

О.В. Кирик, Г.В. Безнин и Д.Э. Коржевский

МАРКЕРЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Отдел общей и частной морфологии (руков. — академик РАН В.А. Нагорнев) Института экспериментальной медицины СЗО РАН, Санкт-Петербург, e-mail: olga_kirik@mail.ru

В обзоре рассматриваются современные подходы к изучению пролиферативной активности клеток. В последние годы были открыты ряд белков, участвующих в регуляции клеточного цикла, которые могут служить селективными маркерами пролиферирующих клеток. В работе дана характеристика методов иммуоцитохимического выявления бромдезоксидуридина, белков PCNA, Ki-67, FEN-1, фосфорилированного гистона H3 и циклинов; представлены сведения о роли этих белков в регуляции клеточного цикла.

Ключевые слова: пролиферация, клеточный цикл, иммуоцитохимия, бромдезоксидуридин, ядерные белки.

Изучение пролиферации клеток различных тканей составляет одну из фундаментальных задач гистологии и эмбриологии. В течение длительного времени в арсенале исследователей имелся ограниченный набор методов, позволяющих выявлять клетки, которые готовятся к делению, и оценивать пролиферативную активность ткани. Так, еще 30–40 лет назад в гистологических исследованиях для выявления популяции пролиферирующих клеток использовали только три методических подхода: определение митотического индекса, метод цитофотометрии препаратов, окрашенных по Фельгену, и метод автордиографии с ^3H -тимидином.

В последние десятилетия в связи со значительными успехами молекулярной биологии и иммунологии у морфологов появилась возможность иммуоцитохимически маркировать клетки, проходящие различные фазы клеточного цикла. Новые методы основаны на возможности иммуоцитохимического выявления антигенов — белков и модифицированных нуклеозидов, которые участвуют в подготовке клетки к делению. Обилие маркеров пролиферации, отсутствие устоявшихся представлений об их функциональной роли и противоречия в результатах, получаемых при использовании различных антител, создают определенные трудности для гистологов в выборе их оптимального набора при решении конкретной задачи исследования. Поэтому цель настоящего обзора состояла в характеристике наиболее часто применяемых маркеров пролиферации, антитела к которым производятся ведущими компаниями, специализирующимися на разработке диагностических и исследовательских иммуоцитохимических реагентов, а также в оценке их преимуществ и недостатков.

Прежде чем дать характеристику методам иммуоцитохимического выявления пролиферирующих клеток, следует кратко остановиться на особенностях метода гисторадиоавтографии с использованием ^3H -тимидина, который до настоящего времени сохраняет значение «золотого стандарта» при выявлении клеток, осуществляющих синтез ДНК.

Тимидин — единственный из четырех нуклеозидов, участвующих в образовании полинуклеотидной структуры ДНК, который отсутствует в РНК. Меченная ^3H -тимидином вновь синтезированная молекула ДНК стабильна, и «разбавление» такой метки происходит лишь в ходе последовательных клеточных делений [1].

К числу достоинств радиоавтографии с ^3H -тимидином относятся быстрота включения тимидина в клетки, синтезирующие ДНК, и относительно недолгое пребывание меченого нуклеозида в несвязанном состоянии в организме. В экспериментальных исследованиях на млекопитающих было показано, что уже через несколько минут после внутрибрюшинного или внутривенного введения ^3H -тимидин исчезает из плазмы крови и включается в ДНК [55]. Позднее было установлено, что уже через 40 мин после введения ^3H -тимидина наблюдается его максимальное включение в ДНК [39].

Недостатками метода радиоавтографии являются ограничение на его использование в клинических исследованиях, необходимость строгого соблюдения норм радиационной безопасности при работе с источниками ионизирующих излучений, а также длительная экспозиция фотоэмульсии (несколько недель), что ведет к существенному замедлению исследования.

Бромдезоксисуридин

Для того, чтобы устранить недостатки радиоавтографического метода выявления пролиферирующих клеток, было предложено использовать нерадиоактивный аналог тимидина — синтетический нуклеозид 5-бром-2'-дезоксисуридин (BrdU) [28]. После включения в молекулу ДНК BrdU можно определять при помощи моноклональных антител. Этот метод обладает многими преимуществами радиоавтографии с ^3H -тимидином и может быть использован в клинической диагностике [5, 6].

К недостаткам BrdU можно отнести его токсичность для включающих его клеток. Так как он является модифицированным нуклеозидом, ему свойственно сильное мутагенное действие. Образование связи BrdU с аденином во вновь синтезированной молекуле ДНК приводит к появлению точечных мутаций — транзиций [73], а также к блокированию транскрипции некоторых генов [1]. Кроме того, BrdU может индуцировать хромосомные разрывы в гетерохроматиновых областях [64].

Существуют два основных способа введения BrdU животным: интраперитонеальный и пероральный (при добавлении его в питьевую воду). Второй способ менее точен, поскольку предусматривает лишь приблизительное дозирование препарата.

Обычно доза BrdU при интраперитонеальном введении составляет от 10 мг/кг [72] до 200 мг/кг [15] на одну инъекцию. Через 1 ч после введения BrdU может быть обнаружен в тимусе и костном мозге животного, а через 24 ч — в большинстве тканей, содержащих пролиферирующие клетки.

При добавлении BrdU в воду для питья используют концентрацию 0,8–1 мг/мл [12, 68]. Как указано в рекомендациях по применению BrdU в лабораторной практике (BD Biosciences, США), длительное использование такой питьевой воды может оказывать токсическое действие. Так, употребление ее в течение 14 сут приводит к летальному исходу, тогда как использование в течение 7–9 сут и последующая смена питьевой воды, содержащей BrdU, на чистую воду не приводит к гибели животных.

При иммуноцитохимическом выявлении BrdU необходимо проведение тепловой или кислотной денатурации ДНК [49] перед инкубацией с первичными антителами — процедуры, ухудшающей качество гистологического препарата.

Ядерные белки

Помимо меченых нуклеозидов, в качестве маркеров пролиферации используются ряд белков, участвующих в регуляции клеточного цикла. Некоторые из этих белков экспрессируются в

клетке только в определенную фазу цикла. В S-фазе экспрессируются белки, участвующие в метаболизме ДНК (репликации, репарации, рекомбинации). К таким белкам относятся белок PCNA (proliferating cell nuclear antigen — ядерный антиген пролиферирующих клеток) и FEN-1 (flap structure-specific endonuclease 1 — флэп-эндонуклеаза 1).

PCNA — консервативный белок массой 36 килодальтон [8], имеющийся у всех животных и растений. Он является вспомогательным белком для ДНК-полимераз δ и ϵ , которые участвуют в репликативном синтезе отстающей цепи ДНК, синтезе фрагментов Оказаки, а также в эксцизионном репаративном ресинтезе ДНК [40, 43, 75]. PCNA обнаруживается в ядрах клеток в S-фазе цикла [9, 10, 66]. В интерфазных клетках, подвергшихся воздействию ультрафиолетового излучения, PCNA появляется при репаративном синтезе ДНК [14, 67]. PCNA является основным компонентом репликативного комплекса, он помогает ДНК-полимеразе- δ удерживаться на цепи ДНК: три молекулы PCNA образуют кольцевой тример с отверстием для двунитевой ДНК в центральной части, который представляет собой перемещающуюся по ДНК подвижную платформу, или «скользящую скрепку» («sliding clamp»), удерживающую ДНК-полимеразу в ходе полимеризации на матрице и обеспечивающую высокопроцессивный синтез ДНК (в 10–100 раз выше, чем в отсутствии PCNA) [16, 56]. PCNA образует связи и с другими белками: RF-C, FEN-1, Gadd45, циклинами группы D, p21 [22, 30, 35, 41, 44, 60, 71].

Относительным недостатком PCNA является его медленный катаболизм после завершения S-фазы цикла [10]. Однако эта особенность может быть использована для более полного выявления пролиферирующих клеток в медленно обновляющихся тканях.

Наиболее часто для выявления антигена PCNA используются антитела клона PC10. Проведение иммуноцитохимической реакции на PCNA, как правило, не требует протеолитической или тепловой демаскировки антигена, что позволяет получать препараты высокого качества [2–4].

Другой ядерный белок, связанный с пролиферативной активностью, — FEN-1 — фермент, принимающий участие в метаболизме ДНК [31, 42, 58]. Он удаляет РНК-праймер, необходимый для начала репликации на отстающей цепи ДНК при созревании фрагмента Оказаки [38, 69, 70]. Природными субстратами этого фермента являются 5'-флэп-субстраты, представляющие собой комплекс, образованный цепями ДНК, одна из которых имеет свисающий неспаренный 5'-уча-

сток (флэп). Такие структуры могут возникать в различных биохимических процессах, включая рекомбинацию ДНК, процессинг фрагментов Оказаки при репликации, а также ресинтез ДНК при эксцизионной репарации оснований. FEN-1 взаимодействует с белками комплексов репликации и репарации, включая PCNA, ДНК-полимеразу- δ , поли(АДФ-рибозо)-полимеразу 1, а также циклин-зависимые киназы [22, 41].

Обычно при проведении иммуноцитохимической реакции на FEN-1 рекомендуется тепловое демаскирование антигена, которое может ухудшить качество препаратов.

Один из наиболее часто используемых маркеров пролиферации — белок Ki-67 [23]. Он присутствует только в ядрах клеток в фазах G_1 , S, G_2 и во время митоза [57, 74]. После митоза, при переходе клеток в фазу G_0 , белок Ki-67 быстро подвергается катаболизму и не обнаруживается в ядрах интерфазных клеток [47]. Концентрация Ki-67 в ядре клетки нарастает от фазы G_1 до митоза, причем во время пресинтетического периода белок определяется преимущественно в ядрышках, а в постсинтетический период интенсивно окрашивается вся нуклеоплазма [74].

Белок Ki-67 при электрофорезе выявляется двумя полосами, соответствующими молекулярной массе 345 и 395 килодальтон [18]. К настоящему времени первичная структура белка Ki-67 изучена достаточно хорошо. В составе аминокислотной последовательности этого белка обнаружены потенциальные сайты фосфорилирования для различных киназ, пролин-глутамин-серин-трионин (PEST)-последовательности, имеющиеся в составе многих короткоживущих регуляторных белков, а также домен для связывания с вилкой репликации [17]. Перечисленные структуры характерны для многих белков, участвующих в регуляции клеточного цикла, однако, функция самого Ki-67 среди них остается неясной. Показано, что Ki-67 претерпевает посттрансляционные модификации путем фосфорилирования, сопровождающиеся перераспределением Ki-67 из нуклеоплазмы в перихромосомный слой и обратно в течение митоза. Фосфорилирование и дефосфорилирование Ki-67 контролируется ключевыми регуляторными механизмами клеточного цикла и происходит при распаде и реорганизации ядра в течение митоза [46].

Иммуноцитохимическая реакция на белок Ki-67 широко используется при анализе пролиферативной активности клеток в случае невозможности применения метода радиоавтографии [11]. Наиболее часто используемые клоны антител к белку Ki-67 — MIB-1 и MIB-5. Клон MIB-1 предназначен для работы с материалом, полученным

от человека [61], тогда как клон MIB-5 используют при изучении пролиферации на лабораторных животных [24, 25]. Широко применявшиеся ранее для выявления белка Ki-67 антитела клона Ki-67 в настоящее время используются редко, поскольку выявляют неустойчивый к фиксации формальдегидом эпитоп антигена. Особенностью выявления антигена Ki-67 является необходимость дополнительного проведения процедуры его теплового демаскирования [37, 65].

Одним из недавно введенных в практику высокоспецифичных маркеров митотически делящихся клеток является фосфорилированный гистон H3 [13, 32]. По-видимому, он является более селективным маркером митоза, чем использовавшийся ранее антиген p105 [62].

