

*Коржевский Д. Э., Кирик О. В., Петрова Е. С., Сухорукова Е. Г.*

## **ИЗУЧЕНИЕ ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК В СТРУКТУРАХ РАЗВИВАЮЩЕЙСЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ**

*Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (зав. — д. м. н. Д. Э. Коржевский) Отдела общей и частной морфологии, НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, e-mail: iemmorphol@yandex.ru*

---

Изучение пролиферации клеток в процессе эмбрионального гистогенеза является фундаментальной проблемой современной эмбриологии. В последние годы на основе достижений молекулярной биологии, иммунологии и генетики был разработан ряд новых методик выявления пролиферативной активности, которые характеризуются определенными достоинствами и недостатками, не очевидными при изучении соответствующих научных работ и методических рекомендаций. В связи с актуальностью изучения пролиферативных процессов и необходимости адекватной оценки результатов применения современных методик цель настоящей работы состояла в характеристике наиболее часто применяемых пролиферативных маркеров, а также в оценке преимуществ и недостатков их использования при выявлении пролиферирующих клеток эмбрионального мозга.

Одним из важнейших современных методов изучения пролиферации клеток является использование модифицированного нуклеозида — 5-бром-2'-дезоксинуридина (BrdU) [7], включающегося во вновь синтезируемую ДНК при прохождении клеткой S-периода. Существуют и другие модифицированные нуклеозиды, которые применяют при изучении развития головного мозга [1].

После включения в молекулу ДНК, BrdU можно определять при помощи моноклональных и поликлональных антител. Этот метод обладает многими преимуществами радиоавтографии с  $^3\text{H}$ -тимидином. К недостаткам BrdU можно отнести его токсичность. Так как он является модифицированным нуклеозидом, ему свойственно сильное мутагенное действие [12], которое может проявляться в эмбриотоксичности и в тератогенных эффектах при использовании высоких дозировок препарата и постановке длительного эксперимента.

Существуют два способа введения BrdU: интраперитонеальный и пероральный (при добавлении его в питьевую воду). Вторым способом менее точен, поэтому при изучении пролиферации в эмбриогенезе желательнее вводить препарат беременным самкам интраперитонеально в дозировках 25–100 мг/кг. Препарат в зависимости от цели исследования вводят однократно либо многократно, но не позднее чем за 1 ч до взятия материала.

Выявление включенного в ДНК BrdU проводят иммуноцитохимически на парафиновых срезах. Результат, в отличие от автордиографических методов, может быть получен в течение одного дня. При иммуноцитохимическом выявлении BrdU необходимо проведение тепловой или кислотной денатурации ДНК перед инкубацией с первичными антителами.

В настоящей работе многократное введение BrdU беременным самкам крыс применяли с целью мечения максимального количества нейтральных стволовых/прогениторных клеток (НСПК) в дорсолатеральной стенке переднего мозгового пузыря (ПМП) эмбриона крысы. BrdU (Sigma) разводили в 0,01 М фосфатно-солевом буфере (рН = 7,4) в течение 15 мин при 60 °С. Препарат вводили внутрибрюшинно самкам крыс Вистар на 14-е и 15-е сутки беременности трижды в дозе 50 мг/кг: два раза с интервалом в 6 ч и 1 раз за час до фиксации эмбрионов. Иммуногистохимическую реакцию на BrdU проводили при помощи поликлональных козьих антител (Abscam, U.K.) (рис. 1).

Анализ препаратов показал, что мечеными оказалась бóльшая часть клеток вентрикулярной зоны ПМП. BrdU-иммунопозитивными были клетки, находящиеся в периоде S митотического цикла и располагающиеся в наружном слое вентрикулярной зоны. По-видимому, часть меченых клеточных элементов относилась к предшественникам, мигрирующим к месту локализации — формирующейся кортикальной пластинке.

Помимо меченых нуклеозидов, в качестве маркеров пролиферации может быть использован ряд белков, участвующих в регуляции клеточного цикла. Некоторые из этих белков экспрессируются в клетке только в определенную фазу цикла. В S-периоде экспрессируются белки, участвующие в метаболизме ДНК (репликации, репарации, рекомбинации). К таким белкам относится белок PCNA (proliferating cell nuclear antigen, или ядерный антиген пролиферирующих клеток). PCNA — консервативный белок массой 36 кДа, имеющийся у всех животных и растений. Он является вспомогательным белком для ДНК-

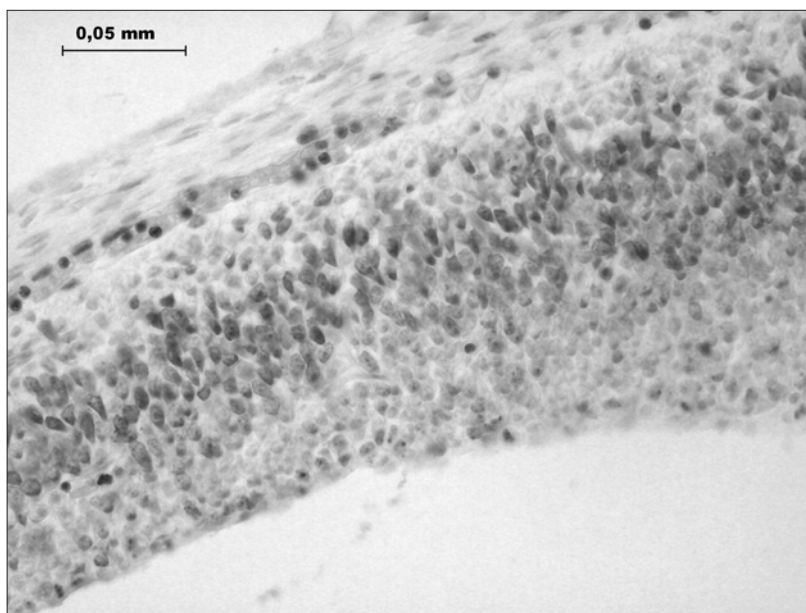


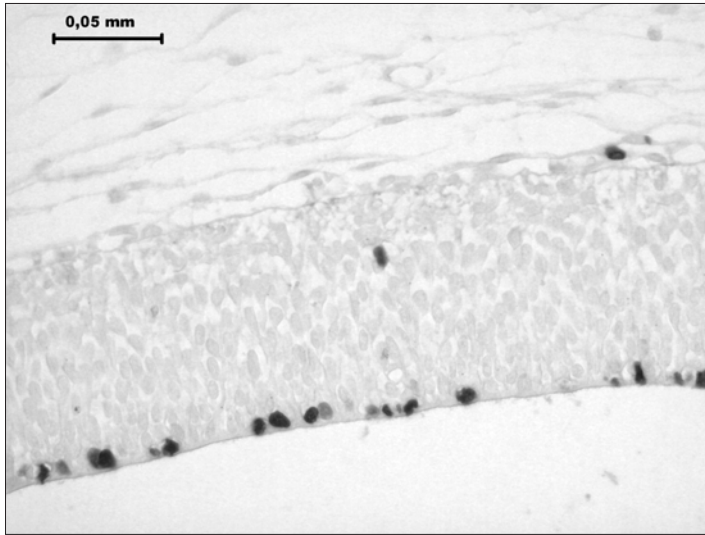
Рис. 1. Фрагмент стенки бокового желудочка (закладки неокортекса) эмбриона крысы на 15-е сутки развития. Иммуногистохимическая реакция на BrdU

полимераз  $\delta$  и  $\varepsilon$ , которые участвуют в репликативном синтезе отстающей цепи ДНК, синтезе фрагментов Оказаки, а также в эксцизионном репаративном синтезе ДНК [9]. В наибольшей концентрации PCNA обнаруживается в ядрах клеток, проходящих S-период интерфазы. Проведение иммуноцитохимической реакции на PCNA, как правило, не требует проведения протеолитической или тепловой демаскировки антигена, что позволяет получать препараты высокого качества [3,4]. Относительным недостатком PCNA является его достаточно медленный катаболизм после завершения S-периода. В связи с этим применение PCNA при изучении ранних стадий развития нервной системы ограничено, поскольку мечеными оказывается подавляющее большинство клеток эмбриональных закладок.

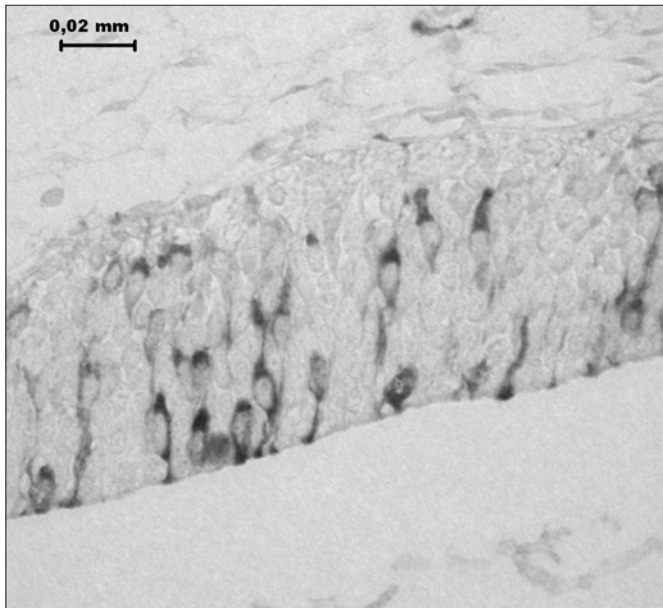
Один из наиболее часто используемых маркеров пролиферации — белок Ki-67. Он присутствует в ядрах клеток в периодах  $G_1$ , S,  $G_2$  и во время митоза [11]. После митоза при переходе клеток в период  $G_0$  белок Ki-67 быстро подвергается катаболизму и не обнаруживается в ядрах клеток [10]. Концентрация Ki-67 в ядре клетки нарастает от периода  $G_1$  до митоза, причем во время пресинтетического периода белок определяется преимущественно в ядрышках, а в постсинтетический период интенсивно окрашивается вся кариоплазма. Наиболее часто используемые клоны антител к белку Ki-67 — MIB-1 и MIB-5. Особенностью выявления антигена Ki-67 является необходимость проведения процедуры его теплового демаскирования. Наш опыт показывает, что Ki-67 является надежным маркером, но метит (как и PCNA) достаточно много клеток эмбриональных закладок, что затрудняет вычисление пролиферативных индексов.

Одним из недавно введенных в практику высокоспецифичных маркеров митотически делящихся клеток является фосфорилированный гистон H3 [8]. 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, тогда как фосфорилирование по серину в положении 28 происходит только в начале митоза [5]. При выходе клетки из митоза происходит дефосфорилирование гистона H3. В настоящей работе для выявления фосфорилированного гистона H3 применяли поликлональные кроличьи антитела (Absam, U.K.) (рис. 2). В результате проведения реакции происходит селективное выявление конденсированных хромосом в клетках, проходящих митоз. Полученные результаты позволяют считать этот маркер удобным для автоматизированного подсчета митотического индекса в закладках органов нервной системы.

Циклин-зависимые киназы (CDK) и их регуляторные субъединицы — циклины — являются основными регуляторами клеточного цикла. Наиболее часто в исследованиях пролиферации используют маркирование циклинов D1 и B1, что позволяет отдельно выявлять клетки, проходящие  $G_1$ - и  $G_2$ -период митотического цикла [6]. В настоящей работе проводили выявление циклина B1 (моноклональные антитела V152 — Dako), который обнаруживается в цитоплазме клеток, проходящих фазу  $G_2$  и митоз, исчезая во время анафазы (рис. 3).



*Рис. 2.* Фрагмент стенки бокового желудочка (закладки неокортекса) эмбриона крысы на 15-е сутки развития. Иммуноцитохимическая реакция на гистон H3



*Рис. 3.* Фрагмент стенки бокового желудочка головного мозга эмбриона крысы на 14-е сутки развития. Иммуноцитохимическая реакция на циклин B1

В заключение следует отметить, что при оценке пролиферативной активности клеток могут быть использованы и другие маркеры [2], число которых постоянно увеличивается по мере углубления наших знаний о механизмах регуляции клеточного цикла.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Васильев Д. С., Туманова Н. Л., Дубровская Н. М., Журавин И. А.* Нарушение пролиферации и миграции нейробластов в формирующемся мозге крыс после пренатальной гипоксии // XIV Международное совещание и VII школа по эволюционной физиологии. СПб.: ВВМ, 2011. С. 41–42.
2. *Кирик О. В., Безнин Г. И., Коржевский Д. Э.* Маркеры пролиферации, применяемые в гистологических исследованиях // *Морфология*. 2009. Т. 136. № 6. С. 95–100.
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. № 5. С. 68–70.
4. *Коржевский Д. Э.* Пролиферативные зоны в эпителии сосудистых сплетений головного мозга эмбриона человека // *Морфология*. 1999. Т. 115. № 3. С. 38–41.
5. *Eberlin A., Grauffel C., Oulad-Abdelghani M., Robert F., Torres-Padilla M. E., Lambrot R., Spehner D., Ponce-Perez L., Würtz J. M., Stote R. H., Kimmins S., Schultz P., Dejaegere A., Tora L.* 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.
6. *Gorczyca W., Sarode V., Juan G., Melamed M. R., Darzynkiewicz Z.* Laser scanning cytometric analysis of cyclin B1 in primary human malignancies // *Mol. Pathol.* 1997. V. 10. № 5. P. 457–462.
7. *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.
8. *Hirata A., Inada K., Tsukamoto T., Sakai H., Mizoshita T., Yanai T., Masegi T., Goto H., Inagaki M., Tatematsu M.* 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.
9. *Maga G., Villani G., Tillement V., Stucki M., Locatelli G. A., Frouin I., Spadari S., Hübscher U.* 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.
10. *McCormick D., Chong H., Hobbs C., Datta C., Hall P. A.* 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.
11. *Seigneurin D., Guillaud P.* Ki-67 antigen, a cell cycle and tumor growth marker // *Pathol. Biol.* 1991. V. 39. № 10. P. 1020–1028.
12. *Sutherland G. R.* The role of nucleotides in human fragile site expression // *Mutat. Res.* 1988. V. 200. № 1–2. P. 207–213.