

Д.Э.Коржевский, И.П.Григорьев, О.В.Кирик, Н.М.Зеленкова и Е.Г.Сухорукова

МЕТОД ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ХОЛИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

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

Представлен протокол иммуноцитохимического выявления холинацетилтрансферазы (ХАТ) — ключевого фермента синтеза ацетилхолина — на парафиновых срезах головного мозга лабораторных животных. Метод прост, даёт хорошо воспроизводимые результаты и позволяет выявлять ХАТ на препаратах в нейронах, волокнах и терминалях в мозгу, по крайней мере, трёх видов лабораторных животных: крысы, кролика, кошки. Для иммуноцитохимического выявления ХАТ были пригодны различные виды фиксации — 10% формалин, 4% параформальдегид и цинк-этанол-формальдегид, но оптимальные результаты были получены при использовании цинк-этанол-формальдегида.

Ключевые слова: ЦНС, холинергические нейроны, холинацетилтрансфераза, иммуноцитохимия

Ацетилхолин является важнейшим классическим нейромедиатором центральных и периферических нейронов у млекопитающих, участвующим в передаче информации. Установлено, что он играет существенную роль в обеспечении многообразных функций нервной системы, таких как сон, память, обучение, внимание [5, 6]. Патологические изменения центральной холинергической системы отмечены у человека при развитии болезни Альцгеймера [3], моделирование которой является актуальной задачей экспериментальной медицины. Поэтому важно иметь достаточно простой и хорошо воспроизводимый нейрогистологический метод, позволяющий выявлять клетки, синтезирующие ацетилхолин и анализировать состояние холинергических нейронов у лабораторных животных при моделировании нейродегенеративных заболеваний и проведении нейрофизиологических экспериментов. К сожалению, несмотря на обилие методических подходов, использовавшихся ранее при изучении холинергических структур, до настоящего времени отсутствует унифицированный протокол обработки материала, который бы позволял получать сопоставимые результаты при иммуноцитохимическом выявлении холинергических нейронов ЦНС у разных видов экспериментальных животных.

В связи с этим цель настоящего исследования состояла в селекции оптимальных методических подходов, унификации и упрощении протоколов обработки материала, предназначенного для выявления холинергических нейронов у трех видов млекопитающих, которые наиболее часто используются при проведении нейроморфологических и нейрофизиологических исследований.

На основании скрининга существующих способов визуализации холинергических нейронов головного мозга млекопитающих, был выбран метод иммуноцитохимического определения холинацетилтрансферазы (ХАТ) — ключевого фермента синтеза ацетилхолина, который содержится в цитоплазме перикарионов и отростков холинергических нейронов. Поскольку в настоящее время существуют большое число доступных антител к ХАТ, для отработки и оптимизации метода были использованы 3 варианта, которые по информации производителей должны были обеспечить выявление фермента у различных млекопитающих (два варианта поликлональных кроличьих антител — ab68779, Abcam, UK; AB143 Millipore Chemicals, США и поликлональные козы антитела AB144 Millipore Chemicals, США). В качестве материала для исследования были использованы срезы головного мозга взрослых

Сведения об авторах:

Коржевский Дмитрий Эдуардович (e-mail: dek@yandex.ru), *Григорьев Игорь Павлович* (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), *Кирик Ольга Викторовна* (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), *Зеленкова Нина Михайловна* (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), *Сухорукова Елена Геннадьевна* (e-mail: len48@inbox.ru), 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

животных из архива лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Института экспериментальной медицины — крыс линии Вистар ($n=5$), кроликов ($n=3$), кошек ($n=3$). Для фиксации материала был использован 10% формалин (кролик, $n=2$), 4% параформальдегид (кошка, $n=3$) и цинк-этанол-формальдегид (кролик, $n=1$; крыса, $n=5$). При отработке методики были использованы разные режимы демаскирования антигенов [1] и различные вторичные реагенты. В результате подбора оптимальных условий обработки материала, которые могли бы обеспечить удовлетворительную сохранность структуры нервной ткани и хорошее качество иммуноцитохимической визуализации холинергических нейронов, было установлено, что не все выбранные антитела удовлетворяют требованиям, поставленным целью настоящего исследования. Только одни из трех антител (AB144) оказались пригодными для разработки достаточно простого протокола, позволившего получить хорошо воспроизводимые результаты на парафиновых срезах головного мозга у трех видов млекопитающих после применения всех использовавшихся способов фиксации материала.

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

В 1-й день необходимо произвести следующие манипуляции.

1. Удалить из срезов парафин и регидратировать их обычным способом.

2. Промыть срезы в дистиллированной воде в течение 5 мин.

3. Поместить стекла со срезами в стеклянный сосуд (удобно использовать сосуды Хелендахела или Коплина) с демаскирующим раствором (Биовитрум, Россия) либо модифицированным цитратным буфером (pH 6,1 S1700 — Dako, Дания) и подвергнуть процедуре теплового демаскирования антигенов в бытовой пароварке (TEFAL, Франция или в любой другой с вертикальным размером паровой камеры 8–10 см) в течение 25 мин.

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

5. Удалить из срезов перекись водорода путем промывки в дистиллированной воде, после чего предметные стекла перенести в 0,01 М фосфатно-

солевой буфер pH 7,4 (ФСБ) на 5–7 мин. Удобно готовить раствор из таблетированной формы буфера (Биолот, Россия).

6. Аккуратно промокнуть стекло вокруг срезов фильтровальной бумагой (для образования сухого поля) и обвести область расположения срезов гидрофобным фломастером (DakoPen). Сразу после этого, не допуская подсыхания срезов, нанести на них необходимое количество (100–200 мкл) блокировочного раствора — 5% раствора бычьего сывороточного альбумина (BSA, номер по каталогу A2153-10G, Sigma-Aldrich, США), разведенного на ФСБ, или готового блокировочного раствора (Protein Block, Spring Bioscience, США) и оставить при комнатной температуре на 10 мин.

7. Удалить излишек блокировочного раствора без промывки и нанести на срезы необходимое количество поликлональных козьих антител к холинацетилтрансферазе (разведение 1:200, номер по каталогу AB144, Millipore Chemicals, США). После этого поместить стекла во «влажные камеры» для предотвращения испарения реагентов и подсыхания срезов — можно использовать любые пластиковые контейнеры с крышками, например чашки Петри 100×100×20 мм (номер по каталогу 82.9923.422, Sarstedt, Австралия), на дно которых положить влажную фильтровальную бумагу, стеклянные палочки и оставить в термостате при 27 °C на 12–14 ч (на ночь).

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 обработку препаратов начинать с извлечения контейнеров из термостата. Далее необходимо:

1. Смыть антитела промывочным буфером (ФСБ) и поместить стекла в стаканчик с аналогичным буфером на 5–7 мин.

2. Аккуратно промокнув фильтровальной бумагой стекло вокруг срезов, нанести на срезы необходимое количество вторичных антикозых биотинилированных антител (разведение 1:200, номер по каталогу E 0466, Dako, Дания) и поставить в термостат при 27 °C на 60 мин.

3. Смыть вторичные антитела промывочным буфером (ФСБ) и поместить стекла в стаканчик с ФСБ на 5–7 мин.

4. Промокнув фильтровальной бумагой стекло вокруг срезов, нанести на срезы необходимое количество стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой (реагент Str/HRP из наборов LSAB 2 или LSAB+ System-HRP, Dako Дания, либо аналогичный реагент других производителей) и поставить в термостат при 27 °C на 30 мин.

5. Смыть конъюгат стрептавидина промывочным буфером (ФСБ) и поместить стекла в стаканчик с ФСБ на 5–7 мин.

6. Аккуратно промокнув фильтровальной бумагой предметное стекло вокруг срезов, нанести необходимое количество рабочего раствора 3,3'-диаминобензидина (готовится из набора DAB+, Дако, Дания и аналогичных). В течение 1–3 мин происходит образование окрашенного продукта гистохимической реакции. Этот процесс желательно контролировать под микроскопом, чтобы остановить реакцию до появления неспецифического фона.

7. Смыть раствор хромогена 3% раствором перекиси водорода и промыть препараты в 2–3 порциях дистиллированной воды по 5 мин в каждой.

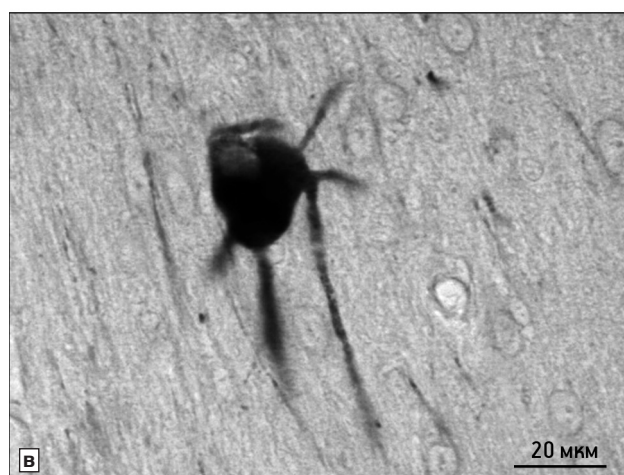
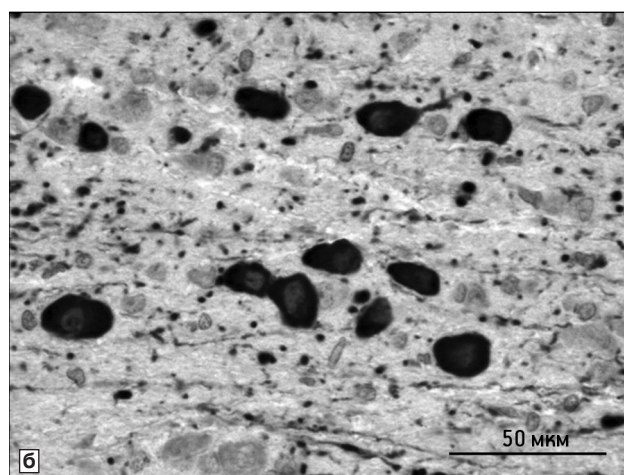
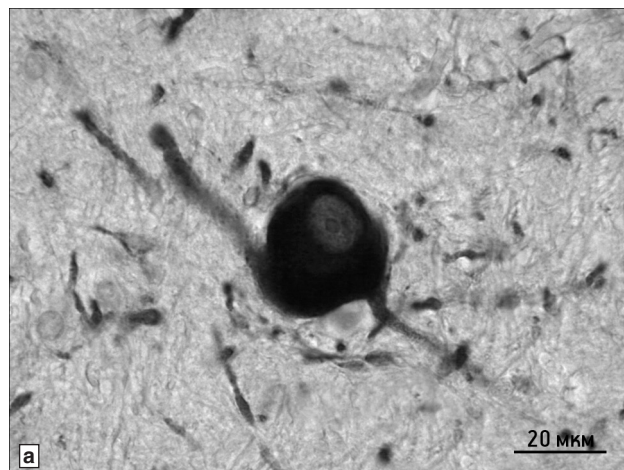
8. При необходимости препараты можно докрасить гематоксилином (например гематоксилином Джилла или Майера) в течение 1–5 мин с подсинением в щелочной воде (1 капля 10% аммиака на 100 мл дистиллированной воды).

9. 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 работы по представленному протоколу, составляет около 3 ч.

В результате проведенной обработки на препаратах отчетливо определяются холинергические нейроны (рисунк) и их терминали в различных структурах головного мозга. Фоновая реакция незначительна.

На препаратах головного мозга исследованных животных ХАТ выявляется в различных структурах в виде хорошо окрашенных нервных клеток, их отростков, попавших в плоскость среза, а также нервных проводников, которые нередко можно наблюдать на довольно большом протяжении как сплошные или пунктирные линии. Тёмно-коричневая окраска микроструктур отчетливо выделяется на фоне нервной ткани как без окраски гематоксилином, так и после неё. Чёткообразная структура ХАТ-иммунореактивных волокон свидетельствует о наличии варикозностей на холинергическом волокне, что согласуется с данными других исследователей [4] и, по-видимому, связано с несинаптическим выделением ацетилхолина, подобно тому как это показано для катехоламинергических волокон [2]. Хотя все использованные способы фиксации материала оказались пригодными для выявления холинергических нейронов у исследованных млекопитающих, фиксация в цинк-этанол-формальдегиде способствовала



Холинергические нейроны головного мозга кролика (а), крысы (б) и кошки (в).

а — область скорлупы; б, в — область перегородки. Иммуногистохимическая реакция на холинацетилтрансферазу с докраской гематоксилином (а, б) и без докраски (в)

более яркому окрашиванию тонких холинергических волокон нейропиля.

Таким образом, представленный протокол обработки препаратов действительно позволяет добиться высокого качества окраски холинерги-

ческих структур и отличается универсальностью, поскольку допускает применение одних и тех же условий инкубации при использовании парафиновых срезов мозга различных млекопитающих.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д.Э. и Юмкина Е.А. Применение методов демаскирования антигенов на парафиновых срезах головного мозга крысы. *Морфология*, 2005, т. 127, вып. 2, с. 76–77.
2. Отеллин В.А. и Григорьев И.П. Синаптические и несинаптические межнейронные связи как структурно-медиаторная основа функций неостриатума. В кн.: Стриарная система и поведение в норме и патологии. Л., изд. Ин-та физиологии им. И.П. Павлова АН СССР, 1984, с. 138–146.
3. Daulatzai M.A. Early stages of pathogenesis in memory impairment during normal senescence and Alzheimer's disease. *J. Alzheimer Dis.*, 2010, v. 20, № 2, p. 355–367.
4. Mechawar N., Cozzari C. and Descarries L. Cholinergic innervation in adult rat cerebral cortex: a quantitative immunocytochemical description. *J. Comp. Neurol.*, 2000, v. 428, № 2, p. 305–318.
5. Picciotto M.R., Higley M.J. and Mineur Y.S. Acetylcholine as a neuromodulator : cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron*, 2012, v. 76, № 1, p. 116–129.
6. Platt B. and Riedel G. The cholinergic system, EEG and sleep. *Behav. Brain Res.*, 2011, v. 221, № 2, p. 499–504.

Поступила в редакцию 24.05.2013

METHOD OF IMMUNOCYTOCHEMICAL DEMONSTRATION OF CHOLINERGIC NEURONS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF LABORATORY ANIMALS

D.E. Korzhevskiy, I.P. Grigoriyev, O.V. Kirik, N.M. Zelenkova and Ye.G. Sukhorukova

A protocol of immunocytochemical demonstration of choline acetyltransferase (ChAT), a key enzyme of acetylcholine synthesis, in paraffin sections of the brain of some laboratory animals, is presented. The method is simple, gives fairly reproducible results and allows for demonstration of ChAT in neurons, nerve fibers, and terminals in preparations of at least three species of laboratory animals including rat, rabbit, and cat. Different kinds of fixation (10% formalin, 4% paraformaldehyde, or zinc-ethanol-formaldehyde) were found suitable for immunocytochemical visualization of ChAT, however, optimal results were obtained with the application of zinc-ethanol-formaldehyde

Key words: *central nervous system, cholinergic neurons, choline acetyltransferase, 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