



МЕТОД
МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ МИКРОГЛИОЗА В
БЕЛОМ ВЕЩЕСТВЕ ГОЛОВНОГО
МОЗГА
(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

УО «Гомельский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ:

Майбогин А.М., д.м.н., профессор Недзьведь М.К., Карапетян Г.М.

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкции) предложен метод морфологической диагностики и оценки микроглиоза в белом веществе головного мозга при различных заболеваниях на основе иммуногистохимического выявления биохимического маркера микроглии.

Настоящая инструкция предназначена для врачей-патологоанатомов, нейро- и онкоморфологов.

Перечень используемых сокращений

ИГХ	— иммуногистохимия
CD68	— рецептор к клеткам микроглии
ДАБ	— диаминобензидин

Перечень необходимого оборудования, реагентов и расходных материалов

Оборудование:

1. Микротом с возможностью изготовления гистологических срезов толщиной не более 4 мкм.
2. рН-метр.
3. Термостат.
4. Автоматические пипетки переменного объема.
5. Баня водяная с датчиком температуры.
6. Световой микроскоп.
7. Таймер/секундомер.

Реактивы и расходные материалы:

1. Предметные стекла для ИГХ (или предметные стекла предварительно обработанные поли-L-лизинном или силаном).
2. Покровные стекла.
3. Лабораторная посуда (колбы, пробирки, стеклянные палочки, воронки, стаканы, контейнеры для предметных стекол).

4. Ксилол.
5. 96% спирт.
6. Перекись водорода 3%.
7. Tris-HCl – отмывочный буфер, pH=7,5.
8. Буфер для разведения специфических антител .
9. Буфер для демаскировки антигенов, pH=6,0.
10. Карандаш для ИГХ.
11. Раствор ДАБ.
12. Первичные моноклональные антитела к CD68 (клон KP1).
Обязательным условием является наличие в спецификации указания о возможности использования на формалин-фиксированных тканях человека.

Показания к применению: заболевания и патологические состояния, сопровождающиеся микроглиозом в белом веществе головного мозга.

Противопоказания для применения: нет.

Забор материала для исследования

Головной мозг извлекается из черепа, помещается в раствор 10% нейтрального формалина и фиксируется в течение 7 дней. Для исследования берут по 1 фрагменту из симметричных участков правой и левой лобной, теменной, височной и затылочной долей головного мозга, а также 2 фрагмента симметрично из гиппокампа (см.рис.1).

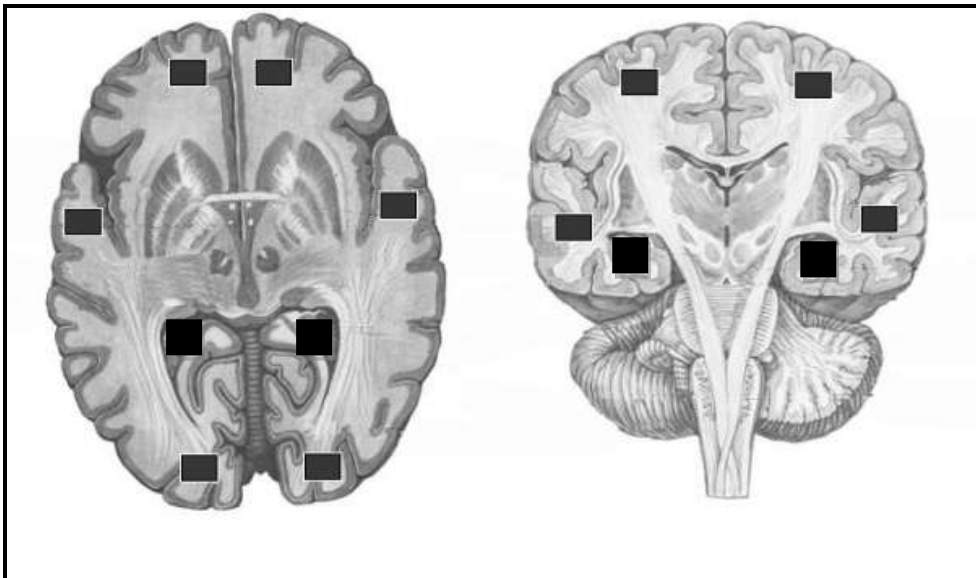


Рисунок 1 — Схематичное отображение участков забора материала для исследования.

Белое вещество полушарий головного мозга исследуется в пределах от границы VI слоя коры до условной линии, соединяющей основание извилины с фундальными отделами расположенных рядом борозд.

Вырезку гиппокампа следует проводить таким образом, чтобы в препарате определялись основные структурные поля гиппокампа (CA1-CA3). Морфометрическую оценку состояния клеток микроглии в гиппокампе следует проводить в слое Alveus, а также в молекулярном слое аммонова рога и зубчатой фасции.

Технология использования иммуногистохимического метода определения экспрессии CD 68

I этап. Депарафинирование и обезвоживание.

1. Поместить стекла с парафиновыми срезами последовательно в две порции ксилола на 10 мин.
2. Стекла поместить последовательно в три порции этанола 96% на 3 мин.

3. Промыть срезы в трех порциях дистиллированной воды и поместить последовательно в две порции дистиллированной воды на 5 мин в каждую.

II этап. Предобработка с целью демаскировки антигенов, направленная на восстановление структуры белка, которая изменилась в ходе фиксации и заливки в парафин.

1. Поместить срезы в емкость с демаскировочным буфером pH=6,0 и погрузить на 10 мин в водяную баню при температуре равной 96-99°C.

2. После демаскировки оставить емкость со срезами при комнатной температуре на 20 мин.

3. Промыть срезы в двух порциях дистиллированной воды по 5 мин.

4. Поместить срезы в 3% раствор перекиси водорода на 20 мин.

5. Промыть в дистиллированной воде 3 раза по 2 мин.

III этап. Проведение иммуногистохимической реакции

1. Срезы обвести карандашом для ИГХ.

2. Нанести первичное антитело (анти-CD68), разведенное согласно указаниям производителя в буфере для разведения специфических антител. Слайды разместить горизонтально в герметичной емкости, дно которой покрыть фильтровальной бумагой, смоченной водой. Емкость поместить в холодильник на ночь.

3. Слить со срезов жидкость.

4. Срезы промыть в Tris-буфере 2 раза по 5 мин.

5. Нанести на срезы визуализирующую систему на полимерной основе к мышинным или кроличьим антителам, или универсальную (к мышинным и кроличьим антителам) на 30 мин.

6. Промыть в Tris-буфере 2 раза по 5 мин.

7. Нанести раствор ДАБ. Раствор ДАБ приготовить в соответствии с рекомендациями изготовителя непосредственно перед нанесением на

срезы, инкубировать 6-8 мин. Длительность инкубации в ДАБ устанавливается в каждой лаборатории индивидуально, для чего необходимо наблюдать процесс появления коричневого окрашивания под микроскопом. Время окрашивания считается достаточным, если структуры подлежащие окрашиванию, приобрели ярко-золотисто-коричневый цвет, в то время как фоновое окрашивание стромальных компонентов отсутствует

8. Слить со срезов жидкость и промыть дистиллированной водой.

9. Срезы докрасить гематоксилином Майера. Время окрашивания зависит от качества и степени зрелости гематоксилина и составляет 40-60 с.

10. Промыть дистиллированной водой.

IV этап. Просветление и заключение срезов

1. Обезвоживание в спиртах.

2. Просветление в ксилоле.

3. Заключение в канадский бальзам.

Для контроля активности первичных антител в каждой серии необходимо проведение одного отрицательного и одного положительного контрольного окрашивания. В качестве отрицательного контрольного окрашивания срезы вместо инкубации с первичным антителом покрываются 1% раствором сывороточного альбумина. В качестве положительного контроля для антител к CD68 могут быть использованы случаи церебральной патологии с известной высокой экспрессией данных маркеров в ткани головного мозга. Окраска расценивается как положительная только при отсутствии окрашивания в отрицательном контрольном препарате, и как отрицательная, при наличии окрашивания в положительном контрольном препарате.

Интерпретация и критерии оценки результатов ИГХ окрашивания маркера CD68

Результат ИГХ выявления антигена CD68 представлен в виде гомогенного окрашивания цитоплазмы клеток микроглии в коричневый цвет различной интенсивности от светло-золотистого до темно-коричневого оттенка.

Подсчет клеток микроглии, обладающих признаками стойкой и четкой окраски на CD68, а также остальных клеток глии белого вещества следует проводить в гистологических срезах в 10 случайных полях зрения при увеличении x400. Далее определяется относительное число клеток с положительной экспрессией антигена CD 68, которое представляет собой отношение общего числа иммунопозитивных клеток к общему числу всех клеток глии белого вещества, выражаемое в процентах. При этом подсчет окрашенных клеток производится без учета интенсивности пероксидазной метки (в области с максимальной экспрессией).

Подсчет и определение относительного числа иммунопозитивных клеток также могут быть осуществлены с использованием персонального компьютера с установленным пакетом прикладного программного обеспечения для морфометрических исследований, соединенного с микроскопом, оборудованным цифровой камерой.

Критерии оценки результатов:

- микроглиоз отсутствует, если в исследуемой ткани головного мозга количество окрашенных на CD68 клеток составляет менее 15%;
- наличие микроглиоза диагностируют при определении цитоплазматической окраски в 15 и более процентах клеток, окрашенных на CD 68, причем слабопозитивный микроглиоз – при наличии 15–30%

окрашенных клеток, умереннопозитивный – при наличии более 30 до 40% и сильнопозитивный – при наличии более 40% окрашенных клеток.

Возможные ошибки и пути их устранения

Ошибочные результаты при исследовании тканевых маркеров микроглии могут быть получены при:

- использовании реагентов с истекшим сроком годности;
- неточном дозировании реагентов;
- неправильном заборе и фиксации патоморфологического материала;
- нарушениях в технологии лабораторного тестирования (время инкубации, температурный режим и т.д.).

Для устранения возможных ошибок необходимо использовать только качественные годные к употреблению реактивы и строго соблюдать технологию лабораторного тестирования. С целью повышения специфичности реакции необходимо включение положительных и отрицательных контролей в число тестируемых образцов при каждой процедуре.

ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ

метода морфологической диагностики и оценки микроглиоза в белом веществе головного мозга при различных заболеваниях на основе иммуногистохимического выявления биомолекулярного маркера микроглии

Предлагаемый метод относится к патологической анатомии, является морфологическим и позволяет на тканевом уровне диагностировать микроглиоз в белом веществе головного мозга.

Содержание микроглиоцитов в белом веществе центральной нервной системы взрослого человека составляет по разным оценкам около 8-13% от общего количества глиальных клеток [1,7]. Однако многие хронические заболевания и патологические процессы различной этиологии сопровождается значительным увеличением количества этих клеток в паренхиме мозга. Это явление получило название микроглиоз. Микроглия рассматривается в нейроморфологии как маркер различных воспалительных и нейродегенеративных заболеваний головного мозга, поскольку любые его повреждения сопровождаются активацией этих клеток и их дальнейшей миграцией в измененные участки мозга. Наряду с классическими фагоцитарными свойствами, клетки микроглии синтезируют различные цитокины и нейромедиаторы, регулирующие регенераторные процессы в нервной системе и оказывающие модулирующее влияние на нейроны и глиально-сосудистый компонент нервной ткани. Это определяет значительное воздействие микроглии на активность всего головного мозга или отдельных его зон, что особенно выражено при различных его повреждениях. Также имеются данные о том, что в условиях патологии активация микроглии зачастую существенно опережает повреждения нейронов (нейродегенерацию) и может наблюдаться даже в ее отсутствие, что наблюдается при

нейродегенеративных заболеваниях, в том числе болезни Паркинсона, хорее Гентингтона и других [2-4].

Таким образом становится очевидным, что изучение реакций микроглии будет способствовать более полным представлениям о структуре, функции и химизме нервной системы в условиях различной патологии головного мозга.

В связи с этим разработка объективных методов морфометрической оценки реакций клеток микроглии является актуальной задачей.

К настоящему времени в отечественной и зарубежной литературе не встречается описаний объективных методов диагностики и количественной оценки микроглиоза в белом веществе головного мозга, несмотря на то, что изучение этого явления при различных психических и неврологических заболеваниях проводится уже достаточно давно.

Известны методы выявления микроглии по Ортега и по Мийагава в модификации Александровской [2-5]. При этом кусочки мозга фиксируют в соответствующих растворах сроком до 12 дней, готовят замороженные срезы, импрегнируют в растворе аммиачного серебра и проводят дальнейшую обработку кислым формалином. Недостатками данных методов является то, что они трудоемки, капризны, требуют больших затрат времени и редких реактивов. Кроме того, эти методы не обеспечивают надлежащей точности, поскольку лежащая в их основе реакция импрегнации проходит только в части клеток микроглии.

Также известен метод окраски микроглии в составе нейроглиальных комплексов головного мозга по Ниссю и гематоксилином и эозином [6]. Недостатками метода являются: 1) использование окрасок, не являющихся селективными для идентификации клеток микроглии; 2) отсутствуют объективные критерии оценки наблюдаемых результатов.

Наиболее близкими к предлагаемому нами методу диагностики и оценки микроглиоза в белом веществе головного мозга являются методы Зайчикова Д.А., Morgan и Wojtera.

Согласно методике Зайчикова Д.А. [7] исследуют фрагменты из симметричных участков лобных, теменных, височных и затылочных долей головного мозга. Препараты окрашивают гематоксилином и эозином, а также по Шпильмейеру и по Нислю. Астроциты и олигодендроциты идентифицируют с применением электронной микроскопии, после чего проводится подсчет всех клеток глии. Недостатками данного метода являются: 1) отсутствие селективной идентификации микроглии и оценки ее изменений; 2) технологическая сложность; 3) способ не предусматривает оценку микроглии в гиппокампе, для которого, как известно, свойственны различные морфологические изменения, наблюдаемые при многих патологических процессах в нервной системе.

По методу Wojtera [8] фрагменты коры больших полушарий головного мозга и мозжечка подвергались иммуногистохимическому исследованию с применением специфических антител к клеткам микроглии, подсчитывалось их абсолютное число, которое в дальнейшем сравнивали среди исследуемой и контрольной групп. Недостатки метода: 1) отсутствие указаний, какие конкретно участки коры полушарий и мозжечка необходимо брать для исследования; 2) отсутствие количественной оценки микроглиоза; 3) не изучается состояние микроглии гиппокампа.

Метод Morgan [9] предполагает взятие участков коры больших полушарий из области префронтальной извилины с последующей иммуногистохимической идентификацией микроглии и стереологическим определением ее плотности и объема; дается

качественная морфологическая оценка микроглии в баллах. К недостаткам данного метода можно отнести: 1) ограниченную область отбора материала (префронтальная извилина); 2) отсутствие количественной оценки микроглиоза; 3) не изучается состояние микроглии гиппокампа.

С целью устранения недостатков перечисленных методов нами разработан новый метод диагностики микроглиоза в белом веществе головного мозга с количественной оценкой полученных результатов.

Сущность предлагаемого метода заключается в следующем: для исследования берут фрагменты ткани белого вещества из симметричных участков всех долей головного мозга и гиппокампа, после чего гистологические срезы окрашивают иммуногистохимическим методом с использованием моноклональных антител к клеткам микроглии, подсчитывают данные клетки в 5 полях зрения при увеличении $\times 400$ в каждом срезе мозга. Затем определяют относительное число клеток с положительной экспрессией антигенов CD68, которое представляет собой отношение числа иммунопозитивных клеток к числу остальных клеток глии в данном поле зрения, выражаемое в процентах.

Оценку ИГХ выявления клеток микроглии осуществляют с использованием персонального компьютера с установленным пакетом программного обеспечения для морфометрических исследований либо путем расчета среднего арифметического значения относительных чисел иммунопозитивных клеток во всех наблюдениях.

Если в исследуемой ткани количество окрашенных на CD68 клеток менее 15% — микроглиоз отсутствует, от 15 до 30% диагностируется слабopозитивный, выше 30% до 40% — умереннопозитивный и при более 40% — сильнопозитивный микроглиоз.

Предлагаемый метод позволяет достоверно выявлять клетки микроглии, т.к. применяется иммуногистохимическое окрашивание срезов

с использованием специфической сыворотки, что имеет преимущества перед стандартными гистохимическими окрасками методом импрегнации.

В предлагаемом методе впервые изучается состояние клеток микроглии белого вещества гиппокампа для диагностики микроглиоза в головном мозге. При этом наибольшая активность микроглиоцитов в гиппокампе в условиях различной патологии обнаруживалась в слое Alveus, а также в молекулярном слое аммонова рога и в полях CA1-CA3 зубчатой фасции.

Также впервые нами приведены количественные критерии оценки микроглиоза в белом веществе головного мозга и их интерпретация.

Предлагаемый метод может быть осуществлен как с использованием цифровой камеры и соответствующего программного обеспечения, так и в визуальном режиме, что определяет доступность его использования в повседневной морфологической практике.

Таким образом, на основании проведенного анализа литературы и собственных наблюдений можно заключить, что заявленный метод диагностики микроглиоза в белом веществе головного мозга обладает новизной, является доступным, воспроизводимым и объективным, а его использование соответствовало бы современным нейроморфологическим и клиническим стандартам.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Гомеостаз и пластичность мозга : монография / Ю.Г. Васильев, Д.С. Берестов. – Ижевск : ФГБОУ ВПО Ижевская ГСХА, 2011. – 216 с.

2. Коломеец Н.С. Значение реактивности микроглии в патологии мозга при шизофрении. // Журнал неврологии и психиатрии.-2009. –Т. 109. –С. 60-63.
3. Александровская М.М. К вопросу о реакциях мезоглии и эктоглии при шизофрении. Труды ин-та им. П.Б. Ганнушкина.М 1939; 3: 291— 312..
4. Белецкий В.К., Скобникова В.К. Патоморфология психозов. Рязань 1968
5. Г.А.Меркулов. Курс патологогистологической техники. Л.: «Медицина», 1969.
6. Морфометрическое исследование нейроглиальных комплексов головного мозга при судебно-медицинской диагностике наркоманий / Богомолов Д.В., Пиголкин Ю.И., Должанский О.В. // Судебно-медицинская экспертиза. — 2001 — №4. — С. 18
7. Зайчиков, Д.А. Морфологическая и морфометрическая оценка реакций глии белого вещества головного мозга при некоторых неврологических заболеваниях : автореф. дис. ... канд. мед. Наук : 14.03.02 / Д. А. Зайчиков ; ФГБОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» МО РФ. — Санкт-Петербург., 2011. — 24 с.
8. Expression of immunohistochemical markers on microglia in Creutzfeldt-Jakob disease and Alzheimer's disease: morphometric study and review of the literature / M. Wojtera [et al.] // Folia Neuropathol. – 2012. – Vol. 50, № 1. – P. 74-84.

9. Microglial Activation and Increased Microglial Density Observed in the Dorsolateral Prefrontal Cortex in Autism / J. T. Morgan [et al.] // BIOL PSYCHIATRY. – 2010. – Vol. 68. – P. 368-376.

Аспирант кафедры патологической
анатомии с курсом судебной медицины
УО «Гомельский государственный
медицинский университет»

_____ Майбогин А.М.

Профессор кафедры патологической
Анатомии УО «Белорусский
государственный медицинский
университет»,
доктор медицинских наук

_____ Недзьведь М.К.

Заведующий лабораторией
Информационно-компьютерных
Технологий Научно-исследовательской
части УО «Белорусский
государственный медицинский
университет

_____ Карапетян Г.М.