

Санкт-Петербургский государственный университет

Горобец София Сергеевна

Иммунногистохимический анализ клаудинов в различных
областях головного мозга крыс

Выпускная квалификационная работа по направлению подготовки 06.03.01 «Биология»
основная образовательная программа бакалавриата «Биология»

Работа выполнена на кафедре
Общей физиологии

Научный руководитель:
профессор кафедры Общей физиологии,
д.б.н., А.Г.Марков

Санкт-Петербург

2021

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	5
Гематоэнцефалический барьер	5
Циркумвентрикулярные органы	6
Area postrema	7
Межклеточные контакты	8
Свойства белков клаудинов и окклюдина	10
5.1. Свойства клаудинов-3,-5	10
5.2. Свойства клаудинов-4,-8,-10,-12	11
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	12
3.1. Экспериментальные животные.	12
3.2. Методика получения замороженных срезов.	12
3.3. Иммуногистохимический анализ	12
3.4.. Конфокальная микроскопия.	13
ПРИЛОЖЕНИЕ	14
Таблица 1. Используемые первичные антитела	14
Таблица 2. Используемые вторичные антитела	15
Таблица 3. Используемые другие красители	15
РЕЗУЛЬТАТЫ	16
4.1 Иммуногистохимическое определение белков-маркеров различных типов клеток в головном мозге крысы.	16
4.2 Иммуногистохимическое определение окклюдина в лобных долях	17
4.3 Иммуногистохимическое определение клаудинов-4,-8,-10,-12 в лобных долях	18
4.4 Иммуногистохимическое определение белков плотных контактов в area postrema	19
ОБСУЖДЕНИЕ	19
ВЫВОДЫ	20
БЛАГОДАРНОСТИ	20
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	21

ВВЕДЕНИЕ

Системные функции мозга базируются на гистологической, биохимической, медиаторной и функциональной гетерогенности свойств различных областей мозга. В частности, тканевые барьеры, являющиеся необходимыми структурами мозга и обеспечивающие разделение отдельных компартментов мозга, существенно различаются по своим свойствам. Гематоэнцефалический барьер, разделяющий плазму крови кровеносных сосудов и тканевую жидкость головного мозга, обладает выраженными барьерными свойствами. Строго регулируемый трансклеточный и селективный межклеточный транспорт обеспечивают сохранение параметров внутренней среды мозга и, тем самым, создают оптимальные условия для функций нейронов и мозга в целом [1]. В тоже время существуют области мозга, объединенные понятием циркумвентрикулярные органы, в которых барьерные свойства гематоэнцефалического барьера изменены. Предполагается, что некоторые из них представляют из себя структуры, в которых происходит интеграция метаболических сигналов плазмы крови и деятельности нервных клеток. Так, одна из областей продолговатого мозга, а именно *area postrema*, представляет из себя образование, в котором в результате повышенной проницаемости гематоэнцефалического барьера метаболиты крови могут оказывать влияние на деятельность рядом расположенных нервных ядер, в частности моторного ядра блуждающего нерва [2].

Гематоэнцефалический барьер можно определить как совокупность тесно взаимодействующих между собой тканевых структур и физиологических механизмов, контролирующих обмен веществами между кровью и центральной нервной системой с целью поддержания условий, оптимальных для функционирования мозга. По существующим представлениям в гематоэнцефалический барьер входят следующие структуры: отростки астроцитов, перициты, эндотелий сосудов головного мозга, соединенный плотными контактами, а также базальная мембрана. Главную роль в обеспечении барьерной функции гематоэнцефалического барьера в настоящее время приписывается именно клеткам эндотелия сосудов головного мозга и соединяющим их плотным контактам [3]. Таким образом, изучение проницаемости эндотелия мозговых капилляров и механизмов его регуляции представляет собой первоочередную задачу при исследовании барьерных свойств этого тканевого барьера.

Основными белками, формирующими плотные контакты, являются: окклюдин [4], семейство клаудинов [5], белки адгезии JAM [6], трансмембранный белок трицеллюлин [7], а также цитоплазматические белки ZO (*zonula occludens*)-1, ZO-2, ZO-3 и цингулин, связывающие трансмембранные белки с актиновым цитоскелетом [8]. Свойства плотных контактов и их проницаемость определяются экспрессией трансмембранных белков семейства клаудина [5],

насчитывающего в настоящий момент более 20 представителей. Кластеры различных клаудинов обеспечивают изменение селективной проницаемости эпителиального барьера от высокопроницаемого до непроницаемого состояния [9]. Поэтому изучение молекулярного разнообразия белков плотных контактов, в частности клаудинов, является актуальной задачей в изучении барьерных свойств тканевых барьеров мозга.

Ключевыми белками, участвующим в формировании плотных контактов между клетками эндотелия сосудов мозга, является клаудин-3 и -5. Функциональная роль клаудина-5 в формировании барьерных свойств эпителия сосудов мозга была показана в опытах с мышами, нокаутными по его гену. У этих животных гематоэнцефалический барьер стал проницаем для молекул с массой менее 800 Да [10]. Временное выключение гена клаудина-5 ведет к сходным изменениям в барьерных свойствах эндотелия сосудов и изменению поведения при тестовом введении тиролиберина. Восстановление экспрессии клаудина-5 снимает наблюдаемые изменения в проницаемости и поведении [11]. Однако, в обогащенной фракции эндотелия сосудов мозга обнаружены мРНК пятнадцати клаудинов, при этом ее содержание для разных клаудинов отличается на несколько порядков [12]. Кроме клаудина-3 и -5 высокий уровень транскриптов обнаружен для клаудина-4, -8, -10 и -12. В настоящий момент отсутствуют данные о наличии этих белков в ткани головного мозга, в частности в эндотелии сосудов.

Цель данного исследования состояла в иммуногистохимическом определении наличия и локализации клаудина-4, -8, -10 и -12 в различных по своим свойствам областях: ткани лобных долей и *area postrema* мозга крысы.

В соответствии с целью было поставлено несколько **задач**:

1. Освоение различных методов для достижения результата: замороженных срезов, иммуногистохимического анализа, конфокальной микроскопии;
2. Идентификация различных типов клеток с помощью соответствующих белков-маркеров для верификации используемого метода иммуногистохимического исследования;
3. Изучение распределения белков плотных контактов клаудинов-4,-8,-10,-12 в лобных долях и *area postrema*

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гематоэнцефалический барьер

Граница между кровообращением и центральной нервной системой состоит из сложных многоклеточных структур с уникальными особенностями, которые избирательно разрешают или ограничивают прохождение веществ между этими двумя отделами [13,14]. Гематоэнцефалический барьер — это физиологический барьер между кровью и паренхимой мозга, состоящий из нейроваскулярного объединения (рис.1) эндотелиоцитов, базальной мембраны, перицитов, астроцитов и многочисленных контактов между этими клетками [15]. Такой эндотелиальный гематоэнцефалический барьер реализован практически в каждом капилляре головного мозга, за исключением капилляров циркумвентрикулярных органов. Функциональное назначение барьера сводится к выполнению двух тесно связанных задач: барьерной и транспортной.

Реализация транспортной функции обеспечивает перенос веществ с помощью многочисленных транспортеров, расположенных в мембране эндотелиоцитов, перицитов и астроцитов [16][17]. В ГЭБ реализуется транспорт молекул с помощью облегченной диффузии, рецептор-опосредованного транспорта и активного транспорта против градиента концентрации веществ [18,19]. Транспорт по межклеточным пространствам ограничивается межклеточными плотными и адгезионными контактами, однако их роль в переносе некоторых веществ до конца не изучена. Благодаря этим факторам, ГЭБ пропускает некоторые липофильные молекулы и вещества массой менее 400 Да. [20]

Одновременно с тем, выполняя барьерную функцию, ГЭБ предотвращает попадание в ткань мозга нейротоксических компонентов плазмы: антител, альбумина, плазмина, фибрина, а также препятствует избыточной миграции иммунных клеток [21]. Четкое разграничение между кровью и паренхимой мозга не позволяет развиваться нейровоспалению [22]. Для белков плотных и адгезионных контактов было показано возможное участие в процессе экстравазации лейкоцитов. [23,24]. Однако в обычном состоянии между эндотелиоцитами ГЭБ постоянно присутствуют уплотняющие клаудины-3,-5 [25,26].

