

А. И. К О Н О Н С К И Й

ГИСТОХИМИЯ

И. К О Н О Н С К И Й

ИСТОХИМИЯ

*Допущено Министерством высшего
и среднего специального образования УССР
в качестве учебного пособия для студентов
биологических специальностей вузов*

ИЗДАТЕЛЬСКОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ «ВИЩА ШКОЛА»
ГОЛОВНОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО
КИЕВ — 1976

57.029
К64

611.018
К 64

✓ 47207

УДК 578.088:[611—018:612.015+636:611—018:612.015]

БИБЛИОТЕКА
Государственного
медицинского института
гор. Акжика

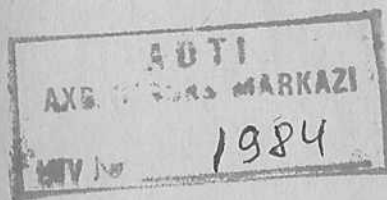
Гистохимия. Кононский А. И. Издательское объединение «Вища школа», 1976, с. 280.

В пособии изложены основные гистохимические методы, которые используются в современной биологии, медицине и животноводстве при изучении локализации и содержания в тканях, клетках и интрацеллюлярных структурах человека и животных нуклеиновых кислот, белковых соединений, аминокислот, липидов, углеводов и др.

Пособие предназначено в качестве спецкурса для студентов биологических специальностей вузов. Им могут пользоваться студенты зоотехнических и ветеринарных факультетов сельскохозяйственных вузов.

Табл. 5. Ил. 69. Библиогр. 46.

Редакция литературы по химии, химической технологии, горному делу и металлургии.
Зав. редакцией Т. С. Антоненко



21005—122
К 49—76
М211(04)—76

© Издательское объединение «Вища школа», 1976.

ПРИНЯТЫЕ В КНИГЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ ¹

АДФ — аденозиндифосфорная кислота	МС — метиленовый синий
АМФ — аденозинмонофосфорная кислота	НАД — никотинамидадениндинуклеотид
АС — алциановый синий	НАДФ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат
АТФ — аденозинтрифосфорная кислота	нитро-СТ — нитро-синий тетразолий
АТФ-аза — аденозинтрифосфатаза	НК — нуклеиновые кислоты
АХ — ацетилхолин	НЭ — неспецифическая эстераза
АХЭ — ацетилхолинэстераза	ПХЭ — псевдохолинэстераза
ВЖК — высшие жирные кислоты	РНК — рибонуклеиновая кислота
ГК — гиалуроновая кислота	РНК-аза — рибонуклеаза
ГС — гепаринсульфат	р-РНК — рибосомальная рибонуклеиновая кислота
ГХК — галлоцианинхромовые квасцы	СДГ — сукцинатдегидрогеназа
ДДД — 2,2'-диокси-6,6'-динафтилди-сульфид	СК — сиаловая кислота
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота	т-РНК — транспортная рибонуклеиновая кислота
ДНК-аза — дезоксирибонуклеаза	ТС — толуидиновый синий
и-РНК — информационная рибонуклеиновая кислота	ТХУ — трихлоруксусная кислота
КАГ — карбоангидраза	УДФ — уридиндифосфат
КМПС — кислые мукополисахариды	ФАД — флавинадениндинуклеотид
КС — кератосульфат	ФФ — флавиновые ферменты
КФ — кислая фосфатаза	ХСК — хондроитинсерная кислота
ЛДГ — лактатдегидрогеназа	ЦФ — цитофотометрия
МАО — моноаминоксидаза	ЦХО — цитохромоксидаза
МДГ — малатдегидрогеназа	ШИК — Шифф-иодная кислота
	ЩФ — щелочная фосфатаза

¹ Приведены лишь наиболее часто встречающиеся в различных главах обозначения.

ПРЕДИСЛОВИЕ

Гистохимические методы широко используются в современной биологии, медицине, животноводстве, ветеринарии и агрономии. С их помощью изучается химическая статика и динамика организма человека, животных и растений на тканевом, клеточном и интрацеллюлярном уровнях. Они используются в морфологических, биохимических и клинических исследованиях. Отдельные методы применяются для диагностики болезней человека и животных, прогноза и оценки эффективности лечения.

