

Д.Э. Коржевский^{1, 2}, Г.В. Безнин¹, Е.А. Колос¹, О.В. Кирик¹

ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЯДЕРНОГО БЕЛКА NeuN/Fox-3 В КЛЕТКАХ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹ Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (зав. — д-р мед. наук Д.Э. Коржевский), отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН; ² кафедра фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий (зав. — А.Н. Суворов), Санкт-Петербургский государственный университет

На срезах поджелудочной железы крыс в возрасте 1 мес и половозрелых (n=4) с использованием методов иммуоцитохимии и линии Вистар конфокальной лазерной микроскопии установлен ранее неизвестный факт присутствия белка NeuN в ненервных клетках — секреторных эпителиоцитах экзокринной части органа. Этот белок располагается в надъядерной части цитоплазмы несколько ниже зоны зимогенных гранул. До сих пор ядерный белок NeuN считался паннейрональным дифференцировочным маркером и использовался в исследованиях нейрогенеза.

Ключевые слова: поджелудочная железа, NeuN, иммуоцитохимия, конфокальная лазерная микроскопия

Белок NeuN (Neuronal Nuclei) был открыт в 1992 г. [7] и считается конститутивным белком нуклеоплазмы нервных клеток [5]. Нуклеотидная последовательность NeuN была определена в 2009 г. и тогда же этот белок получил свое второе название — Fox-3 [6]. В настоящее время NeuN/Fox-3 считается паннейрональным дифференцировочным маркером и часто используется в исследованиях нейрогенеза [1]. Известны ряд исключений — NeuN/Fox-3 не встречается в отдельных популяциях нейронов (например, клетках Пуркиньи мозжечка), а в нейронах черного вещества присутствует непостоянно [2]. Несмотря на значительную историю исследований, выполняемых с использованием антител к белку NeuN/Fox-3, он никогда не был обнаружен в каких-либо иных клетках, кроме клеток нервной ткани.

Цель настоящего исследования — продемонстрировать присутствие белка NeuN в секреторных эпителиоцитах экзокринной части поджелудочной железы крысы.

Материал и методы. Работа проведена на крысах линии Вистар обоего пола в возрасте 1 мес и половозрелых (n=4). Содержание животных и все экспериментальные манипуляции осуществляли с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Поджелудочную железу

фиксируют в цинк-этанол-формальдегиде, обезживали, заливали в парафин и изготавливали серийные срезы толщиной 5 мкм на ротационном микротоме Leica RM2125RT (Leica, Германия). Перед проведением иммуногистохимической реакции на ядерный белок нервных клеток проводили тепловое демаскирование антигенов в растворе Target Retrieval Solution S1700 (Dako, Дания). Для выявления NeuN использовали мышинные моноклональные антитела (клон A60) (Merck-Millipore, США) в разведении 1:400, и набор EnVision+System Labeled Polymer-HRP Anti-Mouse (K4001; Dako, Дания). Визуализацию прореагировавших антител проводили с применением диаминобензидина (DAB+, Dako, Дания). После постановки иммуногистохимической реакции часть гистологических препаратов докрашивали астровым синим, заключали в среду Cytoseal 60 (Richard-Allan, США) и анализировали с помощью микроскопа Leica DM750 (Leica, Германия).

Для конфокальной микроскопии после теплового демаскирования антигенов инкубацию в первичных антителах проводили в течение 18 ч при 27 °С. В качестве вторичных антител был использован реагент Link из набора LSAB+System-HRP (Dako, Дания). После инкубации с вторичными антителами препараты инкубировали в растворе стрептавидина, конъюгированного с индокарбоцианином (Cy3, Invitrogen, США) в разведении 1:70. Полученные препараты, заключенные в водорастворимую среду Fluorescence Mounting Medium (Dako, Дания), исследовали и фотографировали при помощи конфокального микроскопа LSM710 (Zeiss, Германия). Для анализа изображений использовали программу ZEN2012 (Zeiss, Германия).

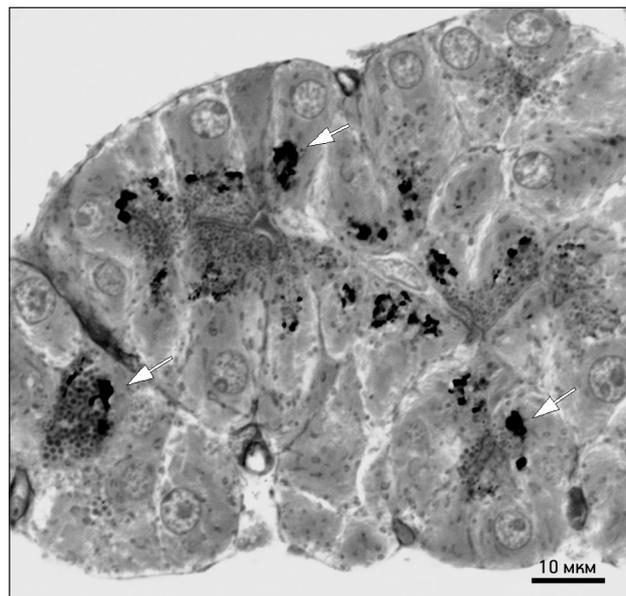
Сведения об авторах:

Коржевский Дмитрий Эдуардович (e-mail: dek2@yandex.ru), *Безнин Глеб Владимирович*, *Колос Елена Андреевна*, *Кирик Ольга Викторовна* (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

Результаты исследования. При постановке реакции на NeuN во всех изученных срезах поджелудочной железы у крысы была обнаружена положительная реакция в апикальной части цитоплазмы большинства экзокриноцитов концевых отделов. Различий, связанных с полом и возрастом животных, не наблюдали. В эндокриноцитах панкреатических островков реакция на NeuN отсутствовала. В нервных клетках интрамуральных ганглиев поджелудочной железы не имелось ни внутриядерной, ни цитоплазматической реакции на исследуемый нейрональный маркер.

