В настоящем исследовании для изучения пролиферативного потенциала таницитов были использованы два общеизвестных пролиферативных маркера - H3-S10ph и PCNA, которые характерны для разных стадий клеточного цикла. Гистон 3 служит субстратом для киназы Aurora-B и фосфорилируется по серину 10 (H3-S10ph) только в фазу митоза, являясь маркером митотически и мейотически делящихся клеток. Установлено, что H3-S10ph важен для конденсации хроматина и регуляции прохождения клеточного цикла (Haruki et al., 2012; Sawicka, Seiser, 2012; Komar, Juszczynski, 2020). В таницитах данный маркер наблюдается в отдельных клетках всех субпопуляций лишь на 7 сутки постнатального развития. Это может указывать на то, что 1) активная пролиферация характерна для таницитов лишь в первую неделю постнатального онтогенеза (неонатальный период); 2) в первую неделю постнатального развития пролиферативным потенциалом обладают все типы таницитов.

PCNA (proliferating cell nuclear antigen) – ядерный негистоновый белок, который необходим для синтеза ДНК и является вспомогательным белком для ДНК-полимеразы α , содержание которого в ядре повышается в G1/S фазу клеточного цикла. PCNA также принимает участие в репарации ДНК. Тем не менее, он традиционно считается маркером пролиферирующих клеток (Juríková et al., 2016). Наличие PCNA в таницитах на всех исследованных сроках указывает на то, что эти клетки не вышли из клеточного цикла, и способны к пролиферации. Кроме того, различные субпопуляции таницитов гетерогенны в отношении экспрессии PCNA, что может указывать на различия в пролиферативном потенциале этих клеток. Так, на ранних сроках все типы таницитов характеризуются присутствием PCNA. Начиная со второй недели развития, этот маркер присутствует лишь в α -таницитах. Это соответствует литературным данным, согласно которым танициты способны к пролиферации не только у молодых крыс, но и у половозрелых и старых животных. Однако, исследователи отмечают низкую пролиферативную активность этих клеток по сравнению с другими нейрогенными нишами (Rodríguez et al., 2019). В этом отношении, PCNA, в силу

своего медленного катаболизма (Кирик и соавт., 2009), является наиболее удобным маркером для исследования пролиферативного потенциала медленно пролиферирующих популяций НСК, таких как танициты.

Субпопуляции таницитов различаются распределением не только пролиферативных маркеров, но и маркеров НСК. В настоящем исследовании рассматривались такие маркеры НСК как Sox2 и Musashi-1. Sox2 (SRV-box2) – транскрипционный фактор, который необходим для поддержания плюрипотентности эмбриональных и нейральных стволовых клеток (Zhang, Cui, 2014). Musashi-1 (Msi-1) – РНК-связывающий белок, который является маркером пролиферирующих и мультипотентных нейральных стволовых/прогениторных клеток. Экспрессия Msi-1 подавляется в пост-митотических клетках. Проведенные нами исследования показали, что Sox2 присутствует во всех типах таницитов на всех исследованных сроках, однако при старении интенсивность реакции уменьшается в β -таницитах. Msi-1 в первый месяц развития выявляется во всех субпопуляциях таницитов. У взрослых и старых животных данный маркер выявляется только в α -таницитах, при этом интенсивность реакции в $\alpha 1$ -таницитах выше по сравнению с $\alpha 2$ -таницитами. Полученные данные указывают на то, что 1) в ходе раннего развития β -танициты постепенно теряют свойства НСК, и у половозрелых животных для них характерна экспрессия лишь отдельных маркеров НСК, что может указывать на их ограниченную способность к пролиферации; 2) в α -таницитах свойства НСК сохраняются на протяжении всего постнатального развития и при старении; 3) при старении пролиферативный потенциал таницитов падает, уменьшается число таницитов, экспрессирующих PCNA, а интенсивность реакции на маркеры НСК (Musashi-1, sox2) уменьшается, что свидетельствует о том, что пролиферативно активными при старении остаются лишь α -танициты. Действительно, в настоящее время считается, что именно α -танициты ($\alpha 2$ -танициты) являются истинными НСК у половозрелых особей и способны к пролиферации и дифференцировке в глию (в большей степени) и в нейроны (в меньшей степени), в то время как β -танициты представляют собой скорее коммитированные нейральные прогениторные клетки (НПК) (Prevot et al., 2018). Установлено, что танициты пролиферируют в ответ на повреждение (Mu et al., 2021) и введение таких ростовых факторов как IGF-1, FGF2 и EGF (Fugube et al., 2020). Исследование таницитов при старении показало, что старение медиобазального гипоталамуса характеризуется нейровоспалением, уменьшением числа таницитов и их дезорганизации (Zoli et al., 1995; Kostin et al., 2021), а также падением пролиферативного потенциала этих клеток. Это проявляется в том, что уменьшается число клеток, экспрессирующих маркеры НСК и НПК, включая нестин, Sox2, Bmi1 и Musashi-1 (Zhang et al., 2017). Однако способность пролиферировать и дифференцироваться в новые нейроны все еще сохраняется (Kostin et al., 2021).

Таким образом, активная пролиферация характерна для всех типов таницитов лишь в первую неделю постнатального онтогенеза. С развитием пролиферативный потенциал таницитов угасает и у взрослых животных сохраняется лишь у α -таницитов, в то время как β -танициты имеют ограниченный потенциал к делению.

5.4. Особенности клеток микроглии инфундибулярного углубления.

Исследование клеток микроглии в инфундибулярном углублении и их взаимоотношения с таницитами представляет особый интерес, так как обе эти клеточные популяции задействованы в формировании барьерных систем головного мозга. Кроме того, исследования последних лет продемонстрировали важную роль микроглии, наряду с таницитами, в регуляции метаболических процессов (García-Cáceres et al., 2019). Важной, но при этом слабо освещенной проблемой остается вопрос о механизмах формирования барьеров в срединном возвышении в ходе нормального развития и старения.

Изучение микроглии в инфундибулярном углублении показало, что на разных стадиях постнатального онтогенеза здесь присутствуют разные типы микроглии, которые различаются по локализации, степени активации, пространственным взаимоотношениям с таницитами, а также морфологическим и функциональным признакам. В ходе исследования было установлено, что определенные типы микроглии взаимодействуют с тем или иным типом таницитов. У взрослых животных, помимо типичных отростчатых микроглиоцитов, локализовавшихся в нервной ткани в области аркуатного и вентромедиального ядер гипоталамуса, была выделена популяция субэпендимных микроглиоцитов, которые локализовались непосредственно под телами α -таницитов. Данная разновидность микроглии была охарактеризована ранее О.В. Кирик и соавт. (Кирик и соавт., 2014). Наблюдаемая морфологическая картина может быть следствием того, что тела α -таницитов (в отличие от β -таницитов) не скреплены плотными контактами в связи с чем в этой области может происходить парацеллюлярный транспорт молекул. Микроглия, локализованная непосредственно под телами α -таницитов, в этом случае осуществляет защитную функцию, тестируя поступающие молекулы на признаки патогенности (Muller et al., 2010). Отростки субэпендимной микроглии были всегда направлены вдоль выстилки, а у некоторых из этих клеток они проникали через эпендимный пласт и контактировали с СМЖ. Такой тесный контакт микроглии с СМЖ может указывать на контроль этими клетками состава СМЖ, а также на возможность секреции активных молекул (цитокинов) в СМЖ для паракринной регуляции функциональной активности таницитов. В соответствии с этим положением было установлено, что на таницитах (в основном β -таницитах) присутствуют рецепторы интерлейкина-6 α (IL-6R α). Связываясь с этими рецепторами на телах таницитов, IL-6 может

быть вовлечен в регуляцию метаболических процессов этих клеток (Anesten et al., 2017). Следовательно, микроглия, синтезируя цитокины (например, IL-6) в СМЖ, опосредовано (через танициты) может участвовать в контроле энергетического гомеостаза организма.

Срединное возвышение, выстилка которого образована β -таницитами, характеризуется своим уникальным типом микроглии. На сегодняшний день в литературе существуют единичные данные о распределении и функциональном статусе микроглии в данной области, а в возрастном аспекте микроглия срединного возвышения ранее не изучалась. В настоящем исследовании было продемонстрировано, что у взрослых животных в срединном возвышении микроглия активирована на всех исследованных сроках, несмотря на отсутствие патологии. Полученные данные согласуются с исследованием Takagi и соавт. (2019), которые показали, что микроглия у контрольных животных в циркумвентрикулярных органах (ЦВО) представлена амебоидной (активированной) формой и находится в тесном контакте с фенестрированными капиллярами. Кроме того, экспрессия маркеров, характерных для M1 (CD16/32 и CD86) и для M2 (CD206 и Ym1) типов микроглии в ЦВО, была значительно выше, чем в других областях мозга. Авторы предполагают, что амебоидная микроглия в этих органах вовлечена в регуляцию проницаемости кровеносных сосудов и/или ангиогенеза (Takagi et al., 2019). Таким образом, микроглия, наряду с таницитами, участвует в контроле веществ, поступающих из кровотока в нервную ткань. Кроме того, активированное состояние микроглии может указывать на фагоцитоз этими клетками нейротоксичных молекул или клеток, которые поступают с кровотоком. За счет этого микроглия задействована в поддержании гомеостаза нервной ткани (Takagi et al., 2019). В другой работе с помощью метода электронной микроскопии было установлено, что в срединном возвышении у контрольных животных микроглия характеризуется фенотипом, который авторы назвали «темная микроглия» («dark microglia») (Bisht et al., 2016). Такое название обусловлено тем, что на ультраструктурном уровне эти клетки выглядят темными за счет конденсации в них цитоплазмы. Такие микроглиоциты обнаруживают признаки окислительного стресса. Было показано, что этот тип микроглии характеризуется высокой активностью, и в других областях мозга он характерен для патологических состояний, таких как хронический стресс, старение, болезнь Альцгеймера. Идентификация «темной микроглии» в области срединного возвышения указывает на высокую активность микроглиоцитов в этой зоне мозга в норме (при отсутствии патологического процесса), что предполагает уникальные функции этих клеток в срединном возвышении (Bisht et al., 2016).

Также в настоящем исследовании была идентифицирована популяция супраэпендимных макрофагов, которая была выявлена лишь в определенные этапы постнатального онтогенеза, а

именно в первый месяц постнатального развития и у старых животных. Эти клетки встречались в области α - и β 1-таницитов, но преимущественно тяготели к α -таницитам. Ранее супраэпендимные клетки дна третьего желудочка были описаны с использованием метода электронной микроскопии у мышей (Bleier, 1977) и крыс (Mestres, Breipohl, 1976; Mestres, 1976). Было показано, что эти клетки локализуются в инфундибулярном углублении на апикальной поверхности клеток выстилки, лишенных ресничек - таницитах, и их число варьирует в зависимости от фазы эструса у самок, в то время как у самцов это число остается постоянным (Mestres, 1976; Bleier, 1977). Авторы предполагают, что супраэпендимные макрофаги обладают фагоцитарной активностью, и выполняют те же функции, что и клетки Колмера в сосудистом сплетении, а именно утилизируют клеточные обломки, нейротоксичные вещества и патогены СМЖ, являясь важными компонентами ликворозенцефалического барьера (Lu et al., 1993). Кроме того, вероятно, эти клетки могут фагоцитировать фрагменты цитоплазмы эпендимных клеток, в которых накапливаются поврежденные органеллы. Увеличение или уменьшение числа супраэпендимных макрофагов у самок авторы связывают с возможной ролью этих клеток в регулировании на поверхности таницитов числа и размеров микроворсинок, которые, как показали исследователи, различаются у самок в разные фазы эструса (Bleier, 1977).

В настоящем исследовании мы не обнаружили супраэпендимные макрофаги у взрослых животных. Возможно, что у самцов эти клетки являются единичными и при исследовании они не попали на изучаемые срезы, либо у взрослых крыс эти клетки являются Iba-1-иммунонегативными. Тем не менее, супраэпендимные макрофаги были идентифицированы нами у молодых и старых животных. Вероятно, увеличение количества этих клеток в полости желудочка указывает на их высокую активность на данных этапах онтогенеза, что может быть важно для активного удаления лишних клеточных элементов из СМЖ. Их преимущественная локализация на апикальной поверхности α -таницитов, может быть обусловлена необходимостью формирования дополнительного барьера в области, лишенной плотных контактов.

Данные, полученные при изучении структурно-функциональной организации микроглии и ее пространственной взаимосвязи с таницитами в инфундибулярном углублении, суммированы на рисунке 55.

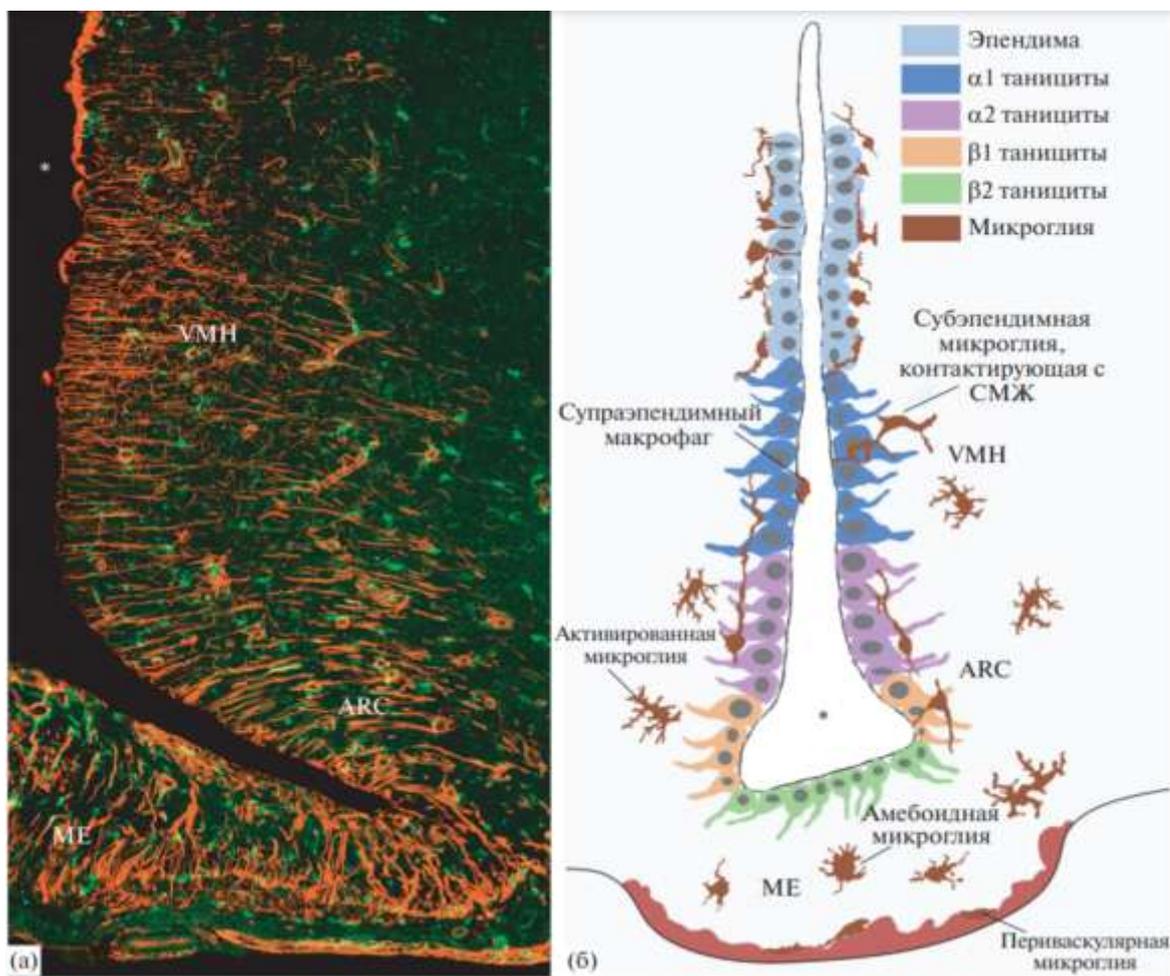


Рисунок 55. Различные типы микроглии в инфундибулярном углублении. А – двойная иммуногистохимическая реакция на виментин (маркер таницитов, красный цвет) и Iba-1 (маркер микроглии, зеленый цвет). Конфокальная лазерная микроскопия, единичный оптический срез. Б – схема различных типов микроглии в инфундибулярном углублении. ME – срединное возвышение; ARC – аркуатное ядро, VMH – вентромедиальное ядро гипоталамуса. Звездочка – полость третьего желудочка.

При количественной оценке микроглии на разных этапах постнатального онтогенеза было продемонстрировано, что число микроглиоцитов варьирует в зависимости от изучаемого возраста. Также стоит отметить, что в инфундибулярном углублении на разных сроках развития микроглия представлена разными формами – активированная (она же амебоидная) или покоящаяся (она же рамифицированная или отростчатая) микроглия. Было установлено, что в первые две недели развития микроглия дна третьего желудочка активирована, а число этих клеток возрастает. После 14 суток постнатального развития активность и количество микроглиоцитов идет на спад, и к концу первого месяца постнатального развития микроглия характеризуется, как и у взрослых животных, отростчатой формой. Аналогичные результаты были получены Lenz и Nelson, которые показали, что у крыс число микроглиоцитов возрастает

в течение эмбриогенеза и первых двух недель постнатального развития, и клетки переходят из активированной формы в покоящуюся (Lenz, Nelson, 2018). Высокую активность микроглии в этот период связывают с их ролью в созревании и ремоделировании синапсов, а также элиминации ненужных синаптических связей. Здесь интересно отметить, что функцию элиминации синапсов у взрослых животных некоторые исследователи приписывают также таницитам (Pasquettaz et al., 2021). В развивающемся головном мозге микроглия может регулировать количество нейронов путем фагоцитоза мертвых или умирающих клеток и обеспечивать трофическую поддержку нервных клеток-предшественников для их пролиферации и созревания. (Kaur et al., 2017; Lenz, Nelson, 2018). Также, было предложено, что микроглиальные клетки при развитии ЦНС регулируют васкуляризацию и влияют на миелинизацию (Lenz, Nelson, 2018). Поскольку танициты являются НСК, можно предположить, что микроглия инфундибулярного углубления у взрослых животных вовлечена также в поддержание функций клеток-предшественников.

В ходе нормального старения в области инфундибулярного углубления число микроглиоцитов резко возрастает по сравнению со взрослыми животными. Микроглия демонстрирует амебоидный фенотип, что указывает на ее чрезвычайно активное состояние. Активация микроглии на этом этапе онтогенеза, вероятно, обусловлена процессами, сопровождающими нормальное старение. Так, установлено, что старение в ЦНС характеризуется высоким уровнем окислительного стресса и перекисного окисления липидов. Предполагается, что накопление с возрастом свободных радикалов приводит к развитию нейровоспаления (Norden, Godbout, 2013). Было также показано, что с возрастом происходит нарушение проницаемости гематоэнцефалического и ликвороэнцефалического барьеров (Erickson, Banks, 2019). Определенный вклад в этот процесс вносят танициты, которые из-за возрастной дезорганизации отростков не способны нормально выполнять свои барьерные функции (Koopman et al., 2017). Наконец, при старении уменьшается уровень половых гормонов и IGF-1 (в транспорт которых вовлечены танициты), которые в гипоталамусе активируют нейропротекторные и противовоспалительные сигнальные пути, в частности, подавляя NFκB-сигнальный путь. Падение уровня этих гормонов и ростовых факторов способствует развитию системного нейровоспаления и дисфункции медиобазального гипоталамуса. В конечном счете все это приводит к повреждению и гибели в этой области нейронов, остатки которых удаляет микроглия, что обуславливает выраженную активацию этих клеток при старении. Некоторые авторы полагают, что танициты (наряду с микроглией) участвуют в удалении клеточных обломков, продуцируемых близлежащими дегенерирующими нейронами в ходе старения ЦНС (Goodman, Hajihosseini, 2015).

Таким образом, определенные субпопуляции таницитов взаимодействуют со своим типом микроглии. Так, для α -таницитов характерно присутствие субэпендимной микроглии и супарэпендимных макрофагов, для β -таницитов типично взаимодействие с активированными формами микроглии срединного возвышения, реже - с супраэпендимными макрофагами (для $\beta 1$ -таницитов). Также в инфундибулярном углублении наблюдалась возрастная динамика в активности и количестве микроглиоцитов на исследуемых этапах постнатального онтогенеза и старения. Танициты наряду с микроглиоцитами важны в формировании барьеров, элиминации клеточных структур, регуляции работы подлежащих ядер гипоталамуса и поддержании гомеостаза нервной ткани в целом.

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 $\alpha 1$ -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 $\alpha 2$ - 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 СОКРАЩЕНИЙ

АЯ –аркуатное ядро

ВМЯ – ветромедиальное ядро

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДМЯ – дорсомедиальное ядро

ИГХ - иммуногистохимическая реакция

НСК - нейральные стволовые клетки

СВ – срединное возвышение

СМЖ – спинномозговая жидкость

AgRP – Agouti-related peptide (агути-родственный пептид)

CART – cocaine- and amphetamine-regulated transcript (транскрипт, регулируемый кокаином и амфетамином)

Calb1 – Calbindin-1 (кальбиндин-1)

Cdhr4 - Cadherin Related Family Member 4 (Ca^{2+} -зависимый адгезионный белок)

Cldn10 – Claudin-10 (клаудин-10)

Cntf - Ciliary Neurotrophic Factor (цилиарный нейротрофический фактор)

Cntrf - Ciliary Neurotrophic Factor Receptor (Рецептор цилиарного нейротрофического фактора)

Col25a1 - Collagen Type XXV Alpha 1 Chain (коллаген XXV типа, цепь альфа 1)

Cysltr1 - Cysteinyl Leukotriene Receptor 1 (Рецептор 1 цистеинил лейкотриена)

Dlk1 - Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1 (Белок дельта-гомолог 1)

Dio2 - Iodothyronine Deiodinase 2 (Йодотирониндейодиназа 2 типа)

Fabp7 - Fatty Acid Binding Protein 7 (белок, связывающий жирные кислоты 7)

Fgf10 - Fibroblast growth factor 10 (Фактор роста фибробластов 10)

Fgfr1 and 2 - Fibroblast Growth Factor Receptor 1 and 2 (Рецептор фактора роста фибробластов 1 и 2 типа)

Foxj1 - Forkhead Box J1 (транскрипционный фактор Foxj1)

Frzb - Frizzled Related Protein (Frizzled-родственный белок 1)

Flt1 - Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 1 (рецептор тирозин киназы 1, также известный как Рецептор 1 сосудистого эндотелиального фактора роста -VEGFR1)

GFAP - Glial fibrillary acidic protein (Глиальный фибриллярный кислый белок)

Gja1 - Gap Junction Protein Alpha 1 (белок щелевых контактов альфа 1, также известный как коннексин 43)

GLUT1 - Glucose Transporter Type I (транспортер глюкозы 1)

GLT-1 - glutamate transporter 1 (транспортер глутамата 1)

GLAST - glutamate/aspartate transporter (транспортер глутамата/аспартата)

GKRP - glucokinase regulatory protein (Регуляторный белок глюкокиназы)

GnRH – gonadotropin-releasing hormone (гонадотропин-рилизинг гормон)

Gpr50 - G Protein-Coupled Receptor 50 (G-белок-связанный рецептор 50)

Itih5 - Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 5 (тяжелые цепи ингибитора интер-альфа-трипсина 5)

Lrrtm3 - Leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein 3 (Трансмембранный нейрональный белок 3 с высоким содержанием лейцина)

Lyz2 – Lysozyme 2 (лизоцим)

Mt1 and 2 - Metallothionein 1 and 2 (металлотионин 1 и 2 типа)

Nes – nestin (нестин)

NPY – neuropeptide Y (нейропепид Y)

P3h2 - Prolyl 3-Hydroxylase 2 (пролил-3-гидроксилаза 2, член семейства 2-оксоглутарат-зависимых диоксигеназ)

POMC – pro-opiomelanocortin (проопиомеланокортин)

PPP1R1B - Protein Phosphatase 1, Regulatory (Inhibitor) Subunit 1B (белок фосфатаза 1, регуляторная (ингибирующая) субъединица 1B, также известный как DARPP-32)

Prdx6 - Peroxiredoxin 6 (Пероксиредоксин-6)

Rab4 - Member RAS Oncogene Family (белок Rab4 – малая ГТФаза)

Rarres2 - Retinoic Acid Receptor Responder 2 (рецептор-респондер 2 ретиноевой кислоты, также известный как Химерин)

Rax - Retina And Anterior Neural Fold Homeobox (Гомеобокс белка сетчатки Rx)

Rbp1 - Retinol Binding Protein 1 (Ретинол-связывающий белок 1)

Rgs7bp - Regulator Of G-Protein Signaling 7 Binding Protein (белок связывающий регулятор 7 сигнальных каскадов, связанных с G-белками)

Rspo3 - R-Spondin 3 (R-спондин-3)

S100b - S100 Calcium Binding Protein B (Ca^{2+} -связывающий белок семейства S100 белков)

Scn7a - Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 7 (Субъединица альфа-белка натриевого канала 7-го типа)

Slc17a8 - Solute Carrier Family 17 Member 8 (также известный как Везикулярный транспортер глутамата 3 - VGLUT3)

Sox2 - SRY (sex determining region Y)-box 2 (транскрипционный фактор Sox2)

SST – somatostatin (соматостатин)

Stra6 – “stimulated by retinoic acid” 6 (сигнальный рецептор и переносчик ретинола Stra6)

Tmem212 - Transmembrane protein 212 (трансмембранный белок 212)

Trhde - Thyrotropin Releasing Hormone Degrading Enzyme (Фермент, расщепляющий тиреотропин-рилизинг-гормон)

Vim – vimentin (виментин)

6330403K07Rik - кодирует белок UGS148 (фактор мультипотентных стволовых клеток)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дыбан, А. П. Объекты биологии развития: монография / А. П. Дыбан.– М.: Изд-во «Наука».– 1975.– 579 с.
2. Жарская, О. О. Динамика и механизмы реорганизации ядрышка в митозе / О. О. Жарская, О. В. Зацепина // Цитология.– 2007.– Т. 49, № 5.– С. 355—369.
3. Кирик, О. В. Маркеры пролиферации, применяемые в гистологических исследованиях / О.В. Кирик, Г.В. Безнин, Д.Э. Коржевский // Морфология. – 2009. – Т. 136, №6. – С. 95-100.
4. Кирик, О.В. Субэпендимные микроглиоциты III желудочка головного мозга/ О.В. Кирик, Е.Г. Сухорукова, О.С. Алексеева, Д.Э. Коржевский // Морфология.– 2014.– Т. 145, №2.– С. 67-69.
5. Коржевский, Д. Э. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии : руководство / Д. Э. Коржевский, О. В. Кирик, М. Н. Карпенко [и др.]; под ред. Д. Э. Коржевского. — 2-е изд., испр. и доп. — Санкт-Петербург : СпецЛит, 2014. —119 с.
6. Коржевский, Д. Э. Иммуногистохимическое исследование головного мозга / Д. Э. Коржевский, Е. Г. Гилерович, О. В. Кирик [и др.]; под ред. Д. Э. Коржевского.– Санкт-Петербург: СпецЛит, 2016.– 143 с.
7. Ноздрячев, А.Д. Анатомия крысы / А.Д. Ноздрячев, Е.Л. Поляков.– Спб.: Изд-во «Лань».– 2001.– 464 с.
8. Поленов, А.Л. Гипоталамо-гипофизарный нейроэндокринный комплекс / А. Л. Поленов, М.С. Константинова, П.Е. Гарлов // Нейроэндокринология. Под ред. А. Л. Поленова.– Часть 1, Книга 1.– Спб., 1993.– С. 139 -187.
9. Рубашкин В.Я., К учению о строении невроглии и эпендимы: Дис. .д-ра мед. наук.- Санкт-Петербург, 1903.- 162 с.
10. Суфиева, Д.А. Нуклеолин и ядрышки в эпендимоцитах и таницитах третьего желудочка головного мозга крысы / Д.А. Суфиева, О.В. Кирик, Д.Э. Коржевский // Цитология.– 2018.– Т. 60, № 1.– С. 30-36.
11. Сухорукова, Е.Г. Ферменты-маркеры астроцитов / Е.Г. Сухорукова, В.В. Гусельникова // Медицинский академический журнал.– 2015.– Т. 15, №3.– С. 31-37.

12. Akimoto, J. Immunohistochemical study of glutamine synthetase expression in early glial development / J. Akimoto, H. Itoh, T. Miwa, K. Ikeda // *Brain Res Dev Brain Res.*– 1993.– Vol. 72, № 1.– P. 9-14.
13. Akmayev, I.G. Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. IV. Medial basal hypothalamus. An experimental morphological study / I.G. Akmayev, O.V. Fidelina, Z.A. Kabolova, A.P. Popov, T.A. Schitkova // *Z Zellforsch Mikrosk Anat.*– 1973.– Vol. 137, № 4.– P. 493-512.
14. Akmayev, I.G. Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. VI. The tanycytes: their relation to the sexual differentiation of the hypothalamus. An enzyme-histochemical study / I.G. Akmayev, O.V. Fidelina // *Cell Tissue Res.*– 1976.– Vol. 173, № 3.– P. 407-416.
15. Akmayev, I.G. Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. VII. The tanycytes: Their relation to the hypophyseal adrenocorticotrophic function. An ultrastructural study / I.G. Akmayev, A.P. Popov // *Cell Tissue Res.*– 1977.– Vol. 80B № 2.– P. 263-82.
16. Albertini, R. Aquaporins and glia. / R. Albertini, R. Bianchi // *Curr Neuropharmacol.*– 2010.– Vol. 8, № 2.– P. 84-91.
17. Allshire R.C. Ten principles of heterochromatin formation and function / R.C. Allshire, H.D. Madhani // *Nat Rev Mol Cell Biol.*– 2018.– Vol. 19, № 4.– P. 229-244.
18. Alvarez-Bolado, G. Sonic hedgehog lineage in the mouse hypothalamus: from progenitor domains to hypothalamic regions / G. Alvarez-Bolado, F.A. Paul, S. Blaess // *Neural development.*– 2012.– Vol. 7, № 4.– P. 1-18
19. Anesten, F. Functional interleukin-6 receptor- α is located in tanycytes at the base of the third ventricle / F. Anesten, C. Santos, E. Gidestrand, E. Schéle, V. Pálsdóttir, T. Swedung-Wettervik, B. Meister, K. Patrycja Skibicka, J.O. Jansson // *J Neuroendocrinol.*– 2017.– Vol. 29, № 12.– P. e12546.
20. Balland, E. Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain / E. Balland, J. Dam, F. Langlet, E. Caron, S. Steculorum, A. Messina, S. Rasika, A. Falluel-Morel, Y. Anouar, B. Dehouck, E. Trinquet, R. Jockers, S.G. Bouret, V. Prévot // *Cell Metab.*– 2014.– Vol. 19, № 2.– P. 293-301.

21. Barrett, P. Photoperiodic regulation of cellular retinol binding protein, CRBP1 [corrected] and nestin in tanycytes of the third ventricle ependymal layer of the Siberian hamster / P. Barrett, E. Ivanova, E.S. Graham, A.W. Ross, D. Wilson, H. Plé, J.G. Mercer, F.J. Ebling, S. Schuhler, S.M. Dupré, A. Loudon, P.J. Morgan // *J Endocrinol.*– 2006.– Vol. 191, № 3.– P. 687-698.
22. Barry, D.S. Radial glial cells: key organisers in CNS development / D.S. Barry, J.M. Pakan, K.W. McDermott // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.*– 2014.– Vol. 46.– P. 76-79.
23. Batailler, M. DCX-expressing cells in the vicinity of the hypothalamic neurogenic niche: a comparative study between mouse, sheep, and human tissues / M. Batailler, M. Droguerre, M. Baroncini, C. Fontaine, V. Prevot, M. Migaud // *J Comp Neurol.*– 2014.– Vol. 522, № 8.– P. 1966-1985.
24. Belenky, M.A. The hypothalamo-hypophysial system of the lamprey, *Lampetra fluviatilis* L. II. The proximal neurosecretory contact region / M.A. Belenky, M.S. Konstantinova, A.L. Polenov // *Cell Tissue Res.*– 1979.– Vol. 204, № 2.– P. 319–331.
25. Benford, H. A sweet taste receptor-dependent mechanism of glucosensing in hypothalamic tanycytes / H. Benford, M. Bolborea, E. Pollatzek, K. Lossow, I. Hermans-Borgmeyer, B. Liu, W. Meyerhof, S. Kasparov, N. Dale // *Glia.*– 2017.– Vol. 65, № 5.– P. 773-789.
26. Bennett, L. Circumventricular organs: a novel site of neural stem cells in the adult brain / L. Bennett, M. Yang, G. Enikolopov, L. Iacovitti // *Mol Cell Neurosci.*– 2009.– Vol. 41, № 3.– P. 337–347.
27. Bernal, A. Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications / A. Bernal, L. Arranz // *Cell Mol Life Sci.*– 2018.– Vol. 75, № 12.– P. 2177-2195.
28. Berger, U.V. Differential distribution of the glutamate transporters GLT-1 and GLAST in tanycytes of the third ventricle / U.V. Berger, M.A. Hediger // *J Comp Neurol.*– 2001.– Vol. 433, № 1.– P. 101-114.
29. Bisht, K. Dark microglia: A new phenotype predominantly associated with pathological states/ K. Bisht, K.P. Sharma, C. Lecours, M.G. Sánchez, H. El Hajj, G. Milior, A. Olmos-Alonso, D. Gómez-Nicola, G. Luheshi, L. Vallières, I. Branchi, L. Maggi, C. Limatola, O. Butovsky, M.È. Tremblay // *Glia.*– 2016.– Vol. 64, №5.– P. 826-839.

30. Bleier, R. Ultrastructure of supraependymal cells and ependymal of hypothalamic third ventricle of mouse / R. Bleier // *J Comp Neurol.*– 1977.– Vol. 174, №2.– P. 359-376.
31. Bolborea M. Melatonin controls photoperiodic changes in tanycyte vimentin and neural cell adhesion molecule expression in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*) / M. Bolborea, M.P. Laran-Chich, K. Rasri, H. Hildebrandt, P. Govitrapong, V. Simonneaux, P. Pévet, S. Steinlechner, P. Klosen // *Endocrinology.*– 2011.– Vol. 152, № 10.– P. 3871-3883.
32. Bolborea, M. Hypothalamic tanycytes: potential roles in the control of feeding and energy balance / M. Bolborea, N. Dale // *Trends Neurosci.*– 2013.– Vol. 36, № 2.– P. 91-100.
33. Bolborea, M. Hypothalamic tanycytes generate acute hyperphagia through activation of the arcuate neuronal network / M. Bolborea, E. Pollatzek, H. Benford, T. Sotelo-Hitschfeld, N. Dale // *Proc Natl Acad Sci U S A.*– 2020.– Vol. 117, № 25.– P. 4473-14481.
34. Böttcher, M. NF- κ B signaling in tanycytes mediates inflammation-induced anorexia / M. Böttcher, H. Müller-Fielitz, S.M. Sundaram, S. Gallet, V. Neve, K. Shionoya, A. Zager, N. Quan, X. Liu, R. Schmidt-Ullrich, R. Haenold, J. Wenzel, A. Blomqvist, D. Engblom, V. Prevot, M. Schwaninger // *Mol Metab.*– 2020.– Vol. 39.– P. 101022.
35. Brawer, J.R. Response of tanycytes to aging in the median eminence of the rat. / J.R. Brawer, R.J. Walsh // *Am. J. Anat.*– 1982.– Vol. 163.– P. 247-256.
36. Bruni, J.E. Ependymal Development, Proliferation, and Functions: A Review / J.E. Bruni // *Microscopy Research and technique.*– 1998.–Vol. 41.– P. 2-13.
37. Burbidge, S. Development of the Neuroendocrine Hypothalamus / S. Burbidge, I. Stewart, M. Placzek // *Compr Physiol.*– 2016.– Vol. 6, № 2.– P. 623-643.
38. Bustamante, F.A. Role of adherens junctions and apical-basal polarity of neural stem/progenitor cells in the pathogenesis of neurodevelopmental disorders: a novel perspective on congenital Zika syndrome / F.A. Bustamante, M.P. Miró, Z.D. Velásquez, L. Molina, P. Ehrenfeld, F.J. Rivera, L.F. BÁTiz // *Transl Res.*– 2019.– Vol. 210.– P. 57-79.
39. Butruille, L. Seasonal reorganization of hypothalamic neurogenic niche in adult sheep / L. Butruille, M. Batailler, D. Mazur, V. Prévot, M. Migaud // *Brain Structure and Function.*– 2017.– Vol. 223, №1.– P. 91–109.
40. Butruille, L. Selective Depletion of Adult GFAP-Expressing Tanycytes Leads to Hypogonadotropic Hypogonadism in Males / L. Butruille, M. Batailler, M.L. Cateau, A.

- Sharif, V. Leysen, V. Prévot, P. Vaudin, D. Pillon, M. Migaud, // *Frontiers in endocrinology*.– 2022.– Vol. 13.– P. 869019.
41. Cabral, A. Brain circuits mediating the orexigenic action of peripheral ghrelin: narrow gates for a vast kingdom / A. Cabral, P.N. De Francesco, M. Perello // *Front Endocrinol*.– 2015.– Vol. 6.– P. 44.
42. Card, J.P. Tanycytes of the third ventricle of the neonatal rat: A golgi study / J.P. Card, J.A. Rafols // *American Journal of Anatomy*.– 1978.– Vol. 151, №2.– P. 173–189.
43. Cai, D. "Hypothalamic Microinflammation" Paradigm in Aging and Metabolic Diseases. / D. Cai, S. Khor // *Cell Metab*.– 2019.– Vol. 30, № 1.– P. 19-35.
44. Castro-Muñozledo, F. Vimentin as a Marker of Early Differentiating, Highly Motile Corneal Epithelial Cells / F. Castro-Muñozledo, D.G. Meza-Aguilar, R. Domínguez-Castillo, V. Hernández-Zequinely, E. Sánchez-Guzmán // *J Cell Physiol*.– 2017.– Vol. 232, № 4.– P. 818-830.
45. Chaker, Z. Hypothalamic neurogenesis persists in the aging brain and is controlled by energy-sensing IGF-I pathway / Z. Chaker, C. George, M. Petrovska, J.B. Caron, P. Lacube, I. Caillé, M. Holzenberger // *Neurobiol Aging*.– 2016.– Vol. 41.– P. 64-72.
46. Chowen J.A. Microglia, neurodegeneration and loss of neuroendocrine control / J.A. Chowen, L.M. Garcia-Segura // *Prog Neurobiol*.– 2019.– P. 101720
47. Clevers, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease / H. Clevers // *Cell*.– 2006.– Vol. 127. № 3.– P. 469-480.
48. Collden, G. Neonatal overnutrition causes early alterations in the central response to peripheral ghrelin / G. Collden, E. Balland, J. Parkash, E. Caron, F. Langlet, V. Prevot, S.G. Bouret // *Molecular metabolism*.– 2014.– Vol. 4, № 1.– P. 15–24.
49. Cortes-Campos, C. MCT2 expression and lactate influx in anorexigenic and orexigenic neurons of the arcuate nucleus / C. Cortes-Campos, R. Elizondo, C. Carril, F. Martínez, K. Boric, F. Nualart, M.A. Garcia-Robles // *PLoS One*.– 2013.– Vol. 8, № 4.– P. e62532.
50. Coppola, A. Suppression of hypothalamic deiodinase type II activity blunts TRH mRNA decline during fasting / A. Coppola, J. Hughes, E. Esposito, L. Schiavo, R. Meli, S. Diano // *FEBS Lett*.– 2005.– Vol. 579, № 21.– P. 4654–4658.

51. Daikoku, S. Electron microscopic observations on the development of the median eminence in perinatal rats / S. Daikoku, T. Kotsu, M. Hashimoto // *Z Anat Entwicklungsgesch.*– 1971.– Vol. 134, № 3.– P. 311-27.
52. Dale, N. Purinergic signaling in hypothalamic tanycytes: potential roles in chemosensing / N. Dale // *Semin Cell Dev Biol.*– 2011.– Vol. 22, № 2.– P. 237-44.
53. Duquenne, M. Leptin brain entry via a tanycytic LepR–EGFR shuttle controls lipid metabolism and pancreas function / M. Duquenne, C. Folgueira, C Bourouh [et al.] // *Nat Metab.*– 2021.– №3.– P. 1071–1090.
54. Ebling, F. J. Hypothalamic control of seasonal changes in food intake and body weight / F. J. Ebling // *Front Neuroendocrinol.*– 2015.– Vol. 37.– P. 97-107.
55. Elias, L. A. Connexin 43 mediates the tangential to radial migratory switch in ventrally derived cortical interneurons / L.A. Elias, M. Turmaine, J.G. Parnavelas, A.R. Kriegstein // *J Neurosci.*– 2010.– Vol. 30, № 20.– P. 7072-7077.
56. Elizondo-Vega, R. Inhibition of Hypothalamic MCT4 and MCT1–MCT4 Expressions Affects Food Intake and Alters Orexigenic and Anorexigenic Neuropeptide Expressions / R. Elizondo-Vega, K. Oyarce, M. Salgado, M. J. Barahona, A. Recabal, P. Ordenes, S. López, R. Pincheira, P. Luz-Crawford, M. A. García-Robles // *Mol Neurobiol.*–2020.– Vol. 57.– P. 896–909.
57. Etienne-Manneville, S. Adherens junctions during cell migration / S. Etienne-Manneville // *Subcell Biochem.*– 2012.– Vol. 60.– P. 225-249.
58. Evans, J. Characterization of mitotic neurons derived from adult rat hypothalamus and brain stem / J. Evans, C. Sumners, J. Moore, M.J. Huentelman, J. Deng, C.H. Gelband, G. Shaw // *J Neurophysiol.*– 2002.– Vol. 87, № 2.– P. 1076-1085.
59. Fekete, C. Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions / C. Fekete, R.M. Lechan // *Endocr Rev.*– 2014.– Vol. 35, № 2.– P. 159-194.
60. Firth, J. A. Distribution and properties of an adenosine triphosphatase in the tanycyte ependyma of the IIIrd ventricle of the rat / J. A. Firth, R. Bock // *Histochemistry.*– 1976.– Vol. 47.– P. 145–157.

61. Forouzanfar, M. Intracellular functions of RNA-binding protein, Musashi1, in stem and cancer cells / M Forouzanfar, L. Lachinani, K. Dormiani, M. H. Nasr-Esfahani, A.O. Gure, K. Ghaedi // *Stem Cell Res Ther.*– 2020.– № 11.– P. 193.
62. Frehlick, L. J. New insights into the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones / L. J. Frehlick, J. M. Eirín-López, J. Ausió // *Bioessays.*– 2007.– Vol. 29, № 1.– P. 49-59.
63. Frayling, C. ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes / C. Frayling, R. Britton, N. Dale // *J Physiol.*– 2011.– Vol. 589 (Pt 9).– P. 2275-2286.
64. Furube, E. Neural stem cell phenotype of tanycyte-like ependymal cells in the circumventricular organs and central canal of adult mouse brain / E. Furube, H. Ishii, Y. Nambu, E. Kurganov, S. Nagaoka, M. Morita, S. Miyata // *Sci Rep.*– 2020.– Vol. 10, № 1.– P. 2826.
65. Galvez-Contreras, A.Y. Role of fibroblast growth factor receptors in astrocytic stem cells / A.Y. Galvez-Contreras, R.E. Gonzalez-Castaneda, S. Luquin, O. Gonzalez-Perez // *Curr Signal Transduct Ther.*– 2012.– Vol. 7, № 1.– P. 81-86.
66. García-Cáceres, C. Role of astrocytes, microglia, and tanycytes in brain control of systemic metabolism / C. García-Cáceres, E. Balland, V. Prevot, S. Luquet, S. C. Woods, M. Koch, T. L. Horvath, C. X. Yi, J. A. Chowen, A. Verkhratsky, A. Araque, I. Bechmann, M. H. Tschöp // *Nat Neurosci.*– 2019.– Vol. 22, № 1.– P. 7-14.
67. Genet, N. Multifaceted Roles of Connexin 43 in Stem Cell Niches / N. Genet, N. Bhatt, A. Bourdieu, K. K. Hirschi // *Curr Stem Cell Rep.*– 2018.– Vol. 4, № 1.– P. 1-12.
68. Giaume, C. Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles / C. Giaume, L. Leybaert, C. C. Naus, J. C. Sáez // *Front Pharmacol.*– 2013.– Vol. 4.– P. 88.
69. Ginisty, H. Structure and functions of nucleolin / H. Ginisty, H. Sicard, B. Roger, P. Bouvet // *J Cell Sci.*– 1999.– Vol. 112 (Pt 6).– P. 761-772.
70. Goodman, T. Hypothalamic tanycytes-masters and servants of metabolic, neuroendocrine, and neurogenic functions. / T. Goodman, M. K. Hajihosseini // *Front Neurosci.*– 2015.– Vol. 9.– P. 387.

71. Guerra, M. Cell organization of the rat pars tuberalis. Evidence for open communication between pars tuberalis cells, cerebrospinal fluid and tanycytes / M. Guerra, J. L. Blázquez, B. Peruzzo, B. Peláez, S. Rodríguez, D. Toranzo, F. Pastor, E. M. Rodríguez // *Cell Tissue Res.*—2010.— Vol. 339, № 2.— P. 359-381.
72. Haan, N. Fgf10-expressing tanycytes add new neurons to the appetite/energy-balance regulating centers of the postnatal and adult hypothalamus / N. Haan, T. Goodman, A. Najdi-Samiei, C. M. Stratford, R. Rice, E. El Agha, S. Bellusci, M. K. Hajihosseini // *J Neurosci.*—2013.— Vol. 33, № 14.— P. 6170–6180.
73. Hanon, E.A. Ancestral TSH mechanism signals summer in a photoperiodic mammal / E.A. Hanon, G.A. Lincoln, J.M. Fustin, H. Dardente, M. Masson-Pévet, P.J. Morgan, D.G. Hazlerigg // *Curr Biol.*—2008.— Vol. 18, № 15.— P. 1147-1152.
74. Haruki, T. Multiparameter analysis using cell cycle biomarkers for small-size lung adenocarcinoma: prognostic implications / T. Haruki, K. Shomori, T. Shiomi, Y. Taniguchi, H. Nakamura, H. Ito // *Oncol Rep.*—2012.— Vol. 28, № 3.— P. 915-922.
75. Hashemi, S.H. Presence of sst 2(a) receptor immunoreactivity in rat ependyma and tanycytes / S. H. Hashemi, J. Y. Li, M. Schindler, A. Dahlstrom // *Neuroreport.*—2001.— Vol. 12.— P. 1793–1797.
76. Hendrickson, M. L. Nestin expression and in vivo proliferative potential of tanycytes and ependymal cells lining the walls of the third ventricle in the adult rat brain / M. L. Hendrickson, I. Zutshi, A. Wield, R. E. Kalil // *Eur J Neurosci.*—2018.— Vol. 47, № 4.— P. 284-293.
77. Herwig, A. Hypothalamic thyroid hormone in energy balance regulation / A. Herwig, A. W. Ross, K. N. Nilaweera, P. J. Morgan, P. Barrett // *Obes Facts.*—2008.— Vol. 1, № 2.— P. 71-79.
78. Herwig, A. Hypothalamic ventricular ependymal thyroid hormone deiodinases are an important element of circannual timing in the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*) / A. Herwig, E. M. de Vries, M. Bolborea, D. Wilson, J. G. Mercer, F. J. Ebling, P. J. Morgan, P. Barrett // *PLoS one.*—2013.— Vol. 8, № 4.— P. e62003.
79. Holmes, A. P. Reductions in hypothalamic Gfap expression, glial cells and α -tanycytes in lean and hypermetabolic Gnasxl-deficient mice / A. P. Holmes, S. Q. Wong, M. Pulix, K. Johnson, N. S. Horton, P. Thomas, J. P. de Magalhães, A. Plagge // *Mol Brain.*—2016.— Vol. 9.— P. 39.

80. Horstmann, E. Die faserghlia des selachiergehirns / E. Horstmann // *Z Zellforsch.*– 1954.– Vol. 39.– P. 588- 617.
81. Hovens, I. B. A novel method for evaluating microglial activation using ionized calcium-binding adaptor protein-1 staining: cell body to cell size ratio / I. B. Hovens, C. Nyakas, R. G. Schoemaker // *Neuroimmunol Neuroinflammation.*– 2014.– Vol. 1.– P. 82-88.
82. Hu, J. Tanycyte in Physiology and Disease / J. Hu, P. Gong, S. Qin // *Int J Transl Med.*– 2019.– Vol. 1, № 1.– P. 3-7.
83. Jia, W. New perspectives of physiological and pathological functions of nucleolin (NCL) / W. Jia, Z. Yao, J. Zhao, Q. Guan, L. Gao // *Life Sci.*– 2017.– Vol. 186.– P. 1-10.
84. Jiménez, A. J. Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption / A. J. Jiménez, M. D. Domínguez-Pinos, M. M. Guerra, P. Fernández-Llebrez, J. M. Pérez-Fígares // *Tissue Barriers.*– 2014.– Vol. 2.– P. e28426.
85. Jørgensen, S. Histone H4 lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity / S. Jørgensen, G. Schotta, C. S. Sørensen // *Nucleic Acids Res.*– 2013.– Vol. 41, № 5.– P. 2797-2806.
86. Jourdon, A. Prss56, a novel marker of adult neurogenesis in the mouse brain / A. Jourdon, A. Gresset, N. Spassky, P. Charnay, P. Topilko, R. Santos // *Brain Struct Funct.*– 2016.– Vol. 221, № 9.– P. 4411-4427.
87. Juanes-Mendez, J.A. Glial fibrillary acidic protein-like immunoreactive ependymal elements in the third ventricle of the rat / J. A. Juanes-Mendez, J. M. Riesco, F. Sanchez, J. Carretero, E. Blanco, R. Vazquez // *Acta Anat.*– 1992.– Vol. 145.– P. 364–369.
88. Juríková, M. Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer / M. Juríková, L. Danihel, S. Polák, I. Varga // *Acta Histochemica.*–2016.– Vol. 118, № 5.– P. 544-552.
89. Jurkowski, M. P. Beyond the Hippocampus and the SVZ: Adult Neurogenesis Throughout the Brain / M.P. Jurkowski, L. Bettio, E. K Woo, A. Patten, S. Y. Yau, J. Gil-Mohapel // *Front Cell Neurosci.*– 2020.– Vol. 14.– P. 576444.
90. Kaur, C. Biology of Microglia in the Developing Brain / C. Kaur, G. Rathnasamy, E.A. Ling // *J Neuropathol Exp Neurol.*– 2017.– Vol.76, №9.– P. 736-753.

91. Kidder, B. L. SMYD5 regulates H4K20me3-marked heterochromatin to safeguard ES cell self-renewal and prevent spurious differentiation / B. L. Kidder, G. Hu, K. Cui, K. Zhao // *Epigenetics Chromatin*.– 2017.– Vol. 10.– P. 8.
92. Kim, J. G. Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding / J. G. Kim, S. Suyama, M. Koch [et al.] // *Nat Neurosci*.– 2014.– Vol. 17, № 7.– P. 908-910.
93. Kittner, H. Enhanced food intake after stimulation of hypothalamic P2Y1 receptors in rats: modulation of feeding behaviour by extracellular nucleotides / H. Kittner, H. Franke, J. I. Harsch, I.M. El-Ashmawy, B. Seidel, U. Krügel, P. Illes // *Eur J Neurosci*.– 2006.– Vol. 24, № 7.– P. 2049-2056.
94. Kohnke, S. Nutritional regulation of oligodendrocyte differentiation regulates perineuronal net remodeling in the median eminence / S. Kohnke, S. Buller, D. Nuzzaci [et al.] // *Cell Rep*.– 2021.– Vol. 36, № 2.– P. 109362.
95. Kolos, E.A. Glutamine Synthetase – Containing Cells of the Dorsal Root Ganglion at Different Stages of rat Ontogeny / E.A. Kolos, D.E. Korzhevskii // *Russ J Dev Biol*.– 2018.– Vol. 49, № 3.– P. 179-183.
96. Komar, D. Rebelled epigenome: histone H3S10 phosphorylation and H3S10 kinases in cancer biology and therapy / D. Komar, P. Juszczynski // *Clin Epigenet*.– 2020.– Vol. 12.– P. 147.
97. Koopman, A. C. M. Age-related changes in the morphology of tanycytes in the human female infundibular nucleus/median eminence / A. C. M. Koopman, M. Taziaux, J. Bakker // *J Neuroendocrinol*.– 2017.– Vol. 29.– P. 1-9
98. Kostin, A. Adult hypothalamic neurogenesis and sleep-wake dysfunction in aging / A. Kostin , M. A. Alam, D. McGinty, M.N. Alam // *Sleep*.– 2021.– Vol. 44, № 2.– P. zsaal73.
99. Kriegstein, A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells / A. Kriegstein , A. Alvarez-Buylla // *Annu Rev Neurosci*.– 2009.– Vol. 32.– P. 149-84.
100. Landry, C. F. Developmental expression of glial fibrillary acidic protein mRNA in the rat brain analyzed by in situ hybridization / C. F. Landry, G. O. Ivy, I. R. Brown // *J Neurosci Res*.– 1990.– Vol. 25, № 2.– P. 194-203.
101. Langlet, F. Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain / F. Langlet, A. Mullier, S. G. Bouret, V. Prevot, B. Dehouck // *J Comp Neurol*.– 2013.– Vol. 521, № 15. – P. 3389-3405.

102. Langlet, F. Tanycytes: a gateway to the metabolic hypothalamus / F. Langlet // *J Neuroendocrinol.* – 2014. – Vol. 26, № 11. – P.753-760.
103. Langlet, F. Tanycyte Gene Expression Dynamics in the Regulation of Energy Homeostasis / F. Langlet // *Front Endocrinol.*– 2019. – Vol. 10. – P. 286.
104. Lagutin, O.V. Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development / O. V. Lagutin, C. C. Zhu, D. Kobayashi, J. Topczewski, K. Shimamura, L. Puellas, H. R. Russell, P. J. McKinnon, L. Solnica-Krezel, G. Oliver // *Genes Dev.* – 2003. – Vol. 17, № 3. – P. 368-379.
105. Lazcano, I. Fasting Enhances Pyroglutamyl Peptidase II Activity in Tanycytes of the Mediobasal Hypothalamus of Male Adult Rats / I. Lazcano, A. Cabral, R. M. Uribe, L. Jaimes-Hoy, M. Perello, P. Joseph-Bravo, E. Sánchez-Jaramillo, J. L. Charli // *Endocrinology.*– 2015. – Vol. 156, № 7. – P. 2713–2723.
106. Lazutkaite, G. Amino acid sensing in hypothalamic tanycytes via umami taste receptors / G. Lazutkaite, A. Soldà, K. Lossow, W. Meyerhof, N. Dale // *Mol Metab.*– 2017. –Vol. 6, № 11. – P. 1480-1492.
107. Lee, J. E. Canonical Wnt signaling through Lef1 is required for hypothalamic neurogenesis / J. E. Lee, S. F. Wu, L. M. Goering, R. I. Dorsky // *Development.*– 2006. – Vol. 133. – P.4451-4461.
108. Lee, J.H. Heterochromatin: an epigenetic point of view in aging / J. H. Lee, E. W. Kim, D. L. Croteau, V. A. Bohr // *Exp Mol Med.*– 2020.– Vol. 52. – P. 1466–1474.
109. Lee, D. A. Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche / D. A. Lee, J.L. Bedont, T. Pak, H. Wang, J. Song, A. Miranda-Angulo, V. Takiar, V. Charubhumi, F. Balordi, H. Takebayashi, S. Aja, E. Ford, G. Fishell, S. Blackshaw // *Nat. Neurosci.* – 2012. – Vol. 15.– P. 700–702.
110. Lenz, K.M. Microglia and beyond: Innate immune cells as regulators of brain development and behavioral function / K.M. Lenz, L.H. Nelson // *Frontiers in Immunology.*– 2018.– Vol. 9. – P. 698.
111. Lezhava, T. Chromosome and aging: genetic conception of aging / T. Lezhava // *Biogerontology.* – 2001. – Vol. 2, № 4.– P. 253-260.

112. Lindström, M. S. NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling / M. S. Lindström // *Biochem Res Int.*– 2011. – Vol. 2011. – P. 195209.
113. Liu, Y. Endoplasmic reticulum-mitochondria tethering in neurodegenerative diseases / Y. Liu, X. Zhu // *Transl Neurodegener.* – 2017.– Vol. 6.– P. 21
114. Lomet, D. The impact of thyroid hormone in seasonal breeding has a restricted transcriptional signature / D. Lomet, J. Cognié, D. Chesneau, E. Dubois, D. Hazlerigg, H. Dardente // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2018. – Vol. 75. – P. 905–919.
115. Lu, J. Intraventricular macrophages in the lateral ventricles with special reference to epileptus cells: a quantitative analysis and their uptake of fluorescent tracer injected intraperitoneally in rats of different ages / J. Lu, C. Kaur, E. A. Ling // *J Anat.* – 1993. – Vol. 183 (Pt 2). – P. 405–414.
116. MacClellan, K.M. Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus / K. M. MacClellan, K. L. Parker, S. Tobet // *Frontiers in Neuroendocrinology.* – 2006. – Vol. 27. – P. 193–209.
117. MacDonald, A. Single Cell Transcriptomics of Ependymal Cells Across Age, Region and Species Reveals Cilia-Related and Metal Ion Regulatory Roles as Major Conserved Ependymal Cell Functions / A. MacDonald, B. Lu, M. Caron, N. Caporicci-Dinucci, D. Hatrock, K. Petrecca, G. Bourque, J. A. Stratton // *Front Cell Neurosci.*– 2021. – Vol. 15. – P. 703951.
118. Maggi, R. Neurodevelopmental origin and adult neurogenesis of the neuroendocrine hypothalamus / R. Maggi, J. Zasso, L. Conti // *Front Cell Neurosci.*– 2015.– Vol. 8. – P. 440.
119. Mathew, T. C. Regional analysis of the ependyma of the third ventricle of rat by light and electron microscopy / T. C. Mathew // *Anat Histol Embryol.*– 2008.– Vol. 37, № 1.– P. 9-18.
120. Masuda, K. Characterization of the modes of binding between human sweet taste receptor and low-molecular-weight sweet compounds / K. Masuda, A. Koizumi, K. Nakajima, T. Tanaka, K. Abe, T. Misaka, M. Ishiguro // *PLoS One.*– 2012. – Vol. 7, № 4. – P. e35380.
121. Matsuda, Y. Nestin: Neural Stem/Progenitor Cell Marker in Brain Tumors / Y. Matsuda, H. Yoshimura, T. Suzuki, T. Ishiwat // In: *Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications.* Edited by Terry Lichtor.– London: IntechOpen, 2013.– 650 p.

122. Meister, B. DARPP-32, a dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein in tanycytes of the mediobasal hypothalamus: distribution and relation to dopamine and luteinizing hormone-releasing hormone neurons and other glial elements / B. Meister, T. Hökfelt, Y. Tsuruo, H. Hemmings, C. Ouimet, P. Greengard, M. Goldstein // *Neuroscience*.– 1988. – Vol. 27, № 2. – P. 607-622.
123. Mesters, P. The supraependymal cells of the rat hypothalamus: changes in their morphology and cell number during the ovarian cycle / P. Mesters // *Experientia*.– 1976.– Vol. 32, № 10. – P. 1329-1331.
124. Mestres, P. Morphology and distribution of supraependymal cells in the third ventricle of the albino rat / P. Mestres, W. Breipohl // *Cell Tissue Res*.– 1976.– Vol. 168, №3.– P. 303-314.
125. Millhouse, O. E. A Golgi study of third ventricle tanycytes in the adult rodent brain. / Millhouse, O. E. // *Z Zellforsch Mikrosk Anat*.– 1971.– Vol. 121, № 1.– P. 1–13.
126. Miranda-Angulo, A. L. Rax regulates hypothalamic tanycyte differentiation and barrier function in mice / A. L. Miranda-Angulo, M. S. Byerly, J. Mesa, H. Wang, S. Blackshaw // *J Comp Neurol*.– 2014. – Vol. 522, № 4. – P. 876–899.
127. Mirzadeh, Z. Bi- and unciliated ependymal cells define continuous floor-plate-derived tanycytic territories / Z. Mirzadeh, Y. Kusne, M. Duran-Moreno, E. Cabrales, S. Gil-Perotin, C. Ortiz, B. Chen, J. M. Garcia-Verdugo, N. Sanai, A. Alvarez-Buylla // *Nat Commun*. – 2017. – Vol. 8. – P. 13759.
128. Monroe, B. G. Ultrastructural changes in the hypothalamus during development and hypothalamic activity: the median eminence / B. G. Monroe, W. K. Paull // *Prog Brain Res*.– 1974.– Vol. 41.– P. 185-208.
129. Mori, T. The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis / T. Mori, A. Buffo, M. Götz // *Curr Top Dev Biol*.– 2005.– Vol. 69.– P. 67-99.
130. Morton, G. J. Central nervous system control of food intake and body weight / G. J. Morton, D. E. Cummings, D. G. Baskin, G. S. Barsh, M. W. Schwartz // *Nature*.– 2006. – Vol. 44, № 7109.– P. 289-295.
131. Mu, W. Hypothalamic Rax⁺ tanycytes contribute to tissue repair and tumorigenesis upon oncogene activation in mice / W. Mu, S. Li, J. Xu, X. Guo, H. Wu, Z. Chen, L. Qiao, G. Helfer, F. Lu, C. Liu, Q.F. Wu // *Nat Commun*.– 2021.– Vol. 12, № 1. – P. 2288.

132. Mukhopadhyay, M. Dickkopf1 Is Required for Embryonic Head Induction and Limb Morphogenesis in the Mouse / M. Mukhopadhyay, S. Shtrom, C. Rodriguez-Esteban [et al.] // *Developmental Cell*.– 2001 – Vol. 1.– P. 423-434.
133. Mullier, A. Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain / A. Mullier, S. G. Bouret, V. Prevot, B. Dehouck // *The Journal of Comparative Neurology*.– 2010.– Vol. 518. – P. 943–962.
134. Müller-Fielitz, H. Tanycytes control the hormonal output of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis / H. Müller-Fielitz, M. Stahr, M. Bernau, M. Richter, S. Abele, V. Krajka, A. Benzin, J. Wenzel, K. Kalies, J. Mittag, H. Heuer, S. Offermanns, M. Schwaninger // *Nat Commun*.– 2017.– Vol. 8, № 1.– P. 484.
135. Nakao, N. Possible involvement of organic anion transporting polypeptide 1c1 in the photoperiodic response of gonads in birds / N. Nakao, T. Takagi, M. Iigo, T. Tsukamoto, S. Yasuo, T. Masuda, T. Yanagisawa, S. Ebihara, T. Yoshimura // *Endocrinology*.– 2006.– Vol. 147, № 3. – P. 1067-1073.
136. Naugle, M. M. Age and Long-Term Hormone Treatment Effects on the Ultrastructural Morphology of the Median Eminence of Female Rhesus Macaques / M. M. Naugle, S. A. Lozano, F. A. Guarraci, L. F. Lindsey, J. E. Kim, J. H. Morrison, W. G. Janssen, W. Yin, A. C. Gore // *Neuroendocrinology*. – 2016. – Vol. 103, № 6. – P. 650-664.
137. Nieto-Estévez, V. IGF-I: A Key Growth Factor that Regulates Neurogenesis and Synaptogenesis from Embryonic to Adult Stages of the Brain / V. Nieto-Estévez, Ç. Defterali, C. Vicario-Abejón // *Front Neurosci*.– 2016. – Vol. 10.– P. 52.
138. Nilaweera, K. Photoperiodic regulation of glycogen metabolism, glycolysis, and glutamine synthesis in tanycytes of the Siberian hamster suggests novel roles of tanycytes in hypothalamic function / K. Nilaweera, A. Herwig, M. Bolborea, G. Campbell, C. D. Mayer, P. J. Morgan, F. J. Ebling, P. Barrett // *Glia*. – 2011. – Vol. 59, № 11. – P. 1695–1705.
139. Norden, D.M. Microglia of the Aged Brain: Primed to be Activated and Resistant to Regulation / D. M. Norden, J. P. Godbout // *Neuropathol Appl Neurobiol*.– 2013.– Vol. 39, №1.– P. 19–34.

140. Matsuda, Y. Nestin: Neural Stem/Progenitor Cell Marker in Brain Tumors / Y. Matsuda, H. Yoshimura, T. Suzuki, T. Ishiwat // In: Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications. Edited by T. Lichtor.– London: IntechOpen, 2013.– 650 p.
141. Ojeda, S. R. Puberty in the rat / S. R. Ojeda, M. K. Skinner // In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 3rd Edition. Edited by Jimmy D. Neill. –Elsevier Inc., 2006.– P. 2061-2126.
142. Orellana, J. A. Glucose increases intracellular free Ca(2+) in tanycytes via ATP released through connexin 43 hemichannels / J. A. Orellana, P. J. S´aez, C. Cort´es-Campos, R. J. Elizondo, K. F. Shoji, S. Contreras-Duarte, V. Figueroa, V. Velarde, J. X. Jiang, F. Nualart, J. C. S´aez, M. A. Garc´ia // *Glia*.– 2012. – Vol. 60, № 1. – P. 53–68.
143. Parkash, J. Semaphorin7A regulates neuroglial plasticity in the adult hypothalamic median eminence / J. Parkash, A. Messina, F. Langlet // *Nature communications*. – 2015.– Vol. 6. – P. 6385.
144. Pasquettaz, R. Peculiar protrusions along tanycyte processes face diverse neural and nonneural cell types in the hypothalamic parenchyma / R. Pasquettaz, I. Kolotuev, A. Rohrbach, C. Gouelle, L. Pellerin, F. Langlet // *J Comp Neurol*.– 2021. – Vol. 529, № 3. – P. 553-575.
145. Pearson, R. A. ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation / R. A. Pearson, N. Dale, E. Llaudet, P. Mobbs // *Neuron*.– 2005.– Vol. 46, № 5.– P. 731-44.
146. Pearson, C. A. Development of the medial hypothalamus: forming a functional hypothalamic-neurohypophyseal interface / C. A. Pearson, M. Placzek // *Curr Top Dev Biol*. – 2013. – Vol. 106. – P. 49-88.
147. Pellegrino, G. A comparative study of the neural stem cell niche in the adult hypothalamus of human, mouse, rat and gray mouse lemur (*Microcebus murinus*) / G. Pellegrino, C. Trubert, J. Terrien [et al.] // *J Comp Neurol*.– 2018.– Vol. 526, № 9. – P. 1419-1443.
148. Pena, E. 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 / E. Pena, M. T. Berciano, R. Fernandez, J. L. Ojeda, M. Lafarga // *J Comp Neurol*. – 2001. –Vol. 430, № 2. – P. 250-263.

149. Pérez-Martín, M. IGF-I stimulates neurogenesis in the hypothalamus of adult rats / M. Pérez-Martín, M. Cifuentes, J. M. Grondona, M. D. López-Avalos, U. Gómez-Pinedo, J. M. García-Verdugo, P. Fernández-Llebrez // *Eur J Neurosci.*— 2010.— Vol. 31, № 9. — P. 1533-1548.
150. Peruzzo, B. A second look at the barriers of the medial basal hypothalamus / B. Peruzzo, F. E. Pastor, J. L. Blazquez, K. Schobitz, B. Pelaez, P. Amat, E. M. Rodriguez // *Exp. Brain Res.*— 2000.— Vol. 132.— P. 10-26
151. Peruzzo, B. Polarized endocytosis and transcytosis in the hypothalamic tanycytes of the rat / B. Peruzzo, F. E. Pastor, J. L. Blázquez, P. Amat, E. M. Rodríguez // *Cell Tissue Res.* — 2004. — Vol. 317, № 2. — P. 147-164.
152. Picut, C. A. Postnatal development of the testis in the rat: morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters / C. A. Picut, A. K. Remick, E. P. de Rijk, M. L. Simons, D. G. Stump, G. A. Parker // *Toxicol Pathol.*— 2015.— Vol. 43, № 3. — P. 326-342.
153. Prevot, V. Semi-quantitative ultrastructural analysis of the localization and neuropeptide content of gonadotropin releasing hormone nerve terminals in the median eminence throughout the estrous cycle of the rat / V. Prevot, S. Dutoit, D. Croix, G. Tramu, J. C. Beauvillain // *Neuroscience.*— 1998.— Vol. 84, № 1.— P. 177-191.
154. Prevot, V. Definitive evidence for the existence of morphological plasticity in the external zone of the median eminence during the rat estrous cycle: implication of neuro-glioendothelial interactions in gonadotropin-releasing hormone release / V. Prevot, D. Croix, S. Bouret, S. Dutoit, G. Tramu, G. B. Stefano, J. C. Beauvillain // *Neuroscience.*— 1999.— Vol. 94, № 3.— P. 809–819.
155. Prevot, V. Activation of erbB-1 signaling in tanycytes of the median eminence stimulates transforming growth factor beta1 release via prostaglandin E2 production and induces cell plasticity / V. Prevot, A. Cornea, A. Mungenast, G. Smiley, S. R. Ojeda // *J. Neurosci.* — 2003.— Vol. 23, № 33.— P. 10622-10632.
156. Prevot, V. Gonadotrophin-Releasing Hormone Nerve Terminals, Tanycytes and Neurohaemal Junction Remodelling in the Adult Median Eminence: Functional Consequences for Reproduction and Dynamic Role of Vascular Endothelial Cells / V. Prevot, N. Bellefontaine, M. Baroncini, A. Sharif, N. K. Hanchate, J. Parkash, C. Campagne, S. de Seranno // *Journal of Neuroendocrinology.*— 2010.— Vol. 22.— P. 639–649.

157. Prevot, V. The Versatile Tanycyte: A Hypothalamic Integrator of Reproduction and Energy Metabolism / V. Prevot, B. Dehouck, A. Sharif, P. Ciofi, P. Giacobini, J. Clasadonte // *Endocr Rev.*– 2018.– Vol. 39, № 3.– P. 333-368.
158. Raikwar, S. P. Are Tanycytes the Missing Link Between Type 2 Diabetes and Alzheimer's Disease? / S. P. Raikwar, S. M. Bhagavan, S.B. Ramaswamy, R. Thangavel, I. Dubova, G. P. Selvakumar, M. E. Ahmed, D. Kempuraj, S. Zaheer, S. Iyer, A. Zaheer // *Mol Neurobiol.*– 2019.– Vol. 56, № 2. – P. 833-843.
159. Recabal, A. Connexin-43 Gap Junctions Are Responsible for the Hypothalamic Tanycyte-Coupled Network. / A. Recabal, R. Elizondo-Vega, C. Philippot, M. Salgado, S. López, A. Palma, E. Tarifeño-Saldivia, A. Timmermann, G. Seifert, T. Caprile, C. Steinhäuser, M. A. García-Robles // *Front Cell Neurosci.*– 2018. – Vol. 12. – P. 406.
160. Redecker, P. Postnatal development of glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in pituicytes and tanycytes of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). / P. Redecker // *Histochemistry.*– 1989. – Vol. 91, № 6. P. 507-515.
161. Redecker, P. Immunogold electron microscopic localization of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in neurohypophyseal pituicytes and tanycytes of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) / P. Redecker // *Histochemistry.*– 1989. – Vol. 91, № 4. – P. 333-337.
162. Rinne, U. K. Ultrastructure of the median eminence of the rat / U. K. Rinne // *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* – 1966. – Vol. 74, № 1. – P. 98-122.
163. Rizzoti, K. Pivotal role of median eminence tanycytes for hypothalamic function and neurogenesis / K. Rizzoti, R. Lovell-Badge // *Mol Cell Endocrinol.*– 2017.– Vol. 445.– P. 7-13.
164. Roberts, L. M. Expression of the thyroid hormone transporters monocarboxylate transporter-8 (SLC16A2) and organic ion transporter-14 (SLCO1C1) at the blood-brain barrier / L. M. Roberts, K. Woodford, M. Zhou, D. S. Black, J. E. Haggerty, E. H. Tate, K. K. Grindstaff, W. Mengesha, C. Raman, N. Zerangue // *Endocrinology.*– 2008.– Vol. 149, № 12. – P. 6251–6261.
165. Robins, S. C. α -Tanycytes of the adult hypothalamic third ventricle include distinct populations of FGF-responsive neural progenitors / S. C. Robins, I. Stewart, D. E. McNay [et al.] // *Nat Commun.* – 2013. Rodríguez EM. Vol. 4. – P. 2049.

166. Rodríguez, E. M. Ependymal specializations. I. Fine structure of the neural (internal) region of the toad median eminence, with particular reference to the connections between the ependymal cells and the subependymal capillary loops / E. M. Rodríguez // *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* – 1969. – Vol. 102, № 2. – P. 153-171.
167. Rodríguez, E. M. Cellular organization of the lateral and postinfundibular regions of the median eminence in the rat / E. M. Rodríguez, C. B. González, L. Delannoy // *Cell Tissue Res.* – 1979. – Vol. 201. – P. 377-408.
168. Rodríguez, E. M. Hypothalamic tanycytes: a key component of brain- endocrine interaction / E. M. Rodríguez, J. L. Blázquez, F. E. Pastor, B. Peláez, P. Peña, B. Peruzzo, P. Amat // *Int Rev Cytol.* – 2005. – Vol. 247. – P. 89-164.
169. Rodríguez, E. M. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid / E.M. Rodríguez, J. L. Blázquez, M. Guerra // *Peptides.* – 2010. – Vol. 31, № 4. – P. 757-776.
170. Rodríguez, E. Tanycytes: A rich morphological history to underpin future molecular and physiological investigations / E. Rodríguez, M. Guerra, B. Peruzzo, J. L. Blázquez // *J Neuroendocrinol.* – 2019 – Vol. 31, № 3. – P. e12690.
171. Rojczyk, E. Effects of neuroleptics administration on adult neurogenesis in the rat hypothalamus / E. Rojczyk, A. Pałasz, R. Wiaderkiewicz // *Pharmacol Rep.* – 2015. – Vol. 67, № 6. – P. 1208-1214.
172. Saaltink, D. J. Doublecortin and doublecortin-like are expressed in overlapping and non-overlapping neuronal cell population: implications for neurogenesis / D. J. Saaltink, B. Håvik, C. S. Verissimo, P. J. Lucassen, E. Vreugdenhil // *J Comp Neurol.* – 2012. – Vol. 520, № 13. – P. 2805-2823.
173. Sáenz de Miera, C. Circannual variation in thyroid hormone deiodinases in a short-day breeder / C. Sáenz de Miera, E. A. Hanon, H. Dardente, M. Birnie, V. Simonneaux, G. A. Lincoln, D. G. Hazlerigg // *J Neuroendocrinol.* – 2013. – Vol. 25, № 4. – P. 412-421.
174. Salgado, M. Dynamic localization of glucokinase and its regulatory protein in hypothalamic tanycytes. / M. Salgado, E. Tarifeño-Saldivia, P. Ordenes [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, № 4. – P. e94035.

175. Salvatierra, J. The LIM homeodomain factor Lhx2 is required for hypothalamic tanycyte specification and differentiation / J. Salvatierra, D. A. Lee, C. Zibetti [et al.] // *J Neurosci.* – 2014.– Vol. 34, № 50. – P. 16809-16820.
176. Sánchez, E. Tanycyte pyroglutamyl peptidase II contributes to regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the median eminence / E. Sánchez, M. A. Vargas, P. S. Singru, I. Pascual, F. Romero, C. Fekete, J. L. Charli, R. M. Lechan // *Endocrinology.*– 2009.– Vol. 150, № 5. – P. 2283–2291.
177. Sanders, N. M. Third ventricular alloxan reversibly impairs glucose counterregulatory responses / N. M Sanders, A. A. Dunn-Meynell, B. E. Levin // *Diabetes.*– 2004. – Vol. 53, № 5. – P. 1230-1236.
178. Sarnat, H.B. Regional differentiation of the human fetal ependyma: immunocytochemical markers / H.B. Sarnat // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 1992.– Vol. 51. – P. 58–75.
179. Sawicka, A. Histone H3 phosphorylation - a versatile chromatin modification for different occasions / A. Sawicka, C. Seiser // *Biochimie.* – 2012. – Vol. 94, № 11. – P. 2193-2201.
180. Schaeffer, M. Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. / M. Schaeffer, F. Langlet, C. Lafont [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2013. – Vol. 110, № 4. – P. 1512–1517.
181. Schindelin, J. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis / J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise [et al.] // *Nat Methods.*– 2012.– Vol. 9, № 7.– P. 676-682.
182. Schuit, F. C. Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus / F. C. Schuit, P. Huypens, H. Heimberg, D. G. Pipeleers // *Diabetes.*– 2001.– Vol. 50, № 1.– P. 1-11.
183. Scott, D. E. Age related changes in the endocrine hypothalamus: I. Tanycytes and the blood-brain-cerebrospinal fluid barrier / D. E. Scott, J. R. Jr. Sladek // *Neurobiol Aging.*– 1981. – Vol. 2, № 2. – P. 89-94.
184. Sengupta, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's / P. Sengupta // *Int J Prev Med.* – 2013. – Vol. 4, № 6. – P. 624-630.
185. Seress, L. Development and structure of the radial glia in the postnatal rat brain / L. Seress // *Anat Embryol.*– 1980.– Vol. 160.– P. 213-226.

186. Sharif, A. When Size Matters: How Astrocytic Processes Shape Metabolism / A. Sharif, V. Prevot // *Cell Metab.*– 2017.– Vol. 25, № 5. – P. 995-996.
187. Spacek, J. Relationships between mitochondrial outer membranes and agranular reticulum in nervous tissue: ultrastructural observations and a new interpretation / J. Spacek, A. R. Lieberman // *J Cell Sci.* – 1980. – Vol. 46. – P. 129-147.
188. Sterzi G., *Il sistema nervoso centrale dei vertebrati : ricerche anatomiche ed embriologiche*, Padova : A. Draghi, 1907-1912.
189. Sterzi, G. *Il Sistema Nervoso Centrale Dei Vertebrati* / G. Sterzi // *Ricerche Anatomiche Ed Embriologiche.*– Padova: Draghi, 1907.
190. Suarez, I. Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia / I. Suarez, G. Bodega, B. Fernandez // *Neurochem. Int.*– 2002. – Vol.41. – P.123-142.
191. Swaab, D. F. Infundibular nucleus (arcuate nucleus), subventricular nucleus and median eminence / D. F. Swaab // In: *The Human Hypothalamus: Basic and Clinical Aspects. Part I: Nuclei of the Human Hypothalamus.* Edited by Dick F. Swaab. *Handbook of Clinical Neurology.*– 2003.– Vol. 79.– P. 249- 261.
192. Szarek, E. Molecular genetics of the developing neuroendocrine hypothalamus / E. Szarek, P. S. Cheah, J. Schwartz, P. Thomas // *Molecular and Cellular Endocrinology.* – 2010. – Vol.323. – P.115-123.
193. Szilvásy-Szabó, A. Localization of connexin 43 gap junctions and hemichannels in tanycytes of adult mice / A. Szilvásy-Szabó, E. Varga, Z. Beliczai, R. M. Lechan, C. Fekete // *Brain Res.*–2017. – Vol. 1673. – P. 64-71.
194. Takagi, S. Microglia are continuously activated in circumventricular organs of mouse brain / S. Takagi, E. Furube, Y. Nakano, M. Morita, S. Miyata // *J.Neuroimmunology.* – 2019. – Vol. 331. – P. 74-79.
195. Tsai, P. S. Fibroblast growth factor signaling in the developing neuroendocrine hypothalamus / P. S. Tsai, L. R. Brooks, J. R. Rochester, S. I. Kavanaugh, W. C. Chung // *Front Neuroendocrinol.*– 2011. – Vol. 32, № 1.– P. 95-107.
196. Ugrumov, M. V. The adsorptive and transport capacity of tanycytes during the perinatal period of the rat / M. V. Ugrumov, M. S. Mitskevich // *Cell Tissue Res.*– 1980.– Vol. 211, № 3.– P. 493-501.

197. Ugrumov, M. V. Interrelations between neural elements and tanycytes during the perinatal period of the rat / M.V. Ugrumov, M. S. Mitskevich // *Cell Tiss. Res.*– 1981.– Vol. 215, № 3.– P. 633–641.
198. Ugrumov, M. V. Ependymal lining of infundibular recess in perinatal rats: relationships with portal capillaries and permeability / M. V. Ugrumov, M. S. Mitskevich, B. Halász, J. Kiss, N. A. Borisova // *Int J Dev Neurosci.* – 1986. – Vol. 4, № 2. – P. 101-111.
199. Ugrumov, M. V. Development of the median eminence during ontogenesis (morpho-functional aspects) / M. V. Ugrumov // *Prog Brain Res.*– 1992. – Vol. 91.– P. 349-356.
200. Wang, J. New Insights into the Regulation of Heterochromatin / J. Wang, S. T. Jia, S. Jia // *Trends Genet.* – 2016. – Vol. 32, № 5. – P. 284-294.
201. Watanabe, M. Photoperiodic regulation of type 2 deiodinase gene in Djungarian hamster: possible homologies between avian and mammalian photoperiodic regulation of reproduction / M. Watanabe, S. Yasuo, T. Watanabe, T. Yamamura, N. Nakao, S. Ebihara, T. Yoshimura // *Endocrinology.*– 2004.– Vol. 145, № 4.– P. 1546–1549.
202. Watanabe-Susaki, K. Biosynthesis of ribosomal RNA in nucleoli regulates pluripotency and differentiation ability of pluripotent stem cells / K. Watanabe-Susaki, H. Takada, K. Enomoto, K. Miwata, H. Ishimine, A. Intoh, M. Ohtaka, M. Nakanishi, H. Sugino, M. Asashima, A. Kurisaki // *Stem Cells.* – 2014. – Vol. 32, № 12. – P. 3099 – 3111.
203. Wiencken-Barger, A. E. A role for Connexin43 during neurodevelopment / A. E. Wiencken-Barger, B. Djukic, K. B. Casper, K. D. McCarthy // *Glia.* – 2007. – Vol. 55, № 7. – P. 675-686.
204. Weissman, T. A. Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex / T. A. Weissman, P. A. Riquelme, L. Ivic, A. C. Flint, A. R. Kriegstein // *Neuron.*– 2004.– Vol. 43, № 5.– P. 647-661.
205. Xu, J. P2X4 Receptor Reporter Mice: Sparse Brain Expression and Feeding-Related Presynaptic Facilitation in the Arcuate Nucleus / J. Xu, A. M. Bernstein, A. Wong, X. H. Lu, S. Khoja, X. W. Yang, D. L. Davies, P. Micevych, M. V. Sofroniew, B. S. Khakh // *J Neurosci.* – 2016. – Vol. 36, № 34. – P. 8902-8920.

206. Xu, Y. Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle / Y. Xu, N. Tamamaki, T. Noda, K. Kimura, Y. Itokazu, N. Matsumoto, M. Dezawa, C. Ide // *Exp Neurol.* – 2005. – Vol. 192, № 2. – P. 251–264.
207. Yaba, A. Expression of aquaporin-7 and aquaporin-9 in tanycyte cells and choroid plexus during mouse estrus cycle / A. Yaba, B. Sozen, B. Suzen, N. Demir // *Morphologie.* – 2017. – Vol. 101, № 332. – P. 39-46.
208. Yang, Z. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker / Z. Yang, K. K. Wang // *Trends Neurosci.* – 2015. – Vol. 38, № 6. – P. 364-374.
209. Yin, W. Gonadotropin-releasing hormone neuroterminals and their microenvironment in the median eminence: effects of aging and estradiol treatment / W. Yin, D. Wu, M. L. Noel, A. C. Gore // *Endocrinology.* – 2009. – Vol. 150, № 12. – P. 5498-5508.
210. Yin, W. The hypothalamic median eminence and its role in reproductive aging / W. Yin, A. C. Gore // *Ann N Y Acad Sci.* – 2010. – Vol. 1204. – P. 113-122.
211. Yoo, S. Tanycyte ablation in the arcuate nucleus and median eminence increases obesity susceptibility by increasing body fat content in male mice / S. Yoo, D. Cha, S. Kim, L. Jiang, P. Cooke, M. Adebessin, A. Wolfe, R. Riddle, S. Aja, S. Blackshaw // *Glia.* – 2020. – Vol. 68, № 10. – P. 1987-2000.
212. Yoshimura, T. Light-induced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds / T. Yoshimura, S. Yasuo, M. Watanabe, M. Iigo, T. Yamamura, K. Hirunagi, S. Ebihara // *Nature.* – 2003. – Vol. 426, № 6963. – P. 178-181.
213. Yulyaningsih, E. Acute lesioning and rapid repair of hypothalamic neurons outside the blood-brain barrier / E. Yulyaningsih, I. A. Rudenko, M. Valdearcos, E. Dahl'en, E. Vagena, A. Chan, A. Alvarez-Buylla, C. Vaisse, S. K. Koliwad, A. W. Xu // *Cell Reports.* – 2017. – Vol. 19, № 11. – P. 2257–2271.
214. Zhang, S. Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation / S. Zhang, W. Cui // *World J Stem Cells.* – 2014. – Vol. 6, № 3. – P. 305-311.
215. Zhang, Y. Hypothalamic stem cells control ageing speed partly through exosomal miRNAs / Y. Zhang, M. S. Kim, B. Jia, J. Yan, J. P. Zuniga-Hertz, C. Han, D. Cai // *Nature.* – 2017. – Vol. 548, № 7665. – P. 52-57.

216. Zhou, Y. Novel aspects of glutamine synthetase in ammonia homeostasis / Y. Zhou, T. Eid, B. Hassel, N. C. Danbolt // *Neurochem Int.*– 2020.– Vol. 140. – P. 104809.
217. Zimmermann, H. Purinergic signaling in neural development / H. Zimmermann // *Semin. Cell Dev. Biol.*– 2011. – Vol. 22. – P. 194–204.
218. Zoli, M. Age-related alterations in tanycytes of the mediobasal hypothalamus of the male rat / M. Zoli, F. Ferraguti, A. Frasoldati, G. Biagini, L. F. Agnati // *Neurobiol Aging.* – 1995. – Vol. 16, № 1. – P. 77-83.