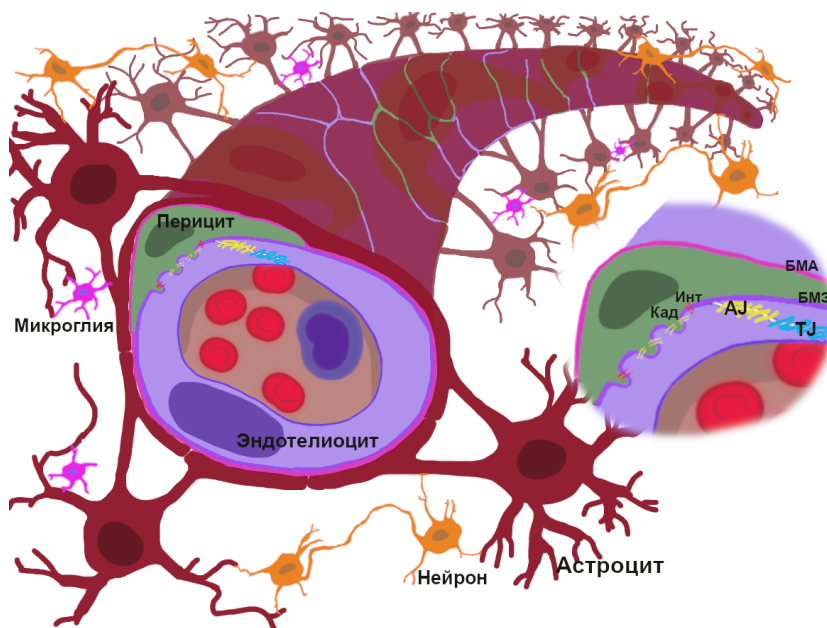


Рис.1 Нейроваскулярное объединение. TJ - плотный контакт, AJ - адгезионный контакт, Кад - кадгерин, Инт - интегрин, БМЭ - базальная мембрана эндотелиоцита, БМА - базальная мембрана астроцита

2. Циркумвентрикулярные органы

Циркумвентрикулярные органы являются древними структурными элементами мозга, которые присущи всем позвоночным. В настоящий момент не известен генетический маркер, свидетельствующий о молекулярных сходствах ЦВО, известно лишь родство происхождения в онтогенезе, строение и выполняемые функции [27].

Интерес к этим структурам возник исходя из того, что эти органы пронизаны плотной сетью капилляров с повышенной проницаемостью для веществ, не способных в других сосудах головного мозга пройти через ГЭБ [28]. Так, разнообразные пептиды и гормоны без наличия специализированных транспортеров не могут пересекать кровеносные сосуды, окруженные барьером, в то время как для некоторых ЦВО повышенная транспортная способность пептидов является функциональной необходимостью [29]. Физиологическая роль ЦВО заключается в поддержании гомеостаза спинномозговой жидкости и в регуляции некоторых жизненно важных систем организма, таких как сердечно-сосудистая, поддержание и нормализация водно-солевого баланса, обеспечение иммунных ответов, контроль жажды и голода, контроль репродуктивного поведения [30]. Молекулярные механизмы реализации некоторых из этих функций до сих пор до конца не ясны.

Принято разделять ЦВО на сенсорные и секреторные. Сенсорные органы — *area postrema*, субфорникальный орган и сосудистый орган терминальной пластинки воспринимают молекулы плазмы крови и обмениваются информацией с другими отделами мозга и вегетативной нервной

системой через многочисленные нейронные связи [31]. Секреторные органы — срединное возвышение, субкомиссуральный орган, эпифиз и нейрогипофиз выделяют в кровь гормоны и гликопротеины и обмениваются информацией с другими отделами мозга (рис.2).

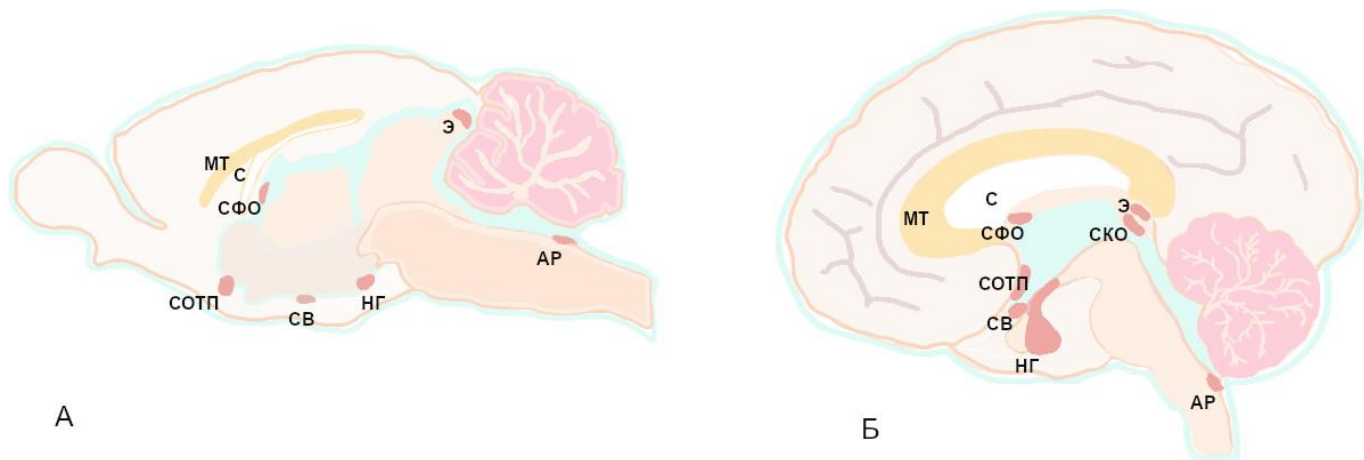


Рис. 2 Циркумвентрикулярные органы крысы (А) и человека (Б). АР - *area postrema*, СФО - субфорникальный орган, СОТП - сосудистый орган терминальной пластинки, СВ - срединное возвышение, СКО - субкомиссуральный орган, Э - эпифиз, НГ - нейрогипофиз. МТ - мозолистое тело, С - свод.

3. *Area postrema*

Постремная зона, или самое заднее поле, или *area postrema* (АР) расположена под мозжечком в нижнем конце четвертого желудочка. У большинства млекопитающих, в том числе и человека, это парный выступающий орган [32], у грызунов непарный [33]. АР состоит из сосудистого и клеточного компонентов.

Касательно клеточного состава, в *area postrema* были показаны клетки различного происхождения. В данном органе присутствуют тучные клетки, макрофаги и фибробласты, микроглия и астроциты, а также мелкие нейроны. Как и другие ЦВО, этот орган окружен специальной эпендимной выстилкой, клетки которой простирают свои микроворсинки к спинномозговой жидкости четвертого желудочка. Эти таницитоподобные клетки лишены ресничек, но главное, они иммунореактивны к оклюдину, клаудину – 1,5 и белку ZO-1, что является маркером наличия между этими клетками плотных контактов [34]. Также, между таницитоподобными клетками расположены адгезионные контакты и кадгерины.

Сосудистая часть *area postrema* состоит из многочисленных фенестрированных капилляров, формирующих систему быстрого переноса веществ между кровью и тканью мозга [33]. Примечательно, что для сосудов ЦВО и *area postrema* характерно обширное периваскулярное пространство, в котором и находятся иммунные клетки вместе с фибробластами [35] (рис.3).