Большинство руководств по гистохимии, изданных в нашей стране, — переводные. Многие из них становятся библиографической редкостью. Описание некоторых гистохимических методов можно найти в пособиях по микроскопической, гистологической и патогистологической технике, в специальных монографиях. Ряд методов устарел. За последние годы в отечественной и зарубежной печати накопился огромный материал по использованию и разработке новых гистохимических методов, который нуждается в систематизации, обобщении и экспериментальной проверке.

Настоящая книга является пособием по гистохимии для студентов биологических факультетов университетов и педагогических институтов, ветеринарных и зоотехнических факультетов сельскохозяйственных вузов, в котором предпринята попытка изложить на современном научном уровне основные гистохимические методы изучения в тканях животных и человека биологически важных веществ.

Автор благодарит заслуженного деятеля науки СССР проф. П. А. Ковальского, проф. Я. В. Белика,

проф. И. Д. Головацкого, проф. В. Я. Карупу, кандидата химических наук М. А. Шерстобоеву и кандидата биологических наук А. В. Денисьевского за ценные замечания, сделанные при просмотре рукописи книги, а также научных работников, любезно предоставивших препараты для иллюстрации гистохимических реакций.

Все отзывы и пожелания просим присылать по адресу: 252054, Киев, 54, Гоголевская, 7, Головное издательство издательского объединения «Вища школа».

Автор

ВВЕДЕНИЕ

Гистологическая химия, или гистохимия, — это наука, изучающая химическую статику и динамику организмов человека, животных и растений на тканевом уровне. Слово «гистохимия» произошло от двух греческих слов: *histós* — ткань и *chemeia* — наука о составе, внутреннем строении, свойствах и взаимных превращениях веществ. Раньше гистохимию называли топохимией, изучающей тканевое размещение различных химических соединений.

Основными задачами современной гистохимии являются: изучение химического состава, определение количества отдельных соединений и выяснение особенностей их метаболизма в тканевых микроструктурах и межклеточных средах в процессе развития, в различные этапы специфической деятельности, в эксперименте и при патологических условиях. Гистохимия находится на стыке двух наук — гистологии и биологической химии, что способствует их взаимному сближению и обогащению получаемой информацией. Особым разделом гистохимии является цитохимия, изучающая локализацию, содержание отдельных веществ и обменные процессы в клетках и их органоидах. В гисто- и цитохимии чаще всего пользуются одними и теми же методами исследования.

В развитии гистохимии можно выделить период зарождения (1800—1829 гг.), оформления как науки (1829—1936 гг.) и современный (с 1936 г. по настоящее время). Содержание гистохимии как науки и проблемы, решаемые ее методами, в различные периоды определялись многими факторами — общественной формацией, философским мировоззрением, уровнем развития естествознания биологии, медицины, ветеринарии, зоотехнии.

Основоположником гистохимии считают Франсуа-Винсента Распайля (1794—1878), известного французского биолога, ботаника и политического деятеля. Им определены главные задачи гистохимии, теоретически обоснованы известные раньше и разработанные новые гистохимические методы. К первым методам гистохимии следует отнести реакции Линка (1807) на выявление в тканевых срезах растений танина и галловой кислоты, метод Колэна и де Клобри (1814) для обнаружения в растительных тканях зерен крахмала, а также ряд гистохимических методик, разработанных Распайлем, для выявления в тканях белков (ксантопротеиновая), углеводов (фурфуроловая), аминокислоты триптофана (альдегидная), технику микросжигания для открытия в тканях и клетках некоторых неорганических соединений и отдельных химических элементов. Часть гистохимических методов (особенно по выявлению неорганических веществ) позаимствована из аналитической химии и модифицирована для изучения отдельных веществ на микроскопических объектах. Опубликованные Распайлем в 1825—1834 гг. труды, послужившие основой создания новой науки, не получили достойной оценки современников и были отвергнуты научным комитетом Академии наук, состоящим в то время из физиолога, химика и ботаника. Причиной, по мнению Распайля, было то, что физиолог оказался невеждой в химии, химик — в микроскопической технике, ботаник — и в том, и в другом.

