

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

МЕТОД СЕЛЕКТИВНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ КЛЕТОК В СТРУКТУРАХ ФОРМИРУЮЩЕЙСЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ, ОСНОВАННЫЙ НА ОПРЕДЕЛЕНИИ ФОСФОРИЛИРОВАННОГО ГИСТОНА H3

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

Фосфорилированный гистон (ФГ) H3 представляет интерес для исследования пролиферативной активности клеток различных тканей. Его выявление используется в гистопатологической диагностике опухолей. Цель настоящей работы состояла в разработке иммуноцитохимических протоколов выявления ФГH3 в клетках развивающейся нервной системы для классической световой микроскопии и конфокальной лазерной микроскопии. Представленные протоколы позволяют с высокой селективностью и хорошей воспроизводимостью выявлять делящиеся клетки в структурах развивающегося головного мозга. В качестве оптимального фиксатора для ФГH3 рекомендуется использовать цинк—этанол—формальдегид.

Ключевые слова: *головной мозг, гистон H3, пролиферация, иммуноцитохимия*

Изучение развития нервной системы невозможно без определения пролиферативной активности клеток эмбриональных закладок, которые, обладая способностью делиться, мигрировать и дифференцироваться в различных направлениях в пределах единого нейрального зачатка, служат источником развития всех типов нервных клеток и клеток макроглии. В настоящее время исследователям доступны разнообразные методы выявления пролиферирующих клеток *in situ*, среди которых отмечают и маркирование фосфорилированного гистона H3 (ФГH3) [4].

Гистоны представляют собой небольшие основные ядерные белки с консервативной для всех эукариот структурой, обеспечивающие сборку нитей ДНК в хромосомы. Известно 5 различных типов гистонов [9]. Фосфорилирование гистона H3 — необходимый этап подготовки к компактизации хроматина и спирализации ДНК, характерной для метафазных хромосом. Дефосфорилирование этого гистона происходит в конце митоза и сопровождается деконденсацией хромосом [12]. Существуют данные о том, что в нервных клетках фосфорилирование гистона H3 не связано с пролиферацией. В частности, в нейронах зубчатой извилины гиппокампа фосфорилирование гистона H3 происходит в процессе ответной реакции на стрессорное воздействие

[10]. Однако остается неясным, приводит ли это фосфорилирование к компактизации хроматина, наблюдаемой при гиперхроматозе и «простом сморщивании» нервных клеток [3].

Несмотря на широкое использование ФГH3 в качестве пролиферативного маркера в онкологии [1, 3, 8], отсутствует систематизированная информация об оптимальных режимах фиксации материала, демаскирования и дальнейшей обработки срезов, а также о допустимых вариантах докраски препаратов, в которых пролиферирующие клетки выявляются при помощи реакции на гистон H3. Кроме того, остаётся не ясным, насколько удобно использовать этот маркер при анализе пролиферативной активности клеток формирующейся нервной системы.

Цель настоящего исследования состояла в разработке простых и хорошо воспроизводимых способов иммуноцитохимического выявления ФГH3, пригодных для идентификации пролиферирующих клеток при обычной световой и конфокальной лазерной микроскопии.

Для изучения возможности выявления делящихся клеток при помощи реакции на ФГH3 были использованы срезы эмбрионов крысы 13–20 сут внутриутробного развития и срезы головного мозга новорожденных крысят. Материал был фиксирован в цинк — формалине, спирт — фор-

Сведения об авторах:

Коржевский Дмитрий Эдуардович (e-mail: dek2@yandex.ru), *Кирик Ольга Викторовна* (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), *Безнин Глеб Владимирович*, 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

малине и цинк – этанол – формальдегиде [6]. Объекты исследования были залиты в парафин — Histomix (БиоВитрум, Россия). Срезы толщиной 5 и 12 мкм готовили на ротационном микротоме Leica RM 2125RT (Leica, Германия) и наклеивали на предметные стекла, покрытые специальным адгезивом [7]. Для выявления ФГНЗ применяли поликлональные кроличьи антитела (ab5176, Abcam, Великобритания) и вторичные реагенты — Poly HRP Reagent из набора Super Sensitive Polymer-HRP Detection System QD430-ХАК (BioGenex, США), HRP Conjugate из набора Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System SPD-015 (Spring Bioscience, США) и антикроличьи антитела, конъюгированные с флюорохромом TRITC (Dako, Дания). Для выявления продукта реакции на светооптическом уровне использовали хромоген 3`3-диаминобензидин из наборов DAB+ (Dako, Дания) и DAB 2-component (Spring Bioscience, США).

На основании обработки различных режимов инкубации, дополнительных блокировок и проверки необходимости процедуры теплового демаскирования антигена, были выбраны два варианта протокола обработки препаратов — для обычной световой и для флуоресцентной (лазерной конфокальной) микроскопии. Сравнение результатов обработки препаратов, фиксированных различным образом, показало, что фиксация в цинк—этанол—формальдегиде лучше сохраняет иммунореактивность изучаемого антигена.

Для световой микроскопии рекомендуется использовать следующий протокол окраски препаратов.

1. Удалить парафин и регидратировать срезы обычным способом.

2. После кратковременной (2–5 мин) промывки в дистиллированной воде перенести предметные стекла в 3% перекись водорода на 10 мин для блокирования эндогенной пероксидазы.

3. Смыть перекись дистиллированной водой и поместить стекла в 0,01 М фосфатно-солевой буфер (ФСБ) pH 7,4 на 5–10 мин.

4. Аккуратно промокнув фильтровальной бумагой стекло вокруг срезов, нанести на срезы необходимое количество блокировочного раствора (Protein block DPB-125, Spring Bioscience, США или 5% раствор бычьего сывороточного альбумина) и оставить при комнатной температуре на 10 мин. Чтобы реагенты при инкубации не растекались по предметному стеклу и срезы не высыхали, рекомендуется нарисовать специальным фломастером (Liquid Blocker, PAP Pen, Dako Pen) вокруг срезов гидрофобный круг.

5. Аккуратно удалить блокировочный раствор и, не промывая препараты, нанести на срезы антитела к ФГНЗ, разведенные разбавителем для антител S0809 (Dako, Дания) до 1:200. Поместить стекла во влажную камеру и инкубировать при 40 °С в течение 80 мин.

6. Смыть антитела и оставить препараты в ФСБ на 5–10 мин.

7. Удалить излишки ФСБ (промокнув стекло фильтровальной бумагой вокруг срезов), нанести необходимое количество реагента Poly HRP Reagent из набора Super Sensitive Polymer-HRP Detection System или HRP Conjugate из набора Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System. Поместить стекла во влажную камеру и инкубировать при 27 °С в течение 30 мин.

8. Смыть реагент и оставить препараты в ФСБ на 5–10 мин.

9. Удалить излишки ФСБ (промокнув стекло фильтровальной бумагой вокруг срезов), нанести необходимое количество рабочего раствора DAB. В течение 1–5 мин происходит образование продукта гистохимической реакции. Этот процесс желательно контролировать под микроскопом, чтобы остановить реакцию до появления окрашенного фона.

10. Смыть раствор хромогена в 2–3 порциях дистиллированной воды (10–15 мин).

11. При необходимости докрасить цитоплазму клеток астровым синим (0,1% водный раствор).

12. Обезводить, просветлить и заключить препараты в перманентную среду (DPX, полистирол, канадский бальзам) обычным способом.

В результате обработки препаратов отчетливо выявляются клетки (рис. 1), проходящие различные фазы митотического деления. При этом в формирующихся структурах мозга у эмбрионов 13–15 сут развития иммунопозитивные клетки обнаруживаются преимущественно в так называемой «зоне М» [2] — слое клеток на границе с вентрикулярной поверхностью, тогда как в «зоне S», в которой клетки проходят синтетический период клеточного цикла, иммунопозитивные клетки встречаются редко. На более поздних стадиях пренатального развития отчетливо определяется вторая пролиферативная зона закладки неокортекса — промежуточная. Докрашивание препаратов астровым синим, как и в случае с ядерным антигеном пролиферирующих клеток [5], улучшает ориентацию в структурах препарата, не маскируя продукта иммуногистохимической реакции (см. рис. 1).

Для конфокальной микроскопии рекомендуется использовать следующий протокол окраски препаратов.

1. Удалить парафин и регидратировать срезы обычным способом.

2. Поместить предметные стекла в 0,01 М ФСБ pH 7,4 на 5–10 мин.

3. Аккуратно промокнув фильтровальной бумагой стекло вокруг срезов, нанести на срезы необходимое количество блокировочного раствора — (Protein block) (DPB-125 — Spring Bioscience, США) или 5% раствор бычьего сывороточного альбумина и оставить при комнатной температуре на 10 мин. Чтобы реагенты при инкубации не растекались по предметному стеклу и срезы не высыхали, рекомендуется нарисовать специальным фломастером (Liquid Blocker, PAP Pen, Dako Pen) вокруг срезов гидрофобный круг.

4. Аккуратно удалить блокировочный раствор и, не промывая препараты, нанести на срезы антитела к ФГНЗ, разведенные разбавителем для антител до 1:400. Поместить стекла во влажную камеру и инкубировать при 40 °С в течение 20 ч.

5. Смыть антитела и оставить препараты в ФСБ на 5–10 мин.

6. Удалить излишки ФСБ (промокнув фильтровальной бумагой предметное стекло вокруг срезов), нанести необходимое количество вторичных антител, конъюгированных с TRITC (1:25, R0156, Dako). Поместить стекла во влажную камеру и инкубировать при 40 °С в течение 30 мин.

7. Смыть реагент и оставить препараты в ФСБ на 5–10 мин.

8. Промыть срезы в дистиллированной воде (10–15 мин) и заключить в специальную водную нефлюоресцирующую среду Mounting Medium (Dako, Дания). Перед заключением препаратов можно добавить этап докраски ядер клеток флюоресцентным красителем (например, Hoechst 33342 или SYTOX-green), после чего необходима дополнительная промывка в дистиллированной воде (10–20 мин).

В результате обработки препаратов флюоресцируют только хромосомы митотически делящихся клеток. Данный протокол может быть использован не только для селективного выявления пролиферирующих клеток, но и как составная часть более сложных методов [1], для одновременного выявления ФГНЗ в комбинации с другими цитохимическими маркерами (рис. 2).

При использовании представленных двух вариантов протоколов могут быть получены высококонтрастные цифровые изображения препаратов при малом увеличении, легко поддающиеся бинаризации и автоматическому подсчету фигур митоза с использованием компьютерной программы ImageJ (NIH, США) и аналогичных. Это позволяет

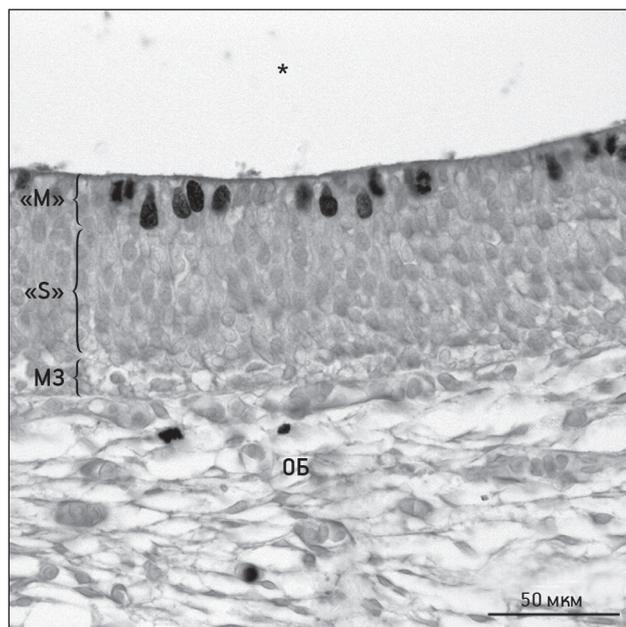


Рис. 1. Участок стенки бокового желудочка головного мозга 14-суточного эмбриона крысы.

Пролиферирующие (иммунопозитивные) клетки сосредоточены в зоне «М». В зоне «S» реакция на фосфорилированный гистон H3 отсутствует. M3 — маргинальная зона; ОБ — область мозговых оболочек; звездочка — полость желудочка. Иммуноцитохимическая реакция на фосфорилированный гистон H3 с докраской астровым синим

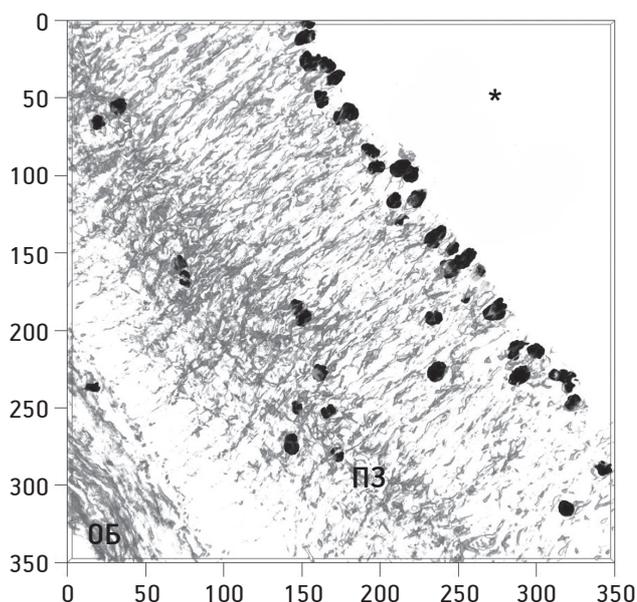


Рис. 2. Конфокальная реконструкция стенки бокового желудочка головного мозга 17-суточного плода крысы.

Пролиферирующие клетки, помимо вентрикулярной зоны, выявляются в промежуточной зоне (ПЗ). Остальные обозначения те же, что на рис. 1. Иммуноцитохимическая реакция на фосфорилированный гистон H3 — черная окраска — в комбинации с иммуноцитохимической реакцией на виментин (белок радиальных глиоцитов и менингоцитов) — серая окраска

очень быстро (в сравнении с ручным способом) определять число делящихся клеток на единице площади препарата и проводить статистическую обработку полученных данных. Поскольку на изготовленных препаратах отсутствуют признаки неспецифического окрашивания, а также не имеется тенденции к накоплению продукта реакции в зонах созревания нейронов (кортикальной пластинке и др.), можно заключить, что представленные протоколы выявления ФГНЗ пригодны для изучения пролиферации клеток развивающегося мозга. Тем не менее, учитывая данные о возможности фосфорилирования гистона H3 при стрессе [9], следует с осторожностью использовать этот маркер при изучении нервной системы взрослых млекопитающих.

Таким образом, представленные протоколы обработки позволяют с высокой селективностью и хорошей воспроизводимостью выявлять делящиеся клетки в структурах развивающегося головного мозга. В качестве оптимального фиксатора для ФГНЗ, позволяющего отказаться от теплового демаскирования при постановке иммуноцитохимической реакции, рекомендуется использовать цинк – этанол – формальдегид.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гиляров А. В., Кирик О. В. и Коржевский Д. Э. Сравнительный анализ методических подходов, применяемых для одновременного выявления нескольких антигенов при иммуногистохимическом исследовании. *Морфология*, 2010, т. 138, вып. 5, с. 59–64.
2. Грачева Н. Д. Авторадиография синтеза нуклеиновых кислот и белков в нервной системе. Л., Наука, 1967.
3. Жаботинский Ю. М. Нормальная и патологическая морфология нейрона. Л., Медицина, 1965.
4. Кирик О. В., Безнин Г. В. и Коржевский Д. Э. Маркеры пролиферации, применяемые в гистологических исследованиях. *Морфология*, 2009, т. 136, вып. 6, с. 95–100.
5. 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.
6. Коржевский Д. Э., Григорьев И. П. и Отеллин В. А. Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрогистологических исследованиях. *Морфология*, 2006, т. 129, вып. 1, с. 85–86.
7. Патент РФ № 2386137. Покрытие предметных стекол для проведения иммуноцитохимических и гистологических исследований. Д. Э. Коржевский и О. В. Кирик. Заявка от 29.09.2008 г. Опубл. в БИ, 2010, № 10. (III ч.), с. 621.
8. Aune G., Stunes A. K., Tingulstad S. et al. The proliferation markers Ki-67/MIB-1, phosphohistone H3, and survivin may contribute in the identification of aggressive ovarian carcinomas. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2011, v. 4, № 5, p. 444–453.
9. Bhasin M., Reinherz E. L. and Reche P. A. Recognition and classification of histones using support vector machine. *J. Comput. Biol.*, 2006, v. 13, № 1, p. 102–112.
10. Bilang-Bleuel A., Ulbricht S., Chandramohan Y. et al. Psychological stress increases histone H3 phosphorylation in adult dentate gyrus granule neurons: involvement in a glucocorticoid receptor-dependent behavioral response. *Eur. J. Neurosci.*, 2005, v. 22, № 7, p. 1691–1700.
11. Goodarzi M., Correa A. M., Ajani J. A. et al. Anti-phosphorylated histone H3 expression in Barrett's esophagus, low-grade dysplasia, high-grade dysplasia, and adenocarcinoma. *Mod. Pathol.*, 2009, v. 22, № 12, p. 1612–1621.
12. Hendzel M. J., Wei Y., Mancini M. A. et al. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, 1997, v. 106, № 6, p. 348–360.
13. Ildikio H. A. Spindle checkpoint protein hMad2 and histone H3 phosphoserine 10 mitosis marker in pediatric solid tumors. *Anticancer Res.*, 2006, v. 26, № 6, p. 4687–4694.

Поступила в редакцию 15.05.2012

METHOD OF SELECTIVE DEMONSTRATION OF PROLIFERATING CELLS IN THE STRUCTURES OF DEVELOPING NERVOUS SYSTEM BASED ON THE DETECTION OF PHOSPHORYLATED H3 HISTONE

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

Phosphorylated H3 histone is of interest for the study of proliferative activity of the cells in various tissues. Its detection is used in histopathological tumor diagnosis. The purpose of this study was to develop immunocytochemical protocols for the demonstration of H3phosphohistone in the cells of the developing nervous system for classical light microscopy and confocal laser microscopy. The protocols presented allow to identify the dividing cells in the structures of developing brain with high selectivity and good reproducibility. Zinc-ethanol-formaldehyde is recommended as an optimal fixative for H3phosphohistone.

Key words: *brain, H3 histone, cell proliferation, immunocytochemistry*

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