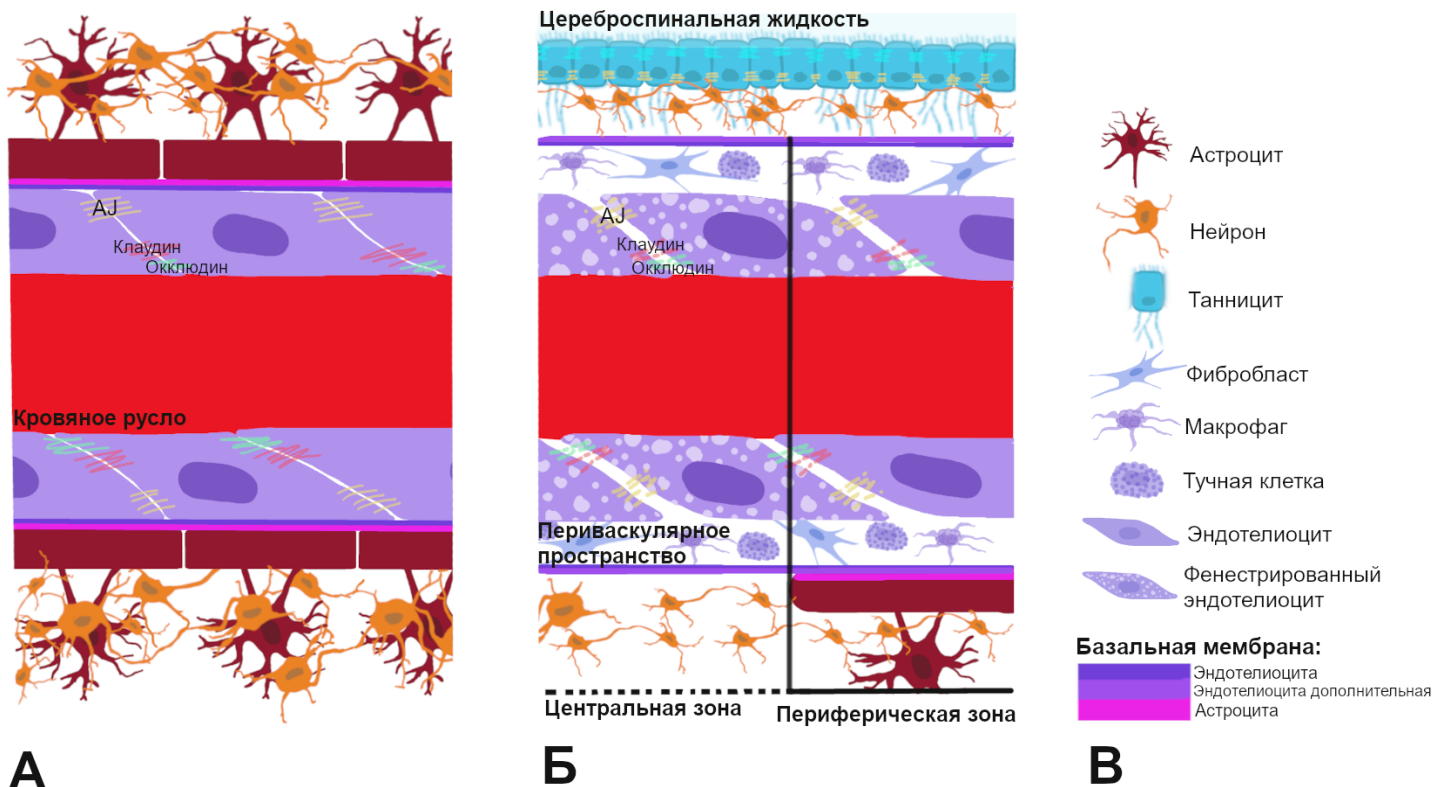


Рис.3 Разница между капиллярами ГЭБ (А) и ЦВО (Б). В - клеточный состав. АЖ - адгезионный контакт.

Говоря о функциях этого органа, нельзя не упомянуть входящие и выходящие связи *area postrema* с отделами мозга. *Area postrema* соединяется с одиночным ядром, с ядром солитарного тракта и другими центрами вегетативного контроля в стволе мозга [36]. К функциям принято относить следующие: контроль тошноты и рвоты [37], водно-солевого баланса организма, контроль жажды и голода, контроль полового и материнского поведения, контроль некоторых иммунных ответов, контроль сердечно-сосудистой системы [30]. Недавним открытием было выявление связи между работой этого органа и появлением такого когнитивного явления как мотивация работать ради еды [38]. Примечательно то, что в *area postrema* есть множество дофаминергических нейронов, которые активируются при приеме дофаминергических препаратов, используемых при болезни Паркинсона [39]. Считается, что активация рвотных центров *area postrema* этими препаратами и является причиной их побочных эффектов [40]. Несмотря на многочисленные исследования *area postrema*, еще многое предстоит изучить и многие молекулярные механизмы работы разобрать.

4. Межклеточные контакты

Основные типы контактов между клетками ГЭБ: адгезионные и плотные. Каждый из них обладает рядом особенностей белкового состава и выполняемых функций.

Ближе всего к базолатеральной мембране белки адгезионного контакта, VE-кадгерины. Они образуют гомофильные контакты между эндотелиальными клетками примерно 20нм шириной. Адгезионные контакты связаны с цитоскелетом и модулируют передачу сигналов рецепторов, а при фосфорилировании VE-кадгерина регулируют миграцию лимфоцитов, моноцитов и нейтрофилов [41].

Плотные контакты расположены ближе к апикальной мембране и состоят из белков клаудинов. Для ГЭБ установлено, что за его формирование отвечают белки клаудин-3, -5 [42]. Кроме клаудинов плотные контакты формируют следующие белки: окклюдин, являющийся маркером плотных контактов и регулятором их проницаемости, различные адаптерные белки ZO-1-3, соединяющие трансмембранную часть молекулы клаудина с актиновым цитоскелетом клетки, JAM-белки, регулирующие полярность клетки и перенос лейкоцитов [43]. К функциям плотных контактов относят не только ограничение трансцеллюлярного транспорта, но и обеспечение стабильности сосудов в целом, что реализуется путем передачи внутриклеточных сигналов. Белки плотных контактов за счет многочисленных взаимосвязей с адаптерными молекулами (рис.4) сообщают положение клетки, ограничивают ее рост, и в некоторых случаях способны запускать апоптоз клеток [44].

Для *area postrema* ситуация распределения белков плотных контактов не однозначная. Показано, что в дистальных зонах и между эпендимными клетками есть белки клаудины-1,-5, ZO-1, окклюдин, но не клаудин-3, тогда как в центральной зоне *area postrema* наоборот, есть распределение клаудинов-1,3 и окклюдина, но нет важнейших белков плотных контактов клаудина-5 и ZO-1, определяющих барьерные свойства. Предположительно, барьерной и транспортной функцией в *area postrema* заняты танницитоподобные клетки и астроциты [45]. Это предположение требует отдельного изучения.

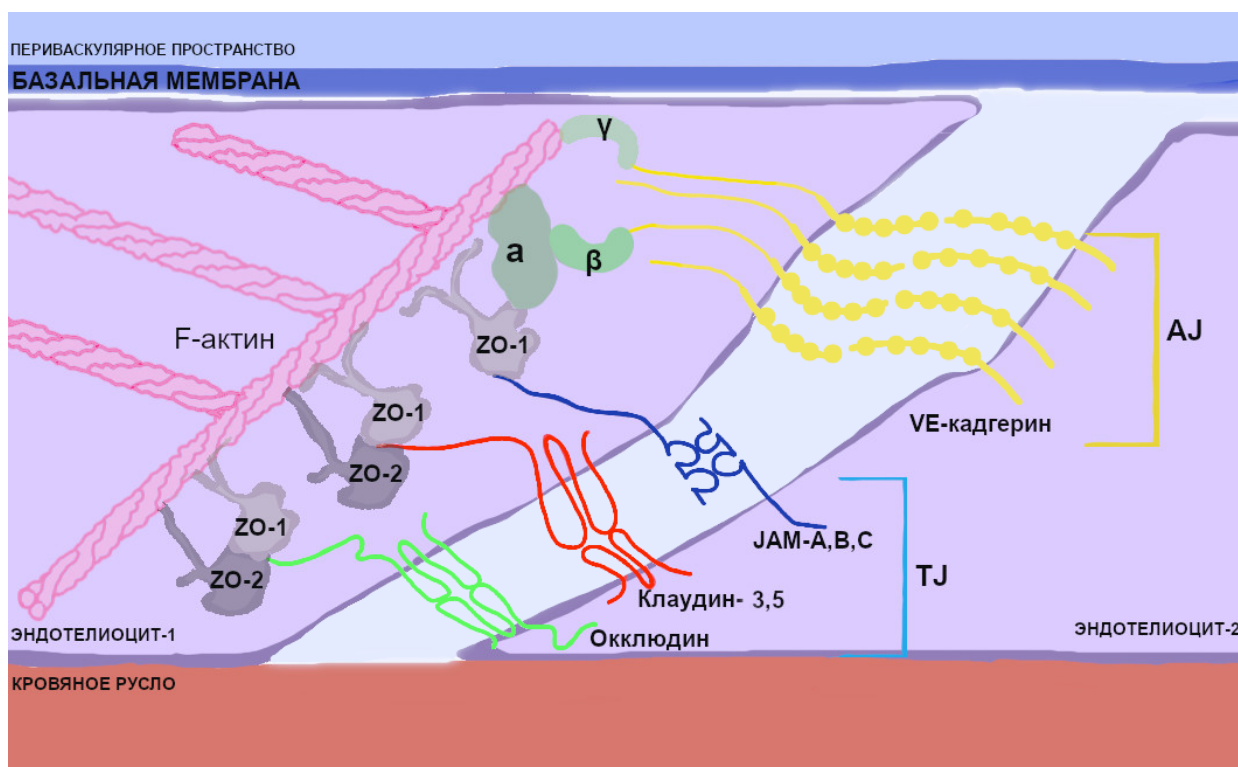


Рис.4 Строение плотных контактов в ГЭБ. TJ - плотный контакт, AJ - адгезионный контакт, ZO - zonula occludens, α, β, γ - белки-катенины.

