

# МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

© О. В. Кирик, А. В. Назаренкова, Д. А. Суфиева, 2014  
УДК 611.81.018:599.323.4

*О. В. Кирик, А. В. Назаренкова и Д. А. Суфиева*

## ТРЕХМЕРНАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ЭПЕНДИМЫ И ТАНИЦИТОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА

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, Санкт-Петербург

Целью настоящего исследования являлась разработка комплексного подхода, позволяющего с помощью конфокальной лазерной микроскопии и иммуноцитохимической реакции на виментин производить пространственную реконструкцию клеток, выстилающих желудочки головного мозга. Работа была выполнена на парафиновых срезах головного мозга крысы, имеющих разную толщину (5 и 10 мкм). Для визуализации иммуноцитохимической реакции были выбраны флуоресцентные красители видимого диапазона — селективно окрашивающий ядра SYTOX Green и конъюгированный со стрептавидином индокарбацианин (Cy-3). В результате тестирования различных режимов обработки предложен протокол, который позволяет получить интенсивную окраску структур. Использование данного набора флюорохромов при конфокальной лазерной микроскопии дает возможность легко разделять каналы и при необходимости изучать структуры независимо друг от друга и не требует использования дорогостоящего ультрафиолетового лазера.

**Ключевые слова:** *головной мозг, эпендима, танициты, виментин, конфокальная лазерная микроскопия*

Эпендима, выстилающая желудочки головного мозга, участвует в формировании ликворозно-цефалического барьера и препятствует проникновению веществ из цереброспинальной жидкости непосредственно в нервную ткань. До настоящего времени у нейробиологов нет единого мнения о структурной и функциональной однородности эпендимы. Так, по мнению ряда авторов [6, 7], в состав эпендимы, помимо обычных (реснитчатых) эпендимоцитов, входят танициты (специализированные клетки), которые обнаруживают в выстилке не только III, но и боковых желудочков. В отличие от типичных эпителиальных тканей, эпендима не имеет базальной мембраны и напрямую контактирует с подлежащей нервной тканью. Вследствие этого изучение базальной поверхности эпендимы может пролить свет на взаимодействия эпендимоцитов с субэпендимными клетками. Одним из наиболее информативных способов изучения структуры клеток, имеющих сложную форму (наличие отростков, ресничек), является их пространственная реконструкция с применением конфокальной микроскопии [2]. Однако использование этого методического подхода ограничено необходимостью поиска адекватных иммуноцитохимических маркеров, позволяющих селективно выявлять те или иные клеточные популяции. Для эпендимоцитов и таницитов таким маркером мог

бы послужить белок промежуточных филаментов III типа — виментин [1, 3, 5]. Известно, что этот белок присутствует в эпендимоцитах в достаточно высокой концентрации [1].

Целью настоящего исследования являлась разработка комплексного подхода, позволяющего с помощью конфокальной лазерной микроскопии и иммуноцитохимической реакции на виментин производить пространственную реконструкцию клеток, выстилающих желудочки головного мозга.

Для изучения эпендимоцитов и таницитов были использованы срезы головного мозга крысят (на 5-е и 14-е сутки постнатального развития) и взрослых животных (крысы-самцы линии Вистар). 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). Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде, который обеспечивает лучшее сохранение антигенов по сравнению с другими методами фиксации [4], далее его обезживали и заливали в парафин обычным способом. Изготавливали срезы толщиной 5 и 10 мкм и наклеивали на предметные стекла Polysine slides (Menzel-Glaser, Германия). Для иммуноцитохимического выявления виментина использовали

### Сведения об авторах:

*Кирик Ольга Викторовна, Назаренкова Анна Владимировна, Суфиева Дина Азатовна (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*

мышинные моноклональные антитела (клон V9, Dako, Дания) в разведении 1:100.