Гистоны представляют собой небольшие основные белки, обладающие консервативной структурой у всех эукариот. Они участвуют в организации высокоупорядоченного нуклеопротеинового комплекса. В образовании каждой нуклеосомы принимают участие гистоны четырех типов — H2A, H2B, H3 и H4, а гистон H1 участвует во взаимодействии нуклеосом между собой и нужен для их укладки в компактную структуру более высокого порядка [54]. Молекула гистона H3 содержит глобулярную C-концевую часть и аморфный N-конец. Именно посттрансляционная модификация N-конца отвечает за уровень конденсации и деконденсации хроматина. Фосфорилирование молекулы гистона H3 по серину в положении 10 (в N-конце) происходит при транскрипции некоторых генов и при делении клетки [19, 20, 27, 33, 51]. Фосфорилирование молекулы гистона H3 по серину в положении 28 (в N-конце) происходит только в начале митоза [21]. Таким образом, фосфорилированный по серину в положении 28 гистон H3 позволяет маркировать только клетки, проходящие различные фазы митоза. При выходе клетки из митоза происходит дефосфорилирование гистона H3 [27, 29].

Антигенная структура гистона H3 стабильна при фиксации формальдегидом [13, 32] и заливке объектов в парафин. При проведении иммуноцитохимической реакции на фосфорилированный гистон H3 рекомендуется тепловое демаскирование антигена [32].

Циклины

Циклин-зависимые киназы (CDK) и их регуляторные субъединицы — циклины — являются основными регуляторами клеточного цикла. В настоящее время известны 12 циклинов, обозначаемых латинскими буквами от A до L. Часть циклинов имеют подтипы, которые обозначают арабскими цифрами [53]. Прохождение клеточ-

ного цикла достигается путем последовательной активации и дезактивации разных комплексов циклин—CDK. Действие комплексов циклин—CDK заключается в фосфорилировании ряда белков-мишеней в соответствии с фазой клеточного цикла, в которой активен тот или иной комплекс циклин—CDK [53].

Основным результатом каскада сигнальных процессов, происходящих вследствие связывания ростового фактора с рецептором на поверхности клетки, является активация комплекса циклин D1—CDK4/6. Активность этого комплекса существенно возрастает уже в раннем периоде фазы G₁ [59]. Этот комплекс фосфорилирует мишени, необходимые для прохождения в S-фазу [7]. Основным субстратом комплекса циклин D1—CDK4/6 является продукт гена ретинобластомы (pRb) [34, 45]. Нефосфорилированный pRb связывается и, тем самым, инактивирует транскрипционные факторы группы E2F. Фосфорилирование pRb комплексами циклин D1—CDK4/6 приводит к высвобождению E2F, который проникает в ядро и инициирует транскрипцию генов, продукты которых необходимы для репликации ДНК, в частности, генов циклина Е и циклина А. В конце фазы G₁ происходит кратковременное увеличение концентрации циклина Е [52], что предвещает накопление циклина А и переход в S-фазу. Комплекс циклин-А—CDK2 необходим как для инициации репликации ДНК, так и для успешного окончания S-фазы [63].

Основным регулятором прохождения фазы G₂ служит комплекс циклин В—CDK2, а регулятором перехода G₂/М является комплекс циклин В—CDK1. Его фосфорилирование/дефосфорилирование регулирует вход в М-фазу [48, 50].

Для вступления в митоз необходимо присутствие циклина А, однако, основным регулирующим комплексом является, как и на предыдущей стадии, комплекс циклин-В—CDK1. Активность этого комплекса приводит к деградации ядерной оболочки, конденсации хроматина и формированию метафазной пластинки. Перед переходом клетки из метафазы в анафазу происходит разрушение циклина В1 [26].

Наиболее часто в исследованиях пролиферации используют маркирование циклинов D1 и В1, что позволяет отдельно выявлять клетки, проходящие G₁- и G₂-фазы цикла [26, 62]. Особенностью выявления большинства циклинов является необходимость дополнительного проведения процедуры теплового демаскирования антигенов.

