

**ОПИСАНИЕ  
ИЗОБРЕТЕНИЯ  
К ПАТЕНТУ**

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ  
СОБСТВЕННОСТИ

(19) ВУ (11) 9178

(13) С1

(46) 2007.04.30

(51)<sup>7</sup> G 01N 33/48

(54) **СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ ГИСТАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ  
МОЗГА**

(21) Номер заявки: а 20040005

(22) 2004.01.08

(43) 2005.09.30

(71) Заявитель: Учреждение образования "Гродненский государственный медицинский университет" (ВУ)

(72) Авторы: Зиматкин Сергей Михайлович; Кузнецова Вера Борисовна (ВУ)

(73) Патентообладатель: Учреждение образования "Гродненский государственный медицинский университет" (ВУ)

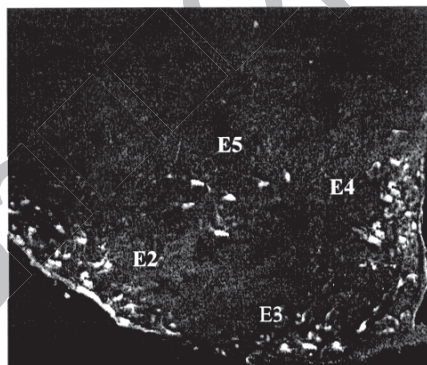
(56) Зиматкин С.М. и др. // Морфология. - 1994. - Т. 106, № 4-6. - С. 157-161.

ВУ 1044 С1, 1996.

SU 1223079 А, 1986.

(57)

Способ выявления гистаминергических нейронов мозга, **отличающийся** тем, что выявляют моноаминоксидазу В, которую используют в качестве маркера гистаминергических нейронов.



Гистаминергические нейроны гипоталамуса крысы (Р -3.80 mm). Иммунофлюоресцентный метод с использованием антител против гистамина (по методу Panula et al., 1984). Об.х10. Цифровая микрофотография.

Фиг. 1

Изобретение относится к области биологии, а именно к нейробиологии, нейрогистологии, и может использоваться для морфофункциональной оценки гистаминергических нейронов мозга.

Известен способ выявления гистаминергических нейронов с использованием антител против гистамина, авидин-биотинового комплекса и пероксидазы хрена. (Panula P., Yang H.Y., Costa E. Histamin-containing neurons in the rat hypothalamus., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1984, vol. 81, p. 2572-2576).

ВУ 9178 С1 2007.04.30

Недостатками способа являются: 1) сложность, многоэтапность, длительность - 2-4 суток, трудоемкость; 2) ненадежность, плохая воспроизводимость.

Наиболее близким к предлагаемому является иммунофлюоресцентный способ выявления гистаминергических нейронов с использованием антител против гистамина и флюоресцентной метки (Panula P., Yang H.Y., Costa E. Histamin-containing neurons in the rat hypothalamus., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1984, vol. 81, p. 2572-2576). Он включает перфузию крысы 2 % раствором 1-этил-3-(3-диметил-аминопропил)-карбодимид (EDAC), постфиксация 2-4 ч (возможно в течение ночи) в 4 % EDAC. Пропитывание в 20 % растворе сахарозы. Быстрое замораживание (в жидком азоте, приготовление срезов толщиной 20 мкм, расправление их на стеклах, покрытых желатином. Приготовленные срезы хранят при  $t = 20^{\circ}\text{C}$ . Промывание в фосфатном буфере 0,01M pH 7,4  $2 \times 10$  мин. Обработка первичными антителами: HA 19C (разведение 1 : 1000 или 1 : 2000 в фосфатном буфере 0,01M pH 7,4 + NSS (нормальная свиная сыворотка) (1 : 100). Инкубация с вторичными антителами, связанными с FITC (разведение 1 : 40 в фосфатном буфере 0,01M pH 7,4) в темном месте. Промывание в фосфатном буфере 0,01M pH 7,4 в течение 20 мин в темном месте. Заключение в PBS-глицерол (1 : 1). Хранение в холодильнике ( $+ 4^{\circ}\text{C}$ ) в течение 1-3 суток.

Недостатком способа является сложность, трудоемкость, малый срок хранения препаратов, дороговизна и недоступность реактивов, необходимость специальной фиксации тканей.

Задача изобретения - упрощение, повышение надежности и экономичности способа выявления гистаминергических нейронов.

Поставленная задача решается путем выявления моноаминоксидазы Б, которую используют в качестве маркера гистаминергических нейронов.

Способ осуществляют следующим образом.

После декапитации крысы проводят вскрытие черепной коробки, извлечение головного мозга с последующим выделением гипоталамуса. Образец мозга, предварительно выдержав в парах азота, замораживают путем погружения в жидкий азот. Изготавливают криостатные срезы толщиной 20  $\mu$ . Срезы монтируют на предметные стекла, быстро расправляют и размораживают, а затем подсушивают при комнатной температуре в течение 3-4 часов. Срезы преинкубируют в течение 30 мин в фосфатном буфере 0,05M pH 7,6 с хлоргидрином  $10^{-7}$  и окрашивают на выявление активности моноаминоксидазы типа Б (МАО Б), которая является маркером гистаминергических нейронов (Зиматкин С.М., Цыдик В.Ф. Гистохимический метод исследования активности моноаминоксидазы А и В в мозге. Морфология, 1994, № 4-6, с. 157-161). Инкубация в растворе: диаминобензидина гидрохлорида (0,08 мг) + пероксидазы хрена (1 мг) + никель-аммонийного сульфата (6 мг) + азида натрия (0,65 мг) + тирамина гидрохлорида + 1 мл Трис-НСI буфера 0,05M pH 7,6. Инкубируют в течение 2-х часов во влажной камере при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ . Реакцию прекращают промыванием срезов в Трис-НСI буфере с последующим обезвоживанием в спиртах возрастающей концентрации, просветляют в ксилоле и заключают в полистирол. В полученных гистохимических препаратах гипоталамуса избирательно и четко выявляются гистаминергические нейроны.

Для иллюстрации полученных результатов прилагаются микрофотографии соседних срезов заднего отдела гипоталамуса крысы на уровне  $P = - 3,60$ , один из которых окрашен иммунофлюоресцентным способом с использованием антител против гистамина, а второй - на выявление активности МАО Б (фиг. 1, 2).

Преимущества предлагаемого способа по сравнению с прототипом:

простота и быстрота изготовления препаратов (всего один инкубационный раствор, срок инкубации 2 часа);

# ВУ 9178 С1 2007.04.30

надежность, хорошая воспроизводимость (по сравнению с прототипами), а по сравнению с иммунофлуоресцентным методом, гораздо большая длительность хранения готовых препаратов;

экономичность и доступность (в предлагаемом способе используются более дешевые и доступные реактивы).

Способ прост, надежен, экономичен. Может быть использован в любой гистологической лаборатории.

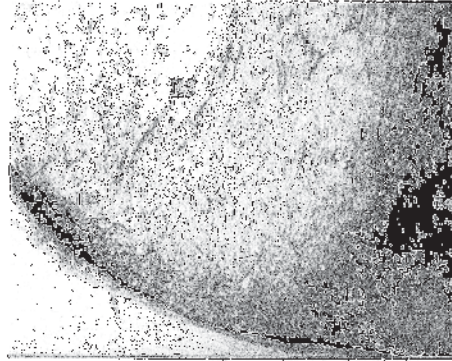


Рис. 2. Гистологический препарат, полученный способом изобретения. Увеличение  $\times 40$ . Структура однородная, плотная, без признаков некроза. В центре видна темная зона, соответствующая сосуду. Вокруг нее наблюдается зона инфильтрации. В остальной части препарата структура однородная.

Фиг. 2