Прежде чем приступить к работе с использованием конфокального микроскопа, структуры эпендимы и таницитов были изучены после иммунопероксидазной реакции при микроскопии в проходящем свете. Для этого была проведена иммуноцитохимическая реакция на виментин с использованием моноклональных антител V9 (Dako, Дания), вторичных антител, конъюгированных с полимером и пероксидазой (EnVision+, Dako, Дания). Визуализацию связавшихся первичных антител осуществили с помощью хромогена DAB+ (Dako, Дания) [3]. На этом этапе проводили подбор режима теплового демаскирования. В результате был установлен наилучший вариант процедуры, пригодный для достижения цели данной работы. Он заключался в том, что перед инкубацией срезов с первичными антителами была проведена инкубация предметных стекол с депарафинированными срезами в предварительно нагретом до 60 °С модифицированном цитратном буфере pH 6,1 S1700 (Dako, Дания) в пароварке в течение 20 мин. На световом уровне как у молодых, так и у половозрелых животных отчетливая реакция на виментин наблюдалась в эпендиме боковых и III желудочков. В таницитах, клетках с длинными базальными отростками, было заметно неравномерное распределение виментина, реакция менее интенсивная, чем в эпендимоцитах. Ход длинных отростков из-за их переплетения прослеживался с трудом (*рисунок, а, б*).

При подготовке препаратов для конфокальной микроскопии была проведена иммуногистохимическая реакция на виментин. Срезы обрабатывали первичными антителами после предварительного теплового демаскирования согласно отработанному протоколу. После этого проводили обработку срезов вторичными биотинилированными антителами из набора LSAB2 System-HRP (Dako, Дания) и стрептавидином, конъюгированным с флюоресцентным красителем индокарбоцианином (Cy3). Параллельно с этим проводили докраску флюоресцентным ядерным красителем SYTOX Green. По окончании окраски препараты заключали в водорастворимую среду Fluorescence Mounting Medium (Dako, Дания). В процессе отработки оптимального протокола были проведены исследования по подбору времени и температуры инкубации, а также разведения антител и красителя SYTOX Green. На основании анализа полученных препаратов, обработанных по разным протоколам, был выбран оптимальный вариант, позволяющий получить яркую окраску эпендимоцитов

при интенсивной докраске ядер, пригодной для проведения трехмерной реконструкции.

Рекомендуется использовать следующий протокол окраски.

1. Удалить парафин и дегидратировать срезы обычным способом.

2. Промыть срезы в дистиллированной воде (5 мин) и провести теплое демаскирование в буфере S1700 (предварительно прогретом до 60 °С) в пароварке в течение 20 мин.

3. Остывшие предметные стекла со срезами промыть дистиллированной водой и поместить в 3% перекись водорода на 10 мин для блокирования эндогенной пероксидазы.

4. Смыть со срезов дистиллированной водой перекись, поместить их в 0,01 М фосфатно-солевой буфер (PBS) с pH 7,4 на 5–7 мин.

5. Аккуратно промокнув фильтровальной бумагой стекло вокруг срезов, обвести срезы гидрофобным фломастером (Dako Pen или аналогичным) и нанести необходимое для покрытия срезов количество блокирующего раствора Protein block (Spring Bioscience, США) на срезы и оставить при комнатной температуре на 10 мин.

6. Слить излишек блокирующего раствора, не промывая препараты, нанести необходимое количество моноклональных мышинных антител к виментину (клон V9, Dako, Дания) в разведении 1:100 и поместить стекла во влажную камеру в термостат при 40 °С до следующего дня (18–20 ч).

7. Смыть антитела 0,01М PBS с pH 7,4 и затем поместить в свежую порцию того же буфера на 5–7 мин.

8. Нанести вторичные биотинилированные антитела (из набора LSAB2 System-HRP, Dako, Дания или из аналогичного). Инкубировать в течение 180 мин в термостате при 27 °С во влажной камере.

9. Смыть антитела 0,01 М PBS с pH 7,4 и затем поместить в свежую порцию того же буфера на 5–7 мин.

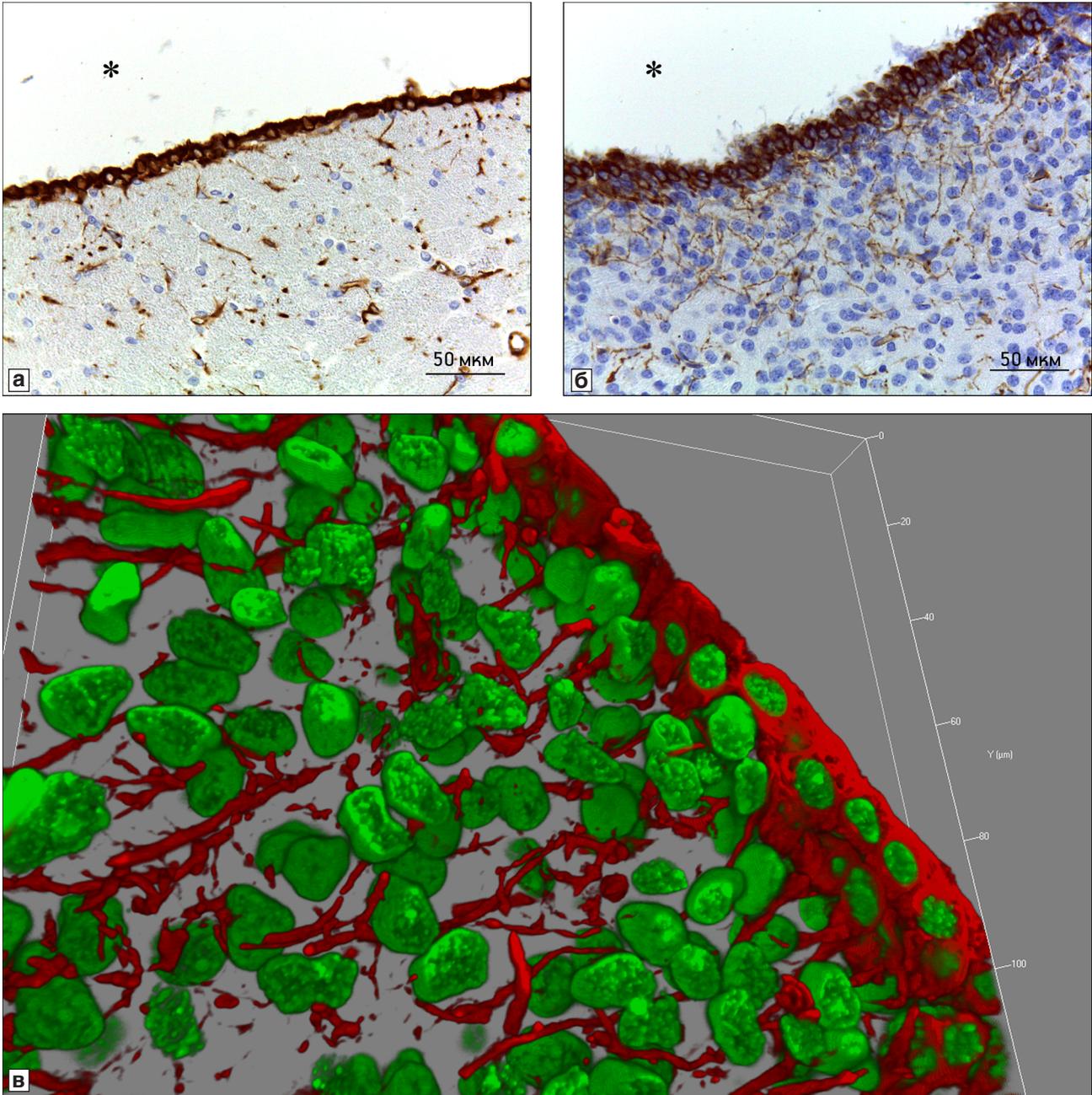
10. Нанести раствор флюоресцентного красителя SYTOX Green (водный раствор 0,4 мкмоль). Инкубировать в течение 30 мин в термостате при 27 °С во влажной камере.

11. Смыть краситель 0,01М PBS с pH 7,4 и затем поместить в свежую порцию того же буфера на 5–7 мин.

12. Нанести на срезы необходимое количество конъюгата стрептавидина и флюорохрому Cy3 и поместить в термостат на 30 мин при 27 °С.

13. Промыть в двух сменах дистиллированной воды по 10 мин.

14. Заключить в водорастворимую среду Fluorescence Mounting Medium (Dako, Дания).



Стенка бокового желудочка головного мозга крысы.

а — взрослое животное; б — 14-е сутки постнатального развития; в — 5-е сутки постнатального развития. Звездочка — полость желудочка. Иммуноцитохимическая реакция на виментин с докраской гематоксилином Джилла (а, б), ядерным красителем SYTOX Green (в). а, б — микроскопия в проходящем свете; в — конфокальная лазерная микроскопия, трехмерная реконструкция

Исследование полученных препаратов проводили при помощи конфокального лазерного микроскопа LSM 710 (Zeiss, Германия), укомплектованного аргоновым лазером (488 нм) и твердотельным лазером (561 нм). Обработку полученных изображений и трехмерную реконструкцию объектов можно проводить с помощью компьютерных программ Zen-2010, Zen-2012 и LSM Image Browser (Zeiss, Германия).

Были подобраны оптимальные параметры работы микроскопа для каждого из препаратов отдельно. Установлено, что оптимальным объективом для работы является объектив C-Apochromat 63×/1.20 W Corr M27 (водная иммерсия). Для возбуждения флюоресценции Cy3 и SYTOX Green следует использовать лазеры с длиной волны 561 и 488 нм соответственно. При проведении трехмерной реконструкции в программе Zen-2010, Zen 2012 используется режим 3D Mixed.

На полученных изображениях (см. рисунок, в) отчетливо видны клетки, расположенные в один ряд и имеющие кубическую форму. Они располагаются на границе с полостью желудочка. Некоторые из них имеют длинные отростки, проходящие субвентрикулярную зону и идущие далее в нервную ткань. Эти отростки ветвятся и переплетаются, проходя между клетками других типов. Однако есть отростки, подходящие к этим клеткам со стороны подлежащих структур.

Результаты микроскопии в проходящем свете дают предположительное представление о взаимном расположении эпендимцитов и других типов клеток головного мозга, в то время как трехмерная картина, полученная с помощью конфокального лазерного микроскопа, позволяет рассматривать пространственное расположение этих клеток друг относительно друга и изучать взаиморасположение их отростков. Оба метода выявляют и эпендимциты, и танициты, которые являются виментин-иммунопозитивными клетками.

Таким образом, данный протокол окраски с использованием методов конфокальной микроскопии позволяет проводить трехмерную реконструкцию клеток, образующих выстилку желудочков головного мозга, и может быть рекомендован для проведения исследований пролиферативных зон головного мозга и определения пространственных взаимоотношений клеток, расположенных на границе с цереброспинальной жидкостью.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кирик О.В. и Коржевский Д.Э. Виментин в клетках эпендимы и субвентрикулярной пролиферативной зоны конечного мозга крысы. Клеточные технологии в биологии и медицине, 2012, вып. 4, с. 210–214.
2. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Сухорукова Е.Г. и др. Изучение пространственной организации астроцитов головного мозга при помощи конфокальной лазерной микроскопии. Морфология, 2009, т. 135, вып. 3, с. 76–79.

3. Коржевский Д.Э., Ленцман М.В., Кирик О.В. и Отеллин В.А. Виментин-иммунопозитивные клетки конечного мозга крысы после экспериментального ишемического инсульта. Морфология, 2007, т. 132, вып. 5, с. 23–27.
4. Коржевский Д.Э., Сухорукова Е.Г., Гилерович Е.Г. и др. Преимущества и недостатки цинк-этанол-формальдегида как фиксатора для иммуноцитохимических исследований и конфокальной лазерной микроскопии. Морфология, 2013, т. 143, вып. 2, с. 81–85.
5. Петрова Е.С. Виментин и глиальный фибриллярный кислый белок в клетках эктопических нейротрансплантатов неокортекса крыс. Морфология, 2011, т. 139, вып. 2, с. 22–26.
6. Bruni J.E. Ependymal development, proliferation and functions. A review. *Microsc. Res. Tech.*, 1998, v. 41, p. 2–13.
7. Navarro A., Tolivia J. and Alvarez-Uria M. Ultrastructural study of a special type of ependymal cell at paraventricular level of the golden hamster third ventricle. *Histol. Histopathol.*, 1995, v. 10, p. 861–868.

Поступила в редакцию 07.10.2013

### THREE-DIMENSIONAL VISUALIZATION OF THE BRAIN EPENDYMA AND TANCYTES

*O. V. Kirik, A. V. Nazarenkova and D. A. Sufiyeva*

The aim of this investigation was to develop an integrated approach to spatial reconstruction of the cells lining the ventricles of the brain using confocal laser microscopy and immunocytochemical reaction to vimentin. The work was performed on paraffin sections of rat brain of different thickness (5 and 10  $\mu\text{m}$ ). To visualize the immunocytochemical reaction the fluorescent dyes in the visible range were selected: SYTOX Green selectively staining the nucleus and indocarbocyanin (Cy-3) conjugated with streptavidin. As a result of testing of various processing conditions, the protocol which allows to receive an intensive staining of the structures was developed. The set of fluorochromes proposed in confocal laser microscopy allows to separate easily the channels, to study the structures independently, if needed, and does not require the use of an expensive ultraviolet laser.

**Key words:** *brain, ependyma, tancytes, vimentin, confocal laser microscopy*

Laboratory of the Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAMS North-Western Branch Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg