

*Коржевский Д. Э., Кирик О. В., Григорьев И. П.,
Сухорукова Е. Г., Сырцова М. А.*

МАРКИРОВАНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИХСЯ НЕРВНЫХ КЛЕТОК ПРИ ИЗУЧЕНИИ РАЗВИТИЯ И ПАТОЛОГИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

*Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной
системы (заведующий – д. м. н. Д. Э. Коржевский)*

*Отдела общей и частной морфологии НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН,
Санкт-Петербург, e-mail: iemmorphol@yandex.ru*

Изучение дифференцировки нервных клеток как при развитии нервной системы в пренатальном онтогенезе, так и при регенерации нервной ткани, является актуальной задачей современной нейробиологии. Одна из существенных трудностей на пути ее решения состоит в адекватном маркировании клеток, имеющих соответствующий дифференцировочный потенциал, до приобретения ими характерных морфологических черт зрелых нейронов. Исследованиями последних лет установлено, что большинство нервных клеток содержит ряд специфических белков, которые нехарактерны для большинства других клеток организма. Наличие этих специализированных белков в постмитотических клетках свидетельствует об их нейрональной дифференцировке. Применение методов иммуоцитохимической идентификации таких белков позволяет селективно выявлять различные популяции дифференцирующихся и зрелых нейронов как в центральной, так и в периферической нервной системе.

Цель работы – дать краткую характеристику наиболее удачным (с точки зрения практической применимости) цитохимическим маркерам дифференцирующихся и зрелых нейронов.

На основании многолетних исследований различных способов иммуоцитохимического маркирования зрелых и дифференцирующихся клеток нервной ткани авторами было установлено, что далеко не все белки, которые считаются специфическими нейрональными маркерами, могут быть успешно использованы в практике нейрогистологических исследований. Многие из доступных антител к известным нейрональным белкам оказались непригодными для проведения сравнительных межвидовых исследований в связи с видоспецифичностью. Среди наиболее надежных общенейрональных маркеров, которые пригодны для изучения развития органов нервной системы, следует отметить маркер нейробластов – даблкортин (DCX), ядерный антиген нервных клеток – NeuN и нейрон-специфическую енолазу (NSE). Среди ферментов, участвующих в синтезе конкретных нейромедиаторов, наибольшее значение в качестве нейрональных маркеров имеют тирозингидроксилаза, холинацетилтрансфераза и NO-синтаза.

DCX – продукт гена, мутации которого у человека вызывают аномалии развития и стратификации неокортекса. Это белок с молекулярной массой 40kDa (360 аминокислотных остатков у человека, 365 аминокислотных остатков у мыши), который взаимодействует с микротрубочками (MT) цитоскелета нейрона. DCX об-

наружен в дифференцирующихся и мигрирующих нейронах центральной и периферической нервной системы в период эмбрионального и постнатального развития [3]. Установлено, что он принимает активное участие в реорганизации цитоскелета и процессе транслокации ядра (одного из ключевых событий, осуществляемых в ходе миграции нейронов), участвует в везикулярном аксональном и дендритном транспорте [2]. DCX экспрессируется в постмитотических нейробластах. По мере дифференцировки нейрона экспрессия DCX уменьшается и в зрелых нейронах этот белок, как правило, не обнаруживается.

Белок NeuN локализуется в ядрах и перинуклеарной цитоплазме большинства зрелых нейронов ЦНС млекопитающих. NeuN был открыт в 1992 году группой исследователей, получившей моноклональные антитела (клон А60), выявлявшие этот известный ранее ядерный белок [4]. Антитела к NeuN позволяют выявлять нейроны, но не связываются с глиальными клетками. Синтез белка NeuN начинается в постмитотических нейробластах на достаточно поздних стадиях дифференцировки [3]. Следует отметить, что этот маркер не вполне применим при изучении развития нервных клеток мозжечка, поскольку он не синтезируется в клетках Пуркинье и некоторых нетипичных нейронах коры мозжечка [4,6]. Для выявления последних в качестве селективных нейрональных маркеров могут быть использованы кальбиндин и кальретинин.

Нейрон-специфическая енолаза (NSE) принадлежит группе енолаз (2-фосфо-D-глицерат гидролаза; молекулярный вес около 80 кДа), участвующих в предпоследнем этапе гликолиза. В геноме человека семейство енолаз представлено тремя локусами генов: ENO1 – нейрональная енолаза (α), ENO2 – нейрон-специфическая енолаза (γ) и ENO3 – мышечная енолаза (β). Данные ферменты могут образовывать гомо- и гетеродимеры. NSE обычно присутствует в клетке в виде как гомо- (γ - γ), так и гетеродимера (α - γ). NSE присутствует в клетках нейроэктодермального происхождения – нейронах головного мозга и периферической нервной системы. Исключение составляют клетки Пуркинье, которые оказываются NSE-иммунонегативными [5]. Иммуноцитохимическая реакция на NSE может быть использована для выявления первых дифференцирующихся нейронов в эмбриогенезе.

Тирозингидроксилаза – ферментный маркер нейронов катехоламинергических систем головного мозга и симпатических ганглиев. В мозгу млекопитающих катехоламины образуются из аминокислоты тирозина в результате последовательных этапов синтеза: L-тирозин \rightarrow L-3,4-диоксифенилаланин, или сокращенно: L-ДОФА \rightarrow дофамин \rightarrow норадреналин \rightarrow адреналин. Реакцией, ограничивающей скорость данной последовательности процессов синтеза, является гидроксилирование тирозина тирозингидроксилазой с образованием L-ДОФА. В настоящее время антитела к тирозингидроксилазе широко используются для выявления катехоламинергических нейронов и нервных волокон при экспериментальном моделировании болезни Паркинсона и при изучении дофаминергических нейронов substantia nigra у человека.

Холинацетилтрансфераза (ХАТ) – фермент, участвующий в синтезе классического нейромедиатора – ацетилхолина. Ацетилхолин был самым первым из идентифицированных нейромедиаторов. В центральной нервной системе

выявлены несколько групп холинергических нейронов, расположенных в базальном отделе переднего мозга, в перегородке, в области ножек мозга, моста и покрышки, которые проецируются практически на все отделы головного мозга. Наиболее известными холинергическими нейронами являются мотонейроны спинного мозга. Иммуноцитохимическая реакция на ХАТ с использованием поликлональных козьих антител удобна для маркирования дифференцирующихся и зрелых холинергических нейронов при проведении межвидовых сравнительных исследований [1].

NO-синтаза (NOS) – фермент, катализирующий NADPH-зависимое окисление аргинина с образованием оксида азота (NO) и цитруллина. Данный путь образования оксида азота является основным в организме млекопитающих. NO играет ключевую роль в регуляции мозговой гемодинамики. NO-продуцирующие клетки широко распространены в структурах головного и спинного мозга человека и позвоночных животных, где участвуют в регуляции важнейших функций как нервной системы, так и других систем организма. Источниками NO в центральной нервной системе являются нейроны, астроциты и клетки микроглии, а также эндотелий кровеносных сосудов. В настоящее время идентифицировано три основных изоформы NOS: нейрональная, индуцибельная и эндотелиальная, которые обозначаются как NOS1 (nNOS), NOS2 (iNOS) и NOS3 (eNOS). Маркером нитрокси-дергических нейронов является nNOS. С помощью антител к этому белку можно выявлять дифференцирующиеся и зрелые нейроны, способные к выработке окиси азота.

Работа выполнена при поддержке РФФ (проект 14–15–00014).

ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д. Э., Григорьев И. П., Кирик О. В. и др. Сравнительное изучение холинергических структур стриатума человека и крысы с использованием иммуноцитохимической реакции на холинацетилтрансферазу // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2014. 50(2). С. 157–160.
2. Коржевский Д. Э., Карпенко М. Н., Кирик О. В. Белки, ассоциированные с микротрубочками, как показатели дифференцировки и функционального состояния нервных клеток // Морфология. 2011. Т. 139. № 1. С. 13–21.
3. Коржевский Д. Э., Петрова Е. С., Кирик О. В., Отеллин В. А. Оценка дифференцировки нейронов в эмбриогенезе крысы с использованием иммуноцитохимического выявления даблкортина // Морфология. 2008. Т. 133. № 4. С. 7–10.
4. Mullen R. J., Buck C. R., Smith A. M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates // Development. 1992. Vol. 116. № 1. P. 201–211.
5. Pickel V. M., Reis D. J., Maragos P. J., Zomzely-Neurath C. Immunocytochemical localization of nervous system specific protein (NSP-R) in rat brain // Brain Res. 1976. Vol. 105. № 1. P. 184–187.
6. Wolf H. K., Buslei R., Schmidt-Kastner R. et al. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology // J. Histochem. Cytochem. 1996. Vol. 44. № 10. P. 1167–1171.