

Зиматкин С.М.

ОПЫТ ИССЛЕДОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЁРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ НЕЙРОНОВ МОЗГА

*Гродненский государственный медицинский университет,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Исследование проведено на крысах в норме и при экспериментальной патологии (холестаз, потомство крыс с холестазом, или потреблявших алкоголь во время беременности, церебральная ишемия). Образцы мозга фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде и заключали в парафин. Серийные срезы окрашивали иммуногистохимически для выявления необходимых нейромаркеров.

Оценивали нейромедиаторную природу нейронов, выявляя в них специфические ферменты синтеза или деградации нейромедиаторов. Используя маркер Ki-67, избирательно визуализировали делящиеся предшественники нейронов, маркер даблкортин - мигрирующие предшественники нейронов, маркер NeuN - зрелые нейроны. Для оценки энергетического потенциала нейронов использовали АТФ-синтазу, депо кислорода - нейроглобин. Для оценки аутофагии в нейронах выявляли её активатор AMBRA1. Изучали депонирующий кальций белок, кальбиндин, Наблюдали появление и накопление белка гена быстрого реагирования c-Fos. Для оценки синаптического аппарата мозга использовали маркер синаптофизин.

Ключевые слова: молекулярные маркеры, иммуногистохимия, нейроны, мозг.

Zimatkin S.M.

EXPERIENCE IN THE STUDY OF MOLECULAR MARKERS FOR ASSESSING THE STATE OF BRAIN NEURONS

Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

The study was conducted on rats in normal and experimental pathology (cholestasis, offspring of rats with cholestasis, or who consumed alcohol during pregnancy, cerebral ischemia). Brain samples were fixed in zinc-ethanol-formaldehyde and enclosed in paraffin. Serial sections were stained immunohistochemically to identify the necessary neuromarkers.

The neurotransmitter nature of neurons was evaluated by identifying specific enzymes of neurotransmitter synthesis or degradation in them. Using the Ki-67 marker, dividing precursors of neurons were selectively visualized, the doublecortin marker - migrating precursors of neurons, the NeuN marker - mature neurons. To assess the energy potential of neurons, ATP synthase was used, and oxygen depot - neuroglobin. To assess autophagy in neurons, its activator AMBRA1 was detected. The calcium-depositing protein, calbindin, was studied, and the appearance and accumulation of the c-Fos rapid response gene protein was observed. To assess the synaptic apparatus of the brain, the marker synaptophysin was used.

Keywords: molecular markers, immunohistochemistry, neurons, brain.

Введение. В настоящее время в нейроморфологии все шире используется иммуногистохимические методы для микроскопического исследования молекулярных маркёров нейронов во взрослом и развивающемся мозге в норме и

при различной нейропатологии. Эти методы оказываются более точными и эффективными для оценки морфофункционального состояния нервных клеток, по сравнению с традиционными, классическими нейрогистологическими и гистохимическими методами, которые оценивают строение нейронов и содержание в них различных веществ или активность ферментов.

Цель исследования. Обобщение собственного опыта применения молекулярных маркеров для оценки состояния нейронов мозга.

Материалы и методы. Исследование проведено на крысах различного возраста в норме и при экспериментальной патологии (холестаза, потомство крыс с холестазом, или потреблявших алкоголь во время беременности, церебральная ишемия, вызванная перевязкой сонных артерий, и др.). Животных содержали в стандартных условиях вивария. Исследования выполнялись в соответствии с требованиями о защите животных, используемых для научных целей. Животных забивали быстрой декапитацией. Образцы мозга фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде при +4°C в течение 20 часов, для сохранения антигенных свойств изучаемых молекулярных маркеров, обезвоживали в спиртах, просветляли в ксилолах и заключали в парафин. Серийные срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью микротомы Leica 2125 RTS (Германия) и монтировали на предметные стекла.

Один срез из каждой серии окрашивали по методу Ниссля для идентификации структур мозга по стериотаксическому атласу. Другие срезы окрашивали иммуногистохимически для выявления необходимых молекулярных маркеров. Среди сотен маркёров, имеющих на рынке, были выбраны те, которые наиболее эффективно оценивают состояние нейронов, а также применимы для парафиновых срезов мозга крысы.

Для иммуногистохимического выявления маркера ГАМК-эргических нейронов, гистидиндекарбоксилазы, применяли первичные моноклональные

мышинные антитела GAD67 фирмы Abcam (Великобритания, ab. 26116) в разведении 1:2000 при +4°C, экспозиция – 20 часов во влажной камере. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (Великобритания, ab. 80436).

Для иммуногистохимического выявления маркера гистаминэргических нейронов, MAO Б, применяли первичные поликлональные кроличьи антитела против MAO Б фирмы Elabscience, cat.No.EPP15673 (Китай) в разведении 1:100, при +4°C, 20 часов во влажной камере. Связавшиеся первичные антитела выявляли с помощью набора детекции Elabscience cat.No. E-IR-R213 (Китай).

Для иммуногистохимического выявления маркера мигрирующих нейронов, даблкортина, применяли первичные поликлональные кроличьи антитела фирмы Abcam (Великобритания) ab.18723, для NeuN – ab.128886 (в разведении 1:400, при +4°C, 20 часов во влажной камере). Для выявления связавшихся первичных антител использовали: набор EXPOSE Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit ab.80437 Abcam (Великобритания)

Для выявления маркера митохондрий и энергетического потенциала нейронов, АТФ-синтазы, и белка, депонирующего кислород (нейроглобина), использовали первичные моноклональные мышинные антитела Anti-АТP5А antibody фирмы Abcam (Великобритания, ab. 14748) и Anti-Neuroglobin antibody фирмы Abcam (Великобритания, ab. 37258) в оптимальном разведении 1:2400 и 1:600 соответственно, экспозиция 20 часов во влажной камере при +4°C. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit - Micro-polymer (Великобритания, Abcam, ab236466).

Для выявления активатора аутофагии, AMBRA1, применяли первичные моноклональные мышинные антитела Anti-Neuroglobin antibody фирмы Abcam(Великобритания, ab. 37258) в разведении 1:600 при +4°C, экспозиция 20 часов во влажной камере. Для выявления связавшихся первичных антител

использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (Великобритания, ab. 80436).

Для иммуногистохимического выявления белка, депонирующего кальций, кальбиндина-D28K, применяли первичные поликлональные кроличьи антитела Rabbit polyclonal antibody фирмы Abcam (Великобритания, ab. 11426) в разведении 1:1200, экспозиция 20 ч во влажной камере при +4°C. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (Великобритания, ab. 80437).

Для иммуногистохимического выявления белка гена быстрого реагирования, c-fos, применяли первичные поликлональные кроличьи антитела c-fos фирмы Abcam (Великобритания, ab 209794) в разведении 1:1000, экспозиция 20 часов во влажной камере при +4°C. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (Великобритания, ab. 80437).

Для иммуногистохимического выявления синаптофизина применяли первичные поликлональные кроличьи антитела фирмы ThermoScientific (США) Synaptophysin Antibody (PA5-27286) (в разведении 1:400, экспозиция 20 часов во влажной камере при +4°C). Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор ThermoScientific (США) Super Picture™ Polymer Detection Kit.

Оптимальное разведение первичных антител (с максимальным соотношением в срезе сигнал/фон) подбирали опытным путём, выбирая из разведений от 1:50 до 1:3000. В качестве отрицательного контроля использовали препараты, при изготовлении которых вместо первичных антител срезы обрабатывали нормальной кроличьей сывороткой (иммунопозитивная окраска в них отсутствовала). Внутренним отрицательным контролем служили мозговые оболочки (они не должны окрашиваться), а положительным контролем – структуры с известным высоким содержанием исследуемого маркера.

Изучение иммуногистохимических препаратов, их микрофотографирование и морфометрию проводили с помощью микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры Leica DFC 320 (Leica Microsystems GmbH, Германия) и программы компьютерного анализа изображения ImageWarp (BitFlow, США).

Для анализа полученных цифровых данных использовали методы непараметрической статистики. Иммунореактивность выявляемых маркеров выражали в единицах оптической плотности $\times 10^3$. Полученные первичные цифровые данные обрабатывали с помощью компьютерной программы Statistica 10.0 для Windows (StatSoft, Inc., США). Для сравнения контрольной и опытных групп использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test) и H-критерий Краскела-Уоллиса (Kruskal-Wallis H-Test). Различия между группами считались статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5% ($p < 0,05$).

Результаты. Определение нейромедиаторной природы нейронов. В своих исследованиях мы в качестве маркера ГАМК-ергических нейронов мозжечка использовали фермент синтеза ГАМК, глутаматдекарбоксилазу, а в качестве маркера гистаминергических нейронов гипоталамуса фермент деградации гистамина – моноаминооксидазу **Б**. Экспрессия этих ферментов избирательно возрастала при постнатальном развитии, дифференцировке именно соответствующих типов нейронов [1, 2, 5].