При конфокальной микроскопии (рисунок) в цитоплазме экзокринных панкреатоцитов обнаружено аналогичное скопление иммунопозитивного материала, располагающееся непосредственно под областью, занятой зимогенными гранулами, над ядром. Специфическая флюоресценция в ядрах клеток не определялась.

Обсуждение полученных данных. В результате проведенного исследования было обнаружено, что белок NeuN/Fox-3, который постоянно присутствует в ядрах большинства нейронов ЦНС [7], локализован в одном из цитоплазматических компартментов экзокриноцитов поджелудочной железы крысы. Это — первое обнаружение NeuN вне клеток нервной системы. Учитывая высокую специфичность использованных антител (а это — именно тот клон антител, который был получен первооткрывателями данного белка [7]) и воспроизводимость результатов в случае применения как пероксидазной, так и флюоресцентной метки, можно заключить, что результат реакции не является артефактом. Несмотря на значительное число иммуноцитохимических исследований поджелудочной железы, в том числе и выполняемых в Институте экспериментальной медицины [3], этот орган не изучали с использованием антител к NeuN. Поэтому установленный в настоящей работе факт ранее не был известен. Субклеточная структура, в которой концентрируется изучаемый белок, при использованной методике исследования не может быть идентифицирована. В соответствии с областью локализации — надъядерная часть цитоплазмы несколько ниже зоны зимогенных гранул — ею может оказаться и гранулярная эндоплазматическая сеть, и комплекс Гольджи. Последнее предположение менее вероятно в связи с данными о связи NeuN в нейронах с РНК [4]. Отсутствие белка NeuN в нейронах интрамуральных ганглиев



Экзокринная часть поджелудочной железы крысы.

Стрелки — скопления NeuN в апикальных отделах панкреатоцитов. Конфокальная лазерная микроскопия, инвертированное изображение. Иммуноцитохимическая реакция на ядерный антиген NeuN, визуализация с помощью флюорохрома Cy3. Остальные клеточные структуры визуализированы с использованием эффекта автофлюоресценции. Объектив plan-Apochromat 100x/1.40 Oil DICM27 (масляная иммерсия). Для возбуждения флюоресценции Cy3 и автофлюоресценции были использованы твердотельный лазер (561 нм) и гелий-неоновый лазер (633 нм) соответственно. Были использованы следующие комбинации фильтров: Track 1 (NeuN): MBS 488/561/633, Cy3 566–628 нм; Track 2 (клеточные структуры): MBS 488/561/633, автофлюоресценция 638–685 нм

поджелудочной железы у крысы не имеет удовлетворительного объяснения. Известно, что для отдельных нейрональных популяций не характерно присутствие данного белка [7], что рассматривается как исключение из общего правила.

Таким образом, впервые получены данные об экспрессии нейронального белка NeuN в секреторных клетках поджелудочной железы. Вопрос о причинах присутствия этого нейронального белка в ненервных клетках остается открытым и нуждается в дальнейшем изучении.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-15-00014).

ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д.Э., Петрова Е.С., Кирик О.В. и др. Нейрональные маркеры, используемые при изучении дифференцировки стволовых клеток // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2010. Т. 5, вып. 3. С. 57–63.
2. Сухорукова Е.Г. Ядерный белок NeuN в нейронах черного вещества головного мозга человека // Морфология. 2013. Т. 143, вып. 2. С. 78–80.

3. Чумасов Е. И., Петрова Е. С., Коржевский Д. Э. Распределение и структурная организация автономных нервных аппаратов в поджелудочной железе крысы (иммуногистохимическое исследование) // Морфология. 2011. Т. 139, вып. 3. С. 51–58.
4. Darnell R. B. RNA Protein Interaction in Neurons // *Annu. Rev. Neurosci.* 2013. Vol. 36. P. 243–270.
5. Dent M. A., Segura-Anaya E., Alva-Medina J., Aranda-Anzaldo A. NeuN/Fox-3 is an intrinsic component of the neuronal nuclear matrix // *FEBS Lett.* 2010. Vol. 584, № 13. P. 2767–2771.
6. Kim K. K., Adelstein R. S., Kawamoto S. Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors // *J. Biol. Chem.* 2009. Vol. 284. P. 31052–31061.
7. Mullen R. J., Buck C. R., Smith A. M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates // *Development.* 1992. Vol. 116. P. 201–211.

Поступила в редакцию 22.01.2015

CYTOPLASMIC LOCALIZATION OF NEUN/FOX-3 NUCLEAR PROTEIN IN THE PANCREATIC CELLS

*D. E. Korzhevskiy^{1, 2}, G. V. Beznin¹, Ye. A. Kolos¹,
O. V. Kirik¹*

The study of the sections of Wistar rat pancreas (n=4) using the methods of immunocytochemistry and confocal laser microscopy has demonstrated previously unknown fact of the presence of NeuN protein in the secretory epithelial cells of the exocrine part of this organ. The protein was located in the apical part of the cytoplasm slightly below the zone of zymogen granules. Until now the nuclear protein NeuN was considered to be the panneuronal differentiation marker and was used in the studies of neurogenesis.

Key words: *pancreas, NeuN, immunocytochemistry, confocal laser microscopy*

¹ Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAS Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg; ² Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technology, St. Petersburg State University