

О.В. Кирик¹, И.П. Григорьев¹, Е.Г. Сухорукова¹, Н.В. Павлова² и Д.Э. Коржевский¹

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ИММУНОЦИТОХИМИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРАНИЦЫ МЕЖДУ СУБВЕНТРИКУЛЯРНОЙ ЗОНОЙ КОНЕЧНОГО МОЗГА И СТРИАТУМОМ

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; ² лаборатория физиологии движений (зав. — проф. Ю.П. Герасименко), Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург; e-mail: iemmorphol@yandex.ru

Субвентрикулярная зона (СВЗ) конечного мозга, предполагаемый главный источник нейральных стволовых клеток у взрослых млекопитающих, недостаточно хорошо выявляется при использовании обычных гистологических окрасок. В настоящей работе изучена возможность использования иммуноцитохимических подходов для четкого определения границы между СВЗ и стриатумом. Показано, что применение реакции на тирозингидроксилазу и синаптофизин оптимально для определения границы между стриатумом и СВЗ у различных млекопитающих.

Ключевые слова: субвентрикулярная зона, головной мозг, иммуноцитохимия, тирозингидроксилаза, синаптофизин

В настоящее время накоплено достаточно большое количество данных, свидетельствующих о том, что в головном мозгу млекопитающих, включая человека, сохраняются особые области (так называемые эмбриональные ниши) [7], в которых на протяжении всего постнатального периода идут процессы нейро- и глиогенеза. Одной из этих ниш является субвентрикулярная зона (СВЗ), расположенная между слоем эпендимцитов латеральной стенки бокового желудочка и нейропилем стриатума. Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению нейрогенеза в СВЗ, представления о ее микроанатомических границах неоднозначны. Определение границ этой области на препаратах, предназначенных для наблюдений в проходящем свете и при флуоресцентной микроскопии, затруднительно в связи с отсутствием отчетливых морфологических ориентиров со стороны стриатума. С учетом того, что одной из важных задач исследования гистогенетических процессов мозга у взрослых млекопитающих является изучение миграции нейробластов из СВЗ в стриатум [8, 10], необходим селективный морфологический метод, позволяющий без использования электронной микроскопии четко разграничить стриатум и СВЗ.

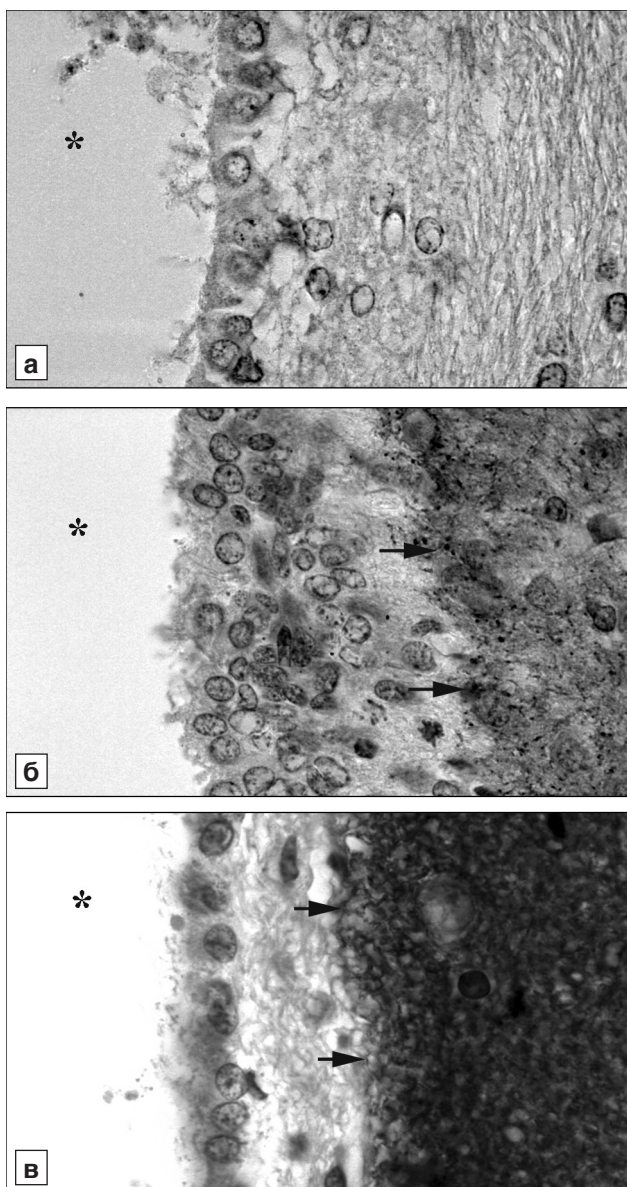
Цель данного исследования состояла в разработке новых методических подходов, позволяющих на гистологических препаратах, предназначенных для световой микроскопии, четко

определять границу между СВЗ и стриатумом у различных млекопитающих.

На основании сведений о медиаторной и ультраструктурной организации стриатума [4], а также результатов собственных предварительных исследований [1, 2], были определены белки, которые могут выявляться в нейропиле стриатума и предположительно отсутствуют (либо присутствуют в минимальных количествах) в СВЗ.

Ранее было установлено, что нейроны стриатума имеют многочисленные синаптические контакты с катехоламинергическими проекциями нейронов черного вещества, составляющими нигростриатное звено нигрострионигральной системы [4]. В то же время, СВЗ содержит, преимущественно, глиальные клетки и малодифференцированные клетки-предшественники, не способные формировать синапсы [6]. Кроме того, в стриатуме имеется собственная холинергическая система и присутствует основной фермент синтеза ацетилхолина — холинацетилтрансфераза [9], тогда как в СВЗ присутствие этого фермента маловероятно. Электронно-микроскопические исследования свидетельствуют об отсутствии синапсов в СВЗ [6] и значительном их количестве в нейропиле стриатума [5].

Эти данные позволили выделить группу маркерных белков, которые могли бы быть полезны при разработке методических подходов для решения задачи настоящего исследования, — это тирозингидроксилаза (ключевой фермент синтеза



Стенка бокового желудочка конечного мозга крысы (а, б) и кошки (в).

а — окраска толуидиновым синим по методу Ниссля; б — иммуногистохимическая реакция поликлональными антителами на тирозингидроксилазу; в — иммуногистохимическая реакция поликлональными антителами (Monosan) на синаптофизин с подкраской гематоксилином. Звездочка — полость желудочка; стрелки — граница между субвентрикулярной зоной и нейропилем стриатума. Об. 100, ок. 10.

катехоламинов), синаптофизин (белок синаптических пузырьков), холинацетилтрансфераза (фермент синтеза ацетилхолина).

Работа выполнена на половозрелых животных обоего пола — крысах линии Вистар ($n=10$) и беспородных кошках ($n=3$). Содержание и умерщвление животных осуществляли с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Головной мозг крыс фиксировали погружением в цинк-этанол-формальдегид

[3], обезжизняли и заливали в парафин обычным способом. Головной мозг кошек фиксировали методом перфузии. Под глубоким наркозом проводили транскардиальную перфузионную фиксацию головного мозга раствором, состоящим из 4% параформальдегида на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4). После извлечения из черепной коробки головной мозг освобождали от оболочек, помещали в 0,1 М фосфатный буфер и оставляли при комнатной температуре на ночь. На следующий день начинали обезжизнение материала и затем производили заливку в парафин обычным способом. Срезы головного мозга толщиной 5–7 мкм изготавливали на ротационном и санном микротоме Leica (Германия).

В качестве обзорных гистологических окрасок использовали ШИК-реакцию с докраской гематоксилином и окраску толуидиновым синим по методу Ниссля (рисунок, а).

Иммуноцитохимическое выявление тирозингидроксилазы, синаптофизина и холинацетилтрансферазы проводили при помощи соответствующих первичных антител и наборов вторичных реагентов (таблица). Часть срезов докрашивали квасцовым гематоксилином.

В результате проведения реакции на тирозингидроксилазу было обнаружено, что в нейропиле стриатума головного мозга у крыс наиболее ярко (без фона) окрашиваются катехоламинергические нервные волокна, выявляемые антителами № 6 (см. рисунок, б), которые при малом увеличении, сливаясь, выглядят как интенсивно окрашенное поле, соответствующее анатомическим границам nucl. caudatus/putamen. Окрашенная зона (нейропил стриатума) заканчивается недалеко от эпендимы, область СВЗ остается неокрашенной. Граница СВЗ и стриатума неровная, но четкая. Толщина СВЗ неравномерна в различных участках стенки желудочка (400–800 мкм).

В результате проведения реакции на синаптофизин было обнаружено, что в стриатуме у крыс ярко окрашивается весь нейропил. В СВЗ сплошная окраска отсутствует, однако отчетливо видны отдельные синаптофизин-иммунопозитивные точки, соответствующие предполагаемой локализации синапсов, располагающиеся на равном расстоянии между эпендимой и стриатумом, образуя дополнительную синаптическую область в пределах СВЗ, которая хорошо выражена не во всех ее участках. Тем не менее, граница между стриатумом и СВЗ четкая. Выявление границы СВЗ дает результат, совпадающий с полученным при проведении реакции на тирозингидроксилазу.

Использованные реагенты и результаты реакции

№ п/п	Первичные антитела	Вторичные системы детекции	Результат
1	К синаптофизину поликлональные кроличьи (Dako, Дания)	Super Sensitive Polymer-HRP Detection Kit HRP/DAB (BioGenex, США)	+
2	К синаптофизину моноклональные мышьиные, клон SY38 (Dako, Дания)	Envision+ (Dako, Дания)	+
3	К синаптофизину поликлональные кроличьи (Monosan, Нидерланды)	Super Sensitive Polymer-HRP Detection Kit HRP/DAB (BioGenex, США)	+
4	К тирозингидроксилазе моноклональные мышьиные, клон ТОН-А1 (BD Pharmingen, США)	Envision+ (Dako, Дания)	—
5	К тирозингидроксилазе моноклональные мышьиные, клон 1B5 (Novocastra, Великобритания)	Envision+ (Dako, Дания)	+
6	К тирозингидроксилазе поликлональные кроличьи, ab112 (AbCam, Великобритания)	Super Sensitive Polymer-HRP Detection Kit HRP/DAB (BioGenex, США)	+
7	К холинацетилтрансферазе поликлональные кроличьи, ab68779 (AbCam, Великобритания)	Super Sensitive Polymer-HRP Detection Kit HRP/DAB (BioGenex, США)	0
8	К холинацетилтрансферазе поликлональные кроличьи, AB143 (Millipore Chemicon, США)	Super Sensitive Polymer-HRP Detection Kit HRP/DAB (BioGenex, США)	—

Примечание. (+) — интенсивная специфическая иммуноцитохимическая реакция, позволяющая четко визуализировать границу между субвентрикулярной зоной (СВЗ) и стриатумом; (—) — реакция, не позволяющая четко визуализировать границу между СВЗ и стриатумом; (0) — специфическая реакция на препаратах отсутствует. DAB — диаминобензидин, HRP — пероксидаза хрена.

Различия между интенсивностью окраски при использовании различных видов антител к синаптофизину отсутствуют. Фоновая реакция при применении моноклональных антител ниже, чем при использовании поликлональных антител.

В результате проведения реакции на холинацетилтрансферазу антителами № 7 не удается получить специфической окраски структур внутреннего положительного контроля, что свидетельствует о непригодности этих антител для обработки использованного материала.

В результате проведения реакции на холинацетилтрансферазу антителами № 8, помимо холинергических структур — внутреннего положительного контроля, окрашивается эпендима желудочков головного мозга. Нейропилъ стриатума определяется недостаточно отчетливо. Граница СВЗ и стриатума нечетка и неконтрастна.

Для проверки воспроизводимости полученных результатов на других млекопитающих антитела, давшие оптимальную специфическую реакцию на срезах головного мозга крысы (антитела к синаптофизину № 2 и № 3, антитела к тирозингидроксилазе № 6), были также апробированы на срезах головного мозга кошки. В результате проведенных реакций при обработке этими антителами четко определялась граница между СВЗ и нейропилем хвостатого ядра (см. рисунок, в).

Полученные результаты показывают, что иммуногистохимические реакции на тирозингид-

роксилазу и синаптофизин могут быть рекомендованы для уточнения границ СВЗ при проведении исследований нейрогенеза у различных млекопитающих. Кроме того, полученное свидетельство о существовании в СВЗ у крыс собственной синаптической зоны, не дающей положительную реакцию на тирозингидроксилазу, указывает на наличие особой иннервации данной области.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 10-04-00180а, проект 11-04-01693а, проект 10-04-00676а).

ЛИТЕРАТУРА

- Григорьев И.П., Василенко М.С., Сухорукова Е.Г. и Коржевский Д.Э. Применение различных антител к тирозингидроксилазе для изучения катехоламинергических систем головного мозга млекопитающих. Морфология, 2010, т. 138, вып. 6, с. 60–63.
- Григорьев И.П., Кирик О.В., Алексеева О.С. и Коржевский Д.Э. Применение иммуногистохимической реакции на тирозингидроксилазу для определения наружной границы субвентрикулярной пролиферативной зоны конечного мозга. В кн.: Материалы 8-й Всероссийской научной конференции: «Бабушкинские чтения в Орле». М., изд. ЗАО «Ретиноиды». 2011, вып. 32, с. 63–64.
- Коржевский Д.Э. и Гиляров А.В. Основы гистологической техники. СПб., СпецЛит, 2010.
- Отеллин В.А. и Арушанян Э.Б. Нигрострионигральная система. М., Медицина, 1989.
- 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.
6. Gil-Perotin S., Duran-Moreno M., Belzunegui S. et al. Ultrastructure of the subventricular zone in *Macaca fascicularis* and evidence of a mouse-like migratory stream. *J. Comp. Neurol.*, 2009, v. 514, p. 533–554.
 7. Miller F.D. and Gauthier-Fisher A. Home at last: neural stem cell niches defined. *Cell Stem Cell*, 2009, v. 4, № 6, p. 507–510.
 8. Nam S.C., Kim Y., Dryanovski D. et al. Dynamic feature of post-natal subventricular zone cell motility: a two-photon time-lapse study. *J. Comp. Neurol.*, 2007, v. 505, № 2, p. 190–208.
 9. Schulz D., Sergeeva O.A., Lanovskii E. et al. Behavioral parameters in aged rats are related to LTP and gene expression of ChAT and NMDA-NR2 subunits in the striatum. *Eur. J. Neurosci.*, 2004, v. 19, № 5, p. 1373–1383.
 10. Zhang R.L., Le Tourneau Y., Gregg S.R. et al. Neuroblast division during migration toward the ischemic striatum: a study of dynamic migratory and proliferative characteristics of neuroblasts from the subventricular zone. *J. Neurosci.*, 2007, v. 27, № 12, p. 3157–3162.

Поступила в редакцию 30.09.2011
Получена после доработки 23.10.2011

APPLICATION OF IMMUNOCYTOCHEMICAL TECHNIQUE FOR THE DETERMINATION OF THE BORDER BETWEEN FOREBRAIN SUBVENTRICULAR ZONE AND STRIATUM

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

Forebrain subventricular zone (SVZ) — the putative major source of neural stem cells in the brain of adult mammals — can hardly be visualized using routine histological staining. The present study was focused on the possibility of application of immunocytochemical approach for accurate delineation of the border between SVZ and striatum. It was shown that immunocytochemical reactions demonstrating tyrosine hydroxylase or synaptophysin were optimal for the determination of the border between SVZ and striatum in different mammals

Key words: *brain, subventricular zone, immunocytochemistry, tyrosine hydroxylase, synaptophysin*

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; Laboratory of Locomotor Physiology, RAS I.P. Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg