

DOI: 10.18499/2225-7357-2019-8-2-91-99

УДК 616-018

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

© Коллектив авторов, 2019

Особенности применения методов гистохимии и иммуногистохимии для выявления амилоидных бляшек в коре головного мозга человека

В. В. Гусельникова¹, М. В. Антипова^{1, 2}, Е. А. Федорова¹, А. Е. Сафрай^{3, 4},
А. А. Рукавишникова^{3, 4}, Е. В. Михайлова⁵, Д. Э. Коржевский^{1, 4}

¹ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

²ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

³ГКУЗ Ленинградской области Бюро судебно-медицинской экспертизы, Санкт-Петербург, Россия

⁴ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

⁵ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Амилоидные (сенильные) бляшки – нерастворимые внеклеточные агрегаты β-амилоидного пептида, которые формируются в головном мозге человека как в ходе нормального старения, так и при развитии старческой деменции альцгеймеровского типа.

Целью данной работы стало изучение особенностей выявления амилоидных бляшек в коре головного мозга пожилых людей методами гистохимии и иммуногистохимии.

Материал и методы. Материалом для исследования служили образцы коры головного мозга людей обоих полов (79–98 лет, n = 23). Для гистохимического выявления амилоида применяли окраску Конго красным и альциановым синим. Для иммуногистохимической идентификации амилоидных бляшек использовали конформационно-специфические ОС-антитела, для выявления астроцитов – антитела к глияльному фибриллярному белку (GFAP). Для одновременного выявления амилоидных бляшек и астроцитов ставили двойную иммунофлуоресцентную реакцию ОС/GFAP.

Результаты. Показано, что применение классических гистохимических методик оказывается неэффективным для идентификации амилоидных бляшек в мозге пожилых людей, позволяя выявлять лишь единичные скопления амилоида. Иммуногистохимическая реакция с применением антител к конформационным эпитопам амилоидных фибрилл позволяет идентифицировать многочисленные амилоидные бляшки и изучать их морфологию. Иммуногистохимическая реакция на GFAP, являющийся маркерным белком астроцитов, также подходит для первичного анализа имеющихся образцов мозга на наличие или отсутствие амилоидных бляшек. Разработанный нами в рамках представленной работы протокол двойной иммунофлуоресцентной реакции ОС/GFAP позволяет с высокой специфичностью выявлять одновременно и амилоидные бляшки, и астроциты. Это дает возможность изучать пространственную взаимосвязь данных элементов, а также строить 3D-реконструкции, дающие наиболее полную информацию о структурных особенностях и взаимном расположении астроцитов и амилоидных бляшек.

Ключевые слова: амилоид, амилоидные (сенильные) бляшки, болезнь Альцгеймера, Конго красный, альциановый синий, антитела к конформационным эпитопам амилоидных фибрилл (ОС-антитела), GFAP.

Distinctive Features of Histochemical and Immunohistochemical Techniques for Amyloid Plaque Detection in the Human Cerebral Cortex

© V.V. Guselnikova¹, M.V. Antipova^{1, 2}, E.A. Fedorova¹, A.E. Safray^{3, 4}, A.A. Rukavishnikova^{3, 4}, E.V. Mikhailova⁵, D.E. Korzhevskii^{1, 4}, 2019

¹Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russia

²Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

³Leningrad Region Bureau of Forensic Medical Expertise, Saint-Petersburg, Russia

⁴Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint-Petersburg, Russia

⁵Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, Saint-Petersburg, Russia

Amyloid plaques (also known as senile plaques) are insoluble extracellular aggregates of the β-amyloid peptide that accumulate in the human brain under normal aging and Alzheimer disease.

The aim of this work was to study distinctive features of amyloid plaque detection in the cerebral cortex of the elderly with histochemical and immunohistochemical techniques.

Material and methods. This study included samples of brain cortex of humans, males and females, aged 79–98, n = 23. Histochemical detection of amyloid was performed using the Congo red and the sodium sulphate-Alcian Blue methods. Anti-amyloid fibrils OC antibodies were used for immunohistochemical identification of amyloid plaques, anti-GFAP antibodies were used for astrocyte detection, a double immunofluorescent OC/GFAP reaction was performed for simultaneous detection of amyloid plaques and astrocytes.

Results. The study results have demonstrated that classical histochemical methods are not effective for identification of amyloid plaques in the human brain allowing detecting only isolated amyloid accumulations. Immunohistochemical reaction with application of anti-amyloid fibrils OC antibodies allows identifying numerous amyloid plaques and studying plaque morphology. Immunohistochemical reaction with application of GFAP, being an astrocyte marker protein, is also suitable for the primary analysis of the human brain samples for the presence or absence of amyloid plaques. The double OC/GFAP immunofluorescence protocol developed by the authors makes it possible to identify both amyloid plaques and astrocytes with high specificity, to further study their spatial relationship and to create 3D reconstructions giving comprehensive information about the structural features and spatial relationship of astrocytes and amyloid plaques.

Keywords: amyloid, amyloid (senile) plaques, Alzheimer disease, the Congo red, the sodium sulphate-Alcian Blue, anti-amyloid fibrils OC antibodies, GFAP.

***Автор для переписки:**

Гусельникова Валерия Владимировна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», ул.
Академика Павлова, 12, г. Санкт-Петербург, 197376,
Российская Федерация.

E-mail: Guselnicova.Valeriia@yandex.ru

***Corresponding author:**

Valeriya Gusel'nikova
Institute of Experimental Medicine, ul. Akademika Pavlova,
12, Saint-Petersburg, 197376, Russian Federation
E-mail: Guselnicova.Valeriia@yandex.ru

Введение

Амилоиды – группа белков, способных формировать патологические фибриллы, которые представляют собой уложенные в стопку антипараллельные β -структуры. Амилоидные фибриллы нерастворимы, вследствие чего они накапливаются в различных органах [4, 11]. В тканях головного мозга у человека нерастворимые фибриллы β -амилоида образуют так называемые амилоидные (сенильные) бляшки – внеклеточные белковые агрегаты, которые могут формироваться как в ходе нормального старения, так и при развитии некоторых нейродегенеративных заболеваний, в том числе болезни Альцгеймера [18]. Диагностика данного заболевания затруднена вследствие гетерогенности клинических проявлений и отсутствия строго специфичных патогномоничных симптомов. Точный диагноз болезни Альцгеймера может быть установлен только на основании гистологического исследования образцов головного мозга. Накопление сенильных бляшек в данном случае является одним из основных гистопатологических признаков болезни [20]. В связи с этим, важным представляется использование для гистологического анализа проверенного и надежного метода идентификации амилоида. В настоящее время известно несколько способов выявления амилоидных скоплений в тканях человека. Наиболее широко используемым методом является окраска Конго красным. Данный краситель способен регулярно встраиваться между амилоидными фибриллами, что придает амилоиду красно-розовое окрашивание при световой микроскопии и зеленый цвет при микроскопии в поляризованном свете [6, 27]. Несмотря на повсеместное использование Конго красного для идентификации амилоида в практике научных,

клинических и патоморфологических лабораторий, в литературе имеются сведения о том, что данный метод окраски не всегда эффективен [21, 30]. Это ставит под сомнение возможность его применения в качестве рутинного метода идентификации амилоидных скоплений и постановки правильного диагноза. Кроме того, возникает вопрос о возможностях применения альтернативных методов идентификации амилоида в мозге человека.

Целью данной работы стало изучение особенностей выявления амилоидных бляшек в коре головного мозга человека методами гистохимии и иммуногистохимии.

Материал и методы исследования

Материалом для данного исследования служили образцы коры головного мозга людей обоих полов (79–98 лет, $n = 23$) из архива судебно-гистологического отделения (зав. отделением – к.м.н. А.Е. Сафрай) Бюро судебно-медицинской экспертизы Ленинградской области. Исследование проведено в соответствии с этическими нормами (заключение локального этического комитета ФГБНУ «ИЭМ» №3/18 от 22.11.2018 г). Образцы были фиксированы в 10% забуференном формалине, который является стандартным фиксатором для патологоанатомического исследования [1], и залиты в парафин по общепринятой методике. Для гистохимического выявления амилоида применяли 0.1% водный раствор Конго красного (Sigma-Aldrich, США) или 1% водный раствор альцианового синего 8G (Loba Chemie, Австрия). Для иммуногистохимической идентификации амилоидных бляшек применяли ОС-антитела к конформационным эпитомам амилоидных фибрилл (разведение 1:1000, Sigma-Aldrich, США). Для выявления астроцитов использовали антитела к глиальному фибриллярному кислом белку, GFAP (ready-to-use, Dako, Дания). Анализ препаратов проводили с помощью светового микроскопа Leica DM750 (Leica, Германия), для анализа изображений использовали компьютерную программу LAS EZ (Leica, Германия). Подсчет количества амилоидных бляшек, выявляемых разными методами, проводили на серийных срезах одного и того же случая. Подсчет осуществляли в программе ImageJ (США) на участке ткани, площадью в 1 мм².

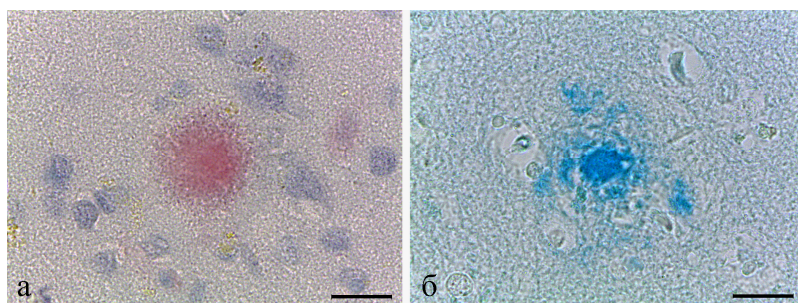


Рис. 1. Амилоидные скопления в коре головного мозга человека, окрашенные Конго красным (а) и альциановым синим (б). Масштабный отрезок – 20 мкм.

Для одновременного выявления амилоидных бляшек и астроцитов ставили двойную иммунофлуоресцентную реакцию ОС/GFAP. Для этого предварительно депарафинированные срезы подвергали процедуре теплового демаскирования в цитратном буфере (S1700, Agilent, США) в течение 20 минут, после чего на них наносили смесь (1:1) первичных антител, в качестве которых использовали кроличьи поликлональные конформационные ОС-антитела в разведении 1:500 (Sigma-Aldrich, США) и мышинные моноклональные (клон SPM507) антитела к GFAP в разведении 1:100 (SpringBioscience, США). В качестве вторичных реагентов использовали моновалентный Fab-фрагмент антикроличьего иммуноглобулина осли, конъюгированный с флуорохромом Rhodamine Red™-X (RRX) в разведении 1:100 (Jackson ImmunoResearch, США), биотинилированный антимышинный Fab-фрагмент иммуноглобулина осли в разведении 1:100 (Jackson ImmunoResearch, США), а также конъюгат стрептавидина с флуорохромом Cy2 в разведении 1:50 (Jackson ImmunoResearch, США). Исследование полученных препаратов проводили при помощи конфокального лазерного микроскопа LSM 710 (Zeiss, Германия).

Результаты и их обсуждение

Гистохимические методы окраски амилоидных скоплений Конго красным и альциановым синим

При анализе препаратов, окрашенных Конго красным, было показано, что в случае использования этого метода скопления амилоида в коре мозга человека выявляются редко. Лишь в 6 из 23 проанализированных образцов было отмечено присутствие в коре единичных конгофильных скоплений. Количество бляшек, окрашенных Конго красным, в случае, взятом для количественного анализа, составило 5 шт/мм² ткани. Отложения амилоида в данном случае располагались преимущественно в поверхностном слое коры и выглядели как внеклеточные скопления, гомогенно окрашенные Конго красным в розовый цвет (рис. 1, а). Выявленные конгофильные образования характеризовались округлой формой и имели размытую границу. Средний диаметр скоплений составил 14.5 ± 3.2 мкм. Вследствие малых размеров скоплений и их

небольшого количества, данные образования были с трудом различимы и могли быть идентифицированы только на большом увеличении микроскопа ($\times 40$, $\times 100$).

При окраске альциановым синим, как и в случае с Конго красным, скопления амилоида были обнаружены лишь в нескольких исследованных образцах и выявлялись в виде внеклеточных скоплений, расположенных в поверхностных слоях коры. Отложения амилоида в данном случае были окрашены в насыщенный синий цвет (рис. 1, б). При этом для одних скоплений было характерно наличие интенсивно окрашенной центральной области и расположенного вокруг нее волокнистого ореола (рис. 1, б), в то время как другие (соседние) бляшки выглядели как скопления, сформированные только волокнистыми структурами (без выраженной центральной области). Средний диаметр выявленных скоплений составил 30.1 ± 7.3 мкм. Средний диаметр центрального кора (без учета ореола) был равен 11.7 ± 2.7 мкм, что сопоставимо с размером структур, выявляемых при использовании Конго красного. Количество бляшек, окрашенных альциановым синим, в случае, взятом для количественного анализа, составило 19 в 1 мм² ткани.

В настоящее время гистохимические методы окраски широко используются для идентификации амилоида в тканях животных и человека [8, 12–14, 25]. Наиболее часто для выявления амилоидных скоплений применяют окраску Конго красным, которая считается «золотым стандартом» идентификации амилоида [26, 27]. В проведенных ранее исследованиях нами было показано, что использованный в настоящей работе протокол окраски Конго красным позволяет выявлять даже небольшие скопления амилоида в различных тканях [12–14]. Это свидетельствует об эффективности использованной методики в отношении выявления амилоида. В связи с этим, мы полагаем, что малое количество амилоидных скоплений, выявляемое при использовании Конго красного в коре головного мозга пожилых людей, связано со структурными особенностями формирующихся амилоидных скоплений. Это подтверждается имеющимися в литературе данными, свидетельствующими о существовании нескольких разновидностей амилоидных бляшек [9, 16, 19, 22, 24]. Большинство исследователей выделяет три основ-

ных типа – диффузные (или незрелые) бляшки, классические (или нейритные) бляшки и выгоревшие (от англ. «burnt-out») бляшки [15, 24, 29]. Диффузные бляшки представляют собой очаговые скопления агрегированного β -амилоидного пептида. Для данной разновидности бляшек не характерно фибриллярное строение, вследствие чего они не окрашиваются Конго красным. Классические бляшки состоят из трех основных компонентов – плотно упакованных фибрилл β -амилоида, формирующих центральный кор бляшки, ростков нервных клеток с признаками дегенеративных изменений и глиальных клеток (активированных астроцитов и микроглиоцитов, окружающих скопление амилоида). «Выгоревшие» бляшки состоят только из плотного центрального амилоидного кора и, как считают, представляют собой конечную стадию развития амилоидной бляшки. И классические, и «выгоревшие» бляшки, благодаря наличию амилоидных фибрилл в своей структуре, окрашиваются Конго красным [7, 24, 29].

Сопоставляя полученные нами результаты с данными литературы, можно предположить, что в проанализированных нами случаях преобладают диффузные бляшки, которые не связывают Конго красный, вследствие чего не идентифицируются при данной окраске. Единичные обнаруженные нами конгофильные скопления, вероятно, являются центральным кором классических и «выгоревших» бляшек, в котором плотность амилоидных фибрилл наиболее высока. Это объясняет небольшие размеры выявленных окрашенных структур.

Окраска альциановым синим применяется для выявления амилоида значительно реже по сравнению с Конго красным. A.D. Snow и соавт. (1987) впервые использовали данный метод для идентификации амилоидных бляшек в мозге людей с болезнью Альцгеймера. Авторы показали, что формирование отложений амилоида при данном заболевании ассоциировано с накоплением сульфатированных гликозамингликанов, что позволяет использовать окраску альциановым синим для выявления амилоидных бляшек [28]. В настоящее время известно, что гликозамингликаны вовлечены в процесс агрегации β -амилоида в нерастворимые амилоидные фибриллы [5].

Нами было показано, что при окраске альциановым синим в ряде случаев более интенсивно окрашивается центральная область бляшки. Вероятно, это является следствием присутствия в данной области большого количества гликозамингликанов. Выявление волокнистого ореола может быть связано с присутствием гликозамингликанов также в тех областях бляшки, где амилоидные фибриллы еще не обладают способностью связывать Конго красный (поэтому при окраске

Конго красным данного ореола не наблюдается). Этим, вероятно, объясняется также большее по сравнению с окраской Конго красным количество бляшек, выявляемых в случае использования альцианового синего.

Иммуногистохимические способы выявления амилоидных бляшек

В настоящее время для идентификации амилоида в тканях человека все чаще применяются методы иммуногистохимии, которые являются более специфичными по сравнению с гистохимическими методиками. Для выявления амилоидных бляшек в мозге человека наиболее широко используются антитела против β -амилоида – короткого пептида, являющегося основным компонентом амилоидных бляшек при болезни Альцгеймера [2]. Еще одним типом антител, позволяющим выявлять амилоидные бляшки, являются антитела к конформационным эпитопам амилоидных фибрилл (ОС-антитела). Показано, что эти антитела распознают общий эпитоп, специфичный для амилоидных фибрилл, независимо от их последовательностей [17].

В рамках проведенного нами исследования с использованием ОС-антител иммунопозитивные структуры были идентифицированы во всех исследованных образцах. Выявленные скопления, имеющие вид компактных очаговых образований, были многочисленны и присутствовали во всех слоях коры (рис. 2). Количество ОС-иммунопозитивных бляшек в случае, взятом для количественного анализа, составило 47 в 1 мм² ткани, что в 2.5 и 9.4 раз больше по сравнению с количеством, выявляемым при использовании альцианового синего и Конго красного соответственно. Большинство обнаруженных скоплений характеризовались округлой формой и четкими границами. При этом была отмечена гетерогенность морфологии выявленных амилоидных бляшек. Так, размер бляшек сильно варьировал. Для всех бляшек была характерна волокнистая структура. При этом в одних бляшках было отмечено присутствие плотного интенсивно-окрашенного центрального кора, связанного с внешним ободком спицеобразными расширениями (рис. 2, а), в то время как в других бляшках такого кора не наблюдалось и вся структура выглядела равномерно волокнистой. Для ряда бляшек было отмечено присутствие в центральной области одной или нескольких «пустот» – светлых участков, не содержащих продукта иммуногистохимической реакции. Иногда в местах таких «пустот» было отмечено присутствие клеточных элементов, идентифицируемых за счет подкрашивания ядер гематоксилином (рис. 2, б).

Ранее R. Kaye и соавт. показали, что применение ОС-антител позволяет выявлять все разновидности сенильных бляшек, в том

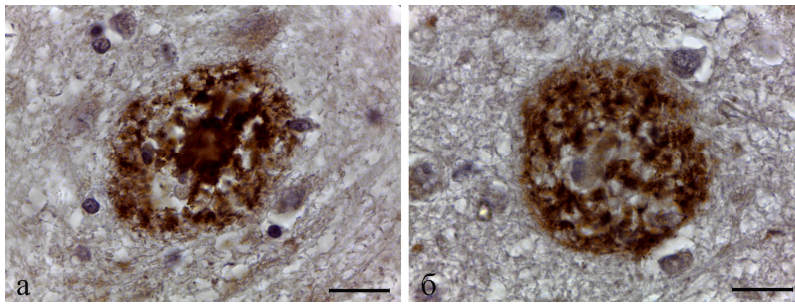


Рис. 2. Иммуногистохимическое выявление амилоидных бляшек в коре головного мозга человека. Иммуногистохимическая реакция с использованием антител к конформационным эпитопам амилоидных фибрилл (ОС-антител), подкрашивание ядер гематоксилином Эрлиха. Масштабный отрезок – 20 мкм.

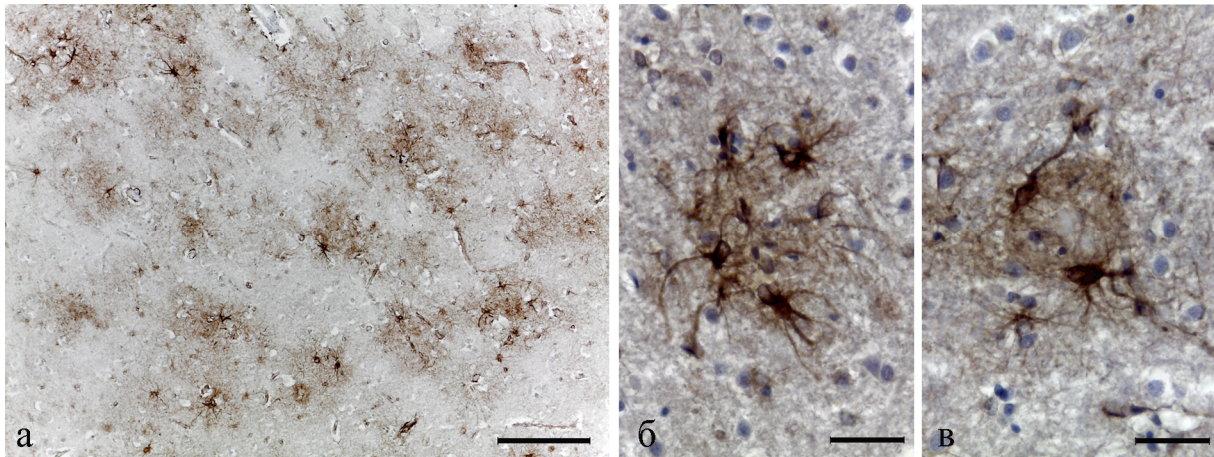


Рис. 3. Скопления астроцитов в коре головного мозга человека. Иммуногистохимическая реакция на глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), подкрашивание ядер гематоксилином Эрлиха. Масштабный отрезок – 200 мкм (а) и 50 мкм (б, в).

числе «незрелые» диффузные бляшки, которые не окрашиваются при использовании Конго красного [17]. Авторы объясняют это тем, что диффузные бляшки ошибочно считаются нефибриллярными структурами и на самом деле состоят из т.н. фибриллярных олигомеров, которые представляют собой растворимые молекулы диаметром до 250 кДа. По мнению R. Kaye и соавт., ОС-антитела, в отличие от Конго красного, способны связываться не только с полностью собранными амилоидными фибриллами, но и с фибриллярными олигомерами [17]. Это согласуется с полученными нами на основании окраски гистохимическими красителями данными, согласно которым большинство амилоидных бляшек в проанализированных нами образцах являются «незрелыми» диффузными бляшками. Такие бляшки не окрашиваются Конго красным и альциановым синим, но демонстрируют высоко интенсивную иммуногистохимическую реакцию, что объясняет отмеченное нами различие в количестве конгофильных отложений и иммунопозитивных структур в одних и тех же образцах коры головного мозга.

Для первичной оценки имеющихся образцов коры головного мозга человека на наличие или отсутствие амилоидных бляшек может быть использована иммуногистохимическая реакция на глиальный фибриллярный кислый белок (glial fibrillary acidic protein, GFAP). GFAP относится к III типу белков промежуточных филаментов и является маркерным белком астроцитов [3]. При постановке

иммуногистохимической реакции на GFAP нами было показано, что в коре головного мозга пожилых людей присутствуют как нормальные (не активированные) астроциты, так и клетки с признаками активации, характеризующиеся гипертрофией тел и отростков и высоко интенсивной реакцией на GFAP. Такие реактивные астроциты формируют в коре головного мозга многочисленные скопления, хорошо различимые даже на малом увеличении микроскопа (рис. 3, а). В большинстве случаев выявленные скопления, сформированные телами реактивных астроцитов и их переплетающимися отростками, не имеют четкой формы (рис. 3, б). В редких случаях скопления имеют округлую форму. В центре таких структур визуализируется гомогенное вещество, слегка подкрашенное гематоксилином (рис. 3, в). Количество четко выраженных скоплений, сформированных астроцитами, в случае, взятом для количественного анализа, составило 11 мм² ткани. Из литературных данных известно, что подобные скопления активированных астроцитов формируются в коре головного мозга вокруг амилоидных бляшек [10, 23], поэтому присутствие скоплений реактивных астроцитов в коре мозга человека может выступать в качестве косвенного свидетельства наличия у него амилоидных отложений. В связи с этим, постановка иммуногистохимической реакции на GFAP может быть использована для предварительного анализа имеющихся образцов головного мозга на наличие или отсутствие амилоидных скоплений.

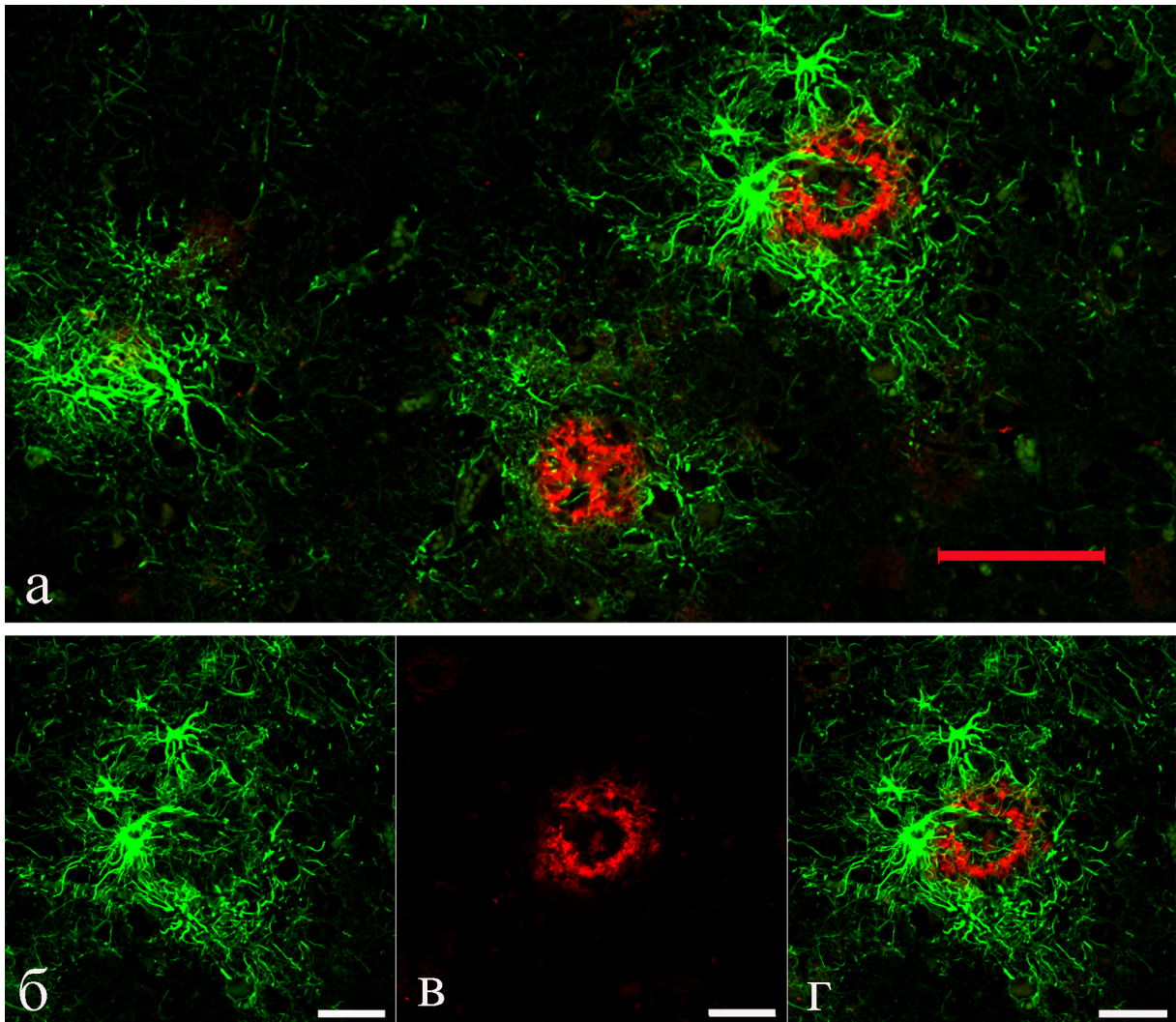


Рис. 4. Амилоидные бляшки, окруженные активированными астроцитами, в коре головного мозга человека. Иммуноцитохимическая реакция на амилоидные фибриллы, визуализация с помощью флуорохрома RRX (красный цвет), и на глиальный фибриллярный кислый белок, визуализация с помощью флуорохрома Cy2 (зеленый цвет). Конфокальная лазерная микроскопия. Объектив C-Apochromat 63x/1.20 W Corr M27 (водная иммерсия). Для возбуждения флуоресценции RRX и Cy2 использовали лазеры с длиной волны 561 нм и 488 нм соответственно. Раздельное (б, в) и объединенное (а, г) представление красного и зеленого каналов. Масштабный отрезок – 100 мкм (а) и 50 мкм (б–г).

Функциональное значение формирующейся при нейродегенерации пространственной ассоциации реактивных астроцитов с амилоидными бляшками остается не до конца понятным. Согласно последним данным литературы, реактивные астроциты, окружающие амилоидные бляшки, утрачивают свои нейротрофические функции и приобретают нейротоксические свойства [23]. Существование тесной пространственной и функциональной взаимосвязи между амилоидными бляшками и астроцитами делает актуальным одновременное выявление амилоида и астроглии в коре мозга человека, что осуществимо с помощью постановки двойной иммуноцитохимической реакции и применения метода конфокальной лазерной микроскопии. В рамках представленного исследования нами был разработан протокол, основанный на использовании смеси ОС-антител и антител к GFAP, который позволяет эффективно выяв-

лять и амилоидные бляшки, и астроциты в коре головного мозга человека. Результаты применения данного протокола представлены на рис. 4.

Применение метода конфокальной лазерной микроскопии дает возможность более детально, по сравнению с методом световой микроскопии, изучить каждую из исследуемых структур – и амилоидные бляшки, и астроциты. Так, например, в случае амилоидных скоплений хорошо идентифицируется фибриллярная структура бляшки (рис. 4, в), а иммунофлуоресцентное выявление астроцитов позволяет рассмотреть тонкие отростки клеток и проследить их ход (рис. 4, б), что затруднительно в случае использования световой микроскопии. Одновременное выявление и амилоидных бляшек, и астроцитов позволяет оценить взаимное расположение этих структур друг относительно друга (рис. 4, а, г). Показано, что тела астроцитов располагаются

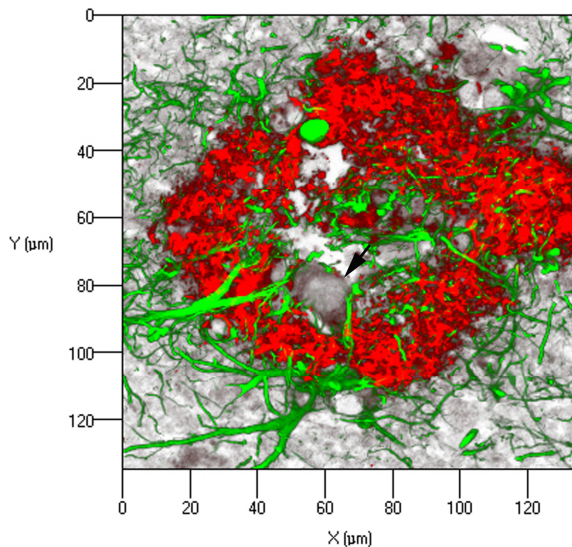


Рис. 5. Амилоидная бляшка, оплетенная отростками астроцитов, в коре головного мозга человека. Иммуноцитохимическая реакция на амилоидные фибриллы, визуализация с помощью флуорохрома RRX (красный цвет), и на глиальный фибриллярный кислый белок, визуализация с помощью флуорохрома Cy2 (зеленый цвет). Стрелка указывает на тело клетки. Конфокальная лазерная микроскопия. Пространственная реконструкция.

по периферии амилоидной бляшки (вплотную к ней или на некотором удалении), а отростки тянутся от тел клеток к бляшке, оплетая амилоидные фибриллы и доходя до центральной области бляшки (рис. 4, а, г). Было отмечено, что не все выявляемые амилоидные бляшки окружены активированными астроцитами.

Еще одним преимуществом метода конфокальной микроскопии является возможность построения 3D-реконструкций, анализ которых дает наиболее полную информацию о структурных особенностях и взаимном расположении астроцитов и амилоидных бляшек (рис. 5).

На представленной 3D-реконструкции (рис. 5) хорошо видна волокнистая структура амилоидной бляшки и распределение в ней астроцитарных отростков. Четко выявляются «пустоты» – иммунонегативные участки в центральной области бляшки, наличие которых было отмечено при использовании метода световой микроскопии. Одной из возможных причин формирования таких участков может быть присутствие в них клеточных элементов. Так, нами было отмечено, что в зоне одной из «пустот» находится сома клетки, предположительно являющейся нейроном (рис. 5, стрелка). Возможно, окружающее данную клетку «пустое» пространство в центре бляшки занято расширенными отростками нейрона, в которых накапливаются нейрофиламенты. Еще одним возможным объяснением наличия «пустот» является присутствие в данной области кровеносного сосуда, стенки которого оплетаются отростками аст-

роцитов, но не содержат амилоид. Также, возможно, что очень плотная упаковка амилоидных фибрилл в центральной области бляшки создает препятствие для связывания антител с соответствующими эпитопами в данных областях, вследствие чего такие участки оказываются иммунонегативными.

Заключение

Таким образом, в рамках представленного исследования нами были использованы методы гистохимии и иммуногистохимии для идентификации амилоидных бляшек в мозге пожилых людей. Показано, что применение классических гистохимических методик в данном случае оказывается неэффективным и позволяет выявлять лишь единичные скопления амилоида. Иммуногистохимическая реакция с применением антител к конформационным эпитомам амилоидных фибрилл позволяет идентифицировать многочисленные амилоидные бляшки и изучить их морфологию. Иммуногистохимическая реакция на GFAP, являющийся маркерным белком астроцитов, также подходит для первичного анализа имеющихся образцов на наличие или отсутствие амилоидных бляшек. Разработанный нами в рамках представленной работы протокол двойной иммунофлуоресцентной реакции ОС/GFAP позволяет с высокой специфичностью выявлять одновременно и амилоидные бляшки, и астроциты. Это позволяет изучать пространственную взаимосвязь данных элементов, а также строить 3D-реконструкции, дающие наиболее полную информацию о структурных особенностях и взаимном расположении астроцитов и амилоидных бляшек.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

1. Григорьев И.П., Коржевский Д.Э. Современные технологии фиксации биологического материала, применяемые при проведении иммуногистохимических исследований (обзор). Современные технологии в медицине. 2018; 10(2): 156-165 [Grigorev IP, Korzhevskii DE. Current Technologies for Fixation of Biological Material for Immunohistochemical Analysis (Review). *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2018 Jun;10(2):156-65] (in Russian).
2. Сухорукова Е.Г., Григорьев И.П., Кирик О.В., Коржевский Д.Э. Дополнительные гистологические и иммуноцитохимические методы, используемые при изучении нейродегенерации. В кн.: Молекулярная нейроморфология. Нейродегенерация и оценка реакции нервных клеток на повреждение. СПб: СпецЛит; 2015: 87-110 [Sukhorukova E.G., Grigor'ev IP, Kirik OV, Korzhevskii DE. *Dopolnitel'nye gistologicheskie i immunotsitokhimicheskie metody, ispol'zuemye pri izuchenii neurodegeneratsii*. In:

- Molekulyarnaya neiromorfologiya. Neurodegeneratsiya i otsenka reaktsii nervnykh kletok na povrezhdenie. Saint Petersburg: SpetsLit; 2015] (in Russian). 2
3. Сухорукова Е.Г., Гусельникова В.В. Иммуногистохимические маркеры астроцитов. В кн.: Иммуногистохимическое исследование головного мозга. СПб: СпецЛит; 2016: 85-109 [Sukhorukova EG, Gusel'nikova VV. Immunogistokhimicheskie markery astrotsitov. In: Immunogistokhimicheskoe issledovanie golovnogo mozga. Saint Petersburg: SpetsLit; 2016] (in Russian).
 4. Шавловский М.М. Молекулярные и генетические основы этиопатогенеза амилоидозов. Медицинский академический журнал. 2010; 10(4):63-81 [Schavlovsky MM. Etiology and pathogenesis of amyloidosis: the molecular and genetic basis. Medical Academic Journal. 2010;10(4):63-81] (in Russian).
 5. Ariga T, Miyatake T, Yu RK. Role of proteoglycans and glycosaminoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease and related disorders: Amyloidogenesis and therapeutic strategies-A review. Journal of Neuroscience Research. 2010 Apr 5;88(11):2303-15. doi: 10.1002/jnr.22393
 6. Bennhold H. Specific staining of amyloid with Congo red. Munchener Medizinische Wochenschrifte. 1922; 69:1537-38.
 7. Castellani R, Perry G. Molecular Pathology of Alzheimer's Disease. Colloquium Series on Neurobiology of Alzheimer's Disease. 2013 Oct 31;1(1):1-91. doi: 10.4199/coo095ed1v01y201310alz001
 8. Clement CG, Truong LD. An evaluation of Congo red fluorescence for the diagnosis of amyloidosis. Human Pathology. 2014 Aug;45(8):1766-72. doi: 10.1016/j.humpath.2014.04.016
 9. Delaere P, Duyckaerts C, He Y, Piette F, Hauw JJ. Subtypes and differential laminar distributions of pA4 deposits in Alzheimer's disease: relationship with the intellectual status of 26 cases. Acta Neuropathologica. 1991 Feb;81(3):328-35. doi: 10.1007/bf00305876
 10. Frost GR, Li Y-M. The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease. Open Biology. 2017 Dec;7(12):170228. doi: 10.1098/rsob.170228
 11. Gillmore JD, Hawkins PN. Pathophysiology and treatment of systemic amyloidosis. Nature Reviews Nephrology. 2013 Aug 27;9(10):574-86. doi: 10.1038/nrneph.2013.171
 12. Gusel'nikova VV, Antimonova OI, Fedorova EA, Shavlovskii MM, Krutikov AN, Mikhailova EV, et al. Fluorene Derivative Disodium Salt as a New Fluorescent Dye for Identification of Amyloid Deposits in Myocardium of mdx Mice. Cell and Tissue Biology. 2018 May;12(3):213-6. doi: 10.1134/s1990519x18030057
 13. Gusel'nikova VV, Antimonova OI, Fedorova EE, Shavlovskiy MM, Krutikov AN, Mikhailova EV, et al. Fluorescent characterization of amyloid deposits in the kidneys of mdx mice. European Journal of Histochemistry. 2018 Apr 3;62(2). doi: 10.4081/ejh.2018.2870
 14. Gusel'nikova VV, Gudkova AY, Semernin EN, Grudinina NA, Krutikov AN, Shavlovskii MM, et al. Characterization of amyloid deposits found in internal organs of mdx mice. Cell and Tissue Biology. 2017 Jan;11(1):27-34. doi: 10.1134/s1990519x17010047
 15. Haberland C. Clinical Neuropathology: text and color atlas. New York: Demos Medical; 2007.
 16. Ikeda SI, Allsop D, Glenner GG. Morphology and distribution of plaque and related deposits in the brains of Alzheimer's disease and control cases. Lab Invest. 1989 Jan;60:113-22.
 17. Kaye R, Head E, Sarsoza F, Saing T, Cotman CW, Necula M, et al. Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers. Molecular Neurodegeneration. 2007;2(1):18. doi: 10.1186/1750-1326-2-18
 18. Kumar A, Singh A, Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. Pharmacological Reports. 2015 Apr;67(2):195-203. doi: 10.1016/j.pharep.2014.09.004
 19. Liscic RM. Immunological Aspects and Anti-Amyloid Strategy for Alzheimer's Dementia. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology. 2013 Dec 1;64(4):603-8. doi: 10.2478/10004-1254-64-2013-2414
 20. Masters CL, Bateman R, Blennow K, Rowe CC, Sperling RA, Cummings JL. Alzheimer's disease. Nature Reviews Disease Primers. 2015 Oct 15;15056. doi: 10.1038/nrdp.2015.56
 21. Mavrogiorgou P, Gertz HJ, Ferszt R, Wolf R, Bär KJ, Juckel G. Are routine methods good enough to stain senile plaques and neurofibrillary tangles in different brain regions of demented patients? Psychiatria Danubina. 2011; 23(4): 334-39.
 22. Ogomori K, Kitamoto T, Tateishi J, Sato Y, Suetsugu M, Abe M. Beta-protein amyloid is widely distributed in the central nervous system of patients with Alzheimer's disease. The American journal of pathology [Internet]. 1989 [cited 2019 Apr 17];134(2):243-51. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1879581/>
 23. Perez-Nievas BG, Serrano-Pozo A. Deciphering the Astrocyte Reaction in Alzheimer's Disease. Frontiers in Aging Neuroscience. 2018 Apr 25;10. doi: 10.3389/fnagi.2018.00114
 24. Perl DP. Neuropathology of Alzheimer's Disease. Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine. 2010 Jan;77(1):32-42. doi: 10.1002/msj.20157
 25. Raghunathan V, Louis D, Wirk B. Gastrointestinal Tract Amyloidosis Presenting With Pneumatosis Intestinalis. Journal of Clinical Medicine Research. 2017;9(7):654-8. doi: 10.14740/jocmr2957w
 26. Real de Asua D, Galvan JM, Filigghedu MT, Trujillo D, Costa R, Cadinanos J. Systemic AA amyloidosis: epidemiology, diagnosis, and management. Clinical Epidemiology. 2014 Oct;369-77. doi: 10.2147/lep.s39981
 27. Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN, Ikeda S, Merlini G, Saraiva MJM, et al. Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. Amyloid. 2016 Oct;23(4):209-13. doi: 10.1080/13506129.2016.1257986
 28. Snow AD, Willmer JP, Kisilevsky R. Sulfated glycosaminoglycans in Alzheimer's disease. Human Pathology. 1987 May;18(5):506-10. doi: 10.1016/s0046-8177(87)80036-9

29. Wippold FJ, Cairns N, Vo K, Holtzman DM, Morris JC. Neuropathology for the Neuroradiologist: Plaques and Tangles. American Journal of Neuroradiology. 2007 Oct 9;29(1):18–22. doi: 10.3174/ajnr.a0781
30. Yakupova EI, Bobyleva LG, Vikhlyantsev IM, Bobylev AG. Congo Red and amyloids: history and relationship. Bioscience Reports. 2018 Dec 19;39(1):BSR20181415. doi: 10.1042/bsr20181415
-

Поступила в редакцию 22.03.2019
Принята в печать 6.05.2019

Received 22.03.2019
Accepted 6.05.2019

Для цитирования: Гусельникова В.В., Антипова М.В., Федорова Е.А., Сафрай А.Е., Рукавишников А.А., Михайлова Е.В., Коржевский Д.Э. Особенности применения методов гистохимии и иммуногистохимии для выявления амилоидных бляшек в коре головного мозга человека. Журнал анатомии и гистопатологии. 2019; 8(2): 91–99. doi: 10.18499/2225-7357-2019-8-2-91-99

For citation: Gusel'nikova V.V., Antipova M.V., Fedorova E.A., Safrai A.E., Rukavishnikova A.A., Mikhailova E.V., Korzhevskii D.E. Distinctive features of histochemical and immunohistochemical techniques for amyloid plaque detection in the human cerebral cortex. Journal of Anatomy and Histopathology. 2019; 8(2): 91–99. doi: 10.18499/2225-7357-2019-8-2-91-99