5. Свойства белков клаудинов и окклюдина

Как было упомянуто ранее, на основании данных исследования уровня экспрессии мРНК клаудинов в эндотелии капилляров головного мозга у мышей [12] был выбран спектр наиболее экспрессируемых клаудинов-4-8,-10,-12, а в качестве контроля был взят маркер плотных контактов окклюдин. Каждый из этих белков обладает своими исключительными свойствами, показанными на различных тканях. Кроме того, примечательная способность белков клаудинов к гетеровзаимодействию с клаудинами другого типа позволяет формировать свойства, отличные от свойств гомополимерных клаудинов [46]. Поэтому изучение свойств белков клаудинов далеко от своего завершения.

5.1. Свойства клаудинов-3,-5

В опытах с нокаутными животными по клаудину-3 было показано развитие обширного воспаления мозга. Данные исследования показывают барьерную функцию клаудина-3 в эпителии мозга: данный белок препятствует проникновению иммунных клеток из крови в паренхиму мозга и развитию нейровоспаления. Клаудин-3 работает как уплотняющий и уменьшает проницаемость эпителия [47].

Жизненно важный барьерный белок клаудин-5 играет ключевую роль в межклеточном транспорте для молекул меньше 800 Да и препятствует прохождению молекул 3-10 кДа. Жизнеспособность мышей, нокаутных по клаудину-5 не превышала 10 часов после рождения [48]. Кроме того, наличие клаудина-5 необходимо на ранних этапах развития мозга [49]. Ведущая роль этого белка в формировании ГЭБ показана не только у позвоночных, но и у некоторых беспозвоночных животных [50], что еще раз показывает его незаменимость и необходимость для корректной работы плотного соединения эндотелиоцитов мозга.

5.2. Свойства клаудинов-4,-8,-10,-12

Функции белков клаудинов, мРНК которых была найдена в большом количестве в ткани мозга, разительно отличаются. Однако общей чертой выбранного спектра клаудинов является участие в формировании ионного градиента в различных тканях. Известно, что клаудин-4 понижает проницаемость эпителия для ионов Na^+ в ткани почки [51]. Представляет интерес его гетеровзаимодействие с другим клаудином: показано, что без участия клаудина-8 клаудин-4 не способен правильно встраиваться в мембрану и в условиях нокаута по клаудину-8 отсутствовал в эпителии. В свою очередь, клаудин-8 совместно с переносчиками натрия участвует в натриевом транспорте. Особенность клаудина-8 проявляется в способности к переносу ионов NH_4^+ и HCO_3^- в почке [51,52]. Интересна функция клаудина-10, который является порообразующим. Его изоформы 10а и 10б обладают противоположными свойствами: клаудин-10а образует анион селективные поры между эпителиоцитами и повышает проницаемость для анионов Cl^- и NO_3^- , а клаудин-10б путем образования катион селективных пор повышает проницаемость для катионов K^+ и Na^+ , Li^+ [53]. Что касается клаудина-12, в различных исследованиях отмечалась его способность к гетеровзаимодействию с другими типами клаудинов. К примеру, взаимодействуя с клаудином-2, он участвует в адсорбции ионов Ca^{2+} , а у нокаутных по клаудину-12 мышей его отсутствие компенсируется сокращением белка клаудина-14 [54]. Кроме того, считается, что клаудин-12 совместно с клаудинами-3 и -5 участвует в образовании ГЭБ, а отсутствие клаудина-12 способствует неврологическим и поведенческим изменениям [55].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Экспериментальные животные.

В опытах использовали самцов крыс Вистар (n=5) весом 190-230 грамм, взятых из питомника Института физиологии имени И.П. Павлова РАН. Животные содержались при комнатной температуре и естественном освещении, с беспрепятственным доступом к воде и корму. Эксперименты были выполнены в соответствии с Директивой Совета Европейского сообщества (2010/63/EU) об использовании лабораторных животных. Перед проведением операций животные были анестезированы золетилом (Virbac, Франция) 100 мг/кг массы тела, внутривенно, а также миорелаксантом ксилазином (Нита-Фарм, Россия) 0,3 мг/кг массы тела внутримышечно. После достижения наркоза была проведена декапитация.

3.2. Методика получения замороженных срезов.

Выделение головного мозга происходило на охлажденной подложке. Ткань помещалась в емкость с 10% забуференным формалином (БиоВитрум, Россия) для последующего хранения. Перед подготовкой ткани мозга к заморозке и нарезке выдерживали полученные образцы в 15% растворе сахарозы 24 часа. При получении гистологических срезов отделяли области лобных долей и зоны продолговатого мозга, которые помещались в криопротектор Frozen Section Compound (Leica, США). Кусочки мозга в криопротекторе замораживались при температуре -80 °С в течение 15 минут, после чего эти замороженные блоки с тканью мозга использовались для получения тонких срезов толщиной 18 мкм.

Далее, с помощью криостат-микротомы Leica CM-3050S (Германия) замороженные срезы располагали на предметных стеклах SuperFrost Plus (Thermo Scientific, США).

3.3. Иммуногистохимический анализ

Для получения достоверных и качественных результатов проведенного иммуногистохимического анализа необходимо провести процедуры по демаскировке тканевых антигенов, а также положительный и отрицательный контроль для корректной интерпретации полученного результата.

Фиксирование тканевого материала могло привести к конформационным изменениям и образованию перекрестных сшивок тканевых антигенов, что в свою очередь препятствует их взаимодействию с антителом [56] . Отсюда возникает необходимость их демаскировки путем высокотемпературной обработки в буферном растворе.

Для демаскировки полученные срезы выдержали 30 минут на водяной бане (+85 °C) в цитратном буфере (pH=6,2) (Panreac, США), после чего проводили отмывку ткани в натрий-фосфатном буфере (Phosphate buffered saline, PBS) (Helicon, США) три раза. Последующее нанесение 10% раствора BSA (бычий сывороточный альбумин) с 0,2% Triton X-100 (Helicon, США) на каждое стекло сопровождалось их дальнейшей инкубацией во влажной камере при +37 °C в течении 2 часов. Только после выполнения вышеупомянутых шагов приступили к нанесению необходимых первичных антител. Инкубация стекол с первичными антителами осуществлялась в течение 24 часов при +4 °C во влажной камере.

Перед нанесением вторичных антител провели серию промываний в PBS, а затем инкубацию в 0,1% Судана черного (Интерхим, Россия) в 70% этиловом спирте на 20 мин с целью подавления автофлуоресценции эритроцитов в кровеносных сосудах [57,58]. В завершение наносили необходимые вторичные антитела и инкубировали стекла во влажной камере 90 минут, после чего наносили ядерный краситель DAPI и накрывали покровным стеклом.

Чтобы убедиться в специфичном связывании антител с исследуемым белком, был проведен отрицательный контроль антител. Для исключения методических ошибок в процессе проведения иммуногистохимического анализа был проведен положительный контроль на антигены.

Отрицательный контроль антител. Стекла со срезами обрабатывались согласно вышеизложенной методике, только вместо первичных антител на срезы наносили 3% раствор BSA. Дальнейшее исследование этих стекол выявило отсутствие сигнала, что также означало отсутствие неспецифического взаимодействия используемых антител.

Положительный контроль на антиген. Антитела к белку окклюдину проверялись на ткани лобных долей, в которой он достоверно присутствует [59]. В результате был получен характерный флуоресцентный сигнал в области кровеносных сосудов лобных долей (рис.7 А). Это демонстрирует тот факт, что используемые нами антитела могут специфично связываться с белками в условиях реализации представленного протокола проведения анализа.

3.4.. Конфокальная микроскопия.

С помощью лазерного конфокального сканирующего микроскопа Leica TCS SP5 (Германия) проводился анализ распределения белков плотных контактов и глиального фибриллярного белка в зоне лобных долей и в *area postrema*.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1. Используемые первичные антитела

Антиген	Источник антитела	Клон	Номер по каталогу и производитель	Разведение
<i>Клаудин-1</i>	кролик	поликлональное	51-9000 Invitrogen	1:100
<i>Клаудин-3</i>	кролик	поликлональное	34-1700 Invitrogen	1:100
<i>Клаудин-4</i>	кролик	поликлональное	36-4800 Invitrogen	1:100
<i>Клаудин-8</i>	кролик	поликлональное	40-0700Z Invitrogen	1:100
<i>Клаудин-10</i>	кролик	поликлональное	38-8400 Invitrogen	1:100
<i>Клаудин-12</i>	кролик	поликлональное	38-8200 Invitrogen	1:100
<i>Окклюдин</i>	мышь	моноклональное	33-1500 Invitrogen	1:100
<i>GFAP (Glial fibrillary acidic protein)</i>	кролик	поликлональное	PA5-16291 Invitrogen	1:500
<i>E-кадгерин</i>	мышь	моноклональное	MA5-12547 Invitrogen	1:200

Таблица 2. Используемые вторичные антитела

Вторичное антитело	Хозяин	Клон	Цвет сигнала	Номер по каталогу и производитель
Анти-кроличьи CF633	коза	поликлональное	Красный	20122-1mg Biotium
Анти-мышинные Alexa Fluor 488	коза	поликлональное	Зеленый	A28175 Invitrogen
Анти-мышинные Alexa Fluor 546	коза	поликлональное	Желтый	A-11003 Invitrogen

Таблица 3. Используемые другие красители

Название красителя	Назначение	Цвет сигнала	Номер по каталогу и производитель
SYTOX Green Nucleic Acid Stain	краситель нуклеиновых кислот	зеленый	S7020 Invitrogen
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)	краситель нуклеиновых кислот	синий	D1306 Invitrogen

РЕЗУЛЬТАТЫ

4.1 Иммуногистохимическое определение белков-маркеров различных типов клеток в головном мозге крысы.

Лобные доли. Связывание первичных антител с глиальным фибриллярным кислым белком (GFAP) и дальнейшая инкубация с козыми анти-кроличьими вторичными антителами CF633 на срезах лобных долей головного мозга крысы дает интенсивный красный сигнал, визуализирующий астроцитарные клетки (рис.5). Обработка ядерным красителем SYTOX Green позволяет идентифицировать также их ядра. Найденные клетки астроцитов характеризуются длинными первичными ветвями, отходящими от сомы клетки, которые делятся на более тонкие отростки.

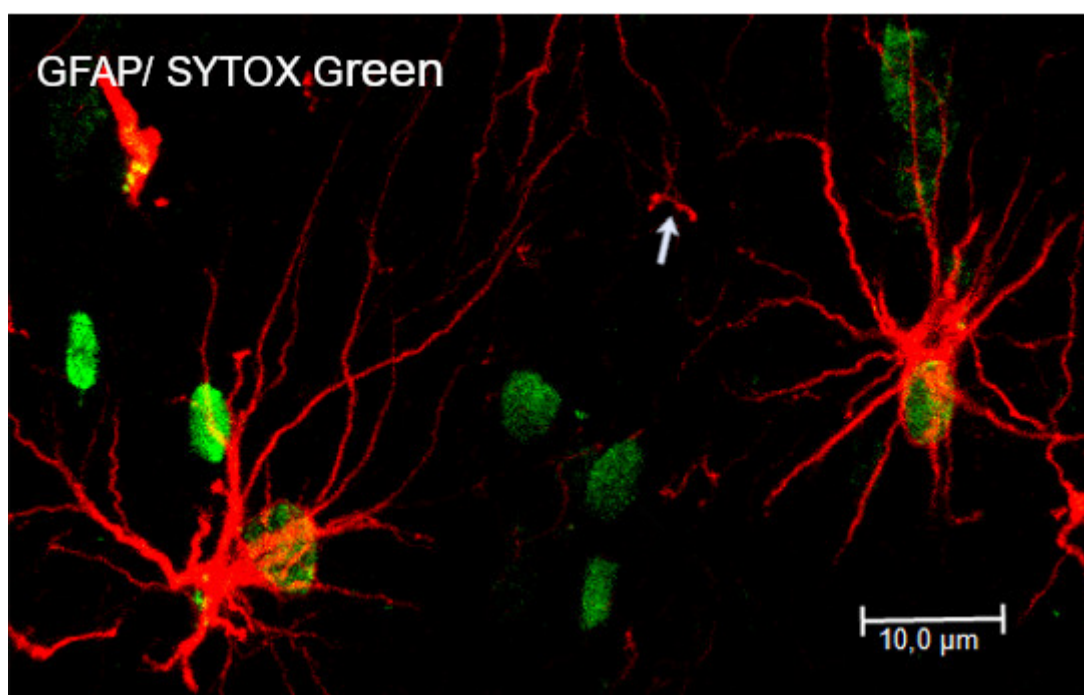


Рис.5 Иммунофлюоресцентный сигнал глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в клетках глии лобных долей. Отростки глиальных клеток окрашены красным. Стрелкой указана ножка астроцита.

Area postrema. На срезах мозга с *area postrema*, обработанных антителами к кадгерину, нами был идентифицирован сигнал между таницитоподобными клетками, выстилающими изнутри центральный канал. Слева и справа от центрального канала срез прошел по разным плоскостям клетки, о чем свидетельствует характер распределения сигнала (рис.6). В левой части срез прошел горизонтально относительно клетки, сигнал имеет вид ячеистой структуры. В правой части срез прошел вертикально относительно клетки, сигнал выглядит точечно.

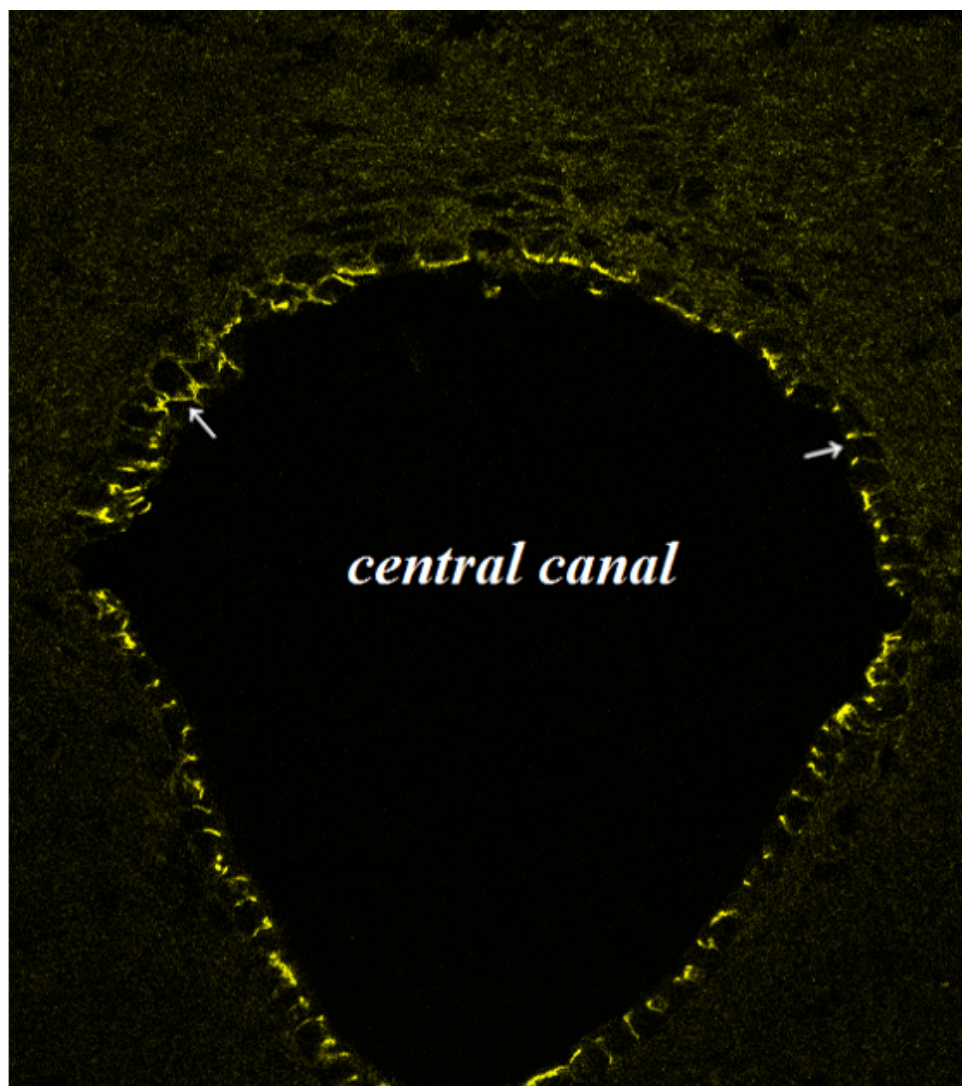


Рис.6 Распределение сигнала Е-кадгерина в таницитоподобных клетках центрального канала. Стрелками указаны срезы в разных плоскостях клетки.

4.2 Иммуногистохимическое определение окклюдина в лобных долях

На рис.7 А можно идентифицировать несколько участков сосудов микроциркуляторного русла лобных долей, вдоль которых, в виде протяженных линий, флуоресцирует зеленым окклюдин. Для корректной интерпретации полученного сигнала, окрашивали ядра эндотелиоцитов: наличие голубого сигнала ядерного красителя DAPI совместно с протяженным зеленым сигналом окклюдина подтверждает предположение, что перед нами участок капилляра.

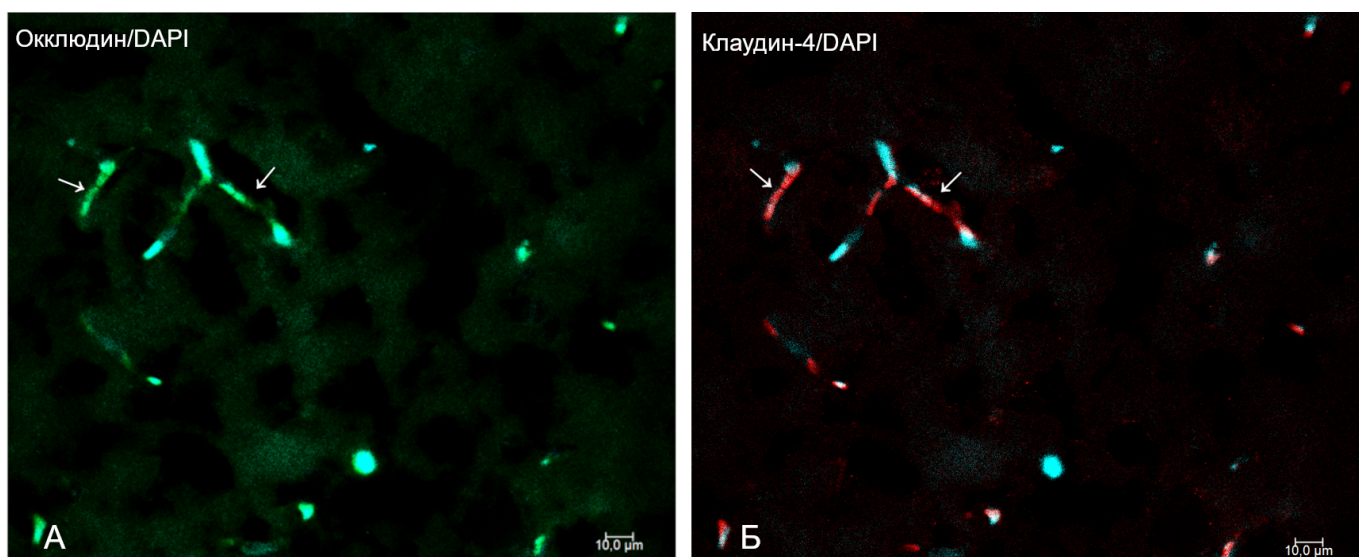


Рис.7 Флуоресцентный сигнал в лобных долях головного мозга крысы: А - зеленый сигнал окклюдина, Б - красный сигнал клаудина-4. Голубым цветом сигнализируются ядра, окрашенные DAPI.

4.3 Иммуногистохимическое определение клаудинов-4,-8,-10,-12 в лобных долях

Иммуногистохимическое определение клаудина-4 в лобных долях дало положительный сигнал (рис.7 Б, рис.8). Это типичная картина, которая наблюдалась на срезах лобных долей крыс. На представленном рис.8 отчетливо видна разница между формой ядер эндотелиоцитов и нейронов: ядра клеток эпителия капилляров имеют протяженный вид, тогда как ядра нейронов округлые. Для верификации расположения клаудина-4 в эндотелии сосудов применяли ряд критериев:

- 1) Размеры и конфигурация красного сигнала клаудина-4 соответствует архитектонике сосуда;
- 2) Наличие рядом расположенного голубого сигнала ядер эндотелиоцитов удлинённой формы;
- 3) Наложение двух сигналов друг на друга: голубого ядерного сигнала и красного сигнала белка клаудина-4

На основании всех этих параметров мы делаем вывод о том, что сигнал клаудина-4 находится в эндотелии сосудов (рис.8)

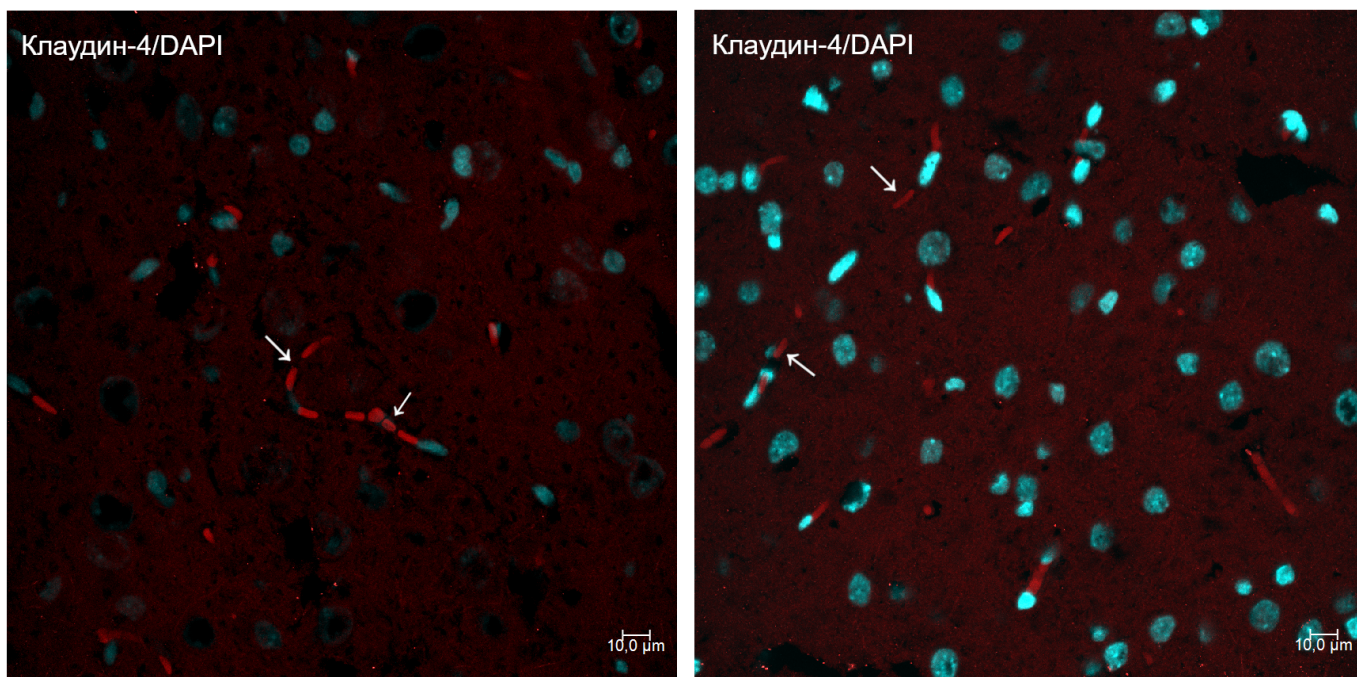


Рис.8 Сигнал клаудина-4 в эндотелии головного мозга крыс. Стрелками указан сосуд.

Таким образом, нами было показано наличие белка клаудина-4 в сосудах лобных долей головного мозга крысы.