Выявление делящихся предшественников нейронов. В эмбриогенезе, а для отдельных типов нейронов и в раннем постнатальном онтогенезе, предшественники нейронов митотически делятся. В этот период в них экспрессируется пептид **Ki-67**, который иммуногистохимически выявляется в ядрах делящихся предшественников нейронов. Используя данный маркер, мы

избирательно выявляли эти клетки во временном, наружном зернистом слое коры развивающегося мозжечка (7-15 день после рождения крысы) [2].

Выявление мигрирующих предшественников нейронов. Эти мигрирующие предшественники нейронов можно выявить по белку, стабилизирующему микротрубочки, необходимые для миграции этих клеток, **даблкортину**. Мы успешно использовали этот маркер для выявления предшественников зернистых нейронов мигрирующих из наружного во внутренний зернистый слой развивающегося мозжечка [2].

Оценка зрелости нейронов мозга. Маркер зрелых нейронов, белок сплайсинга **NeuN**, мы использовали для оценки динамики созревания зернистых нейронов коры и ядер мозжечка, а также гистаминергических нейронов гипоталамуса в постнатальный период развития мозга крысы [2, 5].

Оценка энергетического потенциала нейронов. Важнейшим ферментом, образующим АТФ, является **АТФ-аза**. Этот мультисубъединичный белковый комплекс участвует и в образовании крист внутренней мембраны митохондрий. Этот молекулярный маркер оказался очень удобным для сравнительной оценки энергетического потенциала нейронов разных отделов мозга, для характеристики его становления в развивающихся нейронах мозга и для оценки его нарушений при церебральной ишемии и при холестазах [2, 4, 5].

Депозит кислорода в нейронах. Белок **нейроглобин** способен связывать и депонировать кислород в нейронах, а также передавать его митохондриям, участвуя в энергообеспечении этих нервных клеток. Мы изучили региональное и клеточное распределение этого молекулярного маркера в мозге крысы, накопление его в развивающихся нейронах мозга и изменения в нейронах разных отделов мозга крысы при церебральной ишемии и холестазах [2, 4, 5].

Оценка аутофагии. Для изучения регуляции этого процесса в нейронах оценивают в них активатор аутофагии AMBRA1. Мы показали возрастание его содержания в нейронах мозга при холестазах [4].

Депозит кальция в нейронах. Из белков депонирующих кальций и предупреждающих накопление его свободных ионов в клетке, мы изучали белок **кальбиндин** в нейронах мозга в нормальных условиях и при холестазах [2, 4].

Выявление белка гена быстрого реагирования нейронов. Ген C-Fos активируется в условиях требующих быстрой мобилизации ресурсов нейронов мозга в экстремальных условиях. Мы наблюдали появление и накопление этого белка в нейронах в ранние сроки холестаза, отражающих процессы их адаптации, способствующие выживанию нейронов в неблагоприятных условиях, например при моделировании подпечёночного холестаза у крыс [4].

Оценка синаптического аппарата. Хорошим маркером межнейронных синапсов является белок синаптических пузырьков, **синаптофизин**. Мы наблюдали его накопление на поверхности тел нейронов (аксосоматические синапсы) и в нейропиле (аксодендритические синапсы) в развивающемся мозге в период синаптогенеза и нарушение этого процесса у потомства крыс, потреблявших алкоголь во время беременности [1].

Заключение. Иммуногистохимические исследования специфических молекулярных маркеров являются надёжным и эффективным инструментом для оценки морфофункционального и метаболического состояния нейронов мозга в норме и при различной патологии.

Литература

1. Зиматкин С.М. Нарушения в мозге после антенатальной алкоголизации: монография / С.М. Зиматкин, Е.И. Бонь. – Гродно: ГрГМУ, 2017. – 192 с.
2. Зиматкин, С.М. Мозжечок крысы: строение, функции, онтогенез: монография / С.М. Зиматкин, О.А. Карнюшко. – Гродно: ГрГМУ, 2019. – 132 с.
3. Зиматкин С.М. Строение и развитие коры головного мозга крысы: монография / С.М. Зиматкин, Е.И. Бонь. – Гродно: ГрГМУ, 2019. – 156 с.

4. Зиматкин С.М., Нейроны мозга при нарушениях циркуляции желчи: монография / С.М. Зиматкин, С.В. Емельянчик. – Гродно: ГрГМУ, 2021. – 368 с.
5. Зиматкин, С.М. Онтогенез гистаминергических нейронов гипоталамуса: монография / С.М. Зиматкин, А. В. Заерко, Е.М. Федина. – Гродно: ГрГМУ, 2022. – 148 с.