В заключение следует отметить, что при оценке пролиферативной активности клеток могут быть использованы и другие маркеры, число кото-

рых постоянно увеличивается по мере углубления знаний о механизмах регуляции клеточного цикла. Кроме гистологических методов, позволяющих выявить пролиферирующие клетки *in situ*, важное место в исследованиях пролиферации занимает метод проточной цитометрии [62]. В последние годы был предложен радиологический метод, позволяющий проводить оценку пролиферации клеток у человека *in vivo* при помощи позитронно-эмиссионной томографии [36]. Однако анализ этих перспективных разработок выходит за рамки настоящего обзора.

Таким образом, использование существующих маркеров пролиферации позволяет существенно расширить возможности гистологического исследования. При проведении исследований пролиферативной активности клеток следует обращать внимание на особенности экспрессии отдельных маркеров в пределах клеточного цикла, а при интерпретации полученных данных учитывать весь спектр биохимических процессов, в которых могут участвовать исследуемые белки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Епифанова О.И., Терских В.В. и Захаров А.Ф. Радиоавтография. М., Высш. школа, 1977.
2. Коржевский Д.Э. Проллиферативные зоны в эпителии сосудистых сплетений головного мозга эмбриона человека. Морфология, 1999, т. 115, вып. 3, с. 38–41.
3. Коржевский Д.Э. Использование моноклональных антител к ядерному белку PCNA для выявления пролиферирующих клеток в развивающемся головном мозге эмбриона человека. Морфология, 2000, т. 118, вып. 5, с. 68–70.
4. Омельченко Н.В., Коржевский Д.Э., Смирнов Е.Б. и Петрова Е.С. Ядрышковый аппарат пролиферирующих и дифференцирующихся клеток неокортекса эмбриона человека в период формирования кортикальной пластинки. Морфология, 1998, т. 113, вып. 2, с. 53–57.
5. Упоров А.В. Активность пролиферации и ядрышковых организаторов клеток рака молочной железы как показатель биологического поведения опухоли: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб., 1998.
6. Упоров А.В., Цырлина Е.В., Семиглазов В.Ф. и Пожариский К.М. Определение пролиферативной активности клеток рака молочной железы с использованием введения 5-бром-2'-дезоксифлуоридина *in vivo*. Вопр. онкол., 1997, т. 43, с. 176–182.
7. Barnes D.M. and Gillett C.E. Cyclin D1 in breast cancer. Breast Cancer Res. Treat., 1998, v. 52, № 1–3, p. 1–15.
8. Bravo R., Fey S.J., Bellatin J. et al. Identification of a nuclear and of cytoplasmic polypeptide whose relative proportion is sensitive to changes in the rate of cell proliferation. Exp. Cell Res., 1981, v. 136, № 2, p. 311–319.
9. Bravo R. and Macdonald-Bravo H. Changes in the nuclear distribution of cyclin (PCNA) but not its synthesis depend on DNA replication. EMBO J., 1985, v. 4, p. 655–661.
10. Bravo R. and Macdonald-Bravo H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle:

- association with DNA replication sites. *J. Cell Biol.*, 1987, v. 105, № 4, p. 1549–1554.
11. Brooks D.J. and Garewal H.S. Measures of tumor proliferative activity. *Int. J. Clin. Lab. Res.*, 1992, v. 22, № 4, p. 196–200.
 12. Buffo A., Rite I., Tripathi P. et al. Origin and progeny of reactive gliosis: a source of multipotent cells in the injured brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, v. 105, № 9, p. 3581–3586.
 13. Bystron I., Molnar Z., Otellin V. and Blakemore C. Tangential networks of precocious neurons and early axonal outgrowth in the embryonic human forebrain. *J. Neurosci.*, 2005, v. 25, p. 2781–2792.
 14. Celis J.E. and Madsen P. Increased nuclear cyclin/PCNA antigen staining of non S-phase transformed human amnion cells engaged in nucleotide excision DNA repair. *FEBS Lett.*, 1986, v. 209, p. 277–283.
 15. Chen Y., Ai Y., Slevin J.R. et al. Progenitor proliferation in the adult hippocampus and substantia nigra induced by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Exp. Neurol.*, 2005, v. 196, № 1, p. 87–95.
 16. Cox L.S. Who binds wins: competition for PCNA rings out cell-cycle changes. *Trends Cell Biol.*, 1997, v. 7, № 12, p. 493–498.
 17. Duchrow M., Schlüter C. et al. Cell proliferation-associated nuclear antigen defined by antibody Ki-67: a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 1995, v. 43, № 2, p. 117–121.
 18. Duchrow M., Schlüter C., Wohlenberg C. et al. Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67. *Cell Prolif.*, 1996, v. 29, № 1, p. 1–12.
 19. Dyson M.H., Thomson S., Inagaki M. et al. MAP kinase-mediated phosphorylation of distinct pools of histone H3 at S10 or S28 via mitogen- and stress-activated kinase 1/2. *Cell Sci.*, 2005, v. 118, Pt. 10, p. 2247–2259.
 20. Dyson M.H., Thomson S. and Mahadevan L.C. Heat shock, histone H3 phosphorylation and the cell cycle. *Cell Cycle.*, 2005, v. 4, № 1, p. 13–17.
 21. Eberlin A., Grauffel C., Oulad-Abdelghani M. et al. Histone H3 tails containing dimethylated lysine and adjacent phosphorylated serine modifications adopt a specific conformation during mitosis and meiosis. *Mol. Cell Biol.*, 2008, v. 28, № 5, p. 1739–1754.
 22. Gary R., Ludwig D.L., Cornelius H.L. et al. The DNA repair endonuclease XPR binds to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and shares sequence elements with the PCNA-binding region of FEN-1 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *J. Biol. Chem.*, 1997, v. 272, p. 24522–24529.
 23. Gerdes J., Li L., Schlueter C. et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am. J. Pathol.*, 1991, v. 138, p. 867–873.
 24. Gerlach C., Golding M., Larue L. et al. Ki-67 immunoreexpression is a robust marker of proliferative cells in the rat. *Lab. Invest.*, 1997, v. 77, № 6, p. 697–698.
 25. Gerlach C., Sakkab D.Y., Scholzen T. et al. Ki-67 expression during rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology*, 1997, v. 26, № 3, p. 573–578.
 26. Gorczyca W., Sarode V., Juan G. et al. Laser scanning cytometric analysis of cyclin B1 in primary human malignancies. *Mol. Pathol.*, 1997, v. 10, № 5, p. 457–462.
 27. Goto H., Tomono Y., Ajiro K. et al. Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *Biol. Chem.*, 1999, v. 274, № 36, p. 25543–25549.
 28. Gratzner H.G. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science*, 1982, v. 218, № 4571, p. 474–475.
 29. Hans F. and Dimitrov S. Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene*, 2001, v. 20, № 24, p. 3021–3027.
 30. Hall P.A., Kearsley J.M., Coates P.J. et al. Characterization of the interaction between PCNA and Gadd45. *Oncogene*, 1995, v. 10, № 12, p. 2427–2433.
 31. Harrington J.J. and Lieber M.R. The characterization of a mammalian DNA structure-specific endonuclease. *EMBO J.*, 1994, v. 13, p. 1235–1246.
 32. Hirata A., Inada K., Tsukamoto T. et al. Characterization of a monoclonal antibody, HTA28, recognizing a histone H3 phosphorylation site as a useful marker of M-phase cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 2004, v. 52, № 11, p. 1503–1509.
 33. Juan G., Traganos F., James W.M. et al. Histone H3 phosphorylation and expression of cyclins A and B1 measured in individual cells during their progression through G₂ and mitosis. *Cytometry*, 1998, v. 32, № 2, p. 71–77.
 34. Kato J., Matsushima H., Hiebert S.W. et al. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev.*, 1993, v. 7, № 3, p. 331–342.
 35. Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*, 1997, v. 14, № 6, p. 629–640.
 36. Kenny L.M., Vigushin D.M., Al-Nahhas A. et al. Quantification of cellular proliferation in tumor and normal tissue of patients with breast cancer by [18F]fluorothymidine-positron emission tomography imaging evaluation of analytical methods. *Cancer Res.*, 2005, v. 65, p. 10104–10112.
 37. Key G., Petersen J.L., Becker M.H. et al. New antiserum against Ki-67 antigen suitable for double immunostaining of paraffin wax sections. *J. Clin. Pathol.*, 1993, v. 46, № 12, p. 1080–1084.
 38. Kim K., Biade S. and Matsumoto Y. Involvement of flap endonuclease 1 in base excision DNA repair. *J. Biol. Chem.*, 1998, v. 273, p. 8842–8848.
 39. Koburg E. and Maurer W. Autoradiographic studies with ³H-thymidine on the duration of desoxyribonucleic acid synthesis and its time lapse in the intestinal epithelium and other cell types in the mouse. *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, v. 61, p. 229–242.
 40. Levin D.S., Bai W., Yao N. et al. An interaction between DNA ligase I and proliferating cell nuclear antigen: implications for Okazaki fragment synthesis and joining. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, v. 94, p. 12862–12868.
 41. Li X., Li J., Harrington M.R. et al. Lagging strand DNA synthesis at the eucariotic replication fork involves binding and stimulation of FEN-1 by PCNA. *J. Biol. Chem.*, 1995, v. 270, p. 22109–22112.
 42. Liu Y., Kao H.I. and Bambara R.A. Flap endonuclease 1: a central component of DNA metabolism. *Annu. Rev. Biochem.*, 2004, v. 73, p. 589–615.
 43. Maga G., Villani G., Tillement V. et al. Okazaki fragment processing: modulation of the strand displacement activity of DNA polymerase delta by the concerted action of replication

- protein A, proliferating cell nuclear antigen, and flap endonuclease-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, v. 98, p. 14298–14303.
44. Matsuoka S., Yamaguchi M. and Matsukage A. D-type cyclin-binding regions of proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.*, 1994, v. 269, № 15, p. 11030–11036.
 45. Matsushime H., Quelle D.E., Shurtleff S.A. et al. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.*, 1994, v. 14, № 3, p. 2066–2076.
 46. McCallum D.E. and Hall P.A. Biochemical characterization of pKi67 with the identification of a mitotic-specific form associated with hyperphosphorylation and altered DNA binding. *Exp Cell Res.*, 1999, v. 252, № 1, p. 186–198.
 47. McCormick D., Chong H., Hobbs C. et al. Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. *Histopathology*, 1993, v. 22, № 4, p. 355–360.
 48. McGowan C.H. and Russell P. Cell cycle regulation of human WEE1. *EMBO J.*, 1995, v. 14, p. 2166–2175.
 49. McKinley J.N., Knott K.K. and Thompson H.J. Effect of fixation and epitope retrieval on BrdU indices in mammary carcinomas. *J. Histochem. Cytochem.*, 2000, v. 48, № 3, p. 355–362.
 50. Morgan D.O. Principles of CDK regulation. *Nature*, 1995, v. 374, p. 131–134.
 51. Nowak S.J. and Corces V.G. Phosphorylation of histone H3 correlates with transcriptionally active loci. *Genes Dev.*, 2000, v. 14, № 23, p. 3003–3013.
 52. Payton M. and Coats S. Cyclin E2, the cycle continues. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2002, v. 34, p. 315–320.
 53. Pines J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem.*, 1995, v. 308, p. 697–711.
 54. Prigent C. and Dimitrov S. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J. Cell Sci.*, 2003, v. 116, 3677–3685.
 55. Quastler H. and Sherman F.G. Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp. Cell Res.*, 1959, v. 17, № 3, p. 420–438.
 56. Schurtenberger P., Egelhaaf S.U., Hindges R. et al. The solution structure of functionally active human proliferating cell nuclear antigen determined by small-angle neutron scattering. *J. Mol. Biol.*, 1998, v. 275, № 1, p. 123–132.
 57. Seigneurin D. and Guillaud P. Ki-67 antigen, a cell cycle and tumor growth marker. *Pathol. Biol.*, 1991, v. 39, № 10, p. 1020–1028.
 58. Shen B., Singh P., Liu R. et al. Multiple but dissectible functions of FEN-1 nucleases in nucleic acid processing, genome stability and diseases. *Bioessays*, 2005, v. 27, p. 717–729.
 59. Sherr C.J. G₁ phase progression: cycling on cue. *Cell*, 1994, v. 79, № 4, p. 551–555.
 60. Smith M.L., Chen I.T., Zhan Q. et al. Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science*, 1994, v. 266, № 5189, P1376–1380.
 61. Spyrtatos F., Ferrero-Pous M., Trassard M. et al. Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: clinical implication of the MIB-1 cutoff value. *Cancer*, 2002, v. 94, p. 2151–2159.
 62. Sramkoski R.M., Wormsley S.W., Bolton W.E. et al. Simultaneous detection of cyclin B1, p105, and DNA content provides complete cell cycle phase fraction analysis of cell that endoreduplicate. *Cytometry*, 1999, v. 35, № 3, p. 274–283.
 63. Stillman B. Cell cycle control of DNA replication. *Science*, 1996, v. 274, p. 1659–1664.
 64. Sutherland G.R. The role of nucleotides in human fragile site expression. *Mutat. Res.*, 1988, v. 200, № 1–2, p. 207–213.
 65. Suurmeijer A.J.H. and Boon M.E. Pretreatment in a high pressure microwave processor for MIB-1 immunostaining of cytological smears and paraffin tissue sections to visualize the various phases of the mitotic cycle. *J. Histochem. Cytochem.*, 1999, v. 47, № 8, p. 1015–1020.
 66. Takasaki Y., Deng J.S. and Tan E.M. A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. *J. Exp. Med.*, 1981, v. 154, № 6, p. 1899–1909.
 67. Toschi L. and Bravo R. Changes in cyclin/proliferating cell nuclear antigen distribution during DNA repair synthesis. *J. Cell Biol.*, 1988, v. 107, p. 1623–1628.
 68. Tough D.F. and Sprent J. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J. Exp. Med.*, 1994, v. 179, № 4, p. 1127–1135.
 69. Turchi J.J., Huang L., Murante R.S. et al. Enzymatic completion of mammalian lagging-strand DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, v. 91, p. 9803–9807.
 70. Waga S., Bauer G. and Stillman B. Reconstitution of complete SV40 DNA replication with purified replication factors. *J. Biol. Chem.*, 1994, v. 269, p. 10923–10934.
 71. Waga S., Hannon G.J., Beach D. and Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*, 1994, v. 369, p. 574–578.
 72. Wen Y., Yang S., Lui R. and Simpkins J.W. Cell-cycle regulators are involved in transient cerebral ischemia induced neuronal apoptosis in female rats. *FEBS Lett.*, 2005, v. 579, № 21, p. 4591–4599.
 73. Xu F.M., Greenspan J.A. and Davidson R.L. Replication-dependent mutagenesis by 5-bromodeoxyuridine: identification of base change and sequence effects on mutability. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 1990, v. 16, № 5, p. 477–486.
 74. Yu C.C. and Filipe M.I. Update on proliferation-associated antibodies applicable to formalin-fixed paraffin-embedded tissue and their clinical applications. *Histochem J.*, 1993, v. 25, № 12, p. 843–853.
 75. Yuzhakov A., Kelman Z., Hurwitz J. and O'Donnell M. Multiple competition reactions for RPA order the assembly of the DNA polymerase delta holoenzyme. *EMBO J.*, 1999, v. 18, № 21, p. 6189–6199.

Поступила в редакцию 18.06.09

PROLIFERATION MARKERS USED IN HISTOLOGICAL STUDIES

O.V. Kirik, G.V. Beznin and D.E. Korzhevskiy

The present paper reviews the current approaches used to study cell proliferative activity. In the last years, a number of proteins involved in cell cycle control were discovered, that may serve as selective markers of proliferating cells. This work gives the characteristics of immunocytochemical methods demonstrating 5-bromodeoxyuridine, PCNA, Ki-67, FEN-1, phosphorylated histone H3 and cyclins. The data on the role of these proteins in cell cycle control are presented.

Key words: *proliferation, cell cycle, immunocytochemistry, 5-bromodeoxyuridine, nuclear proteins.*

Department of General and Special Morphology, RAMS Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg.