

И.П. Григорьев, М.С. Василенко, Е.Г. Сухорукова и Д.Э. Коржевский

ПРИМЕНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ АНТИТЕЛ К ТИРОЗИНГИДРОКСИЛАЗЕ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КАТЕХОЛАМИНЕРГИЧЕСКИХ СИСТЕМ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

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, Санкт-Петербург

Иммуногистохимическая реакция на ключевой фермент синтеза катехоламинов (КА) — тирозингидроксилазу (ТГ) в настоящее время является основным морфологическим методом выявления нейронов головного мозга, синтезирующих КА. Сейчас для исследователей доступен ряд моноклональных антител к ТГ, при создании которых использовались различные иммуногены. Цель настоящей работы состояла в сравнительном анализе результатов выявления ТГ в нейронах головного мозга крысы и человека при помощи двух клонов антител: ТОН-А1 и 1В5. Установлено, что антитела клона ТОН-А1 целесообразно использовать только для выявления нейронов КА-ергических (КАЕ) нервных центров крысы. Антитела клона 1В5 могут быть использованы для выявления КА-синтезирующих нейронов как у крысы, так и у человека, а также эфферентных нервных волокон в областях-мишенях КАЕ-иннервации.

Ключевые слова: головной мозг, антитела, катехоламины, тирозингидроксилаза

Катехоламинергические системы играют важную роль в регуляции различных физиологических процессов [1, 8], поведенческих актов [11] и в патогенезе многих неврологических и психиатрических расстройств, таких как болезнь Паркинсона [7], синдром дефицита внимания и гиперактивности [15], депрессия [19], шизофрения [16], наркозависимость [3, 9].

В мозгу млекопитающих катехоламины образуются из аминокислоты тирозина в результате последовательных этапов синтеза, катализируемых ферментами тирозингидроксилазой (ТГ), которая преобразует L-тирозин в L-3,4-диоксифенилаланин, или сокращённо, L-ДОФА, ДОФА-декарбоксилазой, или декарбоксилазой ароматических L-аминокислот (преобразует L-ДОФА в дофамин), дофамин-β-гидроксилазой (преобразует дофамин в норадреналин) и фенилэтаноламин-N-метилтрансферазой (преобразует норадреналин в адреналин). Реакцией, ограничивающей скорость данной последовательности процессов синтеза катехоламинов, является гидроксилирование тирозина ТГ с образованием L-ДОФА. Этот фермент также способен гидроксилировать фенилаланин с образованием тирозина, но не L-триптофан (предшественник серотонина), таким образом, ТГ имеет высокую субстратную специфичность и избирательную приуроченность к синтезу катехоламинов [13].

Поскольку имеющиеся данные свидетельствуют, что в процессе биосинтеза катехолами-

нов существует только одна высокоспецифичная реакция — гидроксилирование тирозина с образованием L-ДОФА, катализируемое ТГ, то по ее активности можно судить об интенсивности синтеза катехоламинов. Нейроны, содержащие данный фермент, являются катехоламин-синтезирующими, или катехоламинергическими, т.е., использующими дофамин или норадреналин в качестве нейромедиатора.

Первоначально для изучения строения катехоламинергических нервных центров использовали гистохимические методы, разработанные шведскими исследователями С. Owman, В. Falck и N.A. Hillarp в середине XX в. [2], основанные на спектральных различиях флюоресценции моноаминов. Данные методы позволили установить локализацию основных катехоламинергических центров и их проекций в ЦНС [12]. Однако исследование катехоламинергических структур с помощью флюоресцентной гистохимии имеет существенные недостатки: трудоёмкость, нестабильность результатов, быстрое ослабление специфической флюоресценции, невозможность исследовать морфологические особенности клеток и их отростков на постоянных препаратах.

Эти недостатки были преодолены с введением в практику иммуногистохимических методов выявления ферментов синтеза катехоламинов, приемлемых для получения постоянных препаратов, на которых можно не только маркировать катехоламинергические нейроны, но и изучать внутрикле-

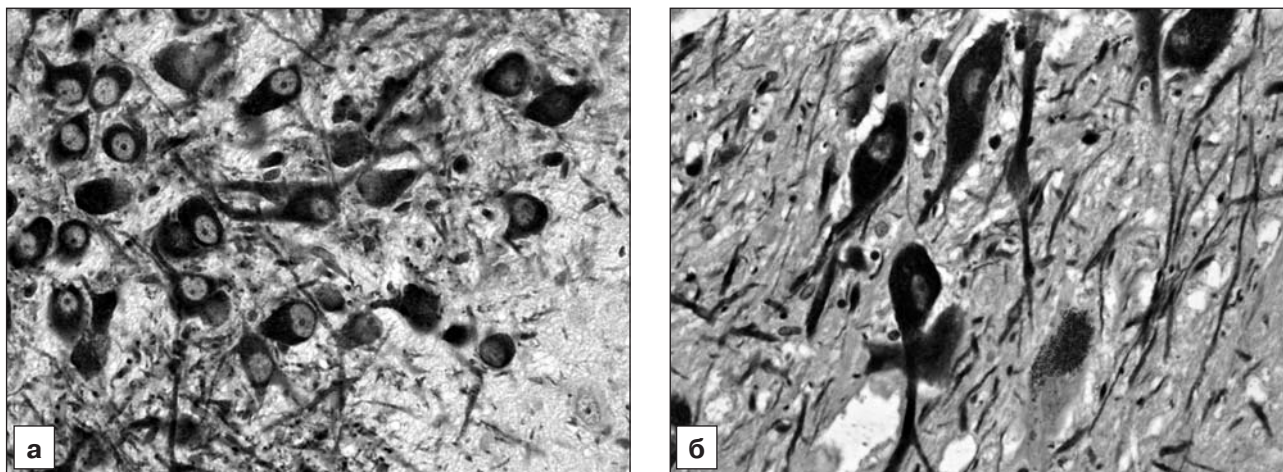


Рис. 1. Нейроны черного вещества головного мозга крысы (а) и человека (б).

Иммуноцитохимическая реакция на тирозингидроксилазу с моноклональными антителами ТОН А1 (а) и 1В5 (б). Цифровая камера Leica DFC 420. Об. 40, ок. 10.

точные компартменты локализации ферментов, необходимых для синтеза катехоламинов [18]. В настоящее время при помощи различных иммуногенов получены ряд моноклональных антител к ТГ (ТОН-А1, 1В5, ТН-2, ТН-16, ТН-100, 6d7), способных выявлять различные эпитопы этого фермента. Учитывая межвидовые отличия в аминокислотном составе ТГ, возможную чувствительность к фиксации и последующей обработке ее антигенных детерминант, можно ожидать, что применение различных моноклональных антител к ТГ у животных и человека может давать неодинаковые результаты. В связи с этим цель исследования состояла в сравнительном анализе результатов выявления ТГ в головном мозгу крысы и человека при помощи двух видов моноклональных антител, полученных от ведущих производителей иммуноцитохимических реагентов.

В работе использован головной мозг 20 половозрелых крыс линии Вистар обоего пола и 10 фрагментов головного мозга человека (10 мужчин в возрасте 25–79 лет), полученных в Городском бюро судебно-медицинской экспертизы в соответствии с разрешением Этического комитета Научно-исследовательского института экспериментальной медицины СЗО РАМН при проведении плановой аутопсии. Содержание животных и все экспериментальные манипуляции осуществлялись с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Программа исследования имеет положительное заключение Этического комитета Научно-исследовательского института экспериментальной медицины СЗО РАМН. Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [6], обезжизняли и заливали в парафин по обще-

принятой методике. Готовили срезы толщиной 5 и 7 мкм. Катехоламинергические структуры головного мозга выявляли при помощи иммуноцитохимической реакции на ТГ с использованием двух различных моноклональных антител (клоны ТОН-А1, BD Pharmingen, США и 1В5, Novocastra, Великобритания) и набора EnVision+ (DAKO, Дания) с учетом рекомендаций производителей реагентов и собственных разработок оптимальных способов инкубации препаратов с первичными антителами [4, 5, 10]. После проведения иммуноцитохимической реакции часть срезов докрашивали квасцовым гематоксилином.

Проведение иммуноцитохимической реакции с использованием антител клона ТОН-А1 на срезах головного мозга крыс позволило выявить основные центры, в которых присутствуют ТГ-иммунопозитивные клетки (рис. 1). В клетках чёрной субстанции вентральной области покрышки и гипоталамуса хорошо окрашивались перикарион и крупные отростки, а также отдельные катехоламинергические нервные волокна в области мишеней иннервации (стриатума, неокортекса). Особенно интенсивно метились ТГ-положительные волокна в области nigro-стриатного тракта. Нейропиль серого вещества стриатума был окрашен слабо (рис. 2).

Использование антител клона ТОН-А1 не позволило иммуноцитохимически выявить ТГ-содержащие структуры в головном мозгу человека. Нейроны черного вещества головного мозга человека, которое было идентифицировано по наличию нейромеланина в их цитоплазме, не дают реакцию на ТГ с антителами ТОН-А1, что подтверждает видовую специфичность этого клона антител.

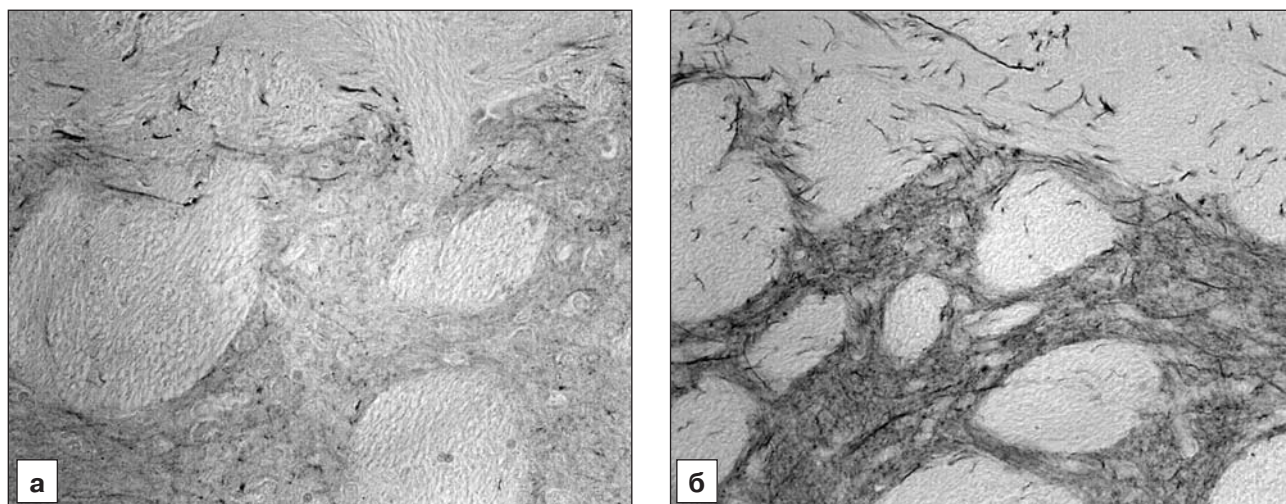


Рис. 2. Катехоламинергические нервные волокна в нейропиле полосатого тела мозга крысы.

Иммуноцитохимическая реакция на тирозингидроксилазу с моноклональными антителами ТОН А1 (а) и 1В5 (б). Цифровая камера Leica DFC 280. Об. 40, ок. 10.

Иммуноцитохимическая реакция с использованием антител к ТГ клона 1В5, так же как и в случае с клоном ТОН А1, выявляла основные катехоламинергические центры головного мозга крысы (см. рис. 1), однако нервные клетки окрашивались более контрастно, создавая картину, подобную наблюдаемой после импрегнации нейронов нитратом серебра. ТГ-позитивные волокна можно было наблюдать на большем протяжении, и они окрашивались более интенсивно, давая возможность наблюдать как их пучки, так и отдельные волокна не только в области nigrostriatal tract, но и в неокортексе, гиппокампе и стриатуме. Нейропил серого вещества области хвостатого ядра/скорлупы был хорошо окрашен (см. рис. 2). При большом увеличении светового микроскопа в нем определялось густое сплетение ТГ-иммунопозитивных нервных волокон.

Применение антител клона 1В5 для иммуноцитохимической окраски срезов мозга человека позволило выявить многочисленные ТГ-позитивные нейроны и волокна среднего мозга. Особенно интенсивно окрашивались ТГ-содержащие клетки и волокна в компактной части чёрного вещества (см. рис. 1), создавая картины, подобные получаемым при импрегнационном методе их выявления по Гольджи. Однако не все нейроны черного вещества головного мозга человека, имеющие цитоплазматический нейромеланин, дают положительную реакцию на ТГ.

Полученные результаты подтверждают высокую видоспецифичность антител клона ТОН-А1 [17], которая ограничивает возможность их использования у различных млекопитающих. В то же время, антитела клона 1В5 можно успеш-

но применять не только для анализа структурной организации катехоламинергических нервных центров и их проекций у крысы, но и для изучения черного вещества у человека. Качество реакции и высокая сохранность нервных и глиальных структур черного вещества в использованном аутопсийном материале свидетельствуют о возможности применения антител к ТГ (1В5) в сравнительных исследованиях катехоламинергических центров у крысы и человека. Полученные результаты позволяют добавить ТГ к списку нейрональных маркеров [14], доступных для выявления в аутопсийном материале, и будут способствовать совершенствованию методических подходов, используемых при изучении медиаторных систем головного мозга млекопитающих.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 10-04-00676а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Баришполец В.В., Федотова Ю.О. и Сапронов Н.С. Структурно-функциональная организация дофаминергической системы головного мозга. Экспер. клин. фармакол., 2009, т. 72, № 3, с. 44–49.
2. Буданцев А.Ю. Моноаминергические системы мозга. М., Наука, 1976.
3. Дробленков А.В., Карелина Н.Р. и Лебедев В.А. Мезоаккумболопоясная дофаминергическая система крыс и эмоциональные функции мозга. Морфология, 2008, т. 134, вып. 6, с. 84–89.
4. Коржевский Д.Э. и Гиляров А.В. Оптимизация метода иммуногистохимического выявления нестина на парафиновых срезах головного мозга крысы. Морфология, 2006, т. 130, вып. 6, с. 77–79.
5. Коржевский Д.Э., Григорьев И.П. и Отеллин В.А. Иммуноцитохимическое выявление катехоламинергических структур

- тур в парафиновых срезах головного мозга крысы после различных способов фиксации. Морфология, 2005, т. 127, вып. 1, с. 63–64.
6. Коржевский Д.Э., Григорьев И.П. и Отеллин В.А. Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрогистологических исследованиях. Морфология, 2006, т. 129, вып. 1, с. 85–87.
 7. Крыжановский Г.Н., Карабань И.Н., Магаева С.В. и др. Болезнь Паркинсона (этиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение, профилактика). М., Медицина, 2002.
 8. Отеллин В.А. и Арушанян Э.Б. Нигрострионигральная система. М., Медицина, 1989.
 9. Полунина А.Г., Давыдов Д.М. и Брюн Е.А. Психическая зависимость при наркомании: роль мезокортико-лимбической дофаминергической системы. Журн. невропатол. и психиатр., 2007, т. 107, № 2, с. 70–75.
 10. Сухорукова Е.Г., Коржевский Д.Э., Кирик О.В. и Коржевская В.Ф. Иммуноцитохимическое выявление астроцитов головного мозга при черепно-мозговой травме. Суд.-мед. эксперт., 2010, № 1, с. 14–16.
 11. Egerton A., Mehta M.A., Montgomery A.J. et al. The dopaminergic basis of human behaviors: A review of molecular imaging studies. Neurosci. Biobehav. Rev., 2009, v. 33, №7, p. 1109–1132.
 12. Hillarp N.A., Fuxe K. and Dahlstrom A. Demonstration and mapping of central neurons containing dopamine, noradrenaline, and 5-hydroxytryptamine and their reactions to psychopharmaca. Pharmacol. Rev., 1966, v. 18, № 1, p. 727–741.
 13. Kuhar M.J., Couceyro P.R. and Lambert P.D. Catecholamines. In: Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1999, p. 243–261.
 14. Lyck L., Dalmau I., Chemnitz J. et al. Immunohistochemical markers for quantitative studies of neurons and glia in human neocortex. J. Histochem. Cytochem., 2008, v. 56, № 3, p. 201–221.
 15. Prince J. Catecholamine dysfunction in attention-deficit/hyperactivity disorder: an update. J. Clin. Psychopharmacol., 2008, v. 28, № 3, suppl.2, p. S39–S45.
 16. Remington G. Alterations of dopamine and serotonin transmission in schizophrenia. Prog. Brain Res., 2008, v. 172, p. 117–140.
 17. Semenenko F.M., Cuello A.C., Goldstein M. et al. A monoclonal antibody against tyrosine hydroxylase: application in light and electron microscopy. J. Histochem. Cytochem., 1986, v. 34, p. 817–821.
 18. Ugrumov M., Melnikova V., Ershov P. et al. Tyrosine hydroxylase-and/or aromatic L-amino acid decarboxylase-expressing neurons in the rat arcuate nucleus: ontogenesis and functional significance, Psychoneuroendocrinology, 2002, v. 27, № 5, p. 533–548.
 19. Yadid G. and Friedman A. Dynamics of the dopaminergic system as a key component to the understanding of depression. Prog. Brain Res., 2008, v. 172, p. 265–286.

Поступила в редакцию 16.06.10

APPLICATION OF DIFFERENT TYROSINE HYDROXYLASE ANTIBODIES FOR THE STUDY OF CATECHOLAMINERGIC SYSTEMS OF MAMMALIAN BRAIN

I.P. Grigoriev, M.S. Vasilenko, Ye.G. Sukhorukova and D.E. Korzhevskiy

Immunohistochemical reaction demonstrating the key enzyme of catecholamine (CA) synthesis — tyrosine hydroxylase (TH) — is currently used as the major morphologic technique for detection of the catecholamine-synthesizing neurons in the brain. At the moment, several monoclonal TH-antibodies are available, which are prepared using different immunogens. The aim of the present study was to compare the results of TH detection in the neurons of rat and human brain using two different antibody clones: TOH A1 and 1B5. Clone TOH A1 antibodies were found to be appropriate for the detection of neurons of the catecholaminergic (CAE) neural centers of the rat. Clone 1B5 antibodies may be used for the visualization of rat and human CA-synthesizing neurons as well as for efferent nerve fibers demonstration in the target areas of CAE innervation.

Key words: *brain, antibodies, catecholamines, tyrosine hydroxylase*

Laboratory of the Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, Department of Neuropharmacology, RAMS North-Western Branch Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg