

Х.Б. Юнусов, Д.Н. Федотов,
И.Ю. Лялина, Ш.А. Чалабоев

ОСНОВЫ ГИСТОХИМИИ



Самаркандский институт ветеринарной медицины

**Х.Б. Юнусов, Д.Н. Федотов,
И.Ю. Лялина, Ш.А. Чалабоев**

ОСНОВЫ ГИСТОХИМИИ

Учебное пособие

**Ташкент 2021
Издательство «Fan ziyosi»**

УДК: 417.412.18.44

ББК: 45.2(Узб)

547.9
0-753

Авторы:

Х. Б. Юнусов – доктор биологических наук, профессор

Д. Н. Федотов – кандидат ветеринарных наук, доцент

И. Ю. Лялина – ст. преподаватель

Ш. А. Чалабоев – докторант

Рецензенты:

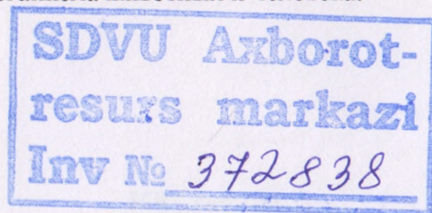
Н. Б. Дилмуродов – доктор ветеринарных наук, профессор

Б. К. Кулиев – кандидат ветеринарных наук, доцент

Юнусов, Х. Б. Основы гистохимии: учебное пособие / Х. Б. Юнусов, Д. Н. Федотов и др. – Ташкент. Издательство «Fan ziyosi», 2021.-152 с..

ISBN: 978-9943-7467-7-0

Учебное пособие подготовлено в соответствии с образовательным стандартом для высших учебных заведений по специальностям «Ветеринарная медицина» и «Биология». Содержит основную характеристику гистологической техники и гистохимических методов окраски тканей и органов организма животных и человека.



Содержание

I. Фиксация и фиксирующие средства.....	5
1. Простые фиксаторы.....	7
2. Сулема и сулемовые фиксаторы.....	11
3. Хромовая кислота и ее соли.....	14
4. Пикриновая кислота и пикриновые фиксаторы.....	17
5. Четырехокись осмия и осмиевые фиксаторы.....	19
6. Сульфосалициловая кислота и ее фиксаторы.....	21
7. Трихлоруксусная кислота.....	22
8. Выбор фиксатора.....	23
II. Техника приготовления истохимических препаратов.....	25
1. Препараты из замороженных тканей.....	25
2. Препараты из материала, залитого в затвердевающие среды.....	35
III. Принципы микроскопии гистохимических препаратов.....	49
1. Системная микроскопия.....	50
2. Поляризационная микроскопия.....	51
3. Люминесцентная (флуоресцентная) микроскопия.....	55
4. Фигово-контрастная микроскопия.....	59
5. Ультрафиолетовая микроскопия.....	60
6. Электронная микроскопия.....	63
IV. Нуклеиновые кислоты.....	66
1. Выявление нуклеиновых кислот по методу Эйнарсона.....	68
2. Раздельное выявление ДНК и РНК смесью метилового зеленого с пионином.....	70
3. Выявление ДНК.....	75
V. Белковые вещества.....	80
1. Выявление суммарных белков.....	82
2. Выявление основных и кислых белков.....	84
3. Выявление липопротеидов.....	86
4. Определение белковых функциональных групп.....	87
5. Гистохимическое изучение аминокислот.....	91
VI. Липиды.....	98
1. Определение общих липидов.....	99
2. Определение связанных липидов.....	102
3. Выявление нейтральных и кислых липидов по Кайну.....	104
4. Выявление нейтральных жиров.....	105
5. Стерины и стериды.....	108
6. Высшие жирные кислоты.....	110

§ 7. Постановка гистохимического контроля.....	112
VII. Углеводы.....	115
§ 1. Гистохимическое определение гликогена.....	117
§ 2. Кислые мукополисахариды.....	122
VIII. Витамины.....	126
§ 1. Витамин А (ретинол, аксерофтол).....	127
§ 2. Витамин В1 (тиамин, антиневрин).....	128
§ 3. Витамин В2 (рибофлавин, лактофлавин, овофлавин).....	129
§ 4. Витамин С (аскорбиновая кислота).....	131
IX. Гормоны.....	134
§ 1. Гормоны коркового слоя надпочечников.....	135
§ 2. Гормоны мозгового слоя надпочечников.....	137
§ 3. Гормоны гипофиза.....	139
X. Минеральные вещества.....	142
§ 1. Выявление кальция.....	143
§ 2. Выявление магния.....	145
§ 3. Выявление железа.....	146
§ 4. Выявление меди.....	147
§ 5. Выявление цинка.....	148
§ 6. Выявление кобальта.....	149
§ 7. Выявление стронция.....	150
Литература	151

I. ФИКСАЦИЯ И ФИКСИРУЮЩИЕ СРЕДСТВА

Фиксация (от латинского *fixus* – твердый, неизменный) – совокупность приемов, направленных на сохранение в тканях и клетках прижизненного строения, содержания и локализации химических веществ. С помощью фиксации приостанавливается течение химических реакций в тканях и клетках в момент их отделения от организма, предотвращаются реакции автолиза и распада под влиянием факторов внешней среды, подготавливается материал для приготовления постоянных препаратов. Положительный результат любого гистохимического исследования в первую очередь зависит от того, насколько полно и прочно изучаемые вещества сохранены в тканях и клетках.

Различают физические и химические методы фиксации. К первым относится термическая фиксация в кипящей бане, на пламени горелки на медной проволоке при 120°C (по Эрлиху). Эти методы мало приемлемы для гистохимии. Ими чаще всего пользуются в микробиологической и вирусологической практике. Особого внимания заслуживает такой физический метод фиксации, как лиофильная сушка – глубокое замораживание материала с последующим вакуумированием. Лيوфилизация осуществляется с помощью специальных установок и состоит из трех этапов: замораживания – мгновенного охлаждения кусочка материала или в жидком азоте (-195°C), или в смеси пропана и изопентана (-190°C), или в других жидкостях с низкой температурой замерзания; высушивания в условиях вакуума – осуществляется при температуре, когда кристаллизация льда не наступает (от -26 до -40°C) и максимально сохраняется прижизненная морфология тканей; заливки в парафин и приготовления гистохимических препаратов. Темп охлаждения должен обеспечить превращение воды из жидкого состояния в стеклообразное, минуя стадию кристаллизации, что представляет исключительно большое значение для проведения гисто- и цитохимических исследований на электронномикроскопическом уровне. Леофильная сушка имеет преимущества перед многими методами физической и химической фиксации.

При ней почти не разрушаются белковые молекулы, сохраняется химический состав клеток, мало изменяется морфология тканей, так как отсутствуют артефакты, вызванные кристаллизацией воды. Лيوфизированные ткани в процессе постановки гистохимических реакций впитывают влагу и восстанавливают первоначальный вид и коллоидное состояние.

К химическим методам относится фиксация материала с помощью химических веществ. Различают простые (фиксирующие вещества) и сложные (фиксирующие смеси) фиксаторы: -к фиксирующим веществам относятся обезвреживающие средства (метанол, этанол, ацетон), соли тяжелых металлов (сулема, хлорид платины), альдегиды (формальдегид, глутаральдегид, гидроксидипальдегид), кислоты (уксусная, трихлоруксусная, пикриновая, сульфосалициловая), пиридин и др.; -к фиксирующим смесям относят различные смеси фиксирующих веществ. В большинстве случаев фиксирующие смеси оказывают лучшее действие на результат фиксации, чем простые фиксаторы. По условной классификации различают так называемые основные (карбонат калия), кислые (трихлоруксусная кислота) и нейтральные (этанол) фиксаторы.

При химической фиксации нужно соблюдать следующие правила:

1. Кусочки материала (размером до 0,5 см) после отделения от организма немедленно погрузить в фиксирующие жидкости.

2. Не допускать соприкосновения фиксаторов с металлическими предметами (скальпелями, ножницами, пинцетами, крючками и др.).

3. Фиксирующие жидкости готовить точно по прописям, хранить в темной посуде с притертыми пробками, в темном месте, при низких температурах (в холодильнике, термосе со льдом).

4. Количество фиксатора должно превышать размеры материала в 20 – 100 раз. Во время фиксации строго соблюдать температурный режим, pH и, особенно, сроки нахождения материала в фиксаторе. Фиксирующей жидкостью пользоваться не больше од-

ного раза. В случае необходимости фиксаторы следует менять несколько раз.

5. Перед погружением в фиксатор материал не промывать водой. Если после погружения материала наступит помутнение фиксатора или изменение цвета, то его нужно заменить свежим.

6. Не лить фиксирующую жидкость на кусочки материала.

7. Чтобы не было соприкосновения кусочков материала между собой, для свободной циркуляции фиксирующих жидкостей на дно сосуда следует положить нужное количество стеклянной ваты.

8. Процесс фиксации считают закончившимся, если поперечные разрезы кусочков материала имеют равномерную окраску.

§ 1. Простые фиксаторы

Этанол, или этиловый спирт – легкоподвижная жидкость плотностью при 0°C 0,806 г/см³, кипит при 78,3°C, замерзает при -110,5°C. Хороший органический растворитель. Фиксатор для гликогена, мочевой кислоты, мукополисахаридов, некоторых минеральных соединений (железа, кальция), энзимов – кислой и щелочной фосфомоноэстераз, неспецифической эстеразы.

Принцип действия. Этанол осаждает белки. При этом создаются новые стереохимические конфигурации белковых функциональных групп, так как происходит сжатие белковых молекул, потерявших сольватные оболочки. После удаления этанола большинство молекул белков восстанавливает свое строение (обратимые реакции осаждения белков). Тем не менее, молекулы многих энзимов, особенно дегидрогеназ, не восстанавливаются.

Состав. В гистохимической практике обычно используют 70%-, 80%-, 96%- и 100%-ный (абсолютный) этанола. В некоторых случаях (например, при изучении общих липидов) применяются этанола с более низкой концентрацией (30%-ный). Для приготовления абсолютного этанола к 100 мл 96%-ного этанола добавляют 15 г безводного прокаленного медного купороса (сульфата меди).

Способ применения. 1. Кусочки материала поместить в бюкс, заполненный этанолом. 2. Фиксировать: пленки – 15-30 мин, ку-

сочки органов и тканей толщиной 1-2 мм – 0,5-1 ч, толщиной 3-4 мм – 2-4 ч. 3. После фиксации материал подвергнуть дальнейшей обработке (просветлению, заливке в парафин или целлоидин) или приготовить замороженные срезы, промыв перед этим материал в дистиллированной воде (3-6 ч). При недостатке времени для дальнейшей обработки материал можно хранить 80%-ном этаноле.

Примечание. Нельзя передерживать материал в этаноле, так как это отрицательно сказывается на структуре и химии тканей, а также на дальнейшей обработке: заливке в парафин и приготовлении парафиновых срезов. Наименьшее сжатие материала происходит в 100%-ном этаноле.

Метанол или метиловый спирт – легкоподвижная жидкость плотностью при 0°C 0,79 г/г³, кипит при 65°C, замерзает при -97°C, хороший органический растворитель, ядовит (20-25 мл принятые внутрь, вызывают слепоту и даже смерть). Применяется для фиксации мазков, мазков-отпечатков и др.

Принцип действия. Метанол осаждает белковые вещества протоплазмы. При этом сближаются полипептидные цепи белковых молекул. Реакция осаждения многих белковых молекул, в известной степени, обратима.

Способ применения. 1. Высушенные на воздухе мазки или мазки-отпечатки поставить в стеклянный стаканчик, заполненный абсолютным метанолом. 2. Фиксировать 5-10 мин. 3. Извлечь пинцетом и каждый мазок поставить в наклонном положении на фильтровальную бумагу для просушивания. 4. Провести соответствующую цитохимическую реакцию.

Примечание. Фиксацию метанолом применяют в гематологической, цитологической и цитохимической практике. Удовлетворительные результаты можно получить при изучении цитохимии ДНК, РНК, гистидина, сульфгидрильных групп, некоторых ферментов.

Ацетон или диметилкетон – летучая с характерным запахом жидкость плотностью при 20°C 0,7980 г/г³, кипит при 56,2°C, смешивается с водой в любых соотношениях, хороший ор-

газический растворитель. Применяется продолжительное время для фиксации тканей мозга при диагностике бешенства. Используется для фиксации материала, предназначенного для гистохимического исследования (в частности, анализ на фосфатазы).

Принцип действия. Ацетон отнимает от коллоидных частиц протоплазмы воду, а также сольватную оболочку в молекуле белка. Осаждение белков с помощью ацетона в значительной мере обратимо, так как при действии ацетона происходят неглубокие изменения в строении белковых молекул, и после добавления воды происходит их восстановление.

Способ применения. 1. Небольшие кусочки материала (2-3 мм) поместить в абсолютный ацетон (при изучении гистохимии фосфатаз ацетон должен быть предварительно охлажден до 0-5°C). 2. Фиксировать нужное время: для обычных исследований – 2-3 ч при комнатной температуре, для выявления фосфатаз – 24 ч при 0-5°C. 3. Подвергнуть дальнейшей обработке (подготовка к заливке и заливка в парафин).

Примечание. Фиксация ацетоном вызывает резкое сжатие тканей, в результате чего возникают артефакты деформации тканей и клеток.

Формалин, или раствор формальдегида в воде. Формальдегид – газ плотностью при 20°C 0,815 г/см³, при – 21°C сжимается в бесцветную жидкость, хорошо растворим в воде, обладает резким запахом, при хранении полимеризуется в параформ-осадок белого цвета. Формальдегид впервые получен А.М. Бутлеровым. Введен для фиксации Ф. Блюмом в 1890 г. Применяется как фиксатор в морфологии и гистохимии. Легко диффундирует в ткани, не вызывая их сильного сжатия. Используется при фиксации материала, предназначенного для изучения многих веществ: белков, нуклеиновых кислот, некоторых углеводов, энзимов, минеральных соединений и др.

Принцип действия. Фиксация формалином – физико-химический процесс. Он протекает в три стадии: адсорбция поверхностью материала молекул формальдегида, проникновение в ткань воды и взаимодействие карбонильной группы фиксатора с

белковыми функциональными группами: аминными, иминными, сульфгидрильными, дисульфидными, карбоксильными, гидроксильными, гуанидиновой группировкой и др. Вначале происходит сжатие материала, потом набухание и затем вторичное сжатие. При продолжительной фиксации объем материала может уменьшиться до 40%. Фиксирующее действие формалина, прежде всего, состоит в том, что молекула формальдегида вступает в реакцию присоединения с веществами, содержащими реакционноспособный водородный азот, образуя оксиметильное производное (Э. Пирс, 1962 г., 1968 г.).

Часть белковых функциональных групп остается связанной с формальдегидом необратимо и ее не удастся восстановить обычным путем (промывкой водой).

Состав. В микроскопической и гистохимической практике в качестве фиксирующих средств используют растворы формалина различной концентрации. При разбавлении за 100%-ный условно принимают формалин, (37 – 40%-ный раствор формальдегида в воде), который продается в торговой сети. В таком формалине есть примеси метанола, ацетона, муравьиной кислоты и другие, которые отрицательно сказываются на процессе фиксации. Для нейтрализации этих примесей к 100%-ному формалину добавляют карбонат кальция или карбонат магния из расчета 100 г на 1000 мл формалина. Через 24–48 ч формалин становится нейтральным.

При длительном хранении в 100%-ном формалине появляются белые хлопья параформа, который образуется в результате полимеризации формальдегида. Для деполимеризации параформа раствор формалина нужно поместить в термостат на 24 ч при 54–56°C.

Растворы формалина разной концентрации готовят обычным образом. Например, для приготовления 10%-ного раствора формалина нужно взять 10 мл 100%-ного формалина и 90 мл проточной воды. Для приготовления 10%-ного раствора нейтрального формалина нужно взять 10 мл неразбавленного нейтрального формалина и 90 мл проточной воды.

Способо применения. 1. Кусочки материала (0,5 см) поместить в раствор (чаще в 10%-ый) формалина на 24–48 ч при ком-

натной температуре или на несколько суток при температуре 0–5°C. 2. После окончания фиксации материал перенести в банки, связать их марлей и поставить на промывку под водопроводный кран. Промывать в течение нескольких часов, иногда до суток. 3. На замораживающем микротоме приготовить срезы или подвергнуть дальнейшей обработке (для заливки в парафин или целлоидин).

Примечание. Формалин – универсальное фиксирующее средство для тканей человека, животных и растений. В отличие от других фиксаторов (например, ацетона) он не вызывает резкого сжатия тканей. Фиксированный материал хорошо режется на замораживающем микротоме и подвергается дальнейшей обработке. Следует учитывать, что в растворах формалина частично растворяются нуклеиновые кислоты, некоторые белки, липиды, инактивируются белковые функциональные группы, изменяется строение ненасыщенных карбоновых кислот. Формалин мало пригоден для фиксации гликогена, мочевой кислоты, соединений железа, кальция и др. В тканях, богатых кровеносными сосудами, возникают артефакты – «формалиновый пигмент».

§ 2. Сулема и сулемовые фиксаторы

Сулема, или хлорид ртути (II) – белые ромбические кристаллы или белый порошок, растворимый в воде (в холодной воде растворяется в соотношении 1:18,5, в кипящей — 1:3), спирте (1:4), эфире (1:17). Водные растворы имеют кислую реакцию. Молекулярная масса – 271,5, содержание ртути — 73,9%. Яд. Применяется в медицине и ветеринарии как дезинфектор, в микроскопической технике и гистохимии – как фиксатор.

Принцип действия. Вызывает необратимые реакции осаждения белков тканей. Ионы ртути могут взаимодействовать с гидроксильными и карбоксильными группами белков, а также с остатками фосфорной кислоты нуклеопротеидов, образуя соединения типа солей (Э. Пирс, 1962 г.). Обладает высоким химическим родством к сульфгидрильным группам. Реакция обратима, протекает в две стадии.

Большинство сульфгидрильных групп после промывки водой материала восстанавливается, часть остается связанной с остатками молекул сулемы необратимо. Как фиксатор, сулема легко диффундирует вглубь тканей, мало их деформируя. Она мало травмирует митохондрии, комплекс Гольджи, ядерную и плазматическую мембраны. Тем не менее, при фиксации сулемой в ядрах и цитоплазме многих клеток можно наблюдать выпадение грубых осадков белковых веществ как следствие денатурации. Сулема почти не фиксирует углеводы. Ее молекулы могут взаимодействовать с некоторыми липидными соединениями, вызывая артефакты химической природы.

В гистохимической практике применяется несколько видов растворов сулемы и сулемовых фиксаторов.

Насыщенный раствор сулемы. В чистом виде применяется редко. Им обычно фиксируют материалы, предназначенные для выявления белков, богатых аминокислотой тирозином (реакция Миллона), а также некоторых групп мукополисахаридов. Насыщенный раствор сулемы служит основой для приготовления сулемовых фиксаторов.

С о с т а в. Для приготовления насыщенного раствора сулемы нужно брать 60 г чистого вещества. Растворить (осторожно!) в 1 л горячей дистиллированной воды, взболтать и дать остыть. На дне колбы осядет несколько игольчатых кристаллов. Такой раствор можно использовать.

Способ применения. 1. В нужный объем насыщенного раствора сулемы положить кусочки материала (0,3–0,4 см).

2. Фиксировать различное время: тонкие оболочки – несколько минут, кусочки размером 1 мм – 0,5 – 1 ч, 3 мм – около 3–4 ч, больше 3 мм – около 6–12 ч. Окончание фиксации определяется по равномерной беловатой окраске поперечного разреза. 3. Перенести в 70%-ный этанол (держат до 24 ч) для удаления кристаллических и аморфных осадков. К этанолу рекомендуется добавить несколько капель спиртового раствора иодида калия. В последнем содержится 2 г иода, 3 г иодида калия, 100 мл 90%-ного этанола. 4. Поместить в 0,25%-ный раствор тиосульфата натрия для удаления

вода (раствор должен быть свежим!). Время нахождения материала определяется толщиной кусочка: пленки — несколько минут и т.д., как в пункте 2. 5. Тщательно промыть в дистиллированной воде. 6. Подвергнуть дальнейшей обработке (приготовление замороженных срезов, парафиновых или целлоидиновых блоков).

Примечание. К интерпретации результатов исследования белковых веществ в клетках ткани органов нужно подходить осторожно.

Сулема и ледяная уксусная кислота. Оба вещества (сулема и уксусная кислота) легко проникают в глубину тканей. Наличие уксусной кислоты предохраняет материал от образования поверхностной пленки, характерной при фиксации сулемой. Ядра и цитоплазма клеток максимально сохраняют строение, типичное для прижизненного состояния.

Состав. Насыщенный раствор сулемы — 100 мл, ледяная уксусная кислота — 6мл.

Способ применения. 1. Кусочки материала (до 0,3 см) поместить в фиксатор на 0,5–24ч (в зависимости от природы материала).

Примечание. Используют для фиксации материала, предназначенного для изучения гистохимии белковых веществ, нуклеиновых кислот и др. Можно применять для фиксации зародышевых тканей и др.

Жидкость «суза» по Гейденгайну. В жидкости сочетаются фиксирующие свойства сулемы, уксусной кислоты, формальдегида, хлорида натрия и трихлоруксусной кислоты. Хлорид натрия способствует созданию осмотического давления, аналогичного прижизненному состоянию тканей. Применяют в гистологии и гистохимии. Хорошо фиксирует белковые вещества, мукополисахариды.

Состав жидкости «суза»: Сулема — 4,5 г; хлорид натрия — 0,5 г; дистиллированная вода — 80 мл; трихлоруксусная кислота — 2мл; ледяная уксусная кислота — 4 мл; неразбавленный формалин — 20 мл.

Способ применения. Кусочки материала (0,1–0,3 см) поместить в жидкость на 1–24 ч.

Примечание. Смесь хорошо фиксирует ткани, богатые водой (например, эмбриональные). Не пригодна для фиксации гликогена.

Сулема + формалин + ацетат натрия по Лилли (1969). Фиксирующие средства в смеси подобраны так, чтобы не было резкого уплотнения материала и максимально сохранялись в нем белковые вещества, углеводы, минеральные соединения и др.

Состав. Сулема – 6г, безводный ацетат натрия – 1,25 г, дистиллированная вода – 90 мл. Смешать, растворить и добавить в смесь 10 мл неразбавленного формалина.

Способ применения. 1. Кусочки материала (до 0,5 см) поместить в смесь. 2. Продолжительность фиксации – 12–14 ч (печень грызунов фиксировать больше недели).

Примечание. Фиксатор используют согласно рекомендациям специальных методик.

§ 3. Хромовая кислота и ее соли

Хромовую кислоту получают из хромового ангидрида – кристаллического вещества красно-коричневого цвета – по химическим свойствам – сильный окислитель. В ткани проникает медленно: в течение 4 ч всего на 1,4 мм. В морфологии и гистохимии в качестве фиксаторов применяют растворы хромовой кислоты и ее солей.

Принцип действия. Во время фиксации в тканях происходят сложные физико-химические изменения. Прежде всего, осаждаются белковые вещества цитоплазмы и ядра. У хрома проявляется химическое сродство к белковым функциональным группам – карбоксильным, аминным, гидроксильным и др. Хроматы способны взаимодействовать с водой, образуя комплексы, которые в свою очередь, вступают в реакцию с функциональными группами полипептидных цепей белковых молекул, образуя соединения, аналогичные тем, которые возникают при формалиновой фиксации. В результате под влиянием хрома разрываются солевые связи белковых молекул, и возрастает число основных групп.

Хромовые фиксаторы нужно применять осторожно. Хорошие результаты получены при постановке хромаффиновой реакции, фиксации гликогена, некоторых белков, нуклеиновых кислот, отдельных групп липидов.

Хромовая кислота. Применяется в качестве фиксатора при некоторых гистологических, цитологических (изучение комплекса Гольджи и митохондрий) и гистохимических (изучение углеводов) исследованиях.

Состав. 0,3–0,4%-ный раствор хромовой кислоты на дистиллированной воде.

Способ применения. 1. Кусочки материала (1–2 мм) поместить в раствор кислоты на 5–6 ч, более крупные кусочки материала – на несколько суток и даже недель. Объем фиксатора должен превышать размеры материала в 200 раз. Во время фиксации фиксатор несколько раз сменить свежими порциями. 2. Материал промыть в проточной воде. 3. Подвергнуть дальнейшей обработке (приготовить замороженные срезы или блоки для заливки в парафин и целлоидин).

Примечание. Фиксация дает хорошие результаты при изучении гистохимии гликогена в тканях.

Дихромат калия – кристаллическое вещество оранжево-красного цвета. Используют в кожевенной, спичечной, текстильной и химической промышленности. Растворим в воде. Применяют для фиксации гликогена, липидов, ДНК, РНК. Входит в состав смесей с формалином, сулемой, уксусной кислотой и ангидридом осмиевой кислоты.

1. Фиксатор Альтмана.

Удачно сочетает фиксирующие свойства дихромата калия и сулемы. При фиксации хорошо сохраняются клетки, комплекс Гольджи, митохондрии. Сохраняются многие химические соединения, даже фосфатиды.

Состав. Дихромат калия – 2,5 г, сулема – 5 г, дистиллированная вода – 100 мл.

Способ применения. Кусочки материала поместить в смесь на 1–3 суток. Подвергнуть дальнейшей обработке (для заливки в парафин).

2. Смесь Мюллера.

Применяют для фиксации материала, полученного из различных участков нервной системы. Служит основой для приготовления других фиксаторов. Используют для фиксации некоторых углеводов и липидов.

Состав. Дихромат калия – 2-2,5 г, сульфат натрия – 1г, дистиллированная вода – 100мл.

Способ применения. Кусочки материала (до 0,5 см) фиксировать 1–24 ч (в зависимости от природы и толщины материала). Промывать в проточной воде 20–24 ч. Подвергнуть дальнейшей обработке (приготовить замороженные срезы или залить в парафин).

3. Жидкость Рего.

Используют для фиксации митохондрий и отдельных групп липидов.

Состав. 3%-ный раствор дихромата калия – 80 мл, неразбавленный формалин – 20мл.

Способ применения. Кусочки материала (до 0,5 см) поместить в фиксатор на 4 суток (жидкость менять ежедневно). Перенести в 3%-ный раствор дихромата калия на 8 дней. Промыть в проточной воде (сутки). Подвергнуть дальнейшей обработке (приготовить замороженные срезы или залить в парафин).

Примечание. Сроки фиксации можно уменьшить до 8 суток.

4. Жидкость Чиаччио.

Используется для фиксации материала, в котором изучаются липиды.

Состав. 5%-ный раствор дихромата калия – 80 мл, неразбавленный формалин – 20 мл, ледяная уксусная кислота – 5 мл.

Способ применения. Кусочки материала (до 0,5 см) поместить в смесь на 24–48 ч. Перенести на 5–8 суток в 3%-ный раствор дихромата калия. Промыть в проточной воде (сутки). Провести дальнейшую обработку (обезводить в спирте в течение 24ч, залить в парафин через ксилол или сероуглерод).

Примечание. Заливку в парафин проводить быстро.

1. Жидкость Ценкера.

В смеси сочетаются фиксирующие свойства дихромата калия, сулемы, формальдегида и сульфата натрия.

Состав. Дистиллированная вода – 100 мл, дихромат калия – 1,5 г, сульфат натрия – 1 г, сулема – 5 г, неразбавленный формалин – 10 мл.

Способ применения. Кусочки материала (размером до 0,5 см) поместить в смесь на 6 ч. Промыть в проточной воде (сутки).

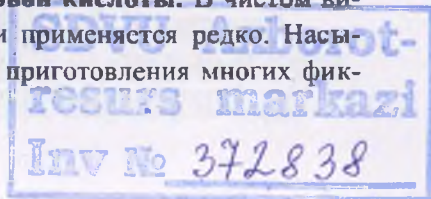
Примечание. Является универсальным фиксатором в цитологии и гистологии. Используют при фиксации материала, предназначенного для изучения в нем белковых веществ, некоторых минеральных соединений.

§ 4. Пикриновая кислота и пикриновые фиксаторы

Пикриновая кислота (от гр. *Achros* – горький), или 2, 4, 6-тринитрофенол. Кристаллическое вещество желтого цвета с температурой плавления 122,5°C. Растворима в воде: в 100 мл при 10°C растворяется 1,225 г пикриновой кислоты, при 100°C – 7,6 г. Используют в медицине и ветеринарии при лечении ожогов, в текстильной промышленности – для крашения тканей, в оборонной – для получения взрывчатых веществ, служит сырьем для получения коорпикрина. Хранить в воде. Не растирать в ступке – возможен взрыв. Используют как фиксатор в микроскопической технике и гистологии.

Принцип действия. Пикриновая кислота легко диффундирует в ткани. Вызывает коагуляцию белков. При этом образуются соеобразные соединения, в которых белковая часть является катионом, остаток пикриновой кислоты – анионом. Реакция осаждения белков ускоряется наличием в фиксирующих жидкостях небольших количеств, примесей других кислот.

Насыщенный раствор пикриновой кислоты. В чистом виде пикриновая кислота для фиксации применяется редко. Насыщенный раствор служит основой для приготовления многих фиксирующих жидкостей.



Состав. В стеклянном сосуде растворить 30–50 г пикриновой кислоты в 2 л горячей дистиллированной воды, дать остыть. На дне сосуда после растворения кислоты выпадают желтые кристаллы. Раствор годен к употреблению в течение шести месяцев.

Смесь Буэна. Смесь содержит пикриновую кислоту, которая вызывает коагуляцию белков, формальдегид – он обратимо связывает белковые функциональные группы – и уксусную кислоту – ускоряет диффузию фиксаторов.

Состав. Насыщенный раствор пикриновой кислоты – 15 мл, неразбавленный формалин – 5 мл, ледяная уксусная кислота – 1 мл.

Способ применения. Кусочки материала (размером до 0,5 см) поместить в смесь на время от 1 до 24 ч. Промыть в нескольких порциях 80%-ного этанола до исчезновения желтой мутности. Подвергнуть дальнейшей обработке (приготовить срезы или блоки).

Примечание. Смесь не вызывает артефактов при фиксации. Материал может длительно находиться в фиксаторе. Смесь удобно пользоваться в экспедициях. Хороший фиксатор для гликогена и мукополисахаридов.

Жидкость Жандра. Удачно сочетает фиксирующие свойства трех веществ – пикриновой кислоты, этанола и формальдегида. Гомори (1952) считает, что жидкость Жандра более пригодна для гистохимических целей, чем, смесь Буэна.

Состав. Насыщенный раствор пикриновой кислоты в 96%-ном этаноле – 85 мл, неразбавленный формалин – 10 мл.

Способ применения. Кусочки материала (до 0,5 см) поместить в смесь на 1–4 ч. Промыть в нескольких порциях 80%-го этанола. Провести через ряд спиртов (80%-, 96%- и 100%-ном этаноле), по два раза в каждом. Просветлить в ксилоле. Залить в парафин.

Примечание. Пирс (1962) рекомендует перед употреблением жидкость охладить до -73°C , после чего поместить в нее материал на 18 ч. Результаты фиксации лучше, чем при лиофильной сушке.

Смесь Буэна – Аллена. Готовить перед употреблением. Перед фиксацией смесь нагреть до 37–38°C. Используют при фиксации материала, предназначенного для изучения нуклеиновых кислот и при карнологических исследованиях.

Состав. Насыщенный раствор пикриновой кислоты – 75 мл, неразбавленный формалин – 25 мл, ледяная уксусная кислота – 5 мл. Нагреть до 37–38°C, добавить 1,5 г химически чистого хромового ангидрида, после растворения его кристаллов – 2 г мочевины. Полученный прозрачный темно-коричневый раствор годен к употреблению.

Способ применения. Кусочки материала (до 0,5 см) поместить в фиксатор на 2–3 ч. Дать остыть смеси. Материал перенести в 70%-ный этанол. Провести дальнейшую обработку материала (приготовить замороженные срезы или залить в блоки).

Примечание. Для фиксации применять только свежую смесь. Некоторые авторы не рекомендуют добавлять мочевины.

§ 5. Четырехокись осмия и осмиевые фиксаторы

Четырехокись осмия часто называют «осмиевой кислотой». Это кристаллическое вещество бледно-желтого цвета с температурой плавления 40,6°C и температурой кипения 131,2°C. Легко разлагается на воздухе с образованием ядовитых паров, которые раздражают слизистые оболочки носа, рта и глаз. Растворима в воде: при 0°C в 100 мл воды растворяется 5,3 г четырехоксида осмия. Полученный раствор нейтрален. Лучший фиксатор для электронной микроскопии и электронной гистохимии.

Принцип действия. Под действием четырехокисного осмия в тканях возникают физико-химические изменения, обеспечивающие сохранность в клетках различных химических соединений и приближенной структуры. Четырехокись осмия вызывает нежную коагуляцию коллоидов клетки. Образуется гель, имеющий мицеллярную и даже мономолекулярную структуру. Фиксатор легко взаимодействует с липидами и, особенно, с нейтральными жирами, молекулы которых содержат остатки непредельных карбоно-

вых кислот (олеиновой, линолевой, линоленовой). Согласно Пирсу, здесь происходит разрыв двойных связей. Полученное соединение может взаимодействовать с веществами, содержащими гидроксильные группы, образуя соединения типа диэфиров.

В некоторых случаях (при избытке других неопредельных соединений) возникают биокомплексные соединения с координационными связями:

Необходимо строго придерживаться рекомендуемых сроков фиксации, так как передержка материала в растворе четырехокси осмия способствует разрушению осмиевых мостиков между углеродными и полипептидными цепочками в результате окисления.

Раствор четырехокси осмия. Химически чистая четырехокись осмия употребляется редко из-за малой диффузии в толщу материала. Ее раствор служит основой для приготовления ряда смесей.

Состав. Обычно употребляют 1–2%-ный раствор. Для приготовления раствора ампулу с реактивом обмывают дистиллированной водой, протирают эфиром, подпиливают кончик ампулы, опускают ампулу в темную банку с нужным количеством бидистиллированной воды и под водой раздавливают стеклянной палочкой. Банку закрывают притертой пробкой и хранят в холодном темном месте.

Способ применения. На дно широкогорлой банки с притертой пробкой налить нужное количество раствора четырех-окси осмия, поставить мазки или мазки-отпечатки так, чтобы они не сприкасались с жидкостью, но подвергались действию паров. Банку закрыть; тонкие мазки фиксировать 30 – 60 мин, толстые – 1–3ч. Фиксированные мазки и мазки-отпечатки подвергнуть дальнейшей обработке.

Примечание. Нельзя допускать подсыхания мазков и мазков-отпечатков. Гистохимическую реакцию ставить сразу же после фиксации.

Жидкость Флемминга. Хорошо фиксирует материал.

Состав. 2%-ный раствор четырехокси осмия - 20 мл,

1 %- ный раствор хромовой кислоты – 75 мл, ледяная уксусная кислота – 5 мл.

Способ применения. Кусочки материала (2–2,5 мм) поместить в смесь на 1–3 суток. После фиксации промыть в темноте в проточной воде в течение 24 ч. Обезвожить в спиртах. Просветлить в ксилоле. Залить в парафин.

Примечание. Отличный фиксатор для липидных соединений и др.

Смесь Альтмана. В смеси сочетаются фиксирующие свойства четырехокси осмия и дихромата калия.

Состав. 5%-ный раствор дихромата калия – 1 часть, 2%-ный раствор четырехокси осмия – 1 часть.

Способ применения. Кусочки материала (1–3 мм) поместить в смесь на сутки. Промыть в проточной воде в течение 24ч. Обезвожить в спиртах. Просветлить в ксилоле. Залить в парафин.

Смесь Германа. В состав смеси, кроме четырехокси осмия, введен хлорид платины – для усиления коагуляции белков цитоплазмы и уксусная кислота – для увеличения степени диффузии фиксаторов.

Состав. 1%-ный раствор хлорида платины – 15 частей, 2%-ный раствор четырехокси осмия – 4 части, ледяная уксусная кислота – 1 часть.

§ 6. Сульфосалициловая кислота и ее фиксаторы

Сульфосалициловая кислота относится к ароматическим кислотам. Молекулярная масса – 218,17, температура плавления 110 °С, хорошо растворима в воде в любых соотношениях, этаноле и динитилом эфире. Гигроскопична. При медленном испарении концентрированного раствора на дне сосуда выпадают белые игольчатые кристаллы. Является одним из лучших фиксаторов.

Принцип действия. Под влиянием кислоты коагулируют белки цитоплазмы. Коллоидные частицы сольватную оболочку теряют. Это позволяет вместе с белками сохранить в клетках многие другие вещества.

5%-ный раствор сульфосалициловой кислоты. Служит исходным раствором для приготовления многих фиксирующих смесей. В некоторых случаях применяется самостоятельно.

Состав. Дистиллированная вода – 95 мл, сульфосалициловая кислота – 5 г.

Способ применения. 1. Кусочки материала (2–5 мм) погрузить в раствор на 6–24 ч. Фиксировать в темноте. 2. Промыть в проточной воде. 3. Провести дальнейшую обработку (приготовить замороженные срезы или залить в парафиновые блоки).

Примечание. Используют для фиксации материала, в котором изучаются белки, углеводы, липиды, минеральные соединения и др.

Смесь Санномия. Смесь сульфосалициловой кислоты, этанола и уксусной кислоты хорошо и надежно фиксирует материал, предназначенный для постановки гистологического контроля и изучения гистохимии углеводов, липидов и некоторых белков.

Состав. Сульфосалициловая кислота – 3 г, абсолютный этанол – 100 мл, ледяная уксусная кислота – 5 мл.

Д. Кисели (1962) видоизменил пропись: ледяная уксусная кислота – 5 г, сульфосалициловая кислота – 30 г, абсолютный этанол – до 100 мл.

Способ применения. 1. Кусочки тканей (размером 2–3 мм) погрузить на 3 ч в смесь. 2. Перенести в абсолютный этанол и обезводить. 3. Просветлить в ксилоле. 4. Залить в парафин.

Примечание. Смесь дает хорошие результаты при фиксации материала, предназначенного для изучения мукополисахаридов, гликогена и некоторых групп липидов. Смесь Санномия не пригодна для постановки реакции Браше.

§ 7. Трихлоруксусная кислота

Трихлоруксусная кислота – бесцветные расплывающиеся на воздухе кристаллы с острым запахом. Молекулярная масса – 163,4, температура плавления 57,5°C, температура кипения 197,5°C, плотность – 1,6237 г/см³. Хорошо растворяется в воде.

этаноле и диэтиловом эфире. Константа диссоциации используется в биохимической практике в качестве вещества, осаждающего белки.

Принцип действия. Вызывает денатурацию белков тканей, что дает возможность сохранить в них многие органические и неорганические вещества.

Состав. Трихлоруксусная кислота – 5 мл, дистиллированная вода – 95 мл (в некоторых случаях приготавливают и 10%-ный раствор кислоты).

Способ применения. 1. Кусочки тканей (размером 2–3 мм) поместить в раствор кислоты. 2. Сроки фиксации определяются размерами материала: кусочки размером 1 мм фиксируют 0,5–1 ч, 3 мм – 4 ч, 6 мм – сутки. 3. Провести через несколько порций 96%-ного этанола (в течение суток). 4. Обезводить в 100%-ном этаноле. 5. Просветлить в ксилоле. 5. Залить в парафин.

Примечание. Используют для фиксации материала, в котором изучается гистохимия белковых веществ и из которого приготавливаются контрольные гистологические препараты.

§ 8. Выбор фиксатора

Выбор фиксатора определяется целью исследования, видом материала, химическими свойствами изучаемого вещества и временем, которым располагает морфолог или гистохимик.

Так, при приготовлении препаратов для общего обзора лучше всего использовать 10%-ном раствор нейтрального формалина, также фиксаторы Буэна, Санномия, Шаффера, Буэна–Аллена. При проведении цитологических исследований можно в качестве фиксаторов рекомендовать жидкости Шампи, Буэна, Карнуа, Флеминга, Ценкера и др.

При изучении нуклеиновых кислот материал чаще всего фиксируют в жидкостях Карнуа, реже – в 10%-ном растворе нейтрального формалина, смесях Лилли, формалин-этанол-уксусной кислоты и жидкости Шабадша. Лучшими фиксаторами для белковых соединений и их функциональных групп служат жидкость

Карнуа, смесь Лилли, растворы трихлоруксусной кислоты, этанола и сульфосалициловой кислоты.

Фиксация липидных веществ обеспечивается использованием жидкостей Бэкера и Чиаччио, растворами хромовой кислоты и ее солей «осмиевой кислотой» и ее смесями.

Для фиксации углеводов используют ряд фиксаторов. В частности, для фиксации гликогена можно рекомендовать жидкости Шабдаша и Карнуа, мукополисахаридов — смесь Санномия и др.

Фиксация ферментов осуществляется применением лиофильной сушки и многих фиксирующих средств (охлажденного ацетона, 10%-ного раствора нейтрального формалина, этанолом и др.).

Для того чтобы получить достоверную гистохимическую картину материала, необходимо его образцы подвергать нескольким способам фиксации и постановки гистохимической реакции. Например, при изучении гистохимии фосфатаз в качестве фиксаторов можно использовать охлажденные растворы нейтрального формалина, ацетона или этанола.

II. ТЕХНИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ГИСТОХИМИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Предметом изучения гистохимии являются химические вещества тканей и клеток человека, животных и растений на микроскопическом уровне, объектом – гистохимический препарат. Последний должен быть тонок (толщиной 2–20 мкм), контрастен и прозрачен, доступный для микроскопического исследования. Оптимальная толщина гистохимического препарата, изучаемого с помощью электронного микроскопа, еще меньше – 0,02–0,05 мкм.

Гистохимические препараты готовят так же, как и гистологические, но срезы не окрашивают, а ставят гистохимическую реакцию на выявление в тканях и клетках определенных веществ. В ряде случаев на таких препаратах производят количественное определение химических соединений.

Большинство гистохимических препаратов готовят из замороженных и залитых в затвердевающие среды кусочков материала.

§ 1. Препараты из замороженных тканей

Замороженные срезы готовятся из свежих и фиксированных кусочков материала. К методу замораживания чаще всего прибегают при необходимости быстро и точно провести исследование материала, например, при экспресс-диагностике в медицинской практике, максимально сохранить в тканях и клетках вещества, хорошо растворимые в органических растворителях при заливке в затвердевающие среды (в частности, большинство липидов) и, наконец, при изучении гисто- и цитохимии соединений, которые быстро разрушаются в тканях после отделения последних от живого организма (многие ферменты). Метод замораживания имеет и недостатки. Так, с его помощью невозможно получить срезы тоньше 10 мкм. Из некоторых органов и тканей, отдельные микроструктуры которых рыхло соединены между собой, вообще нельзя получить замороженные срезы.

Приготовление гистохимических препаратов из замороженных тканей можно разделить на четыре основных этапа: промывание (для фиксированных тканей), изготовление срезов, постановка гистохимической реакции и изготовление постоянного препарата.

Промывание материала. При этом удаляется избыток фиксатора, многие продукты химических реакций между веществами тканей и фиксирующих средств, восстанавливается часть белковых и других функциональных групп (после фиксации формалином, этанолом, ацетоном и др.). Время, среда и сроки промывки определяются составом фиксатора, продолжительностью нахождения в нем материала, морфологическими особенностями объекта и химическими свойствами изучаемого вещества. Для промывки большинства фиксированного материала применяют проточную воду. Материал кладут в банку или другой сосуд, горлышко завязывают марлей и помещают в проточную воду (под кран) на нужное время (в среднем до 20–24 ч). Следует избегать продолжительной промывки, так как это приводит к мацерации тканей. После фиксации в смесях, содержащих пикриновую и трихлоруксусную кислоты, сулему, материал нужно промывать в 70–96%-ном этаноле. Если материал фиксировался в условиях повышенных температур, промывать надо дольше. Ткани, фиксированные в этаноле или спиртовых смесях, а также промытые в спиртах, перед приготовлением замороженных срезов нужно промыть в проточной воде. Материал, фиксированный в сулемовых фиксаторах, мало пригоден для получения замороженных срезов.

Изготовление срезов. Для изготовления срезов применяют специальные замораживающие микротомы, основной частью которых является металлический столник. Замораживание объектов на таких микротомеях достигается или применением углекислотной установки, или с помощью термоэлектрического охлаждающего столика ТОС. Работать с этими приборами нужно строго по инструкциям, прилагаемым к ним.

На поверхность замораживающего столика кладут мокрую прокладку из фильтровальной бумаги, затем на нее наносят не-

сколько капель дистиллированной воды и после этого кладут небольшой, кусочек ткани, предназначенной для приготовления срезов. Производят замораживание объекта. Несколько первых срезов выбрасывают, остальные кисточкой или пальцем переносят в чашки Петри с дистиллированной водой, физиологическим раствором или инкубационной средой. Срезы от каждого образца материала нужно помещать в отдельную посуду с этикеткой. В некоторых случаях срезы наносят прямо на обезжиренные предметные стекла, на которых будет поставлена гистохимическая реакция. Иногда (если не ставят реакцию на белки) для приклеивания срезов на предметные стекла предварительно наносят тонкий слой белка — глицерина (1:1). Приготавливая срезы, нельзя допускать перемерзания объекта, так как при резании они крошатся. При недостаточном замораживании будут недоброкачественные срезы. В этом случае получают соскобы тканей. Очень ценным для изучения многих веществ является получение срезов из свежемороженой тканей в криостате. Сейчас во многих отечественных лабораториях используется микротом-криостат МК-25. На нем получают срезы толщиной 3 – 4 мкм, которые не свертываются и плотно прилегают к предметным стеклам без клеящих средств. Криостат становится незаменимым аппаратом для получения срезов из свежемороженой ткани с целью экспресс-диагностики биопсий в ходе хирургических операций, при изучении ферментных, антигенных и других белковых систем организма.

Постановка гистохимических реакций. Для получения достоверных гистохимических препаратов нужно руководствоваться следующими рекомендациями:

1. При постановке гистохимической реакции использовать срезы (мазки, мазки-отпечатки) образцов материала, которые подвергались разным методам фиксации. Если возможно, параллельно провести реакцию на срезах свежемороженой ткани, приготовленных в криостате, с помощью ножа глубокого охлаждения или на обычном замораживающем микротоме.

2. Строго придерживаться пунктов методик, применяемых в гистохимической практике при изучении отдельных веществ.

3. Обязательным условием правильной интерпретации гистохимической картины препаратов должно быть сравнение их с контрольными препаратами, приготовленными из одного и того же материала с помощью обычных гистологических методик.

4. Для каждой серии гистохимических препаратов ставить соответствующий гистохимический контроль, предусмотренный методикой.

5. При изучении одного и того же вещества в образце материала можно применить несколько гистохимических и биохимических методик.

6. Приготавливая постоянный препарат, нужно обрабатывать срезы (мазки-отпечатки) так, чтобы обработка не отразилась отрицательно на гистохимической характеристике препарата.

В процессе постановки гистохимических реакций в срезах тканей (мазках, мазках-отпечатках) возникают соответствующие окрашенные продукты, благодаря которым обнаруживается локализация и определяется содержание отдельных химических соединений. Возникновение окрашенных продуктов связано с растворением отдельных красителей в определенных химических соединениях клеток (например, судановые красители растворяются в липидах), и явлениями диффузии, адсорбции и абсорбции. В ряде случаев в результате взаимодействия между отдельными веществами клеток и бесцветными реактивами образуются строго локализованные скопления молекул красок, по которым производится гистохимическая оценка препаратов. Химизм таких процессов по возможности раскрывается при описании каждого гистохимического метода в соответствующем разделе настоящего руководства. При изучении гистохимии ферментов используются их свойства катализировать течение определенных химических реакций в тканях и клетках. Для установления локализации того или иного фермента его «заставляют» взаимодействовать с соответствующими реактивами, что и приводит к появлению окрашенных соединений, свидетельствующих прижизненной локализации биологических катализаторов. При изучении многих веществ (нуклеиновые кислоты, белки, углеводы, витамины, гормоны, некоторые минеральные вещества, продукты метаболизма) применяются

флуорохромы, по которым можно установить локализацию в тканях и клетках этих веществ с помощью люминисцентного микроскопа. В количественной цитохимии применяется метод поглощения определенными соединениями, особенно белковыми веществами и нуклеиновыми кислотами, ультрафиолетовых лучей.

При постановке гистохимических реакций места локализации отдельных веществ окрашиваются красителями, молекулы которых состоят из хромофоров и ауксохромов. Для хромофоров характерно – наличие ненасыщенных групп в сопряженном положении.

Особое значение имеет образование хиноидных структур.

Хромофорными свойствами обладают вещества, молекулы которых содержат ядра антрацена, хинолина, нафталина, пиридина, бензола, пиримидина и пиррола. На возникновение окраски оказывают существенное влияние полярные группы-ауксохромы, к которым относятся фенольная-ОН, аминогруппы-первичная, вторичная и третичная, хлор, бром и др.

Под влиянием ауксохромов красящее вещество способно закрепляться на тканях, усиливается и часто углубляется в его цвет. Качество окраски находится в прямой зависимости от количества ауксохромов в молекуле красителя. Так, для амидоазобензола характерна желтая окраска, диамидоазобензола – оранжевая, триамидоазобензола – коричневая. Ауксохромы дают возможность молекуле красителя взаимодействовать с соответствующими веществами тканей и клеток. Например, в молекуле пикриновой кислоты есть три группы хромофоров ($-\text{NO}_2$) и одна – ауксохромов ($-\text{OH}$). С помощью последней кислота осуществляет связь с определенными химическими соединениями.

Возникновение окраски при постановке гистохимических реакций – очень сложный физико-химический процесс, в котором могут преобладать физические (реакция Кайна на различные группы липидов) и химические (возникновение осадков моно- и диформазапов в местах локализации сукцинатдегидрогеназы) факторы. В конечном итоге результат окрашивания зависит от сочетания свойств красителя (размер частиц, растворимость, электрический заряд, способность к окислению или восстановлению и др.)

и протоплазмы (проницаемость, субмикроскопическая плотность, наличие свободной энергии, способность к реакциям присоединения, замещения, окисления, восстановления).

На начальных стадиях окрашивания часто имеют место только физические явления (абсорбция, адсорбция, капиллярность, растворимость красителя в протоплазме), затем происходит химическое взаимодействие молекул красителя с субстратом. Возникает окрашенный комплекс. Важная роль в процессе окрашивания принадлежит факторам внешней среды – окружающей температуре, pH, осмотическому давлению растворов и др. Большое значение имеют и металлы, которые присутствуют в реакционной смеси. Некоторые из них способствуют образованию ковалентных связей между молекулами красителя и субстрата. Часто металлы действуют как своеобразные «мостики», формирующие координационные связи между молекулой красителя и частицами белков. Наибольшей активностью обладают ионы ртути, меди, серебра, никеля, цинка, кобальта и марганца. Некоторые из них действуют протравляюще на ткани.

Механизм возникновения окраски при постановке многих гистохимических реакций в настоящее время изучен мало. Некоторые гистохимические методы пока применяются эмпирически без достаточного научного обоснования. Объяснение физических и химических явлений, происходящих в тканях и клетках при использовании таких методов, должно стать проблемой дальнейших исследований теоретической гистохимии.

При постановке гистохимических реакций необходимо руководствоваться рекомендациями, изложенными вначале раздела. Практически это осуществляется следующим образом.

1. Приготовленные срезы (целые и хорошо расправляющиеся в воде) стеклянными палочками или крючками (если позволяет метод металлическими иглами или крючками) переносят в соответствующую посуду (бюксы, тигельки, часовые стекла), заполненную реактивами согласно применяемому методу.

2. Число срезов должно быть небольшим (соответствовать количеству реактива), но достаточным, чтобы получить нужную гистохимическую картину.

3. Постановку гистохимической реакции проводить в соответствии с требованиями гистохимического метода со строгим соблюдением сроков каждой процедуры, температурного режима, концентрации водородных ионов и др.

4. Часть срезов окрашивают обычными гистологическими методами (например, гематоксилин-эозином) и оставляют гистологическим контролем для данной серии исследования.

5. На части срезов ставят гистохимический контроль согласно используемому методу.

Приготовление постоянного препарата. В постоянном препарате закрепляется состояние срезов органов и тканей, достигнутое в результате постановки гистохимической реакции. Здесь следует выделить отдельные, процедуры: расправление срезов, их монтирование на предметные стекла, обезвоживание и просветление, заключение.

При расправлении срезы вынимают иглами, крючками или стеклянными палочками из соответствующих реагентов и переносят сосуды (чашки Петри, эксикаторы), заполненные дистиллированной водой или другой жидкостью, предусмотренной методом. Здесь срезы расправляются, из них вымывается избыток красителей и растворимые продукты химических реакций, которые могут отрицательно влиять на качество гистохимического препарата.

Затем приступают к монтированию препарата. Для этого предметное стекло в воде (или в другой жидкости) осторожно подводят под край среза, прижимают срез иглой или стеклянной палочкой к стеклу, а затем стекло вместе со срезом медленно вытягивают из сосуда. Срез дополнительно расправляют на поверхности стекла.

Если позволяет метод гистохимического исследования и свойства изучаемых веществ, приступают к обезвоживанию и просветлению срезов. Прежде всего срезы высушивают, промокая их несколькими слоями фильтровальной бумаги. Обезвоживание и просветление срезов проводят несколькими способами. Чаще всего капельницами на срезы наносят на 3–5 мин спирты с возрастающей концентрацией: 70%, 96 и 100% (ускоренный способ), или

и протоплазмы (проницаемость, субмикроскопическая плотность, наличие свободной энергии, способность к реакциям присоединения, замещения, окисления, восстановления).

На начальных стадиях окрашивания часто имеют место только физические явления (абсорбция, адсорбция, капиллярность, растворимость красителя в протоплазме), затем происходит химическое взаимодействие молекул красителя с субстратом. Возникает окрашенный комплекс. Важная роль в процессе окрашивания принадлежит факторам внешней среды – окружающей температуре, рН, осмотическому давлению растворов и др. Большое значение имеют и металлы, которые присутствуют в реакционной смеси. Некоторые из них способствуют образованию ковалентных связей между молекулами красителя и субстрата. Часто металлы действуют как своеобразные «мостики», формирующие координационные связи между молекулой красителя и частицами белков. Наибольшей активностью обладают ионы ртути, меди, серебра, никеля, цинка, кобальта и марганца. Некоторые из них действуют протравляюще на ткани.

Механизм возникновения окраски при постановке многих гистохимических реакций в настоящее время изучен мало. Некоторые гистохимические методы пока применяются эмпирически без достаточного научного обоснования. Объяснение физических и химических явлений, происходящих в тканях и клетках при использовании таких методов, должно стать проблемой дальнейших исследований теоретической гистохимии.

При постановке гистохимических реакций необходимо руководствоваться рекомендациями, изложенными вначале раздела. Практически это осуществляется следующим образом.

1. Приготовленные срезы (целые и хорошо расправляющиеся в воде) стеклянными палочками или крючками (если позволяет метод металлическими иглами или крючками) переносят в соответствующую посуду (бюксы, тигельки, часовые стекла), заполненную реактивами согласно применяемому методу.

2. Число срезов должно быть небольшим (соответствовать количеству реактива), но достаточным, чтобы получить нужную гистохимическую картину.

3. Постановку гистохимической реакции проводить в соответствии с требованиями гистохимического метода со строгим соблюдением сроков каждой процедуры, температурного режима, концентрации водородных ионов и др.

4. Часть срезов окрашивают обычными гистологическими методами (например, гематоксилин-эозином) и оставляют гистологическим контролем для данной серии исследования.

5. На части срезов ставят гистохимический контроль согласно используемому методу.

Приготовление постоянного препарата. В постоянном препарате закрепляется состояние срезов органов и тканей, достигнутое в результате постановки гистохимической реакции. Здесь следует выделить отдельные, процедуры: расправление срезов, их монтирование на предметные стекла, обезвоживание и просветление, заключение.

При расправлении срезы вынимают иглами, крючками или стеклянными палочками из соответствующих реагентов и переносят сосуды (чашки Петри, эксикаторы), заполненные дистиллированной водой или другой жидкостью, предусмотренной методом. Здесь срезы расправляются, из них вымывается избыток красителей и растворимые продукты химических реакций, которые могут отрицательно влиять на качество гистохимического препарата.

Затем приступают к монтированию препарата. Для этого предметное стекло в воде (или в другой жидкости) осторожно подводят под край среза, прижимают срез иглой или стеклянной палочкой к стеклу, а затем стекло вместе со срезом медленно вытягивают из сосуда. Срез дополнительно расправляют на поверхности стекла.

Если позволяет метод гистохимического исследования и свойства изучаемых веществ, приступают к обезвоживанию и просветлению срезов. Прежде всего срезы высушивают, промокая их несколькими слоями фильтровальной бумаги. Обезвоживание и просветление срезов проводят несколькими способами. Чаще всего капельницами на срезы наносят на 3–5 мин спирты с возрастающей концентрацией: 70%, 96 и 100% (ускоренный способ), или

60%, 80,96 и 100% (обычный способ) или 30%, 40, 50, 60, 70, 80, 96 и 100% (замедленный способ, для нежных тканей). После нанесения каждого спирта препарат промокают фильтровальной бумагой. Просветляют срезы, нанося на препарат капельницей один из органических растворителей (ксилол, бензол, толуол, эфирные масла – органоовое, бергамотное, гвоздичное), или их смеси (спирт – ксилол, спирт – толуол), или специальные просветляющие среды (карбол – ксилол, карбол – толуол, карбол – бензол, карбол – скипидар). Последние готовят из расчета: 1 часть кристаллического фенола и 4–5 частей растворителя. В качестве растворителя часто применяют скипидар и креозот. Следует помнить, что во время просветления красители меньше всего экстрагируются толуолом и ксилолом. В ряде случаев срезы (если они хорошо приклеены к стеклам) обезвоживают и просветляют в биологических стаканчиках. Существует также ускоренный метод: на осушенные срезы наносят несколько капель абсолютного ацетона, затем их просветляют смесью ацетона и ксилола (1:1), абсолютным ксилолом и, наконец, заключают в соответствующую среду: канадский бальзам, полистирол и др.

Окончательным этапом приготовления препарата является заключение срезов. Существует много заключающих сред, растворимых в органических растворителях и в воде. Выбор такой среды определяется многими факторами – свойствами изучаемых веществ и гистохимическим методом. Приведем несколько рецептов приготовления таких сред.

Канадский бальзам. Смолообразное вещество, которое получают при перегонке живицы канадской пихты или бальзамической ели, при высыхании затвердевает. Показатель преломления света близок к показателю преломления стекла. Хорошо растворим в органических растворителях. Для приготовления раствора кусочки сухой смолы помещают в широкогорлый с шлифованной пробкой сосуд. Затем наливают растворитель (ксилол, бензол, толуол и др.) с таким расчетом, чтобы жидкость полностью покрывала смолу, и оставляют до полного растворения (иногда для ускорения процесса смесь ставят в термостат при 37 – 40°). Если возникает консистенция жидкого меда, бальзам готов к употреблению. Раствор

глицеро-бальзама обычно имеет слабокислую реакцию. Если такая реакция наносит вред гистохимическому препарату, то для нейтрализации бальзама в смесь добавляют щепотку карбоната натрия или соды. Сосуд закрывают. Для повседневного пользования в небольшой флакон наливают раствор бальзама, закрывают его парафинидовой пробкой или картонной крышечкой. В середине крышечки прокалывают дырку для стеклянной палочки, с помощью которой наносят бальзам на предметное стекло. Вместо капающего бальзама иногда пользуются его заместителями — кедровым или шихтовым бальзамами, но качество препаратов получается хуже; может иметь место явление кристаллизации.

Полистирол. Прозрачные кусочки пластмассы, хорошо растворимы в органических растворителях (ксилоле, толуоле, бензоле). Приготавливают 30%-ный раствор полистирола в ксилоле (толуоле). Хранить в банке с притертой пробкой. Используют при окраске срезов жидкого меда. Если раствор полистирола становится в банке густым, нужно добавить немного ксилола (толуола). Если раствор слишком жидкий, открыть пробку и дать улетучиться избыточному количеству растворителя. Чтобы полистирольная пленка на срезах была прочной и эластичной, в раствор добавляют пластификатор — дибутилсебацат. Методика заключения срезов: на срезы после обработки просветляющими жидкостями наносят (из небольшой пробирки стеклянной палочкой) несколько капель раствора полистирола. Препарат предохраняют от пыли, через 30–40 мин срезы покрываются прозрачной прочной пленкой.

Глицерин — желатина. Применяют для заключения срезов в тех случаях, когда изучаемое вещество и красители, образовавшиеся в результате постановки гистохимической реакции, растворимы в органических растворителях, которые применяются для обезжиривания и просветления. Используют для заключения срезов, в которых изучаются различные группы липидов, многие ферменты, особенно оксидоредуктазы, и другие вещества. Представляет собой смесь трехатомного спирта глицерина и желатины

Желатинного вещества животного происхождения, которое получают после выварки костей, хрящей, обрезков кожи и т. д. Содержит фенол — C_6H_5ON .

Рекомендуется пропись: 7 г сухой желатины растворить в 41 мл дистиллированной воды, через 2–5 ч в смесь добавить 50 мл химически чистого глицерина и 1 г кристаллического фенола. Смесь нагревать в течение 10–15 мин, постепенно перемешивая стеклянной палочкой, после чего отфильтровать через стеклянную вату. Перед употреблением нагреть до 50–60°C. Во время работы (при заключении срезов) смесь сохранять в водяной бане.

Глицерин. Глицерин – трехатомный спирт, вязкая сиропообразная бесцветная жидкость плотностью 1,26, кипит при 290°C, с водой смешивается в любых соотношениях. Применяется для заключения срезов сразу после монтирования их на предметные стекла без обезвоживания и просветления (как и в предыдущем случае). Чтобы максимально сохранить неповрежденными микро-структуры тканей, срезы вначале обрабатывают смесью, состоящей из одинаковых количеств глицерина и дистиллированной воды (1:1), затем переносят в концентрированный раствор глицерина в воде (2:1) и, наконец, в чистый глицерин. Срезы накрывают покровными стеклами, а избыток глицерина отсасывают и удаляют бумажным фильтром.

Гумми – сироп А п а т и. Состоит из гуммиарабика (прозрачной смолы аравийской акации), сахарозы и тимола. Используют для заключения срезов, предназначенных для изучения мукополисахаридов, плазмалей, многих липидов и ферментов. Рекомендуются следующая пропись: в 50 мл дистиллированной воды растворить 50 г сухого гуммиарабика и 50 г сахарозы, нагреть на водяной бане и добавить 0,5 г тимола (консервант).

При заключении на срез стеклянной палочкой наносят нужное количество заключающей среды. К срезу осторожно под острым углом подводят покровное стекло, заключающая среда растекается по краям стекла, и оно под углом 45° постепенно (иногда под контролем препаровальной иглы) опускается на срез, вытесняя воздух.

Препараты, для приготовления которых применяют жидкие незатвердевающие среды (глицерин, глицерин – желатина, гумми – сироп Апати), следует окантовывать. Для этих целей используют специальные лаки, парафин, целлоидин. Приводим прописи: а)

ланолин – канифоль – 1 часть ланолина расплавить в фарфоровом тигельке (15–30 мин), добавить 4 части канифоли, растереть в однородную желто-коричневую массу, перед использованием нагреть (осторожно! Смесь огнеопасна!); б) «асфальтовый лак» по Г. И. Роскину и Л. Б. Левинсону (1957) – к 2 частям расплавленного пчелиного воска добавить 7–9 частей канифоли (осторожно! Смесь воспламеняется!), перед использованием нагреть. Окантовывать горячим шпателем, глазным скальпелем или стеклянной палочкой.

§ 2. Препараты из материала, залитого в затвердевающие среды

В микроскопической технике и гистохимии изучают морфологию и химию тканей на срезах такой толщины, которую невозможно получить с помощью замораживающего микротом (10 мкм и меньше). Для этой цели применяют заливку материала в затвердевающие среды с изготовлением блоков, из которых при резании можно получить срезы толщиной до 1–2 мкм. Этот способ имеет и свои недостатки. В частности, во время обработки материала многие вещества и, в первую очередь, липиды экстрагируются органическими растворителями. Некоторые ферменты, особенно оксидоредуктазы, при обработке материала инактивируются. Поэтому нужно использовать надежные методы фиксации, сохраняющие в материале локализацию и содержание соответствующих веществ. Во многих случаях, особенно при экспресс-диагностике, пока еще незаменим замораживающий микротом, хотя толщина срезов на нем сравнительно большая – 10–30 мкм.

В приготовлении гистохимических препаратов из материала, залитого в затвердевающие среды, выделим шесть основных этапов: промывание материала, заливка материала, изготовление срезов, удаление из срезов затвердевающей среды, постановка гистохимических реакций и приготовление постоянного препарата.

Промывание материала. При промывании фиксированного материала, предназначенного для заливки, происходят те же фи-

зико-химические процессы, что в материале, из которого готовились замороженные срезы.

При выборе среды и сроков промывания нужно учитывать способ и продолжительность фиксации, свойства изучаемых веществ, соблюдать правила заливки фиксированного материала и постановки гистохимической реакции.

Заливка. Заливка состоит из обезвоживания материала, пропитывания его кусочков промежуточной и основной средами, приготовления блока. Чаще всего материал заливают в парафин, целлоидин, целлоидин – парафин, некоторые синтетические среды. Парафин и целлоидин в воде нерастворяются. Кусочки материала последовательно обезвоживают спиртами с возрастающей концентрацией, затем спирты в тканях постепенно вытесняют растворителями парафина или целлоидина – ксилолом, бензолом, хлороформом или диэтиловым эфиром. В результате из тканей и клеток вытесняется вода, они уплотняются и становятся доступными для действия парафина или целлоидина.

Для проведения заливки нужно приготовить ряд бюксов или стаканчиков объемом 150 мл для растворов спирта с различной концентрацией (50%, 60, 70, 80, 96 и 100%, причем последние два раствора спирта взяты по два раза), а также для промежуточных и основной сред. Если материал после фиксации промывали раствором этанола меньшей концентрации, то обезвоживание нужно начинать с раствора спирта с большей концентрацией (следующего за ним). Например, материал промывали в 70%-ном этаноле, обезвоживание нужно начинать с 80%-ного этанола. Если материал фиксировали жидкостями, содержащими этанол, то в тканях произошло естественное обезвоживание и их нужно поместить в следующий по возрастающей концентрации спирт. Например, после жидкости Карнуа кусочки материала переносят в абсолютный этанол. Для лучшего циркулирования этанолов на дно сосудов кладут стеклянную вату. Сроки нахождения материала в спиртах и просветляющих жидкостях определяются его размерами, природой исследуемых веществ и свойствами ткани. Так, кусочки материала размером 5 мм находятся в 50%- и 60%-ном этанолах по 2–4 ч, и

следующих спиртах – от 12 до 24 ч., а кусочки материала размером 1 мм нужно обезвоживать в каждом спирте 1–4 ч. Не следует одну и ту же порцию этанола многократно использовать для обезвоживания, так как в нем возрастает содержание экстрагированных липидов и других соединений. Перед перенесением объекта в 96%-ный этанол кусочки материала обрезают до нужного размера и формы. Если работа по обезвоживанию прерывается, кусочки материала хранят в 70%-ном этаноле. Затем обезвоживание проводят в обычном порядке: после 70%-ного этанола материал переносят в 80%-ный, затем в 96%- и 100%-ный этанола. Чтобы достичь абсолютного обезвоживания, в бюкс или стаканчик с 100%-ным этанолом на каждые 100 мл добавляют 5–10 г безводного медного купороса, который отделяют от кусочка материала прослойкой фильтровальной бумаги и марли. Обезвоживание материала, фиксированного в хромовых смесях, следует начинать с 70%-ного этанола в темноте.

Заливка в парафин. Большинство веществ, прежде всего ферментов, изучают в срезах, приготовленных из материала, залитого в парафин. Парафин – это смесь предельных углеводородов с 20–30 атомами углерода. Для заливки материала применяют парафины, имеющие температуру плавления 52–56°C. Для пластичности в парафин добавляют 5% очищенного пчелиного воска и несколько капель скипидара. Чтобы избавиться от газовых примесей, парафин нагревают в термостате при 70°C в открытых чашках в течение нескольких суток. Для заливки кусочков материала, имеющих поверхность не более 1 см² и толщину не более 3–5 мм, можно рекомендовать схему, предложенную Г. И. Роскиным и Л. Б. Левинсоном (1957):

- 1) 40%-ный этанол – 2–4 ч;
- 2) 70%-ный этанол – 4–6 ч (материал в нем можно сохранять продолжительное время);
- 3) 96%-ный этанол – 6–12 ч;
- 4) 100%-ный этанол – 6–12 ч (дважды сменить раствор);
- 5) смесь 100%-ного этанола и ксилولا (1:1) – 1–2 ч
- 6) ксилол – 2–4 ч (дважды сменить раствор);
- 7) ксилол – парафин (приготовить насыщенный раствор па-

рафина в ксилоле, то есть растворить столько парафина, чтобы был его небольшой осадок) – 2–12 ч при 37°C;

8) парафин – 4–6 ч при 55–56°C (дважды сменить раствор);

9) окончательная заливка в парафин.

При заливке материала в парафин промежуточные среды между этанолом и парафином, кроме ксилола, могут состоять из бензола, толуола, хлороформа, терпинеола, метилбензоата, кедрового масла и др.

Быструю заливку материала в парафин можно проводить по методу Г. А. Меркулова (1969). Можно применить более простой способ ускоренной заливки материала в парафин: 1. Кусочки тканей толщиной 2–3 мм поместить на 30–90 мин в абсолютный ацетон (объем фиксатора должен превышать размеры материала в 25 раз). 2. Абсолютный ацетон дважды сменить. 3. Перенести материал на 15 мин в бензол или на 20–30 мин в хлороформ. 4. Поместить в смесь бензол – парафин при 37°C (или хлороформ – парафин) на 20–30 мин. 5. Перенести в расплавленный парафин при 56°C (две порции, в темноте). 6. Окончательно залить в парафин.

Применение методов ускоренной заливки в парафин вынужденное, так как при этом имеет место нарушение обычного строения тканей.

Очень ценным является способ заливки при помощи вакуума (Кисели, 1962). Все операции после обезживания материала выполняются в условиях вакуума: в вакуум-термостате или упрощенной установке, которую нетрудно сконструировать в обычных лабораторных условиях. Хорошие результаты получены при изучении гистохимии ферментов. Метод более приемлем, чем лиофильная сушка.

Окончательная заливка материала в парафин состоит из нескольких процедур: перенос в формочки или в бумажные корбочки, застывание материала и наклеивание образцов на деревянные колодочки (приготовление блока). Для формочек используют специальные металлические угольники из латуни, стали или олова длиной 8–10 см, шириной 3 см и высотой 1,5–2 см. Угольники кладут на металлическую или стеклянную пластины, сдвигают углы, подбирая нужные размер и форму. Перед заливкой края фор-

мочки смазывают глицерином, наливают горячий (58–60°C) парафин и переносят в нее кусочки материала.

Для заливки материала в парафин чаще всего применяют бу-мажные формочки.

В коробочку наливают горячий (58–60°C) парафин, затем на-гретым пинцетом или шпателем из гермостата переносят кусочек материала и монтируют иглами в нужном направлении. Все эти манипуляции нужно проводить быстро, так как задержка может повлечь за собой артефакты заливки. Коробочки с залитым мате-риалом немедленно переносят в сосуд с проточной водой (темпе-ратура воды 10–18°C), где и происходит остывание. Если для за-ливки применяют металлические формочки, их кладут на стеклян-ные палочки в сосуд и постепенно наливают воду до верхних кра-ев формочки. Через 30–60 мин материал застывает. Скальпелем или острым ножом вырезают нужные кусочки залитого материала так, чтобы вокруг тканей была парафиновая каемка шириной 2 мм.

Затем приступают к наклеиванию изучаемых образцов к де-ревянным колодочкам. Парафиновые блоки прикладывают к коло-дочке стороной, где есть больше парафина. Для этого между коло-дочкой и блоком помещают горячий шпатель, парафин расплавля-ется, шпатель удаляют, блок прижимают к колодочке, и он при-клеивается. Для большей прочности блок дополнительно оплав-ляют парафином по окружности.

Если в тканях изучают ферменты, нужно строго придержи-ваться температурного режима, не допускать перегревания мате-риала и соприкосновения горячего шпателя с тканями. Залитые блоки этикетируют (делают надписи на колодочках).

Заливка в целлоидин. Целлоидин – термопластический мате-риал, состоящий из моонитроцеллюлозы, динитроцеллюлозы и камфоры. Огнеопасен. Используют в производстве фото-, кино- и рентгенопленок. В микроскопической технике и гистохимии при-меняют как затвердевающую среду. Целлоидин, поступающий в продажу, имеет вид тонких стружек или плиток, растворимых во многих органических растворителях. Целлоидин можно получить из некоторых видов фото-, кино- и рентгенопленок, обрабатывая их в течение 30 мин 40%-ным раствором КОН или NaOH. Такую

парафина в ксилоле, то есть растворить столько парафина, чтобы был его небольшой осадок) – 2–12 ч при 37°C;

8) парафин – 4–6 ч при 55–56°C (дважды сменить раствор);

9) окончательная заливка в парафин.

При заливке материала в парафин промежуточные среды между этанолом и парафином, кроме ксилола, могут состоять из бензола, толуола, хлороформа, терпинеола, метилбензоата, кедрового масла и др.

Быструю заливку материала в парафин можно проводить по методу Г. А. Меркулова (1969). Можно применить более простой способ ускоренной заливки материала в парафин: 1. Кусочки тканей толщиной 2–3 мм поместить на 30–90 мин в абсолютный ацетон (объем фиксатора должен превышать размеры материала в 25 раз). 2. Абсолютный ацетон дважды сменить. 3. Перенести материал на 15 мин в бензол или на 20–30 мин в хлороформ. 4. Поместить в смесь бензол – парафин при 37°C (или хлороформ – парафин) на 20–30 мин. 5. Перенести в расплавленный парафин при 56°C (две порции, в темноте). 6. Окончательно залить в парафин.

Применение методов ускоренной заливки в парафин вынужденное, так как при этом имеет место нарушение обычного строения тканей.

Очень ценным является способ заливки при помощи вакуума (Кисели, 1962). Все операции после обезвоживания материала выполняются в условиях вакуума: в вакуум-термостате или упрощенной установке, которую нетрудно сконструировать в обычных лабораторных условиях. Хорошие результаты получены при изучении гистохимии ферментов. Метод более приемлем, чем лиофильная сушка.

Окончательная заливка материала в парафин состоит из нескольких процедур: перенос в формочки или в бумажные коробочки, застывание материала и наклеивание образцов на деревянные колодки (приготовление блока). Для формочек используют специальные металлические угольники из латуни, стали или олова длиной 8–10 см, шириной 3 см и высотой 1,5–2 см. Угольники кладут на металлическую или стеклянную пластины, сдвигают углы, подбирая нужные размер и форму. Перед заливкой края фор-

мочки смазывают глицерином, наливают горячий (58–60°C) парафин и переносят в нее кусочки материала.

Для заливки материала в парафин чаще всего применяют бумажные формочки.

В коробочку наливают горячий (58–60°C) парафин, затем нагретым пинцетом или шпателем из гермостата переносят кусочек материала и монтируют иглами в нужном направлении. Все эти манипуляции нужно проводить быстро, так как задержка может повлечь за собой артефакты заливки. Коробочки с залитым материалом немедленно переносят в сосуд с проточной водой (температура воды 10–18°C), где и происходит остывание. Если для заливки применяют металлические формочки, их кладут на стеклянные палочки в сосуд и постепенно наливают воду до верхних краев формочки. Через 30–60 мин материал застывает. Скальпелем или острым ножом вырезают нужные кусочки залитого материала так, чтобы вокруг тканей была парафиновая каемка шириной 2 мм.

Затем приступают к наклеиванию изучаемых образцов к деревянным колодочкам. Парафиновые блоки прикладывают к колодочке стороной, где есть больше парафина. Для этого между колодочкой и блоком помещают горячий шпатель, парафин расплавляется, шпатель удаляют, блок прижимают к колодочке, и он приклеивается. Для большей прочности блок дополнительно оплавливают парафином по окружности.

Если в тканях изучают ферменты, нужно строго придерживаться температурного режима, не допускать перегревания материала и соприкосновения горячего шпателя с тканями. Залитые блоки этикетировуют (делают надписи на колодочках).

Заливка в целлоидин. Целлоидин – термопластический материал, состоящий из моонитроцеллюлозы, динитроцеллюлозы и камфоры. Огнеопасен. Используют в производстве фото-, кино- и рентгенопленок. В микроскопической технике и гистохимии применяют как затвердевающую среду. Целлоидин, поступающий в продажу, имеет вид тонких стружек или плиток, растворимых во многих органических растворителях. Целлоидин можно получить из некоторых видов фото-, кино- и рентгенопленок, обрабатывая их в течение 30 мин 40%-ным раствором КОН или NaOH. Такую

пленку промывают в проточной воде, очищают от эмульсии, высушивают, режут на тонкие кусочки, споласкивают в нескольких порциях хлороформа, снова высушивают и используют как обычный целлоидин.

Заливка материала в целлоидин состоит из нескольких процедур: обезвоживания в спиртах, пропитывания целлоидином, изготовления блоков и наклеивания их на деревянные колодочки. Растворителем целлоидина служит смесь абсолютного этанола и диэтилового эфира (1:1). Растворы целлоидина хранят в сосудах с пришлифованными пробками. Смесь огнеопасна. Заливку материала в целлоидин проводят по схеме:

1. Обезвоживание в 50%-, 60, 70, 80, 96, 100 (первый раствор) и 100%-ном (второй раствор) спиртах по 24 ч в каждом.
2. Перенести в смесь 100%-ного этанола и диэтилового эфира (1:1) на сутки.
3. Пропитывание в 2%-ном растворе целлоидина – 2–7 суток.
4. Пропитывание в 4%-ном растворе целлоидина – 3–7 суток.
5. Пропитывание в 10%-ном растворе целлоидина – 3–7 суток.
6. Уплотнение материала: в чашечки или тигельки наливают 10%-ный раствор целлоидина, кладут материал, закрывают часовым стеклом на 2–4 суток.
7. Вырезывание целлоидиновых блоков (ободок вокруг материала 2 мм) и хранение их в 70%-ном этаноле до появления консистенции твердой резины.
8. Наклеивание блоков на деревянные кубики: капнуть на кубик несколько капель смеси этанола и эфира, затем 10%-ного раствора целлоидина и приклеить блок.
9. Маркировать блоки и хранить в 70%-ном этаноле.

Заливка материала в целлоидин имеет ряд преимуществ перед парафиновой. Прежде всего, медленное пропитывание тканей целлоидином без применения высоких температур максимально сохраняет без видимых изменений микроструктуры клеток и их химический состав. При заливке в парафин в отличие от целлоидина наблюдается сильное сжатие материала (на 8–20%). Метод хорош для структур, которые при заливке легко расслаиваются: трубчатые органы, глазное яблоко, эмбриональный материал и др. К недостаткам метода относятся: продолжительность заливки, трудность получения серийных срезов, лимитирование времени

хранения блоков. Если материал фиксирован в этаноле и спиртовых смесях, то при обезвоживании его нужно переносить в этанол с более высокой концентрацией.

Заливка в целлоидин – парафин. Метод сочетает преимущества парафиновой и целлоидиновой заливок. Он пригоден для заливки многих тканей, прежде всего таких, которые при парафиновой заливке легко сжимаются (мезенхима, слизистая оболочка матки, яйцевода, ткани глазного яблока и др.) или очень хрупкие. Смысл таких процедур заключается в том, что материал вначале заливают в целлоидин, затем в парафин. Это резко уменьшает сморщивание материала и увеличивает прочность блоков. Можно получить срезы толщиной 1–3 мкм, пригодные для тонких цитохимических исследований.

Целесообразно использовать мягкий парафин с температурой плавления 50–52°C.

Способ не пригоден для приготовления препаратов, в которых будут изучать гистохимию липидных веществ. Такую заливку можно рекомендовать для получения препаратов, в которых изучаются нуклеиновые кислоты, белки, белковые функциональные группы, аминокислоты, некоторые минеральные вещества.

Заливку материала в целлоидин – парафин проводят так:

1. Промывают материал в проточной воде, если материал фиксирован в этаноле и его смесях – в спирте восходящей концентрации.
2. Обезвоживают в спиртах: 70%-ном – 2–24 ч, 96%-ном – 2–6 ч, 100%-ном – 2–6 ч.
3. Пропитывают в целлоидиновом масле и течение 1–3 ч (состав масла: 100 мл 2%-ного раствора целлоидина и 100 мл касторового масла).
4. Проводят через хлороформ – первый раз 15–30 мин, второй раз – также 15–30 мин.
5. Пропитывают парафином: материал поместить в смесь парафина с хлороформом (1:1) при 37°C на 6 ч, перенести в первый парафин при 55–56°C на 15–30 мин, затем во второй парафин при 55–56°C на 15–30 мин.
6. Окончательно заливают в парафин и приготавливают блоки. Для приготовления 2%-ного раствора целлоидина нужно взять 100 мл смеси 100%-ного этанола и диэтилового эфира (1:1) и добавить 2 г целлоидина. Кусочки материала перед внесением в хлороформ осушить фильтровальной бумагой.

Г. А. Меркулов (1969) рекомендует применять более простой способ заливки в целлоидин – парафин:

1. Обезвоживание в спиртах с возрастающей концентрацией – 2–3 суток.

2. Проводка через смесь абсолютного этанола и эфира (1:1) – 3–6 ч. 3. Пропитывание 1–2%-ным раствором целлоидина, приготовленным на смеси 100%-ного этанола и диэтилового эфира (1:1) – 1–2 суток.

4. Хлороформ (одна порция) – 6–18 ч.

5. Хлороформ – парафин (насыщенный раствор, температура 37°C) – 2–3 ч.

6. Первый парафин (температура 54°C) – 1–2 ч.

7. Второй парафин (температура 54°C) – 1–2 ч.

8. Окончательная заливка в парафин.

Кусочки материала перед перенесением в хлороформ осушить фильтровальной бумагой.

Заливка в поливакс (карбовакс). Поливакс, или полиэтиленгликоль, – это воскообразное вещество, имеет различную температуру плавления в зависимости от степени полимеризации. Поливакс – полимер двухатомного спирта этиленгликоля.

Для заливки применяют поливаксы с молекулярной массой 550–4000. Можно рекомендовать два метода заливки.

Метод Кисели (1962)

1. Материал фиксировать в 10%-ном растворе формалина.

2. Промыть в проточной воде.

3. Перенести на 30 мин в 50%-ный раствор поливакса с молекулярной массой 550.

4. Поместить на 30 мин в 75%-ный раствор поливакса.

5. Пропитать в течение 30 мин насыщенным раствором поливакса при температуре 37°C.

6. Перенести материал на 20–30 мин при 37°C в насыщенный раствор поливакса с молекулярной массой 1000.

7. Уплотнить в течение 15–20 мин в смеси «Нонекс» + поливакс (1:1).

8. Перенести на 15–20 мин в «Нонекс».

9. Окончательная заливка материала.

Кисели летом и при высокой влажности воздуха рекомендует использовать поливакс с молекулярной массой 4000.

Метод Бленка

1. Кусочки материала (2–3 мм) поместить в холодный пропиленгликоль (-20°C), держать при глубоком охлаждении. Желательно материал предварительно (3–5 мин) охладить на льду.

2. Через 1–2 ч образцы материала перенести в смесь поливаксов с молекулярной массой 4000 и 1500 (9:1).

3. После пропитывания (в течение 2–3 ч) смеси дают затвердеть и затем приготавливают блоки.

4. Изготовить срезы и расправить на предметных стеклах.

Следует иметь в виду, что в материале, залитом в поливакс, может быть диффузия ферментов и конечных продуктов постановки гистохимической реакции. Эти явления больше выражены для щелочной фосфатазы, меньше – для пероксидазы и кислой фосфатазы.

Изготовление срезов. В зависимости от вида затвердевающей среды и способа заливки материала изготавливаются различные виды срезов, резание и обработка которых имеют свои особенности.

Парафиновые срезы. Получают с помощью микротомов. Обычно используют микротомы специальные для парафиновых срезов и санный микротом. Микротом для парафиновых срезов состоит из основания, приводного механизма, механизма микроподачи, объектодержателя, ножедержателя с механизмом подачи транспортной ленты и транспортера. Санный микротом МС-2 состоит из станины, механизма микроподачи, механизма подъема, объектодержателя и ножевых салазок с ножедержателем.

Во многих лабораториях есть санный микротом, предназначенный для получения срезов из материалов, залитых в парафин, целлоидин, целлоидин – парафин, поливакс. Для резания парафиновых блоков применяют ножи твердой закалки, с толстым клином. Блоки, наклеенные на кубики, закрепляют в объектодержателе. Подбирают углы для разреза и наклона ножа. Нож укрепляют или перпендикулярно к длиннику микротомов (когда надо полу-

чить ленты срезов), или косо (при разрезе плотных объектов). Подгоняют блок к ножу так, чтобы между ними было расстояние 0,5–1 мм. Скальпелем срезают избыток парафина, а микротомным ножом – поверхностные слои материала. Движения микротомного ножа должны быть плавными и быстрыми. Если материал хорошо залит, правильно подобраны углы для разреза и наклона ножа, лезвие острое, то срезы размещаются на поверхности ножа в виде ровной ленты. При неправильной обрезке блока срезы имеют угловатые контуры, при наличии зазубрин ножа – рвутся. С помощью санного микротома получают срезы толщиной 5–6 мкм, а при хорошей подготовке блоков даже 1 – 2 мкм.

При изготовлении срезов возможны погрешности, которые нужно своевременно распознать:

1. Срезы крошатся (объект плохо пропитался парафином, твердый парафин, большой угол наклона ножа, низкая температура окружающей среды, медленное охлаждение парафина при заливке).
2. Срезы сильно деформируются и плохо расправляются (слишком высока температура окружающей среды, парафин очень мягкий).
3. Материал плохо режется или совсем не режется (переуплотнение материала при фиксации и проводке).
4. Срезы закручиваются (высокая температура окружающей среды, малый угол наклона ножа, мягкий парафин).
5. Поперечный срез материала неоднородный (плохое обезжиривание).

Микротомные ножи нужно регулярно точить и править, хранить в сухом месте в футлярах. Применяя тупые и зазубренные ножи, получают срезы с неравномерной толщиной, которые непригодны для цитоспектрофотометрии, и со сдвигом отдельных тканевых и клеточных структур из мест типичной для них локализации (например, ядер и ядрышек), что может служить причиной неправильной интерпретации результатов исследования.

Полученные срезы с бритвы снимают мягкой кисточкой или препаровальной иглой (не касаясь лезвия!) и переносят в теплую (40°C) кипяченую воду, причем стороной, которая была обращена к ножу. В воде их расправляют, затем обезжиренное стекло одним концом опускают в чашку с водой, к нему препаровальной иглой

подносят срез и постепенно вытягивают из воды. Можно взять предметное стекло, подвести под срез под углом 45° , край среза прижать к стеклу, а затем его вместе со срезом медленно вытянуть из воды. Предметные стекла с расправленными на них срезами осушивают гладкой фильтровальной бумагой.

Для проведения некоторых гистохимических исследований (изучение гликогена, многих ферментов, минеральных веществ) нахождение срезов в воде нежелательно. Поэтому срезы с микротомного ножа сразу же переносят на предметные стекла, на которые предварительно нанесен тонкий слой смеси белка и глицерина (смешать равные количества яичного белка и химически чистого глицерина, добавить несколько кристалликов тимола), расправляют при $50-60^\circ\text{C}$ и высушивают в термостате. Иногда срезы помещают прямо на предметное стекло, на которое предварительно накладывают несколько капель 30–40%-ного этанола, подогретого до $45-50^\circ\text{C}$. Последний способ хорош лишь в том случае, когда внесение чужеродного белка на предметное стекло не является причиной возникновения артефактов при проведении гистохимических реакций на белковые вещества. Наклеенные на предметные стекла срезы сушат в термостате при 37°C в течение суток. Стекла этикеттируют.

Целлоидиновые срезы. Наклеенный на кубик блок вынимают из 70%-ного этанола и прочно укрепляют в объектодержателе санного микротом. Блок располагают так, чтобы длинник материала был перпендикулярным к длиннику микротом. Используют ножи типа «а» и «в». Угол наклона ножа острый и регулируется в зависимости от плотности блока: чем мягче объект, тем острее надо ставить угол. Лезвие ножа должно быть в образцовом состоянии, без мельчайших зазубрин. Темп работы с микротомным ножом (короткий и отрывистый, медленный и плавный) определяется эмпирически и зависит от многих причин: навыка, плотности блока, качества заливки, остроты лезвия бритвы. Чаще всего получают срезы толщиной 5–20 мкм. Нож и объект регулярно смачивают 70%-ным этанолом (мягкой кисточкой). При необходимости срезы расправляют на лезвии легким нажатием кисточки или подушечкой пальца. Расправленные срезы переносят в чашку Петри, за-

полненную 70%-ным этанолом. В некоторых случаях для хорошего расправления срезы можно перенести из 70%-ного этанола в дистиллированную воду, где они выравниваются вследствие резкого изменения поверхностного натяжения. Для монтирования срезов на предметные стекла можно рекомендовать метод Рубашкина – Максимова:

1. Предметные стекла сполоснуть 96%-ным этанолом.
2. Нанести тонкий слой белка – глицерина (см. предыдущий метод, без нагревания стекол до 50–60°C).
3. Перенести срезы из чашки Петри на стекла.
4. Быстро промокнуть фильтровальной бумагой.
5. На каждый срез нанести несколько капель 96%-ного этанола и через 2–3 мин промокнуть фильтровальной бумагой.
6. Срезы залить гвоздичным маслом или его заменителями на 5–20 мин до полного растворения целлоидина.
7. Раствор слить и осушить срезы фильтровальной бумагой.
8. На каждый срез нанести несколько раз 2–3 капли 96%-ного (раньше) и 100%-ного (позже) этанолов.
9. Поместить на 10 мин в смесь этанола с эфиром.
10. Провести через ряд спиртов с нисходящей концентрацией (100%, 96 и 70%).
11. Осушить срезы фильтровальной бумагой.
12. Промыть в воде (5–10 мин) и поставить соответствующую гистохимическую реакцию.

В морфологии и гистохимии часто используют ненаклеенные целлоидиновые срезы, так как сам целлоидин имеет клеящие свойства. При этом проводят следующие процедуры:

1. Целлоидиновые срезы мягкой кисточкой, смоченной в этаноле, переносят в 70%-ный этанол.
2. Срезы помещают в 50%-ный этанол.
3. После удаления целлоидина срезы переносят в дистиллированную воду.
4. После промывки ставят соответствующую гистохимическую реакцию.

Целлоидин-парафиновые срезы. Разрез блоков аналогично разрезу парафиновых. Угол разреза более прямой, чем при изго-

товлении срезов из целлоидиновых блоков. Из небольших кусочков материала срезы можно получить даже при угле 90° . Нож и блок нужно смочить 30%-ным этанолом (мягкой кисточкой). Изготавливать срезы и перенести на предметные стекла (кисточка смачивается спиртом). Стекла предварительно смазать несколькими каплями смеси белка и глицерина (в местах наклеивания срезов). Срезы расправляются при температуре $50-60^\circ\text{C}$, после чего их сушат в термостате при 37°C в течение суток.

Удаление из срезов затвердевающей среды. Для проведения гистохимических реакций и постановки гистологического контроля из срезов нужно удалить частицы затвердевающих сред. Срезы, полученные из парафиновых и целлоидин-парафиновых блоков, депарафинируют. Это лучше проводить в биологических стаканчиках или кюветах. В каждом из них содержатся органические растворители (ксилол, бензол или хлороформ) и соответствующий спирт. Предметные стекла со срезами поместить на несколько минут в органический растворитель, затем на 5 мин в 100%-ный этанол, потом в ряд спиртов с нисходящей концентрацией (по 2–5 мин. в каждом) — 96%, 80, 70, 60, 50, 40% и, наконец, в дистиллированную воду. Качество приклеивания и депарафинирования определяют, просматривая предметные стекла в наклонном положении. Если они возле размещения срезов матовые, приклеивание прошло хорошо. Если возникнет зеркальное отсвечивание, то между стеклом и срезом есть пузырек воздуха. В некоторых случаях срезы приклеивают коллодием. Так, после депарафинирования в ксилоле, бензоле или хлороформе, 100%- и 96%-ном этанолах, препарат переносят на 1–2 мин в смесь следующего состава: антсечный раствор коллодия — 20 мл, диэтиловый эфир — 40 мл, 100%-ный этанол — 40 мл. Избыток смеси смывают водой, срезы помещают на несколько минут в 70%-ный этанол и после этого ставят гистохимическую реакцию.

Постановка гистохимических реакций. Является основным этапом приготовления гистохимического препарата. Срезы тканей должны быть полностью освобождены от частиц затверде-

вающей среды. Неполное удаление частиц парафина, целлоидина, парафин-целлоидина или других сред может служить причиной появления артефактов морфологического или гистохимического характера. Постановку любой гистохимической реакции проводят в полном соответствии с предлагаемым методом исследования. Она основана на тех же принципах, что и постановка гистохимических реакций на замороженных срезах (см. предыдущий параграф).

Приготовление постоянного препарата. Постоянный препарат из парафиновых, целлоидиновых, парафин-целлоидиновых и карбо-ваксовых срезов готовят точно так же, как из замороженных срезов, пропуская только расправление срезов и монтирование препарата. Приступают к обезвоживанию, просветлению и заключению срезов в бальзам, полистирол и другие среды. Срезы, приготовленные из желатиновых блоков, не нуждаются в расправлении и монтировании. Их, как правило, не обезвоживают и просветляют, а заключают в одну из водорастворимых сред – глицерин, глицерин – желатину, гумми – сироп Апати.

III. ПРИНЦИПЫ МИКРОСКОПИИ ГИСТОХИМИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Гистохимия — биологическая наука. Объектом биологии служат живые организмы — человек, животные, растения, микробы, вирусы. Современная биология изучает такие объекты имеющимися в ее распоряжении методами на самых различных уровнях: от многоклеточного организма (например, кита) и до элементарных частиц, входящих в состав атомов. Гистохимические методы дают возможность изучать химический состав и течение реакций обмена веществ на уровне тканей, клеток, клеточных оргanelл, ультраструктур и даже молекул. Следует помнить, что клетки человека, животных и растений имеют размеры меньше предела разрешающей способности глаза (0,1 мм), их можно изучать только с помощью светового микроскопа (разрешающая способность — 0,2 мкм). Ультраструктуры клеток еще меньше (200–1 нм) и исследуются в электронном микроскопе. Многие гистохимические методы взяты из аналитической химии. Микрохимическими методами можно провести анализ при наличии в объекте сравнительно небольшого количества вещества — 1 мг (10^{-3} г). Методы цито- и гистохимии фактически являются ультрамикрохимическими, так как с их помощью удастся обнаружить еще меньшие количества веществ в тканях и клетках — от 1 мкг (10^{-6} г) до 1 пг (10^{-12} г). Локализация и содержание таких соединений устанавливается микроскопически. Подсчитано, что по разрешающей способности световой микроскоп (предел 200 нм) в 500 раз сильнее человеческого глаза, электронный (предел 0,4 нм) — в 500 раз сильнее светового. Различные виды микроскопии дают возможность изучить морфологию и химию клеток и субклеточных структур. Ниже мы познакомимся с общими принципами использования отдельных видов микроскопии в цито- и гистохимии. Основные правила работы с микроскопами изложены в специальных инструкциях, прилагаемых к приборам.

§ 1. Световая микроскопия

Микроскоп — основной оптический прибор в цито- и гистохимических исследованиях. Существует много видов и моделей микроскопов. Общий принцип их строения рассмотрим на примере биологического микроскопа МБИ-1.

Микроскоп состоит из механических, оптических и осветительных частей. Механические части в микроскопе — это основание штатива, тубусодержатель, головка тубусодержателем, наклонный тубус, расширенная часть наклонного тубуса, коробка микромеханизма, револьверная система, столик микроскопа, кремальера грубой наводки, микрометрический винт, винтконденсора. Для микрофотографирования прилагается вертикальная монокулярная насадка. Оптические части состоят из набора окуляров (к микроскопу МБИ-1 прилагается три окуляра: $\times 7$, $\times 10$ и $\times 15$) и объективов (к микроскопу МБИ-1 прилагается три объектива: $\times 8$, $\times 40$ и $\times 90$, последний — иммерсионный). В состав осветительного устройства входит зеркало, конденсор с ирисовой диафрагмой. К МБИ-1 прилагается два светофильтра: с синим и белым матовыми стеклами. Они вставляются в специальное кольцо, размещенное под конденсором. Оптические системы современных микроскопов дают возможность изучить микроскопические детали тканей, в том числе и конечные продукты гистохимических реакций, размером до $0,2\text{--}0,3$ мкм. Это достигается системой линз объектива и окуляра. Световые лучи от естественного или искусственного источника света падают на зеркало микроскопа, отражаются от него и направляются на конденсор. Здесь они собираются в виде параллельного пучка и направляются на изучаемый объект, расположенный на предметном столике. После прохождения через соответствующий участок препарата световые лучи расходятся в виде конуса и собираются в линзах объектива, где создается увеличенное, истинное и обратное изображение объекта. Проходя через тубус, в линзах окуляра световые лучи превращаются в параллельные или близкие к ним пучки. Изображение увеличивается, становится мнимым и остается обратным. В таком виде световые лучи достигают оптической системы человеческого глаза, после

чего на сетчатке строится увеличенное, мнимое и обратное изображение объекта. Современные модели светового микроскопа обладают совершенной оптикой, устраняющей сферическую и хроматическую абберацию. Имеют набор окуляров и объективов, дающий увеличение до 2000–2500 раз. Оснащены приспособлениями, с помощью которых можно проводить специальные исследования (фазово-контрастные, люминесцентные, поляризационные), измерения, зарисовку, микрофотографирование и в некоторых моделях – киносъемку объектов. Исследования можно проводить при естественном и искусственном освещении. Многие микроскопы снабжены удобным бинокулярным тубусом с переменным увеличением.

§ 2. Поляризационная микроскопия

С помощью поляризационной микроскопии можно определить оптическую активность веществ, входящих в состав тканей и клеток. Поляризационный микроскоп построен по тому же принципу, что и обыкновенный световой микроскоп. В оптическую систему дополнительно введены поляризатор, превращающий обычный свет в линейно поляризованный, и анализатор, позволяющий провести анализ оптического действия препарата на прошедший сквозь него поляризованный свет. Световые лучи, пройдя через поляризатор, конденсор, препарат, объектив, компенсатор, анализатор и окуляр, создают увеличенное, действительное и обратное изображение изучаемой части препарата.

В гистохимии применяют несколько отечественных моделей микроскопа: МИН-4, МИН-8, МП-6, МП-7. Можно дополнительно переоборудовать биологические микроскопы (МБР-3, МББ-1, МББ-1А, МБИ-6), введя в их оптическую систему поляризационные фильтры.

Метод поляризационной микроскопии определяет наличие в тканях и клетках объектов, обладающих двойным лучепреломлением света – оптической анизотропией. Пучок света, прошедший через пластинку поляризатора, содержит лучи, которые колеблются в одной определенной плоскости. Если между поляризатором и

анализатором нет оптически активных объектов, а их оси будут совпадать, то при рассматривании в окуляр поле зрения окажется светлым. Если оси обеих призм взаимоперпендикулярны (скрещенные призмы), то лучи света, прошедшие через поляризатор, задержатся анализатором и поле зрения окажется темным. Когда между поляризатором и анализатором при скрещенных призмах в препарате окажутся оптически активные вещества, то на темном поле зрения возникнет свечение изучаемого объекта, который называют анизотропным. Проходя через такой объект, плоско поляризованный луч света разделяется на две части, каждая из которых распространяется с неодинаковой скоростью и в различных направлениях. При выходе из объекта части луча снова соединяются, но фазы колебаний их уже не совпадают, что и улавливается анализатором. Большинство биологических объектов, обладающих свойством анизотропии, имеет одну оптическую ось. В тканях выявляются главным образом одноосные кристаллы или кристаллы типа сферита. Некоторые анизотропные вещества сконцентрированы в коллагеновых, мышечных и нервных волокнах. При изучении таких волокон в поляризованном свете оптическая ось света и направление волокон совпадают. Оптическая ось располагается или вдоль, или поперек изучаемого волокна. Совпадение оси объекта и плоскости поляризованного света достигается поворотом столика микроскопа. Существует несколько видов анизотропии: внутренняя, структурная, механическая и дихроизм. Первый вид анизотропии возникает, если между молекулами и ионами формируется упорядоченная асимметрическая структура, и двойное лучепреломление не зависит от коэффициента преломления среды. Эти явления наблюдаются в структурах, в состав которых входят белки и некоторые группы липидов. Причем лучепреломление здесь, как и в большинстве биологических объектов одноосное и положительное. Если проходят такие лучи через волокна, состоящие из нуклеоиротеидов, то возникает одноосное и отрицательное лучепреломление.

Структурная анизотропия наблюдается в тех случаях, когда ультрамикроскопические частицы, имеющие асимметрическое строение, определенным образом ориентированы в среде, имею-

шей индекса коэффициент преломления. Это нужно учитывать при выборе сред для фиксации, промывания, обезвоживания, заливки и, особенно, заключения тканевых срезов, изучаемых в поляризованном свете. Так, анизотропия коллагена отчетливо проявляется при заключении срезов изучаемых тканей в капрат целлюлозы или в смолы, но исчезает после заключения в глицерин – желатину (Дилли, 1969 г.).

Механическая анизотропия возникает в ранее изотропных структурах под действием натяжения или травмирования тканей, или клеток. Это нужно учитывать при интерпретации результатов исследования материала в поляризованном свете.

Дихроизм – свойство анизотропных веществ неодинаково окрашиваться при рассматривании в белом свете в зависимости от направленности поля зрения. Причиной этого явления служит неодинаковое поглощение лучей, имеющих различную поляризацию. Его можно вызвать искусственно при помощи специального окрашивания тканей. Так, при окрашивании срезов материала раствором конго красного в местах локализации амилоида при рассмотрении препарата в поляризованном свете возникает розовая окраска. Дихроизм служит весьма чувствительным показателем ориентации молекул в тканях и во многих случаях дает возможность установить упорядоченное размещение молекул в тех объектах, в которых это не выявляется при изучении в обычном поляризованном свете.

На возникновение анизотропии оказывает влияние внутреннее строение молекул различных химических соединений. Любая структурная анизометрия должна сопровождаться оптической анизотропией. Причиной оптической анизотропии отдельного химического соединения является – наличие в его молекуле асимметрического атома углерода, у которого каждая единица валентности связана с различными атомами и атомными группами. Примером может быть молекула молочной кислоты, у которой второй атом углерода связан с водородом, карбоксильной и гидроксильной группами, метилом.

В тканях и клетках есть много соединений, молекулы которых содержат асимметрический атом углерода: белки, полипепти-

ды, аминокислоты, отдельные группы липидов (стерины и стериды, фосфатиды, цереброзиды, сульфатиды), углеводы (моно-, ди- и полисахариды, мукополисахариды), некоторые витамины, гормоны, продукты конечного обмена и др. Кроме того, в результате взаимодействия некоторых реактивов с химическими веществами тканей и клеток образуются оптически активные конечные продукты реакций. Изучая препараты в поляризованном свете, нужно учитывать явления синергизма и антагонизма отдельных анизотропных соединений, содержащихся в тканях и клетках.

Приготавливая препарат, нельзя допускать наличия в нем пузырьков воздуха и других посторонних примесей.

С помощью поляризационной микроскопии можно определить природу веществ, вызывающих двойное лучепреломление, определить знак и измерить величину оптической активности. Использование поляризационной микроскопии в морфологии дало положительные результаты. Так, при исследовании гаверсовой системы костной ткани можно увидеть радиальное чередование пластин с продольной и поперечной ориентацией фибрилл осеина. Установлено радиальное расположение молекул липидов (стеринов, фосфатидов, цереброзидов) относительно продольной оси нервного волокна и перпендикулярное относительно размещения макромолекул белка. Установлена закономерная ориентация мицелл в ахроматиновом волокне делящихся клеток. Аналогичное размещение белково-липидных элементов обнаружено в хлоропластах и эритроцитах. Поляризационная микроскопия используется для выявления в тканях и клетках патологических отложений оптически активных веществ (стеринов и стеридов, амилоида и др.). По характеру анизотропии изучается форма белковых молекул и вирусов. Работая с препаратами, предназначенными для изучения в поляризованном свете, нужно тщательно удалить парафин и не допускать соприкосновения с фенолами, так как это способствует возникновению артефактов.

§ 3. Люминесцентная (флуоресцентная) микроскопия

Люминесцентная микроскопия по сравнению с другими видами микроскопии имеет ряд преимуществ. К ним, в первую очередь, следует отнести возможность в люминесцентном микроскопе изучать различные вещества в фиксированных, свежемороженых и живых тканях и клетках, высокую чувствительность (в 1000 и больше раз превышает чувствительность адсорбционных методов) и специфичность к минимальным количествам соединений, хорошую яркость (на темном фоне) и контрастность изображений, широкое использование в различных исследованиях.

Люминесцентный микроскоп построен по тому же принципу, что и обыкновенный световой микроскоп. В оптическую систему микроскопа введен более мощный источник ультрафиолетового или белого света и специальные светофильтры. Световые лучи от источника света коллекторной линзой и зеркалом направляются в конденсор, который их концентрирует на препарате. Последний в лучах уже собственной (первичной или вторичной) люминесценции изучается или фотографируется с помощью системы обычного светового микроскопа. Первый светофильтр из общей массы излучения пропускает те лучи, которые вызывают люминесценцию препарата — ультрафиолетовые и синефиолетовые. Второй (запирательный) светофильтр, размещенный в тубусе, поглощает эти лучи, но пропускает в глаз исследователя или на фотопленку лучи люминесценции.

В микроскопической технике и гистохимии используют отечественные микроскопы МЛД-1, МЛ-2, МЛ-2а, МЛ-26, МЛ-3, МЛ-4, МЛК-1, а также оборудованные для этих целей световые микроскопы, в оптическую систему которых введены специальные осветители: ОСЛ-1 (для микроскопов МБИ-2, МБИ-1а), ОИ-17 (для микроскопа МБИ-3), ОИ-18 (для микроскопов МБИ-3, МБР-3, МБИ-8), ОИ-28 (для микроскопов МБИ-3, МББ-1) и др. Люминесцентная микроскопия основана на способности определенных веществ тканей и клеток вначале поглощать, затем испускать световую энергию. Интенсивность люминесценции про-

порциональна интенсивности света, который вызывает люминесценцию, и количеству (во многих случаях) флуоресцирующего вещества. По правилу Стокса, световые волны люминесценции всегда имеют большую длину волн, чем свет, который вызывает это явление. Количество энергии, которое поглощается и затем выделяется в виде свечения (люминесценции), называется квантовым выходом флуоресценции. Величина такого свечения для различных веществ неодинакова и колеблется от 0 до 100%. Она зависит от многих факторов: природы вещества, флуорохрома (при вторичной люминесценции, растворителя, наличия посторонних примесей, особенно «тушителей» люминесценции (осмия, ртути, иода), pH и температуры. Квантовый выход люминесценции не зависит от длины волны света, который вызывает люминесценцию, лишь при достижении определенного предела порция энергии скачком выделяется. Длина волны излучаемого света (цвет люминесценции) определяется химическим строением изучаемого вещества и физико-химическим состоянием. Отдельные вещества могут различаться между собой цветом люминесценции. Четкость изучаемой картины зависит от увеличения, разрешающей способности микроскопа и интенсивности света, который вызывает люминесценцию.

При люминесцентной микроскопии изучают первичную и вторичную люминесценцию. Первичная, или естественная, люминесценция свойственна небольшой группе веществ. Срезы тканей готовят на замораживающем микротоме или в микротоме-криостате. Монтируют на предметные стекла и заключают в дистиллированную воду. Люминесценция вызывается ультрафиолетовым светом. В качестве «запирающего» светового фильтра используется светофильтр ЖС 3.

Следует избегать соприкосновения срезов с фиксирующими жидкостями, длительного ультрафиолетового облучения и продолжительного хранения материала вне организма. Можно использовать мазки и мазки-отпечатки органов и тканей. Большинство веществ, обладающих свойством люминесцировать, после освещения ультрафиолетовым светом светится голубым, синим или фиолетовым цветом. Для цитоплазмы характерна голубоватая

тая, гранул — желтоватая флуоресценция. Отложения кальция имеют желтовато-белое, свободные порфирины — интенсивно-красное свечение. Для хлорофилла типична ярко-красная люминесценция. Канцерогенные вещества типа 3,4-бензпирсена выявляются по ярковыраженным светящимся частицам. Липофусцин в гепатоцитах люминесцирует коричневым, в клетках надпочечника — коричнево-красным цветом. Амилоид обладает синей, церроид — зелено-желтой, пенициллин — зеленой, силикат натрия — синей люминесценцией. Для витамина А типична зеленая или желтая флуоресценция. Люминесцентная микроскопия дает возможность провести количественный анализ содержания веществ в тканях. Так, при малом содержании витамина А в препарате из срезов печени люминесценция угасает в течение 10 с, достаточном — через 45 с (Лилли, 1969).

Большинство веществ, которые содержатся в тканях и клетках, не обладает способностью флуоресцировать. Специфическое свечение таких объектов в люминесцентном микроскопе появляется после их предварительной обработки специальными красителями — флуорохромами. Они и способствуют возникновению вторичной люминесценции. Флуорохромы введены в микроскопическую технику Хайтиигером в 1932 г. Сейчас в люминесцентном анализе применяют несколько десятков естественных и искусственных флуорохромов — тиазиновых, ксантогеновых, хинолиновых, акридиновых, азокрасителей, алкалоидов (берберин, эверсетин, хинин), естественных пигментов (хлорофилл, липохромы, порфирины), углеводов (дибензантрацен, бензатрацен). Некоторые флуорохромы, например, акридиновый оранжевый, обладают способностью неодинаково связываться с различными веществами, вызывая различное их свечение. Флуорохромы соединяются с изучаемыми веществами различными способами: электроадсорбцией, образуют соединения типа солей или просто растворяются в них, вызывая свечение в ультрафиолетовом свете.

Для исследования используются замороженные срезы, приготовленные из фиксированной или свежей ткани, мазки, мазки-отпечатки. Хорошие результаты можно получить при изучении

срезов тканей, приготовленных лиофилизацией. Иногда флуорохромирование проводят на целостном организме: дают животному с пищей флуорохром, через некоторое время убивают и берут нужный материал для исследования. Лучше всего исследовать свежие ткани. Если такой возможности нет, материал фиксируют в 96%-ном этаноле, жидкости Карнуа или же в 10%-ном растворе формалина. Применяя формалин, нужно учитывать деполимеризацию ДНК в материале, что сказывается на характере люминесценции. Фиксация в формалине должна длиться не более двух суток. Фиксаторы, содержащие сулему, пикриновую кислоту или осмий, гасят люминесценцию.

Для исследования объекты на предметном стекле подвергают действию флуорохрома в концентрациях от 1:10 000 до 1:100 000. Выбор флуорохрома определяется целями исследования и природой изучаемого вещества. Флуорохромы обычно растворяют на дистиллированной воде или буферных смесях, в случае прижизненных наблюдений – на физиологическом растворе с учетом pH. Объект покрывают предметным стеклом, избыток флуорохрома отсасывают фильтровальной бумагой и изучают препарат в люминесцентном микроскопе. Если препарат некоторое время нужно сохранить, края покровного стекла окантовывают горячим парафином или асфальтным лаком. Постоянные препараты заключают в полистирол, глицерин или в нелюминесцирующую иммерсионную жидкость. Бальзамы, желатину и другие вещества (даммарлак, кедровое масло) нельзя рекомендовать для заключения препаратов, так как они обладают свойством собственной люминесценции. При подготовке препарата нужно обратить внимание на продолжительность флуорохромирования. Срезы в флуорохроме могут находиться от 10–30 с до 5–10 мин. Продолжительность флуорохромирования и концентрация флуорохрома определяются методикой, часто эмпирически.

При изучении цитохимии нуклеиновых кислот чаще всего в качестве флуорохрома используют акридиновый оранжевый. Обработанные им срезы в люминесцентном микроскопе в местах локализации РНК испускают оранжевый, ДНК – зеленый свет. Денатурация и деполимеризация ДНК приводят к тому, что лю-

минесценция в местах локализации нуклеиновой кислоты становится красной. То же самое можно наблюдать в клетках, подвергнутых некрозу.

§ 4. Фазово-контрастная микроскопия

Этот вид микроскопии используется для постановки морфологического контроля при проведении цито- и гистохимических исследований. Как известно, при световой микроскопии для лучшей видимости микроскопических структур препарата тканевые срезы (мазки, мазки-отпечатки) окрашивают. Фиксация материала вносит глубокие изменения в прижизненное строение тканей и клеток. Преимущество фазово-контрастной микроскопии заключается в том, что здесь рассматриваются живые ткани и клетки, представляющие собой разнородные скопления коллоидных частиц. Различные участки ткани (клетки, межклеточное вещество, волокна) и клетки (цитоплазма и ядро, плазмалемма и ядерная мембрана, эндоплазматическая сеть и органоиды) различаются между собой и окружающей средой коэффициентом преломления света. Пройдя через эти образования, световые лучи меняют скорость, то есть происходит смещение фаз, невидимое при рассмотрении препарата в обыкновенном световом микроскопе. Фазово-контрастный микроскоп превращает фазовые изменения световых волн в световые колебания разной амплитуды, и на поле зрения возникает контрастное изображение рассматриваемой части препарата.

В отличие от светового микроскопа в конструкцию фазово-контрастного микроскопа вместо ирисовой апертурной диафрагмы введена кольцевая диафрагма, которая конденсором и объективом изображается в выходном зрачке объектива вблизи заднего фокуса, где размещена фазовая стеклянная пластинка и фазовое кольцо. Последнее поглощает значительную часть прямо прошедших световых лучей и сдвигает фазу световых колебаний на четверть длины волны света. Осуществляется позитивный фазовый контраст и в окуляре создается контрастное изображение, в котором участки препарата, имеющие меньший коэффициент преломления света,

срезов тканей, приготовленных лиофилизацией. Иногда флуорохромирование проводят на целостном организме: дают животному с пищей флуорохром, через некоторое время убивают и берут нужный материал для исследования. Лучше всего исследовать свежие ткани. Если такой возможности нет, материал фиксируют в 96%-ном этаноле, жидкости Карнуа или же в 10%-ном растворе формалина. Применяя формалин, нужно учитывать деполимеризацию ДНК в материале, что сказывается на характере люминесценции. Фиксация в формалине должна длиться не более двух суток. Фиксаторы, содержащие сулему, пикриновую кислоту или осмий, гасят люминесценцию.

Для исследования объекты на предметном стекле подвергают действию флуорохрома в концентрациях от 1:10 000 до 1:100 000. Выбор флуорохрома определяется целями исследования и природой изучаемого вещества. Флуорохромы обычно растворяют на дистиллированной воде или буферных смесях, в случае прижизненных наблюдений — на физиологическом растворе с учетом pH. Объект накрывают предметным стеклом, избыток флуорохрома отсасывают фильтровальной бумагой и изучают препарат в люминесцентном микроскопе. Если препарат некоторое время нужно сохранить, края покровного стекла окаптовывают горячим парафином или асфальтным лаком. Постоянные препараты заключают в полистирол, глицерин или в нелюминесцирующую иммерсионную жидкость. Бальзамы, желатину и другие вещества (даммарлак, кедровое масло) нельзя рекомендовать для заключения препаратов, так как они обладают свойством собственной люминесценции. При подготовке препарата нужно обратить внимание на продолжительность флуорохромирования. Срезы в флуорохроме могут находиться от 10–30 с до 5–10 мин. Продолжительность флуорохромирования и концентрация флуорохрома определяются методикой, часто эмпирически.

При изучении цитохимии нуклеиновых кислот чаще всего в качестве флуорохрома используют акридиновый оранжевый. Обработанные им срезы в люминесцентном микроскопе в местах локализации РНК испускают оранжевый, ДНК — зеленый свет. Денатурация и деполимеризация ДНК приводят к тому, что лю-

минесценция в местах локализации нуклеиновой кислоты становится красной. То же самое можно наблюдать в клетках, подвергнутых некрозу.

§ 4. Фазово-контрастная микроскопия

Этот вид микроскопии используется для постановки морфологического контроля при проведении цито- и гистохимических исследований. Как известно, при световой микроскопии для лучшей видимости микроскопических структур препарата тканевые срезы (мазки, мазки-отпечатки) окрашивают. Фиксация материала вносит глубокие изменения в прижизненное строение тканей и клеток. Преимущество фазово-контрастной микроскопии заключается в том, что здесь рассматриваются живые ткани и клетки, представляющие собой разнородные скопления коллоидных частиц. Различные участки ткани (клетки, межклеточное вещество, волокна) и клетки (цитоплазма и ядро, плазмалемма и ядерная мембрана, эндоплазматическая сеть и органоиды) различаются между собой и окружающей средой коэффициентом преломления света. Пройдя через эти образования, световые лучи меняют скорость, то есть происходит смещение фаз, невидимое при рассмотрении препарата в обыкновенном световом микроскопе. Фазово-контрастный микроскоп превращает фазовые изменения световых волн в световые колебания разной амплитуды, и на поле зрения возникает контрастное изображение рассматриваемой части препарата.

В отличие от светового микроскопа в конструкцию фазово-контрастного микроскопа вместо ирисовой апертурной диафрагмы введена кольцевая диафрагма, которая конденсором и объективом изображается в выходном зрачке объектива вблизи заднего фокуса, где размещена фазовая стеклянная пластинка и фазовое кольцо. Последнее поглощает значительную часть прямо прошедших световых лучей и сдвигает фазу световых колебаний на четверть длины волны света. Осуществляется позитивный фазовый контраст и в окуляре создается контрастное изображение, в котором участки препарата, имеющие меньший коэффициент преломления света,

будут светлыми, большой — темными. В ряде случаев применяется негативный фазовый контраст.

В лабораторной практике чаще всего используют фазово-контрастные устройства КФ-1, которые можно смонтировать на обыкновенных световых микроскопах МБИ-1, МБИ-3 и др. К некоторым микроскопам (МБИ-6) такие установки прилагаются. Освещение осуществляется с помощью специальных осветителей ОИ-7, ОИ-19 или ОИ-20.

Фазово-контрастная микроскопия используется при многих исследованиях, проводимых в гематологии, бактериологии, микологии, паразитологии, нормальной и патологической гистологии. Служит контролем при проведении цитохимических исследований пунктатов костного мозга, количественного определения резистентности эритроцитов, изучения состояния и числа ретикулоцитов, тромбоцитов, пунктатов опухолей и др.

§ 5. Ультрафиолетовая микроскопия

Ультрафиолетовая микроскопия является одним из важнейших методов исследования биологически важных веществ — нуклеиновых кислот и белков. С помощью ультрафиолетового микроскопа (УФ-микроскопа) определяют количество этих соединений в клетках в процессе роста, развития, физиологической деятельности и патологии. С помощью ультрафиолетовой микроскопии решены важные для биологии и медицины вопросы о составе белков, хромосом, поперечной исчерченности мышечных волокон, механизме мышечных сокращений, химических аспектов утомления и функции нервных клеток, расшифрованы некоторые проблемы молекулярной генетики, определена природа коллоида щитовидной железы и др.

УФ-микроскопы построены по тому же принципу, что и обыкновенные световые. В отличие от световых микроскопов они снабжены ультрафиолетовым источником излучения (для освещения препарата), имеют кварцевую оптику, монохроматор, оптическое устройство, которое разделяет спектр источника света на зоны (в пределах 1–3 нм). Прозрачные и бесцветные в видимой ча-

ти спектра объекты избирательно поглощают коротковолновые световые лучи и становятся видимыми в ультрафиолетовых лучах. Видимость изображения достигается несколькими способами: с помощью флуоресцирующих экранов, электронно-оптических преобразователей, фотографированием на несенсибилизированных фотоматериалах и др.

Ультрафиолетовую микроскопию используют для визуальных наблюдений. Если разрешающая способность светового микроскопа равна 0,2–0,3 мкм, то при использовании УФ-микроскопа она возрастает до 0,11 мкм. Это объясняется тем, что УФ-лучи имеют меньшую длину волны (250–260 нм.), чем обычные световые (550 нм). На флуоресцирующем экране УФ-микроскопа можно детальнее изучить микроструктуры клетки и локализацию продуктов цитохимических реакции. Основное применение ультрафиолетовой микроскопии – это ультрафиолетовая цитофотометрия.

УФ-цитофотометрия базируется на способности отдельных веществ избирательно поглощать УФ-лучи. Так, нуклеиновые кислоты поглощают лучи с длиной волны 260 нм, белки, содержащие остатки аминокислот тирозина, триптофана и фенилаланина, – в пределах 280 нм, ациклические аминокислоты – 220–230 нм и т. д. Интенсивность поглощения лучей отдельными структурами клеток пропорциональна концентрации в них изучаемого вещества при одной и той же толщине объекта (закон Ламберта–Бэра). Количественное содержание отдельных веществ в клетках определяют путем цитофотометрического измерения поглощения света продуктами гистохимических реакций.

Согласно закону Ламберта – Бэра, поглощение света E прямо пропорционально концентрации окрашенного вещества C , толщине поглощающего слоя d зависит от коэффициента экстинкции данного вещества K : $E = KCd$.

Для проведения таких исследований Е. М. Брумберг в 1939 г. создал оригинальный ультрафиолетовый микроскоп МУФ-1, предназначенный для количественного определения содержания веществ в клетках. Позднее были созданы более совершенные модели: МУФ-2, МУФ-3 и МУФ-4. Сейчас наша промышленность

выпускает две модели УФ-микроскопов: МУФ-5 и МУФ-6. УФ-микроскоп – основной оптический узел цитоспектрофотометра, с помощью которого проводятся количественные определения веществ. Обязательной частью цитоспектрофотометра является монохроматор, с помощью которого разделяется спектр источника света на узкие зоны (1–3 нм).

Величину поглощения изучаемыми веществами УФ-лучей измеряют двумя способами – фотоэлектрическим и фотографическим. При использовании первого способа монохроматические лучи падают на препарат, затем адсорбируются определенными веществами и после этого поступают в фотоумножитель. Здесь световая энергия трансформируется в электрическую, что и регистрируется гальванометром или другим записывающим устройством.

Применяя метод цветовой трансформации по Е. М. Брумбергу, исследуемый объект в таком микроскопе фотографируется трижды (на одной и той же пластинке) в лучах трех различных зон УФ-спектра. При этом длины волн УФ-спектра подбирают так, чтобы в каждой зоне размещалась полоса поглощения одного вещества, которое не способно поглощать лучи двух других зон. Таким образом, вещества, которые имеются на фотографиях, оказываются разными на всех снимках. Три снимка помещают в микроскоп. Один из них изучают в синих, второй – в зеленых, третий – в красных лучах. При этом вещества, которые преимущественно локализованы на одном снимке, окрашиваются в разные цвета. Снимки фотометрируют и определяют количество изучаемого вещества в отдельной клетке.

Цитоспектрофотометрию проводят прямым (изучение количества веществ на неокрашенных препаратах) и косвенным (фотометрирование цветных продуктов цитохимических реакций) способами. В последнем случае для количественного определения содержания ДНК в отдельных клетках применяют реакцию Фельгена, суммарного количества нуклеиновых кислот – метод Эйнарсона, белковых веществ, богатых тирозином и триптофаном, – реакцию Миллона, белков, содержащих большой процент аргинина, – реакцию Сакагуши, – SS- и –SH-групп – метод Барнетта и Зеллигмана.

§ 6. Электронная микроскопия

С помощью электронного микроскопа можно изучать тончайшее строение ультрамикроструктур тканей и клеток. Сконструирован в начале 30-х годов. Теоретической основой для создания микроскопа послужили работы де Бройля о волновой природе материи и исследования Буша, доказавшего, что электрические и магнитные поля действуют подобно линзам. Первые микроскопы имели невысокую разрешающую способность – 500 Å. Современные приборы имеют разрешающую способность до 2 Å и увеличение до 1 000 000 раз. В СССР создан ряд моделей электронных микроскопов: ЭМ-100, ЭМ-100Л, УЭМБ-100, УЭМВ-100 и др. В лабораториях используют лучшие модели электронных микроскопов зарубежных фирм: Elmiskop1 (ФРГ), Tesla (ЧССР), Hitachi 10С (Япония), Jem7 (Япония), Jem100В (Япония) и др.

По разрешающей способности электронные микроскопы разделяют на три класса. Микроскопы первого класса имеют разрешающую способность от 2 до 10 Å, второго – от 10 до 40 Å, третьего – от 40 до 50 Å. По виду линз различают электромагнитные, электростатические и магнитостатические микроскопы, а по характеру исследований объекта – просвечивающие, отражающие, эмиссионные, растровые, теневые, зеркальные, телевизионные и др. В биологии, медицине и ветеринарии используют микроскопы просвечивающего типа.

Электронные микроскопы рекомендуется устанавливать на первом этаже без подвального помещения, чтобы избежать вибрации препарата во время исследования. Комната должна быть затемненной. Кроме обычного оборудования, в лаборатории должны быть ультрамикротом, вакуумная установка для теневого распыления, стереоскопический микроскоп МБС-1 и другие приборы, необходимые для электронной микроскопии.

Главным отличием электронного микроскопа от светового является то, что в нем вместо света применяется поток электронов, а обычные стеклянные линзы заменены электромагнитными полями. Во время работы поток электронов от катода – раскаленной вольфрамовой нити – направляется к аноду, проходит через

его отверстие и фокусируется магнитной катушкой на поверхности объекта. Магнитная катушка выполняет роль конденсора. Полученное изображение с помощью второй магнитной катушки – своеобразного объектива – увеличивается. Поток электронов проходит через третью магнитную катушку, выполняющую функцию окуляра или проекционной линзы, после чего изображение объекта увеличивается и изучается на флуоресцирующем экране или фотографируется. Введение в оптическую систему электронного микроскопа дополнительных линз даст прямое увеличение около 100 000 раз, а при микрофотографировании эта величина возрастает до 1 млн. раз.

Основными проблемами, которые стоят перед исследователем при электронно-микроскопическом изучении материала, есть сохранение нативной природы объекта, повышение контрастности изображения, приготовление срезов тканей, доступных для микрофотографирования, выбор приемлемых для данных условий цито- и гистохимических методик.

С помощью электронной микроскопии изучают морфологию и химию ультратонких (толщиной до 50 А) срезов или взвесей тканей, клеток, микробов и вирусов. Живой материал нельзя исследовать под электронным микроскопом из-за повреждаемости в условиях подготовки материала и микроскопирования (вакуум, облучение электронным потоком). Исследуемый объект перед микроскопированием подвергают специальной обработке, после которой максимально сохраняется прижизненное состояние тканей и клеток. Контрастности электронно-микроскопического изображения достигают несколькими способами: сравнением объектов одинаковой толщины, одинакового веса и содержащих одинаковое количество молекул. Срезы готовят на ультрамикротоме. Число цито- и гистохимических методик, модифицированных для электронной микроскопии, пока еще небольшое: изучение локализации ДНК, некоторых белков, липидов, гликогена, ферментов – щелочной и кислой фосфомоноэстераз, АТФ-азы, сукцинатдегидрогеназы и небольшой группы других соединений.

Приготовление препарата для электронной микроскопии заключается в получении свежего материала (экспериментального,

биопсийного, послеоперационного), его фиксации (префиксация и постфиксация), обезвоживании, пропитывании застывающей средой, заливке, изготовлении срезов. Если проводить цито- и гистохимическое исследование, то в приготовление препарата входит и постановка реакции. Для этого лучше использовать материал после лиофильной сушки (изучение локализации РНК, ДНК, гликогена, некоторых ферментов). Гистохимическую реакцию ставят перед обезвоживанием материала.

Правила работы с электронным микроскопом изложены в специальных инструкциях, прилагаемых к приборам, а также в руководствах по электронной микроскопии и электронной гистологии.

IV. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Нуклеиновые кислоты – важнейшие органические соединения, с которыми связаны основные процессы жизнедеятельности организмов. Они открыты Мишером в 1868 г. в ядрах клеток гноя. В дальнейшем обнаружены в различных клетках человека, животных и растений. Установлено, что нуклеиновые кислоты являются простетическими группами сложных белков – нуклеопротеидов. При гидролизе нуклеиновых кислот выявлены пуриновые и пиримидиновые основания, пентозы и фосфорная кислота.

Долгое время считали, что существует два типа нуклеиновых кислот – животного и растительного происхождения. Нуклеиновая кислота животного происхождения впервые получена из тимуса (вилочковой железы). При ее гидролизе образуются два пуриновых основания – аденин и гуанин, два пиримидиновых основания – цитозин и тимин, дезоксирибоза и фосфорная кислота. Эта нуклеиновая кислота и была названа тимонуклеиновой кислотой, позже – дезоксирибонуклеиновой кислотой, или ДНК. При гидролизе нуклеиновой кислоты второго типа, полученной из дрожжей, выявили пуриновые и пиримидиновые основания, а также рибозу и фосфорную кислоту. Эта нуклеиновая кислота была названа рибонуклеиновой кислотой, или РНК. Было установлено, что основной составной частью нуклеиновых кислот является нуклеотид – производное пуринового и пиримидинового оснований, пентозы и фосфорной кислоты. Это можно заметить на примере образования АМФ.

Левин и Басс в 1931 г. создают тетра нуклеотидную теорию, согласно которой нуклеиновые кислоты представляют собой поли нуклеотид, состоящий из четырех нуклеотидов; ДНК – из адениловой, гуаниловой, цитидиловой и тимидиловой кислот. РНК – из адениловой, гуаниловой, цитидиловой и уридилловой кислот. Использование методов цитохимии и фракционирования клеточных структур показало, что обе нуклеиновые кислоты являются обязательными компонентами животных и растительных клеток. Оказалось, что ДНК преимущественно локализуется в ядре, РНК – в ядрышке и цитоплазме. Установлена связь нуклеиновых

кислот с белковым синтезом, что убедительно доказано исследованиями Касперсона (1941), Браше (1942) и Б. В. Кедровского (1942). Выявлено, что при делении клеток (интерфаза) ДНК концентрируется в хромосомах. Опыты Эвери в 1944 г. доказали, что ДНК участвует в передаче наследственной информации.

К этому времени в науке укоренилось мнение, что молекула нуклеиновых кислот представляет собой биополимер, который образуется в результате соединения между собой нуклеотидов с помощью остатков фосфорной кислоты.

Уотсон и Крик в 1953 г. создают структурную модель ДНК. Им доказано, что молекула ДНК состоит из двух спиральных цепочек нуклеотидов, соединенных между собой водородными связями, причем, аденин в ней соединяется с тиминном, гуанин с цитозином. Каждый спиральный тяж молекулы ДНК состоит из 10 нуклеотидов, длина спирали — 15 000–20 000 А, толщина — 15–20 А, межу нуклеотидные расстояния — 3,4 А, один виток спирали (шаг спирали) простирается на 34 А нуклеотидов в молекуле насчитывается до 25 000 единиц, молекулярная масса — 4–8 млн., конфигурация может быть сжатая и растянутая.

В начале 60-х годов работами советских (А. Н. Белозерский и Д. С. Спириин) и зарубежных (Корнберг, Очоа и др.) ученых расшифрована структура молекулы РНК. Молекула РНК представляет собой линейную спираль, в которой нуклеотиды соединены между собой с помощью остатков фосфорной кислоты. Кроме известных ранее аденина, гуанина, цитозина и урацила, в составе молекулы РНК выявлены 6-метилгуанидин, 2-метиламино-6-оксипурин и 2-диметиламино-6-оксипурин. Установлено три вида РНК: информационную, рибосомную и растворимую. Информационная, или матричная, РНК (и-РНК, или m-РНК) составляет около 5% всей РНК клетки, имеет строение, близкое к ДНК, снимает информацию с ДНК и осуществляет контроль за синтезом белка. Ее молекула содержит от 100 до 6000 остатков нуклеотидов, имеет молекулярную массу — от 35 тыс. до 2 млн ед. Рибосомная РНК, р-РНК, или г-РНК, составляет около 80% всей РНК клетки, сконцентрирована в рибосомах и имеет молекулярную массу до 1,5–2 млн ед. Растворимая, или транспортная, РНК (s-

РНК, или т-РНК) представлена более чем 20 разновидностями, свойственными для каждой аминокислоты, составляет около 15% всей РНК клетки, имеет невысокий нуклеотидный состав (80–100 остатков нуклеотидов), участвует в переносе отдельных аминокислот к месту синтеза клеточного белка, то есть к рибосомам. Молекулярная масса составляет 18–35 тыс. Различные виды РНК в основном синтезируются в ядре, затем через поры ядерной мембраны они перемещаются в цитоплазму, в которой и выполняют синтетические, структурные, информационные функции. Местами клеточного синтеза РНК являются хромосомы и ядрышковый аппарат. Причем для клеток различных типов характерны различные метаболические циклы синтеза РНК – в одних преобладает хромосомный, в других – ядрышковый.

Содержание ДНК в различных клетках одного и того же организма характеризуется поразительным постоянством. Так, клетки различных тканей крысы содержат следующее количество ДНК: костного мозга – 6,7 пг, почек – 6,5, легких – 6,5, - сердца – 6,3 пг. Различно также количество ДНК в одной клетке в зависимости от размещения организма в филогенетическом ряду. Так, у человека клетка в среднем содержит 6,8 пг, крокодила – 5, курицы – 2,3 пг ДНК. Количество РНК в клетках определяется их ролью в синтезе белка.

Установлено, что молекулярная масса ДНК вирусов достигает огромной величины: вируса оспы – 160 млн., вируса чумы птиц – 200 млн. Предполагают, что молекулярная масса ДНК кишечной палочки еще выше – 1 млрд.

Применение большинства гистохимических методов при изучении нуклеиновых кислот основано на взаимодействии реактивов с продуктами гидролиза.

§ 1. Выявление нуклеиновых кислот по методу Эйнарсона

(Жидкость Карнуа, 96%-ный этанол, 10%-ный раствор формалина, желательно избегать фиксаторов, содержащих ртуть и хром; парафиновые и замороженные срезы).

Является важным методом гистохимических исследований. Дает возможность суммарно выявить на препарате ДНК и РНК. Используется в цитоспектрофотометрии. При окрашивании срезов ГХК образуется устойчивая окраска, которая не изменяется при обезвоживании спиртами. Важным свойством этого метода является интенсивность окраски – ГХК можно окрашивать срезы при рН от 0,8 до 4,3. Переокрашивание исключено. При уменьшении рН интенсивность окрашивания уменьшается, но специфичность возрастает, достигая максимума при рН = 1,5–1,75. Высокая специфичность реакции ГХК с нуклеиновыми кислотами доказана при рН = 0,8–1,75 на нервной ткани ультрафотометрически.

Принцип выявления. Теоретическое обоснование метода разработано Эйнарсоном в 1951 г. и дополнено другими исследователями. Галлоцианин – краситель оксазинового ряда. Солянокислый галлоцианин представляет собой блестящие игольчатые зеленоватые кристаллы, хорошо растворимые в воде (с образованием фиолетовой окраски). При кипячении с квасцами образуется хромовый краплек галлоцианина в виде трех комплексов: лак-катион, лак-гидроксид и лак-сульфат. Взаимодействуя с нуклеиновыми кислотами, лак-катион образует солевые связи с остатками фосфорной кислоты нуклеотидов. Такой комплекс окрашен в темносиний цвет. Из результатов цитофотометрических исследований видно, что каждый моноклеотид связывается с одной молекулой красителя, в результате чего образуется комплексное соединение, по локализации которого и определяют место нахождения нуклеиновых кислот, в частности ДНК.

Реактивы. 1. Раствор ГХК готовят так: 5 г хромовых квасцов растворить в 100 мл дистиллированной воды, добавить 0,15 г галлоцианина, смешать, встряхивая. Смесь постепенно нагреть до кипения и кипятить 5–10 мин. Охладить, профильтровать, объем довести дистиллированной водой до 100 мл, рН раствора – до 1,64. Раствор годен в течение 1–3 недель. 2. Раствор РНК-азы или ДНК-азы. 3. Буферная смесь. Готовят по таблице, в которой указано, сколько нужно добавить к 40 мл раствора ГХК (см. пункт 1) 1 М растворов HCl или NaOH, чтобы получить нужную рН реактива на нуклеиновые кислоты.

Постановка реакции.

1. Депарафинированные срезы довести до дистиллированной воды.
2. Окрашивать в растворе красителя в течение 48 ч при комнатной температуре.
3. Промыть в проточной и сполоснуть в дистиллированной воде.
4. Обезводить в ряде спиртов с восходящей концентрацией.
5. Просветлить в ксилоле.
6. ЗаклЮчить в бальзам или полистирол.

Результат. Нуклеиновые кислоты окрашиваются в серо-голубоватый цвет. В зависимости от значения pH окрашиваются и другие вещества. Оптимальное значение pH для окрашивания нуклеиновых кислот – 0,83–1,73, для цитоспектрофотометрических исследований – 1,64. На срезах, предварительно обработанных раствором РНК-азы или ДНК-азы, соответствующие нуклеиновые кислоты не выявляются в местах типичной локализации.

§ 2. Раздельное выявление ДНК и РНК смесью метилового зеленого с пиронином

Установлено, что пиронин G в смеси с метиловым зеленым окрашивает РНК ядрышек и цитоплазмы в красный цвет, метиловый зеленый окрашивает ДНК хромосом в зеленый цвет. Это послужило основой для создания гистохимического метода раздельного выявления в клетке РНК и ДНК и многих его модификаций.

Метод Браше (1942)

(Жидкость Карнуа, 10%-ный раствор нейтрального формалина, другие фиксаторы: свежесамороженные и парафиновые срезы, мазки; мазки-отпечатки)

Метод широко используется во многих гистохимических лабораториях мира. С его помощью установлено участие нуклеиновых кислот в синтезе белка, росте и развитии клеток, выполнении клетками специфических функций, возникновении опухолей, патогенезе многих болезней человека и животных.

Принцип выявления. Изучен недостаточно. Принято считать, что реакции метилового зеленого и пиронина с обеими нуклеиновыми кислотами основаны на базофилии структур, обусловленной наличием в составе ДНК и РНК остатков фосфорной кислоты. В возникновении окраски ДНК и РНК ведущее место принадлежит явлению адсорбции, которая по мнению В. Г. Конарева (1966) наступает при структурном соответствии между аминогруппами молекул красителей и фосфатными группами полинуклеотидных цепей. Степень такого взаимодействия изменяется при нарушении нативной структуры нуклеиновых кислот под влиянием вредного действия факторов внешней (рН, температура, наличие посторонних примесей в реактиве) и внутренней (присутствие микробных ядов, продуктов автолиза) среды. Окрашенный комплекс метилового зеленого с ДНК содержит одну молекулу метилового зеленого на каждые 10 атомов фосфора. Кроме этого, метиловый зеленый окрашивает негистоновые белки ядра, связанные с ДНК.

По результатам флуорометрических и спектрографических исследований В. Г. Конарев пришел к выводу, что пиронин в клетке вступает в реакцию со свободной или слабо связанной с белками РНК, образуя окрашенное комплексное соединение пиронина с РНК.

Реактивы. Пригодны два пиронина – G и Y. Метиловый зеленый нужно очистить от примесей метилового фиолетового. Для этого 0,2 г красителя растворяют в 100 мл хлороформа, перемешивают и оставляют на 24 ч. Затем встряхивают, профильтровывают. Осадок метилового зеленого на фильтре промывают хлороформом до тех пор, пока не исчезнет синевато-фиолетовый оттенок. Высушивают и используют для приготовления растворов: 1. Раствор А – смешать 17,5 мл 5% -ного водного раствора пиронина и 10 мл 2% -ного водного раствора метилового зеленого в 250 мл дистиллированной воды. 2. Раствор Б – ацетатный буфер Уолпола с рН = 4,8. 3. Рабочий раствор – перед постановкой реакции смешать равные объемы растворов А и Б. Срок хранения рабочего раствора – в пределах недели. 4. Контрольный раствор – растворить кристаллическую РНК-азу на бидистиллированной воде из расчета 1 мг РНК-азы на 1 мл воды.

Постановка реакции. 1. Если срезы парафиновые довести до воды. 2. Контрольные срезы поместить в раствор РНК-азы на 1 ч при 37 С°. 3. Опытные и контрольные срезы окрасить рабочим раствором пиронина с метиловым зеленым (от 10 мин до 24 ч). 4. Сполоснуть в дистиллированной воде несколько секунд. 5. Осушить фильтровальной бумагой. 6. Быстро обезводить в абсолютном ацетоне. 7. Перенести в раствор ксилола в ацетоне (1:1) на 30–60 с. 8. Сполоснуть в растворе ацетона в ксилоле (1:10). 9. Просветлить в двух порциях чистого ксилола. 10. ЗаклЮчить в канадский бальзам или синтетическую среду.

Результат. Структуры, содержа РНК, окрашиваются в красный цвет, ядерный хроматин – в зеленый, сине-зеленый или пурпурно-зеленый. Контрольные препараты не окрашиваются пиронином, ДНК хроматина выявляется в виде частиц зеленого цвета или зелено-синих образований. На характер окраски влияет степень очистки и качество метилового зеленого.

Пимечание. Для некоторых тканей, в частности нервной, обезвоживание срезов лучше проводить в спиртах с возрастающей концентрацией.

Окрашивание смесью метилового зеленого с пиронином по методу Курника (1955). (Жидкость Карнуа, 80%-ный этанол, холодный ацетон, 10%-ный раствор нейтрального формалина, парафиновые, свежесзамороженные и лиофилизированные срезы).

Модификация Курника дает возможность получить хорошую цветопередачу.

Принцип выявления основан на тех же физических явлениях и химических реакциях, что и предыдущий. Автор модификации установил, что интенсивность и характер окраски препарата определяется степенью полимеризаций нуклеиновых кислот. Так РНК окрашивается пиронином в 5 раз интенсивнее, чем высокополимерная ДНК, и в 6 раз сильнее, чем комплекс ДНК с гистоном. Процедуры, предложенные автором, максимально сохраняют нативную структуру нуклеиновых кислот.

Реактивы.

1. Очистить хлороформом метиловый зеленый от примесей метилового фиолетового (см. Предыдущий метод) и пиронин (до исчезновения окраски хлороформа).
2. Приготовить 2%-ный водный раствор метилового зеленого и 2%-ный водный раствор пиронина.
3. Для приготовления рабочего раствора взять 7,5 мл раствора метилового зеленого, 12,5 мл раствора пиронина и 30 мл дистиллированной воды.
4. Абсолютный н-бутанол.
5. Кедровое масло.
6. Раствор РНК-азы (1 мг фермента на 1 мл бидистиллированной воды).

Постановка реакции. 1. Если срезы парафиновые, довести их до воды. 2. Контрольные срезы поместить на 1 ч в раствор РНК-азы при 37°C. 3. Опытные и контрольные срезы окрасить в рабочем растворе (5 мин). 4. Осушить фильтровальной бумагой. 5. Обезводить в двух порциях н-бутанола (по 5 мин в каждой). 6. Просветлить в ксилоле (5 мин). 7. Погрузить на 5 мин в кедровое масло. 8. Заключить в терпеновую смолу.

Результат. Хроматин окрашивается в голубовато-зеленый цвет, РНК ядрышек и цитоплазмы — в ярко-красный.

Примечание. Курник рекомендует использовать пиронин Y.

Окрашивание смесью метилового зеленого с пиронином по методу Унна (Жидкость Карнуа, Карнуа с 1 % уксусной кислоты, Ценкера, Гелли, 10%-ный раствор нейтрального формалина — фиксация в течение 4–16 ч; замороженные и парафиновые срезы).

Метод прост. Наличие в составе реактивной смеси фенола, по-видимому, способствует лучшему взаимодействию красителей с молекулами нуклеиновых кислот, особенно в грубоволокнистых тканях (например, в надкостнице), где он выполняет «протравливающие» функции.

Принцип выявления. Такой же, как и в методе Браше.

Реактивы. Метиловый зеленый очищают от примесей мети-

лового фиолетового хлороформом (см. метод Браше). 1. Рабочий раствор состоит из: метилового зеленого – 0,15 г, пиронина – 0,25 г, 96%-ного этанола – 2,5 мл, глицерина – 20 мл, кристаллического фенола – 0,5 г, дистиллированной воды – до 100 мл. 2. Раствор РНК-азы (см. метод Браше).

Постановка реакции. 1. Если срезы парафиновые, довести до дистиллированной воды. 2. Контрольные срезы обработать раствором РНК-азы в течение часа при 37°C. 3. Опытные и контрольные срезы поместить в рабочий раствор на срок от 10 мин до 24 ч (время подбирать эмпирически). 4. Осушить фильтровальной бумагой. 5. Быстро обезводить в абсолютном ацетоне. 6. Сполоснуть в смеси ацетон + ксилол (9:1). 7. Перенести «а несколько секунд» в смесь ацетон+ксилол (1:1). 8. Провести срезы через 10%-ный раствор ацетона в ксилоле. 9. Просветлить в двух порциях ксилола. 10. ЗаклЮчить в балъзам.

Результат. Клеточные структуры, содержащие РНК, окрашиваются пиронином в ярко-красный цвет, а содержащие ДНК – в сине-зеленый. Хорошие результаты получены на материале нервной ткани (спинной мозг и ганглии).

Окрашивание смесью метилового зеленого с пиронином по методу Г. И. Роскина и Л. Б. Левинсона (1957)

(Жидкость Карнуа, кратковременно фиксировать, 10%-ный раствор нейтрального формалина; парафиновые и замороженные срезы).

Модификация широко использовалась при изучении химической архитектоники нейронов, опухолей, тканей желез. Получила широкое применение в нашей стране и за рубежом.

Принцип выявления. Такой же, как и в методе Браше.

Реактивы. Используются пиронин Gu Y. Метилловый зеленый очищают от примесей метилового фиолетового (см. метод Браше). 1. Раствор А готовят так: смешивают 15,5 мл 5%-ного водного раствора пиронина с 10 мл 2%-ного раствора метилового зеленого и добавляют дистиллированной воды до 250 мл. 2. Раствор Б: ацетатный буфер с рН = 4,8. 3. Для приготовления рабочего раствора

нужно смешать равные объемы растворов А и Б (годен не больше недели). 4. Раствор РНК-азы (см. метод Браше). В. В. Соколовский (1971) рекомендует готовить раствор из расчета 25 мг РНК-азы на 1 мл дистиллированной воды.

Постановка реакции. 1. Если срезы парафиновые, депарафинировать и довести до воды. 2. Контрольные срезы поместить в раствор РНК-азы на 1 ч при температуре 37°C. 3. Опытные и контрольные срезы перенести в рабочий раствор, и держать там от 10 мин до 24 ч (Г. И. Роскин и Б. Левинсон, 1957) или 40 мин (В. В. Соколовский, 1971). 4. Промокнуть фильтровальной бумагой. 5. Обезводить в абсолютном ацетоне. 6. Сполоснуть в растворе ацетона и ксилола (9:1). 7. Сполоснуть в растворе ацетона и ксилола (1:1). 8. Поместить на 30–60с в раствор ксилола и ацетона (9:1). 9. Просветлить в двух порциях ксилола. 10. ЗаклЮчить в бальзам или полистирол.

Результат. Цитоплазма и ядрышки окрашиваются в малиновый, красный или розовый цвет, ядра – в зеленый. В контрольных срезах РНК не выявляется.

Примечание. В. В. Соколовский рекомендует проводить обезвреживание в двух порциях абсолютного изоамилового спирта по 2 с в каждом. Для получения абсолютного спирта нужно добавить к нему сульфат натрия (10 г на 100 мл спирта).

§ 3. Выявление ДНК

Существует ряд методов, с помощью которых определяется локализация и содержание ДНК. Местами типичной локализации ДНК являются кариоплазма, хромосомы и ядрышки.

Метод Фельгена–Россенбека (1924)

(Все фиксаторы, кроме смеси Бузна; парафиновые, целлоидиновые и замороженные срезы; мазки и мазки-отпечатки). Одна из первых и безупречных реакций современного этапа развития гистохимии. На препаратах можно провести качественные и количественные исследования ДНК. Использование метода дало воз-

лового фиолетового хлороформом (см. метод Браше). 1. Рабочий раствор состоит из: метилового зеленого – 0,15 г, пиронина – 0,25 г, 96%-ного этанола – 2,5 мл, глицерина – 20 мл, кристаллического фенола – 0,5 г, дистиллированной воды – до 100 мл. 2. Раствор РНК-азы (см. метод Браше).

Постановка реакции. 1. Если срезы парафиновые, довести до дистиллированной воды. 2. Контрольные срезы обработать раствором РНК-азы в течение часа при 37°C. 3. Опытные и контрольные срезы поместить в рабочий раствор на срок от 10 мин до 24 ч (время подбирать эмпирически). 4. Осушить фильтровальной бумагой. 5. Быстро обезводить в абсолютном ацетоне. 6. Сполоснуть в смеси ацетон + ксилол (9:1). 7. Перенести «а несколько секунд» в смесь ацетон+ксилол (1:1). 8. Провести срезы через 10%-ный раствор ацетона в ксилоле. 9. Просветлить в двух порциях ксилола. 10. ЗаклЮчить в балъзам.

Результат. Клеточные структуры, содержащие РНК, окрашиваются пиронином в ярко-красный цвет, а содержащие ДНК – в сине-зеленый. Хорошие результаты получены на материале нервной ткани (спинной мозг и ганглии).

Окрашивание смесью метилового зеленого с пиронином по методу Г. И. Роскина и Л. Б. Левинсона (1957)

(Жидкость Карнуа, кратковременно фиксировать, 10%-ный раствор нейтрального формалина; парафиновые и замороженные срезы).

Модификация широко использовалась при изучении химической архитектоники нейронов, опухолей, тканей желез. Получила широкое применение в нашей стране и за рубежом.

Принцип выявления. Такой же, как и в методе Браше.

Реактивы. Используются пиронин Gu Y. Метилловый зеленый очищают от примесей метилового фиолетового (см. метод Браше). 1. Раствор А готовят так: смешивают 15,5 мл 5%-ного водного раствора пиронина с 10 мл 2%-ного раствора метилового зеленого и добавляют дистиллированной воды до 250 мл. 2. Раствор Б: ацетатный буфер с рН = 4,8. 3. Для приготовления рабочего раствора

нужно смешать равные объемы растворов А и Б (годен не больше недели). 4. Раствор РНК-азы (см. метод Браше). В. В. Соколовский (1971) рекомендует готовить раствор из расчета 25 мг РНК-азы на 1 мл дистиллированной воды.

Постановка реакции. 1. Если срезы парафиновые, депарафинировать и довести до воды. 2. Контрольные срезы поместить в раствор РНК-азы на 1 ч при температуре 37°C. 3. Опытные и контрольные срезы перенести в рабочий раствор, и держать там от 10 мин до 24 ч (Г. И. Роскин и Б. Левинсон, 1957) или 40 мин (В. В. Соколовский, 1971). 4. Промокнуть фильтровальной бумагой. 5. Обезводить в абсолютном ацетоне. 6. Сполоснуть в растворе ацетона и ксилола (9:1). 7. Сполоснуть в растворе ацетона и ксилола (1:1). 8. Поместить на 30–60с в раствор ксилола и ацетона (9:1). 9. Просветлить в двух порциях ксилола. 10. ЗаклЮчить в бальзам или полистирол.

Результат. Цитоплазма и ядрышки окрашиваются в малиновый, красный или розовый цвет, ядра – в зеленый. В контрольных срезах РНК не выявляется.

Примечание. В. В. Соколовский рекомендует проводить обезвоживание в двух порциях абсолютного изоамилового спирта по 2 с в каждом. Для получения абсолютного спирта нужно добавить к нему сульфат натрия (10 г на 100 мл спирта).

§ 3. Выявление ДНК

Существует ряд методов, с помощью которых определяется локализация и содержание ДНК. Местами типичной локализации ДНК являются кариоплазма, хромосомы и ядрышки.

Метод Фельгена–Россенбека (1924)

(Все фиксаторы, кроме смеси Буэна; парафиновые, целлоидиновые и замороженные срезы; мазки и мазки-отпечатки). Одна из первых и безупречных реакций современного этапа развития гистохимии. На препаратах можно провести качественные и количественные исследования ДНК. Использование метода дало воз-

возможность установить закон постоянства количества ДНК в хромосомном наборе различных клеток данного вида животных и растений. Реакция Фельгена (так часто называют метод) помогла доказать, что синтез ДНК в клетке происходит во время ее деления — и интерфазе.

Принцип выявления. Начальной стадией реакции является гидролитическое расщепление дезоксирибонуклеопротеида на простой белок и нуклеин. Нуклеин (обычно под влиянием 1 н. раствора HCl) расщепляется до простого белка, и ДНК. Молекула ДНК постепенно разрушается до мононуклеотидов — адениловой, гуаниловой, цитидиловой и тимидиловой кислот. Дальше происходит расщепление связей между основаниями (пуриновыми и пиримидиновыми), дезоксирибозой и фосфорной кислотой. Освобожденные в результате гидролиза молекулы дезоксирибозо-5-фосфата и дезоксирибозы могут (в зависимости от условий среды) существовать как в полуацетальной, так и в оксидной формах. Для простоты изложения дезоксирибозу можно условно изобразить как радикал, связанный с альдегидной группой.

Следующую стадию реакции Фельгена можно выразить уравнением, характеризующим взаимодействие реактива Шиффа с дезоксирибозой. По литературным данным не все альдегидные группы пентоз, которые образовались при кислотном гидролизе, реагируют с реактивом Шиффа. Многие исследователи считают, что реакция Фельгена протекает намного сложнее, чем показано выше.

Реактивы.

1. 1 н. раствор HCl .
2. Реактив Шиффа по прописи де Томази: 1 г основного фуксина растворить в 200 мл кипящей дистиллированной воды, 5 мин встряхивать и охладить, точно, до 50°C . Профильтровать. К фильтрату добавить 20 мл 1 н. раствора HCl . Снова раствор охладить до 25°C и прибавить «нему 1 г пиросульфата натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ или калия $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$. Раствор оставить в темноте в течение 14–24 ч. После добавить 2 г активированного угля, 1 мин встряхивать. Профильтровать. Хранить в холодильнике при $0-4^{\circ}\text{C}$. Перед употреблением раствор должен иметь комнатную температуру.

3. Сернистая вода – взять 5 мл 10%-ного раствора пиросульфита калия или натрия, добавить 5 мл 1 н. раствора HCl, долить дистиллированной воды до 100 мл. Употреблять только свежеприготовленную воду!

4. Растворы для дополнительной окраски: 0,5%-ный водный раствор прочного зеленого, 0,5%-ный спиртовой раствор прочного зеленого, 1%-ный водный раствор светового зеленого, 0,5%-ный спиртовой раствор малахитового зеленого.

Постановка реакции. 1. Парафиновые срезы довести до воды. Если материал находился в сулемовых фиксаторах, ртутные осадки удалить. 2. Ополоснуть в холодном 1 н. растворе HCl. 3. Перенести в 1 н. раствор HCl, нагретый до 60°C, на соответствующий срок для гидролиза (в зависимости от фиксатора – см. примечание к данному методу). 4. Погрузить в реактив Шиффа на 0,5–1 ч. 5. Осушить фильтровальной бумагой. 6. Сполоснуть в трех сменах сернистой воды (по 2 мин в каждой). 7. Промыть в проточной воде. 8. Если это необходимо, докрасить одним из дополнительных красителей (1%-ным водным раствором светового зеленого). 9. Обезводить в спиртах. 10. Просветлить в смеси спирт – ксилол (1:1) и в двух сменах ксилола. 11. ЗаклЮчить в канадский бальзам, полистирол или другие среды.

Результат. ДНК окрашивается в красновато-пурпурный цвет (дополнительная окраска способствует контрастности среза). Реакцию Фельгена используют для изучения различных форм деления клеток и подсчета индекса митозов. Нервные клетки характеризуются слабо выраженной реакцией Фельгена, особенно крупные рецепторные нейроны спинальных ганглиев и ганглионарного узла.

Примечание. При проведении гидролиза нужно учитывать характер и сроки фиксации материала. Так, если материал фиксировался в растворе формалина, сроки кислотного гидролиза определяются 8 ч, формалина – сулемы – 8, жидкости Рего – 14, Карнуа – 8, Карнуа в модификации Лилли – 6, суза – 18, Ценкера – 5, Буэна-Аллена – 22, Флемминга – 16, дихромат – уксусной кислоте – 14, насыщенном растворе пикриновой кислоты – 15–30 мин. Жидкость Буэна не рекомендуется для фиксации материала, предназначенного для изучения ДНК.

Реакция Фельгена с гидразидом нафтойной кислоты по Пирсу

(Различные фиксаторы и способы подготовки тканей).

Э.Пирс (1962) считает, что этот метод позволяет избежать некоторых артефактов, имеющих место при использовании реактива Шиффа.

Принцип выявления. В результате мягкого гидролиза, проведенного в 1 н. растворе HCl , молекула ДНК расщепляется на мононуклеотидов, которые гидролизуются до пуриновых и пиримидиновых оснований, дезоксирибозы и фосфорной кислоты. Дезоксирибоза по своим химическим свойствам является пентозоальдозой. Полученное соединение вступает в реакцию с диазотированным о-дианизидином, в результате чего образуется краситель пурпурного цвета.

Реактивы. 1. 1 н. раствор HCl . 2. 0,1%-ный раствор гидразида 2-окси-3-нафтойной кислоты в 50%-ном этаноле, содержащем 5% уксусной кислоты. 3. Раствор диазотированного о-дианизидина: 50 мг прочного синего В растворить в 50 мл 0,1 М фосфатном буферном растворе с $\text{pH}=7,4$. Если нет в лаборатории гидразида нафтойной кислоты, его можно приготовить из 2-окси-3-нафтойной кислоты.

Постановка реакции.

1. Срезы довести до дистиллированной воды.
2. Быстро сполоснуть в холодном 1 н. растворе HCl .
3. Провести гидролиз в 1 п. растворе HCl при 60°C с учетом фиксации материала (см. предыдущий метод).
4. Сполоснуть в холодном 1 н. растворе HCl .
5. Быстро промыть в дистиллированной воде.
6. Ополоснуть в 50%-ном этаноле.
7. Поместить в раствор гидразида нафтойной кислоты на 3–6 ч при 22°C .
8. Сполоснуть в трех порциях 50%-ного этанола (по 10 мин в каждой).
9. Промыть в дистиллированной воде.
10. Перенести в свежеприготовленный Раствор прочного синего II при 0°C и $\text{pH} = 7,4$ на 1–3 мин.

11. Обезводить в спиртах.
12. Просветлить в ксилоле.
13. Заключить в бальзам или полистирол.

Результат. ДНК окрашивается в синевато-пурпурный цвет. Белковые соединения могут окрашиваться в розовато-красный цвет.

Примечание. Контрольные препараты перед кислотным гидролизом (пункт 2 в методах Фельгена – Россенбека и Пирса) обрабатывают раствором ДНК-азы. Его можно готовить несколькими способами:

а) растворить кристаллическую ДНК-азу в 0,0025 М растворе HgSO_4 из расчета 1 мг ДНК-азы на 1 мл раствора;

б) растворить кристаллическую ДНК-азу в 0,01 М трис-буфере (рН = 7,6) из расчета 2 мг ДНК-азы на 100 мл раствора. Перед использованием разбавить дистиллированной водой (1:5).

Срезы, мазки или мазки-отпечатки инкубируют в соответствующем растворе ДНК-азы при 37°C в течение 1–24 ч (время подбирают эмпирически в зависимости от природы изучаемого материала). В дальнейшем применяют обычную обработку препарата, предусмотренную методиками.

V. БЕЛКОВЫЕ ВЕЩЕСТВА

Белки — высокомолекулярные органические соединения, построенные из остатков аминокислот. Они являются важнейшими веществами, составляющими структурную и функциональную основу клеток любого живого организма, так как с их деятельностью связано существование живой материи.

По определению Ф. Энгельса «Жизнь есть способ существования белковых тел, и этот способ существования состоит по своему существу в постоянном самообновлении химических составных частей этих тел. Повсюду, где мы встречаем жизнь, мы находим, что она связана с каким-либо белковым телом, и повсюду, где мы встречаем какое-либо белковое тело, не находящееся в процессе разложения, мы без исключения встречаем и явления жизни».

Белки разнообразны по строению и видовой специфичности. Для них характерно многообразие физических и химических превращений. Они могут образовывать комплексные соединения со многими веществами: ДНК, РНК, липидами, углеводами, витаминами, металлами и др. Способны изменяться под воздействием физических и химических факторов и быстро восстанавливать прежние свойства.

В тканях и клетках белки выполняют ряд жизненно важных функций. Основными из них являются структурная, биокаталитическая и защитная. Биоконплексные соединения белков с другими соединениями (например, липидами) составляют основу многочисленных клеточных мембран. Все известные ферменты (около 1000) имеют белковую природу. Благодаря наличию в молекуле химически активных функциональных групп, белки могут обесвреживать ядовитые вещества, которые образуются в организме и результате обмена или попадают в него извне.

Известно свыше 2000 белков, полученных из тканей животных, растений, человека, микробов и вирусов. Белковые вещества разделяют на две группы: простые, или протеины, и сложные, или протеиды. Молекула протенинов при гидролизе распадается главным образом до аминокислот. К протейнам относят альбумины,

глобулины, проламины, протамины, гистоны, глютелины, альбумоноиды. При гидролитическом расщеплении молекулы протеидов образуются простой белок и простетическая группа. В зависимости от химической природы простетической группы протеиды разделяют на нуклеопротеиды, хромопротеиды, фосфопротеиды, глюкопротеиды, липопротеиды, металлопротеиды. Конечным продуктом гидролиза белковой части молекулы протеида являются аминокислоты.

Белки имеют высокую молекулярную массу (РНК-аза – 13700, белок вируса гриппа – 322 000 000), хорошо растворимы в воде, образуют коллоидные растворы (золи и гели), высаливаются под влиянием нейтральных солей, а после действия сильных кислот, щелочей, солей тяжелых металлов, алкалоидных реактивов, некоторых органических кислот и высокой температуры они денатурируют. В химическом отношении белковые вещества представляют собой амфотерные электролиты, так как в составе их молекул всегда есть определенное количество свободных карбоксильных и аминных групп: $(\text{H}_2\text{N})_m\text{-R-(COOH)}_n$. При диссоциации карбоксильных групп белки приобретают свойства слабых органических кислот.

Ионы водорода могут присоединяться к аминок группам, тогда белки приобретают свойства слабых органических оснований.

Во время растворения ионы водорода, которые образовались при диссоциации, присоединяются к аминок группам и большинство белковых молекул ионизируются.

Эти явления имеют первостепенное значение при постановке многих цито- и гистохимических реакций на белковые вещества, так как многие реактивы по своим свойствам являются электролитами.

Современные гистохимические методы исследования белков дают возможность выявить локализацию белковых соединений в тканях, клетках и интрацеллюлярных структурах. С их помощью определяют качественный состав многих белков, изучают отдельные стороны биосинтеза белковых молекул и перемещение их в клетке, ткани и органе, определяют реакционную способность белков, выявляют в них активность отдельных функциональных

групп. Продукты отдельных гистохимических реакций (реакций Миллона, Сакагуши, Олферта и Гешвинда и др.) можно цитофотометрировать.

§ 1. Выявление суммарных белков

Суммарные, или общие, белки в тканях человека, животных и растений представлены различными видами протеинов и протеидов. Количество белковых веществ в клетках и тканях определяется многими факторами: их происхождением, спецификой функции, зрелостью организма, ткани и клеток, степенью физиологической нагрузки, местом животного в филогенетическом ряду, условиями обитания, функциональным состоянием и др. Количество гистохимических красителей, связанных с белками, пропорционально содержанию белковых веществ в тканях. Это типично для большинства методов, используемых в цито- и гистохимии, что находится в соответствии с законом Бугера – Ламберта – Бэра.

Метод Бонхега (1955)

(10%-ный раствор формалина, жидкость Карнуа; парафиновые срезы). Метод основан на окрашивании клеток и тканей бромфеноловым синим. Применяют в биохимических исследованиях. Модифицирован для гистохимических целей. В гистохимических срезах, которые окрашивались бромфеноловым синим, количество связанного красителя пропорционально содержанию в них белковых веществ.

Принцип выявления. Реактив представляет собой бесцветные или розоватые кристаллы, растворимые в воде, спирте и эфире. Молекула бромфенолового синего имеет сложное строение.

Химизм реакций красителя с белками мало изучен. Можно предположить, что в результате гистохимической реакции между красителем и субстратом в местах размещения белковых веществ возникает труднорастворимое комплексное соединение бромфенолового синего с белком как следствие проявления ионных сил, химической связи и адсорбции.

Реактивы. 1. В зависимости от цели исследования применяют два раствора красителя: а) 1%-ный спиртовой раствор бромфенолового синего, насыщенный сулемой; б) 0,05%-ный раствор бромфенолового синего, приготовленный на 1%-ом растворе сулемы в 2%-ном растворе уксусной кислоты. 2. 0,5%-ный водный раствор уксусной кислоты.

Постановка реакции.

1. Парафиновые срезы довести до воды.
2. Поместить в раствор бромфенолового синего на 2 ч при комнатной температуре.
3. Промыть в 0,5%-ном водном растворе уксусной кислоты в течение 5 мин.
4. Сполоснуть в трет-бутаноле.
5. Просветлить в ксилоле.
6. Заклочить в канадский бальзам или синтетическую среду, например, в полистирол.

Результат. Локализацию белковых соединений определяют по темно-синему окрашиванию.

Реакция Миллона

(Жидкость Карнуа, Бэкера, Шаффера, Лилли, 10%-ный раствор формалина; парафиновые и замороженные срезы).

Принадлежит к биохимическим методам выявления белков. Модифицирована для гистохимических исследований. Метод усовершенствован для цитофотометрии белков.

Принцип выявления. Выявление белков основано на образовании нитрозо-ртутных производных аминокислот тирозина и триптофана, которые в виде остатков входят в полипептидные цепочки белковых молекул. Многие стороны химизма реакции остаются малоизученными. Джибб (1927) отмечал две стадии реакции Миллона. На первой происходит замещение водорода бензольного ядра тирозина или триптофана нитрозогруппой, образуется нитрозофенольное белковое соединение. На второй стадии образуется комплексное соединение, содержащее ионы ртути и азот нитроазогруппы. Оно и является причиной пурпурно-красной окраски белков.

Реактивы. 1. Рабочий раствор: к 400 мл азотной кислоты (пл. 1,42) добавить 600 мл дистиллированной воды, через 48 ч нужное количество смеси разбавить дистиллированной водой (1:9). К разбавленному раствору добавить до насыщения нитрата ртути и профильтровать. Если берется 400 мл фильтрата, то для приготовления рабочего раствора Г. И. Роскин и Л. Б. Левинсон рекомендуют добавить 3 мл разбавленной (1:9) азотной кислоты и 1,4 г нитрита натрия. 2. 2%-ный раствор азотной кислоты.

Постановка реакции.

1. Если срезы парафиновые, депарафинировать бензином и безводным уксусом.
2. Сполоснуть в воде.
3. Покрывать реактивом Миллона (рабочим раствором) и оставить до появления нужной окраски. При 60°C (в термостате) реакция заканчивается через 30–60 мин (использовать закрытые шоксы или чашки).
4. Сполоснуть в 2%-ном растворе азотной кислоты.
5. Обезводить в спиртах.
6. Просветлить в ксилоле.
7. ЗаклЮчить в бальзам.

Результат. Белки, содержащие тирозин или триптофан, окрашиваются в розово-красный или оранжевый цвет. Окраска устойчива в течение нескольких месяцев. Протамины и коллагены не окрашиваются.

Примечание. Фиксаторы, содержащие этанол, отрицательно влияют на постановку реакции Миллона. Аналогичным действием обладают и некоторые другие соединения: хлориды, пероксиды, соли тяжелых металлов.

§ 2. Выявление основных и кислых белков

Современная гистохимия обладает небольшим количеством методов, с помощью которых можно отдифференцировать основные и кислые белки. Проявление белками основных свойств обусловлено преобладанием в составе их молекул аминогрупп над карбоксильными. Основные белки содержат высокий процент ос-

татков диаминомонокислотных ациклических (орнитина, аргинина, лизина, оксалина) и некоторых циклических (гистидина) аминок- и имино-кислот (пролина, оксипролина). Типичными представителями таких белков являются различные виды протаминов и гистонов. В молекулах кислых белков число карбоксильных групп преобладает над аминными. Они построены главным образом из моноаминодикарбоновых аминокислот (аспарагиновой, глутаминовой), например глутелины содержат до 43% глутаминовой кислоты. Проявление кислых свойств сложных белков, например, фосфопротенидов, связано с наличием в их молекулах остатков минеральных кислот.

Метод Микель – Кальво (1957)

(Свежая ткань, формалин, жидкость Карнуа; замороженные и парафиновые срезы).

Принцип выявления. Изучен недостаточно. По-видимому, как и при выявлении общих белков с помощью растворов бромфенолового синего, здесь главную роль играют явления адсорбции и взаимодействие красителя с молекулами белковых веществ через белковые функциональные группы. В зависимости от преобладания в молекулах белковых веществ тех или других функциональных групп будет неодинаковая окраска – от темно-синего до желтого цвета.

Реактивы. 1. Рабочий раствор: приготовить 0,1%-ный раствор бромфенолового синего на смеси абсолютного этанола (7 частей) и уксусной кислоты (3 части), pH = 2,4. 2. 1%-ный спиртовой раствор уксусной кислоты: в 100 мл 70%-ного этанола растворить 1 мл ледяной уксусной кислоты.

Постановка реакции.

1. Замороженные или депарафинированные срезы поместить на 2–10 мин в рабочий раствор.
2. Дифференцировать в 1 % -ном спиртовом растворе уксусной кислоты.
3. Обезводить (в спиртах или ацетоне).
4. Просветлить в ксилоле.
5. ЗаклЮчить в канадский бальзам или полистирол.

Результат. Основные белки окрашиваются в голубые и синие тона, кислые белки – в красный, желтый и зеленый цвет.

§ 3. Выявление липопротеидов

Липопротеиды – сложные белки, молекулы которых состоят из простого белка и простетической группы. В сложных белках простетической группой являются липиды (нейтральные жиры, стерины фосфатиды, цереброзиды), жирные кислоты, каротины, вита- А, D, Е, К и др. Если в составе молекулы преобладает белковая часть, говорят о липопротеидах. Если количество липидов намного превышает белковую часть, говорят о протеолипидах.

Значение липопротеидов велико. Их молекулы составляют основу клеточных мембран (наружной плазматической и ядерной), рибосом и эндоплазматической сети, митохондрий и лизосом, комплекса Гольджи и микротелец. Отдельные липопротеиды участвуют в таких жизненно важных процессах, как свертывание крови (тромбопластин), зрение (родопсин), иммунитет и т. д.

Метод Кармихалла (1963)

(10%-ный раствор формалина, жидкость Бэкера, Карнуа, Флемминга, Лилли и др.; парафиновые и замороженные срезы; мазки).

Принцип выявления. Липопротеиды, в состав которых входят холин, этаноламин или серии, могут реагировать со смесью, в которой есть гидрохинон (источник протонов и электронов), хлорид кобальта и соль тетразолия. Вначале образуется комплекс гидрохинона с простетической группой липопротеида, после чего выделяется водород, восстанавливающий соли тетразолия.

При этом образуется хелатный комплекс формазана с кобальтом.

Реактивы. 1. 0,1 М раствор гидрохинона. 2. Основной раствор: 0,25 мл 0,2 М трис-буфера с pH=8,1 смешать с 3 мл 0,5 М раствора CoCl_2 , отфильтровать, добавить 25 мл 0,1%-ного раствора 3-(4,5-диметилтиазолил-1,2) 2,5-дифенилтетразолий бромида или хлорида, 25 мл трис-буфера (pH = 8,1) и 40 мл дистиллиро-

ванной воды. Хранить в холодильнике. 3. Рабочий раствор готовят так: перед использованием смешивают 0,25 мл 0,1 М раствора гидрохинона с 15 мл основного раствора.

Постановка реакции.

1. Свежезамороженные или депарафинированные срезы поместить на 90 мин в рабочий раствор.
2. Промыть (несколько минут) в дистиллированной воде.
3. ЗаклЮчить в глицерин – желатину.

Результат. Липопротеиды выявляются в виде светло-серых или сине-черных включений. Реакция лучше выражена на срезах, которые приготовлены из лиофилизированного или свежезамороженного материала, хуже – на срезах тканей, фиксированных в формалине, слабо – на парафиновых срезах.

§ 4. Определение белковых функциональных групп

Белковые вещества, кроме концевых групп – COOH и NH_2 , содержат и другие функциональные группы, определяющие многообразие свойств белковой молекулы. К ним относятся чаще всего те группы, которые размещены в боковых ответвлениях пептидной цепи. В частности, карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот, аминогруппы лизина, гуанидиновая группа аргинина, индольная группа триптофана, имидазольная группа гистидина, гидроксильная группа серина и треонина, фенольная группа тирозина, сульфгидрильная группа цистеина, дисульфидная группа цистина, тиоэфирная группа метионина, алифатические цепи других аминокислот и ароматическое кольцо фенилаланина. Исключительно важная роль таких групп проявляется в структуре и функции ферментов, так как с ними связан процесс катализа, расщепление или присоединение субстратов, ориентация субстратов коэнзимов по отношению к каталитическому центру и др. Некоторые белковые группы можно определить гистохимически.

Выявление NH_2 -групп, связанных с белками

(10%-ный раствор формалина, 85%-ный этанол, жидкость Карнуа, Ценкера; свежезамороженные и парафиновые срезы).

Аминогруппам принадлежит важная роль в строении и функциях белковых молекул. Происхождение свободных NH_2 -групп различное: концевые группы белковой молекулы, группы боковых ответвлений полипептидной цепочки (а-аминокислот, б-аминогруппа лизина и оксилизина, б-аминогруппа орнитина). Особое значение имеет Е-аминогруппа лизина, так как в молекулах ферментов она участвует в образовании связей между апо- и коферментами, при катализе – с субстратами. Для выявления таких аминокрупп чаще всего используют нингидриновый метод.

Принцип выявления. Реакция протекает в несколько стадий. Вначале в результате окислительного дезаминирования а-аминный остаток аминокислот под влиянием нингидрина превращается в иминный.

На следующей стадии реакции иминокислота распадается до углекислого газа, аммиака и альдегида.

На последней стадии альдегид взаимодействует с реактивом Шиффа (см. химизм метода Фельгена – Россенбека).

Реактивы. 1. 0,5%-ный раствор нингидрина на абсолютном этаноле. 2. Реактив Шиффа по прописи де Томази (см. метод Фельгена – Россенбека). 3. Сернистая вода (см. там же).

Постановка реакции.

1. Если срезы парафиновые, депарафинировать и довести до воды.
2. Поместить в раствор нингидрина на 16–20 ч при 37°C .
3. Промыть в проточной воде 2–5 мин.
4. Перенести в реактив Шиффа на 15–60 мин.
5. Промыть в сернистой воде 2–4 мин.
6. Промыть в проточной воде 10 мин.
7. Обезводить в спиртах.
8. Просветлить в карбол-ксилоле и ксилоле.
8. Заключить в канадский бальзам или синтетическую среду.

Результат. Локализация аминокрупп определяется по окрашиванию от розовато-красных до красно-фиолетовых тонов.

Примечание. Перед обезвоживанием срезы можно окрасить гемалауном Майера (окраска ядер), промыть в проточной воде и дифференцировать в 1%-ном спиртовом растворе уксусной кислоты. В некоторых случаях нингидрин заменяют 1%-ным раствором аллоксана.

Выявление сульфгидрильных групп по Барнетту и Зелигману

(Жидкость Карнуа, смесь Буэна, 85%-ный этанол, 1%-ный раствор CCl_3COOH , 10%-ный раствор формалина; свежемороженные и лиофилизированные ткани; парафиновые и замороженные срезы).

С активностью –SH-групп связаны многие жизненно важные функции – клеточное деление, дыхание, проницаемость мембран, энергетический обмен и др. Концентрация сульфгидрильных групп изменяется в тканях и клетках при многих патологических состояниях (инфекционных, инвазионных и лучевой болезнях). Такие группы являются «местами атаки» токсинов и ядов. Они содержатся в цистеине, глутатионе, коферменте А, восстановленной форме липоевой кислоты, в восстановленных остатках цистина, находящихся в боковых ответвлениях полипептидной цепи, и др. Известно свыше 100 ферментов, молекулы которых содержат –SH-группы. Сульфгидрильные группы обладают высокой реакционной способностью и вступают во многие реакции: ионизации, ацилирования, фосфорилирования, окисления, алкилирования, образования меркаптидов, полумеркапталей, водородных связей и комплексов с переносом заряда, что исключительно важно для связывания субстратов, коферментов и металлов в каталитическом процессе. Они участвуют в создании вторичной и третичной структур белковых молекул за счет взаимодействия с другими группами.

Принцип выявления. Реакция протекает в несколько стадий. На первой стадии 2,2-диокси-6,6-динафтилдисульфид (ДДД) взаимодействует с тканевыми белками, содержащими тиоловые группы, в результате чего образуется одна молекула нафтилмеркаптана, связанная с белком, и одна молекула свободного нафтилмеркаптана.

Реактивы. 1. Раствор ДДД: 25 мг ДДД растворить в 35 мл 0,1 М веронал-ацетатного буфера (по Михаэлису, $\text{pH} = 8,5$) и добавить 15 мл 100%-ного этанола. 2. 0,01%-ный раствор уксусной кислоты ($\text{pH} = 4,0-4,5$). 3. Раствор соли диазония: 50 мг прочного синего В растворить в 50 мл смеси (0,1 М фосфатный буфер). Буферный

раствор имеет pH 7,4.

Постановка реакции.

1. Срезы довести до воды.
2. Поместить на 1 ч в раствор ДДД при 50°C.
3. Охладить до комнатной температуры.
4. Быстро промыть в дистиллированной воде.
5. Промыть в 0,01%-ном растворе уксусной кислоты.
6. Провести экстракцию свободных нафтолов, проводя срезы через ряд спиртов с возрастающей концентрацией, промыть в смеси абсолютного этанола и эфира (1:1) и, наконец, в эфире (по 5 мин в каждой жидкости).
7. Сполоснуть в дистиллированной воде.
8. Перенести в свежеприготовленный раствор диазония на 2 мин при комнатной температуре.
9. Промыть в проточной (1–2 мин) и дистиллированной (1–2 мин) воде.
10. ЗаклЮчить в глицерин – желатину или обезвожить, просветлить в ксилоле и заклЮчить в канадский бальзам или синтетическую среду.

Результат. Место локализации выявляют по широкой гамме цветов – от розового до темно-синего. Авторы метода считают, что синее окрашивание свидетельствует о высокой концентрации сульфгидрильных групп, красное или розовое – о малом содержании таких групп в тканях и клетках.

Примечание. Ценные данные получены при диагностике плоскоклеточного рака кожи. Лучшим фиксатором является жидкость Карнуа. Фиксацию нужно проводить на холоде.

Выявление дисульфидных групп по Пирсу (Различные фиксаторы; парафиновые срезы).

Белки богаты дисульфидными группами. Часть таких групп образуется в результате окисления сульфгидрильных. Роль их велика. Дисульфидные группы в белках в основном выполняют статические функции, участвуя в создании и поддержании вторичной, третичной и четвертичной структуры. В некоторых окислительных ферментах они выполняют каталитическую функцию, связанную с

переносом электронов и протонов от субстратов к акцепторам. Неходко такие группы «сшивают» различные участки белковой молекулы (инсулин, трипсин, РНК-аза). Могут участвовать в формировании активных центров ферментов.

Принцип выявления. Автор метода считает, что при окислении белковых функциональных групп, образованных цистином, должна быть цистеиновая кислота. Химизм процессов изучен мало.

Реактивы. 1. Надмуравьиная кислота: к 40 мл 98%-ной муравьиной кислоты добавляют 4 мл 30%-ного (по объему) пероксида водорода и 0,5 мл концентрированной серной кислоты. 2. Реактив Шиффа по прописи де Томази (см. метод Фельгена – Россенбека).

Постановка реакции.

1. Парафиновые срезы депарафинировать и довести до воды. Если в срезах есть ртуть, удалить.
2. Поместить в раствор надмуравьиной кислоты на 10–30 мин.
3. Промыть в дистиллированной воде 2–5 мин.
4. Поместить в реактив Шиффа на 30–60 мин.
5. Промыть в теплой проточной воде 10 мин.
6. Обезводить в спиртах.
7. Просветлить в ксилоле.
8. ЗаклЮчить в бальзам, дистрен–дибутилфталат–ксилол или другую синтетическую среду.

Результат. Структуры, содержащие дисульфидные группы, окрашиваются в разные оттенки, от ярко-красного до светло-розового цвета. Интенсивность окраски отражает количество групп.

§ 5. Гистохимическое изучение аминокислот

Аминокислоты – основные структурные и функциональные единицы, из которых в клетках любого живого организма синтезируются белковые вещества. Известно свыше 150 аминокислот. В организмах животных, человека, растений и микробов постоянно встречается 19 аминокислот и 2 иминокислоты.

Аминокислоты разделяют на две группы: ациклические и циклические. Ациклические аминокислоты делят на четыре подгруппы: моноаминомонокарбоновые (гликокол, аланин, серин, цистеин, треонин, метионин, валин, лейцин, изолейцин), моноаминодикарбоновые (аспарагиновая и глютаминовая кислоты), диаминомонокарбоновые (орнитин, аргинин, лизин) и диаминодикарбоновые (цистин) аминокислоты. Циклические аминокислоты делят на две подгруппы: изоциклические (фенилаланин, тирозин) и гетероциклические (триптофан, гистидин) аминокислоты. Некоторые аминокислоты могут синтезироваться в тканях организма. Они и называются заменимыми. Это глицин, серин, аланин, аспарагиновая и глютаминовая кислоты, а также две иминокислоты: пролин, оксипролин. Несколько аминокислот частично заменимые — цистеин и тирозин. Остальные аминокислоты относятся к незаменимым, так как они не могут синтезироваться в организме человека и животных. Это валин, лейцин, изолейцин, метионин, треонин, лизин, аргинин, фенилаланин, триптофан и гистидин. Их отсутствие в пище или кормах приводит к патологиям.

Аминокислоты — белые кристаллические вещества, хорошо растворимы в воде, оптически активные (кроме глицина), обладают высокой химической активностью, способны образовывать соли, амиды, сложные эфиры, могут взаимодействовать с азотистой кислотой, формальдегидом, между собой, образуя пептиды и дикетопиперазины, вступают в реакцию с образованием комплексных соединений и т. д.

Современная гистохимия пока еще не имеет точных методов определения всех аминокислот. Трудность определения заключается в том, что аминокислоты хорошо растворяются в воде и при постановке гистохимических реакций экстрагируются. Гистохимически можно выявить лишь связанные в молекуле белка аминокислоты в виде остатков. Достоверно можно определить только четыре аминокислоты — аргинин, тирозин, триптофан и гистидин.

Выявление аргинина по Сакагуши

(10%-ный раствор формалина, жидкость Карнуа, Ценкера, смесь Буэна, этанол-формалина в соотношении 9:1; парафиновые

и замороженные срезы; лиофильная сушка, срезы, приготовленные в криостате).

Метод разработан Сакагуши для биохимического анализа белков. Модифицирован для гистохимических исследований. Фактически выявляет основные белки, содержащие от 15 до 30% аргинина от всего количества аминокислот, и свободный аргинин.

Принцип выявления. Положительную реакцию Сакагуши дают производные гуанидина, в молекуле которого атомы водорода замещены на радикалы и другие группы атомов, в частности, аргинин, который участвует в создании структуры многих белков и нейтрализации аммиака в орнитинном цикле Кребса. Механизм реакции полностью не изучен. Реакция специфична только для аргинина; креатин, креатинин, мочевины, гуанидин, диметилгуанидин не дают ярко-красного окрашивания. Считают, что реакция протекает за счет гуанидинового остатка в аргинине.

Реактивы. 1. 1%-ный раствор целлоидина на смеси абсолютного этанола с диэтиловым эфиром (1:1). 2. Рабочий раствор: в 2 мл 1%-ного раствора NaOH растворить две капли 1%-ного раствора а-нафтола в 70%-ном этаноле, добавить четыре капли раствора гипохлорита натрия (100мл дистиллированной воды, 18 г NaCl, 1 г NaClO).

Постановка реакции.

1. Если срезы парафиновые, депарафинировать и довести до воды.
2. Покрывать 1%-ным раствором целлоидина.
3. Сполоснуть водой.
4. Высушить срезы при комнатной температуре.
5. Перенести в рабочий раствор на 15 мин.
6. Промокнуть фильтровальной бумагой.
7. Обезводить в смеси пиридин-хлороформ (1:1).
8. Заключить в смесь пиридин-хлороформ (1:1) или в чистый пиридин.

Результат. Содержание аргинина определяют по оранжево-красной окраске. Интенсивность окрашивания зависит от количества аргинина.

Примечание. Локализация и содержание аргинина в тканях определяется стадией развития, природой ткани и ее физиологическим состоянием. Резко уменьшается в форменных элементах крови при некоторых формах лейкозов.

Выявление тирозина методом Мореля и Сислея

(10%-ный раствор формалина, жидкость Карнуа, другие фиксаторы; парафиновые и замороженные срезы).

Тирозин входит в состав многих белков. Он служит основой для синтеза гормонов щитовидной железы (тироксин, трийодтиронин) и надпочечника (адреналин, норадреналин), пигментов (меланин), многих ферментов. Метод применяется в биохимическом анализе. Для гистохимических исследований модифицирован Р. Лилли.

Принцип выявления. В результате обработки тканей холодной азотистой кислотой тирозин превращается в нитрозотироксин. Нитрозогруппа в дальнейшем таутомеризуется в хиноноксимную. Хиноноксимное соединение под влиянием азотистой кислоты превращается в диазонитрат. Диазонитраты в щелочном растворе вступают в реакцию диазосочетания с аминами, образуя окрашенные продукты реакции. Для этих целей используется S-кислота или H-кислота. Вначале диазонитрат таутомеризуется. Затем происходит реакция диазосочетания с образованием конечного продукта реакции красного цвета.

Реактивы. 1. Раствор для нитрозирования: в 20 мл дистиллированной воды растворить 2 г NaNO_2 , добавить 1,7 мл ледяной уксусной кислоты. 2. Раствор S-кислоты: к 50 мл 70%-ного этанола добавить в темноте 500 мг S-кислоты (8-амино-1-нафтол-5-сульфокислоты), 500 мг KOH, 1 г мочевины; смесь охладить до 3°C . 3. 0,1 н. раствор HCl. 4. Раствор квасцового гематоксилина.

Постановка реакции.

1. Парафиновые срезы довести до воды.
2. Перенести на 16–18 ч при 3°C в раствор для нитрозирования (инкубировать в темноте).
3. Промыть в четырех порциях дистиллированной воды, охлажденной до 3°C , по 5 с в каждой порции (лучше в темноте).

4. Перенести в раствор S-кислоты на 1 ч при 3°C (проводить в темноте).
5. Промыть в трех порциях 0,1 н. растворе HCl (по 5 мин в каждой).
6. Промыть в проточной воде 10 мин.
7. При необходимости срезы докрасить раствором гематоксилина, промыть в воде.
8. Обезводить в спиртах.
9. Просветлить в ксилоле.
10. ЗаклЮчить в нейтральную среду (бальзам, полистирол и др.).

Результат. Белки, богатые тирозином, окрашиваются в цвета от пурпурно-красного до розового. Много тирозина в зоне волосяных луковиц, коллоиде щитовидной железы.

Выявление триптофана по Бруммеру, Карнеру и Томасу
(Жидкость Карнуа, Ценкера, 10%-ный раствор формальдегида; парафиновые срезы).

Триптофан — незаменимая аминокислота. Обязательная составная часть большинства структурных и ферментативных белков. Из триптофана в тканях синтезируются такие биохимически активные соединения как нейрогормон триптамин и серотонин, адренохромы, никотиновая кислота. Триптофан обладает прессорным действием на деятельность сосудистой системы.

Метод определения триптофана разработан для биохимического анализа белков. Модифицирован для гистохимических исследований.

Принцип выявления. После обработки срезов азотистой кислотой образуется нитрозосоединение. В дальнейшем нитрозосоединение конденсируется с нафтилэтилендиамином, образуя соединение пурпурно-красного цвета.

Реактивы. 1. Раствор азотистой кислоты: смешать равные объемы 8%-ного раствора NaNO_2 и 6 н. раствора HCl. 2. Раствор нафтилэтилендиамина: смешать равные объемы 1н. раствора HCl и свежеприготовленного 2%-ного раствора N-(1-нафтил)-этилендиамина, приготовленного 95%-ном этаноле. 3. 70%-ный трет-бутанол, содержащий несколько капель H_2SO_4 . 4. Абсолют-

ный бутанол, содержащий несколько капель H_2SO_4 . 5. Ксилол – ледяная уксусная кислота (100:2).

Постановка реакции.

1. Если срезы парафиновые, депарафинировать и довести до 50%-ного этанола (проводить в темноте все стадии, кроме 6 и 7). Этанол охлажден до $0^{\circ}C$.
2. Поместить в раствор азотистой кислоты 15 Мин.
3. Промыть в двух порциях дистиллированной воды (по 5 мин в каждой).
4. Перенести в свежеприготовленный раствор нафтилэтилендиамина на 15 мин.
5. Обезводить в 70%-ном трет-бутаноле.
6. Обезводить в абсолютном бутаноле.
7. Просветлить в двух порциях ксилола – уксусной кислоты.
8. ЗаклЮчить в синтетическую среду.

Результат. Белки, богатые триптофаном, выявляют по пурпурно-красному окрашиванию.

Выявление гистидина по Брунsvику

(Жидкость Карнуа, 10%-ный раствор нейтрального формалина, свежзамороженная ткань; парафиновые и замороженные срезы).

Гистидин – обязательная составная часть многих белков тканей. Из него синтезируются ансерин и карнозин, выполняющие важную роль в мышечном сокращении. После декарбоксилирования гистидина образуется своеобразный медиатор секреции – гистамин.

