

# МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2012  
УДК 611.018:578.63

*Е. Г. Сухорукова<sup>1</sup>, М. С. Захряпин<sup>2</sup>, Н. М. Аничков<sup>2</sup> и Д. Э. Коржевский<sup>1</sup>*

## ВЫЯВЛЕНИЕ МИКРОГЛИИ В ПРЕПАРАТАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА, ДЛИТЕЛЬНОЕ ВРЕМЯ ХРАНИВШИХСЯ В РАСТВОРЕ ФОРМАЛИНА

<sup>1</sup> Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (зав. — д-р мед. наук Д. Э. Коржевский), отдел общей и частной морфологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН; <sup>2</sup> кафедра патологической анатомии (зав. — чл.-кор. РАМН проф. Н. М. Аничков), ГБОУВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова», Санкт-Петербург

Предлагается достаточно простой протокол, позволяющий выявлять микроглиоциты в архивном материале. Новый вариант обработки препаратов основан на использовании поликлональных антител к белку Iba-1. Отличительными особенностями предлагаемого подхода являются проведение теплового демаскирования антигена в модифицированном цитратном буфере и продолжительная инкубация срезов с первичными антителами при повышенной температуре. Данный метод высокоспецифичен и позволяет селективно выявлять микроглиоциты в препаратах, полученных из материала, находившегося в растворе формалина в течение 2 мес.

**Ключевые слова:** микроглия, головной мозг, формалиновая фиксация, белок Iba-1

Изучение микроглии головного мозга — одно из актуальных направлений экспериментальной нейроморфологии [8], в рамках которого ожидается получение приоритетных данных о регуляции защитных реакций на уровне гематоэнцефалического барьера и о механизме реализации синаптической пластичности при воздействии неблагоприятных факторов [9]. В настоящее время разработан высокоспецифичный метод определения микроглии в парафиновых срезах головного мозга млекопитающих, основанный на использовании антител к микроглиальному белку Iba-1/AIF1 [1, 5, 7] после непродолжительной фиксации в цинк-этанол-формальдегиде [4]. Однако предложенный протокол не позволяет эффективно выявлять микроглиоциты в «перификсированном» и архивном материале, длительное время хранившемся в растворе формальдегида (так называемый влажный архив). Этот факт является препятствием для широкого внедрения данного метода окраски в патологоанатомических и судебно-гистологических исследованиях.

Цель настоящего исследования состояла в модификации предложенного ранее метода выяв-

ления микроглии [7] для использования при изучении головного мозга, находившегося в растворе нейтрального формалина свыше 2 мес.

Материалом для исследования служил головной мозг кроликов породы шиншилла (n=5) массой 1,5–2,5 кг. Фиксировали и хранили материал в нейтральном формалине (БиоВитрум, Россия) не менее 2 мес, обезвоживали и заливали в парафин по общепринятой методике. Для выявления микроглиоцитов использовали первичные поликлональные козы антигена к белку Iba-1 (AbCam, Великобритания).

Обработка препаратов по ранее опубликованному протоколу [7] не позволила выявить в исследуемом материале популяцию микроглиоцитов. При продленной инкубации в растворе хромогена начинала проявляться неспецифическая реакция содержимого кровеносных сосудов. На основании литературных данных и собственного опыта использования различных приемов, позволяющих увеличить чувствительность иммуноцитохимической реакции [2, 6], был разработан оптимальный протокол наиболее полного выявления Iba1-иммунопозитивных микроглиоцитов. Обработка

### Сведения об авторах:

*Сухорукова Елена Геннадиевна, Коржевский Дмитрий Эдуардович* (e-mail: iemorphol@yandex.ru), лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдел общей и частной морфологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, 197376 Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

*Захряпин Михаил Сергеевич, Аничков Николай Мильевич*, кафедра патологической анатомии, ГБОУВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова», 191015 Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41

препаратов по данному протоколу проводится в 2 рабочих дня, поскольку инкубация в первичных антителах продолжается в течение 12–14 ч.

В 1-й день обработки производятся следующие манипуляции.

1. Удаление из срезов парафина и их регидратация (обычным способом).

2. 5-минутная промывка в дистиллированной воде срезов и тепловое демаскирование антигенов в модифицированном цитратном буфере (рН 6,1, S1700—Dako, Дания). Эту обработку можно осуществить в бытовой пароварке [3] в сосуде Хелендахела в течение 25 мин или применить другие приборы — автоклав, скороварку, микроволновую печь, водяную баню — изменив сроки инкубации в растворе в зависимости от типа использованного прибора.

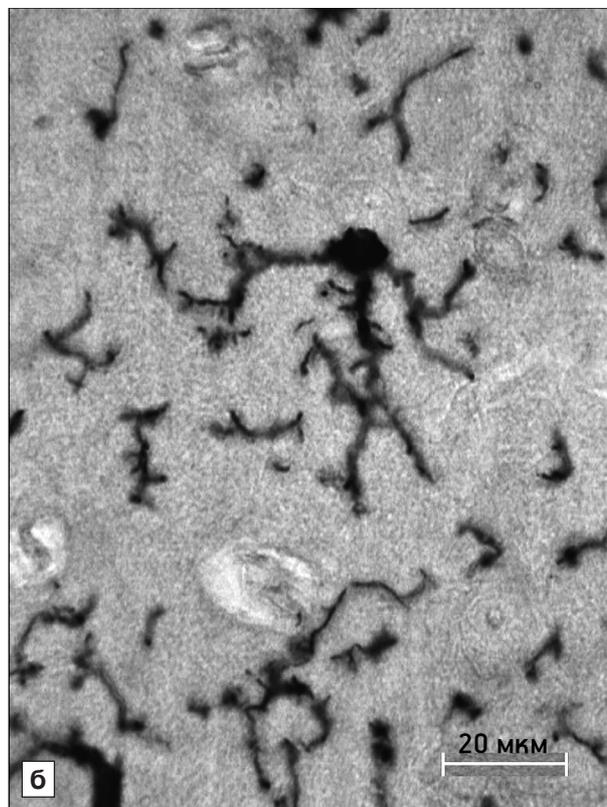
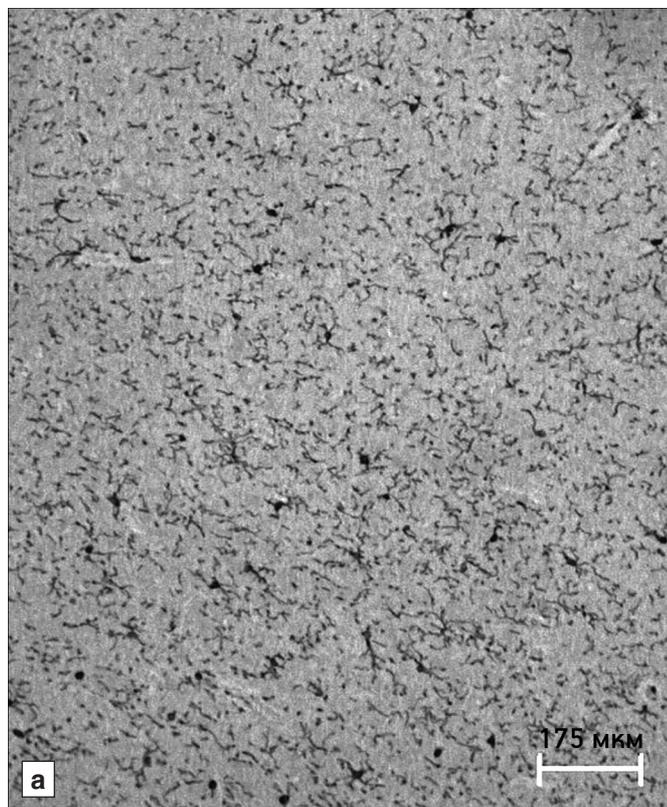
3. Охлаждение препаратов в остывающем буфере в течение 15–20 мин. Остывшие предметные стекла со срезами промыть дистиллированной водой для удаления остатков буфера и поместить в стаканчик с 3% перекисью водорода на 5–10 мин для блокировки эндогенной пероксидазы.

4. Удаление из срезов перекиси водорода путем промывки в дистиллированной воде, после чего предметные стекла перенести в 0,01М фосфатно-солевой буфер рН 7,4 (ФСБ) на 5–7 мин (на этом

этапе обработки и далее ФСБ может быть заменен 0,05М трис-солевым буфером, ТСБ, рН 7,6).

5. Создание гидрофобного барьера вокруг срезов для препятствия растеканию реагентов по всему предметному стеклу и уменьшения объема используемых в дальнейшем дорогостоящих реагентов. Для этого аккуратно промокнуть стекло вокруг срезов фильтровальной бумагой (для образования сухого поля) и обвести область расположения срезов гидрофобным фломастером (например, DakoPen, Liquid Blocker, PAP Pen и др.). Сразу после этого, не допуская подсыхания срезов, нанести на них необходимое количество (100–200 мкл) блокировочного раствора — 5% раствора бычьего сывороточного альбумина (BSA) на ФСБ и оставить при комнатной температуре на 10 мин.

6. Удаление излишка блокировочного раствора без промывки, нанесение на срезы необходимого количества поликлональных козьих антител к белку Iba-1 (разведение 1:200). После этого поместить стекла во «влажные камеры» (можно использовать любые пластиковые коробки с крышками, например чашки Петри, на дно которых положить влажную фильтровальную бумагу и стеклянные палочки) и оставить в термостате при 27 °С на 12–14 ч (на ночь).



Микроглия в коре большого мозга кролика.

а — общий вид; б — отдельный микроглиоцит с ветвящимися отростками.

Иммуноцитохимическая реакция на микроглиальный белок Iba-1 без докраски.

На этом завершается обработка препаратов в 1-й день, что занимает около 2–3 ч (в зависимости от числа одновременно обрабатываемых препаратов).

На следующий день обработка препаратов начинается с извлечения контейнеров из термостата. Далее необходимо:

1. Смыть антитела промывочным буфером (ФСБ или ТСБ) и поместить стекла в стаканчик с аналогичным буфером на 5–7 мин. Аккуратно промокнув фильтровальной бумагой стекло вокруг срезов, нанести на срезы необходимое количество вторичных антикозых биотинилированных антител (разведение 1:200) и поставить в термостат при 27 °С на 60 мин.

2. Смыть вторичные антитела промывочным буфером (ФСБ или ТСБ) и поместить стекла в стаканчик с ФСБ или ТСБ на 5–7 мин. Аккуратно промокнув фильтровальной бумагой стекло вокруг срезов, нанести на срезы необходимое количество стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой («Str/HRP» из наборов LSAB 2 или LSAB+ System-HRP, Dako, Дания, либо аналогичный реагент других производителей) и поставить в термостат при 27 °С на 30 мин.

3. Смыть конъюгат стрептавидина промывочным буфером (ФСБ или ТСБ) и поместить стекла в стаканчик с одним из этих буферов на 5–7 мин.

4. Аккуратно промокнув фильтровальной бумагой предметное стекло вокруг срезов, нанести необходимое количество рабочего раствора 3,3'-диаминобензидина (например, DAB 2-Component, Spring Bioscience, США или DAB+, Dako, Дания). В течение 1–3 мин происходит образование окрашенного продукта гистохимической реакции. Этот процесс желательно контролировать под микроскопом, чтобы остановить реакцию до появления неспецифического фона.

5. Смыть раствор хромогена и промыть препараты в 2–3 порциях дистиллированной воды по 3–5 мин в каждой.

6. При необходимости препараты можно докрасить гематоксилином (например, гематоксилином Джилла или Майера) в течение 0,5 мин с подсинением в щелочной воде (1 капля 10% аммиака на 100 мл дистиллированной воды).

7. Обезводить препараты в этаноле восходящей крепости, просветлить в ксилоле обычным образом и заключить в полистирол (пермаунт, DPX или другие подобные среды).

Во 2-й день время, затрачиваемое на завершение протокола, составляет около 3 ч.

В результате проведенной обработки на препаратах отчетливо определяются микроглиоциты в различных структурах головного мозга. Фоновая

реакция минимальна и не мешает проведению анализа препарата. Метод позволяет выявить тонкие отростки микроглиоцитов и анализировать характер их ветвления (рисунок). Постановка контрольных реакций на препаратах головного мозга человека, полученных в рамках плановой аутопсии для гистологического исследования и фиксированных в 10% растворе формалина, показала, что рекомендуемый методический подход может быть использован и с диагностической целью при анализе микроглиальной реакции в структурах головного мозга человека.

Таким образом, предлагаемый протокол позволяет селективно выявлять микроглию в препаратах головного мозга, длительное время находившихся в растворе формалина, и выполнять анализ структурной организации микроглиоцитов при проведении экспериментальных и клинических исследований.

*Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты 10-04-00180а, 10-04-00676а).*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кирик О. В., Сухорукова Е. Г. и Коржевский Д. Э. Кальций-связывающий белок Iba-1/AIF1 в клетках головного мозга крысы. *Морфология*, 2010, т. 136, вып. 2, с. 5–7.
2. Коржевский Д. Э. и Гиляров А. В. Оптимизация метода иммуногистохимического выявления нестина для парафиновых срезов головного мозга крысы. *Морфология*, 2006, т. 130, вып. 6, с. 78–80.
3. Коржевский Д. Э. и Гиляров А. В. Основы гистологической техники. СПб., СпецЛит, 2010.
4. Коржевский Д. Э., Григорьев И. П. и Отеллин В. А. Применение фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрогистологических исследованиях. *Морфология*, 2006, т. 129, вып. 1, с. 85–86.
5. Коржевский Д. Э., Кирик О. В., Сухорукова Е. Г. и Власов Т. Д. Структурная организация микроглиоцитов стриатума после транзиторной фокальной ишемии. *Морфология*, 2012, т. 141, вып. 2, с. 28–32.
6. Коржевский Д. Э. и Юмкина Е. А. Применение методов теплового демаскирования антигенов на парафиновых срезах головного мозга крысы. *Морфология*, 2005, т. 127, вып. 2, с. 76–77.
7. Сухорукова Е. Г., Кирик О. В. и Коржевский Д. Э. Применение иммуногистохимического метода для выявления микроглии головного мозга в парафиновых срезах. *Бюл. экспер. биол.*, 2010, т. 149, № 6, с. 709–712.
8. Park J. S., Shin J. A., Jung J. S. et al. Anti-inflammatory mechanism of compound k in activated microglia and its neuroprotective effect on experimental stroke in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2012, v. 341, № 1, p. 59–67.
9. Wake H., Moorhouse A. J., Jinno S. et al. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J. Neurosci.*, 2009, v. 29, № 13, p. 3974–3980.

Поступила в редакцию 15.05.2012

## MICROGLIA DETECTION IN THE BRAIN PREPARATIONS AFTER LONG-TERM STORAGE IN FORMALIN

*Ye. G. Sukhorukova, M. S. Zakhryapin, N. M. Anichkov and D. E. Korzhevskiy*

Relatively simple protocol for identification of microgliaocytes in archived material is proposed. A novel variant is based on preparation processing with the use of polyclonal antibodies against Iba-1 protein. The proposed approach includes antigen heat unmasking in a modified citrate buffer and prolonged

incubation of the sections with the primary antibodies at high temperature. The method is highly specific and allows selective detection of microgliaocytes in sections prepared from a material stored in formalin for 2 months.

**Key words:** *formalin fixation, microglia, Iba-1 protein*

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; Department of Pathological Anatomy, I. I. Mechnikov North-Western State Medical University St. Petersburg

© В. М. Черток, М. С. Старцева, А. Е. Коцюба, 2012  
УДК 578.087.9

*В. М. Черток, М. С. Старцева и А. Е. Коцюба*

## ПРИМЕНЕНИЕ ПИКСЕЛЬНОГО МЕТОДА В КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ГИСТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Кафедра анатомии человека (зав. — проф. В. М. Черток), кафедра физики и математики (зав. — доц. С.Э. Ширмовский), Владивостокский государственный медицинский университет

Приведены результаты, полученные при использовании «пиксельного метода» для автоматизированного измерения интенсивности гистохимической реакции в нейронах. В основе метода лежит принцип измерений, который заключается в автоматическом подсчете с помощью стандартных компьютерных программ суммы яркостей всех пикселей, образующих данное изображение. Возможности этого метода продемонстрированы на примере изучения активности NADPH-диафоразы в нитроксидергических нейронах чувствительных и двигательных ядер продолговатого мозга крысы.

**Ключевые слова:** *количественная гистохимия, пиксельный метод, нитроксидергические нейроны*

Критерием в оценке результатов гистохимической реакции в структурных компонентах клеток является не только локализация, но и количественное содержание химических веществ [3, 5]. Для получения соответствующей информации чаще всего используется метод измерения оптической плотности продукта гистохимической реакции в клетках одно- или двухлучевыми микроспектрофотометрами, денситометрами и т.д. Несмотря на некоторые конструктивные особенности каждого из указанных аппаратов, их объединяет общий принцип измерений, напрямую вытекающий из закона Ламберта – Бера. Согласно этому закону, слои гомогенной поглощающей среды равной толщины поглощают равное количество света.

С помощью микроспектрофотометров исследуют пропускание и поглощение света веществом, связанным с красителем [1, 6]. После вычисления этих параметров определяют концентрацию связанного красителя, а следовательно, и количество исследуемого вещества. Однако необходимость многократных измерений, наличие многочисленных, зачастую трудновыполнимых условий для получения объективных данных, большие затраты времени при проведении таких исследований усложняют использование этого метода в решении научных задач [1, 3]. Определенный прогресс намечился с введением в практику научных исследований автоматизированной аппаратуры, позволяющей быстро и точно определять многие

### Сведения об авторах:

*Черток Виктор Михайлович* (e-mail: chertokv@mail.ru), *Коцюба Александр Евгеньевич* (e-mail: akotc@mail.ru), кафедра анатомии человека; *Старцева Марина Сергеевна* (e-mail: startsevams@mail.ru), кафедра физики и математики, Владивостокский государственный медицинский университет, 690990 Владивосток, пр. Острякова, 2