

© Е. Г. Сухорукова, О. В. Кирик, Д. Э. Коржевский, 2018
УДК 611.14.018.74+576.311

Е. Г. Сухорукова, О. В. Кирик, Д. Э. Коржевский

ВЫЯВЛЕНИЕ ТЕЛЕЦ ВЕЙБЕЛЯ—ПАЛАДЕ ПРИ ПОМОЩИ ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ НА ФАКТОР ВИЛЛЕБРАНДА И КОНФОКАЛЬНОЙ ЛАЗЕРНОЙ МИКРОСКОПИИ

Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (зав. — проф. РАН Д. Э. Коржевский), отдел общей и частной морфологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

Цель — исследовать возможность применения иммуноцитохимической реакции на фактор Виллебранда для анализа особенностей локализации телец Вейбеля—Паладе в эндотелии вен с использованием конфокальной лазерной микроскопии.

Материал и методы. Работа выполнена на парафиновых срезах большой подкожной вены человека (n=5).

Результаты. В результате сравнительного изучения препаратов, изготовленных для световой и конфокальной лазерной микроскопии, установлено, что благодаря возможности достигать высокого разрешения конфокальная лазерная микроскопия позволяет более детально выявлять локализацию продукта реакции, а также проводить количественный анализ.

Выводы. Представленный набор реагентов для иммунофлюоресцентной реакции обеспечивает получение высококачественных препаратов, на которых четко идентифицируются отдельные тельца Вейбеля—Паладе. Использование предложенного набора флуорохромов при конфокальной лазерной микроскопии дает возможность легко разделять каналы и при необходимости изучать структуры независимо друг от друга.

Ключевые слова: эндотелий, тельца Вейбеля—Паладе, фактор Виллебранда, иммуноцитохимия, конфокальная лазерная микроскопия

Тельца Вейбеля—Паладе — это особые цитоплазматические включения в эндотелиоцитах кровеносных сосудов [13]. Они хранят большое число биологически активных веществ, оказывающих существенное влияние на процессы новообразования сосудов [2, 10]. Одним из таких веществ является высокомолекулярный гликопротеин, участвующий в сосудистотромбоцитарном (первичном) и коагуляционном (вторичном) гемостазе — фактор Виллебранда (ФВ) [9]. При стимуляции эндотелия (гипоксия, механическая травма, циркулирующие иммунные комплексы и др.) происходит повышение синтеза ФВ и его высвобождение из телец Вейбеля—Паладе, что позволяет считать этот белок одним из важнейших маркеров функционального состояния (активации/повреждения) эндотелия [8, 12]. В настоящее время исследование структурной организации телец Вейбеля—Паладе осуществляется в основном посредством электронной микроскопии [1, 5, 6]. Однако этот метод требует трудоемких способов обработки материала и не позволяет оценить качественные и количественные характеристики распределения субклеточных структур в пределах клетки в целом.

Кроме того, зачастую остается непонятным действительно ли выявленные находки отражают функциональное состояние изучаемых объектов или регистрировались артефактные изменения их структуры, связанные с особенностями фиксации материала, проводки и его последующего контрастирования. Это обстоятельство требует использования при изучении телец Вейбеля—Паладе в сосудах разного типа современных высокоинформативных и адекватных методов, которые позволяли бы проводить сравнительные исследования на млекопитающих разных видов в норме и при патологии.

Цель настоящего исследования состояла в выяснении возможности использования иммуноцитохимической реакции на ФВ для анализа особенностей локализации телец Вейбеля—Паладе в эндотелии вен с использованием конфокальной лазерной микроскопии.

В работе исследованы фрагменты большой подкожной вены человека (n=5) из архива отдела общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины. Программа исследований имеет положительное заключение локального этического комитета ФГБНУ «Института экспе-

Сведения об авторах:

Сухорукова Елена Геннадьевна (e-mail: len48@inbox.ru), Кирик Ольга Викторовна (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), Коржевский Дмитрий Эдуардович (e-mail: dek2@yandex.ru), лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдел общей и частной морфологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197376, Санкт-Петербург ул. Акад. Павлова, 12

риментальной медицины» № 2/16 от 12.05.2016 г. Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде, который обеспечивает лучшее сохранение антигенов, чем другие методы фиксации [4]. Обезжизнили материал и заливали его в парафин по общепринятой методике. Изготавливали срезы толщиной 5 и 15 мкм и наклеивали на адгезивные предметные стекла Polysine (Menzel-Gläser, Германия).

Прежде чем приступить к работе на конфокальном микроскопе, срезы сосудов были изучены с использованием иммунопероксидазной реакции и микроскопии в проходящем свете. Для этого была проведена иммуноцитохимическая реакция на ФВ с использованием первичных поликлональных кроличьих антител (Dako, Дания) и вторичных антител, конъюгированных с полимером и пероксидазой (EnVision+ System Labelled Polymer-HRP Anti-Rabbit, Dako, Дания). Перед инкубацией срезов с первичными антителами была проведена инкубация предметных стекол с депарафинированными срезами в предварительно подогретом в термостате 60 °С модифицированном цитратном буфере pH 6,1 S1700 (Dako, Дания) в пароварке в течение 20 мин. Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали в 3% растворе перекиси водорода, а для блокирования неспецифических сайтов связывания антигена — в специальном блокировочном растворе «Protein Block» (Spring Bioscience, США). Пероксидазную метку выявляли, используя рабочий раствор 3,3'-диаминобензидина, приготовленный из набора DAB+ (Dako, Дания). Микроскопию в проходящем свете и фотосъемку выполняли, используя микроскоп Leica DM750 и цифровую фотокамеру ICC50 (Leica, Германия). Для анализа

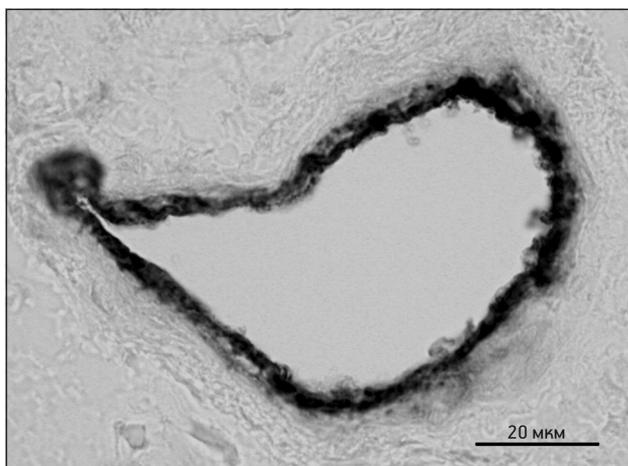


Рис. 1. Поперечный срез вены малого диаметра из адвентиции большой подкожной вены человека.

Имуноцитохимическая пероксидазная реакция на фактор Виллебранда без докраски

полученных изображений использовали программу LAS EZ (Leica, Германия).

При подготовке препаратов для конфокальной микроскопии срезы обрабатывали первичными антителами к ФВ, предварительно проводя тепловое демаскирование согласно описанному выше варианту. После этого проводили обработку срезов вторичными биотинилированными антителами из набора LSAB2 System-HRP (Dako, Дания) и стрептавидином, конъюгированным с флюоресцентным красителем карбоцианином (Cy2; Jackson ImmunoResearch, США). Затем ядра клеток докрашивали флюоресцентным ядерным красителем 7-аминоактиномицином D (7-AAD). По окончании окраски препараты заключали в водорастворимую среду Fluorescence Mounting Medium (Dako, Дания). Препараты исследовали при помощи конфокального лазерного микроскопа LSM-710 (Zeiss, Германия), оснащенного арговым (488 нм) и твердотельным (561 нм) лазерами для возбуждения флюоресценции Cy2 и 7-AAD соответственно. Трехмерную реконструкцию выявляемых структур проводили с использованием компьютерной программы Zen-2011 (Zeiss, Германия). Морфометрию производили с помощью компьютерной программы LSM Image Browser (Zeiss, Германия).

На световом уровне положительная реакция на ФВ отмечается в эндотелиоцитах как эндотелия самой вены, так и небольших кровеносных сосудов (*vasa vasorum*), расположенных в стенке вены, а также в единичных пристеночных тромбах. В субэндотелиальном слое наблюдается градиентное распределение ФВ. В отдельных клетках мелких сосудов наблюдается структуризация ФВ в виде небольших гранул. В субэндотелиальном слое этих сосудов продукт реакции отсутствует. В эндотелии крупных сосудов плотность расположения продукта реакции не позволяет определить его структуру, тогда как в субэндотелиальном слое отчетливо просматривается неравномерное постепенное понижение интенсивности реакции на ФВ (рис. 1).

В результате проведения конфокальной лазерной микроскопии при использовании иммерсионного объектива (ув. 100) в эндотелии, субэндотелиальном слое, а также в пристеночных тромбах был обнаружен продукт иммунофлюоресцентной реакции. В эндотелии он имел вид многочисленных, отграниченных друг от друга флюоресцирующих гранул различной формы (в зависимости от плоскости среза сосуда), которые имеют разные размеры от 0,1×0,2 до 1,3×3,7 мкм (рис. 2, а). На одиночных оптических срезах и небольших Z-сериях плоскостных срезов, полу-

ченных при высоком разрешении конфокального микроскопа, видно, что эти гранулы, собираясь в крупные конгломераты, расположены хаотично преимущественно в периферических зонах эндотелиоцитов. Меньшая их часть образуют один неплотно прилегающий к ядрам эндотелиоцитов циркулярный слой; при этом тельца здесь имеют палочковидную форму и продольную ориентацию относительно длинника ядра (т.е. параллельно кровотоку) (см. рис. 2, б). Тромботические массы представляют собой бесструктурный, однородный, равномерно окрашенный конгломерат.

В настоящее время известно, что в сосудах ФВ локализуется как внутри эндотелиоцитов, так и в субэндотелиальном слое. При этом, если внутриклеточное (в составе телец Вейбеля—Паладе) содержание ФВ обуславливает непосредственное участие этого белка в обеспечении гемостаза, то функциональная роль субэндотелиальной локализации ФВ кажется непонятной. Оказывается, присутствие ФВ в субэндотелиальном слое внутренней оболочки неповрежденного кровеносного сосуда обеспечивает выполнение важной функции — прикрепления эндотелиоцитов к базальной мембране благодаря его способности связываться с коллагеном IV типа [12]. При повреждении эндотелия этот комплекс играет одну из ключевых ролей в обеспечении адгезии пристеночного тромба [14].

Существуют несколько морфологических способов выявления ФВ в клетках эндотелия *in situ*. Один из них представляет собой трудоемкий способ выявления телец Вейбеля—Паладе при помощи электронной микроскопии. Этот метод позволяет точно визуализировать организованные в трубчатые структуры мультимеры ФВ, содержащиеся в тельцах Вейбеля—Паладе, но не дает возможности оценить общее распределение ФВ вне этих органелл как внутри клетки, так и в субэндотелиальном слое. Кроме того, при электронной микроскопии не всегда удается определить тельца Вейбеля—Паладе [3], возможно это связано с особенностями восприятия этими ультраструктурами контрастирующих веществ.

Иммуноцитохимический метод определения ФВ имеет ряд преимуществ, поскольку в настоящее время в распоряжении исследователей имеется большой набор высокоспецифичных моноклональных и поликлональных антител к ФВ, которые выпускаются рядом фирм-производителей иммуноцитохимических реагентов (AbCam, Spring Bioscience, Dako и др.). Многие из них универсальны, имеют широкую иммунореактивность и позволяют выявлять ФВ как у человека, так

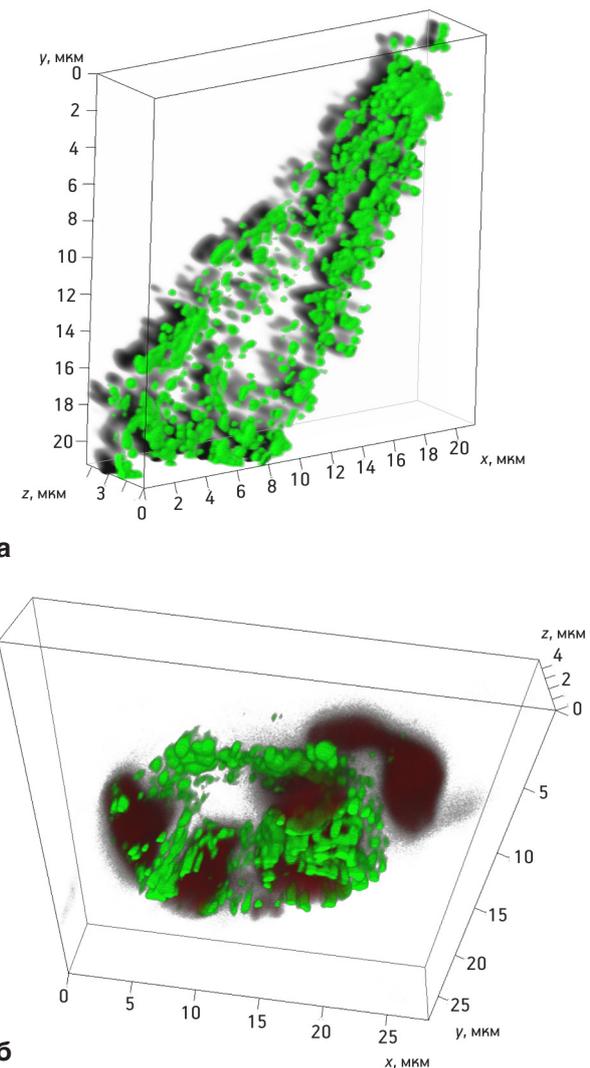


Рис. 2. Пространственная организация и распределение телец Вейбеля—Паладе в цитоплазме отдельных эндотелиоцитов вены малого диаметра (*vasa vasorum*) в стенке большой подкожной вены человека.

Иммуноцитохимическая реакция на фактор Виллебранда, визуализация с помощью флуорохрома Cy2 (зеленый цвет). Ядра окрашены флуоресцентным красителем 7-аминоактиномицином D (красный цвет). Конфокальная лазерная микроскопия. а — величина Z-серии — 3,6 мкм, количество оптических срезов — 25; б — величина Z-серии — 4,95 мкм, количество оптических срезов — 34. Трехмерная реконструкция осуществлена в 3D-модуле программы ZEN 2011 (Zeiss, Германия) в режиме «Mixed».

Величина деления линейки равна: а — по оси *x* и *y* — 2 мкм; по оси *z* — 1,5 мкм; б — по оси *x* и *y* — 5 мкм; по оси *z* — 1 мкм

и у лабораторных животных, даже после довольно жесткой фиксации 4% параформальдегидом. Высокое сродство к антигену позволяет избегать процедуры теплового демаскирования, которая, впрочем, способна улучшить качество реакции. В целом, методы иммуноцитохимии менее тру-

доекми, хорошо воспроизводимы, высокоселективны и позволяют наблюдать продукт реакции на значительной площади среза. Однако недостаточно высокое разрешение светового микроскопа не дает возможности детально изучать распределение и локализацию ФВ в отдельных клетках.

Конфокальная лазерная микроскопия (благодаря увеличению разрешающей способности в 1,4 раза по сравнению с обычной световой микроскопией) в известном смысле сочетает в себе преимущества описанных выше двух методов. В представленном варианте обработки при постановке иммунофлюоресцентной реакции можно эффективно использовать более толстые срезы (свыше 10 мкм). Для выявления детальной локализации флюоресцирующей метки можно изучать отдельные оптические срезы в сочетании с построением пространственных реконструкций. Достаточно высокое разрешение конфокального лазерного микроскопа позволяет оценить содержание телец Вейбеля—Паладе в отдельных микрососудах, а двойная реакция на ФВ и белок клеточных контактов β -катенин [7] — определить их локализацию в отдельных клетках. Также при помощи конфокальной лазерной микроскопии можно проводить и количественный анализ содержания телец Вейбеля—Паладе [11].

Таким образом, использование конфокальной лазерной микроскопии для выявления таких малых объектов, какими являются тельца Вейбеля—Паладе, имеет ряд преимуществ, обусловленных возможностью достигать более высокого разрешения, чем обычная световая микроскопия, для оценки детальной локализации продукта реакции и получать препараты, пригодные для проведения сравнительного количественного анализа.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ФГБНУ «Института экспериментальной медицины» на поисковые научные исследования.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: Д. Э. К.

Сбор и обработка материала: О. В. К.

Анализ и интерпретация данных: О. В. К., Е. Г. С.

Написание текста: Д. Э. К., Е. Г. С.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гурин Я. В. Морфологический анализ новообразованных сосудов и клеточного микроокружения // Бюл. экспер. биол. 2009. Т. 147, № 11. С. 593–596 [Gurin Y. V. Morphological analysis of newly formed vessels and cellular microenvironment // Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny. 2009. Vol. 147, № 11. P. 593–596. In Russ.].
2. Гурина О. Ю., Куприянов В. В., Миронов А. А., Миронов В. А. Механизмы неоваскулогенеза и его регуляции во взрослом организме // Арх. анат. 1985. Т. 88, № 1. С. 9–24 [Gurina O. Iu., Kupriyanov V. V., Mironov A. A., Mironov V. A. Mechanisms of neovasculogenesis and its regulation in the adult organism // Arkhiv anatomii, gistologii i embriologii. 1985. Vol. 88, № 1. P. 9–24. In Russ.].
3. Коржевский Д. Э., Отеллин В. А., Неокесарийский А. А., Старорусская А. Н., Павлова Н. Г. Организация и цитохимические особенности барьерных структур плаценты человека // Морфология. 2006. Т. 129, вып. 3. С. 63–64 [Korzhevskiy D. E., Otellin V. A., Neokessariyskiy A. A., Star-russkaya A. N., Pavlova N. G. Organisation and cytochemical features of barrier structures in human placenta // Morfologiya. 2006. Vol. 129, № 3. P. 63–64. In Russ.].
4. Коржевский Д. Э., Сухорукова Е. Г., Гилерович Е. Г., Петрова Е. С., Кирик О. В., Григорьев И. П. Преимущества и недостатки цинк-этанол-формальдегида как фиксатора для иммуноцитохимических исследований и конфокальной лазерной микроскопии // Морфология. 2013. Т. 143, вып. 2. С. 81–85 [Korzhevskiy D. E., Sukhorukova Ye. G., Gilerovich Ye. G., Petrova Ye. S., Kirik O. V., Grigoriev I. P. Advantages and disadvantages of zinc-ethanol-formaldehyde as a fixative for immunocytochemical studies and confocal laser microscopy // Morfologiya. 2013. Vol. 143, № 2. P. 81–85. In Russ.]. Переводная версия: Korzhhevskii D. E., Sukhorukova E. G., Gilerovich E. G., Petrova E. S., Kirik O. V., Grigor'ev I. P. Advantages and disadvantages of zinc-ethanol-formaldehyde as a fixative for immunocytochemical studies and confocal laser microscopy // Neurosci Behav Physiol 2014. Vol. 44, № 5. P. 542–545. doi: 10.1007/s11055-014-9948-8.
5. Павлович Е. Р., Гурин Я. В., Гурина О. Ю. Ультраструктура телец Вейбеля—Паладе в эндотелиоцитах сосудистого русла млекопитающих разных видов // Успехи современного естествознания. 2010. № 9. С. 123–125 [Pavlovich E. R., Gurin Y. V., Gurina O. Iu. Ultrastructure of the Weibel-Palade bodies in vascular endotheliocytes of the various species of mammals // Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya. 2010. № 9. P. 123–125. In Russ.].
6. Jazayeri M., Allameh A., Soleimani M. et al. Molecular and ultrastructural characterization of endothelial cells differentiated from human bone marrow mesenchymal stem cells // Cell Biol. Int. 2008. Vol. 32, № 10. P. 1183–1192. doi: 10.1016/j.cellbi.2008.07.020.
7. Lopes da Silva M., Cutler D. F. von Willebrand factor multimerization and the polarity of secretory pathways in endothelial cells // Blood. 2016. Vol. 128, № 2. P. 277–285. doi: 10.1182/blood-2015-10-677054.
8. Nightingale T., Cutler D. The secretion of von Willebrand factor from endothelial cells; an increasingly complicated story // J. Thromb. Haemost. 2013. Vol. 11, Suppl. 1. P. 192–201. doi: 10.1111/jth.12225.
9. Peyvandi F., Garagiola I., Baronciani L. Role of von Willebrand factor in the haemostasis // Blood Transfus. 2011. Vol. 9, Suppl. 2. P. 3–8. doi: 10.2450/2011.002S.
10. Starke R. D., Ferraro F., Paschalaki K. E. et al. Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis // Blood. 2011. Vol. 117, № 3. P. 1071–1080. doi: 10.1182/blood-2010-01-264507.
11. Trotman W. E., Taatjes D. J., Bovill E. G. Multifluorescence confocal microscopy: application for a quantitative analysis of hemo-

- static proteins in human venous valves // *Methods Mol. Biol.* 2013. Vol. 931. P. 85–95. doi: 10.1007/978-1-62703-056-4_4.
12. Wagner D.D., Bonfanti R. von Willebrand factor and the endothelium // *Mayo Clin. Proc.* 1991. Vol. 66, № 6. P. 621–627.
13. Weibel E., Palade G. New cytoplasmic components in arterial endothelia // *J. Cell Biol.* 1964. Vol. 23. P. 101–112.
14. Wu X.X., Gordon R.E., Glanville R.W. et al. Morphological relationships of von Willebrand factor, type VI collagen, and fibrillin in human vascular subendothelium // *Am. J. Pathol.* 1996. Vol. 149, № 1. P. 283–291.

Поступила в редакцию 10.11.2016
Получена после доработки 09.06.2017

DEMONSTRATION OF WEIBEL—PALADE BODIES USING VON WILLEBRAND FACTOR IMMUNOCYTOCHEMISTRY AND CONFOCAL LASER MICROSCOPY

Ye. G. Sukhorukova, O. V. Kirik, D. E. Korzhevskiy

Objective — to explore the possibility of application of immunocytochemical reaction to von Willebrand factor to analyze the

localization of Weibel-Palade bodies in the venous endothelium using confocal laser microscopy.

Material and methods. The study was performed on paraffin sections of human great saphenous vein (n=5).

Results. A comparative study of preparations for light and confocal laser microscopy suggests that the confocal laser microscopy due to the possibility to achieve high resolution allows identification of the localization of the product in more detail, as well as to carry out a quantitative analysis.

Conclusions. The presented set of reagents for immunofluorescent reaction provides high quality preparations, in which individual Weibel-Palade bodies are readily identifiable Application of the proposed set of fluorochromes for confocal laser microscopy allows easy separation of channels and the study of structures independently of each other.

Key words: *endothelium, Weibel-Palade bodies, von Willebrand factor, immunocytochemistry, confocal laser microscopy*

Laboratory of Functional Morphology of Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAS Institute of Experimental Medicine, 12, Akademika Pavlova St., St. Petersburg 197376