Принцип выявления. Разработан мало. По-видимому, окраска возникает в результате диазосочетания трех соединений – гистидина, нитрита натрия и сульфаниловой кислоты. Предварительная обработка срезов 33%-ным раствором азотной кислоты блокирует в азосочетании две аминокислоты – тирозин и триптофан.

Реактивы. 1. 33%-ный раствор азотной кислоты. 2. Раствор диазобензолсерной кислоты: 2 г сульфаниловой кислоты растворить в 3 мл дистиллированной воды, добавить 2 мл ледяной уксусной кислоты, 1 г нитрита натрия, растворенного в 2 мл воды, про-

фильтровать, осадок промыть на фильтре, высушить и растворить в концентрированном растворе карбоната натрия. 3. Концентрированный раствор карбоната натрия.

Постановка реакции.

1. Депарафинированные и замороженные срезы поместить в 33%-ный раствор азотной кислоты на 5 мин.
2. Тщательно промыть в дистиллированной воде.
3. Поместить на несколько минут в концентрированный раствор карбоната натрия.
4. Перенести в раствор диазобензолсерной кислоты на 10–20 мин до появления красного цвета.
5. Промыть в дистиллированной воде.
6. Обезводить в спиртах.
7. Просветлить в ксилоле.
8. ЗаклЮчить в бальзам или в другие среды.

Результат. Белковые вещества, богатые гистидином, окрашиваются в красный или оранжевый цвета.

VI. ЛИПИДЫ

Липиды – большая группа органических соединений, различных по химическому строению и значению. Обладают общим признаком – не растворяются в воде и растворяются в органических растворителях (ацетоне, этаноле, диэтиловом эфире, бензоле, ксилоле, толуоле, бензине, хлороформе). Большинство липидов – сложные эфиры, образованные молекулами спирта, высшей жирной кислоты, а в случае сложных липидов – и других соединений.

В современной гистохимической и биохимической литературе нет единой классификации липидов. В пособии использована биохимическая классификация липидов.

Различают две группы липидов: простые и сложные. Молекулы простых липидов образованы из остатков спиртов (глицерина, высших, полициклических спиртов) и высокомолекулярных жирных кислот. Это нейтральные жиры, стерины и стериды, воски. Молекулы сложных липидов построены из остатков молекул некоторых спиртов, высших жирных кислот и других веществ (азотистых оснований, фосфорной и серной кислот, моносахаридов и др.). Сложные липиды разделяют на подгруппы: фосфатиды, гликолипиды (цереброзиды и ганглиозиды), сульфатиды. Часто к липидам относят их дериваты – моно- и диглицериды, высшие жирные кислоты, высокомолекулярные ациклические и циклические спирты и т. д.

В тканях и клетках липиды встречаются в свободном и связанном состоянии, в виде комплексных соединений с белками, углеводами, витаминами и другими веществами. Липиды выполняют ряд жизненно важных функций. Основными из них являются энергетическая и структурная. Так, при распаде молекул нейтрального жира, фосфатидов, цереброзидов и стеридов образуются большие запасы химической энергии, которая концентрируется в виде макроэнергетических соединений: АТФ, АДФ, креатинфосфат, серинфосфат и др. Различные виды и подгруппы простых и сложных липидов (стерины и стериды, фосфатиды, цереброзиды, в растениях – воски) являются основными составными частями экстра- и интрацеллюлярных мембран. Считают, что все клеточные мем-

браны построены, но одному типу: внешний слой представлен одномолекулярным слоем белков, средний – липидов, внутренний – белков.

§ 1. Определение общих липидов

В тканях и клетках отдельные липиды сравнительно редко встречаются в чистом виде. Обычно они находятся в виде биомолекулярных соединений и механических смесей, в которых один липид взаимно растворен в других. Известны липопротеидные, протеолипидные, липоглюцидные и глюцидोलипопротеидные комплексы. Выявлены комплексы, образованные лецитином и холестерином, лецитином и кефалином, фосфатидами и цереброзидами, сфингомиелином и цереброзидом. Для выявления общих, или суммарных, липидов чаще всего используют окрашивание срезов или мазков растворами Судана черного В, который обладает высокой специфичностью к выявлению липидных соединений. Краситель имеет 10 фракций. Основу его составляет синяя фракция. Судан черный В почти не растворяется в нейтральных жирах, поэтому при отсутствии их в тканях считают, что краситель в основном связан с фосфатидами.

Окрашивание по Лизону

(Жидкость Бэкера, формалин, формоловые смеси; замороженные срезы).

Метод применяется при изучении гистохимии и цитохимии многих нормальных и патологических тканей. С его помощью получены ценные сведения по химии нейронов.

Принцип выявления. Окрашивание Суданом черным В липидов основано на растворении его в них и, прежде всего, в фосфатидах, несколько меньше – в других подгруппах (цереброзидах). Краситель является диазосоединением.

Реактивы. 1. 70%-ный этанол. 2. Насыщенный раствор судана черного В на 70%-ном этаноле. Перед окрашиванием судан черный В профильтровать. 3. 30%-ный этанол.

Постановка реакции.

1. Замороженные срезы промыть в дистиллированной воде.
2. Сполоснуть в 70%-ном этаноле 30 с.
3. Перенести в раствор судана черного В на 5–30 мин.
4. Промыть в 30%-ном этаноле.
5. Сполоснуть в дистиллированной воде.
6. ЗаклЮчить в глицерин или глицерин – желатину.

Результат. Липиды окрашиваются в черно-серый цвет. Хорошо окрашивается миелин, проводящие пути центральной и периферической нервной системы. Выявлены синапсы на моторных нейронах спинного мозга.

Примечание. Время окрашивания различных тканей определяется эмпирически. Срезы органов, богатых фосфатидами (например, надпочечников), окрашивать в пределах 1–3 мин.

Окрашивание суданом черным В по Мак-Манусу

(Фиксатор Мак-Мануса, жидкость Бэкера, формалин; парафиновые срезы).

Липиды хорошо растворяются в органических растворителях, применяемых для проводки материала при заливке в парафин.

Фиксация. Небольшие кусочки тканей (1–4 мм) поместить на 1–5 недель в фиксатор следующего состава: 1 г нитрата кобальта, 80 мл дистиллированной воды, 10 мл 10%-ного раствора хлорида кальция, 10 мл 40%-ного раствора формальдегида. Рекомендуют фиксированный материал перенести в 3%-ный раствор дихромата калия на 24–48 ч. Обезводить в трех порциях ацетона (по 0,5 ч в каждой) и перенести в расплавленный парафин. Остальные процедуры проводить в обычном порядке.

Принцип выявления. Окраска срезов основана на тех же принципах, что и в предыдущем методе.

Реактивы. 1. 70%-ный этанол. 2. Насыщенный раствор судана черного В в 70%-ном этаноле. 3. Квасцовый кармин Майера

Постановка реакции.

1. Срезы депарафинировать и довести до воды.
2. Сполоснуть в 70%-ном этаноле.

3. Перенести в раствор судана на 30 мин. Если материал не подвергали хромированию, время окрашивания можно удлинить до 16 ч, далее при 60°C (для плотных тканей).

4. Промыть в 70%-ном этаноле.

5. Сполоснуть в проточной воде.

6. Окрасить квасцовым кармином Майера в течение 16 ч.

7. Промыть в дистиллированной воде.

8. ЗаклЮчить в глицерин – желатину.

Результат. Липиды окрашиваются в черно-синий, серый, черный цвет. Липопротеиды и некоторые липиды могут окрашиваться в коричнево-черный цвет. Ядра кармином окрашиваются в красный цвет.

Окрашивание липидов ацелилированным суданом черным В

(Формалин, жидкость Бэкера; замороженные срезы, мазки).

Судан, поступающий в продажу, содержит 10 хроматографических фракций. Суданы, выпускаемые различными зарубежными фирмами, различаются между собой соотношениями красно-оранжевой и синей фракций. Отдельные фракции отрицательно сказываются на качестве гистохимической реакции. Кассельман в 1954 г. эмпирически провел ацелилирование судана, после чего исчезли артефакты, типичные для обычного метода: красное и красно-оранжевое окрашивание.

Принцип выявления. Реакция основана на тех же принципах, что и в предыдущих методах.

Реактивы. 1. Приготовление ацелилированного судана: 1 г судана черного В растворить в 100 мл диэтилового эфира, отфильтровать, фильтрат довести до кипения, после чего добавить 0,5 мл уксусного ангидрида в 20 мл дистиллированной воды и кипятить в колбе с обратным холодильником 20 мин; смесь охладить, профильтровать, фильтрат перенести в делительную воронку и несколько раз примеси экстрагировать холодной водой; после выпаривания диэтилового эфира образуется осадок ацелилированного судана черного В – частицы черного цвета с металлическим блеском. 2. Насыщенный раствор красителя: в 70%-ном этаноле

растворить нужное количество судана черного В до насыщения 3. 70%-ный этанол.

Постановка реакции.

1. Мазки или мазки-отпечатки поместить в пары формалина на 2–5 мин.
2. Поместить в насыщенный раствор красителя до 30 мин.
3. Дифференцировать в 70%-ном этаноле.
4. Осушить фильтровальной бумагой.
5. Заключить в глицерин – желатину.

Результат. Липиды окрашены в черный и черно-серый цвет.

§ 2. Определение связанных липидов

Большинство липидов в тканях и клетках связаны с другими веществами – белками, углеводами, витаминами, между собой, с металлами и т. д. Различают слабо и прочно связанные липиды. Первые можно выявить при использовании методик, основанных на протравлении или окислении (липофусцин, липиды миеллина, эозинофилов и нейтрофилов). Прочно связанные липиды расщепляются под влиянием ферментов, кислот (липиды ретикулина, клеточного ядра и др.). Выявление комплексов достигается использованием растворов нейтральных солей, длительным промыванием парафиновых срезов в воде, растворами урана, кобальта, кадмия, этилового спирта, применением некоторых прописей судановых красителей, содержащих ацетон, ксилол, а-нафтол и др.

Определение связанных липидов методом экстракции по Спаннгофу

(Свежий материал; замороженные срезы).

В тканях постепенно экстрагируются липидные вещества.

Принцип выявления. Постепенной обработкой срезов тканей группой растворов удаляются свободные липиды. Остаются связанные липиды в виде биоконплексных соединений. Они и обнаруживаются окрашиванием суданом.

Реактивы.

1. 0,14 М раствор NaCl.
2. 0,4 М раствор NaCl.
3. 0,7 М раствор NaCl.
4. 1 М раствор NaCl.
5. Насыщенный раствор судана черного В в 70%-ном этаноле.
6. 70%-ный этанол.

Постановка реакции.

1. Срезы поместить на 30 мин при 4°C в 0,14 М раствор NaCl.
2. Перенести на 12 ч в 0,4 М раствор NaCl при 4°C и pH = 7 (встряхивать).
3. Поместить на 30 мин в 0,7 М NaCl (при тех же условиях).
4. Поместить на 5 ч в 1 М раствор NaCl при 4°C и pH = 4.
5. Перенести в раствор судана черного В на 8–10 мин.
6. Сполоснуть в 70%-ном этаноле.
7. Промыть в дистиллированной воде.
8. ЗаклЮчить в глицерин – желатину.

Результат. Связанные липиды окрашиваются Суданом в черный и черно-серый цвет.

Определение связанных липидов с применением раствора Судана черного В в ацетоне по Беренбауму

(Жидкость Бэкера, формалин, жидкость Ценкера, Карнуа; парафиновые срезы).

После длительной промывки в воде и сушки в горячем воздухе многие структуры тканей приобретают свойство окрашиваться суданом черным В, растворенном в ацетоне. Причиной этого явления является демаскирование связанных липидов.

Принцип выявления. Длительная промывка срезов в воде способствует удалению свободных липидов и демаскированию связанных. Обработка срезов раствором судана в ацетоне способствует завершению этих процессов и окрашиванию связанных липидов.

Реактивы. 2%-ный раствор судана черного В в абсолютном ацетоне.

растворить нужное количество судана черного В до насыщения 3. 70%-ный этанол.

Постановка реакции.

1. Мазки или мазки-отпечатки поместить в пары формалина на 2–5 мин.
2. Поместить в насыщенный раствор красителя до 30 мин.
3. Дифференцировать в 70%-ном этаноле.
4. Осушить фильтровальной бумагой.
5. ЗаклЮчить в глицерин – желатину.

Результат. Липиды окрашены в черный и черно-серый цвет.

§ 2. Определение связанных липидов

Большинство липидов в тканях и клетках связаны с другими веществами – белками, углеводами, витаминами, между собой, с металлами и т. д. Различают слабо и прочно связанные липиды. Первые можно выявить при использовании методик, основанных на протравлении или окислении (липофусцин, липиды миеллина, эозинофилов и нейтрофилов). Прочно связанные липиды расщепляются под влиянием ферментов, кислот (липиды ретикулина, клеточного ядра и др.). Выявление комплексов достигается использованием растворов нейтральных солей, длительным промыванием парафиновых срезов в воде, растворами урана, кобальта, кадмия, этилового спирта, применением некоторых прописей судановых красителей, содержащих ацетон, ксилол, а-нафтол и др.

Определение связанных липидов методом экстракции по Спаннгофу

(Свежий материал; замороженные срезы).

В тканях постепенно экстрагируются липидные вещества.

Принцип выявления. Постепенной обработкой срезов тканей группой растворов удаляются свободные липиды. Остаются связанные липиды в виде биоконплексных соединений. Они и обнаруживаются окрашиванием суданом.

Реактивы.

1. 0,14 М раствор NaCl.
2. 0,4 М раствор NaCl.
3. 0,7 М раствор NaCl.
4. 1 М раствор NaCl.
5. Насыщенный раствор судана черного В в 70%-ном этаноле.
6. 70%-ный этанол.

Постановка реакции.

1. Срезы поместить на 30 мин при 4°C в 0,14 М раствор NaCl.
2. Перенести на 12 ч в 0,4 М раствор NaCl при 4°C и pH = 7 (встряхивать).
3. Поместить на 30 мин в 0,7 М NaCl (при тех же условиях).
4. Поместить на 5 ч в 1 М раствор NaCl при 4°C и pH = 4.
5. Перенести в раствор судана черного В на 8–10 мин.
6. Сполоснуть в 70%-ном этаноле.
7. Промыть в дистиллированной воде.
8. ЗаклЮчить в глицерин – желатину.

Результат. Связанные липиды окрашиваются Суданом в черный и черно-серый цвет.

Определение связанных липидов с применением раствора Судана черного В в ацетоне по Беренбауму

(Жидкость Бэкера, формалин, жидкость Ценкера, Карнуа; парафиновые срезы).

После длительной промывки в воде и сушки в горячем воздухе многие структуры тканей приобретают свойство окрашиваться суданом черным В, растворенном в ацетоне. Причиной этого явления является демаскирование связанных липидов.

Принцип выявления. Длительная промывка срезов в воде способствует удалению свободных липидов и демаскированию связанных. Обработка срезов раствором судана в ацетоне способствует завершению этих процессов и окрашиванию связанных липидов.

Реактивы. 2%-ный раствор судана черного В в абсолютном ацетоне.

Постановка реакции.

1. Срезы депарафинировать.
2. Промыть в течение 12–14 ч в проточной воде.
3. Сполоснуть в абсолютном ацетоне.
4. Перенести в раствор красителя на 1–24 ч при 37°C.
5. Промыть ксилолом до исчезновения облачек красителя в течение 5–10 мин.
6. ЗаклЮчить в канадский бальзам или синтетическую среду.

Результат. Связанные липиды окрашиваются в черный и черно-серый цвет. На препаратах выявляются гранулы нейтрофилов, тромбоциты, амилоид.

§ 3. Выявление нейтральных и кислых липидов по Кайну

(Жидкость Бэкера; замороженные срезы).

Принцип выявления. Сульфат нильского голубого представляет собой сложный краситель, состоящий из трех компонентов. Первый компонент оксазинсульфат, вещество синего цвета, не растворимое в нейтральных жирах и растворимое в воде и этаноле, легко взаимодействует с жирными кислотами. Второй компонент красителя – свободное основание оксазина нильского голубого, вещество красного цвета, не растворимое в воде и растворимое в жирах. Третий компонент красителя – оксазон-дериват, вещество красного цвета (нильский красный по Лизону). Нейтральные (триглицериды, стерины, стериды, цереброзиды) и кислые (сериофосфатиды, лецитины, кефалины, ганглиозиды, свободные жирные кислоты) липиды взаимодействуют с отдельными компонентами красителя, специфически окрашиваясь. Так, нейтральные жиры экстрагируют из красителя компонент красного цвета и окрашиваются в этот же цвет. Кислые липиды растворяют оба компонента красного цвета и вступают в химические реакции, образуя соли, прежде всего, с оксазинсульфатом (частично и со свободным оксазином), окрашиваясь в голубые и синие тона. В результате перекрытия различных цветов возникает своеобразное окрашивание отдельных представителей липидов.

Реактивы. 1. Раствор дихромата калия: 5 г дихромата калия и 1 г хлорида кальция (безводного) растворить в 100мл дистиллированной воды. 2. 1%-ный водный раствор сульфата нильского голубого.

3. 1%-ный раствор уксусной кислоты.

4. Насыщенный раствор судана черного В в 70%-ном этаноле.

Постановка реакции.

в глицерин – желатину.

1. Промыть в проточной воде 2 ч.

2. Кусочки тканей поместить в 0,02%-ный водный раствор дихромата калия на 18 ч (процедура не обязательная).

3. Приготовить замороженные срезы.

4. Срезы разделить на три группы: первую группу срезов окрасить в насыщенном растворе судана черного В; вторую группу поместить в 1%-ный раствор сульфата нильского голубого и третью группу срезов окрасить в 0,02%-ном растворе сульфата нильского голубого при 60°C 5 мин.

5. Срезы, помещенные в раствор судана черного В, окрашивать в соответствии с методикой (см. метод Лизона); срезы, окрашенных растворами сульфата нильского голубого, быстро промыть в дистиллированной воде при 60°C.

6. Дифференцировать в 1%-ном растворе уксусной кислоты.

7. Заключить раствор сульфата нильского голубого.

Результат. Препараты, окрашенные суданом черным В, служат контролем, так как они содержат суммарные липиды. Низкие концентрации красителя (0,02%) обеспечивают высокую степень диссоциации оксазинсульфата, освобождение значительного количества оксазина и их взаимодействие с липидными веществами.

Сопоставить препараты второй и третьей групп срезов и, если они идентичны, приступить к гистохимическому анализу. Нейтральные липиды (жиры, холестерин-эфиры, стероиды, высшие спирты) окрашиваются в красный или розовый цвет. Кислые липиды окрашиваются в голубой или синий цвет.

Предполагается, что раствор сульфата нильского голубого окрашивает жиры в красный, холестерин и его эфиры – розово-

фиолетовый, фосфатиды и цереброзиды – голубой, жирные кислоты и их соли – темно-синий цвет.

§ 4. Выявление нейтральных жиров

Жиры – смесь триглицеридов, сложных эфиров, образованных трехатомным спиртом глицерином и высокомолекулярными жирными кислотами:

В состав природных жиров входят остатки насыщенных (масляной, капроновой, каприловой, каприновой, лауриновой, миристиновой, пальмитиновой, стеариновой, арахидиновой и др.) и ненасыщенных (олеиновой, линолевой, линоленовой, эруковой и др.) карбоновых кислот с четным числом углеродных атомов. Несколько реже в составе жиров встречаются циклические (хаульмугровая и горликовая) и с нечетным числом атомов углерода (валериановая) карбоновые кислоты, а также оксикислоты (цереброновая, оксисиневроновая и др.).

Роль жиров в жизни организмов велика. Они являются важным источником химической энергии (при распаде 1 г жира образуется 9,3 ккал), защищают организм от охлаждения, повреждений, могут покрывать дефицит в водном балансе. Различают резервные (в подкожной клетчатке, сальнике) и протоплазматические (биокомплексные соединения в клетках) жиры.

Окрашивание нейтральных жиров суданом 3 по Дадди (Жидкость Бэкера, формалин; замороженные срезы).

Принцип выявления. Судан 3 по химическому строению и свойствам является диазокрасителем. Окрашивание жиров суданом 3 является типичным физическим процессом. Краситель из худшего растворителя (этанола) экстрагируется нейтральным жиром, окрашивая последний в красный цвет. Судан 3 – сложный краситель, состоит из судана красного (он экстрагируется жирами), судана оранжевого и судана желтого. Влияние двух последних на окраску не изучено.

Реактивы. Раствор красителя: в колбе с притертой пробкой 0,2–0,3 г судана 3 залить 100 мл горячего этанола, перемешать и

поместить в термостат при 37°C на 24–48 ч, периодически взбалтывая. Охладить, профильтровать, хранить в банке с притертой пробкой. Перед использованием разбавить: на 20 мл раствора красителя добавить 2–3 мл дистиллированной воды.

Постановка реакции.

1. Замороженные срезы промыть в дистиллированной воде.
2. Сполоснуть в 50%-ном этаноле в течение нескольких минут.
3. Окрасить раствором красителя 20–25 мин.
4. Сполоснуть в 50%-ном этаноле.
5. Промыть в дистиллированной воде.
6. Заключить в глицерин – желатину.

Результат. Локализацию нейтрального жира определяют по красно-оранжевой или оранжево-желтой окраске.

Окрашивание нейтральных жиров суданом 3 и суданом 4 (Жидкость Бэкера, 10%-ный раствор формалина; замороженные срезы)

Установлено, что смесь судана 3 и судана 4 окрашивает жиры лучше, чем каждый краситель отдельно. Метод широко используется в морфологии и гистохимии.

Принцип выявления. Оба судана относятся к диазокрасителям. Судан 4 иногда называют сольвентом красным 24, или суданом красным ВВА. Оба судана хорошо растворяются в органических растворителях. Процесс окрашивания основан на экстрагировании молекул судана 3 и судана 4 из смеси ацетона с этанолом, в которой они растворяются хуже, чем в нейтральном жире.

Реактивы. 1. Раствор красителей: равные количества судана 3 и судана 4 (по 0,25–0,35 г на 100 мл) смешать и растворить в смеси ацетона с 70%-ным этанолом (1:1); дать раствору созреть: в течение нескольких суток, профильтровать на холоде или отсосать пипеткой надосадочную жидкость; работать с закрытыми бюксами. 2. 70%-ный этанол. 3. 50%-ный этанол. 4. Гематоксилин Эрлиха: 2 г гематоксилина растворить в 100 мл 96%-ного этанола, добавить 100 мл дистиллированной воды, 100 мл глицерина, 3 г квасцов и 10 мл ледяной уксусной кислоты, дать созреть около 14 суток, часто взбалтывая. 5. 0,5%-ный раствор HCl в 50%-ном этаноле.

Постановка реакции.

1. Срезы промыть в дистиллированной воде.
2. Сполоснуть в 70%-ном этаноле.
3. Перенести в раствор красителей на 1 мин.
4. Сполоснуть в 70%-ном этаноле.
5. Промыть в дистиллированной воде.
6. Докрасить в разбавленном (1: 4) растворе гематоксилина Эрлиха.
7. Если нужно, дифференцировать в солянокислом этаноле.
8. Промыть в дистиллированной воде, к которой добавлено несколько капель нашатырного спирта.
9. ЗаклЮчить в глицерин–желатину.

Результат. Нейтральные жиры окрашиваются в различные оттенки от оранжевого до оранжево-красного цвета, ядра – синие.

§ 5. Стерины и стериды

Широко распространены в природе. Типичным представителем является холестерин – вторичный высокомолекулярный циклический спирт.

Содержится во всех клетках организма человека и животных, участвуя в образовании мембран. Много холестерина в нервной и мышечной ткани, печени, надпочечниках. В теле человека весом 70 кг в среднем содержится 140 г холестерина, причем в нервной системе – 2%, надпочечниках 10%, сердце, легких, почках, селезенке, кровеносных сосудах – 0,25%, костном мозге – 0,25%. Ядро холестерина служит источником образования молекул желчных кислот, мужских и женских половых гормонов, гормонов коры надпочечников. В дрожжах, грибах и многих растительных продуктах содержится эргостерин, который при ультрафиолетовом облучении превращается в витамин D₂. Стерины взаимодействуют с высокомолекулярными жирными кислотами, образуя сложные эфиры – стериды. Нарушение холестеринового обмена приводит к возникновению атеросклероза, желчекаменной болезни, ксантомотоза кожи и костей, возрастного помутнения роговицы, некрозов и др. Некоторые производные холестерина (метилхолантрен) являются причиной раковых опухолей. Обмен холестерина в организ-

ме регулируется центральной нервной системой и железами внутренней секреции.

Выявление холестерина по Грундланду, Буйеру и Майе (70%-ный этанол, насыщенный дигитонином; замороженные срезы).

Биохимический метод модифицирован для гистохимических исследований.

Принцип выявления. Изучен мало. Считают, что холестерин образует труднорастворимое в спирте соединение с дигитонином.

В дальнейшем комплекс дигитонин – холестерид реагирует с компонентами рабочего раствора, в частности с хлоридом висмута, образуя конечный продукт реакции, по цвету которого выявляется липид.

Реактивы. 1. Фиксатор: 70%-ный этанол, насыщенный дигитонином. 2. Рабочий раствор: в 100 мл безводного нитробензола растворить 0,2 г хлорида висмута и 11 мл ацетилхлорида. 3. Парафин, содержащий 5% моностеарата глицерина. 4. 10%-ный раствор ацетилхлорида в нитробензоле.

Постановка реакции.

1. Небольшие кусочки материала (1–5 мм) поместить на 24–48 ч в фиксатор.
2. Из посуды, где находится материал, выпарить в термостате этанол.
3. Образцы тканей перенести на 12 ч в расплавленный парафин, содержащий моностеарат глицерина.
4. Провести заливку материала в парафин.
5. Приготовить срезы.
6. Парафиновые срезы (без удаления парафина) перенести в рабочий раствор на 15–45 мин.
7. Быстро промыть в нитробензольном растворе ацетилхлорида.
8. Просветлить срезы и удалить с помощью бензола парафин.
9. ЗаклЮчить в вазелиновое масло.

Результат. Места размещения холестерина обнаруживаются по коричневой окраске.

Выявление холестерина по Шульцу

(10%-ный раствор нейтрального формалина, замороженные срезы).

Один из наиболее специфичных методов выявления холестерина и его эфиров. В основе его лежит биохимический метод, модифицированный для гистохимических исследований.

Принцип выявления. Холестерин превращается в оксихолестерин, который взаимодействует с квасцами и образует окрашенный комплекс. Химизм этих процессов изучен мало.

Реактивы. 1. Раствор для фиксации материала. 2. 2%-ный раствор железоаммониевых квасцов. 3. Ледяная уксусная кислота. 4. Концентрированная серная кислота.

Постановка реакции.

1. Промыть замороженные срезы в дистиллированной воде.
2. Поместить срезы в раствор квасцов при 37°C на 24 ч, при комнатной температуре – на несколько суток.
3. Сполоснуть в дистиллированной воде и монтировать на предметные стекла.
4. Осушить фильтровальной бумагой.
5. Нанести на каждый срез смесь ледяной уксусной кислоты с серной кислотой (1:1).
6. Накрыть покровным стеклом и микроскопировать.

Результат. Места размещения холестерина и его эфиров выявляются по синей или пурпурной окраске, которая постепенно переходит в зеленый и грязно-бурый цвет. С помощью данного метода получены ценные сведения о холестерозе желчных путей. Недостаток метода – нестойкость окраски.

§ 6. Высшие жирные кислоты

В тканях животных и человека содержатся свободные ВЖК. Они образуются в результате гидролиза липидов, синтезируются или приносятся кровью и межклеточной тканевой жидкостью.

Метод Фишлера

(10%-ный раствор нейтрального формалина; замороженные срезы).

Установлено, что ВЖК образуют соли при взаимодействии с ацетатом меди. В основе метода Фишлера лежит образование нерастворимых мыл.

Принцип выявления. Срезы протравляют насыщенным раствором ацетата меди, что приводит к образованию медных мыл ВЖК.

Срезы окрашивают литиевым гематоксилином. Образуется красочный лак. Дифференциация срезов в смеси буры с гексациано- (II) ферратом калия делает реакцию специфичной для жирных кислот. Э. Пирс (1962 г.) считает, что метод дает надежные результаты.

Реактивы. 1. Литиевый гематоксиллин по Вейгерту – состоит из смеси равных частей А и Б; для приготовления раствора А взять 10%-ный раствор гематоксилина в 100%-ном этаноле; Б – в 90 мл дистиллированной воды растворить 10 мл насыщенного водного раствора карбоната лития. 2. Раствор для дифференцировки: 20 г буры и 25 г гексациано-(II) феррата калия растворить в 1 л воды. 3. Насыщенный водный раствор ацетата меди.

Постановка реакции.

1. Срезы поместить в раствор ацетата меди на 24 ч при 37°C.
2. Промыть в дистиллированной воде.
3. Окрасить раствором гематоксилина 20 мин.
4. Перенести в раствор для дифференцировки (до обесцвечивания эритроцитов).
5. Промыть в воде.
6. ЗаклЮчить в глицерин или глицерин – желатину.

Результат. Места размещения ВЖК определяют по темно-синей окраске. Срезы, которые находились для контроля в пиридине, не окрашиваются.

Метод Окамото

(Жидкость Бэкера, 10%-ный раствор формалина; замороженные срезы)

Метод получил широкое применение в гистохимической практике. С его помощью расшифрованы некоторые стороны про-

цесса всасывания жирных кислот в желудочно-кишечном тракте человека и животных. Детализирована функция преджелудков жвачных в реакциях межучного обмена.

Принцип выявления. ВЖК вступают в реакцию с нитратом меди, в результате чего образуются нерастворимые соли – мыла.

Остальные реакции протекают так же, как и в предыдущем методе (за исключением красителя).

Реактивы. 1. Фиксатор: на 20%-ном растворе поваренной соли приготовить 10%-ный раствор формалина (можно использовать и жидкость Бэкера). 2. Раствор нитрата меди: в 100 мл 75%-ного этанола растворить 0,2 мл насыщенного раствора нитрата меди (можно в 100мл воды растворить 0,5мл того же раствора). 3. Раствор красителя: к 95 мл абсолютного этанола, содержащего 2% ацетата натрия, добавить 5 мл насыщенного раствора п-диметиламинобензилиденроданина.

Постановка реакции.

1. Срезы промыть в 20%-ном растворе поваренной соли.
2. Перенести в раствор нитрата меди (в спиртовом растворе выдерживать 2–3 ч, в водном – сутки).
3. Промыть водой.
4. Поместить в раствор красителя на сутки при 58°C.
5. Промыть в воде.
6. ЗаклЮчить в глицерин – желатину.

Результат. Локализация жирных кислот определяется по выпадению красно-коричневых осадков нерастворимых мыл.

§ 7. Постановка гистохимического контроля

Одним из основных свойств липидов является их способность растворяться в органических растворителях. Это свойство используется для дифференциации липидов от других соединений, а также идентификации отдельных групп липидных веществ в тканях и клетках. При постановке гистохимической реакции нужно на некотором количестве срезов (мазков, мазков-отпечатков) ставить контрольное исследование, подвергнув их предварительной обработке соответствующими органическими

растворителями. Выбор растворителя определяется целью исследования, липидным составом объекта и используемым в работе методом. При этом можно руководствоваться принципами, изложенными ниже.

Экстракция липидов по Кейлигу

(Нефиксированная ткань: замороженные срезы).

Механизм действия. Экстракция липидов основана на их способности неодинаково растворяться в различных растворителях. Так, в холодном ацетоне экстрагируются глицериды, стерины и стериды, некоторые кетостероиды. Горячий ацетон экстрагирует церебровиды, горячий диэтиловый эфир – лецитины и кефалины, горячий метанол – хлороформ – все липиды.

Реактивы. Используются химически чистые органические растворители (ацетон, диэтиловый эфир, метанол и хлороформ). Для приготовления смеси метанол – хлороформ берут равное количество обоих растворителей и смешивают. В процессе приготовления контрольных препаратов можно пользоваться группой органических растворителей в очередности, приведенной ниже, или (в зависимости от цели исследования) одним из них.

Постановка реакции.

1. Срезы поместить на 24 ч в холодный ацетон (растворитель сменить трижды через 3, 8 и 12ч).
2. Перенести срезы в горячий ацетон (растворитель сменить трижды в те же сроки). В процессе работы можно использовать аппарат Сокслета или другой прибор для экстракции.
3. Поместить срезы в горячий диэтиловый эфир на сутки (трижды сменить растворитель).
4. Поместить срезы в горячий метанол – хлороформ на сутки (трижды сменить растворитель).
5. Срезы окрасить по соответствующему методу.

Результат. В зависимости от растворителя на препарате не выявляются те или иные группы липидов.

Экстракция липидов по Бэкеру

(Смесь Буэна; замороженные срезы).

цесса всасывания жирных кислот в желудочно-кишечном тракте человека и животных. Детализирована функция преджелудков жвачных в реакциях межуточного обмена.

Принцип выявления. ВЖК вступают в реакцию с нитратом меди, в результате чего образуются нерастворимые соли – мыла.

Остальные реакции протекают так же, как и в предыдущем методе (за исключением красителя).

Реактивы. 1. Фиксатор: на 20%-ном растворе поваренной соли приготовить 10%-ный раствор формалина (можно использовать и жидкость Бэкера). 2. Раствор нитрата меди: в 100 мл 75%-ного этанола растворить 0,2 мл насыщенного раствора нитрата меди (можно в 100мл воды растворить 0,5мл того же раствора). 3. Раствор красителя: к 95 мл абсолютного этанола, содержащего 2% ацетата натрия, добавить 5 мл насыщенного раствора п-диметиламинобензилиденроданина.

Постановка реакции.

1. Срезы промыть в 20%-ном растворе поваренной соли.
2. Перенести в раствор нитрата меди (в спиртовом растворе выдержать 2–3 ч, в водном – сутки).
3. Промыть водой.
4. Поместить в раствор красителя на сутки при 58°C.
5. Промыть в воде.
6. Заключить в глицерин – желатину.

Результат. Локализация жирных кислот определяется по выпадению красно-коричневых осадков нерастворимых мыл.

§ 7. Постановка гистохимического контроля

Одним из основных свойств липидов является их способность растворяться в органических растворителях. Это свойство используется для дифференциации липидов от других соединений, а также идентификации отдельных групп липидных веществ в тканях и клетках. При постановке гистохимической реакции нужно на некотором количестве срезов (мазков, мазкопечатков) ставить контрольное исследование, подвергнув их предварительной обработке соответствующими органическими

растворителями. Выбор растворителя определяется целью исследования, липидным составом объекта и используемым в работе методом. При этом можно руководствоваться принципами, изложенными ниже.

Экстракция липидов по Кейлигу

(Нефиксированная ткань: замороженные срезы).

Механизм действия. Экстракция липидов основана на их способности неодинаково растворяться в различных растворителях. Так, в холодном ацетоне экстрагируются глицериды, стерины и стериды, некоторые кетостероиды. Горячий ацетон экстрагирует цереброзиды, горячий диэтиловый эфир — лецитины и кефалины, горячий метанол — хлороформ — все липиды.

Реактивы. Используются химически чистые органические растворители (ацетон, диэтиловый эфир, метанол и хлороформ). Для приготовления смеси метанол — хлороформ берут равное количество обоих растворителей и смешивают. В процессе приготовления контрольных препаратов можно пользоваться группой органических растворителей в очередности, приведенной ниже, или (в зависимости от цели исследования) одним из них.

Постановка реакции.

1. Срезы поместить на 24 ч в холодный ацетон (растворитель сменить трижды через 3, 8 и 12ч).
2. Перенести срезы в горячий ацетон (растворитель сменить трижды в те же сроки). В процессе работы можно использовать аппарат Сокслета или другой прибор для экстракции.
3. Поместить срезы в горячий диэтиловый эфир на сутки (трижды сменить растворитель).
4. Поместить срезы в горячий метанол — хлороформ на сутки (трижды сменить растворитель).
5. Срезы окрасить по соответствующему методу.

Результат. В зависимости от растворителя на препарате не выявляются те или иные группы липидов.

Экстракция липидов по Бэкеру

(Смесь Буэна; замороженные срезы).

цесса всасывания жирных кислот в желудочно-кишечном тракте человека и животных. Детализирована функция преджелудков жвачных в реакциях межклеточного обмена.

Принцип выявления. ВЖК вступают в реакцию с нитратом меди, в результате чего образуются нерастворимые соли – мыла.

Остальные реакции протекают так же, как и в предыдущем методе (за исключением красителя).

Реактивы. 1. Фиксатор: на 20%-ном растворе поваренной соли приготовить 10%-ный раствор формалина (можно использовать и жидкость Бэкера). 2. Раствор нитрата меди: в 100 мл 75%-ного этанола растворить 0,2 мл насыщенного раствора нитрата меди (можно в 100мл воды растворить 0,5мл того же раствора). 3. Раствор красителя: к 95 мл абсолютного этанола, содержащего 2% ацетата натрия, добавить 5 мл насыщенного раствора п-диметиламинобензилиденроданина.

Постановка реакции.

1. Срезы промыть в 20%-ном растворе поваренной соли.
2. Перенести в раствор нитрата меди (в спиртовом растворе выдерживать 2–3 ч, в водном – сутки).
3. Промыть водой.
4. Поместить в раствор красителя на сутки при 58°C.
5. Промыть в воде.
6. ЗаклЮчить в глицерин – желатину.

Результат. Локализация жирных кислот определяется по выпадению красно-коричневых осадков нерастворимых мыл.

§ 7. Постановка гистохимического контроля

Одним из основных свойств липидов является их способность растворяться в органических растворителях. Это свойство используется для дифференциации липидов от других соединений, а также идентификации отдельных групп липидных веществ в тканях и клетках. При постановке гистохимической реакции нужно на некотором количестве срезов (мазков, мазков-отпечатков) ставить контрольное исследование, подвергнув их предварительной обработке соответствующими органическими

растворителями. Выбор растворителя определяется целью исследования, липидным составом объекта и используемым в работе методом. При этом можно руководствоваться принципами, изложенными ниже.

Экстракция липидов по Кейлигу

(Нефиксированная ткань: замороженные срезы).

Механизм действия. Экстракция липидов основана на их способности неодинаково растворяться в различных растворителях. Так, в холодном ацетоне экстрагируются глицериды, стерины и стериды, некоторые кетостероиды. Горячий ацетон экстрагирует цереброзиды, горячий диэтиловый эфир — лецитины и кефалины, горячий метанол — хлороформ — все липиды.

Реактивы. Используются химически чистые органические растворители (ацетон, диэтиловый эфир, метанол и хлороформ). Для приготовления смеси метанол — хлороформ берут равное количество обоих растворителей и смешивают. В процессе приготовления контрольных препаратов можно пользоваться группой органических растворителей в очередности, приведенной ниже, или (в зависимости от цели исследования) одним из них.

Постановка реакции.

1. Срезы поместить на 24 ч в холодный ацетон (растворитель сменить трижды через 3, 8 и 12ч).
2. Перенести срезы в горячий ацетон (растворитель сменить трижды в те же сроки). В процессе работы можно использовать аппарат Сокслета или другой прибор для экстракции.
3. Поместить срезы в горячий диэтиловый эфир на сутки (трижды сменить растворитель).
4. Поместить срезы в горячий метанол — хлороформ на сутки (трижды сменить растворитель).
5. Срезы окрасить по соответствующему методу.

Результат. В зависимости от растворителя на препарате не выявляются те или иные группы липидов.

Экстракция липидов по Бэкеру

(Смесь Буэна; замороженные срезы).

Механизм действия. Используется пиридин – прекрасный растворитель почти для всех липидов тканей и клеток животных и растений.

Реактивы. 1. Химически чистый пиридин. 2. Раствор дихромата кальция (см. метод Бэкера). 3. Кислый гематеин (см. метод Бэкера). 4. Реактивы для окраски Суданом черным В.

Постановка реакции.

1. Срезы (толщиной 10–15 мкм) промыть в 96%-ном этаноле.
2. Перенести в пиридин на 30 мин при 17–22°C.
3. Обработать пиридином при 60°C в течение суток.
4. Промыть в проточной воде 2 ч.
5. Приготовить препараты по одному из методов (см. метод Бэкера или окрашивание Суданом черным В по Лизону).

Результат. На препаратах, обработанных пиридином, липиды экстрагированы. Пиридин вызывает деформацию тканей.

VII. УГЛЕВОДЫ

Углеводы – большая группа органических веществ, молекулы которых чаще всего состоят из трех элементов – углерода, водорода и кислорода, количественное соотношение между которыми обычно напоминает соотношение между углеродом и водой. Термин «углеводы» введен в науку русским ученым К. Шмидтом в 1844 г. В дальнейшем установлено, что количественные соотношения между С, Н и О в молекулах углеводов могут быть иными, например дезоксирибоза $C_5H_{10}O_4$, или в составе молекулы углеводов имеются другие химические элементы (сера, азот). Углеводы стали называть глицидами или глюцидами – многоатомными альдегидо- или кетоспиртами. Они широко распространены в природе. В растениях составляют до 90% сухого веса, в организме животных – в пределах 2%. Выполняют ряд важных функций, основными из которых являются структурная и энергетическая. Они участвуют в образовании клеточных оболочек растительных организмов. $\frac{2}{3}$ всей химической энергии, необходимой для жизни человека и многих животных, образуется за счет распада углеводов. Часть углеводов может откладываться в клетках и тканях в виде резерва (у растений – крахмал, у человека и животных – гликоген). Отдельные углеводы выполняют опорные функции (гиалуроновая кислота – у человека и животных, клетчатка – у растений), участвуют в защитных реакциях организма (иммунитет, свертывание крови), задерживают развитие микрофлоры, определяют группы крови и др. Некоторые углеводы являются составными частями нуклеиновых кислот, глюкопротеидов, биологически важных соединений (АТФ, АДФ, АМФ, УТФ, УДФ, ГТФ, ЦТФ и т.д.). Продукты расщепления углеводов используются для синтеза аминокислот, жирных кислот, глицерина, гормонов, медиаторов и др.

В настоящее время нет единой классификации углеводов. Чаще всего различают две группы – простые (моносахариды) и сложные (полисахариды) углеводы. Простые углеводы имеют общую формулу $C_nH_{2n}O_n$. В зависимости от количества углеродных атомов их разделяют на несколько подгрупп: триозы, тетрозы,

пентозы, гексозы, гептозы, октозы, нонозы и т. д. Наибольшее значение имеют пентозы и гексозы.

Простые сахара встречаются в свободном состоянии, кроме этого, их получают при гидролизе полисахаридов и синтетически. Это кристаллические вещества, хорошо растворимы в воде, оптически активны, большинство имеют сладкий вкус, вступают в реакции, характерные для альдегидов и кетонов. Из-за хорошей растворимости в воде не могут достоверно определяться гистохимически.

В группе полисахаридов выделяют олигосахариды, содержащие от 2 до 6 остатков молекул простых сахаров, и высшие полисахариды, содержащие десятки и сотни тысяч остатков молекул простых сахаров. Олигосахариды делят на дисахариды, трисахариды, тетрасахариды, пентасахариды и гексасахариды. Они хорошо растворимы в воде, легко кристаллизуются, сладкие на вкус, вступают во многие реакции, характерные для альдегидо- и кетоспиртов, а также углеводов, способны к кислотному и ферментативному гидролизу. Достоверно гистохимически не определяются. Среди высших полисахаридов различают гомо- и гетерополисахариды. Гомополисахариды построены из остатков молекул моносахаридов, соединенных между собой кислородными мостиками. Примером гомополисахаридов могут быть крахмал, инулин, клетчатка, гликоген. Иногда к ним относят полигалактуроновую кислоту и хитин. Среди гетерополисахаридов различают мукополисахариды и глюкополисахариды.

К мукополисахаридам относят гиалуроновую кислоту (ее молекула построена из остатков молекул глюкуроновой и уксусной кислот, глюкозамина), хондроитинсерную кислоту А, С и В (чаще всего содержит остатки глюкозамина, глюкуроновой, серной и уксусной кислот), гепарин (построен из остатков глюкозамина, глюкуроновой и серной кислот).

Глюкополисахариды имеют сходное строение молекул с мукополисахаридами, но не содержат остатков гексозаминов. К ним относят пектиновые вещества, специфические полисахариды микробов (иммунополисахариды), камеди, слизи и др. Они характеризуются разнообразной структурой и свойствами.

§ 1. Гистохимическое определение гликогена

Гликоген называют животным крахмалом, так как он синтезируется в организме человека и животных, является запасным энергетическим материалом. Содержание гликогена в печени достигает 20% (от общего веса), мышцах – 4%, нервной ткани – 0,2%. Синтез гликогена начинается фосфорилированием глюкозы.

Глюкозо-6-фосфат под влиянием фермента: фосфоглюкомутазы превращается в глюкозо-1-фосфат, который служит исходным продуктом для образования молекулы гликогена. Существуют и другие биохимические пути образования гликогена.

Гликоген – белый аморфный порошок, хорошо растворяется в теплой воде, опалесцирует, оптически активен (+ 196°), образует коллоидный раствор. Молекулярная масса колеблется от 400 тыс. до 4 млн. Молекула содержит от 2400 до 24000 глюкозидных остатков. Они соединены между собой глюкозидными связями по типам 1,4 и 1,6, причем связи 1,6 составляют 7–9%.

Строение молекул гликогена у животных, принадлежащих к различным типам (моллюски и позвоночные) и классам (амфибии и млекопитающие), различно. Расщепление гликогена происходит под влиянием фермента амилазы (амилолиз) или фосфорилазы (фосфоролиз). Фосфоролиз представляет собой начальный этап анаэробной фазы распада гликогена, в результате чего в виде макроэргов (АТФ) выделяется химическая энергия, необходимая для жизни клеток, тканей, органов и организма. Богаты полисахаридами эмбриональные ткани, хрящ, кости, многослойный эпителий. Его содержание изменяется при функциональной нагрузке. В клетке различают стабильный (он входит в состав структур в виде симпласта) и лабильный (временно откладывается здесь) гликоген. Обмен гликогена нарушается при многих болезнях: гепатитах, болезнях Гирке, сахарном диабете, миозитах и т. д.

Метод Шабдаша

(Жидкость Шабдаша, Карнуа, Бауэра, Беста; парафиновые и целлоидиновые срезы).

Метод разработан советским морфологом, одним из осново-

пентозы, гексозы, гептозы, октозы, нонозы и т. д. Наибольшее значение имеют пентозы и гексозы.

Простые сахара встречаются в свободном состоянии, кроме этого, их получают при гидролизе полисахаридов и синтетически. Это кристаллические вещества, хорошо растворимы в воде, оптически активны, большинство имеют сладкий вкус, вступают в реакции, характерные для альдегидов и кетонов. Из-за хорошей растворимости в воде не могут достоверно определяться гистохимически.

В группе полисахаридов выделяют олигосахариды, содержащие от 2 до 6 остатков молекул простых сахаров, и высшие полисахариды, содержащие десятки и сотни тысяч остатков молекул простых сахаров. Олигосахариды делят на дисахариды, трисахариды, тетрасахариды, пентасахариды и гексасахариды. Они хорошо растворимы в воде, легко кристаллизуются, сладкие на вкус, вступают во многие реакции, характерные для альдегидо- и кетоспиртов, а также углеводов, способны к кислотному и ферментативному гидролизу. Достоверно гистохимически не определяются. Среди высших полисахаридов различают гомо- и гетерополисахариды. Гомополисахариды построены из остатков молекул моносахаридов, соединенных между собой кислородными мостиками. Примером гомополисахаридов могут быть крахмал, инулин, клетчатка, гликоген. Иногда к ним относят полигалактуриновую кислоту и хитин. Среди гетерополисахаридов различают мукополисахариды и глюкополисахариды.

К мукополисахаридам относят гиалуроновую кислоту (ее молекула построена из остатков молекул глюкуроновой и уксусной кислот, глюкозамина), хондроитинсерную кислоту А, С и В (чаще всего содержит остатки глюкозамина, глюкуроновой, серной и уксусной кислот), гепарин (построен из остатков глюкозамина, глюкуроновой и серной кислот).

Глюкополисахариды имеют сходное строение молекул с мукополисахаридами, но не содержат остатков гексозаминов. К ним относят пектиновые вещества, специфические полисахариды микробов (иммунополисахариды), камеди, слизи и др. Они характеризуются разнообразной структурой и свойствами.

§ 1. Гистохимическое определение гликогена

Гликоген называют животным крахмалом, так как он синтезируется в организме человека и животных, является запасным энергетическим материалом. Содержание гликогена в печени достигает 20% (от общего веса), мышцах – 4%, нервной ткани – 0,2%. Синтез гликогена начинается фосфорилированием глюкозы.

Глюкозо-6-фосфат под влиянием фермента: фосфоглюкомутазы превращается в глюкозо-1-фосфат, который служит исходным продуктом для образования молекулы гликогена. Существуют и другие биохимические пути образования гликогена.

Гликоген – белый аморфный порошок, хорошо растворяется в теплой воде, опалесцирует, оптически активен (+ 196°), образует коллоидный раствор. Молекулярная масса колеблется от 400 тыс. до 4 млн. Молекула содержит от 2400 до 24000 глюкозидных остатков. Они соединены между собой глюкозидными связями по типам 1,4 и 1,6, причем связи 1,6 составляют 7–9%.

Строение молекул гликогена у животных, принадлежащих к различным типам (моллюски и позвоночные) и классам (амфибии и млекопитающие), различно. Расщепление гликогена происходит под влиянием фермента амилазы (амилолиз) или фосфорилазы (фосфоролиз). Фосфоролиз представляет собой начальный этап анаэробной фазы распада гликогена, в результате чего в виде макроэргов (АТФ) выделяется химическая энергия, необходимая для жизни клеток, тканей, органов и организма. Богаты полисахаридами эмбриональные ткани, хрящ, кости, многослойный эпителий. Его содержание изменяется при функциональной нагрузке. В клетке различают стабильный (он входит в состав структур в виде симпласта) и лабильный (временно откладывается здесь) гликоген. Обмен гликогена нарушается при многих болезнях: гепатитах, болезни Гирке, сахарном диабете, миозитах и т. д.

Метод Шабадаша

(Жидкость Шабадаша, Карнуа, Бауэра, Беста; парафиновые и целлоидиновые срезы).

Метод разработан советским морфологом, одним из осново-

положников отечественной гистохимии А. Л. Шабдашем. Широко используется в отечественных и зарубежных лабораториях.

Принцип выявления. Реакция протекает в две стадии. Периодат калия или натрия окисляет спиртовые группы возле второго и третьего атомов углерода глюкозных остатков гликогена.

Образуется высокомолекулярное альдегидное соединение со спиртовыми функциональными группами, которое выявляется реактивом Шиффа. Если это соединение условно обозначить то в результате взаимодействия с лейкофуксином образуется многозамещенный комплекс – краситель красно-пурпурного цвета, по локализации которого определяется гисто- и цитотопография гликогена (см. метод Фельгена – Россенбека на ДНК).

Реактивы. 1. Раствор периодата: перед постановкой реакции приготовить 0,01 М раствор KIO_4 на бидистиллированной воде (банку обернуть темной бумагой). Для получения ориентировочных препаратов концентрацию периодата снижать (0,003, 0,002 и 0,001 М) с уменьшением времени инкубации в нем до 7–10 мин.

2. Реактив Шиффа: 1 г основного фуксина растворить в 200 мл кипящей дистиллированной воды, охладить до 50°C, прибавить 20 мл 1 н. раствора HCl , снова охладить до 25°C и добавить 1 г сухого гидросульфита натрия. Перед прибавлением HCl смесь профильтровать. Поставить банку с притертой пробкой в темное место и через сутки использовать (раствор должен быть бесцветным или иметь палевый цвет). Реактив Шиффа лучше готовить по прописи де Томази (см. метод Фельгена – Россенбека на ДНК).

3. Сернистая вода: к 200 мл дистиллированной воды добавить 10 мл 10%-ного раствора гидросульфита натрия и 10 мл 1 н. HCl . Готовить перед постановкой реакции.

4. 0,5%-ный раствор светового зеленого.

Постановка реакции.

1. Депарафинированные срезы промыть в дистиллированной воде.
2. Перенести в раствор периодата на 20–25 мин.
3. Сполоснуть в трех сменах воды по 3 мин в каждой.
4. Поместить в реактив Шиффа на 20–25 мин.

5. Промыть в трех порциях сернистой воды по 3–4 мин в каждой.
6. Промыть в нескольких порциях дистиллированной воды 10–15 мин.
7. Докрасить световым зеленым или другим красителем.
8. Тщательно сполоснуть в воде.
9. Обезводить, просветлить, заключить в бальзам.

Результат. Гликоген окрашивается в интенсивный фиолетово-вишневый цвет, мукоиды и глюкотеины – красноватые.

Примечание. Пользоваться химически чистой посудой, стеклянными палочками. Нельзя работать с металлическими крючками или иглками. Найти оптимальную концентрацию периодата для материала. Окрашивание срезов в реактиве Шиффа проводить в темноте.

Метод Шифф-иодная кислота (ШИК) по Мак-Манусу

(Жидкость Карнуа, Беста, Шабадша, абсолютный этанол, 10%-ный раствор формалина и др.; парафиновые, целлоидиновые и замороженные срезы, мазки и мазки отпечатки).

Одна из наиболее употребляемых реакций в современной гистохимии. Основана на способности иодной кислоты окислять спиртовые группы. Позаимствована из биохимического анализа полисахаридов. Мак-Манус в 1946 г. применил иодную кислоту для гистохимического изучения муцинов. Вскоре им же был разработан метод для гистохимического определения полисахаридов.

Принцип выявления. Гистохимическое определение гликогена основано на тех же реакциях, что и в предыдущем методе, но в качестве окислителя здесь используют иодную кислоту. Она окисляет две смежные спиртовые группы в положении 2,3 и разрывает –С–С–связь в кольце глюкозидного остатка. Возникшие альдегидные группы вступают в реакцию с лейкофуксином, образуется окрашенный конечный продукт реакции

Реактивы. 1. 0,5%-ный водный раствор иодной кислоты.

2. Реактив Шиффа (см. метод Фельгена – Россенбека на ДНК).

3. Раствор целестинового голубого Р: в 50 мл дистиллированной воды растворить 2,5 г железоаммониевых квасцов, через 12–14 ч добавить 0,25г целестинового голубого Р, кипятить в течение 3 мин, профильтровать и добавить 7 мл глицерина.

4. Гемалаун Майера.

5. Солянокислый спирт: к 100 мл 70%-ного этанола добавить 0,25–0,5 мл концентрированной соляной кислоты.

Постановка реакции.

1. Довести срезы до воды.
2. Поместить в раствор иодной кислоты на 2–5 мин.
3. Промыть в дистиллированной воде 10–15 мин.
4. Поместить в реактив Шиффа на 10–15 мин.
5. Дважды промыть в проточной воде 5–15 мин.
6. Докрасить ядра целестиновым голубым Р 2–3 мин.
7. Перенести в раствор гемалауна на 2–3 мин.
8. Если нужно, дифференцировать в солянокислом спирте.
9. Промыть в водопроводной воде 10–15 мин.
10. Обезводить в спиртах.
11. Просветлить в ксилоле.
12. ЗаклЮчить в бальзам или синтетическую среду.

Результат. Гликоген окрашивается в темно-красный цвет, глюкопротеиды и мукополисахариды – в различные оттенки пурпурного цвета.

Метод Беста

(Жидкость Карнуа, смесь Шабадаша, Буэна, 100%-ный этанол; парафиновые, целлоидиновые и замороженные срезы).

Фиксация. Кусочки тканей брать сразу же после убоя животного и переносить в фиксатор. Они должны иметь минимальную толщину (до 2 мм). Учесть, что после фиксации в абсолютном спирте сохраняется 90% гликогена, в жидкости Ценкера – 37%, Карнуа – 76%, Жандра – 85%.

Принцип выявления. Действующим началом окрашивания является взаимодействие гликогена с кармином. Химизм этих процессов изучен мало. По-видимому, окрашивание возникает в

результате физических и химических явлений. Кармин в определенных условиях ($pH=4,0-4,5$) имеет свойства кислого красителя. Строение кармина полностью не расшифровано. Он является производным оксиантрахинона и представляет собой алюминисолянокальциевое соединение карминовой кислоты:

Реактивы. 1. Раствор красителя: 2 г кармина, 1 г карбоната калия и 5 г хлорида калия растереть в ступке, добавить 60 мл дистиллированной воды, прокипятить 5 мин, охладить и профильтровать. К фильтрату добавить 20 мл гидроксида аммония (пл. 0,880). Хранить в холодильнике в темной банке с притертой пробкой. Годность красителя—1–3 месяца.

2. Рабочий раствор: смешать 15 мл раствора красителя, 12,5 мл гидроксида аммония (пл. 0,880) и 12,5 мл метанола. Рабочий раствор годен в течение 2–3 недель.

3. Раствор для дифференциации: смешать 5 мл 100%-ного этанола, 4 мл метанола и 10 мл дистиллированной воды.

4. Солянокислый спирт (см. метод ШИК).

Постановка реакции.

1. Срезы довести до абсолютного этанола.
2. Поместить в 1%-ный раствор целлоидина, приготовленного на смеси абсолютного этанола и диэтилового эфира (1:1) на 2 мин.
3. Высушить на воздухе.
4. Провести через ряд спиртов до дистиллированной воды.
5. Окрасить гематоксилином Эрлиха
6. Промыть в воде.
7. Дифференцировать в солянокислом спирте.
8. Промыть в воде.
9. Окрасить рабочим раствором 10–30 мин.
10. Поместить в раствор для дифференциации до исчезновения облачков красителя.
11. Промыть в 80%-ном этаноле.
12. Обезводить в 100%-ном этаноле.
13. Просветлить в ксилоле.
14. ЗаклЮчить в бальзам или в другую (синтетическую) среду.

3. Раствор целестинового голубого Р: в 50 мл дистиллированной воды растворить 2,5 г железоаммониевых квасцов, через 12–14 ч добавить 0,25 г целестинового голубого Р, кипятить в течение 3 мин, профильтровать и добавить 7 мл глицерина.

4. Гемалаун Майера.

5. Солянокислый спирт: к 100 мл 70%-ного этанола добавить 0,25–0,5 мл концентрированной соляной кислоты.

Постановка реакции.

1. Довести срезы до воды.
2. Поместить в раствор иодной кислоты на 2–5 мин.
3. Промыть в дистиллированной воде 10–15 мин.
4. Поместить в реактив Шиффа на 10–15 мин.
5. Дважды промыть в проточной воде 5–15 мин.
6. Докрасить ядра целестиновым голубым Р 2–3 мин.
7. Перенести в раствор гемалауна на 2–3 мин.
8. Если нужно, дифференцировать в солянокислом спирте.
9. Промыть в водопроводной воде 10–15 мин.
10. Обезводить в спиртах.
11. Просветлить в ксилоле.
12. ЗаклЮчить в бальзам или синтетическую среду.

Результат. Гликоген окрашивается в темно-красный цвет, глюкОпротеиды и мукополисахариды – в различные оттенки пурпурного цвета.

Метод Беста

(Жидкость Карнуа, смесь Шабдаша, Буэна, 100%-ный этанол; парафиновые, целлоидиновые и замороженные срезы).

Фиксация. Кусочки тканей брать сразу же после убоя животного и переносить в фиксатор. Они должны иметь минимальную толщину (до 2 мм). Учесть, что после фиксации в абсолютном спирте сохраняется 90% гликогена, в жидкости Ценкера – 37%, Карнуа – 76%, Жандра – 85%.

Принцип выявления. Действующим началом окрашивания является взаимодействие гликогена с кармином. Химизм этих процессов изучен мало. По-видимому, окрашивание возникает в

результате физических и химических явлений. Кармин в определенных условиях ($\text{pH}=4.0-4.5$) имеет свойства кислого красителя. Строение кармина полностью не расшифровано. Он является производным оксиантрахинона и представляет собой алюминисво-кальциевое соединение карминовой кислоты:

Реактивы. 1. Раствор красителя: 2 г кармина, 1 г карбоната калия и 5 г хлорида калия растереть в ступке, добавить 60 мл дистиллированной воды, прокипятить 5 мин, охладить и профильтровать. К фильтрату добавить 20 мл гидроксида аммония (пл. 0,880). Хранить в холодильнике в темной банке с притертой пробкой. Годность красителя—1–3 месяца.

2. Рабочий раствор: смешать 15 мл раствора красителя, 12,5 мл гидроксида аммония (пл. 0,880) и 12,5 мл метанола. Рабочий раствор годен в течение 2–3 недель.

3. Раствор для дифференциации: смешать 5 мл 100%-ного этанола, 4 мл метанола и 10 мл дистиллированной воды.

4. Солянокислый спирт (см. метод ШИК).

Постановка реакции.

1. Срезы довести до абсолютного этанола.
2. Поместить в 1%-ный раствор целлоидина, приготовленного на смеси абсолютного этанола и диэтилового эфира (1:1) на 2 мин.
3. Высушить на воздухе.
4. Провести через ряд спиртов до дистиллированной воды.
5. Окрасить гематоксилином Эрлиха
6. Промыть в воде.
7. Дифференцировать в солянокислом спирте.
8. Промыть в воде.
9. Окрасить рабочим раствором 10–30 мин.
10. Поместить в раствор для дифференциации до исчезновения облачек красителя.
11. Промыть в 80%-ном этаноле.
12. Обезводить в 100%-ном этаноле.
13. Просветлить в ксилоле.
14. Заключить в бальзам или в другую (синтетическую) среду.

Результат. Гликоген выявляют по ярко-красной окраске, ядра клеток – по синей. Кармин может окрашивать слизь, фибрин, гранулы тучных клеток, костную ткань в тускло-красные тона. В сомнительных случаях поставить контроль с амилазой.

§ 2. Кислые мукополисахариды

Кислые мукополисахариды широко распространены в природе. В организме входят в состав многих тканей. Встречаются чаще всего вне клеток, являясь одним из главных компонентов соединительной ткани и эпителиальных слизей. Рассмотрим некоторые мукополисахариды.

Гиалуриновая кислота (ГК) – высокомолекулярный полисахарид (молекулярная масса 200 тыс. – 500 тыс.). Молекула имеет вид фиброзной нити. Входит в состав соединительной ткани кожи, стекловидного тела и роговицы глаза, стенок капилляров, пупочного канатика, оболочек бактерий. Ее растворы (0,2%-ные) обнаруживают определенную структурность и вязкость, связанные с формированием сеточки волокнистых молекул. Это создает в ткани устойчивость структуры, препятствует свободному передвижению крупных молекул и регулирует поступление в клетки отдельных веществ, необходимых для жизнедеятельности. ГК обычно синтезируется в телах фибробластов из глюкозы, глюкозамина и уксусной кислоты. Отдельный фрагмент ГК состоит из N-ацетил- β -D- глюкозамина и β -D-глюкуроновой кислоты (1:1), соединенных между собой поочередно β -1,3- и β -1,4-глюкозидными связями.

ГК обладает высокой степенью метаболизма (период полураспада молекулы – 2 суток). Способна к полимеризации и деполимеризации. Именно на этих свойствах основаны гистохимические методы выявления мукополисахаридов.

Хондроитин – полисахарид, имеет аналогичное строение с ГК. Отличается гексозаминным остатком.

Хондроитинсерные кислоты (ХСК) – кислые мукополисахариды, составляющие основную массу некоторых соединительнотканых образований и прежде всего хрящей. Молекула представ-

ляет собой неразветвленную полимерную цепь, состоящую из N-ацетил- галактозаминсульфата и глюкуроновой кислоты, связанных между собой α -1,3- и α -1,4-гликозидными связями. Молекулярная масса ХСК достигает 250 тыс., а в комплексах с белками – от 4 до 50 млн.

Различают ХСК А, ХСК В, ХСК С и ХСК Д, неодинаковые по стереохимическому признаку. ХСК Д имеет сходное строение с ХСК С, но отличается большим содержанием сульфатных групп: 1–3 сульфатных групп на единицу дисахарида. Наличие карбоксильной и сульфатных групп в молекулах ХСК обуславливает метакрохроматическую окраску. ХСК в хряще обновляются наполовину в течение 16 суток, в коже – 8 суток.

Гепарин – полимер с высокой молекулярной массой – от 10 тыс. до 20 тыс. Содержится в печени, сердце, легких, мышцах. Предполагают, что структурной единицей гепарина является тетрасахарид, построенный из глюкозамина, глюкуроновой кислоты и этерифицированный 5–6 остатками молекул серной кислоты.

Кератосульфат – кислый мукополисахарид, построенный из остатков N-ацетилглюкозамина, галактозы и серной кислоты. Обнаружен в стенке аорты, межпозвоночных дисках, хрящах, роговице.

Гепаринсульфат – по строению близок к гепарину, но около половины углеродных атомов в остатке гексозамина содержат N-ацетильные группы. В молекулах гепаринсульфата меньше сульфатных групп, чем в гепарине. Содержится в соединительной ткани легких, аорты и др.

Выявление кислых мукополисахаридов (КМПС) по Хейлу (Свежая ткань, жидкость Карнуа, 10%-ный раствор формалина; замороженные и парафиновые срезы).

Метод широко используется в нормальной и патологической гистохимии.

Принцип выявления. Реактив Хейла представляет собой коллоидный раствор гидроксида железа, который стабилизируется уксусной кислотой. Вначале получают коллоидный раствор гидроксида железа.

Возникает коллоидная мицелла гидроксида железа. Проводят диализ, при котором значительная часть ионов Cl^- удаляется. Затем добавляют в коллоидный раствор гидроксида железа уксусную кислоту, после чего состав мицеллы изменяется, так как в состав диффузного слоя вошли ионы CH_3COO^- .

В процессе постановки гистохимической реакции молекулы гидроксида железа взаимодействуют с функциональными группами КМПС. Образуется своеобразный комплекс, прочность которого определяется плотностью анионных групп на поверхности тканевых и клеточных структур, содержащих КМПС. В дальнейшем этот комплекс вступает в реакцию с гексациано-(II)ферратом калия, что и приводит к образованию молекул берлинской лазури, по осадкам которых определяется локализация КМПС. Некоторые стороны химизма этих процессов пока не изучены.

Реактивы. 1. Реактив Хейла: в кипящую дистиллированную воду по каплям добавить 10%-ный раствор FeCl_3 (от 8 до 12 мл на 100 мл воды), смесь охладить и поместить в диализатор (или в целлофановый мешочек) на 2–3 суток. Менять воду через 4–6 ч до исчезновения в фильтрате ионов Cl^- (проба с AgNO_3). Добавить 2 М раствор уксусной кислоты с таким расчетом, чтобы гидроксид железа и уксусная кислота были в соотношении 1: 1.

2. 2 М раствор уксусной кислоты.

3. 0,5–1%-ный раствор гексациано-(II) феррата калия на 1 %ном растворе HCl .

Постановка реакции.

1. Срезы депарафинировать и довести до воды.
2. Поместить в реактив Хейла на 20–30 мин при комнатной температуре.
3. Промыть в 2–3 сменах раствора уксусной кислоты 2–3 мин.
4. Поместить в раствор гексациано-(II) феррата калия на 15 мин.
5. Промыть водой.
6. Обезводить в спиртах.
7. Просветлить в ксилоле.
8. ЗаклЮчить в канадский бальзам.

Результат. Структуры, содержащие КМПС, окрашиваются в синий цвет.

Примечание. Если нужно, срезы перед обезвоживанием докрасить эозином, нейтральным красным, кислым фуксином.

Возникает коллоидная мицелла гидроксида железа. Проводят диализ, при котором значительная часть ионов Cl^- удаляется. Затем добавляют в коллоидный раствор гидроксида железа уксусную кислоту, после чего состав мицеллы изменяется, так как в состав диффузного слоя вошли ионы CH_3COO^- .

В процессе постановки гистохимической реакции молекулы гидроксида железа взаимодействуют с функциональными группами КМПС. Образуется своеобразный комплекс, прочность которого определяется плотностью анионных групп на поверхности тканевых и клеточных структур, содержащих КМПС. В дальнейшем этот комплекс вступает в реакцию с гексациано-(II)ферратом калия, что и приводит к образованию молекул берлинской лазури, по осадкам которых определяется локализация КМПС. Некоторые стороны химизма этих процессов пока не изучены.

Реактивы. 1. Реактив Хейла: в кипящую дистиллированную воду по каплям добавить 10%-ный раствор FeCl_3 (от 8 до 12 мл на 100 мл воды), смесь охладить и поместить в диализатор (или в целлофановый мешочек) на 2–3 суток. Менять воду через 4–6 ч до исчезновения в фильтрате ионов Cl^- (проба с AgNO_3). Добавить 2 М раствор уксусной кислоты с таким расчетом, чтобы гидроксид железа и уксусная кислота были в соотношении 1: 1.

2. 2 М раствор уксусной кислоты.

3. 0,5–1%-ный раствор гексациано-(II) феррата калия на 1 %ном растворе HCl .

Постановка реакции.

1. Срезы депарафинировать и довести до воды.
2. Поместить в реактив Хейла на 20–30 мин при комнатной температуре.
3. Промыть в 2–3 сменах раствора уксусной кислоты 2–3 мин.
4. Поместить в раствор гексациано-(II) феррата калия на 15 мин.
5. Промыть водой.
6. Обезводить в спиртах.
7. Просветлить в ксилоле.
8. ЗаклЮчить в канадский бальзам.

Результат. Структуры, содержащие КМПС, окрашиваются в синий цвет.

Примечание. Если нужно, срезы перед обезвоживанием докрасить эозином, нейтральным красным, кислым фуксином.

VIII. ВИТАМИНЫ

Витамины (от лат. Vita – жизнь) – группа органических соединений разнообразной химической структуры, необходимых для нормального течения реакций обмена веществ. Синтезируются главным образом в растениях. Люди и животные получают витамины с растительной пищей или с продуктами животного происхождения, содержащими эти вещества. Некоторые витамины синтезируются микроорганизмами в желудочно-кишечном тракте животных, а также в природных водоемах и почве.

Отсутствие витаминов в пище или кормах приводит к возникновению комплексов патологических нарушений обмена веществ – авитаминозам, а недостаток витаминов – к гиповитаминозам.

Витамины открыты русским врачом Н. И. Луниным в 1880 г. как дополнительные факторы питания человека и животных. Термин «витамины» в науку ввел польский ученый К. Функ в 1912 г. Сейчас известно свыше 30 витаминов, из которых для 20 установлено строение молекул. Витамины разделяют на жиро- и водорастворимые. Первые из них термостабильны, стойки к изменению значений pH, могут откладываться в тканях в виде резервного материала. К группе жирорастворимых витаминов относят витамины А, D, Е, К, Q и F. Водорастворимые витамины не растворяются во многих органических растворителях, термолабильны, не устойчивы к изменению pH, не могут откладываться в органах и тканях про запас. К ним относятся В₁, В₂, В₆, В₁₂, В₁₅, В_с, С, РР, Н, В₃, ПАБК, холин, инозит, Р, липоевая кислота, фолиевая кислота, В13 и некоторые другие.

Витамины в организме выполняют исключительно важные функции. Жирорастворимые витамины участвуют в реакциях построения молекул сложных веществ, структур органов и тканей, то есть выполняют пластические функции. Водорастворимые витамины являются компонентами ферментативных реакций или составными частями многих ферментов. В настоящее время известно свыше 100 ферментов, в состав простетических групп которых

входят витамины. Гистохимические методы выявления витаминов разработаны мало.

§ 1. Витамин А (ретинол, аксерофтол)

Его нередко называют витамином роста. При авитаминозе развивается комплекс патологических нарушений: «куриная» слепота (гемералопия), возникает сухость роговицы глаза (ксерофтальмия), происходит размягчение и некротический распад роговицы (кератомалиция), поражаются слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта, дыхательный, мочеполовой аппараты, кожа, тормозится рост, падает вес, наступает истощение организма. Витамин А участвует в окислительно-восстановительных процессах, образуя перекиси, входит в состав зрительного пурпура (родопсина).

Выявление витамина А реакцией с трихлоридом сурьмы
(Раствор Рингер – формол; замороженные срезы)

Биохимическая реакция модифицирована для гистохимических исследований. Не получила широкого использования в микроскопической практике.

Фиксация. Проводится в Рингер – формоле. Раствор Рингера готовят так: 0,9 г хлорида калия и 0,02 г гидрокарбоната натрия растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Затем прибавляют 0,02 г хлорида кальция. К 85 мл раствора Рингера добавляют 15 мл неразбавленного формалина. Фиксировать в течение 24–48 ч.

Принцип выявления. Химизм метода не изучен. Витамин представляет собой циклический непредельный спирт, строение которого установлено П.Каррсом:

Реактивы: 1. Реактив Карра – Прайса – насыщенный раствор $SbCl_3$ в хлороформе (для биохимических исследований рекомендуют 33%-ный раствор).

2. Химически чистый хлороформ.

Постановка реакции.

1. Приготовить срезы.

2. Сполоснуть в дистиллированной воде, покласть на предметные стекла и высушить (при комнатной температуре).
3. Поместить в реактиве Карра – Прайса – от нескольких минут до нескольких часов.
4. Сполоснуть и покрыть химически чистым хлороформом.

Результат. Синее окрашивание – признак локализации витамина А. Он выявляется в ядрышках, митохондриях и других структурах клеток.

Выявление витамина А люминесцентной микроскопией
(10%-ный раствор охлажденного формалина; замороженные срезы).

Люминесцентным анализом локализации витамина А изучено содержание в норме и патологии во многих тканях, особенно в сетчатке глаза, и роль его в зрительном процессе.

Принцип выявления. Витамин обладает первичной (собственной) люминесценцией при ультрафиолетовом освещении (365 нм).

Постановка реакции.

1. Приготовить замороженные срезы.
2. Промыть в дистиллированной воде.
3. Поместить на предметные стекла.
4. На каждый срез нанести несколько капель дистиллированной воды и покрыть покровным стеклом, окантовать парафином и исследовать в течение 3 ч.

Результат. Возникает ярко-зеленая люминесценция, которая быстро затухает (10–60 сек). Много витамина в гепатоцитах, меньше – коре надпочечников, клетках желтого тела, клетках Купфера.

§ 2. Витамин В₁ (тиамин, антиневрин)

Авитаминоз приводит к заболеванию бери-бери у человека или к полиневриту у кур, лошадей, свиней, кроликов. Наступают параличи и парезы, расстройства сердечно-сосудистой системы,

желудочно-кишечного тракта, возникают отеки, возрастает содержание пировиноградной кислоты в нервной системе, крови, моче. Витамин участвует в белковом, липидном и углеводном обмене, является коферментом многих ферментов, в частности карбоксилазы, дегидрогеназ и т. д.

Определение витамина B_1 люминесцентной микроскопией (Нефиксированный материал; замороженные срезы).

Принцип выявления. Гистохимическое определение витамина основано на его преобразовании под влиянием окислителя в тиохром.

Реактивы. 5%-ный раствор $K_2[Fe(CN)_6]$ на 0,1н. растворе NaOH.

Постановка р е а к ц и и.

1. Срезы готовить из свежей ткани на замораживающем микротоме.
2. Промыть в дистиллированной воде.
3. Поместить на предметные стекла.
4. Несколько минут обработать раствором гексациано-(III) феррата калия.
5. Покрывать покровными стеклами.
6. Исследовать.

Результат. Голубоватая окраска возникает в результате спонтанного окисления тиамин.

§ 3. Витамин B_2 (рибофлавин, лактофлавин, овофлавин)

При авитаминозе приостанавливается рост животных, выпадают волосы у человека и шерсть у животных, поражаются слизистые возникают судороги, себоррейные дерматиты, конъюнктивиты, кератиты, катаракта, полупарез, перерождаются нервные клетки. Фосфорные эфиры витамина входят в состав многих ферментов класса оксидоредуктаз. Витамин B_2 — основа простетической группы желтого дыхательного фермента, диафоразы, цитохромоксидазы, оксидаз, цитохромредуктазы.

Выявление рибофлавина по Шевремону и Комара

(10%-ный раствор формалина; замороженные срезы).

Принцип выявления. Метод основан на способности рибофлавина восстанавливаться до лейкофлавина. Лейкофлавин окисляется на воздухе до родофлавина.

Реактивы. 1. Восстанавливающий раствор (цинковую пыль растворить в 1–2%-ном растворе HCl. Раствор сразу же использовать).

Постановка реакции.

1. Приготовить срезы.
2. Промыть в дистиллированной воде.
3. Поместить в раствор восстановителя на 30 мин.
4. Промыть в дистиллированной воде.
5. Оставить в чашке Петри с водой для окисления кислородом воздуха.
6. ЗаклЮчить в глицерин – желатину.

Результат. Локализация витамина определяется по красному цвету. Выявление витамина B₂ люминесцентной микроскопией.

(Свежая ткань; замороженные срезы)

Метод позаимствован из биохимического анализа, в котором определяется ФАД, общее количество флавинов и свободный рибофлавин с помощью флуорометра.

Принцип выявления. Рибофлавин обладает собственной люминесценцией, так как его молекула представляет систему конденсированных ядер с сопряженными связями. Полоса флуоресценции его нейтральных растворов размещена в области 515 – (>13 нм с максимумом 535 нм.

Постановка реакции.

1. Приготовить замороженные срезы.
2. Промыть в дистиллированной воде.
3. Поместить на предметные стекла (не допускать посторонних примесей!).

4. Покрывать покровными стеклами, окантовать парафином и сразу же исследовать под люминесцентным микроскопом.

Результат. В местах размещения витамина возникает желто-зеленая люминесценция с замедленным (по сравнению с витамином А) затуханием.

§ 4. Витамин С (аскорбиновая кислота)

Недостаток или отсутствие в пище витамина С у человека или некоторых животных (обезьян, морских свинок и др.) вызывает заболевание цингой. При начальных формах авитаминоза падает вес, наступает быстрая утомляемость, общая слабость, головокружение. В дальнейшем развиваются кровотечения в различных органах и тканях, кровоточивость десен, кариес, расшатывание и выпадение зубов, могут быть переломы костей, понижается сопротивляемость к инфекционным болезням. Аскорбиновая кислота и ее дегидроформа представляет собой окислительно-восстановительную систему, способную как отдавать, так и принимать электроны и протоны.

Химизм действия витамина С на организм полностью не изучен: участвует в белковом, липидном и углеводном обмене, окислительно-восстановительных процессах, образовании коллагена и дентина, активирует действие аргиназы, внутриклеточных протеаз, амилазы, участвует в гидроксилировании и окислении гормонов коры надпочечников, синтезе ДНК, предохраняет, по-видимому, от окисления SH-группы белков, в том числе тиоловых ферментов, служит активной группой фермента, ускоряющего гидролиз отдельных тиогликозидов.

Выявление витамина С по Барнетту и Бурну

(Уксусная кислота – сероводород; замороженные срезы).

Фиксация. Кусочки тканей (2–3 мм), только что взятые от убитого животного или полученные при биопсии, поместить на 5 мин в пары уксусной кислоты, потом на 15 мин в пары сероводорода. Пары удалить в умеренном вакууме.

Принцип выявления. Метод основан на способности витамина восстанавливать кислый раствор нитрата серебра (без одно-

временного действия света или тепла). Эта реакция осуществляется восстановленной формой аскорбиновой кислоты. Окисленная форма витамина переводится в восстановленную (см. выше), которая и взаимодействует с ляписом. Детально химизм реакции не изучен.

Реактивы. 1. Кислый раствор нитрата серебра; к 100 мл 5%-ного водного раствора AgNO_3 добавить 5 мл ледяной уксусной кислоты.

2. Раствор аммиака: 5%-ный раствор гидроксида аммония.

Постановка реакции.

1. Приготовить срезы.
2. Поместить в раствор нитрата серебра на 5–10 мин.
3. Перенести в раствор аммиака на 10–15 мин.
4. Промыть в дистиллированной воде;
5. Заключить в глицерин.

Результат. Локализация витамина определяется по черным зернам серебра. Витамин содержится в митохондриях, комплексе Гольджи и др.

Выявление витамина С по Кисели

(Свежая ткань; замороженные срезы).

Принцип выявления. Основан на наблюдениях Сент-Дьердьи, который установил, что витамин С восстанавливает нитрат серебра.

Реактивы. 1. 5–10%-ный раствор нитрата серебра на 5%-ном растворе ледяной уксусной кислоты.

2. 0,5–1%-ный раствор уксусной кислоты.

Постановка реакции.

1. Кусочек материала положить в раствор серебра на 1–3 ч.
2. Промыть в дистиллированной воде или в растворе уксусной кислоты 20–40 мин.
3. Обезвожить в ряду спиртов, просветлить в ксилоле и залить в парафин.

4. Приготовить парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм, удалить парафин, просветлить в ксилоле, заключить в бальзам или подходящую синтетическую среду.

Результат. Локализация витамина определяется по зернам серебра.

Примечание. Если нужно, срезы можно окрасить раствором гематоксилин-эозина. Контрольный материал перед тем, как покласть в раствор нитрата серебра, поместить в раствор уксусной кислоты.

Выявление витамина С в модификации Чайно

(Свежая ткань; замороженные срезы).

Принцип выявления. Такой же, как у двух предыдущих методов.

Реактивы. 1. Кислый раствор AgNO_3 : 5 г химически чистого нитрата серебра растворить в смеси, состоящей из 34 мл дистиллированной воды и 60 мл дважды перегнанного абсолютного этанола, добавить 5 мл ледяной уксусной кислоты.

2. Спиртовый раствор аммиака: 5 мл водного раствора гидроксида аммония прибавить к 95 мл 70%-ного этанола.

Постановка реакции.

1. Кусочки свежего материала (2X2X2 мм) поместить в раствор нитрата серебра на 24 ч при 0–3°C в темноте (рН = 2,0–2,5).
2. Промыть 2–3 раза в спиртовом растворе аммиака 10–15 мин.
3. Провести через ряд спиртов с возрастающей концентрацией.
4. Просветлить в ксилоле.
5. Залить в парафин.
6. Приготовить срезы толщиной 5 мкм и депарафинировать.
7. При необходимости докрасить гематоксилин – эозином или другими красителями.
8. Обезводить, просветлить и заключить в бальзам или другую среду.

Результат. Места локализации витамина С выявляются по черной окраске. Метод обладает высокой специфичностью.

IX. ГОРМОНЫ

Гормоны (от лат. *hormao* – возбуждаю) – продукты деятельности желез внутренней секреции. Они вырабатываются в секреторном эпителии желез и выделяются непосредственно в кровь, лимфу, некоторые (гормоны гипофиза) – в цереброспинальную жидкость. Гормоны обладают высокой биологической и физиологической активностью, причем в дозах, выражаемых в тысячных долях миллиграмма. Одни из них относятся к белкам (гормон передней доли гипофиза, инсулин), другие – к октапептидам (гормоны задней доли гипофиза), третьи – к стероидам (половые гормоны, гормоны коры надпочечников), четвертые – производные отдельных аминокислот (гормоны щитовидной железы), пятые – фенолы (адреналин).

Гормоны не характеризуются видовой специфичностью. Так, гормон, полученный из железы внутренней секреции любого позвоночного, обладает аналогичным физиологическим действием. Для многих гормонов расшифровано строение молекул. Часть гормонов получена в чистом виде (тестостерон, фолликулин), некоторые — с помощью органического синтеза (инсулин, окситоцин, вазопресгин, адреналин), отдельные гормоны еще не выделены (вилочковой железы). Изучение гормонов связано с именами Т. Аддисона (1855), К. Бернара (1855), Ш. Броун-Секера (1890), В. Бейлиса и Старлинга (1902) и др.

В медицине и ветеринарии встречаются гормональные нарушения – гипо- и гиперфункции желез внутренней секреции: базедова болезнь, микседема, кретинизм, диабет, болезнь Аддисона и др. Гормоны оказывают разностороннее воздействие на реакции обмена нуклеиновых кислот, белков, липидов, углеводов и минеральных соединений. Гормоны находятся как в свободном, так и связанном состояниях.

Наиболее приемлема классификация гормонов по органам, где они синтезируются: половые (самца и самки), гормоны коры и мозгового слоя надпочечников, щитовидной, паращитовидной, поджелудочной и зубной желез, гипофиза (передней, средней и задней долей), эпифиза, производные азотистых оснований. Не-

которые гормоны используют в медицинской и ветеринарной практике (инсулин, окситоцин, вазопрессин, фолликулин, эстрон, эстриол, эстрадиол и др.). Существуют гистохимические методы выявления локализации гормонов.

§ 1. Гормоны коркового слоя надпочечников

Известно свыше 50 стероидов, полученных из коры надпочечников, из которых 24 обладают гормональной активностью. Различают пять групп: глюкокортикоиды, минералокортикоиды, андрокортикостероиды, эстрогены и тестогены. Гормоны первой группы участвуют в регуляции углеводного и белкового обмена: кортизон, кортикостерон, гидрокортизон. Минералокортикоиды осуществляют регуляцию минерального и водного обменов: альдостерон, 11-дезоксикортикостерон. С деятельностью гормонов третьей группы связано возникновение вторичных половых признаков, синтез белков, рост тела: андростендион, 11-оксиандростендион и дегидроэпиандростерон. Эстрогены здесь вырабатываются в небольших количествах и участвуют в возникновении вторичных половых признаков у женских индивидуумов. Гормоны этой группы представлены прогестероном, оказывающим сильное действие на половой аппарат самки.

Фенилгидразиновая реакция на выявление кортикоидов (Жидкость Бэкера; замороженные срезы).

Принцип выявления. Выявление кортикоидов основано на реакции их альдегидо- и кетогрупп с гидразинами. Образуются окрашенные продукты реакции – гидразоны.

Реактивы: 1. Раствор гидразина: 5 г фенилгидразина, 10 мл ледяной уксусной кислоты, 40 мл дистиллированной воды.

Постановка реакции.

1. Срезы промыть в воде 2–3 ч.
2. Поместить в раствор фенилгидразина на 3–4 ч.
3. Сполоснуть в дистиллированной воде. 4. ЗаклЮчить в глицерин – желатину.

Результат. В местах локализации кортикоидов возникает желтая окраска. Желательно применять синий или зеленый фильтры.

Примечание. Можно применять насыщенный раствор 2,4-динитрофенилгидразина в 1 н. растворе HCl. В методе, начиная со второго пункта, постановку реакции проводят так:

2) срезы поместить и на 24 ч в раствор динитрофенилгидразина при температуре 0–4°C;

3) сполоснуть в 1 н. растворе HCl;

4) сполоснуть в дистиллированной воде;

5) заключить в глицерин – желатину. В местах размещения кортикоидов возникает яркая желтовато-оранжевая окраска.

Выявление а-кетогрупп кортикоидов по Канолкару

(Свежие ткани; срезы, приготовленные в криостате и на замораживающем микротоме)

Принцип выявления. Многие кортикоиды коры надпочечников – кортизон, гидрокортизон, кортикостерон, 11-дезоксикортикостерон, альдостерон – являются а-кетоспиртами. На первом этапе под влиянием хлорида железа а-кетоспирты окисляются до кетоальдегидов.

В дальнейшем срезы обрабатывают реактивом Шиффа. Перед проведением реакции альдегиды тканей блокируют смесью Лилли, что обеспечивает специфичность метода.

Реактивы. 1. Смесью Лилли: 9 мл анилина, 8 мл концентрированной HCl, смешать, встряхивая, добавить 100 мл дистиллированной воды. 2. 5% -ный раствор FeCl₃. 3. Реактив Шиффа. 4. Дисульфидная вода: смешать 5 мл 10%-ного раствора K₂S₂O₅ и 5 мл 1 н. раствора HCl в 100 мл дистиллированной воды.

Постановка реакции.

1. Срезы погрузить в смесь Лилли на 20 мин.
2. Промыть в дистиллированной воде 1–3 мин.
3. Перенести в раствор хлорида железа на 30 мин при 50°C.
4. Промыть в дистиллированной воде.
5. Поместить в реактив Шиффа на 20 мин.

6. Промыть в трех порциях дисульфидной воды (по 2 мин в каждой).

7. Заключить в глицерин – желатину.

Результат. Выявляются две группы гормонов коры надпочечников – глюкокортикоиды и минералокортикоиды. Они определяются по красной окраске. Андрогены, экстрогены и прегнандиол не выявляются.

§ 2. Гормоны мозгового слоя надпочечников

Хромаффинная ткань мозгового слоя надпочечников возникает в эмбриогенезе из клеток боковых частей пояснично-крестцового участка нервной трубки. Часть мигрирующих пронейробластов в ходе дифференциации становится симпатикобластами и дает основу симпатическим узлам, часть – превращается в хромаффинобласты, которые мигрируют к интерренальному телу и дают начало мозговому слою надпочечников. Клетки вырабатывают два гормона – адреналин и норадреналин, которые синтезируются из фенилаланина и тирозина. Такие же вещества выделяются симпатическими нейронами, выполняя функции медиаторов возбуждения.

Гормоны способствуют усилению сердечной деятельности, расширению сосудов сердца, зрачка, усилению гликогенолиза, активизации окислительных процессов и газового обмена. Хромаффинная ткань поражается при аддисоновой болезни, туберкулезе, сифилисе некоторых опухолях (хромаффиноме, феохромоцитоме, параганглиоме, ганглионевроме, симпатогониоме). Гормоны встречаются в свободном, и связанном (с белками) состояниях. Многие реакции, с помощью которых выделяются и выявляются гормоны, основаны на способности последних энергично восстанавливать оксиды хрома, серебра, осмия и др.

Хромаффинная реакция на адреналин и норадреналин по Хилларпу и Хёкфельту (Свежая нефиксированная ткань, замороженные срезы).

После фиксации мозгового вещества надпочечников в дихромате калия или хромовой кислоте во многих клетках возникает темно коричневое окрашивание. Такие клетки стали называть феохромыми, а ткань, способную восстанавливать оксиды хрома, – хромаффинной.

Принцип выявления. Хромаффинность возникает в результате наличия в тканях веществ типа ароматических фотопроявителей – гормонов адреналина и норадреналина, которые под влиянием умеренных окислителей постепенно превращаются в конечные окрашенные продукты реакции типа хингидрона.

Реактивы. Хромовая смесь: смешать 10 объемов 5%-ного раствора $K_2Cr_2O_7$ и 1 объем 5%-ного раствора K_2CrO_4 (pH = 5,6).

Постановка реакции.

1. Срезы поместить в хромовую смесь на 10 ч.
2. Перенести в дистиллированную воду на 30 – 60 мин, воду трижды сменить.
3. ЗаклЮчить в глицерин – желатину (если необходимо, обезвожить в спиртах, просветлить в ксилоле, заклЮчить в бальзам).

Результат. Хромаффинное вещество окрашивается от темно-коричневого до желтоватого цвета. Клетки, содержащие адреналин, приобретают темно-коричневую, норадреналин – желтоватую и желтовато-коричневую окраски.

Выявление норадреналина по Хилларну и Хёкфельту (Свежие ткани; замороженные срезы).

Авторы метода установили, что после окисления KO_4 (pH = 5–6) норадреналин через несколько минут превращается в темный пигмент, адреналин – через сутки. Возможна интрацеллюлярная диффузия норадреналина. Метод можно применять совместно с предыдущим, так как он поможет отдифференцировать локализацию норадреналина и адреналина.

Принцип выявления. Реакция протекает в несколько этапов (окисления адреналина).

Реактивы. 1. 10%-ный раствор KIO_4 . 2. 10%-ный раствор формалина.

Постановка реакции.

1. Ткани поместить в раствор периодата калия на 16 ч.
2. Перенести в раствор формалина на 2 ч.
3. Из кусочков материала (0,5 мм) приготовить срезы толщиной 10–20 мкм.
4. Промыть в дистиллированной воде.
5. Если необходимо, докрасить ядра.
6. Наклеить на предметные стекла.
7. Обезводить в спиртах.
8. Просветлить в ксилоле.
9. Заключить в канадский бальзам.

Результат. Клетки, содержащие норадреналин, окрашены в коричневый цвет. Медиатор выявляется в хромаффинных клетках параганглиев брюшной полости, энтерохромаффинных клетках желудка и т. д. Адреналин выявляется через 20–24 ч.

§ 3. Гормоны гипофиза

Железа внутренней секреции, выполняющая ведущую роль в гормональной регуляции обмена веществ в организме человека и животных. Имеет небольшие размеры и вес (у человека 0,5 – 0,6 г). Состоит из трех долей, различных по происхождению, строению и функциям: -передней (железистой), -средней (промежуточной) и -задней (нервной). В передней доле вырабатывается 7 гормонов: гормон роста, или соматотропный гормон, фолликулостимулирующий гормон, лютеинизирующий гормон, лютеотропный гормон, лактогенный гормон, или пролактин, тиреотропный гормон и адренокортикотропный гормон, или сокращенно АКТГ. В средней доле синтезируется гормон интермедии – меланоцитостимулирующий гормон, принимающий участие в регуляции пигментного обмена. В задней доле вырабатываются гормоны, с деятельностью которых связано сокращение мускулатуры матки (ок-

ситоцин) и регуляция кровяного давления (вазопрессин). По химической природе гормоны передней доли гипофиза – белки, средней и задней долей – полипептиды. Дю Виньо в 1956 г. получил синтетическим путем вазопрессина и окситоцин.

В клинике встречаются патологические нарушения деятельности гипофиза и его отдельных долей. В частности, повышение или понижение интенсивности синтеза гормонов. Например, повышенное выделение соматотропина клетками передней доли в раннем онтогенезе приводит к гигантизму, у взрослого организма – к акромегалии, то есть неравномерному развитию отдельных частей тела.

Метод Ландинга и Холла для выявления клеток передней доли гипофиза (10%-ный раствор нейтрального формалина; парафиновые срезы).

В передней доле гипофиза имеется по крайней мере пять типов клеток, различных по форме, величине, способности окрашиваться химической организацией. Предполагают, что каждый тип клеток вырабатывает свой гормон. Лучше других изучены три типа железистых клеток: хромофобные (их считают резервными, камбиальными, они составляют 50–60% всех клеток), ацидофильные (эозинофильные, или оксифильные, составляют 30–35% всех клеток) и базофильные (цианофильные, составляют 4–10% всех клеток). Гормон роста и пролактин синтезируются в ацидофильных клетках. Тиреотропный и гонадотропный гормоны образуются в базофильных клетках, которые разделяют на два вида – тиреотропы и гонадотропы. Вопрос о клетках, в которых синтезируется АКТГ, пока еще не решен.

Принцип выявления. Химизм цитохимических реакций клеток гипофиза не расшифрован. Здесь имеют место как физические, так и химические процессы. По всей вероятности, в начале постановки реакции на первое место выдвигаются явления адсорбции клетками гипофиза прочного синего В, а в дальнейшем происходит реакция диазосочетания под влиянием Н-кислоты.

Дифференциации окраски способствует обработка срезов остальными реагентами, особенно сульфитом-лейкотионином.

Реактивы. 1. Веронал-ацетатный буферный раствор ($\text{pH} = 9,2$). 2. 0,1 %-ный раствор прочного синего В в этом же буферном растворе. 3. Раствор Н-кислоты (2%-ный в буферном растворе). 4. 1%-ный раствор иодата натрия в 0,5%-ной азотной кислоте. 5. Раствор сульфита-лейкотионина по ван Дейну: -растворить 0,5 г тионина в 250 мл дистиллированной воды, -кипятить 5 мин, -охладить, -довести объем до прежнего уровня, -добавить 250 мл третбуганола (т. пл. 25°C), -перенести в сосуд с пробкой, -встряхивать, -оставить на 24 ч (при 25°C) и после этого на 48 ч (при 4°C); может сохраняться 1,5 месяца.

Постановка реакции.

1. Срезы (мазки, мазки-отпечатки) довести до воды.
2. Сполоснуть веронал-ацетатным буферным раствором.
3. Поместить в раствор прочного синего В на 15 мин при 0°C .
4. Промыть в буферном растворе.
5. Провести реакцию азосочетания: поместить срезы в раствор Н-кислоты на 15–30 сек.
6. Промыть в проточной воде 2 мин.
7. Обработать раствором иодата натрия 10 мин при $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$.
8. Промыть в проточной воде 5 мин.
9. Перенести в сульфит-лейкотионин на 2 ч.
10. Обезводить в спиртах.
11. Просветлить в ксилоле.
12. Заключить в полистирол.

Результат. Базофильные клетки окрашиваются в синий цвет, ацидофильные – коричневый, хромофобные остаются бесцветными. Синее окрашивание связано с наличием в клетках ШИК-положительных веществ. Коричневая окраска возникает в результате реакции диазосочетания реактивов с белками, богатыми тиро-зином.

Х. МИНЕРАЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА

Минеральными веществами тканей и клеток являются вода, соли, кислоты, основания. Вода составляет 65,9% веса позвоночного животного (белки – 16,8%, липидные соединения – 10,5%, углеводы – 1,2%, минеральные соли, основания и кислоты – 5,6%). Вода – универсальный растворитель. 94 – 95% воды находится в свободном, 5–6% – связанном (главным образом с белками) состоянии.

Элементы, входящие в состав минеральных веществ, можно разделить на три группы – макро-, микро- и ультрамикроэлементы. К первой группе относятся такие элементы, которые содержатся в тканях до нескольких сот и тысяч мг %. Это натрий, калий, кальций, магний, фосфор, хлор, железо, сера. Содержание элементов второй и третьей группы не превышает тысячных и даже миллионных долей мг%. К микроэлементам относятся медь, иод, кобальт, цинк, марганец, молибден, фтор и некоторые другие. Ультрамикроэлементы в тканях содержатся в ничтожно малых количествах: от $1 \cdot 10^5$ до $1 \cdot 10^{12}$ мг%. Это уран, радий, торий, цезий и др.

Содержание отдельных минеральных веществ в тканях и клетках определяется многими факторами – их ролью в обмене веществ в живом организме, видом, возрастом, физиологическим состоянием и даже географической зоной обитания животного. В организме есть «депо» отдельных минеральных веществ. Так, кальций и магний откладываются в виде солей в костях, калий и натрий концентрируются в мышечной ткани, коже и т.д. С наличием минеральных веществ связаны многие жизненно важные явления: – кислотно-щелочное равновесие, -осмос, -реакция среды, -прочность и проницаемость мембран, -активация и парализация ферментативных реакций и др. Недостаток этих веществ в пище человека и рационе животных приводит к ряду заболеваний – остеомалации, остеопорозу (при недостатке кальция), гипомagneзии (при недостатке магния), эндемическому зобу (при недостатке иода) и др.

Различные по происхождению и значению клетки отличаются составом минеральных веществ. Общим для всех клеток является то, что для их нормальной деятельности необходимы катионы K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} и анионы HPO_4^{2-} , $H_2PO_4^-$, Cl^- и HCO_3^- . Содержание

в клетке и в окружающей ее среде ионов, определенной концентрации имеет решающее значение для нормального функционирования клетки. Установлено, что ионы натрия и хлора локализованы главным образом вне клетки, а ионы калия и магния сконцентрированы внутри клетки. В некоторых клетках (например, в нейронах) функционирует так называемый натрий – калиевый насос, с помощью которого эктоплазма «перекачивает» ионы натрия из клетки в окружающую среду, предохраняя клетку от явления цитоллиза. По-видимому, в различных клетках существуют и другие такие – «насосы», обеспечивающие полноценное протекание реакций метаболизма на клеточном уровне. Активный перенос веществ через мембраны дает возможность клеткам щитовидной железы накапливать в 100 раз больше иода, чем в окружающей среде. Многие ионы участвуют в построении молекул нуклеиновых кислот, белков, витаминов, гормонов, образуя комплексные и обычные соединения.

§ 1. Выявление кальция

В организме человека и животных 99% кальция сосредоточено в костях и зубах, 1 % – в составе крови и других тканей в виде ионов и комплексных соединений с белками. Кальций откладывается в костях в виде апатитов, фосфатов, карбонатов и фторидов.

Метод Пирса

(10%-ный раствор формалина, жидкость Карнуа, смесь Бэкера; парафиновые срезы).

Принцип выявления. Под влиянием серной кислоты в тканях образуется сульфат кальция.

В дальнейшем возникают кристаллогидраты сульфата кальция.

Реактивы. 1 % -ный раствор серной кислоты.

Постановка реакции.

1. Срезы депарафинировать и довести до ацетона.
2. Высушить на открытом воздухе.

3. Нанести несколько капель серной кислоты.
4. Изучить под микроскопом.

Результат. Кристаллогидрат сульфата кальция выявляется вначале в виде тонких игл, затем призм и, наконец, пластинок.

Метод Косса

(10%-ный раствор нейтрального формалина; замороженные срезы).

Метод рекомендуется применять для выявления связанного кальция, в частности его фосфатов, карбонатов и мыл.

Принцип выявления. Реакция протекает в несколько стадий.

Локализация кальция определяется по выпадению черных осадков Ag_2S .

Реактивы. 1. 5%-ный раствор нитрата серебра. 2. 5%-ный раствор тиосульфата натрия. 3. 0,5–1%-ный раствор сафранина.

Постановка реакции.

1. Промыть срезы в нескольких порциях дистиллированной воды.
2. Поместить в раствор AgNO_3 на 10–60 мин, желательно при ярком дневном свете.
3. Тщательно промыть в воде.
4. Перенести в раствор тиосульфата на 2–3 мин.
5. Промыть в воде.
6. Окрасить сафранином 20–30 сек.
7. Дифференцировать в 95–100%-ном этаноле.
8. Обезводить в спиртах, просветлить в ксилолах и заключить в синтетическую среду или бальзам.

Результат. В местах размещения кальция появляются черные осадки серебра, ядра окрашены в красный, остальные структуры – розовый цвет.

Примечание. Меланин способен восстанавливать серебро, что необходимо учитывать при оценке результатов.

§ 2. Выявление магния

Магний содержится в тех же тканях, что и кальций, в виде фосфатов, карбонатов и фторидов. Кости содержат 1,5% фосфата магния. Его содержание уменьшается при паратироидальной тетрании, эпилепсии, некоторых злокачественных опухолях. Если межклеточная жидкость содержит ионы калия и хлора, то магний локализован в клетках. Ионы магния выявляются в комплексах миозина и АТФ, они активируют фосфатазы, енолазу, пептидазы, карбооксидазы, лецитиназы. Магний входит в состав хлорофилла, участвует в мышечном сокращении. Обмен магния регулируется паратормоном.

Метод Пирса

(Свежая ткань, 10%-ный раствор нейтрального формалина, жидкость Карнуа; замороженные и парафиновые срезы).

Принцип выявления. Выявление магния, по мнению автора метода, основано на сродстве его солей к 4-п-нитробензолазо-1-нафтолу и к некоторым другим красителям. Краситель адсорбируется солями, не изменяя своего красного цвета. Молекула красителя представляет собой азосоединение нафтола и нитробензола.

Добавление к окрашенным срезам щелочи способствует появлению ярко-синей окраски. Химизм процесса не изучен.

Реактивы. 1. 1%-ный раствор 4-п-нитробензолазо-1-нафтола на 5%-ном растворе NaOH (pH = 12,2). 2. Разбавленный раствор NaOH.

Постановка реакции.

1. Парафиновые срезы довести до воды.
2. Поместить срезы в раствор красителя на 30 мин.
3. Промыть разбавленным раствором щелочи.
4. Обезводить в спиртах.
5. Просветлить в ксилоле.
6. ЗаклЮчить в синтетическую среду.

Результат. Места размещения магния окрашены в ярко-синий цвет.

§ 3. Выявление железа

Железо содержится во всех тканях и клетках организма. 60% железа сосредоточено в гемоглобине, 9% – миоглобине, 0,1% – в цитохромах, 0,1% – каталазе, 0,1% – трансферринах, 16% – ферритине и гемосидерине, остальное – в других соединениях. Железо выполняет ряд функций, основными из них являются две, связанные эволюционно: участвует в переносе электронов при окислительно-восстановительных реакциях и осуществляет перенос кислорода от легких к тканям. Накапливается в костном мозге, печени и других органах. Уменьшение количества железа в сыворотке крови называют гипосидеремией, увеличение – гиперсидеремией. Первое явление наблюдается при блокаде инфекционными, инвазионными или токсическими агентами ретикуло-эндотелиальной системы, второе – при гемолитической желтухе, отравлениях некоторыми ядами, парниозиноподобной анемии и др. Иногда в организме откладывается эндогенное железо (у шахтеров, электросварщиков) в виде Fe_2O_3 .

Метод Перлса

(Свежая ткань, замороженные срезы; 10%-ный раствор формалина – парафиновые срезы).

Принцип выявления. Химизм метода изучен мало. Можно предположить, что вначале под влиянием HCl разрушаются соединения железа в тканях и образуются соединения типа хлорида железа.

Потом в результате взаимодействия ионов Fe^{3+} с гексациано-(II) ферратом калия или натрия в кислом растворе образуется берлинская лазурь, по осадкам которой выявляется локализация железа.

Реактивы: 1.2%-ный раствор HCl . 2.2%-ный раствор $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. 3. 1%-ный водный раствор нейтрального красного или квасцового кармина.

Постановка реакции.

1. Парафиновые срезы довести до воды.

2. Перенести в смесь, состоящую из равных объемов HCl и гексациано-(II) феррата калия на 30–60 мин.
3. Промыть в дистиллированной воде 5–10 мин.
4. Докрасить ядра 3–5 мин.
5. Сполоснуть в дистиллированной воде.
6. Провести через ряд спиртов, просветлить в карбол-ксилоле, ксилоле и заключить в бальзам или синтетическую среду.

Результат. Места размещения железа окрашены в темно-синий цвет, ядра – в красный.

Примечание. Вода не должна содержать ионы Fe^{3+} . Иголки для работы должны быть стеклянные.

§ 4. Выявление меди

Обмен меди в организме тесно связан с обменом железа. Медь стимулирует синтез гема, активирует деятельность гонадотропных гормонов гипофиза, содержится в некоторых оксидазах. Много меди содержится в печени (до 4 мг% на сухой вес), мозжечке (2,28 мг%), головном мозге (1,81 мг%). В печени плода больше меди, чем у взрослой особи. Она сосредоточена главным образом в купферовых клетках. Медь принимает участие в синтезе пигментов, ЦХО, цитохромов, каталазы. Наблюдаются нарушения обмена меди – гиперкупренемия и гипокупренемия.

Выявление меди с использованием бензидина

(10%-ный раствор формалина; парафиновые срезы).

Принцип выявления. Метод основан на способности бензидина в присутствии ионов Cu^{2+} окисляться в бензидиновый синий. Ионы одновалентной меди взаимодействуют с анионами, которые содержатся в тканях и клетках. В дальнейшем образуются нерастворимые цианиды.

Реактивы. 1. Рабочий раствор: в 5 мл дистиллированной воды растворить 10 мг солянокислого бензидина и 30 мг тиоцианата аммония. 2. 1%-ный водный раствор нейтрального красного.

Постановка реакции.

1. Довести срезы до воды.
2. Перенести в рабочий раствор на 5–10 мин.
3. Сполоснуть в воде.
4. Докрасить нейтральным красным 15 мин.
5. Сполоснуть в воде.
6. Обезводить в спиртах, просветлить в ксилоле, заключить в канадский бальзам.

Результат. Локализация меди определяется по синим осадкам.

Примечание. Бензидин лучше заменить о-толуидином.

§ 5. Выявление цинка

Цинк — микроэлемент. Выявляется во всех тканях человека и животных. Его содержание в 5–6 раз выше, чем меди. Много цинка в гипофизе (113 мг%), половых железах (49,1 мг%), костях (31 мг%), печени (3,5–8,3 жг%), поджелудочной железе (4 мг%). Цинк стимулирует деятельность фолликулина, тестостерона, гормонов гипофиза, его можно выявить в составе карбоангидразы и уреазы, активизирует деятельность многих ферментов (например, фосфатаз). Главным депо цинка служит печень, ткани поджелудочной железы и глаза. Содержание цинка увеличивается в эритроцитах при аноксии и асфиксии, уменьшается — при многих опухолях, полиартритах, нефритах, желтухе, злокачественном малокровии.

Метод Менделя и Бредли

(Свежая ткань или 10%-ный раствор формалина; замороженные срезы; парафиновые срезы).

Принцип выявления. Механизм реакции изучен недостаточно.

Реактивы. 1. 10%-ный раствор нитропруссиды натрия.

2. 1–5%-ный раствор сульфита калия.

Постановка реакции.

1. Парафиновые срезы довести до воды.
2. Поместить в раствор нитропруссиды натрия на 15–20 мин при 50°C.

3. Промыть в проточной воде 15 мин.
4. Покрывать покровным стеклом и под него ввести капли раствора сульфита калия.

Результат. Локализация цинка определяется по осадкам красного цвета.

§ 6. Выявление кобальта

Кобальт – важнейший микроэлемент. Много кобальта содержится в гипофизе, тимусе, надпочечниках, яичниках, щитовидной железе, легких и печени (20–160 мкг на 100 г свежей ткани). Входит в состав витамина В12 (4,5%), участвует в синтезе инсулина, кроветворении, синтезе нуклеиновых кислот. При аcobальтозах снижается интенсивность окислительно-восстановительных процессов, затухает белковый синтез, возникает злокачественная анемия, теряется вес, нарушается половой цикл, наступает истощение и смерть.

Метод с использованием версена по Лилли

(10%-ный раствор формалина, свежая ткань; замороженная ткань).

Принцип выявления. Обнаружение локализации микроэлемента основано на его способности образовывать комплексное соединение с версеном, или трилоном В.

Реактивы: 1. Раствор версена или трилона В – 10%-ный в 1%-ном растворе Na_2CO_3 . 2. 1%-ный раствор пероксида водорода.

Постановка реакции.

1. Если срезы материала фиксированы в формалине, их следует промыть в дистиллированной воде.
2. Нанести раствор версена.
3. Добавить несколько капель пероксида водорода.
4. Накрывать покровным стеклом и исследовать.

Результат. Голубое или фиолетовое окрашивание свидетельствует о наличии и локализации в тканях кобальта.

§ 7. Выявление стронция

Большую опасность для организма представляет радиоактивный стронций, так как он может накапливаться в костной ткани, оказывая кумулятивное действие на органы, ткани и клетки. Его количество определяется дозой, поступившей в организм, путем проникновения в ткани, возрастом, полом и видом животного. Много стронция откладывается в зонах активного роста костей. Небольшое количество стронция (0,001—0,1 мг на 1 кг ткани) является нормальной составной частью организма. Участвует в ossификации костей. Антагонист магния.

Метод Уотерхаузена

(10%-ный спиртовой раствор нейтрального формалина; замороженные и парафиновые срезы).

Принцип выявления. Метод основан на способности солей стронция (они возникают при действии на ткани хромовой смеси) образовывать хелаты с родизонатом натрия.

Реактивы. 1. 0,2%-ный водный раствор родизоната натрия. 2. 3%-ный раствор дихромата натрия или калия. 3. 10%-ный раствор нейтрального формалина на 70%-ном этаноле. 4. Фосфатный буферный раствор ($\text{pH} = 7$).

Постановка реакции.

1. Срезы довести до воды.
2. Поместить в раствор дихромата на несколько минут.
3. Перенести в раствор родизоната натрия (замороженные срезы — при 37°C , парафиновые — при 60°C), время инкубации — 1–2 ч.
4. Быстро промыть в дистиллированной воде или фосфатном буферном растворе.
5. Обезводить в спиртах, просветлить в ксилоле и заключить в бальзам или синтетическую среду.

Результат. Стронций обнаруживается по осадкам ярко-красного цвета.

Литература

1. Аксенова, Н.П. К морфогистохимической характеристике эпителиальных клеток щитовидной железы человека в возрастном аспекте / Н.П. Аксенова // Научные труды Омского медицинского института. – Омск, 1978. – С. 109–111.
2. Артишевский, А.А. Гистология с техникой гистологических исследований / А.А. Артишевский, А.С. Леонтьук, Б.А. Слука. – Минск: Вышэйшая школа, 1999. – 236 с.
3. Атагимов, М.З. Гистохимические параллели в развитии аденогипофиза и щитовидной железы в предплодном периоде крупного рогатого скота / М.З. Атагимов, В.И. Соколов // Материалы научной конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов Санкт-Петербургской государственной академии ветеринарной медицины. – СПб., 2002. – С. 13–14.
4. Жаков, М.С. Окраска мазков крови и костномозговых пунктатов по методу Браше / М.С. Жаков, И.М. Карпуть // Лабораторное дело. – 1967. – № 1. – С. 52–54.
5. Заостровцева, Н.А. Сравнительное гистологическое и гистохимическое исследование зачатков фетальной и дефинитивной коры в надпочечнике свиньи : автореф. дис. ... канд. биол. наук / Н.А. Заостровцева. – Л., 1969. – 14 с.
6. Кононский, А.И. Гистохимия / А.И. Кононский. – Киев : «Вища школа», 1976. – 280 с.
7. Колб, В.Г. Клиническая биохимия / В.Г. Колб, В.С. Камышников. – Минск, 1976. – 306 с.
8. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / В.В. Меньшиков [и др.] под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина. 1987. – 386 с.
9. Леонтьук, А. С. Основы возрастной гистологии : учебное пособие / А. С. Леонтьук, Б. А. Слука. – Минск : Выш. шк., 2000. – 415 с.
10. Лилли, Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Р. Лилли. – М.: Мир, 1969. – 645 с.
11. Меркулов, Г.А. Курс гистологической техники / Г.А. Меркулов. – Ленинград, 1969. – 423 с.
12. Ромейс, Б. Микроскопическая техника / Б. Ромейс. – М.: Изд-во иностранной литературы, 1953. – 718 с.
13. Wood, J.G. Identification of and observations of epinephrine and norepinephrine containing cells in the adrenal medulla / J.G. Wood // American Journal Anatomy. – 1963. – Vol. 112. – 285 – 303 p.

Х.Б. Юнусов, Д.Н. Федотов, И.Ю. Лялина, Ш.А. Чалабоев

ОСНОВЫ ГИСТОХИМИИ

Учебное пособие

Ташкент. Издательство «Fan ziyosi», 2021.

Лицензия № 3918, от 18.02.2021.

г.Ташкент, ул. Навои, 30.

Директор

И.Халилов

Редактор

Н. Шахназарова

Технический редактор

Л.Файзиев

ISBN: 978-9943-7467-7-0

Подписано в печать 09.11.2021.

Формат 60x84 _{1/16}. Печать офсетная.

Гарнитура Times New Roman.

Ус.п.л. 9,5. Изд. п.л. 10,0.

Тираж 500 экз. Заказ № 11/6.

Отпечатано в ООО «Самарканд идеал принт»

г. Самарканд, ул. Муаззамхон, 53.

