

Д. Э. Коржевский, Е. Г. Сухорукова, Е. С. Петрова, А. Ф. Цуканова и Е. И. Чумасов

ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ НА БЕЛОК PGP 9.5 ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИННЕРВАЦИИ СЕРДЦА КРЫСЫ И ЧЕЛОВЕКА

Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (руков. — д-р мед. наук Д. Э. Коржевский), отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН; Бюро судебно-медицинской экспертизы (нач. — проф. Г. П. Лаврентюк), Санкт-Петербург

Описан современный иммуногистохимический метод выявления нейронального маркера белка PGP 9.5. Продemonстрировано его применение для изучения иннервации сердца человека и крысы, уточнения топографии нервных аппаратов, а также их изменений при патологических состояниях. Структурная организация и характер терминальных ветвлений выявляемых нервных аппаратов свидетельствуют об их принадлежности к афферентному звену. В статье приведен протокол реакции для выявления PGP 9.5 на парафиновых срезах.

Ключевые слова: белок PGP 9.5, иннервация, сердце

Для изучения иннервации внутренних органов, вплоть до 80-х годов, широко использовали известные классические нейрогистологические методы импрегнции нитратом серебра по Бильшовскому—Грос, Бодиану, а также суправителю окраску метиленовым синим. Кроме того, с 70-х годов прошлого века в нейроморфологии нашли применение гистохимические методы, использовавшиеся для выявления катехоламинов по Фальку—Хилларпу, включая обработку тканей глиоксальной кислотой с целью выявления вегетативных нервных волокон в сочетании с флюоресцентной микроскопией, а также реакции на моноаминоксидазу Гленнера и ацетилхолинэстеразу Колле—Фриденвальда. Эти методы продолжают использоваться и до настоящего времени при изучении сердечно-сосудистой системы в норме и при патологии, хотя и имеют ряд недостатков. Например, не все нервные проводники и нейроны различной медиаторной принадлежности можно выявить с помощью перечисленных методов. По методу Фалька, используемого для изучения нейронов симпатических ганглиев и хромаффинных клеток параганглиев, из-за сильной флюоресценции катехоламинов и высокой плотности нейронов в макро- и микроганглиях и хромаффинных клеток параганглиев, а также клеток

мозгового вещества надпочечников не всегда удается определить строение выявляемых клеток, затруднительно проводить и морфометрический анализ.

Учитывая важность проблем изучения механизмов нейротрофики, иннервации и функционирования внутренних органов, все большее предпочтение уделяется, наряду с классическими, более точным, прецизионным методам, которые все чаще находят применение в экспериментальных и диагностических исследованиях. К таким иммуногистохимическим методам следует отнести реакции на нейрофиламенты, периферин, синаптофизин, тирозингидроксилазу и некоторые другие. Предварительные результаты, полученные в лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Института экспериментальной медицины, показывают, что эти иммуногистохимические методы обладают высокой чувствительностью и селективностью [3, 8]. Одним из таких маркеров структур периферической нервной системы (ПНС) является белок PGP 9.5, который имеет и другое название — убиквитин-С-терминальная гидролаза L1. Этот белок был выделен из мозга человека более тридцати лет назад [11]. Показано, что он содержится преимущественно в цитоплазме ней-

Сведения об авторах:

Коржевский Дмитрий Эдуардович (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), *Сухорукова Елена Геннадьевна* (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), *Петрова Елена Сергеевна* (iemmorphol@yandex.ru), *Чумасов Евгений Иванович* (iemmorphol@yandex.ru), лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

Цуканова Алла Федоровна, гистологическое отделение, Бюро судебно-медицинской экспертизы, 195067, Санкт-Петербург, Екатерининский пр., 10

ронов ЦНС и ПНС, а также в нейроэндокринных клетках, и может быть использован в качестве их маркера [16]. Несмотря на то, что функция PGP 9.5 в нервной системе не ясна, он применяется при исследованиях иннервации различных органов: пищеварительного тракта, сердца, плевры, легких, кожи, простаты как взрослых организмов, так и эмбрионов [9, 10, 12–15].

Целью настоящего исследования явились изучение целесообразности применения PGP 9.5 в качестве маркера нервных аппаратов сердца крысы и человека и разработка оптимального протокола для выявления этого белка на парафиновых срезах.

В работе использовали крыс линии Вистар ($n=10$) и аутопсийный материал, полученный в Бюро судебно-медицинской экспертизы Санкт-Петербурга ($n=8$). Аутопсийный материал был фиксирован в 10% растворе формалина, а материал, полученный от животных, — в цинк-этанол-формальдегиде [2]. Гистологический анализ проводили на парафиновых срезах толщиной 5–7 и 15–30 мкм. После применения разных режимов был выбран оптимальный по трудозатратам и качеству реакции протокол иммуногистохимической реакции для выявления PGP 9.5:

1. Удалить парафин и регидратировать срезы обычным способом.

2. После 5-минутной промывки в дистиллированной воде предметные стекла со срезами поместить в стакан с 3% перекисью водорода на 5–10 мин для блокировки эндогенной пероксидазы.

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

4. Промокнув фильтровальной бумагой предметное стекло вокруг срезов (должно образоваться сухое поле), обвести срезы гидрофобным фломастером (например DakoPen). Нанести на срезы необходимое для покрытия их количество блокировочного раствора 5% бычьего сывороточного альбумина (фракция V по Кону) на ФСБ и оставить при комнатной температуре на 10 мин.

5. Слить излишек блокировочного раствора (без промывки) и, не промокая препараты, нанести на них необходимое количество первичных кроличьих поликлональных антител к PGP 9.5 (Spring Bioscience, США) (в разведении 1:400). Поместить предметные стекла во «влажную камеру» (для этого можно использовать любые пластиковые коробки с крышками, на дно которых положены мокрая фильтровальная бумага и стеклянные палочки) и поставить в термостат при 40 °C на 60 мин.

6. Смыть антитела ФСБ и затем препарат поместить в тот же буфер на 5–10 мин. Аккуратно промокнув фильтровальной бумагой предметное стекло вокруг срезов, нанести необходимое количество вторичных антител (реагент «PolyHRP Reagent» из набора Super Sensitive Polymer-HRP Detection System BioGenex, США или реагент «HRP Conjugate» из набора Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System, Spring BioGenex, США) и оставить на 35 мин при комнатной температуре.

7. Смыть антитела ФСБ, и затем препарат поместить в тот же буфер на 5–10 мин.

8. Аккуратно промокнув фильтровальной бумагой стекло вокруг срезов, нанести необходимое количество рабочего раствора хромогена DAB+ (Dako, Дания). На этом этапе происходит образование окрашенного продукта гистохимической реакции. Процесс необходимо контролировать под микроскопом, чтобы остановить реакцию до появления неспецифической фоновой окраски.

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

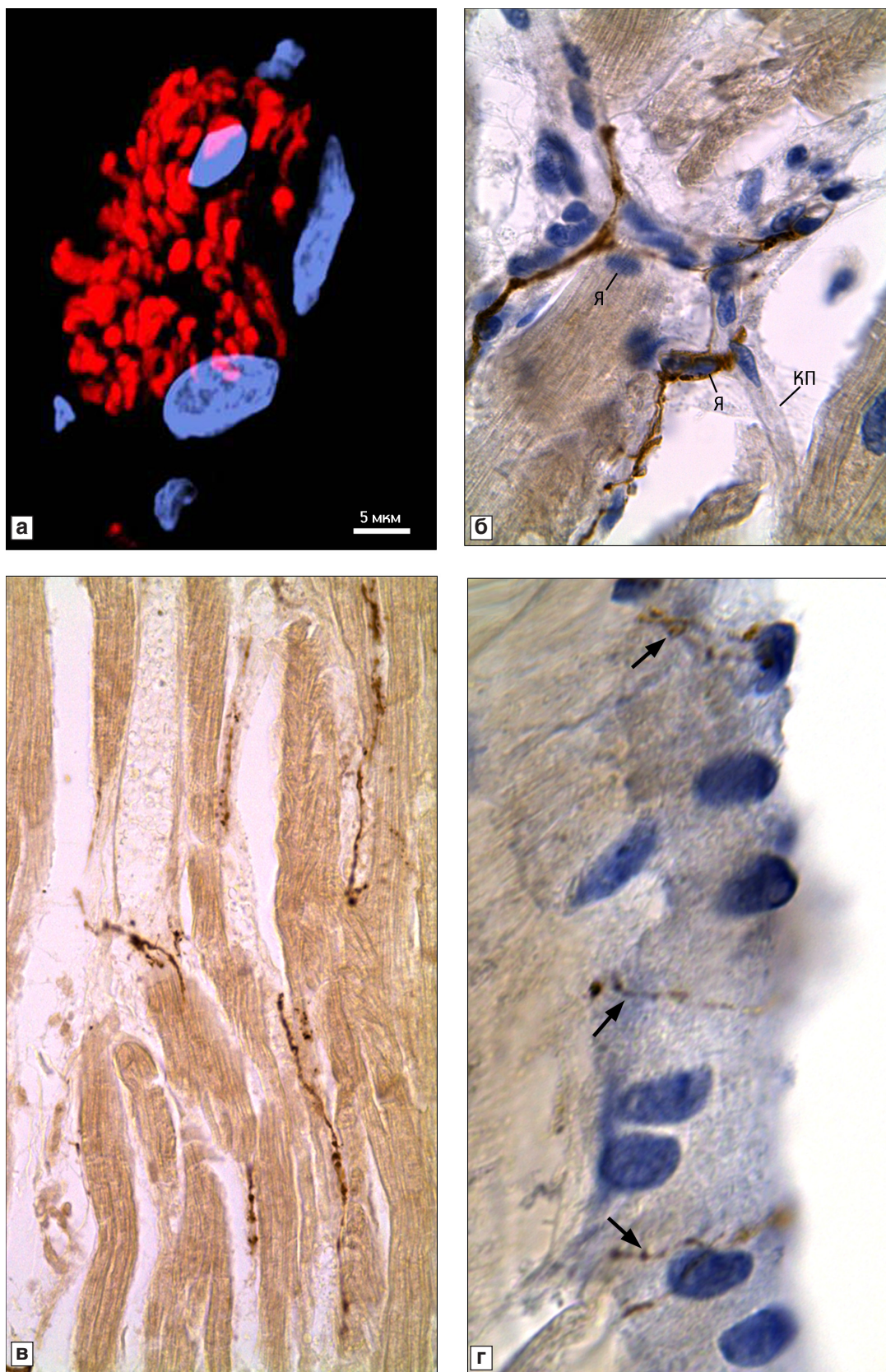
10. Докрасить срезы раствором гематоксилина Джилла в течение 0,5 мин, смыть краситель дистиллированной водой и поместить в подщелоченную или водопроводную воду.

11. Обезводить препараты в 96% и абсолютном этаноле (вместо абсолютного этанола можно использовать абсолютированный 99% изопропанол), просветлить в ксилоле обычным способом и заключить в бальзам, полистирол, пермаунт, DPX или другие подобные среды.

Параллельно с постановкой реакций по этому протоколу проводили выявление PGP 9.5 на аналогичных препаратах при помощи вторичных антикроличьих меченных тетраметилпродамин-изотиоцианатом с докраской ядер клеток красителем Hoechst 33342, которые исследовали в конфокальном микроскопе LSM 510 Meta (Zeiss, Германия).

Данный протокол отличается от предлагавшихся ранее вариантов обработки гистологических срезов антителами к белку PGP 9.5 тем, что инкубация в первичных антителах производится при высокой температуре (при 40 °C). Ранее такой подход не применялся. Это позволяет сократить время обработки материала. Кроме того, данный протокол пригоден для выявления антигена на парафиновых срезах тканей и органов как лабораторных животных, так и человека.

Анализ препаратов сердца крысы и человека показал, что PGP 9.5-иммунопозитивных нервных волокон (ИПНВ) выявляются во всех оболочках



Протеин-ген продукт 9.5 (PGP)-иммунопозитивные нервные элементы в стенке сердца человека.

а — поперечный срез нервного пучка, иммунопозитивные нервные волокна (ИПНВ) (красные), ядра нейролеммоцитов (синие); б — фрагмент нервного сплетения в центральной зоне миокарда человека; в — элементы нервного сплетения во внутренней части миокарда человека (на границе с эндокардом); г — взаимоотношения терминалей ИПНВ и эндотелия венозного сосуда миокарда человека. Стрелки — ИПНВ; Я — ядра нейролеммоцитов; КП — капилляр. а — конфокальная лазерная микроскопия с докраской Hoechst 33342; б, в, г — иммуногистохимическая реакция на PGP 9.5 с докраской гематоксилином. Ув.: б, в — 400; г — 1000

стенки желудочка сердца. Наиболее иннервирована центральная часть миокарда. В ней выявляются как мелкие пучки, так и густая сеть ИПНВ (рисунков, а, б).

Она представлена проводниками толщиной от 1,5 до 2 мкм, которые имеют, как правило, то же направление, что и волокна миокарда. ИПНВ дихотомически делятся, и их истонченные веточки заканчиваются различной формы нервными окончаниями, располагающимися в эндомизии вблизи кардиомиоцитов (см. рисунок, в). Иногда концевые структуры встречаются также по ходу некоторых нервных проводников. Важно отметить, что претерминальные и концевые отделы нервных волокон часто сопровождаются нейролеммоцитами (см. рисунок, б). Среди нервных окончаний встречаются иногда клетки с округлыми ядрами, похожими на ядра глиальных вспомогательных клеток, характерных для рецепторных структур. В некоторых местах удалось выявить также ИПНВ, тесно связанные с эндотелием капилляров и вен (см. рисунок, г).

Кроме описанного выше сплетения, на границе миокарда и эндокарда нами выявлено второе менее выраженное сплетение. Его ИПНВ направляются в эндокард, где они разветвляются, образуя в соединительной ткани широкопетлистое сплетение, некоторые его веточки заканчиваются терминальными структурами вблизи эндотелия.

Таким образом, результаты настоящей работы показывают, что использованный иммуногистохимический метод является адекватным и перспективным для решения ряда специальных задач и вопросов углубленного изучения нормального строения нервных аппаратов сердца, уточнения их топографии, а также изменений при патологических состояниях. Структурная организация и характер терминальных ветвлений выявляемых нервных аппаратов свидетельствуют об их принадлежности к афферентному звену.

ЛИТЕРАТУРА

- Говырин В. А. и Леонтьева Г. Р. Медиаторные механизмы регуляции кровеносных сосудов. В кн.: Физиология кровообращения. Регуляция кровообращения. Л., Наука, 1985, с. 154–185.
- Коржевский Д. Э., Григорьев И. П. и Отеллин В. А. Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрористологических исследованиях. Морфология, 2006, т. 129, вып. 1, с. 85–86.
- Коржевский Д. Э., Кирик О. В., Карпенко М. Н. и др. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии: руководство. СПб., СпецЛит, 2012.
- Новиков И. И. Нервы и сосуды: онтогенез и восстановление нейрорегуляторной системы. Минск, Наука и техника, 1990.
- Ноздрачев А. Д. и Чумасов Е. И. Периферическая нервная система. СПб., Наука, 1999.
- Швалев В. Н., Сосунов А. А. и Гуски Г. Морфологические основы иннервации сердца. М., Наука, 1992.
- Хабарова А. Я. Иннервация сердца и кровеносных сосудов. Л., Наука, 1975.
- Чумасов Е. И., Петрова Е. С. и Коржевский Д. Э. Иммуногистохимическое исследование иннервации сердца крысы. Морфология, 2009, т. 135, вып. 2, с. 33–37.
- Anlauf M., Martin K.-H., Lee E. and Eberhard W. Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes. J. Comp. Neurol., 2003, v. 459, № 1, p. 90–111.
- Gulbenkian S., Wharton J. and Polak J. M. The visualisation of cardiovascular innervation in the guinea pig using an antiserum to protein gene product 9.5 (PGP 9.5). J. Auton. Nerv. Syst., 1987, v. 18, № 3, p. 235–247.
- Jackson P. and Thompson R. J. The demonstration of new human brain-specific proteins by high-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. J. Neurol. Sci., 1981, v. 49, № 3, p. 429–438.
- Jen P. Y. and Dixon J. S. Development of peptide-containing nerves in the human fetal prostate gland. J. Anat., 1995, v. 187, № 1, p. 169–179.
- Pilmane M., Ozoliņa L., Abola Z. et al. Growth factors, their receptors, neuropeptide-containing innervation, and matrix metalloproteinases in the proximal and distal ends of the esophagus in children with esophageal atresia. Medicina (Kaunas), 2011, v. 47, № 8, p. 453–460.
- Pintelon I., Brouns I., Proost I. et al. Sensory receptors in the visceral pleura: neurochemical coding and live staining in whole mounts. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 2007, v. 36, № 5, p. 541–551.
- Tollet J., Everett A. W. and Sparrow M. P. Spatial and temporal distribution of nerves, ganglia, and smooth muscle during the early pseudoglandular stage of fetal mouse lung development. Dev. Dyn., 2001, v. 221, № 1, p. 48–60.
- Wilkinson K. D., Lee K. M., Deshpande S. et al. The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. Science, 1989, v. 246, № 4930, p. 670–673.

Поступила в редакцию 19.11.2012

APPLICATION OF THE IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF PGP 9.5 PROTEIN FOR THE STUDY OF RAT AND HUMAN HEART INNERVATION

D. E. Korzevskiy, Ye. G. Sukhorukova, Ye. S. Petrova, A. F. Tzukanova and Ye. I. Chumasov

In this paper we describe the modern immunohistochemical method detecting the neuronal marker PGP 9.5. The application of this method for the study of the innervation of rat and human heart, the detailed examination of the topography of the cardiac nervous apparatus, as well as their changes in pathological states, is demonstrated. Structural organization and the nature of the terminal branches of nerve apparatus suggest that they have afferent function. Protocol of the reaction demonstrating PGP 9.5 on paraffin sections is presented.

Key words: PGP 9.5, innervation, heart

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; Bureau of Forensic Medicine, St. Petersburg