

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2014
УДК 578.6:611.018.8

*В.В.Гусельникова², Е.Г.Сухорукова¹, Е.А.Федорова¹, А.В.Полевщиков^{1, 2, 4} и
Д.Э.Коржевский^{1, 3}*

МЕТОД ОДНОВРЕМЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК И НЕРВНЫХ ТЕРМИНАЛЕЙ В ТИМУСЕ У ЛАБОРАТОРНЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

¹ 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; ² кафедра цитологии и гистологии (зав. — проф. А.Д.Харазова), ³ кафедра фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий (зав. — проф. А.Н.Суворов), Санкт-Петербургский государственный университет; ⁴ кафедра фундаментальной медицины (зав. — проф. А.В.Полевщиков), Дальневосточный Федеральный университет, г. Владивосток

Цель настоящей работы — разработка метода одновременного выявления тучных клеток (ТК) и терминалей нервных волокон, основанного на отработанных методиках гистохимической идентификации ТК альциановым синим и иммуногистохимической реакции на синаптофизин. Представленный протокол позволяет с высокой избирательностью и хорошей воспроизводимостью выявить одновременно ТК и нервные окончания на парафиновых срезах тимуса лабораторных млекопитающих. Методика может быть использована как для выявления пространственных взаимоотношений ТК и нервных терминалей, так и для самостоятельного исследования иннервации внутренних органов млекопитающих. В качестве оптимального фиксатора рекомендуется использовать цинк-этанол-формальдегид.

Ключевые слова: тучные клетки, нервные терминалы, альциановый синий, синаптофизин

То, что нервная и иммунная системы функционируют в тесной кооперации, оказывая друг на друга взаимное влияние, не вызывает сомнений [2]. Одним из примеров такого взаимодействия является описанная взаимосвязь тучных клеток (ТК) и терминалей нервных волокон [15, 17]. Совместная локализация ТК и нервных окончаний показана в миокарде, диафрагме, мозговых оболочках, желчном пузыре, подвздошной кишке и коже млекопитающих. Особое внимание в настоящее время уделяется роли их взаимодействия в патогенезе различных заболеваний, таких как слизистый колит, бронхиальная астма, псориаз и др., вследствие чего наиболее изученными оказываются пищеварительный тракт, воздухоносные пути и кожа [10]. Исследования тимуса, связанные с совместной локализацией ТК и нервных волокон, преимущественно относятся к 80–90-м годам XX в. [8, 13, 14, 16, 18, 19] и выполнены с использованием таких трудоемких и часто плохо воспроизводимых методов и подходов, как импрегнация нервных волокон солями металлов [16], а также методов с применением глиоксиловой кислоты [8, 9, 19]. Помимо плохой воспроизводимости, недостатком упомянутых методик является то, что они позволяют выявлять нервные волокна и не пригодны для визуализации синаптических контактов. Способность выявлять именно терминалы

нервных волокон является принципиально важной в случае взаимодействия ТК с нервными волокнами. В иммуногистохимических исследованиях для идентификации нервных волокон используют антитела к определенным нейропептидам, таким как субстанция Р, CGRP, VIP, нейропептид Y и др. [12–14], или антитела к ферментам, катализирующим синтез норадреналина и дофамина — тирозингидроксилазе и др. [14, 18]. Это позволяет выявлять нервные волокна только определенной медиаторной принадлежности и не дает возможности оценить общее количество контактов ТК с нервными терминалами в пределах единого среза.

Целью настоящего исследования была разработка простого и хорошо воспроизводимого метода одновременного выявления ТК и нервных терминалей, основанного на комбинации метода гистохимической идентификации ТК альциановым синим и иммуногистохимической реакции выявления синаптофизина (СФ).

СФ является главным интегральным белком мембраны синаптических пузырьков и используется как специфический маркер синапсов. Иммуногистохимическое окрашивание с использованием моно- и поликлональных антител к СФ — простой и надежный метод, который применяется для оценки синаптогенеза, плотности расположения синапсов в нервной

Сведения об авторах:

Сухорукова Елена Геннадьевна (e-mail: len48@inbox.ru), *Федорова Елена Анатольевна* (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), *Коржевский Дмитрий Эдуардович* (e-mail: dek2@yandex.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;

Гусельникова Валерия Владимировна (e-mail: guselnicova.valeriia@yandex.ru), кафедра цитологии и гистологии, Санкт-Петербургский государственный университет; 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9;

Полевщиков Александр Витальевич (e-mail: alexpol512@yandex.ru), кафедра фундаментальной медицины, Дальневосточный Федеральный университет, 690090, Владивосток, ул. Суханова, 8

системе, а также для изучения иннервации внутренних органов у млекопитающих [5–7].

Большинство методов идентификации ТК основаны на гистохимическом выявлении компонентов их гранул. Одной из таких методик, широко используемой в гистологической практике, является окраска альциановым синим, который, будучи катионным красителем, за счет образования ионных связей с полианионами гликозаминогликанов способен связываться с гепарином и хондроитинсульфатами в составе гранул ТК, окрашивая их в синий цвет [3].

В качестве объекта исследования в данной работе был использован тимус половозрелых крыс линии Вистар и мышей линии C57BL. Содержание лабораторных животных и их умерщвление проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу № 755 МЗ СССР от 12.08.1977 г.). Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [1] и в смеси СФУ (96 ° спирт, 6 частей; 40% формальдегид, 3 части; ледяная уксусная кислота, 1 часть) в течение 24 ч и после стандартной гистологической проводки заливали в парафин (НеваРеактив, Россия; Histomix, БиоВитрум, Россия). Срезы толщиной 5 мкм наклеивали на предметные стекла, покрытые поли-L-лизинном (Menzel, Германия) или специальным адгезивом [4]. Для выявления СФ использовали поликлональные кроличьи антитела (Dako, Дания; Monosan, Нидерланды), в качестве вторичных реагентов — HRP Conjugate из набора Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System SPD-015 (Spring Bioscience, США). Для выявления продукта реакции применяли хромоген 3'3'-диаминобензидин из двухкомпонентного набора (Spring Bioscience, США). Для идентификации ТК срезы докрашивали коммерческим раствором альцианового синего (BioVitrum, Россия).

В результате отработки различных режимов инкубации с антителами, проверки необходимости процедуры теплового демаскирования антигена и варьирования времени окрашивания альциановым синим был установлен следующий оптимальный протокол обработки препаратов:

- 1) удалить парафин и регидратировать срезы обычным способом;
- 2) после промывки в дистиллированной воде (2–5 мин) предметные стекла перенести в 3% перекись водорода на 5–7 мин для блокирования эндогенной пероксидазы;
- 3) поместить стекла в 0,01 М фосфатно-солевой буфер (ФСБ), pH 7,4, на 2–3 мин;
- 4) удалить избыток жидкости вокруг срезов фильтровальной бумагой;
- 5) нанести на срезы необходимое количество блокирующего раствора (Protein block DPB-125, Spring Bioscience, США) 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, Dako Pen) гидрофобный круг вокруг срезов;
- 6) удалить блокирующий раствор и, не промывая препараты, нанести на срезы антитела к СФ, равномерно распределив раствор по срезу покачиванием. Поместить стекла во влажную камеру и инкубировать при 27 ° С в течение 50 мин;
- 7) промыть препараты в ФСБ в течение 5–7 мин;
- 8) удалить избыток жидкости вокруг срезов и нанести необходимое количество реагента HRP Conjugate из набора Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System. Поместить стекла во влажную камеру и инкубировать при 27 ° С в течение 15 мин;

- 9) смыть реагент со срезов и оставить препараты в ФСБ на 10 мин;
- 10) удалить избыток ФСБ и нанести на срезы необходимое количество рабочего раствора DAB. В течение 1–3 мин происходит образование продукта гистохимической реакции. Контролируя данный процесс под микроскопом, следует остановить реакцию до появления окрашенного фона, смыв раствор хромогена 3% перекисью водорода;
- 11) промыть препараты в дистиллированной воде (2–5 мин);
- 12) удалить избыток жидкости со стекла и промокнуть фильтровальной бумагой область вокруг срезов;
- 13) докрасить срезы альциановым синим одним из двух предлагаемых способов, различающихся по конечному результату окрашивания.

Прогрессивное окрашивание:

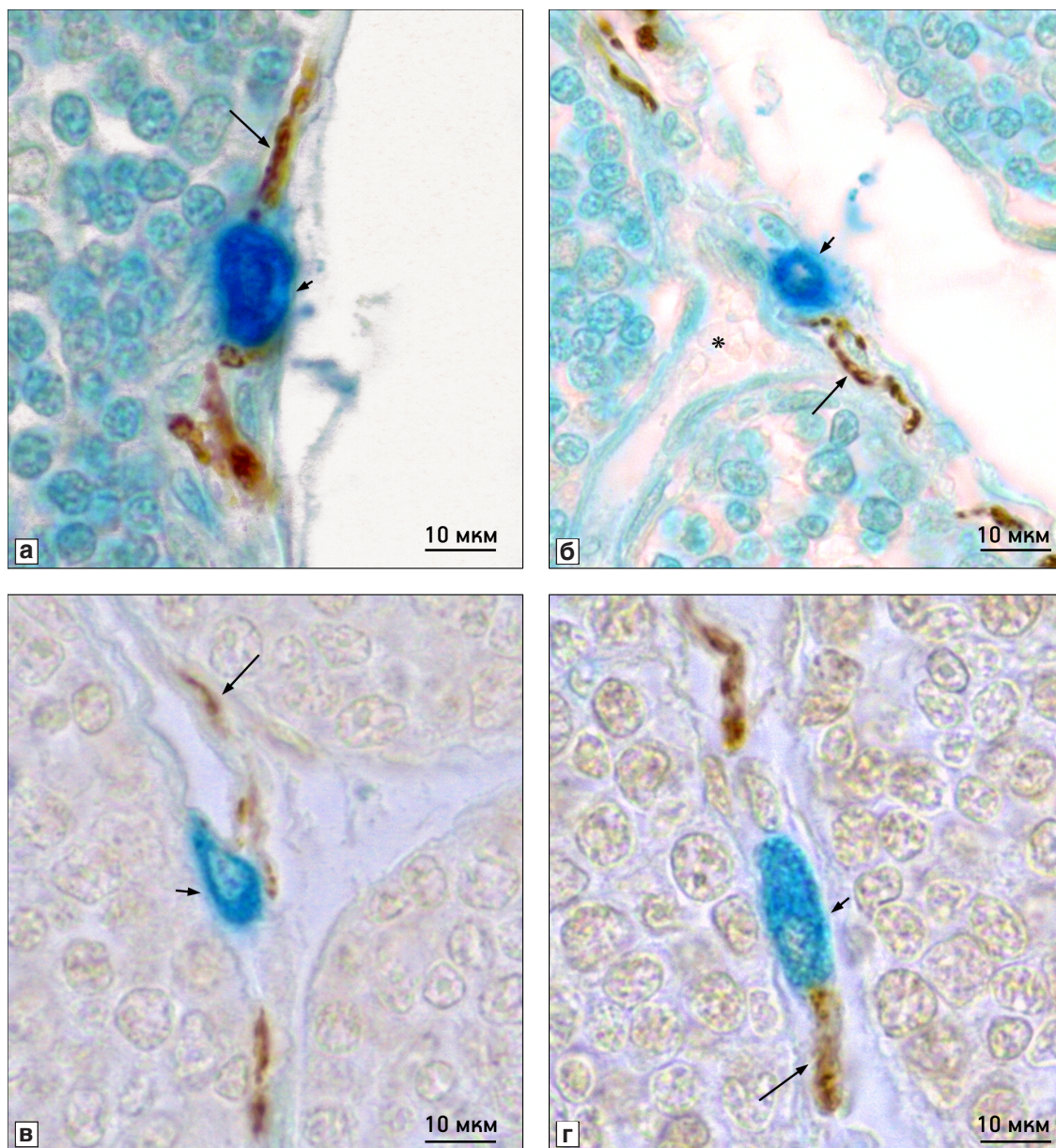
- а) поместить стекла в раствор альцианового синего и оставить на 30 мин при комнатной температуре;
- б) промыть, покачивая, в двух сменах дистиллированной воды;
- в) обезводить, просветлить и заключить препараты в перманентную среду (DPX, полистирол, канадский бальзам) обычным способом.

Регрессивное окрашивание с дифференцировкой в ледяной уксусной кислоте (ЛУК):

- а) на срезы нанести капельно необходимое количество раствора альцианового синего (чтобы раствор красителя полностью покрыл каждый срез);
- б) нагреть стекло со срезами и раствором красителя над пламенем спиртовки (или другим способом) и окрашивать до достижения интенсивной темно-синей окраски срезов;
- в) переместить предметное стекло в дистиллированную воду и промыть покачиванием;
- г) удалить со стекла избыток жидкости и нанести капельно на срезы ЛУК. В течение нескольких секунд происходит отмычка срезов от избытка красителя (дифференцировка). Как только срезы станут неокрашенными для невооруженного глаза, дифференцировку необходимо прекратить, переместив стекла в дистиллированную воду и промыв покачиванием;
- д) обезводить, просветлить и заключить препараты в перманентную среду (DPX, полистирол, канадский бальзам) обычным способом.

Сравнение результатов обработки препаратов, фиксированных разными способами, показало, что фиксация в цинк-этанол-формальдегиде лучше сохраняет иммунореактивность изучаемого антигена и способствует более яркому окрашиванию компонентов ткани альциановым синим, чем фиксация в СФУ.

В результате обработки на препаратах отчетливо выявляются СФ-положительные терминалы (СФПТ) нервных волокон. Результаты иммуногистохимического выявления нервных терминалов по селективности и интенсивности окраски сопоставимы с результатами других исследований, проведенных с применением антител к СФ [5–7]. Идентифицируемые по интенсивному окрашиванию реактивом в темно-коричневый или черный цвет СФПТ обнаруживаются, преимущественно, в пределах соединительной ткани капсулы и септ тимуса, субкапсулярно и вокруг кровеносных сосудов, где часто формируют сплетения. ТК отчетливо выявляются за счет интенсивного окрашивания их цитоплазматических гранул альциановым синим в бирюзово-синий цвет. Обнаруженные ТК характеризуются сравнительно крупными размерами (длиной 10–20 мкм, шириной 6–9 мкм), овальной или удлинённой, реже — сферической формой,



Тучные клетки (ТК) и синаптофизин-позитивные терминалы (СФПТ) нервных волокон в тимусе.

а, б — субкапсулярная область тимуса крысы; в–г — междолевая соединительная ткань тимуса мыши; длинные стрелки — СФПТ; короткие стрелки — ТК; звездочка — полость сосуда. Иммуногистохимическая реакция на синаптофизин с докраской альциановым синим: а, б — прогрессивное окрашивание; в–г — регрессивное окрашивание с дифференцировкой

присутствием несколько эксцентрично расположенного крупного ядра, иногда закрытого гранулами. ТК в тимусе локализуются, как и нервные терминалы, в пределах капсулы и септ, субкапсулярно и периваскулярно. СФПТ часто располагаются в непосредственной близости к ТК, что создает впечатление существования в тимусе контактов между ними.

Окрашивание препаратов альциановым синим без последующей дифференцировки в ЛУК (вариант прогрессивного окрашивания) улучшает ориентацию в структурах препарата, не маскируя при этом продукта иммуногистохимической реакции. На общем голубовато-бирюзовом фоне, который создают окрашенные альциановым синим ядра лимфо-, эндотелио- и эпителиоцитов, компоненты соединительной ткани, ТК выделяются за счет более интенсивного ярко-синего окрашивания (рисунки, а, б).

В результате дифференцировки препаратов в ЛУК (вариант регрессивного окрашивания) все структуры тимуса, кроме ТК и СФПТ, не окрашены. На результат иммуногистохимической реакции и окраску гранул ТК дифференцировка в ЛУК не влияет, вследствие чего ТК более контрастно (по сравнению с таковыми при использовании предыдущего варианта окрашивания) выявляются на неокрашенном фоне, что облегчает их обнаружение и подсчет (см. рисунок, в, г).

Представленный протокол обработки позволяет с высокой избирательностью и хорошей воспроизводимостью одновременно выявлять в пределах среза ТК и терминалы нервных волокон в тимусе лабораторных млекопитающих. Полученные в ходе настоящей работы результаты согласуются с имеющимися данными о присутствии в тимусе контактов ТК с терминалами нервных волокон [9, 12–14, 16, 19]. К преимуществам представленного метода (помим

мо селективности и воспроизводимости) можно отнести специфичность в отношении терминалей нервных волокон любой медиаторной принадлежности, в то время как уже известные иммуногистохимические методики, связанные с использованием антител к нейропептидам, позволяют выявлять нервные волокна только определенной медиаторики [12–14]. В работе V.A. Botchkarev и соавт. [11] представлен метод тройного окрашивания, основанный на одновременном использовании антител к SP и CGRP для выявления нервных волокон, и TRITC- или FITC-меченого авидина для идентификации ТК. Данная методика, хотя и позволяет одновременно выявлять и SP-, и CGRP-содержащие нервные волокна и таким образом расширяет область исследования, является трудоемкой — требует тщательного подбора флуорохромов с неперекрывающимися спектрами свечения, а также использования большого количества разнообразных реагентов. В отличие от подобных методик, связанных с привлечением трудоемких и дорогостоящих методов конфокальной или электронной микроскопии, разработанный нами протокол окрашивания относительно прост и позволяет использовать парафиновые срезы и световую микроскопию. Наконец, разработанная методика применима не только для визуализации пространственного взаимоотношения ТК и СФПТ, но и для самостоятельного исследования иннервации различных органов млекопитающих.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д.Э., Сухорукова Е.Г., Гилерович Е.Г. и др. Преимущества и недостатки цинк-этанол-формальдегида как фиксатора для иммуногистохимических исследований и конфокальной лазерной микроскопии. *Морфология*, 2013, т. 143, вып. 2, с. 81–85.
2. Корнева Е.А. Введение в иммунофизиологию. СПб., ЭЛБИ-СПб., 2003.
3. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М., Мир, 1969.
4. Патент РФ № 2386137. Покрытие предметных стекол для проведения иммуногистохимических и гистологических исследований. Д.Э. Коржевский и О.В. Кирик. Заявка от 29.09.2008. Оpubл. в БИ, 2010, № 10. (III ч.), с. 621.
5. Чумасов Е.И., Ворончихин П.А. и Коржевский Д.Э. Иннервация сердечной поперечнополосатой мышечной ткани легочных вен крысы. *Морфология*, 2011, т. 140, вып. 6, с. 53–55.
6. Чумасов Е.И., Петрова Е.С. и Коржевский Д.Э. Иннервация сердца крысы. *Морфология*, 2009, т. 135, вып. 2, с. 33–37.
7. Чумасов Е.И., Петрова Е.С. и Коржевский Д.Э. Распределение и структурная организация автономных нервных аппаратов в поджелудочной железе крысы (иммуногистохимическое исследование). *Морфология*, 2011, т. 139, вып. 3, с. 51–58.
8. Abramchik G.V., Yermakova S.S., Kaliunov V.N. et al. The immunomodulatory effect of nerve growth factor. *J. Neurosci. Res.*, 1988, v. 19, № 3, p. 349–356.
9. Artico M., Cavallotti C. and Cavallotti D. Adrenergic nerve fibres and mast cells: correlation in rat thymus. *Immunol. Lett.*, 2002, v. 84, № 1, p. 69–76.
10. Bauer O. and Razin E. Mast cell-nerve interactions. *Physiology*, 2000, v. 15, № 5, p. 213–218.
11. Botchkarev V.A., Eichmuller S., Peters E.M. et al. A simple immunofluorescence technique for simultaneous visualization of mast cells and nerve fibers reveals selectivity and hair cycle-dependent changes in mast cell-nerve fiber contacts in murine skin. *Arch. Dermatol. Res.*, 1997, v. 289, № 5, p. 292–302.
12. Cavallotti D., Artico M., Iannetti G. and Cavallotti C. Occurrence of adrenergic nerve fibers in human thymus during immune response. *Neurochem. Int.*, 2002, v. 40, № 3, p. 211–221.
13. Lorton D., Bellinger D.L., Felten S.Y. and Felten D.L. Substance P innervation of the rat thymus. *Peptides*, 1990, v. 11, № 6, p. 1269–1275.
14. Müller S. and Wihe E. Interrelation of peptidergic innervation with mast cells and ED1-positive cells in rat thymus. *Brain Behav. Immun.*, 1991, v. 5, № 1, p. 55–72.
15. Newson B., Dahlström A., Enerbäck L. and Ahlman H. Suggestive evidence for a direct innervation of mucosal mast cells: An electron microscopic study. *Neuroscience*, 1983, v. 10, № 2, p. 565–567.
16. Novothy G.E., Sommerfels H. and Zirbes T. Thymic innervation in the rat: a light and electron microscopical study. *J. Comp. Neurol.*, 1990, v. 302, № 3, p. 552–561.
17. Stead R.H., Tomioka M., Quinonez G. et al. Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, v. 84, № 9, p. 2975–2979.
18. Vizi E.S., Orsó E., Osipenko O.N. and Elenkov I.J. Neurochemical, electrophysiological and immunocytochemical evidence for a noradrenergic link between the sympathetic nervous system and thymocytes. *Neuroscience*, 1995, v. 68, № 4, p. 1263–1276.
19. Williams J.M., Peterson R.G., Shea P.A. et al. Sympathetic innervation of murine thymus and spleen: Evidence for a functional link between the nervous and immune systems. *Brain Res. Bull.*, 1981, v. 6, № 1, p. 83–94.

Поступила в редакцию 07.03.2013

Получена после доработки 16.09.2013

METHOD FOR SIMULTANEOUS VISUALIZATION OF MAST CELLS AND NERVE TERMINALS IN THE RODENT THYMUS

V.V. Gusel'nikova², Ye.G. Sukhorukova¹,
Ye.A. Fyodorova¹, A.V. Polevshchikov^{1, 2, 4}
and D.E. Korzhevskiy^{1, 3}

The purpose of this study was to develop the method for the simultaneous visualization of mast cells (MCs) and nerve terminals, based on generally accepted techniques of histochemical identification of MCs with alcian blue and immunohistochemical detection of synaptophysin. The protocol presented allows simultaneous identification of mast cells and nerve terminals in the sections of paraffin-embedded thymus of laboratory mammals with high selectivity and good reproducibility. The method can be used for both visualization of spatial relationship between MCs and nerve terminals and independent research of the innervation of mammalian internal organs. Zinc-ethanol-formaldehyde is recommended as an optimal fixative.

Key words: mast cells, nerve terminals, alcian blue, synaptophysin

¹ Laboratory of the Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, ² Department of General and Special Morphology, RAMS North-Western Branch Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg; ³ Department of Cytology and Histology, St. Petersburg State University; ⁴ Department of Fundamental Medicine, Far-Eastern Federal University, Vladivostok