

Д.Э. Коржевский и А.В. Гиляров

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОГО ВЫЯВЛЕНИЯ НЕСТИНА НА ПАРАФИНОВЫХ СРЕЗАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ*

Отдел морфологии (зав. — чл.-кор. РАМН проф. В.А.Отеллин) Института экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

Цель настоящего исследования состояла в разработке оптимального и простого протокола иммуноцитохимического выявления нестина (одного из белков промежуточных филаментов, часто используемого для маркирования нейральных стволовых клеток) в парафиновых срезах головного мозга крысы, с исключением процедур демаскирования антигена, нарушающих структуру ткани. Изучено влияние фиксации, характера блокирования неспецифического связывания антител, температурного режима и времени инкубации на результаты иммуноцитохимической реакции. На основании полученных результатов, предложен протокол обработки, позволяющий добиться четкого выявления нестина в клетках головного мозга крысы при оптимальном сохранении структуры нервной ткани.

Ключевые слова: головной мозг, нестин, крыса, иммуноцитохимия.

Иммуноцитохимические методы выявления нестина, одного из белков промежуточных филаментов, часто используются в нейробиологических исследованиях для маркирования нейральных стволовых клеток [4,9]. Предполагается, что нестин можно рассматривать как особый маркер, экспрессирующийся в малодифференцированных, пролиферирующих клетках различного происхождения, который исчезает при их дифференцировке [9]. В настоящее время для выявления нестина применяют различные методические подходы: используют парафиновые, криостатные и вибраторные срезы, тепловое демаскирование антигена, обычную световую, флюоресцентную и конфокальную лазерную микроскопию, ультраструктурную иммуноцитохимию. Неудивительно, что при отсутствии стандартизации методов в результатах, полученных различным способом и с использованием разных моделей, обнаруживаются противоречия. До сих пор остается непонятным, вызывает ли ишемия или другие повреждающие факторы индукцию нестина только в астроцитах и нейральных стволовых клетках или же в более широком спектре клеточных элементов нейрального и ненейрального происхождения [5–7]. В связи с большой актуальностью исследований, посвященных проблеме стволовых клеток, существует необходимость в разработке хорошо воспроизводимого и высокочувствительного метода выявления нестина, позволяющего сохранить структуру и тинкториальные свойства нервной ткани, что необходимо для оценки морфологиче-

ских особенностей иммунопозитивных клеток и правильной ориентации в топографии среза.

Цель настоящего исследования состояла в разработке оптимального и простого протокола иммуноцитохимического выявления нестина в парафиновых срезах головного мозга крысы с помощью наиболее часто применяемых моноклональных антител (Rat-401), с исключением процедур демаскирования антигена, нарушающих структуру и тинкториальные свойства ткани.

В работе использованы парафиновые срезы головного мозга крыс, перенесших кратковременную общую ишемию мозга [3], изготовленные после применения различных способов фиксации и наклеенные на необработанные адгезивами и обработанные полилизинном предметные стекла (Menzel, Германия). В качестве фиксаторов использовали цинк-формалин [8], этанол-формальдегид [1] и цинк-этанол-формальдегид [2], цинковый фиксатор фирмы BD Pharmingen (США). Для выявления нестина применяли моноклональные антитела клона Rat-401 фирмы BD Pharmingen (США). Для выявления связавшихся первичных антител использовали различные реагенты фирмы DakoCytomation (Дания): наборы EnVision+ / HRP-Mouse, DAB+, разбавитель для антител, нормальные сыворотки крысы и свиньи. После постановки иммуноцитохимической реакции часть срезов докрашивали квасцовым гематоксилином.

На основе проверки различных протоколов выявления нестина, после различной фиксации

* Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты 04-04-48227, 05-04-49397, 05-04-08072-офи).

материала, было установлено, что наилучшую сохранность антигена при оптимальном сохранении структуры нервных клеток обеспечивает фиксация в цинк-этанол-формальдегиде.

Изучение разных способов блокирования и различных режимов инкубации срезов показало, что для подавления фоновой реакции необходимо блокирование неспецифического связывания антител в 12% нормальной сыворотке свиньи и добавление 2% нормальной сыворотки крысы к реагенту EnVision+.

Проверка влияния температурного режима на развитие специфической и фоновой реакций показала, что повышение температуры инкубации срезов в первичных антителах до 37 °С может приводить к развитию неспецифической фоновой реакции раньше, чем достигается оптимальный уровень специфической реакции на нестин. Наиболее приемлемой является инкубация в первичных антителах при комнатной температуре.

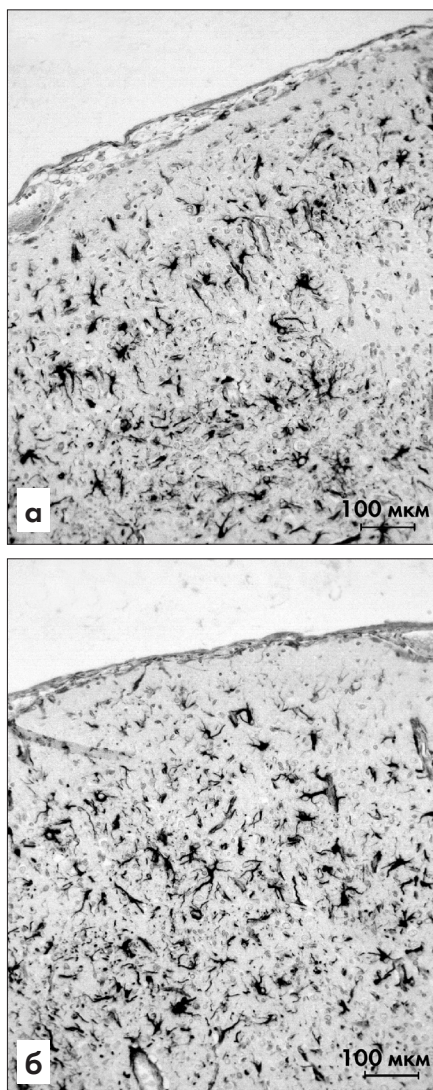
Изучение результатов реакции, развившейся после инкубации с первичными антителами, различной по продолжительности, показало, что оптимальная реакция развивается после 48-часовой инкубации, причем увеличение ее продолжительности до 10 сут (наиболее продолжительный из исследованных сроков) не приводит (в случае применения рекомендуемого нами протокола) к существенному увеличению неспецифической фоновой реакции и появлению новых окрашенных структур. Это свидетельствует о правильном выборе разведения первичных антител, адекватности блокировочных процедур и полноте выявления различных клеток головного мозга, синтезирующих нестин.

Для световой микроскопии рекомендуется использовать следующий протокол обработки 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 в 0,01 М фосфатно-солевой буфер pH 7,4 (ФСБ) на 5–10 мин.
4. Аккуратно промокнув фильтровальной бумагой стекло вокруг срезов, нанести на срезы (пипеткой) необходимое количество (для покрытия срезов) блокировочного раствора свиной сыворотки (12% нормальной сыворотки свиньи на разбавителе для антител DakoCytomation) 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, DakoCytomation Pen) вокруг срезов гидрофобный круг.

5. Аккуратно удалить блокировочный раствор и, не промывая препараты, нанести на срезы антитела к нестину, разведенные разбавителем для антител до 1:350–1:400 (этот раствор можно приготовить заранее, так как он стабилен в течение нескольких недель при 4 °С). Поместить предметные стекла во «влажную камеру» (можно использовать любые пластиковые коробки с крышками, на дно которых положена влажная фильтровальная бумага и стеклянные палочки) и оставить при комнатной температуре (около 20 °С) на 2–5 сут (допустимо увеличение сроков инкубации до 10 сут, однако, продолжительная инкубация может способствовать отклеиванию срезов от необработанных адгезивами предметных стекол).
6. Смыть антитела и оставить препараты в ФСБ на 5 мин.
7. Аккуратно промокнув фильтровальной бумагой стекло вокруг срезов, нанести необходимое количество реагента EnVision+/HRP-Mouse и оставить при комнатной температуре во влажной камере на 30 мин. В реагент EnVision+/HRP-Mouse следует заранее (не менее чем за 30 мин до постановки реакции) добавить 2% нормальной крысиной сыворотки (для устранения возможной неспецифической реакции реактива).
8. Смыть реагент и оставить препараты в ФСБ на 5 мин.
9. Аккуратно промокнув фильтровальной бумагой стекло вокруг срезов, нанести необходимое количество рабочего раствора DAB+. В течение 1–5 мин происходит образование окрашенного продукта гистохимической реакции. Этот процесс желательно контролировать под микроскопом, чтобы остановить реакцию до появления окрашивания фона.
10. Смыть раствор хромогена и промыть препараты в 2–3 порциях дистиллированной воды (10–15 мин).
11. При необходимости докрасить ядра клеток квасцовым гематоксилином.
12. Смыть краситель дистиллированной водой, подсинить в щелочной воде, обезводить, просветлить в ксилоле обычным образом и заключить в полистирол (пермаунт, DPX или другие подобные среды). При обезвоживании вместо абсолютного этанола можно использовать абсолютный (99%) изопропанол. Применение карбол-ксилола недопустимо.



Неокортекс крысы на 12-е сутки после 40-минутной общей ишемии головного мозга.

Иммуноцитохимическая реакция на нестин с докраской гематоксилином. а — после инкубации в первичных антителах при комнатной температуре в течение 5 сут; б — после инкубации в первичных антителах при комнатной температуре в течение 3 сут. В обоих случаях иммунопозитивными являются астроциты. Изображение получено при помощи цифровой камеры Leica DFC 280 и микроскопа Leica DM 1000.

Результат реакции представлен на рисунке.

Таким образом, применение представленного методического подхода позволяет добиться четкого выявления нестина в клетках головного мозга крысы при оптимальном сохранении структуры нервной ткани и ее тинкториальных свойств, что позволяет правильно ориентироваться в топографии среза и определять морфологические характеристики клеток, экспрессирующих нестин. Применение длительной инкубации в первичных антителах позволяет оптимизировать работу

исследователя, разделив технические операции на 2 этапа, выполняемые в различные дни.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д.Э. Использование моноклональных антител к ядерному белку PCNA для выявления пролиферирующих клеток в развивающемся головном мозге человека. *Морфология*, 2000, т. 118, вып. 5, с. 68–70.
2. 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.
3. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Гиляров А.В. и др. Нестин в клетках головного мозга крысы после кратковременной общей ишемии. В кн.: *Материалы XIII международного совещания и VI школы по эволюционной физиологии*. СПб., изд. РАН, 2006, с. 113.
4. Andressen C., Stocker E., Klinz F.-J. et al. Nestin-specific green fluorescent protein expression in embryonic stem cell-derived neural precursor cells used for transplantation. *Stem Cells*, 2001, v. 19, № 5, p. 419–424.
5. Dahlstrand J., Lardelli M. and Lendahl U. Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 1995, v. 84, № 1, p. 109–129.
6. Ernst C. and Christie B.R. Nestin-expressing cells and their relationship to mitotically active cells in the subventricular zones of the adult rat. *Eur. J. Neurosci.*, 2005, v. 22, № 12, p. 3059–3066.
7. He Z., Cui L., Meschia J.F. et al. Hippocampal progenitor cells express nestin following cerebral ischemia in rats. *Neuroreport*, 2005, v. 16, № 14, p. 1541–1544.
8. Naish S.J. *Immunochemical staining methods*. DAKO Corporation, 1989.
9. Wiese C., Rolletschek A., Kania G. et al. Nestin expression — a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol. Life Sci.*, 2004, v. 61, № 19–20, p. 2510–2522.

Поступила в редакцию 10.04.2006 г.

OPTIMIZATION OF THE METHOD FOR IMMUNOCYTOCHEMICAL DEMONSTRATION OF NESTIN IN PARAFFIN SECTIONS OF RAT BRAIN

D.E. Korzhevskiy and A.V. Gilyarov

The aim of this study was to develop an optimal and easy protocol for immunocytochemical demonstration of nestin (an intermediate filament protein which is believed to be a neuronal stem cell marker) in paraffin sections of rat brain with target retrieval procedure being omitted for better preservation of the neural tissue structure. The influence of fixation, character of blocking of nonspecific antibody binding, temperature and time of incubation on the results of immunocytochemical reaction was studied. On the basis of the results obtained, we propose a processing protocol allowing distinct demonstration of nestin in rat brain cells together with the optimal preservation of the nervous tissue structure.

Key words: *brain, nestin, rat, immunocytochemistry.*

Department of Morphology, RAMS Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg.