

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



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.

Гомель, 2014

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

11.11.2014

Регистрационный № 059-0614

**МЕТОД МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ МИКРОГЛИОЗА
В БЕЛОМ ВЕЩЕСТВЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Гомельский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: А.М. Майбогин, д-р мед. наук, проф. М.К. Недзьведь, Г.М. Карапетян

Гомель 2014

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) 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, врачей-нейро- и онкоморфологов.

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ИГХ — иммуногистохимия

CD68 — рецептор к клеткам микроглии

ДАБ — диаминобензидин

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование

1. Микротом с возможностью изготовления гистологических срезов толщиной не более 4 мкм.
2. pH-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

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

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 (рис.).

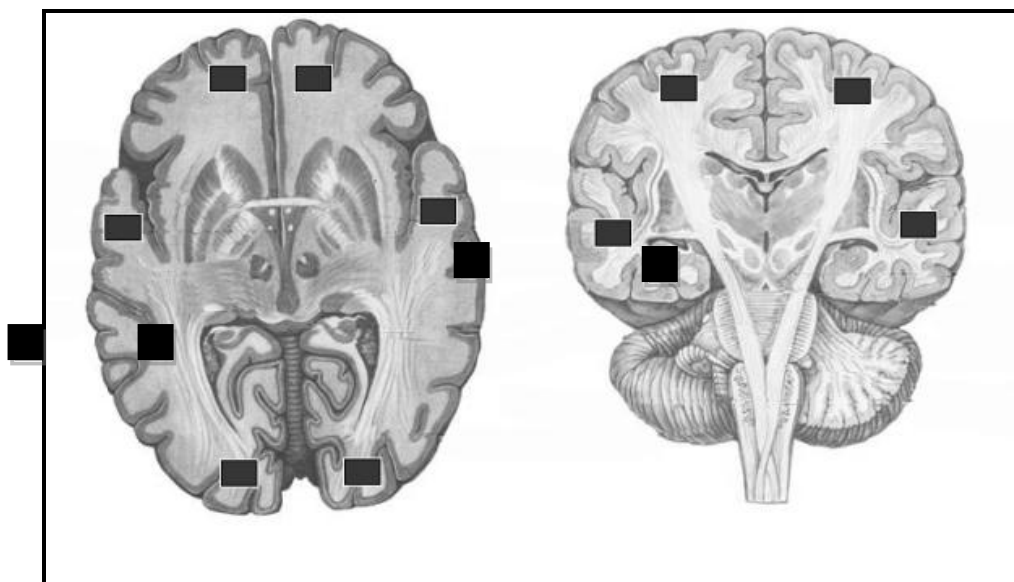


Рис. — Схематичное отображение участков забора материала для исследования

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 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, приготовленный 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 CD68, 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 клеток, окрашенных на CD 68, причем слабопозитивный микроглиоз устанавливается при наличии 15–30% окрашенных клеток, умереннопозитивный — от 30 до 40% и сильнопозитивный — при наличии более 40% окрашенных клеток.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ 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 включать положительные и отрицательные контроли в число тестируемых образцов при каждой процедуре.