

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ

ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

УДК 547.96; 577.11

№ госрегистрации

Инв. №



ТВЕРЖДАЮ

Директор ИФАВ РАН,

член корреспондент РАН,

*С.О. Бачурин* С.О. Бачурин

«25» декабря 2015 г.

**«МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОСТОЯНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ  
НЕЙРОИНФЛАММАТОРНЫХ РЕАКЦИЙ У МОДЕЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПО КАЖДОМУ  
ИЗ СЛЕДУЮЩИХ МАРКЕРОВ: RСА1, Iva1 (МИКРОГЛИОЗ), GFAP  
(АСТРОГЛИОЗ)»**

СТП-14.621.21.0008.16-2015

Ответственный исполнитель  
Заведующий лабораторией,  
к.б.н.

*С.Г. Клочков* С.Г. Клочков  
«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

Черноголовка, Московская обл. 2015

## Оглавление

1. Наименование методики измерений .....	3
2. Назначение методики измерений и область применения .....	3
3. Нормативные ссылки .....	3
4. Погрешность измерений .....	4
5. Требования к показателям точности измерений .....	4
6. Условия измерений .....	4
7. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам при выполнении данной методики. ....	4
7.1. Реактивы .....	4
7.2. Материалы .....	5
7.3. Оборудование .....	5
8. Операции, связанные с выполнением данной методики .....	5
8.1 Подготовка тканей и приготовление срезов .....	5
8.2 Иммуногистохимическое окрашивание с использованием моноклональных антител к Iba1 и GFAP .....	6
8.3 Иммуногистохимическое окрашивание с использованием биотинилированного агглютинина I. ....	7
8.4 Получение микрофотографий и анализ изображения .....	7
9. Обработка и оформление результатов измерений .....	9
10. Требования безопасности, охраны окружающей среды .....	9
11. Требования к квалификации операторов .....	9

## **1. Наименование методики измерений**

Настоящий документ СТП-14.621.21.0008.16-2015 устанавливает методику «Методики оценки определения состояния специфических нейроинфламаторных реакций у модельных животных по каждому из следующих маркеров: RCAI, Iba1 (микроглиоз), GFAP (астроглиоз)»

## **2. Назначение методики измерений и область применения**

Настоящая методика описывает процедуры, выполнение которых необходимо для оценки степени выраженности нейровоспалительной реакции в нервной системе модельных животных. Основными областями применения данной методики являются биологические и медицинские науки (оценка состояния нервной системы модельных животных, установление стадии нейрональной патологии)

## **3. Нормативные ссылки**

В настоящей методике использованы нормативные ссылки на следующие стандарты и документы:

ГОСТ Р 8.563-2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений

СТП – 1.42.02 – 2002 Стандарты предприятия. Общие требования к построению, изложению, оформлению, содержанию, обозначению и порядку введения

ГОСТ 1.5—2001 Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Общие требования к построению, изложению, оформлению, содержанию и обозначению

ГОСТ Р ИСО 9000—2008 Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь.

#### **4. Погрешность измерений**

Не устанавливаются.

#### **5. Требования к показателям точности измерений**

Не устанавливаются.

#### **6. Условия измерений**

Не устанавливаются.

#### **7. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам при выполнении данной методики.**

##### **7.1. Реактивы**

1. Авертин (Sigma Aldrich, Германия)
2. 100% этиловый спирт.
3. Парафармальдегид (ПФА) (Sigma Aldrich, Германия)
4. - Фосфатный Солевой буфер (PBS):
  - 77 mM гидрофосфат натрия,
  - 23 mM дигидрофосфат натрия,
  - 1,5 M хлорид натрия; pH=7,2
5. Хлороформ (ACROS Organics, США)
6. Парафин (Leica Biosystems, Германия)
7. ImmuMount (Life Technologies, США)
8. 100% метиловый спирт (ACROS Organics, США)
9. Первичные антитела:
  - aGFAP (Abcam, Великобритания)
  - aIba1 (Abcam, Великобритания)
10. Вторичные антитела:
  - am Alexa Fluor® 488 (Life Technologies, США)
  - ar Alexa Fluor® 568 (Life Technologies, США)
11. Сыворотка козы (Sigma Aldrich, Германия)

12. Перекись водорода (Sigma Aldrich, Германия)
13. ABC (Vector Laboratories, Великобритания)
14. 3,3-диаминобензидин (Sigma Aldrich, Германия)
15. DPX (BDH, Великобритания)
16. DAPI, (Sigma Aldrich, Германия)
17. Ксилол (ACROS Organics, США)
18. Tween20 (Helicon, Россия)
19. Biotinylated RCA I (Vector Laboratories, Великобритания)

## **7.2. Материалы**

1. Предметные стекла, покрытые поли L-лизинном (Menzel, Германия)
2. Микротомные лезвия Leica DB80 LS (Leica Biosystems, Германия)

## **7.3. Оборудование**

1. Станция для заливки Leica EG1160 (Leica Biosystems, Германия)
2. Ротационный микротом Leica RM2265 (Leica Biosystems, Германия)
3. Хирургические инструменты (Dimeda, Германия):
  - хирургические ножницы (2 шт),
  - пинцет с тупым наконечником (2 шт),
  - пинцет с острым наконечником.
4. Микроскоп Leica DMI 4000B (Leica Microsystems, Швейцария)
- 5 Фотокамера Leica DFS 490 (Leica Microsystems, Швейцария)

## **8. Операции, связанные с выполнением данной методики**

### **8.1 Подготовка тканей и приготовление срезов.**

Провести глубокую анестезию путем введения раствора авертина в дозе 0,5 мг/г веса внутрибрюшинно, после чего провести транскардиальную перфузию фосфатно-солевым буфером (ФСБ), затем – 4%-ным раствором

парафармальдегида (ПФА). Для дальнейших исследований извлечь головной и спинной мозг. Спинной мозг необходимо разделить на отделы: шейный, грудной и поясничный. Фиксацию тканей провести в 4%-ном ПФА в течение ночи. После отмывки от фиксирующего раствора провести дегидратацию тканей при комнатной температуре методом последовательного инкубирования в серии спиртов с повышением концентрации: 75% этиловом спирте – в течение ночи, 96% этаноле – 5 минут; 96% этаноле – 10 минут, 100% этаноле – 10 минут, 100% этаноле – 10 минут. Далее образцы поместить в смесь этанол-хлороформ (1:1) на 30 минут, затем в хлороформ на 1 час, после чего оставить на ночь в хлороформе. Насыщение тканей расплавленным парафином проводить при 60°C (3 смены по 1ч). Заключение в парафиновые блоки при помощи станции для заливки парафиновых блоков Leica EG1160 (Leica Biosystems, Германия). На ротационном микротоме Leica RM2265 (Leica Biosystems, Германия), получить срезы толщиной 8 мкм и монтировать на предметные стекла (Thermo Scientific, Великобритания).

## **8.2 Иммуногистохимическое окрашивание с использованием моноклональных антител к Iba1 и GFAP**

Срезы необходимо депарафинизировать в ксилоле (20 мин) при постоянном перемешивании с последующей регидратацией в серии спиртов (этанол, при комнатной температуре) понижающейся концентрации (100, 95, 50%).

Для демаскировки антигенов препараты после регидратации инкубировать в течение 10 минут в кипящем цитратном буфере, содержащем 2.94 % цитрат натрия трехосновный дигидрат, 0,05 % Tween-20 (pH 6,0). Затем отмыть препараты в ФСБ и инкубировать в блокирующем растворе, содержащем 10% сыворотки лошади или козы в 30 минут при комнатной температуре.

Первичные моноклональные кроличьи антитела против GFAP (Abcam, Великобритания, разведение 1:500) или мышинные анти-Iba1 (Abcam,

Великобритания, 1:1000), развести в блокирующем растворе, и инкубировать в течении 2 часов. Далее отмыть в ФСБ и инкубировать с вторичными антителами к иммуноглобулину G (мыши - Alexa Fluor® 488, кролика - Alexa Fluor® 568; Life Technologies, США), разведенными 1:1000 в 0,4% Tween-ФСБ в течении 1 часа, отмыть в ФСБ и инкубировать с раствором 3,3-диаминобензидина (DAPI, Sigma, США) 3 минуты, после чего промыть дистиллированной водой. Монтирование покровных стекол проводить с использованием среды ImmuMount (Life Technologies, США).

### **8.3 Иммуногистохимическое окрашивание с использованием биотинилированного агглютинина I.**

Депарафинизацию и регидратацию проводить по схеме, указанной в предиущем разделе. После регидратации срезы инкубировать в 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в метаноле в течение 30 мин при 4°C для подавления активности эндогенной пероксидазы. Затем отмыть в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и инкубировать в блокирующем буфере в течение 30 мин при комнатной температуре. Биотинилированный агглютинин I из *Ricinus communis* (RCA I) (Vector Laboratories, Великобритания), разведенный в блокирующем растворе 1:1000, инкубировать в течение 2 часов. После этого инкубировать с раствором ABC (Vector Laboratories, Великобритания) в течение 30 мин, затем кратко промыть ФСБ. Добавить 3,3-диаминобензидин (Sigma Aldrich, Германия) и инкубировать в течение 5 мин при комнатной температуре, после чего остановить реакцию дистиллированной водой и отмыть в воде в течение 5 мин. Дегидратацию срезов провести в серии спиртов (50, 95 и 100% этанол по 5 мин), просветлить срезы в ксилоле в течение 10 мин, заключить в синтетическую среду DPX (BDH, Великобритания).

### **8.4 Получение микрофотографий и анализ изображения.**

Детекцию осуществляли с помощью инвертированного микроскопа Leica DMI 4000B (Leica Microsystems, Швейцария). Микрофотографии получены на

фотокамере Leica DFS 490 (Leica Microsystems, Швейцария) с использованием программного обеспечения Leica Application Suit v. 2.8.1 (Leica Microsystems, Швейцария). Обработку и анализ изображений проводили при помощи программы ImageJ.

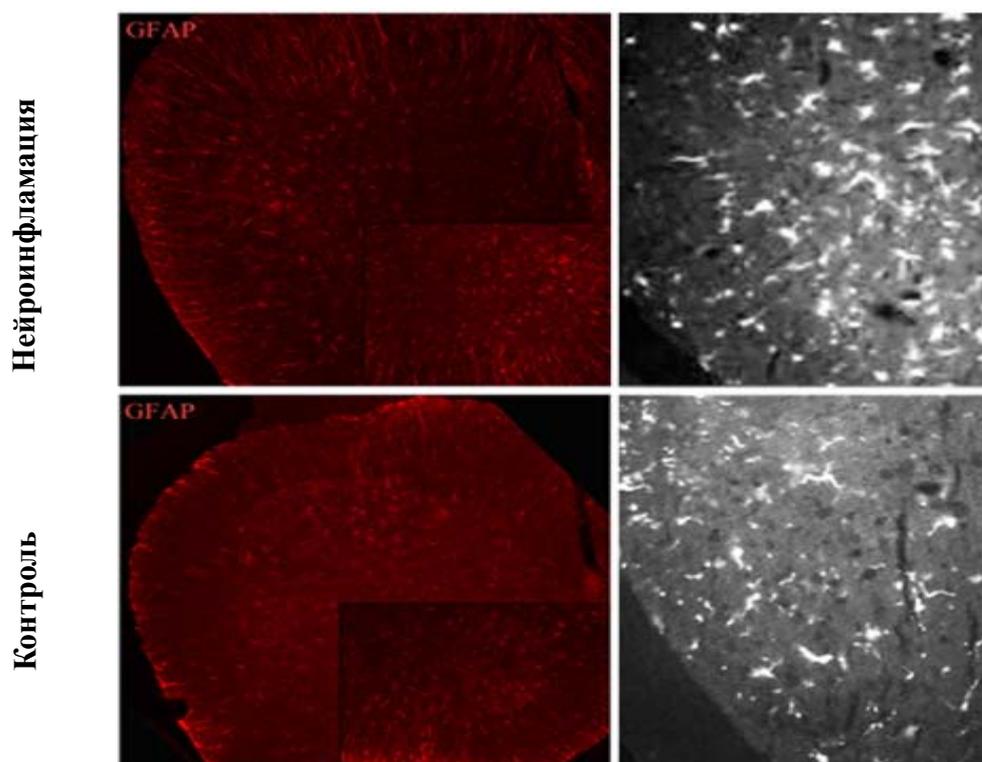


Рисунок 1 Признаки нейровоспалительной реакции в передних рогах спинного мозга Thy-1/FUS 1-359 мышей на поздней пресимптоматической стадии модельного заболевания. Реактивный астроглиоз(слева) и микроглиоз (справа). Окраска антителами к GFAP и Iba1 соответственно. Увеличение 200х

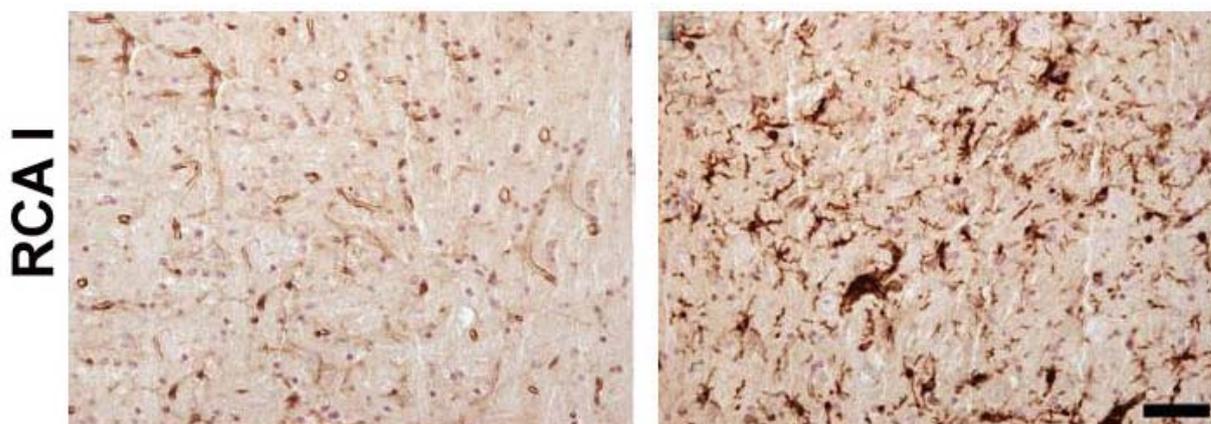


Рисунок 2 Микроглиоз в ядре тройничного нерва у трансгенных мышей линии Thy-1/FUS 1-359 (справа). И микрофотография среза, полученного из той же зоны нетрансгенного контрольного животного (слева). Окрашивание с использованием биотинилированного агглютинина I. Шкала 50 мкм.

### **9. Обработка и оформление результатов измерений**

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программных пакетов Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., США) и GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., США).

### **10. Требования безопасности, охраны окружающей среды**

Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать норм установленных ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004.

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования, изложенные в технической документации к приборам.

### **11. Требования к квалификации операторов**

К выполнению измерений могут быть допущены штатные сотрудники, имеющие соответствующую профессиональную подготовку, прошедшие соответствующий инструктаж, освоившие метод в процессе тренировки