

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2015
УДК 611.817.1:599.323.4

Д.Э.Коржевский^{1,3} Е.Г.Гилерович¹, О.В.Кирик¹, О.С.Алексеева^{1,2}, И.П.Григорьев¹

ОДНОВРЕМЕННОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ ГЛУТАМАТДЕКАРБОКСИЛАЗЫ И СИНАПТОФИЗИНА В ПАРАФИНОВЫХ СРЕЗАХ МОЗЖЕЧКА КРЫСЫ

¹ 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; ² лаборатория сравнительной физиологии дыхания (руков. — чл.-кор. РАН А.И.Кривченко), Научно-исследовательский институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург; ³ кафедра фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий (зав. — проф. А.Н.Суворов), Санкт-Петербургский государственный университет

В работе представлен хорошо воспроизводимый и экономичный протокол одновременного выявления глутаматдекарбоксилазы (ГДК) — ключевого фермента синтеза γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) и синаптофизина — маркерного белка синаптических пузырьков с помощью конфокальной лазерной микроскопии. ГДК в коре мозжечка крысы маркирует клетки Пуркинье и корзинки нервных волокон в их базальной части и неравномерно распределена в нейропиле молекулярного и зернистого слоёв. Синаптофизин в молекулярном слое четко контурирует крупные дендриты клеток Пуркинье, в зернистом — маркирует части клубочков мозжечка — терминали моховидных волокон. ГДК-иммунопозитивные структуры (ГАМК-ергические аксоны звездчатых нейронов — клеток Гольджи) часто расположены на периферии клубочков. В периферической части клубочков наблюдается солокализация ГДК- и синаптофизин-иммунопозитивных структур, что свидетельствует о присутствии в этой зоне ГАМК-ергических синапсов.

Ключевые слова: мозжечок, синапсы, конфокальная микроскопия, глутаматдекарбоксилаза, синаптофизин

Современные методы иммуноцитохимии позволяют проводить селективное маркирование синаптических белков и видеть крупные синапсы на уровне световой микроскопии [2]. Однако медиаторная принадлежность выявляемых синапсов требует уточнения. Для этого могут быть использованы методы двойного иммуноцитохимического маркирования [3]. В этом случае наиболее информативными являются исследования, проводимые с применением конфокальной лазерной микроскопии, поскольку они дают возможность независимого выявления двух различных флюорохромов и более, локализованных в одной микроструктуре изучаемого препарата. Применение двойного иммуноцитохимического маркирования и конфокальной микроскопии является необходимым условием для адекватного анализа солокализации синаптических и медиаторных маркеров. Такой подход позволяет судить не только о структурной организации синаптического аппарата, но и о медиаторной принадлежности выявляемых нервных окончаний.

Несмотря на то, что рядом авторов [1, 8] опубликованы работы, свидетельствующие о возможности выявления глутаматдекарбоксилазы (ГДК) —

ключевого фермента синтеза γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) [6] — на уровне различных звеньев рефлекторных дуг мозжечка у лабораторных животных, до сих пор отсутствует универсальный подход, позволяющий анализировать синаптический аппарат в архивном материале, хранящемся длительное время в парафиновых блоках. Этот методический пробел существенно уменьшает возможности исследователя анализировать ранее полученный экспериментальный материал и проводить ретроспективные нейробиологические исследования мозжечка сравнительного характера.

Цель настоящего исследования состояла в разработке хорошо воспроизводимого протокола, позволяющего с минимально возможными трудозатратами и экономически оправданным использованием дорогостоящих реагентов эффективно определять совместную локализацию ГДК и синаптофизина — маркерного белка синаптических пузырьков [7], а также выявлять у крысы клубочки мозжечка — органоспецифические синаптические комплексы [9].

В работе использованы парафиновые блоки коры мозжечка половозрелых крыс-самцов линии

Сведения об авторах:

Гилерович Елена Георгиевна, Кирик Ольга Викторовна, Григорьев Игорь Павлович, Алексеева Ольга Сергеевна, 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, д. 12

Вистар (n=5) из архива лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Института экспериментальной медицины. Материал был фиксирован в цинк-этанол-формальдегиде [5], обезвожен и залит в парафин по общепринятой методике. Из архивных блоков готовили срезы толщиной 5 и 10 мкм и наклеивали их на предметные стекла с адгезивным покрытием — «Polysine» (Menzel, Германия). Для выявления синаптофизина применяли мышинные моноклональные антитела к синаптофизину (клон SY38, Dako, Дания). ГДК выявляли с использованием кроличьих поликлональных антител к изоформе фермента GAD67 (Spring Bioscience, США). В качестве вторичных реагентов применяли биотинилированный антимишиный Fab-фрагмент иммуноглобулинов ослы (Jackson ImmunoResearch, США), стрептавидин, конъюгированный с флуоресцентным красителем Cy2 (Jackson ImmunoResearch, США), и антикроличьи иммуноглобулины свиньи, связанные с тетраметилродаминизотиоцианатом (TRITC, Dako, Дания).

В результате применения различных режимов инкубации срезов и подбора вариантов разведения реагентов был разработан оптимальный (по соотношению трудозатрат, объемов использованных реагентов и качеству получаемых препаратов) протокол. Он состоит в представленной ниже последовательности операций.

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 (pH 6,1; номер по каталогу 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 20 мин (более подробно тепловое демаскирование описано ранее [4]).

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) и поместить их в фосфатно-солевой буфер (ФСБ) на 5–10 мин.

5. 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 (около 100 мкл) блокировочного раствора — 5% раствора бычьего сыво-

роточного альбумина (BSA, номер по каталогу A2153, Sigma-Aldrich, США) на ФСБ или готового блокировочного раствора — Protein Block (Spring Bioscience, США) и оставить при комнатной температуре на 10 мин.

6. Удалить излишек блокировочного раствора без промывки. Нанести на срезы необходимое для их покрытия количество мышинных моноклональных антител к синаптофизину в разведении 1:30 и кроличьих поликлональных антител к ГДК (GAD67) в разведении 1:100, перемешав их на предметном стекле, аккуратно его покачивая. Общее количество смеси реагентов обычно не превышает 140 мкл. После этого поместить стекла во «влажные камеры» для предотвращения испарения реагентов и подсыхания срезов и поставить в термостат (27 °С) на 60–66 ч.

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

8. Аккуратно промокнув фильтровальной бумагой стекло вокруг срезов, нанести на срезы необходимое количество приготовленной заранее смеси вторичных антикроличьих и антимишиных антител (смешиваются в центрифужной пробирке равные объемы свинных антикроличьих антител, меченных TRITC, предварительно разведенных 1:10, и моновалентного Fab-фрагмента антимишиного иммуноглобулина ослы, меченного биотином, предварительно разведенного 1:100). Препараты во влажных камерах поместить в термостат при 27 °С на 180 мин.

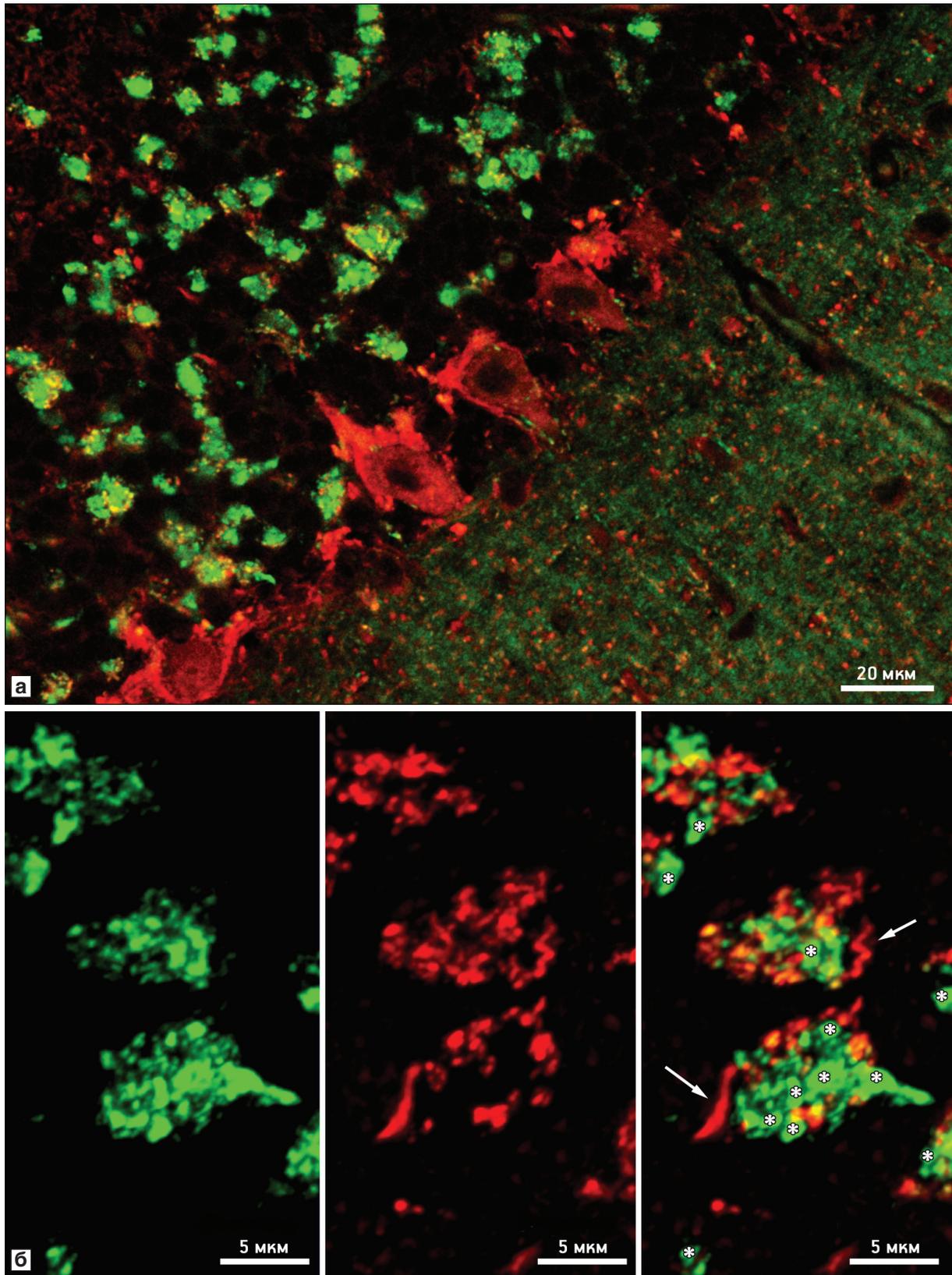
9. Смыть вторичные антитела промывочным буфером (ФСБ) и поместить стекла в стаканчик с ФСБ на 15–20 мин.

10. Аккуратно промокнув фильтровальной бумагой стекло вокруг срезов, нанести на них раствор стрептавидина, конъюгированного с флуоресцентным красителем Cy2 в разведении 1:100 и поставить в термостат при 27 °С на 30 мин.

11. Смыть раствор конъюгата промывочным буфером (ФСБ) и промыть стекла в двух сменах дистиллированной воды по 5 мин в каждой.

12. Промыть препараты абсолютным изопропанолом в течение 30 с при постоянном перемешивании жидкости, поместить в смесь равных объемов орто-ксилола и изопропанола на 1 мин. Просветлить в двух порциях орто-ксилола (не более 1 мин) и заключить в перманентную быстросыхающую нефлуоресцирующую среду (например, Cytoseal 60 — Thermo Scientific, США). Препарат готов для просмотра с использованием «сухих» объективов через 60 мин после заключения.

При проведении флуоресцентной микроскопии с использованием фильтров, предназначенных для наблюдения флуоресценции флуорохромов FITC и TRITC, синаптофизин- и ГДК-иммунопозитивные



Двойная иммуногистохимическая реакция на глутаматдекарбоксилазу (ГДК) и синаптофизин на препарате коры мозжечка крысы с использованием конфокальной лазерной микроскопии.

ГДК-содержащие и синаптофизин-позитивные структуры флюоресцируют в красном и зеленом диапазонах видимого спектра соответственно, совместная локализация двух маркеров дает желтое свечение. а — общий вид коры мозжечка; б-г — клубочки в зернистом слое коры мозжечка. б — реакция на синаптофизин; в — реакция на ГДК; г — совмещение реакций. Стрелки — ГАМК-ергические нервные волокна, подходящие к клубочкам; звездочки — терминалы моховидных афферентных волокон, не содержащие ГДК

структуры проявляют зеленую и красную флюоресценцию соответственно.

Двойная иммуногистохимическая реакция на ГДК и синаптофизин при проведении конфокальной лазерной микроскопии препаратов мозжечка позволяет определить ГДК-содержащие (флюоресцирующие в красном диапазоне видимого спектра) и синаптофизин-позитивные (флюоресцирующие в зеленом диапазоне видимого спектра) структуры (рисунк, а).

В молекулярном слое преобладают гранулы зеленого цвета, их расположение имеет отчетливый градиент в соответствии с поперечным по отношению к коре мозжечка направлением крупных дендритов клеток Пуркинье. Красные ГДК-содержащие вкрапления выглядят как округлые мелкие образования: большие по размеру вкрапления расположены в глубоких частях молекулярного слоя. Ядра клеток Пуркинье не окрашиваются, их цитоплазма и отростки ГДК-позитивны. На фоне клеток Пуркинье отчетливой интенсивно красной окраской выделяются корзинки нервных волокон. В них синаптофизин-позитивные структуры выявляются неотчетливо. В зернистом слое мозжечка определяются зеленые синаптофизин-позитивные части клубочков мозжечка — терминалы моховидных волокон, розетки которых содержат синаптические пузырьки (см. рисунок, б). Красные ГДК-иммунопозитивные структуры (ГАМК-ергические аксоны звездчатых нейронов — клеток Гольджи) часто расположены на периферии клубочков (см. рисунок, б). В периферической части клубочков наблюдается совместная локализация ГДК- и синаптофизин-иммунопозитивных структур, что свидетельствует о присутствии в этой зоне ГАМК-ергических синапсов (см. рисунок, г).

Таким образом, представленный протокол обработки препаратов позволяет выявлять ГАМК-ергические синапсы среди других синапсов мозжечка и проводить как отдельный, так и одновременный анализ синаптофизин- и ГДК-иммунопозитивных структур мозжечка в парафиновых срезах.

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 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. Гилерович Е.Г., Мошонкина Т.Р., Федорова Е.А. и др. Морфофункциональная характеристика поясничного утолщения спинного мозга крысы // Морфология. 2007. Т. 132, вып. 5. С. 33–37.
3. Гиляров А.В., Кирик О.В., Коржевский Д.Э. Сравнительный анализ методических подходов, применяемых для одновременного выявления нескольких антигенов при иммуногистохимическом исследовании // Морфология. 2010. Т. 138, вып. 5. С. 59–64.
4. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Карпенко М.Н. и др. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии. СПб.: СпецЛит, 2014.
5. 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.
6. Сухарева Б.С., Дарий Е.Л., Христофоров Р.Р. Глутамат-декарбоксилаза: структура и каталитические свойства // Успехи биол. химии. 2001. Т. 41. С. 131–162.
7. Evans G.J., Cousin M.A. Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling // Biochem. Soc. Trans. 2005. Vol. 33 (Pt. 6). P. 1350–1353.
8. Garin N., Escher G. The development of inhibitory synaptic specializations in mouse deep cerebellar nuclei // Neuroscience. 2001. Vol. 105. P. 431–441.
9. Manto M., De Zeeuw C.I. Diversity and complexity of roles of granule cells in the cerebellar cortex // Cerebellum. 2012. Vol. 11. P. 1–4.

Поступила в редакцию 06.06.2014

SIMULTANEOUS DEMONSTRATION OF GLUTAMATE DECARBOXYLASE AND SYNAPTOPHYSIN IN PARAFFIN SECTIONS OF RAT CEREBELLUM

D.E. Korzhevskiy^{1,3}, Ye.G. Gilerovich¹, O.V. Kirik¹, O.S. Alekseyeva^{1,2}, I.P. Grigoriyev¹

The article presents highly reproducible and inexpensive protocol for simultaneous demonstration of glutamate decarboxylase (GAD67), the key enzyme of gamma-aminobutyric acid (GABA) synthesis and synaptophysin (SYP), a marker protein of synaptic vesicles using confocal laser microscopy. In the cerebellar cortex, GAD labels Purkinje cells and pinceaux in their basal parts and is unevenly distributed in the neuropil of molecular and granular layers. SYP clearly marks the contours of large dendrites of Purkinje cells in molecular layer, while in the granular layers it labels parts of cerebellar glomeruli — the terminals of the mossy fibers. GAD-immunopositive structures (GABA-ergic axons of stellate cells — Golgi cells) are often located at periphery of the glomeruli. In the peripheral zone of the glomeruli, colocalization of GAD- and SYP-immunopositive structures was observed, suggesting the presence of GABA-ergic synapses in this zone.

Key words: *cerebellum, synapses, confocal microscopy, glutamic acid decarboxylase, synaptophysin*

¹ Laboratory of the Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAS North-Western Branch Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg; ² Laboratory of Comparative Physiology of Respiration, RAS I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, St. Petersburg; ³ Department of Fundamental Problems of Medicine, St. Petersburg State University