

Многоцветная флуоресцентная иммуногистохимическая окраска коры головного мозга человека*

Ефимова О.И.¹, Попов К.В.², Петренко Н.В.³, Анохин К.В.^{1,4}

¹ — Курчатовский комплекс НБИКС-технологий, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182, Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1

² — Ресурсный центр Нейрокогнитивных исследований Курчатовского комплекса НБИКС-технологий, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182, Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1

³ — Патологоанатомическое отделение Государственного бюджетного учреждения «Городская клиническая больница №12 Департамента здравоохранения г.Москвы», 115516, Россия, Москва, ул. Бакинская, д. 26

⁴ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина», 125315, Россия, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Разработан способ многоцветной флуоресцентной иммуногистохимической окраски постмортальных образцов мозга человека, позволяющий визуализировать на одном срезе до пяти маркеров одновременно. В связи с тем, что основной трудностью флуоресцентной иммуногистохимии нервной ткани человека является высокая автофлуоресценция фона, вызванная формальдегидной фиксацией и флуоресценцией липофусциновых гликолипопротеидов, целью работы было минимизировать автофлуоресценцию и, одновременно, усилить иммуногистохимический сигнал молекулярных маркеров белков интереса. В работе представлены результаты мультифлуоресцентной иммуногистохимической окраски 30 мкм срезов префронтальной коры человека с использованием антител к AQP1, CHRNВ3, GFAP, визуализацией клеточных ядер и кровеносных сосудов. Показано, что мягкая формальдегидная фиксация и обработка 1% раствором судана черного В в 70% этиловом спирте, наряду с использованием растворов, блокирующих неспецифическое связывание антител, стрептавидиновых конъюгатов и AlexaFluor, снижают автофлуоресценцию фона, а использование вторичных и третичных систем детекции с флуоресцентными красителями AlexaFluor и стрептавидиновых конъюгатов усиливают специфический иммуногистохимический сигнал.

Ключевые слова: иммуногистохимия, флуоресценция, постмортальные образцы мозга человека, конфокальная микроскопия

Для исследования принципов организации мозга в норме и патологии необходима визуализация микроархитектуры его клеточных компонентов и особенностей их связей. Иммуногистохимическое окрашивание с помощью хромогенных систем детекции и методов широкопольной световой микроскопии не позволяет детально охарактеризовать фенотип клеток, экспрессирующих белок интереса. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия обладает улучшенной разрешающей способностью за счет апертуры, ограничивающей поток фонового рассеянного света, и позволяет регистрировать мультиспектральные изображения с высокой степенью разделения сигналов от разных флуорохромов, что критически необходимо для исследования колокализации различных маркеров [2]. Основной трудностью флуоресцентного иммуногистохимического окрашивания нервной ткани человека является высокая автофлуоресценция фона образца, вызванная формальдегидной фиксацией и флуоресценцией липофусциновых гликолипопротеидов в цитоплазме нейронов, которая может маскировать специфический сигнал [5].

Целью работы было разработать способ многоцветной флуоресцентной иммуногистохимической окраски постмортальных образцов мозга человека, позволяющий

минимизировать фоновую автофлуоресценцию ткани и, одновременно, усилить иммуногистохимический сигнал молекулярных маркеров белков интереса, а также валидировать разработанный метод на образцах префронтальной коры человека с одновременной визуализацией до пяти каналов флуоресценции на одном срезе.

Исследования проводили на постмортальных образцах левого полушария мозга человека ($n = 3$, мужчины, $74 \pm 4,58$ года, постмортальный интервал $13,67 \pm 1,75$ (mean \pm SD), без неврологических и психиатрических нарушений), предоставленных патологоанатомическим отделением ГКБ №12. Образцы мозга были вырезаны в соответствии с Атласом цитоархитектоники коры большого мозга человека [1], в локализованном месте цитоархитектонического поля 10 Бродмана. Препараты нарезали на блоки толщиной 10 мм и фиксировали в свежеприготовленном растворе 4% параформальдегида в 0,1М фосфатно-солевом буфере (PBS), pH 7,4 при 4°C в течение 5 дней. Затем образцы промывали несколько раз в PBS и хранили в PBS с добавлением 0,01% азида натрия при 4°C до последующего использования. Из фиксированных 10 мм блоков с помощью вибрирующего микротомы Leica VT1200S изготавливали серийные срезы толщиной 30 мкм. Все операции со срезами проводили в 24-луночных куль-

* Работа выполнена в соответствии с планом НИЦ «Курчатовский институт» ГЗ 2015 г. по пункту 1.2 на оборудовании Ресурсного центра Нейрокогнитивных исследований Курчатовского комплекса НБИКС-технологий.

туральных планшетах с индивидуальными вставками в лунки, имеющими сетчатое дно (Savillex, 700-724), если не указано иначе.

Для демаскирования антигенов плавающие срезы помещали в микропробирки с 10 мМ цитратным буфером, рН 6,0, инкубировали их в термошейкере при 95°C 10 мин, и перекладывали во вставки культуральных планшетов, где промывали PBS с 0,5% Triton X-100 (0,5% PBST) три раза по 10 мин при комнатной температуре, перекладывая пинцетом вставки со срезами в лунки с новым раствором. Пермеабиллизацию и блокирование неспецифического связывания антител проводили в блокирующем буфере, содержащем 5% нормальную лошадиную сыворотку, 5% нормальную ослиную сыворотку и 5% нормальную козью сыворотку в 1% PBST в течение 1 ч при комнатной температуре на шейкере, отмывали 0,5% PBST три раза по 10 мин.

Реакцию со смесью первичных антител (1:500, см. табл. 1) проводили в 0,5% PBST, содержащем 5% нормальную лошадиную сыворотку, 5% нормальную ослиную сыворотку и 5% нормальную козью сыворотку, в течение 48 ч при 4°C на шейкере. После отмывки в 0,5% PBST и инкубации со вторичными биотинилированными антителами, сделанными в лошади против антител кролика в 0,5% PBST (1:250, см. табл. 2) в течение 2 ч при комнатной температуре срезы промывали в 0,5% PBST и с помощью реагента Image-iT FX Signal Enhancer (Molecular Probes) блокировали неспецифическое связывание флуоресцентных конъюгатов AlexaFluor в течение 30 мин при комнатной температуре. Срезы отмывали в 0,5% PBST и инкубировали в смеси антител с флуоресцентной меткой — антителами против мыши, сделанными в осле, конъюгированными с зеленым флуоресцентным красителем AlexaFluor488, антителами против курицы, сделанными в козе, конъюгированными

ми с красным флуоресцентным красителем AlexaFluor568, и стрептавидином, конъюгированным с дальним красным флуоресцентным красителем AlexaFluor647 (1:500—1:1000, см. табл. 2) в течение 16—18 ч при 4°C, затем срезы отмывали в PBS.

Для блокирования автофлуоресценции липофусцина срезы помещали в 1% раствор судана черного В в 70% этаноле на 10 мин [6], затем промывали три раза по 10 мин в PBS. Окрашенные срезы приклеивали на предметные стекла, оставляли на 5 мин на воздухе, наносили заливку для флуоресцентных препаратов на водной основе Fluoromount (Sigma), в которую предварительно добавляли флуоресцентный ядерный краситель DAPI (0,5 мкг/мл, Molecular probes), покрывали срезы прозрачными стеклами и герметизировали их прозрачным лаком.

Контроль специфичности связывания антител проводили методом пропуска первичных и/или вторичных антител. Контроль неспецифического связывания стрептавидина проводили с использованием набора Streptavidin/Biotin Blocking Kit (Vector Lab). За исключением автофлуоресценции крови в сосудах постмортальной ткани, видимой в синем и зеленом каналах, на всех контрольных микропрепаратах отсутствовало неспецифическое окрашивание.

Изображения микропрепаратов получали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Olympus FluoView10i с использованием водно-иммерсионного объектива UPLSAPO 60X с числовой апертурой 1.20. Съемку проводили последовательно в разных каналах, чтобы избежать неспецифической засветки из других каналов: DAPI, AlexaFluor488, AlexaFluor568, AlexaFluor647 и фазовый контраст. Совмещение и анализ изображений проводили с помощью компьютерного обеспечения Imaris 7.2.3 (Bitplane).

Таблица 1

Первичные антитела, использованные для мультифлуоресцентной иммуногистохимии

| № | Наименование | Хозяин | Клональность | Титр | Производитель, кат. № |
|---|-------------------|--------|----------------|-------|-------------------------------|
| 1 | Антитела к AQP1 | Мышь | Моноклональные | 1:500 | Santa Cruz, sc-55466 |
| 2 | Антитела к CHRNB3 | Кролик | Поликлональные | 1:500 | Novus Biologicals, NBP1-91783 |
| 3 | Антитела к GFAP | Курица | Поликлональные | 1:500 | Abcam, ab134436 |

Таблица 2

Вторичные антитела и красители, использованные для мультифлуоресцентной иммуногистохимии

| № | Наименование | Хозяин | Конъюгат | Титр | Производитель, кат. № |
|---|---|--------|---------------|--------|---------------------------|
| 1 | Антитела к иммуноглобулинам IgG мыши | Осел | AlexaFluor488 | 1:1000 | Molecular Probes, A-21202 |
| 2 | Антитела к иммуноглобулинам IgG кролика | Лошадь | Биотин | 1:250 | Vector Labs, BA-1100 |
| 3 | Антитела к иммуноглобулинам IgY курицы | Коза | AlexaFluor568 | 1:1000 | Molecular Probes, A-11041 |
| 4 | Стрептавидин | | AlexaFluor647 | 1:500 | Molecular Probes, S-21374 |
| 5 | DAPI | | | 1:500 | Molecular Probes, D1306 |

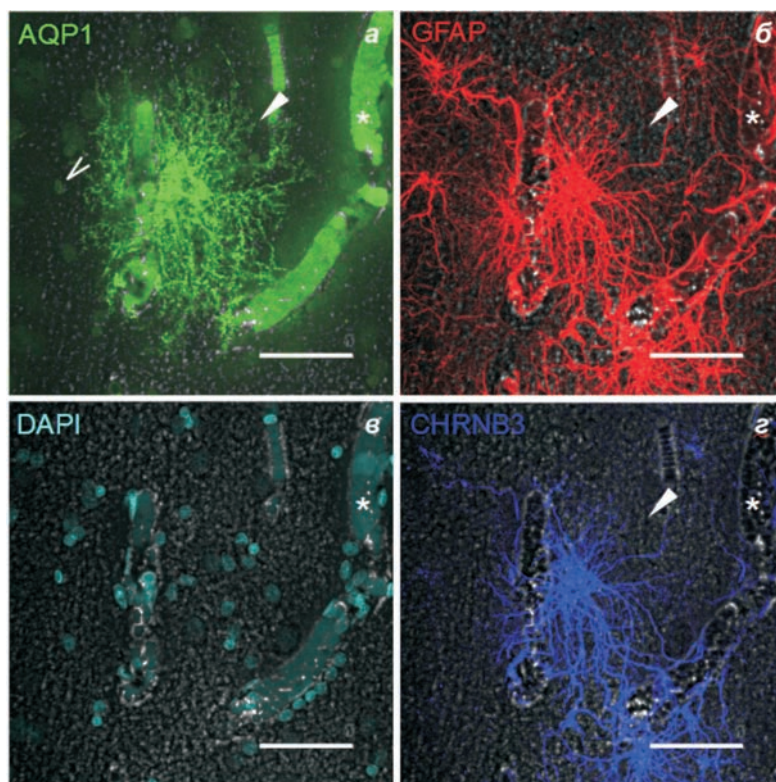


Рис. 1. Флуоресцентная иммуногистохимическая окраска префронтальной коры человека: *а* – антитела к аквапорину 1 (AQP1); *б* – антитела к глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP); *в* – флуоресцентная окраска ядер DAPI; *г* – антитела к никотиновому ацетилхолиновому рецептору $\beta 3$ (CHRNB3). Шкала – 50 мкм. Серый фон – изображение среза в режиме фазового контраста. Звездочкой обозначена автофлуоресценция одного из кровеносных сосудов. Залитая стрелка указывает на иммунореактивность в цитоплазме и отростках некоторых клеток. Открытая стрелка показывает на слабую иммунореактивность в ядрах некоторых клеток.

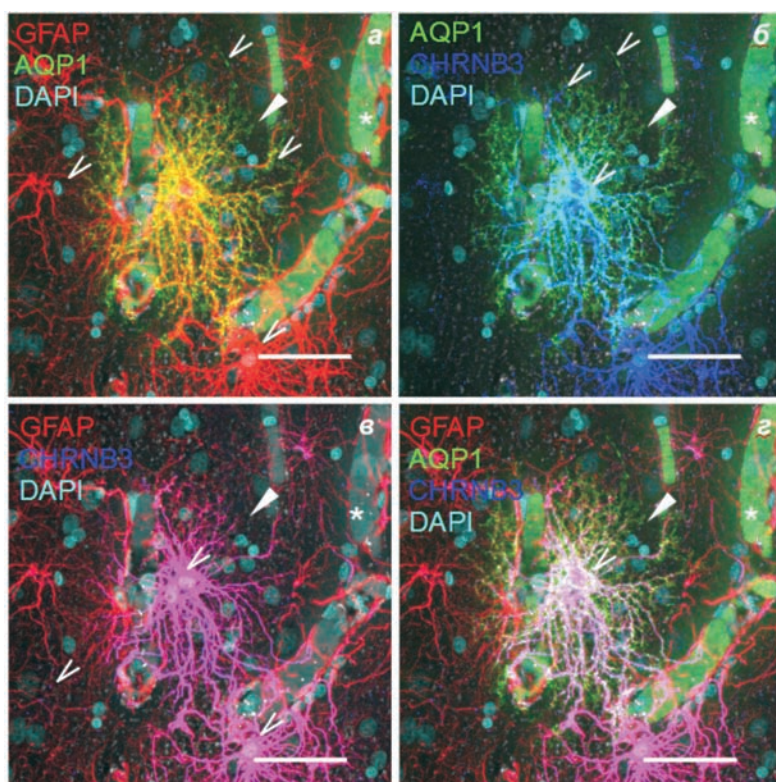


Рис. 2. Колокализация многоцветной флуоресцентной иммуногистохимической окраски префронтальной коры человека: *а* – наложение изображений окраски антителами к аквапорину 1 (AQP1) и маркеру астроцитов (GFAP); *б* – наложение изображений окраски антителами к AQP1 и никотиновому ацетилхолиновому рецептору $\beta 3$ (CHRNB3); *в* - наложение изображений окраски антителами к CHRNB3 и GFAP; *г* – наложение изображений окраски антителами к AQP1, CHRNB3 и GFAP. Шкала – 50 мкм. DAPI – флуоресцентная окраска ядер, серый фон – изображение среза в режиме фазового контраста. Звездочкой обозначена автофлуоресценция одного из кровеносных сосудов. Залитая стрелка указывает на астроцитарную локализацию иммунореактивности к AQP1 и CHRNB3. Открытые стрелки показывают особенности экспрессии AQP1, CHRNB3 и GFAP.

Валидацию разработанного способа мультифлуоресцентной иммуногистохимической окраски проводили на срезах префронтальной коры человека с использованием антител к аквапорину 1 (AQP1), никотиновому ацетилхолиновому рецептору $\beta 3$ (CHRNВ3), глиальному фибриллярному кислом белку (GFAP) — маркеру астроцитов, а также с одновременной визуализацией клеточных ядер и кровеносных сосудов. Выбор антител к AQP1 и CHRNВ3 представлял дополнительную актуальность в связи с тем, что функции и паттерны экспрессии AQP1 и CHRNВ3 в мозге человека очень мало изучены, хотя их мутации у человека связаны с развитием нейропатологий [3, 4].

Флуоресцентная иммуногистохимическая окраска показала, что белки AQP1 и CHRNВ3 экспрессируются в цитоплазме и отростках субпопуляции клеток префронтальной коры человека (рис. 1а и 1г соответственно). Отростки этих клеток ассоциированы с кровеносными сосудами, выявляемыми по автофлуоресценции крови и изображению среза в фазовом контрасте (рис. 1а, 1б, 1з). Слабая иммунореактивность к AQP1 наблюдалась также в ядрах некоторых клеток (рис. 1а, 1б, 1в).

Колокализацию многоцветной флуоресцентной иммуногистохимической окраски префронтальной коры человека анализировали после наложения изображений, полученных в разных каналах. Методом наложения было показано, что AQP1 и CHRNВ3 экспрессируются в некоторых GFAP+ астроцитах (рис. 2а, 2в). Экспрессия AQP1 наблюдалась преимущественно в проксимальных отростках астроцитов и имела субклеточную локализацию, отличную от CHRNВ3. Обнаружены отдельные субпопуляции астроцитов, экспрессирующие CHRNВ3 и экспрессирующие AQP1 и CHRNВ3 (рис. 2б, 2в, 2г). Полученные результаты указывают на специфический характер локализации AQP1 и CHRNВ3 в астроцитах и требуют дальнейших исследований выявленных субпопуляций астроцитов в норме и при патологии.

Таким образом, мягкая формальдегидная фиксация и обработка 1% раствором судана черного В в 70% этиловом спирте, наряду с использованием растворов, блокирующих неспецифическое связывание антител, стрептавидиновых конъюгатов и AlexaFluor, эффективно снижают фоновую автофлуоресценцию образцов коры головного мозга человека, а использование вторичных и третичных систем детекции с флуоресцентными красителями AlexaFluor и стрептавидиновых конъюгатов усиливают специфический иммуногистохимический сигнал. Разработанный способ многоцветной флуоресцентной иммуногистохимической окраски образцов коры головного мозга может быть использован для детальной визуализации микроархитектуры нервной ткани человека в норме и патологии.

Список литературы

1. Саркисов С.А., Филимонов И.Н., Кононова Е.П. и др. Атлас цитоархитектоники коры большого мозга человека. — М.: Медгиз., 1955. — 280 с.
2. Феофанов А.В. Спектральная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия в биологических исследованиях // Успехи биологической химии. — 2007. — Т. 47. — С. 371–410.
3. Badaut J., Fukuda A.M., Jullienne A., Petry K.G. Aquaporin and brain diseases // Biochim Biophys Acta. — 2014. — Vol. 1840. — №5. — P. 1554–65.
4. Bar-Shira A, Gana-Weisz M, Gan-Or Z, Giladi E, Giladi N, Orr-Urtreger A. CHRNВ3 с.-57А>G functional promoter change affects Parkinson's disease and smoking // Neurobiol Aging. — 2014. — Vol. 35. — №9. — P. 2179.e1-6.
5. Diez-Fraile A., Van Hecke N., Guerin C.J., D'Herde K. Optimizing multiple immunostaining of neural tissue: Applications of immunocytochemistry // InTech Publishing. — 2012. — P. 29–48.
6. Schnell S.A., Staines W.A., Wessendorf M.W. Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue // J Histochem Cytochem. 1999. — Vol. 47. — № 6. — P. 719–30.

Поступила 12.10.2015

Received 12.10.2015

Multicolor fluorescence immunohistochemistry of human prefrontal cortex

Efimova O.I.¹, Popov K.V.², Petrenko N.V.³, Anokhin K.V.^{1,4}

¹ — Kurchatov complex of NBICS-technologies, National research centre «Kurchatov Institute», 123182, Russia, Moscow, Akademika Kurchatova sq., 1

² — Resource centre of Neurocognitive research, Kurchatov complex of NBICS-technologies, National research centre «Kurchatov Institute», 123182 Russia, Moscow, Akademika Kurchatova sq., 1

³ — Department of Pathologoanatomy, State Budgetary Healthcare Institution of Moscow «City Clinical Hospital №12», 115516, Russia, Moscow, Bakinskaya str., 26.

⁴ — P.K. Anokhin Institute of Normal Physiology, 125315 Russia Moscow, Baltiyskaya str, 8.

Multicolor fluorescence immunohistochemistry on human postmortal brain samples was optimized to allow simultaneous imaging of more than five markers on one section. The main difficulty of fluorescence immunohistochemistry on human nervous tissue is its high background autofluorescence due to formaldehyde fixation and lipofuscin glycolipoprotein fluorescence. We aimed to minimize background autofluorescence and, simultaneously, enhance signal from molecular markers of the proteins of interest. Here we present the results of multicolor fluorescence immunohistochemistry on 30 mkm sections of human prefrontal cortex stained with antibodies against AQP1, CHRNВ3, GFAP and cellular nuclei and blood vessels imaging. We demonstrated, that mild formaldehyde fixation and treatment with 1% Sudan black B in 70% ethanol together with blocking steps, preventing unspecific binding of antibodies, streptavidin conjugates and AlexaFluor, decreased background fluorescence, and application of secondary / tertiary detection systems with AlexaFluor / streptavidin conjugates enhanced specific immunohistochemical signal.

Keywords: immunohistochemistry, fluorescence, postmortal human brain samples, confocal microscopy