

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2014
УДК 578.6:611.817.1

Е.Г.Гилерович, Е.Г.Сухорукова, О.В.Кирик, И.П.Григорьев и Д.Э.Коржевский

ВЫЯВЛЕНИЕ КЛУБОЧКОВ В МОЗЖЕЧКЕ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ПОМОЩИ ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ НА СИНАПТОФИЗИН И КОНФОКАЛЬНОЙ ЛАЗЕРНОЙ МИКРОСКОПИИ

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

Цель исследования — разработка методических подходов, обеспечивающих выявление сложных синаптических комплексов мозжечка человека (клубочков) с использованием иммуноцитохимической реакции на синаптофизин. Представленные протоколы позволяют получить препараты высокого качества для световой и конфокальной лазерной микроскопии, на которых отчетливо идентифицируются отдельные клубочки и внутриклубочковые аксональные терминалы. Полученные препараты пригодны для проведения количественного анализа.

Ключевые слова: клубочки мозжечка, синаптофизин, иммуноцитохимия, конфокальная лазерная микроскопия

Мозжечок осуществляет контроль координации и двигательной активности за счет комплексного взаимодействия возбуждающих и тормозных систем с участием собственных ядер мозжечка [1]. Первым афферентным звеном в этой системе являются особые синаптические образования — клубочки, расположенные в зернистом слое коры мозжечка. Клубочки имеют сложное строение: в их состав входят дендриты зернистых клеток, моховидные волокна и аксоны больших звездчатых нейронов (клеток Гольджи) [6], образующие синаптические комплексы. Исследование структурной организации клубочков в основном осуществляется посредством электронной микроскопии, требующей трудоемких способов обработки материала. Для функциональной интерпретации состояния синаптических структур клубочков мозжечка может быть полезным иммуноцитохимическое выявление синаптофизина — гликопротеина, являющегося неотъемлемой частью стенки синаптических пузырьков. Он синтезируется в цитоплазме нейрона и транспортируется в синаптические терминалы. Поэтому синаптофизин нередко используют при изучении синаптогенеза [7]. Важным свойством синаптофизина является его высокая устойчивость к аутолизу [8], что обуславливает его пригодность для изучения синаптических структур у человека, подтвержденную

данными, полученными при изучении периферической нервной системы [3–5].

Цель настоящего исследования — выяснение возможности использования иммуноцитохимической реакции на синаптофизин для анализа структурной организации клубочков мозжечка у человека при помощи световой и конфокальной лазерной микроскопии.

В работе использованы парафиновые блоки мозжечка человека (n=8, возраст 20–62 года) из архива лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Института экспериментальной медицины. Материал был фиксирован в цинк-этанол-формальдегиде [2] и обработан по общепринятой методике. Из полученных блоков готовили срезы толщиной 7–12 мкм. Для выявления синаптофизина применяли кроличьи поликлональные антитела к синаптофизину человека (Spring Bioscience, США; номер по каталогу E2174). В качестве вторичных реагентов были использованы реактивы из набора EnVision+ HRP/DAB (Dako, Дания) для световой микроскопии. Для конфокальной лазерной микроскопии были использованы первичные мышинные моноклональные антитела к синаптофизину клон SY38 (Dako, Дания; номер по каталогу M0776), вторичные биотинилированные антитела из набора LSAB2 System-HRP

Сведения об авторах:

Гилерович Елена Георгиевна, Сухорукова Елена Геннадьевна, Кирик Ольга Викторовна, Григорьев Игорь Павлович, Коржевский Дмитрий Эдуардович (e-mail: iemmorphol@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. Акад. Павлова, 12

(Dako, Дания) и стрептавидин, конъюгированный с флюоресцентным красителем индокарбоцианином (Streptavidin Cy3 Conjugate, Invitrogen, США; номер по каталогу SA1010) в разведении 1:100.

В результате применения различных режимов инкубации срезов и подбора вторичных реагентов были разработаны оптимальные (по трудозатратам и качеству получаемых препаратов) протоколы.

Протокол для световой микроскопии

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) с предварительно подогретым в термостате (58–60 °С) модифицированным цитратным буфером (рН 6,1; номер по каталогу S1700 — Dako, Дания) и подвергнуть процедуре теплового демаскирования антигена в бытовой пароварке (TEFAL, Франция или в любой другой с вертикальным размером паровой камеры 8–10 см) в течение 20 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 (1–2 мин).
5. Поместить в стаканчик с 3% перекисью водорода на 5–10 мин для блокировки эндогенной пероксидазы.
6. Удалить из срезов перекись водорода путем промывки в дистиллированной воде, после чего предметные стекла перенести в 0,01M фосфатно-солевой буфер (ФСБ), рН 7,4 на 5–7 мин.
7. 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, номер по каталогу A2153, Sigma-Aldrich, США) на ФСБ или готовый блокировочный раствор — Protein Block (Spring Bioscience, США) и оставить при комнатной температуре на 10 мин.
8. Удалить излишек блокировочного раствора без промывки. Нанести на срезы необходимое для их покрытия количество поликлональных кроличьих антител к синаптофизину в разведении 1:200. После этого поместить стекла во «влажные камеры» для предотвращения испарения реагентов и подсыхания срезов и поставить в термостат (27 °С) на 60 мин. В качестве «влажных камер» можно использовать любые пластиковые коробки с крышками, например квадратные чашки Петри (100×100×20 мм, номер по каталогу 82.9923.422, Sarstedt, Австралия), на дно которых нужно положить влажную фильтровальную бумагу и стеклянные палочки либо другие подставки для предметных стекол.
9. Смыть антитела промывочным буфером (ФСБ) и поместить стекла в стаканчик с аналогичным буфером на 5–7 мин.
10. Аккуратно промокнув фильтровальной бумагой стекло вокруг срезов, нанести на срезы необходимое количество реагента «HRP Conjugate» из набора Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (SpringBioscience, США) и поставить в термостат при 27 °С на 20 мин. На этом этапе можно использовать и другие вторичные реагенты (EnVision+, Dako; MACH2, BioCare), однако время инкубации в этом случае придется увеличить до 30–35 мин.
11. Смыть вторичные антитела промывочным буфером (ФСБ или трис-солевым буфером — ТСБ) и поместить стекла в стаканчик с ФСБ или ТСБ на 5–7 мин.
12. Аккуратно промокнув фильтровальной бумагой предметное стекло вокруг срезов, нанести необходимое количество рабочего раствора 3,3'-диаминобензидина (приготовленного при помощи набора DAB+, Dako, Дания, или аналогичных). В течение 1–5 мин происходит образование окрашенного продукта гистохимической реакции. Этот процесс желателен контролировать под микроскопом, чтобы остановить реакцию до появления неспецифического фона.
13. Смыть раствор хромогена и промыть препараты в 2–3 порциях дистиллированной воды по 5 мин в каждой.
14. При необходимости препараты можно докрасить квасцовым гематоксилином (например, гематоксилином Джилла или Майера) в течение 1 мин с подсинением в щелочной воде (1 капля 10% аммиака на 100 мл дистиллированной воды).
15. Обезводить препараты в этаноле восходящей крепости, просветлить в ксилоле обычным

образом и заключить в полистирол (перманент, DPX или другие подобные среды).

Протокол для конфокальной лазерной микроскопии

Этапы 1–7 провести аналогично предыдущему протоколу, кроме пункта 5, который не является необходимым и может быть исключен.

8. Удалить излишек блокировочного раствора без промывки. Нанести на срезы необходимое для их покрытия количество мышинных моноклональных антител к синаптофизину в разведении 1:30 клон SY38 (ДАКО, Дания; номер по каталогу M0776). После этого поместить стекла во «влажные камеры» для предотвращения испарения реагентов и подсыхания срезов и поставить в термостат (27 °C) на 60–66 ч.
9. Смыть антитела промывочным буфером (ФСБ) и поместить стекла в стаканчик с аналогичным буфером на 5–7 мин.
10. Аккуратно промокнув фильтровальной бумагой стекло вокруг срезов, нанести на них необходимое количество реагента Link из набора LSAB2 System-HRP (Дako, Дания) и поставить в термостат при 27 °C на 180 мин. На данном этапе можно использовать и другие реагенты, содержащие биотинилированные антимишинные антитела.
11. Смыть вторичные антитела промывочным буфером (ФСБ или ТСБ) и поместить стекла в стаканчик с ФСБ или ТСБ на 15–20 мин.
12. Аккуратно промокнув фильтровальной бумагой стекло вокруг срезов, нанести на срезы раствор стрептавидина, конъюгированного с флюоресцентным красителем индокарбоцианином (Streptavidin Cy3 Conjugate, Invitrogen, США; номер по каталогу SA1010) в разведении 1:100 и поставить в термостат при 27 °C на 30 мин. На этом этапе можно использовать и другие конъюгаты флюоресцентных красителей со стрептавидином. Конъюгат стрептавидина с Cy3 был нами выбран, поскольку он удобен при использовании твердотельного лазера (561 нм), а его флюоресценция соответствует зоне слабой автофлюоресценции фиксированных тканей, что позволяет добиться более четкой визуализации иммунопозитивных структур.
13. Смыть раствор конъюгата промывочным буфером (ФСБ или ТСБ) и промыть стекла в двух сменах дистиллированной воды по 5–7 мин в каждой.
14. Заключить в водорастворимую среду, пригодную для флюоресцентной микроскопии

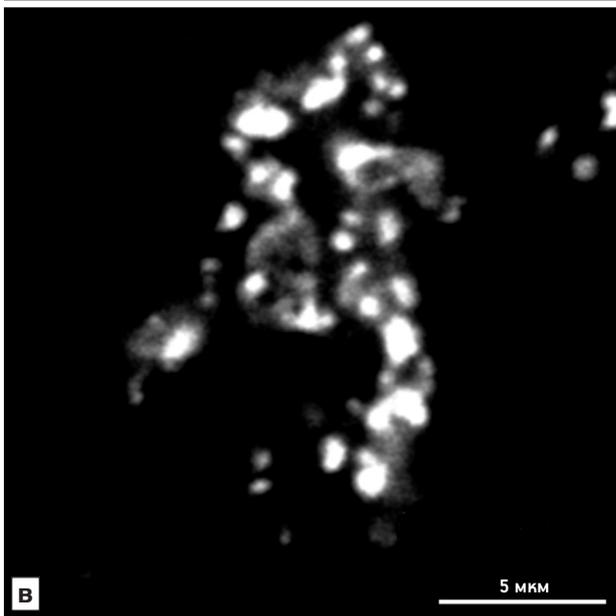
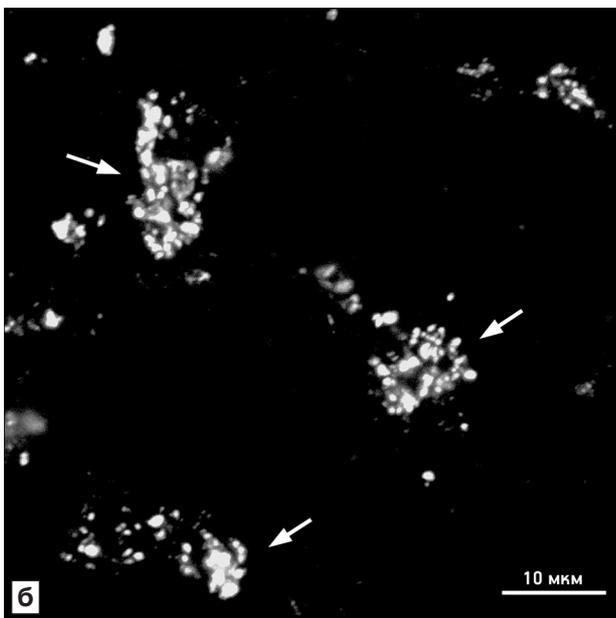
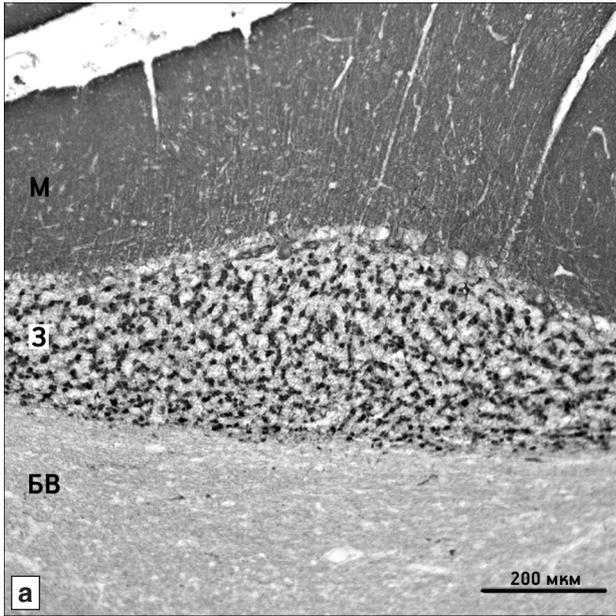
(например, Fluorescent Mounting Medium — Dako, Дания).

Данную методику можно использовать для выявления аксонных терминалей и варикозностей, содержащих синаптические пузырьки как в центральной, так и периферической нервной системе человека.

В результате просмотра препаратов, окрашенных в соответствии с протоколом № 1 (для световой микроскопии), при малых увеличениях микроскопа (об.4 и 10) в коре мозжечка наблюдаются 3 отчетливо выраженные, по-разному окрашенные зоны (рисунк, а). Равномерно окрашенная поверхностная зона соответствует молекулярному слою коры мозжечка. Зона, расположенная глубже, является зернистым слоем коры мозжечка, в котором находятся клубочки. Неокрашенная (самая глубокая) зона соответствует белому веществу, что однозначно определяется на докрашенных гематоксилином срезах. Слой грушевидных нейронов при реакции на синаптофизин четко не дифференцируется, поскольку эти клетки не накапливают синаптофизин в перикарионе и дендритах.

При использовании иммерсионного объектива (об.100) в зернистом слое коры мозжечка четко контурируются отдельные клубочки. В их составе определяются отдельные синаптофизин-иммунопозитивные гранулы, соответствующие терминалям, которые могут принадлежать как моховидным волокнам, так и аксонам больших звездчатых нейронов [6]. Изображения, полученные при помощи цифровой камеры с недокрашенных препаратов, пригодны для проведения морфометрического и стереологического анализа с использованием специализированных компьютерных программ (например, общедоступной программы Image J, NIH, США).

При проведении конфокальной лазерной микроскопии в зернистом слое коры мозжечка отчетливо видны отграниченные друг от друга флюоресцирующие структуры (см. рисунок, б), состоящие из скоплений гранул различной формы, которые имеют неодинаковые размеры (0,1–2 мкм). Эти структуры по местоположению и форме соответствуют клубочкам мозжечка, обнаруживаемым при проведении иммуноцитохимической реакции на синаптофизин и микроскопии в проходящем свете. На одиночном оптическом срезе, полученном при высоком разрешении конфокального микроскопа, видно, что клубочки представляют собой сложные комплексы, напоминающие изогнутые цепочки, образованные отдельными синаптофизин-иммунопозитивными гранулами (см. рисунок, в).



Таким образом, обработка препаратов в соответствии с представленными протоколами позволяет выявлять синаптофизин-иммунопозитивные структуры клубочков мозжечка человека при использовании фиксированного в цинк-этанол-формальдегиде аутопсийного материала и получать препараты, пригодные для проведения компьютерного количественного анализа.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 14-15-00014.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гилерович Е.Г. Иммуногистохимическое изучение структурных основ торможения в центральных ядрах мозжечка у мышей. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова, 1998, т. 84, № 12, с. 1325–1332.
2. Коржевский Д.Э., Сухорукова Е.Г., Гилерович Е.Г. и др. Преимущества и недостатки цинк-этанол-формальдегида как фиксатора для иммуноцитохимических исследований и конфокальной лазерной микроскопии. Морфология, 2013, т. 143, вып. 2, с. 81–85.
3. Чумасов Е.И., Петрова Е.С. и Коржевский Д.Э. Иннервация сердца крысы (иммуногистохимическое исследование). Морфология, 2009, т. 135, вып. 2, с. 33–37.
4. 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.
5. Чумасов Е.И., Петрова Е.С. и Коржевский Д.Э. Иммуноморфологический анализ иннервации хромаффинных клеток параганглиев артерий и сердца млекопитающих. Журн. эволюц. биохимии, 2011, т. 47, № 4, с. 325–331.
6. Hámori J., Jakab R. L. and Takács J. Morphogenetic plasticity of neuronal elements in cerebellar glomeruli during deafferentation-induced synaptic reorganization. J. Neural Transplant. Plast., 1997, v. 6, № 1. p. 11–20.
7. Lossi L., Ghidella S., Marroni P. and Merighi A. The neurochemical maturation of the rabbit cerebellum. J. Anat., 1995, v. 187, p. 709–722.
8. Sarnat H.B. Clinical neuropathology practice guide 5–2013: markers of neuronal maturation. Clin. Neuropathol., 2013, v. 32, № 5, p. 340–369.

Поступила в редакцию 17.02.2014

Синаптофизин-иммунореактивные структуры коры мозжечка человека.

а — общий вид коры мозжечка; б — клубочки в зернистом слое коры мозжечка (стрелки); суперпозиция 10 оптических срезов, выполненных с интервалом 0,1 мкм; в — одиночный оптический срез клубочки мозжечка. М — молекулярный слой; З — зернистый слой; БВ — белое вещество. Иммуноцитохимическая реакция на синаптофизин без докраски. а — микроскопия в проходящем свете; б, в — конфокальная лазерная микроскопия

**DEMONSTRATION OF THE GLOMERULI
IN HUMAN CEREBELLUM USING
SYNAPTOPHYSIN IMMUNOHISTOCHEMISTRY
AND CONFOCAL LASER MICROSCOPY**

*Ye.G. Gilerovich, Ye.G. Sukhorukova, O.V. Kirik,
I.P. Grigoriyev and D.E. Korzhevskiy*

The aim of the study was to develop the methodologic approaches for the demonstration of the complex synaptic groups (glomeruli) in human cerebellum using synaptophysin immu-

nocytochemistry. The protocols presented in the paper allow to obtain of high quality preparations for conventional light and confocal laser microscopy in which individual glomeruli and intraglomerular axonal terminals could be distinctly identified. The preparations obtained are suitable for a quantitative analysis

Key words: *cerebellar glomeruli, synaptophysin, immunocytochemistry, confocal laser microscopy*

Laboratory of the Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAS Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg