

Морфологическое исследование телоцитов в различных отделах нормального головного мозга взрослого человека

Митрофанова Л.Б.¹, Хазратов А.О.¹, Красношлык П.В.¹, Воробьева О.М.¹, Горшков А.Н.^{1,2}, Гуляев Д.А.¹

ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова», Санкт-Петербург, 197143

ФГБУ "НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева" Санкт-Петербург, 197376

Электронный адрес для корреспонденции: lubamitr@yandex.ru – Митрофанова

Любовь Борисовна

Введение: телоциты обладают противовоспалительными, регенераторными и пейсмекерными свойствами, образуют 3D-сеть практически во всех органах и являются координаторами межклеточных взаимоотношений за счет множественных разнообразных контактов и микровезикул. Доказано их наличие в твердой мозговой оболочке и сосудистом сплетении желудочков головного мозга. **Цель исследования:** морфологическое исследование телоцитов в различных отделах нормального головного мозга. **Материалы и методы:** материалом исследования послужили различные отделы головного мозга женщины 53 лет и 2 мужчин 64 и 67 лет; 2 фрагмента нормальной ткани полушарий мозжечка и 2 фрагмента твердой мозговой оболочки мужчин 45 и 39 лет (операционный материал перифокальной зоны астроцитомы и глиобластомы). Методы включали: гистологическое и иммуногистохимическое исследование с CD117, NeuroD1, коктейлями NeuroD1/connexin43 и CD34/connexin43; электронную микроскопию и иммуноцитохимию с CD117; выделение культур телоцитов; фазово-контрастную микроскопию и конфокальную лазерную сканирующую микроскопию культур. **Результаты:** в твердой мозговой оболочке (до 24,5% от всех клеток), сосудистом сплетении желудочков (до 28% от всех клеток), коре больших полушарий (до 1%), подкорковых ядрах (до 77% в некоторых зонах), продолговатом мозге (до 14%), мосту (до 12%), мозолистом теле (до 95%), гиппокампе (от 0,0001 до 90% в различных слоях), мозжечке нормального головного мозга (от 6 до 90% в различных отделах) взрослых выявлены CD117-позитивные клетки. С помощью ультраструктурного анализа и конфокальной микроскопии выделенных культур определены клетки с характеристиками телоцитов, экспрессирующие NeuroD1. **Заключение:** обнаружение телоцитов с экспрессией NeuroD1 во многих отделах головного мозга может свидетельствовать о возможном участии этих клеток в развитии

центральной нервной системы. Дальнейшее понимание функций и происхождения телочитов, изучение их роли в онкогенезе опухолей головного мозга может привести к новым целенаправленным методам лечения не только нейрососудистых заболеваний, но и новообразований.

Ключевые слова: телочиты головного мозга, иммуногистохимическое исследование, электронная микроскопия и иммуноцитохимия, выделение культур

Morphological study of telocytes in different parts of the normal adult human brain

Mitrofanova LB¹, Khazratov AO¹, Krasnoshlyk PV¹, Vorobyova OM¹, Gorshkov AN^{1,2},
Gulyaev DA¹

Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, 197143

Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376

Introduction: Telocytes have anti-inflammatory, regenerative and pacemaker properties, form a 3D network in almost all organs and coordinate intercellular relationships through multiple different contacts and microvesicles. These cells were found in the dura mater and choroid plexus of the cerebral ventricles. **Objective:** morphological study of telocytes in various parts of the normal brain. **Materials and methods:** Different parts of the normal brain of the 53-year-old woman and the 2 men aged 64 and 67 were examined. Two fragments of the normal tissue of the cerebellar hemispheres and two fragments of the dura mater were studied also in 2 men aged 45 and 39 (surgical material of the perifocal zone of astrocytoma and glioblastoma). Methods included histological and immunohistochemical study with CD117, NeuroD1, NeuroD1/connexin43 and CD34/connexin43 cocktails; electron microscopy and immunocytochemistry with CD117; isolation of telocyte cultures; phase-contrast microscopy and confocal laser scanning microscopy of cultures. **Results:** CD117-positive cells were detected in the dura mater (up to 24.5% of all cells), ventricular plexus (up to 28% of all cells), cerebral cortex (up to 1%), subcortical nuclei (up to 77% in some zones), the oblongated marrow (up to 14%), the pons (up to 12%), the corpus callosum (up to 95%), the hippocampus (from 0.0001 to 90% in different layers), the cerebellum of the normal brain (6 to 90 % in different departments). Cells with telocyte characteristics expressing NeuroD1 were identified using ultrastructural analysis and confocal microscopy of isolated cultures. **Conclusion:** The detection of telocytes

with expression of NeuroD1 in many parts of the brain may indicate the possible involvement of these cells in the development of the central nervous system. Further understanding of the functions and origin of telocytes, the study of the role of telocytes in the oncogenesis of brain tumors can lead to new, purposeful methods of treating not only neurovascular diseases but also neoplasms.

Key words: brain telocytes, immunohistochemical examination, electron microscopy and immunocytochemistry, isolation of cultures

В 1893 г. испанский нейрогистолог S. Ramon-y-Cajal описал клетки, расположенные в мышечной стенке желудочно-кишечного тракта, являющиеся особыми элементами интрамуральных нервных сплетений и регулирующие моторику желудочно-кишечного тракта. Ученый назвал их «интерстициальными нейронами». В 1977–1982 гг. M.S. Faussone-Pellegrini и L. Thuneberg, используя данные электронной микроскопии, независимо друг от друга пришли к выводу, что вышеуказанные «интерстициальные нейроны» не имеют отношения к нервной ткани, а являются производными мезенхимы. В 2010 году Popescu L.M. назвал эти клетки телоцитами. Телоциты или интерстициальные пейсмекерные клетки, как было описано в работах Popescu L.M. et al [2007, 2010, 2011], Bei Y. et al [2015], Kostin S. and Popescu L.M. [2009] обладают противовоспалительными, регенераторными, пейсмекерными свойствами, образуют 3D-сеть практически во всех органах и являются координаторами межклеточных взаимоотношений за счет множественных разнообразных контактов и микровезикул [Ratajczak M.Z. et al, 2016]. Popescu B.O. et al [2012] доказали наличие телоцитов в твердой мозговой оболочке и сосудистом сплетении желудочков головного мозга. Contarero I et al [2011] в своей работе показали, что телоциты тесно контактируют с сосудами микроциркуляторного русла. Zheng Y. et al [2012, 2014] продемонстрировали участие интерстициальных пейсмекерных клеток в аэрогематическом барьере в сосудах легких, доказали их наличие между гладкомышечными клетками и эндотелиоцитами капилляров легких. Участие клеток в ангиогенезе при инфаркте миокарда было показано в работе Manole C.G. et al [2011].

Телоциты – уникальный тип интерстициальных клеток со специфическими отростками – телоподиями и дилатированными сегментами – подомами [Popescu LM, et al., 2011]. Имеют иммунофенотип одновременно интерстициальных, эндотелиальных, гладкомышечных, нервных, тучных и гемопоэтических стволовых клеток, экспрессируют

CD117, vimentin, CD34, SMA, S100, NSE, а также connexin43 – белок щелевых межклеточных контактов – gap junctions [Harhun MI, et al., 2004, Smythies J et al., 2014, Popescu LM, Fertig ET, Gherghiceanu M., 2016]. Телоциты участвуют в воспалении, регенерации, ангиогенезе, являются «дирижерами» межклеточных взаимоотношений между разными видами клеток и тканей. Они обладают пейсмекерной активностью, экспрессируют медиаторы воспаления и факторы ангиогенеза PDGFR, VEGF, VEGF, EGF, FGF, TGF [Popescu LM, Manole E. et al, 2011, Cretoiu et al., 2013; Milia et al., 2013].

В последние десятилетия появились работы о Neuro D1 – факторе транскрипции, который был обнаружен в нервной системе взрослого человека, в эндокринных клетках примитивных нейроэктодермальных опухолей [Oyama K., 2001]. Известно, что этот фактор участвует в нейрогенезе, в том числе контролируя возможность трансдифференцировки других типов клеток в нейроны, является регулятором развития головного мозга в целом [Pataskar A., 2016]. Известно, что Neuro D1 играет важную роль в дифференцировке, морфогенезе и поддержании клеток центральной нервной системы [Liu M., 2000]. Он экспрессируется в гипофизе и в клетках-предшественниках «эндокринной» части поджелудочной железы, как на этапах ее формирования, так и у взрослых [Bell G.I., 2001; Cerf M.E., 2006; Oyama K., 2001], секретируется в клетках нейроэктодермы [Lee J.E., 1995].

Учитывая широкую распространенность телоцитов в различных органах и тканях, мы предположили, что в головном мозге эти клетки присутствуют не только в твердой мозговой оболочке и сосудистом сплетении желудочков, но и в других отделах. На сегодняшний день неизвестно, экспрессируют ли телоциты Neuro D1.

Цель исследования: морфологическое исследование телоцитов в различных отделах нормального головного мозга

Материалы и методы: материалом исследования послужили: 1) твердая мозговая оболочка, гиппокамп, аденогипофиз, эпифиз, мозолистое тело, мост, подкорковые ядра, эпендима и субэпендимальные отделы, сосудистое сплетение 3 желудочка, кора лобной доли, продолговатый мозг женщины 53 лет, умершей от острого альтеративного гепатита, мужчин 64 и 67 лет с приобретенными пороками сердца, умерших от хронической сердечной недостаточности; 2 фрагмента нормальной ткани полушарий мозжечка и 2 фрагмента твердой мозговой оболочки мужчин 45 и 39 лет (операционный материал перифокальной зоны астроцитомы и глиобластомы при операции блок-резекции опухоли). Методы включали: 1) гистологическое исследование всех фрагментов головного мозга

всех пациентов с рутинной окраской гематоксилином и эозином, 2) иммуногистохимическое исследование, в том числе, с двойной меткой; 3) электронную микроскопию и иммуноцитохимию операционного материала нормального мозжечка 2 пациентов; 4) выделение культур телоцитов из нормальных твердой мозговой оболочки и полушарий мозжечка пациентов с глиальными опухолями, 5) фазово-контрастную микроскопию полученных 4 культур клеток от 2 пациентов (операционный материал); 6) конфокальную лазерную сканирующую микроскопию 4 культур; 7) морфометрическое исследование с определением процентного отношения этих клеток к остальным.

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование проводилось на парафиновых блоках. Использовались антитела к CD117 (Novusbio, USA; мышиные), GFAP (DAKO, Denmark; мышиные), NeuroD1 (Abcam, United Kingdom; мышиные) и коктейль CD34(DAKO, Denmark; мышиные)/connexin43 (Cell Signaling, USA; кроличьи) во всех образцах ткани.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия 4 культур проводилась с коктейлями CD34/connexin43 и NeuroD1/ connexin43; GFAP и CD117 (использовались те же антитела, что и для иммуногистохимического исследования), с вторичными антителами Alexa Fluor 488 ® goat anti-mouse (Thermo Fisher Scientific), Alexa Fluor 568 ® goat anti-rabbit (Thermo Fisher Scientific), с контрастированием ядер клеток DAPI (appliChem).

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия проводилась на микроскопе Leica TCS SP8 (Germany).

Для электронной микроскопии небольшие фрагменты коры мозжечка фиксировались в 2,5%-ом растворе глютарового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего промывались в трёх сменах фосфатного буфера. Далее выполнялась фиксация кусочков в 1% растворе тетроксидосмия на том же буфере, при той же температуре в течение 1 ч. После фиксации объекты были дегидратированы в серии растворов этанола возрастающей концентрации, пропитаны ацетоном и заключены в эпоксидную смолу Эпон. Полутонкие срезы (1-2 мкм) были окрашены толуидиновым синим для выбора зон интереса. Затем из блоков, содержащих клетки с гистологическими характеристиками телоцитов, на ультрамикротоме Leica UC7 были получены ультратонкие срезы толщиной 50-70 нм. Срезы были помещены на медные сетки и контрастированы в

спиртовом растворе уранил-ацетата и водном растворе цитрата свинца. Электронно-микроскопическое исследование срезов было выполнено на микроскопе JEOL JEM 1011. Электронные микрофотографии были получены с использованием камеры Morada (Digital Imaging Solutions Inc.).

Для электронной иммуноцитохимии фрагменты мозжечка фиксировались в 4% растворе параформальдегида в фосфатном буфере с добавлением 0,2% глutarальдегида в течение 1 часа. Далее объекты дегидратировали в серии растворов этанола возрастающей концентрации и заключали в акриловую смолу LRWhite (Sigma inc.). Полимеризация смолы проходила в закрытых желатиновых капсулах при температуре +52° С. На ультрамикротоме Leica UC7 были получены ультратонкие срезы изучаемого материала толщиной 50-70 нм. Срезы были собраны на никелевые сетки для электронной микроскопии. С целью блокирования неспецифического связывания антител срезы на сетках обрабатывали 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (Sigma Inc.) в фосфатном буфере в течение 15 мин при комнатной температуре. CD117 на ультратонких срезах выявляли непрямой метод. В качестве первичного было использовано мышинное поликлональное антитело к CD117 (Novusbio, USA). Сеточки со срезами инкубировали в растворе указанных антител на фосфатном буфере (1:100) в течение 1 часа и отмывали в 0,05% растворе Твина-20 в фосфатном буфере. В качестве вторичных антител использовали антитела козы против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с коллоидным золотом диаметром 10 нм (Sigma; разведение 1:100, инкубация в течение 1 часа). После проведения иммунной реакции сетки со срезами были контрастированы в водном растворе уранил-ацетата и водном растворе цитрата свинца. Электронномикроскопическое исследование срезов выполнялось на том же микроскопе JEOL JEM 1011. Цифровые электронные микрофотографии были получены с использованием камеры Morada (Digital Imaging Solutions Inc.).

Выделение культур телоцитов

Сразу же после операции фрагменты тканей в стерильной таре доставлялись в лабораторию. Образцы тканей измельчали до фрагментов величиной не более 1 мм в растворе 0,1% коллагеназы (тип III), после чего полученные суспензии инкубировали при 37°С в течении 30 минут. Гомогенизаты тканей отмывали от фермента ФСБ, содержащим 10% фетальной коровьей сыворотки (ФКС), после чего высевали на культуральные фласки площадью 25 см² в питательной среде α -MEM, содержащей 10% ФКС, 1%

глутамин и 1% смеси пенициллин/стрептомицин. Первичные культуры тканей инкубировали в стандартных условиях культивирования (5% CO₂, 37°C) до появления в культуре адгезивных фибробластоподобных клеток. Каждые 48 часов производили замену 50% культуральной среды. После появления в культурах колоний стромальных клеток образцы отмывали от фрагментов тканей ФСБ и культивировали до достижения культурами субконфлюентности.

Для обогащения телоцитами первичной культуры стромальных клеток, культуры разделяли по градиенту адгезии. Клетки снимали с культуральных фласков 0,05% раствором трипсина, отмывали ФСБ, после чего высевали на новые культуральные фласки (пересев 1). Через 60 минут с фласков снимали культуральную среду, содержащую неприкрепившиеся клетки, и пересевали на новые фласки (пересев 2). Полученные культуры инкубировали в стандартных культуральных условиях.

Охарактеризование телоцитов в культурах клеток проводили с помощью фазовой контрастной микроскопии, иммунофлуоресцентной микроскопии и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии с коктейлем антител CD34/connexin43 и NeuroD1/connexin43; GFAP и CD117, вторичными антителами Alexa Fluor 488 ® goat anti-mouse (Thermo Fisher Scientific), Alexa Fluor 568 ® goat anti-rabbit (Thermo Fisher Scientific), с контрастированием ядер клеток DAPI (applied Biosystems) на микроскопе Leica DM4000 и конфокальном сканирующем микроскопе Leica TCS SP8 (Germany). Культуры клеток высевали на покровные стекла и инкубировали 48 часов, после чего фиксировали в 4% растворе параформальдегида 15 минут при +4°C и инкубировали 30 минут в присутствии первичных и 30 минут – в присутствии вторичных антител.

Результаты исследования:

Гистологическое исследование выявило нормальную гистоархитектонику отобранных образцов разных отделов головного мозга у взрослых пациентов. Иммуногистохимический анализ определил наличие клеток с экспрессией CD117 и двойной меткой (бордовое окрашивание) CD34/connexin43, строением телоцитов во всех образцах.

Наименьшее количество клеток с иммуногистохимической характеристикой телоцитов (0,5-1%) было в коре головного мозга, аденогипофизе, эпифизе (до 1%) и слое пирамидных нейронов гиппокампа (0,0001%; таблица 1). Наибольшее количество клеток с иммуногистохимическим профилем телоцитов у взрослых пациентов было в

молекулярном слоях гиппокампа (до 90%) и коры мозжечка (до 90%), мозолистом теле (95%). В основном наблюдались скопления CD117+ клеток с характеристиками телоцитов (Рис. 1-3), а в зонах их меньшей численности (мост и твердая мозговая оболочка) клетки визуализировались периваскулярно (Рис. 4).

Максимальное количество Neuro D1-позитивных клеток у взрослых пациентов было в зубчатом ядре (до 89%; Рис. 5), коре полушарий (до 87%), молекулярном и зернистом слоях коры мозжечка (до 83%; Рис. 6) и ромбовидной ямке (до 80%).

Таблица 1.

Среднее относительное количество клеток с экспрессией CD117 и Neuro D1 в различных отделах головного мозга

Отделы головного мозга	Среднее относительное количество клеток с экспрессией CD117 (%)	Среднее относительное количество клеток с экспрессией Neuro D1 (%)
Твердая мозговая оболочка	До 24,5 (от 9 до 24,5)	Нет данных
Кора больших полушарий	До 1 (от 0,5 до 1)	До 87
Аденогипофиз	До 1 (от 0,5 до 1)	До 67
Эпифиз	До 1 (от 0,5 до 1)	Нет данных
Зубчатое ядро мозжечка	До 25 (от 9 до 25)	До 89
Зернистый слой коры мозжечка	До 6	До 82 (от 9 до 82)
Молекулярный слой коры мозжечка	До 90	До 83
Хвостатое ядро/скорлупа	До 77/87 (от 6 до 87), зонами	До 47
Мост	До 12 (от 0,1 до 12), зонами	Нет данных
Сосудистое сплетение	До 28	Нет данных
Ромбовидная ямка	До 14, зонами	До 80
Молекулярный слой гиппокампа	До 90	Нет данных
Полиморфный слой гиппокампа	До 80	Нет данных
Слой пирамидных нейронов гиппокампа	0,0001	Нет данных
Мозолистое тело	До 95	Нет данных

Электронная микроскопия коры мозжечка выявила неравномерный отек. Клетки с характеристиками телоцитов были обнаружены в стенках капилляров, контактировали с астроцитами (Рис. 7). Они располагались под эндотелиоцитами и базальной мембраной, имели длинные, тонкие, извитые цитоплазматические отростки - телоподии толщиной

0,1-0,3 мкм, длиной 40 мкм и более, окружающие эндотелиоциты, и подомы - утолщения телоподий (Рис. 8) Достоверно оценить истинную длину отростков на ультратонких срезах было затруднительно, т.к. отростки имели неправильную форму и уходили из плоскости среза. Ультраструктурная организация данных клеток полностью совпадала с неоднократно описанными ранее в других органах телоцитами [Popescu L.M. et al., 2010]. Сложная синаптоархитектоника молекулярного слоя коры мозжечка с тесным расположением аксонов и дендритов разных клеток (Рис. 9) и их многочисленными контактами не позволила идентифицировать на поперечных срезах телоподии телоцитов, что послужило поводом для проведения электронной иммуноцитохимии с антителами к CD117.

Электронномикроскопическая иммунодетекция CD117 на ультратонких срезах коры мозжечка позволила обнаружить данный белок в составе телоцитов, что соответствует нашим иммуногистохимическим данным. Непрямое иммуномечение выявило CD117 в виде небольших скоплений коллоидного золота (Рис. 10).

В культурах нормальных твердой мозговой оболочки и полушарий мозжечка пациентов с глиомами на 4-5 сутки культивирования наблюдались гетерогенные колонии фибробластоподобных стромальных клеток, отличающиеся по размеру и форме (Рис. 11). Так, в большом количестве содержались ромбовидные и веретенообразные клетки. В меньшей степени наблюдались клетки, соответствующие по морфологии телоцитам — имеющие маленькое, угловатое тело и длинные изогнутные отростки (телоподии), разделяющиеся на 2 ветви. Также определялись многочисленные тесные контакты телоподий телоцитов с другими клетками, причем как с телоцитами, так и с фибробластоподобными (в культуре из твердой мозговой оболочки) или глиальными (в культуре из мозжечка; Рис. 12), образуя обширную сеть клеток, связанных между собой.

После двойного пересева с каждого образца получали по две культуры, различающиеся по плотности и морфологии колоний клеток. Так, в культурах пересева 1 наблюдались колонии преимущественно фибробластоподобных клеток высокой плотности. В единичных случаях определялись отдельно лежащие клетки, морфологически соответствующие телоцитам. В культурах пересева 2 наблюдали низкую степень конфлюентности, высокое (до 30%) содержание телоцитов, соединенных телоподиями между собой и с фибробластоподобными клетками.

Конфокальная микроскопия с антителом к CD117 выявила зеленую гранулярную флуоресценцию в цитоплазме клеток с характеристиками телоцитов во всех культурах клеток нормальных твердой мозговой оболочки и коры мозжечка (Рис.13). Причем эти клетки не экспрессировали GFAP. Конфокальная микроскопия с коктейлем CD34/connexin43 позволила определить коэкспрессию двух антител в виде диффузной желтой флуоресценции в цитоплазме клеток с характеристиками телоцитов (Рис. 14). При использовании коктейля NeuroD1/connexin43 была обнаружена зеленая флуоресценция NeuroD1 в ядре, а красная флуоресценция connexin43 в цитоплазме одних и тех же телоцитов культур (Рис.15).

Таким образом, иммуногистохимическое и ультраструктурное исследование нормальных тканей головного мозга, фазово-контрастная и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия культур, полученных из нормальных коры мозжечка и твердой мозговой оболочки взрослого человека, показали наличие телоцитов в различных отделах головного мозга.

Обсуждение полученных результатов исследования

Нам представляется логичным присутствие телоцитов не только в твердой мозговой оболочке и сосудистом сплетении желудочков, но и в других отделах головного мозга, равно как и минимальное количество их в таких высокоспециализированных отделах, как кора больших полушарий, аденогипофиз и эпифиз. С помощью конфокальной микроскопии выделенных культур телоцитов мы доказали, что эти клетки экспрессируют Neuro D1. Следовательно, телоциты могут участвовать в нейрогенезе и регулировать развитие головного мозга в целом.

Электронная микроскопия и иммуногистохимическое исследование с CD117 выявили телоциты в стенке некоторых капилляров, в то время как во многих работах в сосудах головного мозга описывают перициты. Впервые перициты были найдены в 1873 году французским ученым Charles-Marie Benjamin Rouget и первоначально назывались клетками Rouget [Dore-Duffy P, Cleary K., 2011]. Они были переименованы через несколько лет из-за своей локализации и тесных контактов с эндотелиальными клетками. Считается, что в головном мозге перициты расположены в прекапиллярных артериолах, капиллярах и посткапиллярных венах. В физиологических условиях перициты центральной нервной системы расположены на поверхности микрососудов, встроены под общую базальную мембрану с эндотелиальными клетками. Цитоплазматические отростки

перицитов могут охватывать несколько эндотелиальных клеток и иметь разное строение, в зависимости от уровня сосудистого русла. Самая высокая плотность перицитов описана именно в центральной нервной системе (Tilton et al., 1985; Frank et al., 1990).

Иммунофенотип перицитов (PDGFRb+, NG2+, CD13+, desmin+, vimentin+, potassium channel complex Kir 6.1+[Lindahl et al., 1997; Winkler et al., 2010, Ozerdem et al., 2001; Trost et al., 2013, Kunz et al., 1994, Bondjers et al., 2006], отличается от иммунофенотипа телоцитов отсутствием экспрессии CD117 (KIT), CD34, SMA, S100, NSE, connexin43. Интересным является и тот факт, что повышенная проницаемость сосудистых стенок, возникающая при эндотелиальном транцитозе, быстро блокируется препаратом иматиниб (ингибитор тирозинкиназы) в эксперименте. Первый ингибитор тирозинкиназ был создан в 1999 г. для лечения больных хроническим миелолейкозом. В 2000г. иматиниб (гливек) был успешно применен для лечения больной с метастатической стромальной опухолью с мутацией KIT. На сегодняшний день наиболее изученной моделью для отработки принципов и методов таргетной терапии являются гастроинтестинальные стромальные опухоли, которые возникают из предшественников телоцитов и имеют иммунофенотип CD117+(C-KIT+) [Мазуренко Н. Н., Цыганова И. В., 2015].

Перициты имеют контакты с глией (астроцитами), регулируют кровоток, гемато-энцефалический барьер [Armulik A. et al, 2010, [Liu S et al, 2012](#)], тканевой гомеостаз, регенерацию сосудов и ткани, участвуют в воспалении [Rustenhoven J et al., 2017], а также обладают функциями стволовых клеток со способностью дифференцироваться в адипоциты, хондроциты, остеобласты, фибробласты, мезенхимальную стволовую клетку [Díaz-Flores et al., 2009], сосудистые клетки, олигодендроциты и астроциты [Dore-Duffy et al., 2006; Paulet al., 2012], а также нейрональные клетки центральной нервной системы [Canfield et al., 1996; Doherty et al., 1998; Farrington-Rock et al., 2004]. Все эти функции, в том числе стволовых клеток, приписывают и телоцитам [Ratajczak MZ. et al., 2014].

На сегодняшний день в центральной нервной системе кроме астроцитов, олигодендроцитов, микроглии и эпендимоцитов выявлен пятый тип глии - NG2+синантоциты, не экспрессирующие, как и телоциты, GFAP [Krawczyk A., Jaworska-Adamu J., 2010] Считается, что синантоциты являются компонентами синапсов, участвуют в стабилизации нейрональных цитоскелетов и контроле целостности миелина, отвечают за повреждение нервных волокон и образуют глиальные рубцы. Доказано, что глиальные

клетки NG2+ поддерживают функции и выживаемость нейронов через контроль нейроиммунологической системы [Nakano M. et al., 2017]. В тоже время, их считают клетками – предшественниками олигодендроцитов. Синантоциты составляют 5-8% всех клеток в центральной нервной системе взрослых. Кроме того, аномальная пролиферативная и дифференцирующая активность глиальных клеток NG2 связана с рядом возрастных нейродегенеративных и демиелинизирующих заболеваний [Kang, S. H. et al., 2013, Kremer D., et al., 2016]. Следуя логике предыдущих исследователей и учитывая факт экспрессии телоцитами Neuro D1, S100, NSE, наверное, клетки Кахаля тоже можно отнести к глиальным клеткам центральной нервной системы.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) были официально названы более 25 лет назад, чтобы представлять класс клеток из костного мозга и надкостницы человека и млекопитающих, которые можно выделить и размножить в культуре, сохраняя при этом их способность *in vitro* вырабатывать различные мезодермальные фенотипы и ткани [Caplan AI., 1991, Haynesworth SE et al, 1992]. Но в настоящий момент в связи с большим количеством опровергающих этот факт исследований понятие мезенхимальной стволовой клетки пересматривается [Caplan AI., 2017], а на роль этой «интригующей» клетки предлагаются перициты.

Возможно, телоциты являются производными перицитов, но с той же долей вероятности, возможно, и их предшественниками. Не исключен и тот вариант, что многие исследователи говорят об одних и тех же клетках, не проанализировав полностью их иммунофенотип.

Заключение

В твердой мозговой оболочке, сосудистом сплетении, коре больших полушарий, подкорковых ядрах, продолговатом мозге, мосту, мозолистом теле, гиппокампе, мозжечке нормального головного мозга взрослых с помощью электронной микроскопии, иммуногистохимического исследования и конфокальной микроскопии выделенных культур выявлены клетки с характеристиками телоцитов. Экспрессия в них NeuroD1 – регулятора нейрогенеза, может свидетельствовать о возможном участии этих клеток в развитии центральной нервной системы. Дальнейшее понимание функций и происхождения телоцитов, их взаимоотношений с перицитами, изучение роли телоцитов в онкогенезе опухолей головного мозга может привести к новым целенаправленным

методам лечения не только нейрососудистых заболеваний, но усовершенствовать таргетную терапию и разработать новые линии клеточной терапии новообразований.

Список использованной литературы:

1. Popescu L.M., Ciontea S.M., Cretoiu D. Interstitial Cajal-like cells in human uterus and fallopian tube. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1101: 139-165.
2. Popescu L.M., Faussone-Pellegrini M.S. Telocytes - a case of serendipity: the winding way from interstitial cells of cajal (ICC), via interstitial cajal-like cells (ICLC) to telocytes. *J Cell Mol Med.* 2010; 14: 729-740.
3. Popescu L.M. The Tandem: Telocytes - Stem Cells. *Int. j biol and biomed. Engineering.* 2011;5(2): 83-92.
4. Bei Y., Wang F., Yang C., Xiao J. Telocytes in regenerative medicine. *Journal of cellular and molecular medicine.* 2015; 19(7): 1441-1454.
5. Kostin S., Popescu L.M. A distinct type of cell in myocardium: interstitial Cajal-like cells (ICLCs). *J Cell Mol Med.* 2009; Vol. 13: 295-308.
6. Ratajczak M. Z., Ratajczak D., Pedziwiatr D. Extracellular microvesicles (ExMV) in cell to cell communication: a role of telocytes. *Telocytes.* – Springer, Singapore. 2016: 41-49.
7. Popescu B. O., Gherghiceanu M., Kostin S., Ceafalan L., Popescu, L. M. Telocytes in meninges and choroid plexus. *Neuroscience letters.* 2012; 516(2): 265-269.
8. Cantarero I., Luesma M.J., Junquera C. The primary cilium of telocytes in the vasculature: electron microscope imaging. *J Cell Mol Med.* 2011; 15: 2594-2600.
9. Zheng Y., Bai C., Wang X. Potential significance of telocytes in the pathogenesis of lung diseases. *Expert review of respiratory medicine.* 2012; 6 (1): 45-49.
10. Zheng Y. Cretoiu D., Yan G. et al. Comparative proteomic analysis of human lung telocytes with fibroblasts. *Journal of cellular and molecular medicine.* 2014; 18 (4): 568-589.

- 11.** Manole C. G., Cismasiu V., Gherghiceanu M. et al. Experimental acute myocardial infarction: telocytes involvement in neoangiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2011; Vol. 15: 2284-2289.
- 12.** Popescu L.M., Gherghiceanu M., Suciu L.C. et al. Telocytes and putative stem cells in the lungs: electron microscopy, electron tomography and laser scanning microscopy. *Cell Tissue Res.* 2011a; 345: 391-403.
- 13.** Harhun M. I., Gordienko D.V., Povstyan O.V. et al. Function of interstitial cells of Cajal in the rabbit portal vein. *Circ Res.* 2004; 95(6): 619–26.
- 14.** Smythies J, Edelstein L. Telocytes, exosomes, gap junctions and the cytoskeleton: the makings of a primitive nervous system? *Front Cell Neurosci.* 2014; 7: 278.
- 15.** Popescu L. M., Fertig E. T., Gherghiceanu M. Reaching out: junctions between cardiac telocytes and cardiac stem cells in culture. *Journal of cellular and molecular medicine.* 2016; 20(2): 370-380.
- 16.** Popescu L. M., Manole E., Serboiu C.S., Manole C.G. et al. Identification of telocytes in skeletal muscle interstitium: implication for muscle regeneration. *J Cell Mol Med.* 2011; 15: 1379–1392.
- 17.** Cretoiu S. M., Cretoiu D. A. et al. Telocytes: ultrastructural, immunohistochemical and electrophysiological characteristics in human myometrium. *Reproduction.* 2013; 145(4): 357–370.
- 18.** Milia A. F., Ruffo M., Manetti M. et al. Telocytes in Crohn's disease. *Journal of cellular and molecular medicine.* – 2013; 17(12): 1525-1536.
- 19.** Oyama K., Sanno N., Teramoto A., Osamura, R. Y. Expression of neuro D1 in human normal pituitaries and pituitary adenomas. *Modern Pathology.* 2001;14(9); 892.
- 20.** Pataskar A., Jung J., Smialowski P., Noack, F. et al. NeuroD1 reprograms chromatin and transcription factor landscapes to induce the neuronal program. *The EMBO journal,* 2016; 35(1): 24-45.

21. Liu M., Pereira F. A., Price S. D., Chu M. J., Shope C. et al. Essential role of BETA2/NeuroD1 in development of the vestibular and auditory systems. *Genes & development*. 2000; 14(22): 2839-2854.
22. Bell G. I., Polonsky K. S. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in β -cell function. *Nature*. 2001; 414(6865): 788.
23. Cerf M. E. Transcription factors regulating β -cell function. *European Journal of Endocrinology*. 2006; 155(5): 671-679.
24. Lee J. E., Hollenberg S. M., Snider L., Turner D. L., Lipnick N. Weintraub H. Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science*. 1995; 268(5212): 836-844.
25. Popescu L.M., Manole C.G., Gherghiceanu M. et al. Telocytes in human epicardium. *J Cell Mol Med*. 2010; Vol. 14: 2085-2093.
26. [Dore-Duffy P.](#), [Cleary K.](#) Morphology and properties of pericytes. [Methods Mol Biol](#). 2011; 686: 49-68.
27. Tilton R. G., Miller E. J., Kilo C., Williamson, J. R. Pericyte form and distribution in rat retinal and uveal capillaries. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1985; 26(1): 68-73.
28. Frank, R. N., Turczyn, T. J., Das, A. Pericyte coverage of retinal and cerebral capillaries. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1990; 31(6): 999-1007.
29. Lindahl P., Johansson B. R., Levéen P., Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*. 1997; 277(5323): 242-245.
30. Winkler E. A., Bell R. D., Zlokovic B. V. Pericyte-specific expression of PDGF beta receptor in mouse models with normal and deficient PDGF beta receptor signaling. *Molecular neurodegeneration*. 2010; 5(1): 32.

- 31.** Ozerdem U., Grako K. A., Dahlin-Huppe K. et al. NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*. 2001; 222(2):218-227.
- 32.** Trost A., Schroedl F., Lange S., Rivera F. J., Tempfer H. et al. Neural crest origin of retinal and choroidal pericytes. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2013; 54(13): 7910-7921.
- 33.** Kunz J., Krause D., Kremer M., Dermietzel R. The 140-kDa protein of blood-brain barrier-associated pericytes is identical to aminopeptidase N. *Journal of neurochemistry*. 1994; 62(6): 2375-2386.
- 34.** Bondjers C., He L., Takemoto M., Norlin J., Asker N. et al. Microarray analysis of blood microvessels from PDGF-B and PDGF-R β mutant mice identifies novel markers for brain pericytes. *The FASEB journal*. 2006; 20(10): 1703-1705.
- 35.** Мазуренко Н. Н., Цыганова И. В. Молекулярно-генетические особенности и маркеры гастроинтестинальных стромальных опухолей. *Успехи молекулярной онкологии*. 2015; (2): 29-40.
- 36.** Armulik A., Genové G, Mäe M., Nisancioglu M. H., et al. Pericytes regulate the blood–brain barrier. *Nature*, 2010; 468: 557–561.
- 37.** Liu S, Agalliu D, Yu C, Fisher M. The role of pericytes in blood-brain barrier function and stroke. *Curr Pharm Des*. 2012; 18(25): 3653-62.

- 38.** Rustenhoven J, Jansson D, Smyth LC, Dragunow M. Brain Pericytes As Mediators of Neuroinflammation. *Trends Pharmacol Sci.* 2017; 38(3): 291-304.
- 39.** Diaz-Flores L., Gutierrez R., Madrid J. F., Varela H., Valladares F. et al. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histology and histopathology.* 2009; 24(7): 909-969.
- 40.** Dore-Duffy P., Katychew A., et al. CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 2006; 26(5): 613-624.
- 41.** Paul G., Özen I., Christophersen N. S., Reinbothe T. et al. The adult human brain harbors multipotent perivascular mesenchymal stem cells. *PloS one.* 2012; 7(4):1-11.
- 42.** Canfield A. E., Sutton A. B., Hoyland J. A., Schor A. M. Association of thrombospondin-1 with osteogenic differentiation of retinal pericytes in vitro. *Journal of cell science.* 1996; 109(2): 343-353.
- 43.** Doherty M. J., Ashton B. A., Walsh S., Beresford J. N., Grant M. E., Canfield A. E. Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research.* 1998; 13(5): 828-838.
- 44.** Farrington-Rock C., Crofts N. J., Doherty M. J., Ashton, B. A. et al. Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation.* 2004; 110(15): 2226-2232.
- 45.** Ratajczak M. Z., Jadczyk T, Pędziwiatr D, Wojakowski W. New advances in stem cell research: practical implications for regenerative medicine. *Pol Arch Med Wewn.* 2014; 124(7–8): 417–26.
- 46.** Krawczyk A., Jaworska-Adamu J. Synantocytes: the fifth type of glia? In comparison with astrocytes. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 2010; 48 (2): 173-177.
- 47.** Nakano M., Tamura Y., Yamato M., Kume S. et al. NG2 glial cells regulate neuroimmunological responses to maintain neuronal function and survival. *Scientific reports.* 2017; 7: 42041.

- 48.** Kang S. H., Li Y., Fukaya M., Lorenzini I., Cleveland D. W. et al. Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature neuroscience*. 2013; 16(5): 571.
- 49.** Kremer D., Göttle P., Hartung H. P., Küry P. Pushing forward: remyelination as the new frontier in CNS diseases. *Trends in neurosciences*. 2016; 39(4); 246-263.
- 50.** Caplan A.I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9: 641–650.
- 51.** Haynesworth S. E., Goshima J., Goldberg V. M. et al. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 1992; 13: 81–88.
- 52.** Caplan A. I. Mesenchymal stem cells: time to change the name! *Stem cells translational medicine*. 2017; 6(6): 1445-1451.

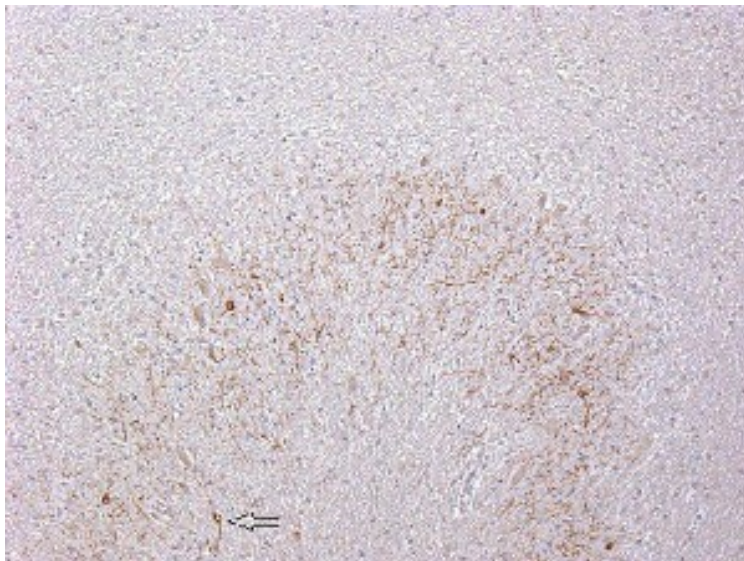


Рис. 1. Зубчатое ядро мозжечка. Антитело к CD117 (коричневое окрашивание), стрелкой указан один из телоцитов; х 100.

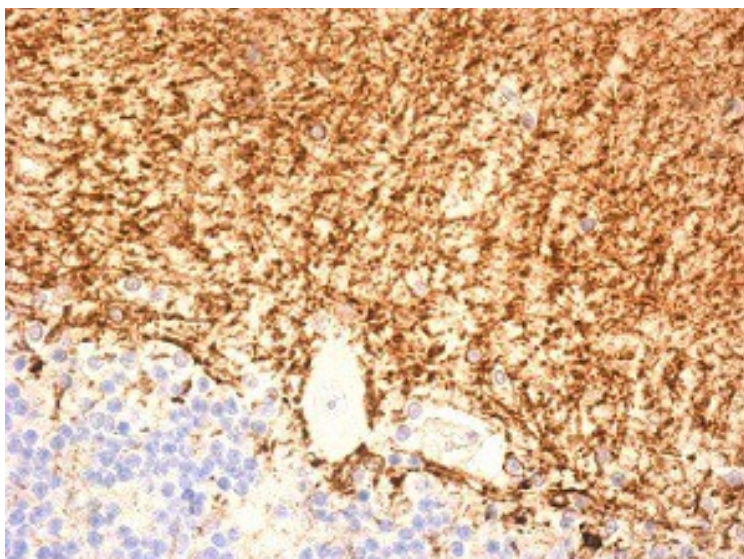


Рис. 2. Кора мозжечка с максимальной экспрессией CD117 (коричневое окрашивание) в молекулярном слое, х 200.

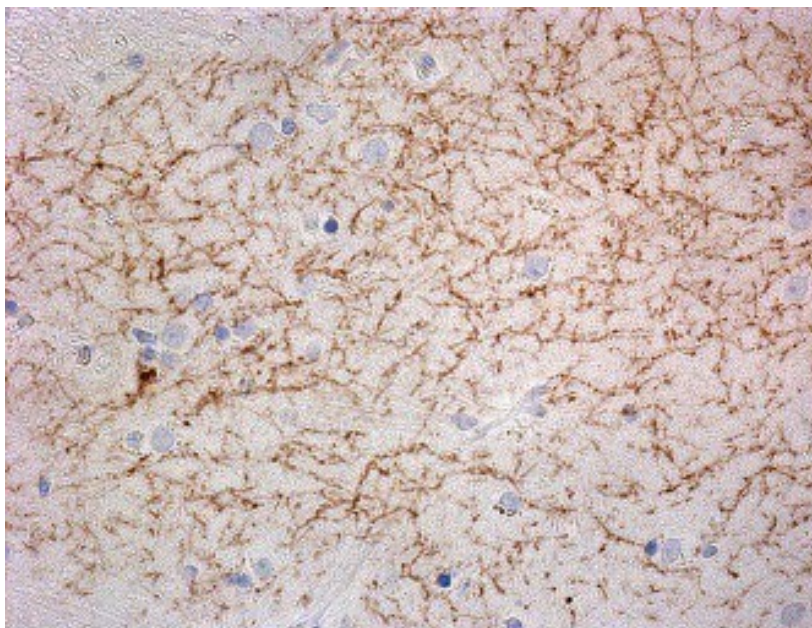


Рис. 3. Хвостатое ядро. Экспрессия CD117 (коричневое окрашивание), х200.

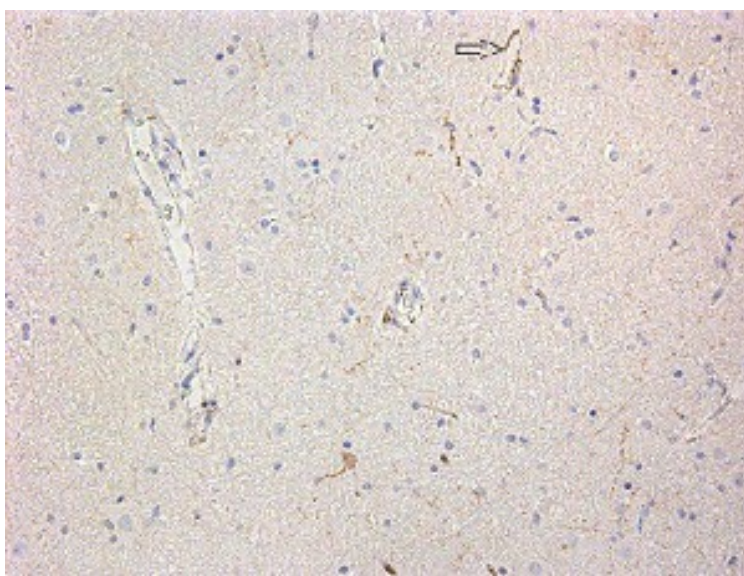


Рис. 4. Мост. Экспрессия CD117 в единичных клетках, в стенке капилляра (указана стрелкой), х100.

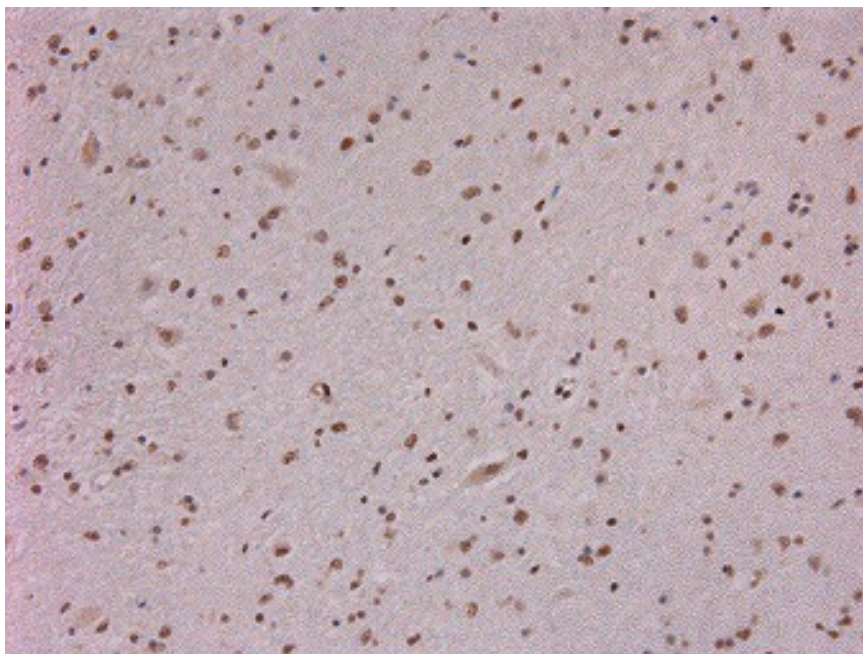


Рис. 5. Зубчатое ядро. Экспрессия NeuN в ядрах клеток (коричневое окрашивание), x200.

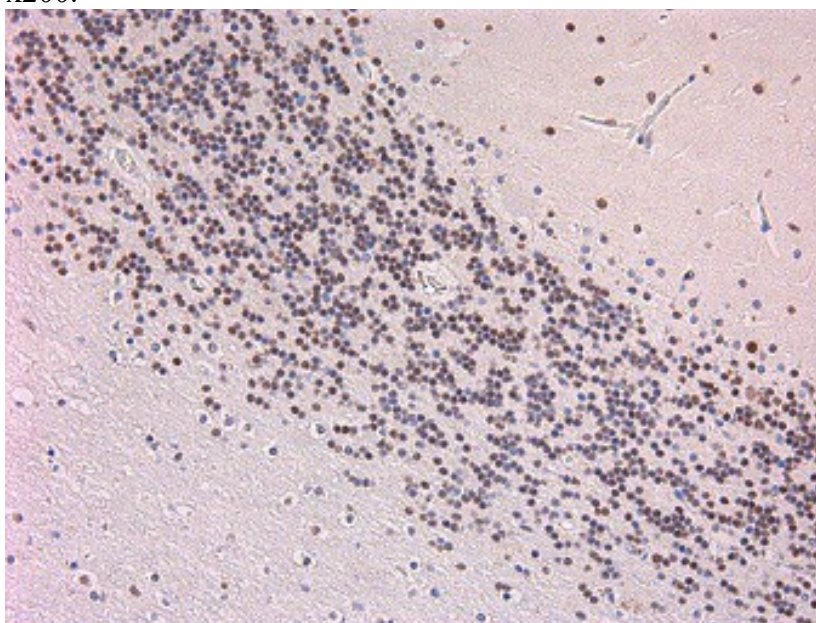


Рис. 6. Кора мозжечка. Экспрессия NeuN в ядрах клеток (коричневое окрашивание), x100.

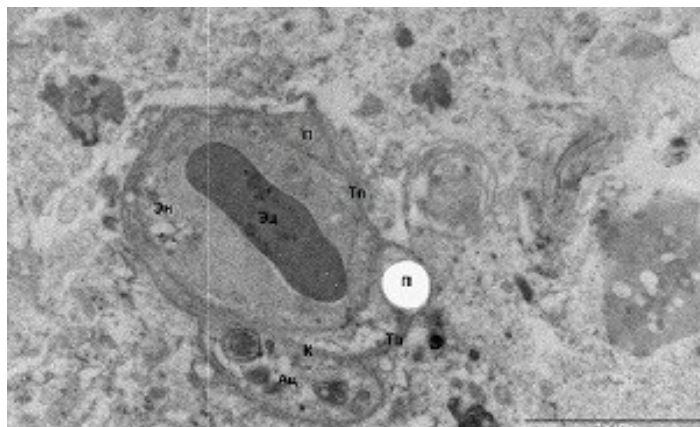


Рис. 7. Отек коры мозжечка в перитуморозной зоне (рядом с глиобластомой). Тесный контакт телоцита, находящегося под базальной мембраной капилляра, с астроцитом. Обозначения: Эц – эритроцит, Эн – эндотелиоцит, Тп – телоподии телоцита, П - подомы телоцита, Ац – отросток астроцита, К – контакт между телоцитом и отростком астроцита.

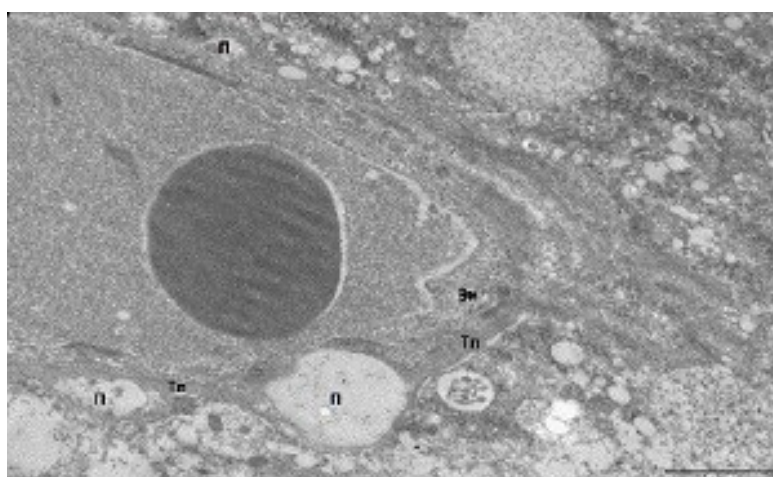


Рис. 8. Кора мозжечка. Телоцит в стенке капилляра. Обозначения: Тп – телоподии телоцита, П – подомы телоцита с вакуолями, Эн – эндотелиоцит.

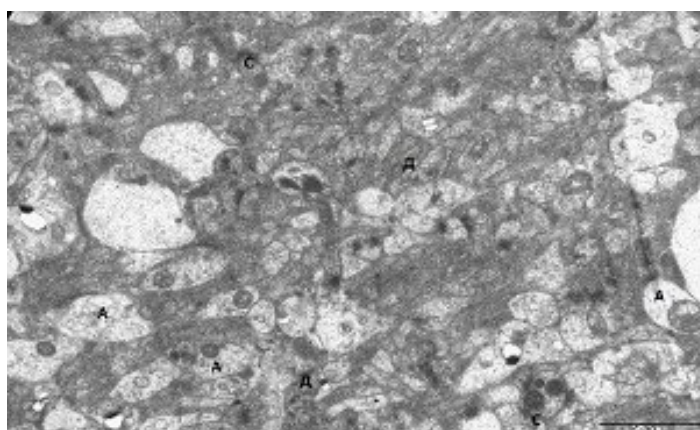


Рис. 9. Молекулярный слой коры мозжечка. Обозначения: А – аксоны, Д – дендриты, С – синапсы

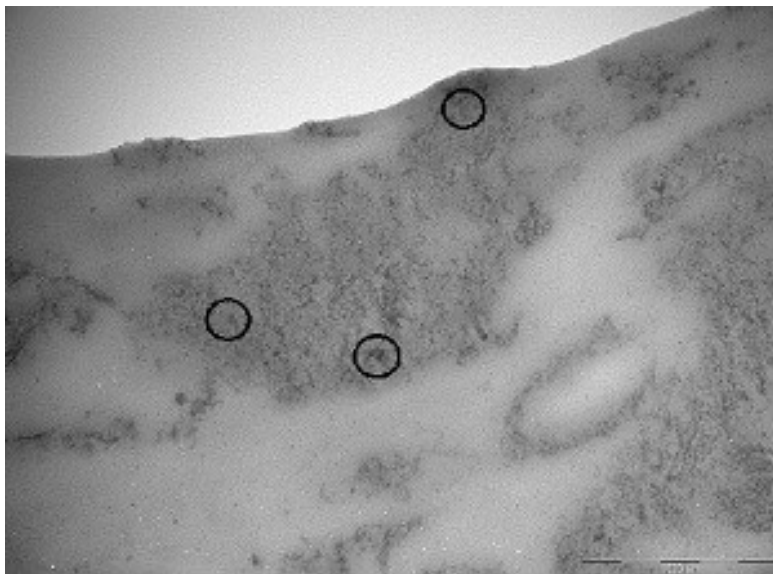


Рис. 10. Молекулярный слой коры мозжечка. Электронная иммуноцитохимия. CD117 в виде небольших скоплений коллоидного золота (скопления обведены кружками).

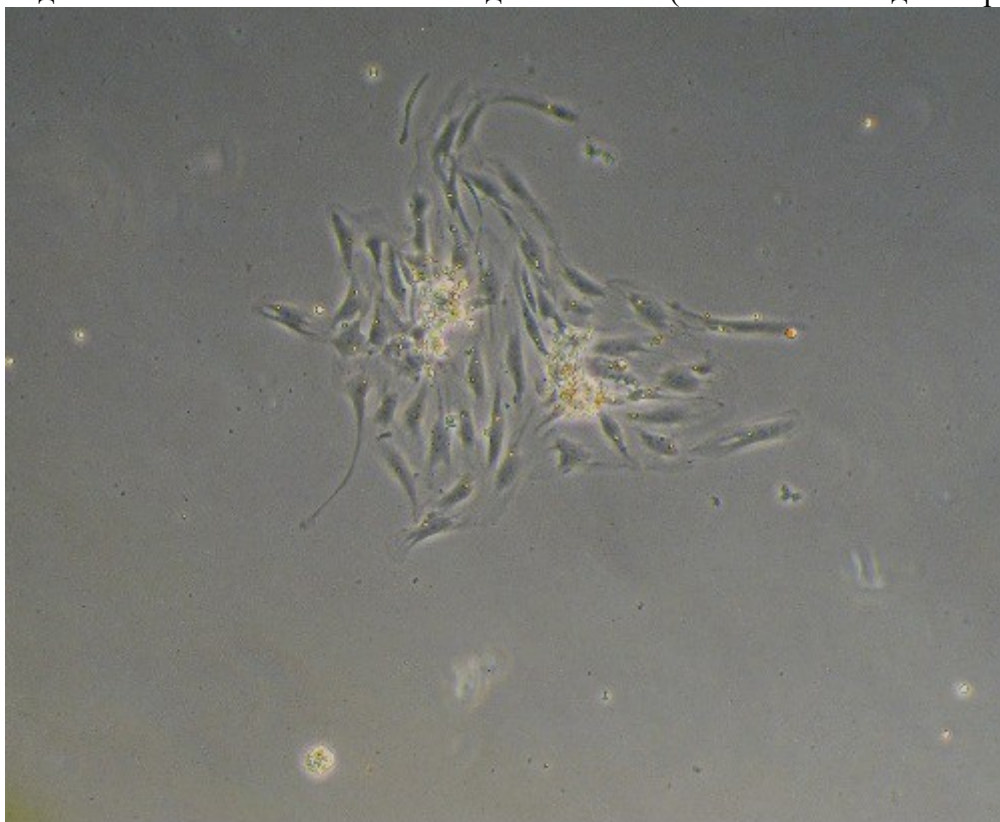


Рис. 11. Фазовая контрастная микроскопия. Культура из коры мозжечка пациента с астроцитомой представлена ромбовидными и веретенообразными клетками, x100.

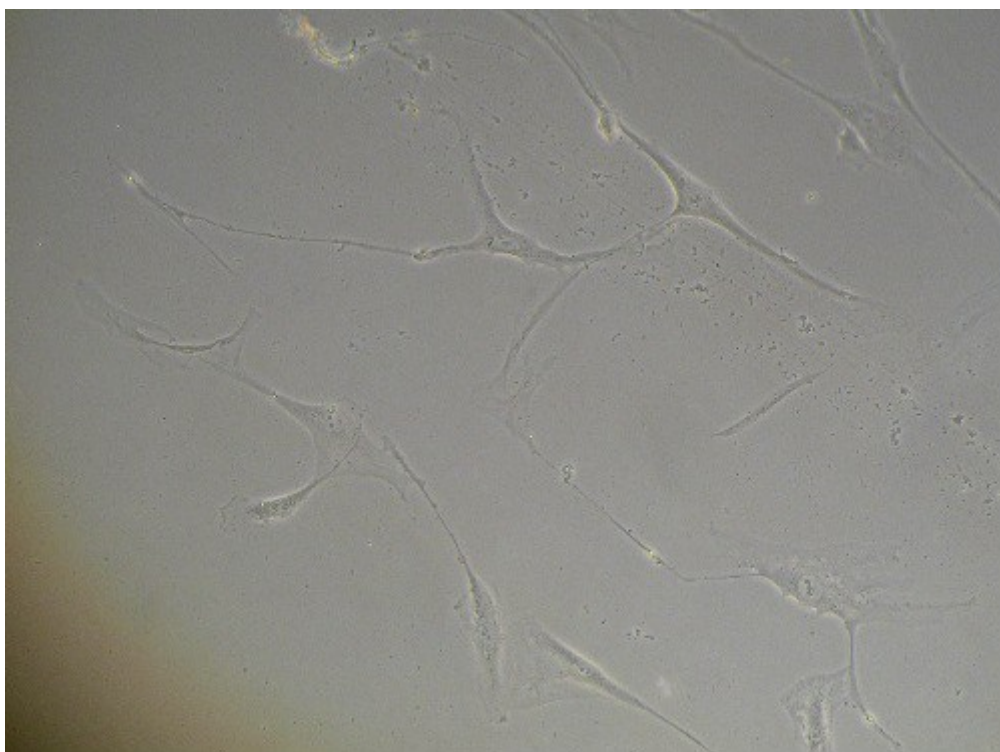


Рис. 12. Фазовая контрастная микроскопия. Культура из коры мозжечка пациента с астроцитомой представлена клетками, имеющими угловатое тело с ядром и длинные изогнутые отростки (телоподии) с многочисленными контактами с другими клетками, x100.

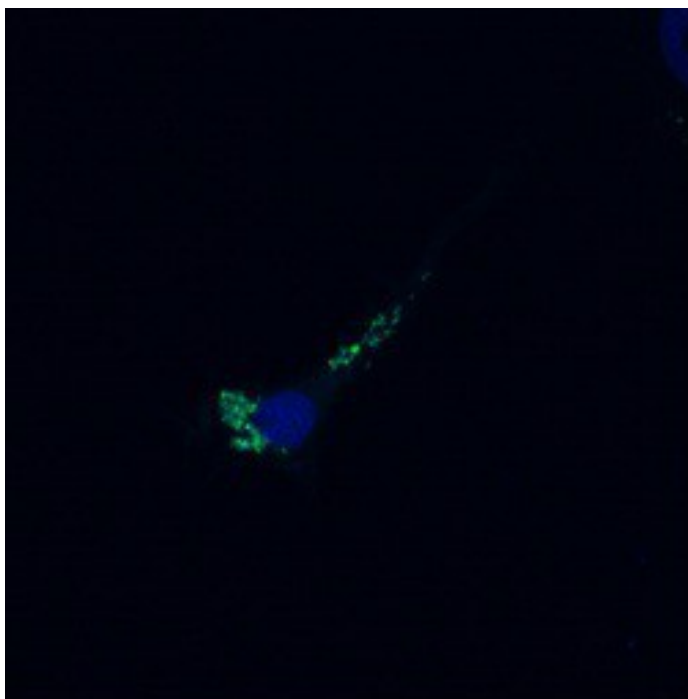


Рис. 13. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия культуры коры мозжечка. Зеленая флуоресценция CD117 в цитоплазме телоцита, синяя - DAPI в ядре, x 400.

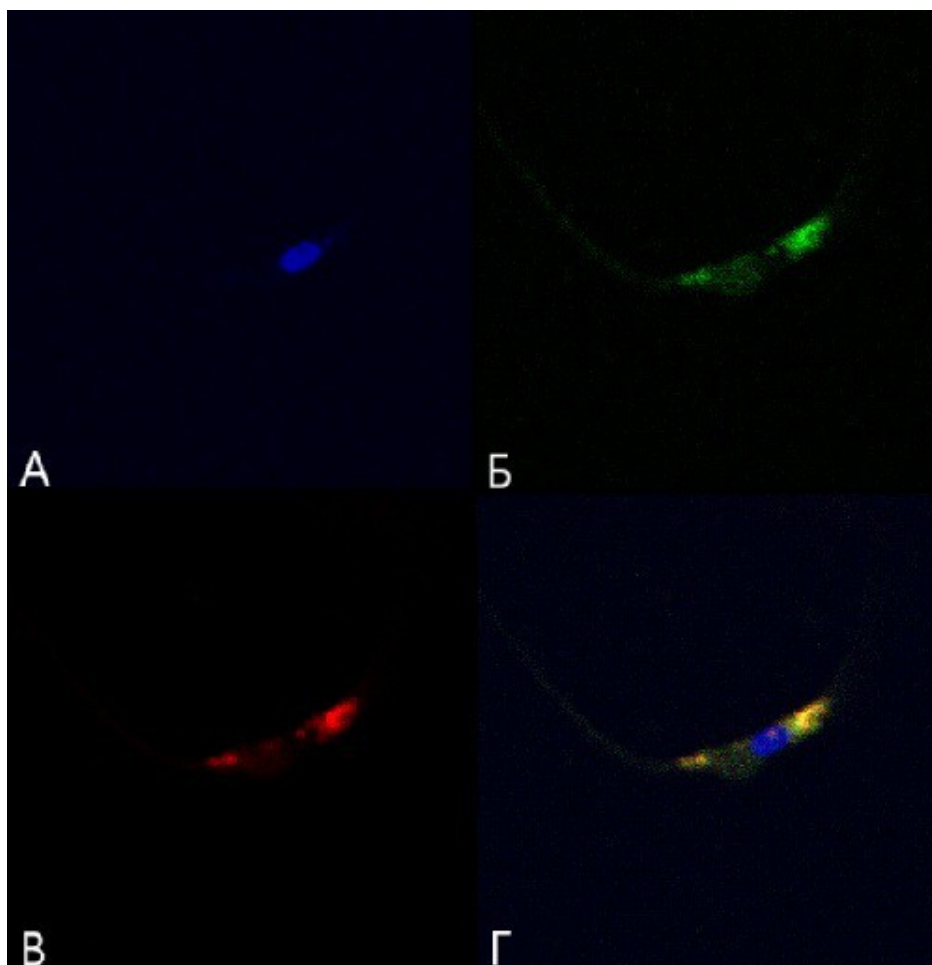


Рис. 14. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия культуры твердой мозговой оболочки. А. Синяя флуоресценция DAPI в ядре телоцита. Б. Красная флуоресценция connexin43 в цитоплазме телоцита. В. Зеленая флуоресценция CD34. Г. Желтая флуоресценция цитоплазмы телоцита и синяя – ядра при наложении каналов, х 400.

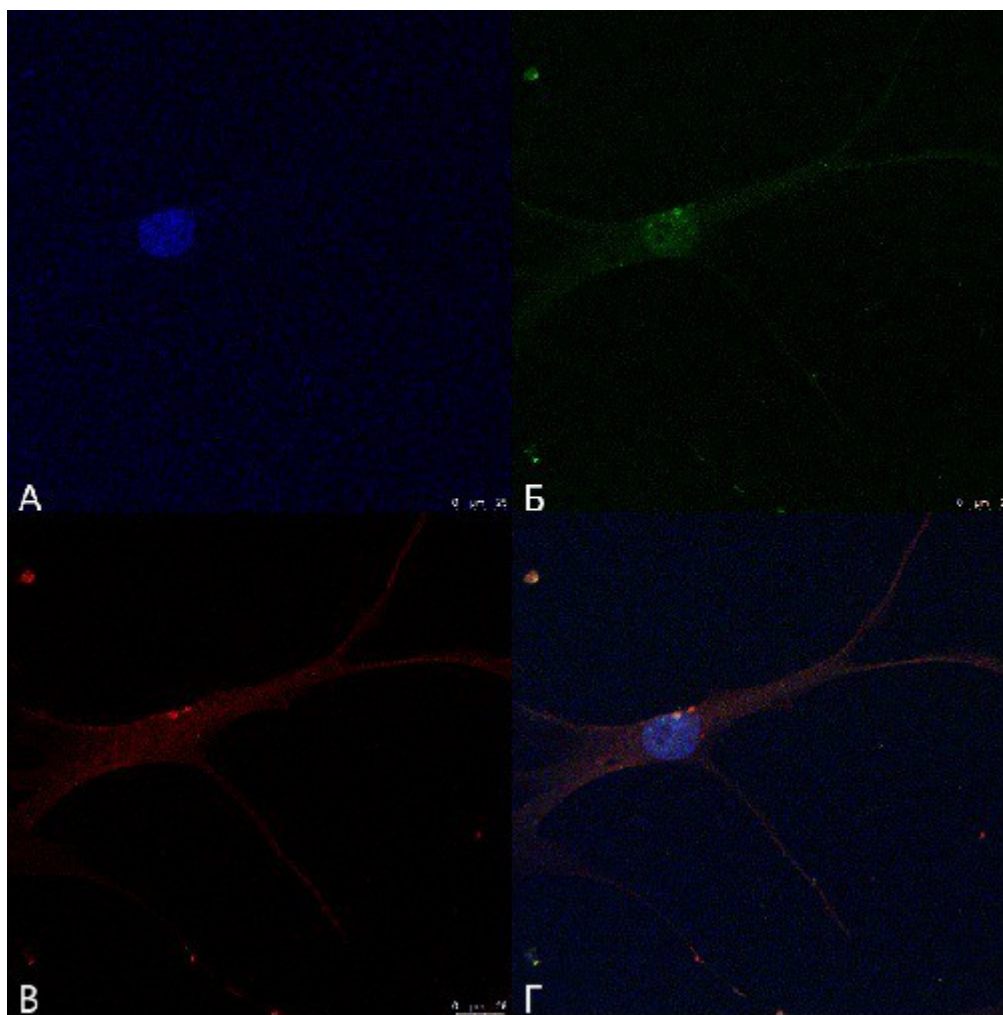


Рис. 15. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия культуры коры мозжечка. А. Синяя флуоресценция DAPI в ядре телоцита. Б. Зеленая флуоресценция NeuroD1. В. Красная флуоресценция connexin43 в цитоплазме телоцита. Г. Сиреневато-фиолетовая флуоресценция ядра и красная флуоресценция цитоплазмы клетки при наложении каналов, х 400.