Сигнал белков клаудинов-8,-10,-12 отсутствовал в исследуемой области лобных долей.

4.4 Иммуногистохимическое определение белков плотных контактов в *area postrema*

Сигнал белков клаудинов-4-8,-10,-12 отсутствовал в области *area postrema*.

ОБСУЖДЕНИЕ

С момента появления первых сведений о существовании гематоэнцефалического барьера и циркумвентрикулярных органов проводилось множество работ по установлению их строения и выполняемых функций. Новую волну открытий в исследованиях физиологических особенностей данных областей мозга внесло обнаружение белков клаудинов. Изучение молекулярного строения межклеточных контактов гематоэнцефалического барьера позволяет глубже понять основы гетерогенности функционирования головного мозга. Наше исследование в очередной раз показывает неоднородность свойств мозговых структур: спектр белков клаудинов различается в сосудах с высокой и низкой проницаемостью. Так, впервые обнаруженный нами в сосудах лобных

долей, уплотняющий белок клаудин-4 отсутствует в капиллярах *area postrema*, характеризующихся повышенной проницаемостью. В тоже время, порообразующие белки клаудины-10 и белки клаудины-8,-12, участвующие в переносе различных ионов, отсутствуют в сосудах лобных долей, имеющих структуры гематоэнцефалического барьера. Отсутствие этого же спектра клаудинов в капиллярах *area postrema* может указывать на то, что за повышенную проницаемость сосудов данного органа отвечают другие структурные элементы, но не клаудины.

Таким образом, наше исследование демонстрирует присутствие между эндотелиоцитами капилляров лобных долей, помимо клаудинов-3,5 также клаудина-4. В дальнейших исследованиях необходимо выяснить роль клаудина-4 в капиллярах мозга, а именно, ответственен ли данный белок за формирование и поддержание барьерных свойств гематоэнцефалического барьера, или выполняет другие функции.

ВЫВОДЫ

1. Методом иммуногистохимического анализа впервые показано наличие клаудина-4 в эндотелии сосудов лобных долей головного мозга крыс.
2. Сигнал от клаудина -8, -10, -12 в ткани лобных долей не идентифицирован.
3. Клаудин -4, -8, -10, -12 в области *area postrema* не были обнаружены.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю благодарность за помощь в постановке опытов и ценные советы Бикмурзиной Анастасии Евгеньевне, а также коллективу сотрудников кафедры общей физиологии СПбГУ за полученные в процессе обучения и работы профессиональные знания и навыки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, Nelson AR, Zlokovic BV. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol Rev.* 2019 Jan 1;99(1):21-78. doi: 10.1152/physrev.00050.2017.
2. Maolood N, Meister B. Protein components of the blood-brain barrier (BBB) in the brainstem area postrema-nucleus tractus solitarius region. *J Chem Neuroanat.* 2009 May;37(3):182-95. doi: 10.1016/j.jchemneu.2008.12.007. Epub 2008 Dec 25.
3. Cardoso FL, Brites D, Brito MA. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Rev.* 2010 Sep 24;64(2):328-63. doi: 10.1016/j.brainresrev.2010.05.003. Epub 2010 May 26.
4. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol.* 1993 Dec;123(6 Pt 2):1777-88. doi: 10.1083/jcb.123.6.1777.
5. Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol.* 1998 Oct 19;143(2):391-401. doi: 10.1083/jcb.143.2.391.
6. Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol.* 1998 Jul 13;142(1):117-27. doi: 10.1083/jcb.142.1.117.
7. Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol.* 2005 Dec 19;171(6):939-45. doi: 10.1083/jcb.200510043.
8. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis.* 2004 Jun;16(1):1-13. doi: 10.1016/j.nbd.2003.12.016.
9. Markov AG, Aschenbach JR, Amasheh S. Claudin clusters as determinants of epithelial barrier function. *IUBMB Life.* 2015 Jan;67(1):29-35. doi: 10.1002/iub.1347. Epub 2015 Mar 18.
10. Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol.* 2003 May 12;161(3):653-60. doi: 10.1083/jcb.200302070.

11. Campbell M, Kiang AS, Kenna PF, Kerskens C, Blau C, O'Dwyer L, Tivnan A, Kelly JA, Brankin B, Farrar GJ, Humphries P. RNAi-mediated reversible opening of the blood-brain barrier. *J Gene Med.* 2008 Aug;10(8):930-47. doi: 10.1002/jgm.1211.
12. Ohtsuki S, Yamaguchi H, Katsukura Y, Asashima T, Terasaki T. mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting. *J Neurochem.* 2008 Jan;104(1):147-54. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.05008.x. Epub 2007 Oct 30.
13. Alvarez JI, Dodelet-Devillers A, Kebir H, Ifergan I, Fabre PJ, Terouz S, Sabbagh M, Wosik K, Bourbonnière L, Bernard M, van Horssen J, de Vries HE, Charron F, Prat A. The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science.* 2011 Dec 23;334(6063):1727-31. doi: 10.1126/science.1206936. Epub 2011 Dec 1.
14. Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV. Pericyte-specific expression of PDGF beta receptor in mouse models with normal and deficient PDGF beta receptor signaling. *Mol Neurodegener.* 2010 Aug 25;5:32. doi: 10.1186/1750-1326-5-32.
15. Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, Zlokovic BV. Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell.* 2015 Nov 19;163(5):1064-1078. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.067.
16. Daneman R, Zhou L, Agalliu D, Cahoy JD, Kaushal A, Barres BA. The mouse blood-brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PLoS One.* 2010 Oct 29;5(10):e13741. doi: 10.1371/journal.pone.0013741.
17. Fu BM. Transport Across the Blood-Brain Barrier. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1097:235-259. doi: 10.1007/978-3-319-96445-4_13.
18. Löscher W, Potschka H. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx.* 2005;2(1):86-98. doi:10.1602/neurorx.2.1.86
19. Pardridge WM. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today.* 2007 Jan;12(1-2):54-61. doi: 10.1016/j.drudis.2006.10.013. Epub 2006 Nov 13.
20. Pardridge WM. Blood-brain barrier endogenous transporters as therapeutic targets: a new model for small molecule CNS drug discovery. *Expert Opin Ther Targets.* 2015;19(8):1059-72. doi: 10.1517/14728222.2015.1042364. Epub 2015 May 2.
21. Ransohoff R., Engelhardt, B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 12, 623–635 (2012).
22. Zlokovic BV. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2011 Nov 3;12(12):723-38. doi: 10.1038/nrn3114.

23. Küppers V, Vockel M, Nottebaum AF, Vestweber D. Phosphatases and kinases as regulators of the endothelial barrier function. *Cell Tissue Res.* 2014 Mar;355(3):577-86. doi: 10.1007/s00441-014-1812-1. Epub 2014 Feb 25.
24. Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol.* 1998 Jul 13;142(1):117-27. doi: 10.1083/jcb.142.1.117.
25. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Kraus J, Rascher-Eggstein G, Liebner S, Hamm S, Duffner F, Grote EH, Risau W, Engelhardt B. Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol.* 2003 Jun;105(6):586-92. doi: 10.1007/s00401-003-0688-z. Epub 2003 Feb 25.
26. Luissint AC, Federici C, Guillonneau F, Chrétien F, Camoin L, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Couraud PO. Guanine nucleotide-binding protein Gai2: a new partner of claudin-5 that regulates tight junction integrity in human brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 May;32(5):860-73. doi: 10.1038/jcbfm.2011.202. Epub 2012 Feb 15
27. Korzh V, Kondrychyn I. Origin and development of circumventricular organs in living vertebrate. *Semin Cell Dev Biol.* 2020 Jun;102:13-20. doi: 10.1016/j.semcdb.2019.10.010. Epub 2019 Nov 6.
28. Duvernoy HM, Risold PY. The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain Res Rev.* 2007 Nov;56(1):119-47. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.06.002. Epub 2007 Jun 18.
29. Ciofi P, Garret M, Lapirot O, Lafon P, Loyens A, Prévot V, Levine JE. Brain-endocrine interactions: a microvascular route in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology.* 2009 Dec;150(12):5509-19. doi: 10.1210/en.2009-0584. Epub 2009 Oct 16.
30. Kaur C, Ling EA. The circumventricular organs. *Histol Histopathol.* 2017 Sep;32(9):879-892. doi: 10.14670/HH-11-881. Epub 2017 Feb 8.
31. Cottrell GT, Ferguson AV. Sensory circumventricular organs: central roles in integrated autonomic regulation. *Regul Pept.* 2004 Jan 15;117(1):11-23. doi: 10.1016/j.regpep.2003.09.004.
32. Longatti P, Porzionato A, Basaldella L, Fiorindi A, De Caro P, Feletti A. The human area postrema: clear-cut silhouette and variations shown in vivo. *J Neurosurg.* 2015 May;122(5):989-95. doi: 10.3171/2014.11.JNS14482. Epub 2015 Jan 16.
33. Dempsey EW. Neural and vascular ultrastructure of the area postrema in the rat. *J Comp Neurol.* 1973 Jul 15;150(2):177-99. doi: 10.1002/cne.901500206.

34. Mullier A, Bouret SG, Prevot V, Dehouck B. Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *J Comp Neurol*. 2010 Apr 1;518(7):943-62. doi: 10.1002/cne.22273.
35. Willis CL, Garwood CJ, Ray DE. A size selective vascular barrier in the rat area postrema formed by perivascular macrophages and the extracellular matrix. *Neuroscience*. 2007 Dec 5;150(2):498-509. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.09.023. Epub 2007 Sep 14.
36. Price CJ, Hoyda TD, Ferguson AV. The area postrema: a brain monitor and integrator of systemic autonomic state. *Neuroscientist*. 2008 Apr;14(2):182-94. doi: 10.1177/1073858407311100. Epub 2007 Dec 13.
37. Sarnat HB, Flores-Sarnat L, Boltshauser E. Area Postrema: Fetal Maturation, Tumors, Vomiting Center, Growth, Role in Neuromyelitis Optica. *Pediatr Neurol*. 2019 May;94:21-31. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2018.12.006. Epub 2018 Dec 25.
38. Whiting L, McCutcheon JE, Boyle CN, Roitman MF, Lutz TA. The area postrema (AP) and the parabrachial nucleus (PBN) are important sites for salmon calcitonin (sCT) to decrease evoked phasic dopamine release in the nucleus accumbens (NAc). *Physiol Behav*. 2017 Jul 1;176:9-16. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.023. Epub 2017 Mar 22.
39. Jovanović-Mićić D, Samardžić R, Beleslin DB. The role of alpha-adrenergic mechanisms within the area postrema in dopamine-induced emesis. *Eur J Pharmacol*. 1995 Jan 5;272(1):21-30. doi: 10.1016/0014-2999(94)00622-e.
40. Koller WC, Rueda MG. Mechanism of action of dopaminergic agents in Parkinson's disease. *Neurology*. 1998 Jun;50(6 Suppl 6):S11-4; discussion S44-8. doi: 10.1212/wnl.50.6_suppl_6.s11.
41. Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol*. 1998 Jul 13;142(1):117-27. doi: 10.1083/jcb.142.1.117.
42. Haseloff RF, Dithmer S, Winkler L, Wolburg H, Blasig IE. Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: structural and functional aspects. *Semin Cell Dev Biol*. 2015 Feb;38:16-25. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.11.004. Epub 2014 Nov 26.
43. Tietz S, Engelhardt B. Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *J Cell Biol*. 2015 May 25;209(4):493-506. doi: 10.1083/jcb.201412147.
44. Dejana E, Tournier-Lasserre E, Weinstein BM. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev Cell*. 2009 Feb;16(2):209-21. doi: 10.1016/j.devcel.2009.01.004.

45. Morita S, Furube E, Mannari T, Okuda H, Tatsumi K, Wanaka A, Miyata S. Heterogeneous vascular permeability and alternative diffusion barrier in sensory circumventricular organs of adult mouse brain. *Cell Tissue Res.* 2016 Feb;363(2):497-511. doi: 10.1007/s00441-015-2207-7. Epub 2015 Jun 6.
46. Piontek J, Fritzsche S, Cording J, Richter S, Hartwig J, Walter M, Yu D, Turner JR, Gehring C, Rahn HP, Wolburg H, Blasig IE. Elucidating the principles of the molecular organization of heteropolymeric tight junction strands. *Cell Mol Life Sci.* 2011 Dec;68(23):3903-18. doi: 10.1007/s00018-011-0680-z. Epub 2011 May 1.
47. Castro Dias M, Coisne C, Lazarevic I, Baden P, Hata M, Iwamoto N, Francisco DMF, Vanlandewijck M, He L, Baier FA, Stroka D, Bruggmann R, Lyck R, Enzmann G, Deutsch U, Betsholtz C, Furuse M, Tsukita S, Engelhardt B. Claudin-3-deficient C57BL/6J mice display intact brain barriers. *Sci Rep.* 2019 Jan 18;9(1):203. doi: 10.1038/s41598-018-36731-3. Erratum in: *Sci Rep.* 2019 Jul 18;9(1):10702.
48. Greene C, Hanley N, Campbell M. Claudin-5: gatekeeper of neurological function. *Fluids Barriers CNS.* 2019 Jan 29;16(1):3. doi: 10.1186/s12987-019-0123-z.
49. Ek CJ, Dziegielewska KM, Stolp H, Saunders NR. Functional effectiveness of the blood-brain barrier to small water-soluble molecules in developing and adult opossum (*Monodelphis domestica*). *J Comp Neurol.* 2006 May 1;496(1):13-26. doi: 10.1002/cne.20885.
50. Stork T, Engelen D, Krudewig A, Silies M, Bainton RJ, Klämbt C. Organization and function of the blood-brain barrier in *Drosophila*. *J Neurosci.* 2008;28(3):587-597. doi:10.1523/JNEUROSCI.4367-07.2008
51. Angelow S, Kim KJ, Yu AS. Claudin-8 modulates paracellular permeability to acidic and basic ions in MDCK II cells. *J Physiol.* 2006 Feb 15;571(Pt 1):15-26. doi: 10.1113/jphysiol.2005.099135. Epub 2005 Dec 1.
52. Krug SM, Schulzke JD, Fromm M. Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Semin Cell Dev Biol.* 2014 Dec;36:166-76. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.09.002. Epub 2014 Sep 16.
53. Günzel D, Stuiver M, Kausalya PJ, Haisch L, Krug SM, Rosenthal R, Meij IC, Hunziker W, Fromm M, Müller D. Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function. *J Cell Sci.* 2009 May 15;122(Pt 10):1507-17. doi: 10.1242/jcs.040113. Epub 2009 Apr 21.
54. Plain A, Pan W, O'Neill D, Ure M, Beggs MR, Farhan M, Dimke H, Cordat E, Alexander RT. Claudin-12 Knockout Mice Demonstrate Reduced Proximal Tubule Calcium Permeability. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 18;21(6):2074. doi: 10.3390/ijms21062074.

55. Castro Dias M, Coisne C, Baden P, Enzmann G, Garrett L, Becker L, Hölter SM; German Mouse Clinic Consortium, Hrabě de Angelis M, Deutsch U, Engelhardt B. Claudin-12 is not required for blood-brain barrier tight junction function. *Fluids Barriers CNS*. 2019 Sep 12;16(1):30. doi: 10.1186/s12987-019-0150-9.
56. FRAENKEL-CONRAT H, BRANDON BA, OLCOTT HS. The reaction of formaldehyde with proteins; participation of indole groups; gramicidin. *J Biol Chem*. 1947 Apr;168(1):99-118.
57. Whittington NC, Wray S. Suppression of Red Blood Cell Autofluorescence for Immunocytochemistry on Fixed Embryonic Mouse Tissue. *Curr Protoc Neurosci*. 2017 Oct 23;81:2.28.1-2.28.12. doi: 10.1002/cpns.35. PMID: 29058770;
58. Sun Y, Yu H, Zheng D, Cao Q, Wang Y, Harris D, Wang Y. Sudan black B reduces autofluorescence in murine renal tissue. *Arch Pathol Lab Med*. 2011 Oct;135(10):1335-42. doi: 10.5858/arpa.2010-0549-OA.
59. Sántha P, Veszélka S, Hoyk Z, Mészáros M, Walter FR, Tóth AE, Kiss L, Kincses A, Oláh Z, Seprényi G, Rákhely G, Dér A, Pákáski M, Kálmán J, Kittel Á, Deli MA. Restraint Stress-Induced Morphological Changes at the Blood-Brain Barrier in Adult Rats. *Front Mol Neurosci*. 2016 Jan 14;8:88. doi: 10.3389/fnmol.2015.00088.