Существенное влияние на дальнейшее развитие гистохимии оказали работы Велера (1828) по синтезу из типичного неорганического вещества — цианистого аммония — мочевины; исследования, нанесшие сокрушительный удар идеалистическим представлениям в биологии — витализму. В эти годы разработаны иодная реакция на крахмал и иодсерная — на белок, методы обнаружения в тканях железа, белков, некоторых аминокислот, энзимов, целлюлозы. Н. Н. Зинин в 1842 г. синтезировал анилин — основное сырье для получения анилиновых красителей и реактивов, которые стали

широко использоваться в гистологии и гистохимии. В это время предпринимаются попытки объяснить механизм окрашивания тканевых структур явлениями адсорбции и химическим сродством тканей к красителям. Изучается явление метакромазии. Разрабатываются методы выявления в тканях нуклеиновых кислот, белков, липидов, железа, фосфатов, ртути, кальция. Разработка и использование этих методов так или иначе свидетельствовали о единстве превращений химических соединений в тканях и клетках, способствовали преодолению существующей ранее грани между живым и неживым. В гистохимию все больше проникают идеи диалектики. Возникает необходимость сочетания данных анализа и синтеза для объяснения химического состава тканей и клеток. В 80-е годы XIX века немецкие ученые В. Флемминг и Р. Альтман создают научное представление о сложном составе протоплазмы различных клеток. Отечественные ученые А. Н. Петунников, А. С. Фаминцын, И. П. Бородин и С. М. Розанов расшифровывают процессы синтеза кутикулы, маннана, смол растительных тканей, крахмала и кристаллических отложений. Разрабатываются принципы лиофильной сушки. В гистохимическую технику вводятся новые фиксаторы, в частности, осмиевая кислота. Устанавливается хромофилия клеток мозгового слоя надпочечника.

Начало XX века ознаменовалось широким применением гистохимических методов в самых различных областях биологии и медицины. Этому способствовали публикации руководств по микрохимии, микроскопической технике и гистохимии. Разработан классический метод выявления ДНК (Фельген и Россенбек, 1924). Подытоживаются главные результаты гистохимических исследований, выполненных в течение предыдущих ста лет. Завершается оформление гистохимии как науки. В конце 30-х и в начале 40-х годов гистохимия получила надежные методы выявления в тканях и клетках нуклеиновых кислот, белков, углеводов, липидов, некоторых ферментов, минеральных соединений. В прикладную гистохимию все больше и больше проникают модификации многих биохимических методик. Гистохимия вступает в новый период развития — современный.

Значительную роль в развитии гистохимии сыграл выход в свет в 1936 г. книги Л. Лизона «Гистохимия животных». Гистохимия пополняется большим комплексом методик. К ним, в первую очередь, следует отнести метод выявления гликогена, предложенный в 1939 г. советским гистохимиком А. Л. Шабадашом, метод обнаружения в клетке ДНК и РНК, разработанный в 1942 г. бельгийским ученым Браше, метод выявления в тканях щелочной фосфомоноэстеразы, созданный в 1939 г. американским и японским гистохимиками Гомори и Такаматчу и др. Разрабатываются принципы и техника цитофотометрии нуклеиновых кислот шведским цитохимиком Касперсоном (1936) и советским ученым Е. М. Брумбергом (1939). Создается ряд оригинальных руководств по гисто- и цитохимии — Глика (1949), Гомори (1952), Даниелли (1953) и, особенно, Э. Пирса (1953). Гисто- и цитохимические методы дали возможность

установить многие биологические закономерности. В частности, зависимость интенсивности синтеза белка в клетке от содержания в ней РНК, постоянство содержания ДНК в хромосомном наборе клеток одного и того же вида животного (В. Я. Бродский, 1966).

На развитие гистохимических исследований в СССР плодотворное влияние оказали идеи И. П. Павлова о нервизме, так как большинство работ в эти годы выполнено по гистохимии нервной системы (А. Л. Шабадаш, 1949; В. В. Португалов, 1956; Г. И. Роскин, 1959). Во многих лабораториях страны проводится комплекс гисто- и цитохимических исследований различных тканей и клеток человека, животных и растений. Результаты таких работ подытоживаются в 1960 г. на первой Всесоюзной конференции по гисто- и цитохимии в Москве. Создаются отечественные пособия по отдельным проблемам гисто- и цитохимии (Г. И. Роскин, 1946; Д. А. Жданов, 1955; Г. И. Роскин и Л. Б. Левинсон, 1957; И. А. Паламарчук и Т. Д. Веселова, 1965, 1969; В. Г. Конарев, 1966; А. Г. Агеев, 1969; А. П. Авцын, А. И. Струков, Б. Б. Фукс, 1971; В. В. Соколовский, 1971). Все это способствует бурному развитию гистохимических исследований в СССР, которые сейчас широко проводятся как в теоретической биологии, так и в различных отраслях медицины, животноводства, ветеринарии и агрономии. По образному выражению академика АМН СССР Н. А. Краевского, в наши дни гистохимия приобретает все большее и большее значение, превращаясь из совокупности методических приемов в самостоятельную отрасль, способную решать только ей доступные задачи и проблемы.

Результаты гистохимических исследований публикуются в ряде отечественных («Архив анатомии, гистологии и эмбриологии», «Архив патологии», «Цитология», «Доклады АН СССР», «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины» и др.) и зарубежных («Acta Histochemica» — ГДР, «Journal of Histochemistry and Cytochemistry» — США, «The histochemical Journal» — Англия, «Annalis d'histochimie» — Франция, «Rivista di Istochimica» — Италия, «Histochemie» — Западный Берлин, «Progress in Histochemistry and Cytochemistry» — ФРГ, «Experimental Cell Research» — Англия и т. д.) журналов, а также в трудах морфологических, биохимических, гистохимических, физиологических, клинических и других съездов, научных конференций и симпозиумов, многих научно-исследовательских учреждений, вузов. Результаты цито- и гистохимических исследований, проводимых во многих странах мира, подытожены на четырех международных конгрессах по гисто- и цитохимии: первом — в Париже (1960), втором — во Франкфурте-на-Майне (1964), третьем — в Нью-Йорке (1968), четвертом — в Киото (1972). Советские ученые принимают активное участие в работе международных форумов по гисто- и цитохимии. Их работы получают высокую оценку научной общественности.

Использование гисто- и цитохимических методов в различных отраслях биологии, медицины, животноводства и ветеринарии

поможет советским исследователям решить проблемы, поставленные перед наукой Программой КПСС. К таким проблемам, в первую очередь, следует отнести выяснение сущности явлений жизни, раскрытие биологических закономерностей развития органического мира, изучение физики и химии живых организмов, разработка различных способов управления жизненными процессами, овладение и управление обменом веществ, наследственностью и направленными изменениями организмов.

Глава II. ЗНАЧЕНИЕ ГИСТОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Основными задачами гистохимии являются идентификация и определение локализации (иногда и количества) химических соединений в тканях, клетках и межклеточном веществе в онтогенезе, при различных функциональных состояниях и патологии. С помощью гистохимических методов можно связать реакции обмена веществ с определенными тканевыми и клеточными структурами, а также сделать заключение о роли этих образований в непрерывном потоке обменных процессов в живом организме.

Ценность каждого гистохимического метода прежде всего определяется тем, чтобы он максимально сохранял прижизненную морфологию и химическую организацию изучаемых участков организма, был специфичным для отдельных веществ — выявлял их группы (нуклеиновые кислоты, белки, липиды, кислые фосфатазы) или определенные химические соединения (ДНК, РНК, гликоген, щелочную фосфатазу, сукцинатдегидрогеназу), обладал высокой чувствительностью к их минимальным количествам и способствовал функциональному объяснению содержания и локализации таких соединений. Необходимо иметь в виду, что обмен веществ на тканевом, клеточном и субклеточном уровнях трудно поддается изучению, так как многие гистохимические методы пока еще недостаточно совершенны и с их помощью не всегда можно дать достоверную количественную оценку исследуемым явлениям.

Пограничное положение гистохимии между гистологией и биохимией способствует их сближению, что обоюдно обогащает арсенал знаний и возможности познания объективных законов существования живой материи. Гистохимические методы дают возможность получить ценную научную информацию для всех морфологических дисциплин. Проводя такие исследования, нужно реально оценивать возможности методов, не допуская двух крайностей, о которых в свое время говорил один из основоположников отечественной гистохимии А. Л. Шабадаш (1949). Первая из них — фантастичность целей, которые ставит перед собой исследователь, не учитывая современных возможностей цито- и гистохимии, что в умелых руках компрометирует науку. Вторая крайность — чрезмерный скептицизм отдельных ученых к цито- и гистохимическим методам, так как преувеличивается роль артефактов и методологи-

ческих трудностей в качественной и количественной оценке изучаемых объектов, что в итоге приводит к нигилизму и является тормозом в развитии биологии и ее отдельных отраслей.

Цито- и гистохимические методы могут значительно быстрее, чем гистологические, уловить в тканях и клетках возрастные и функциональные изменения, что очень важно для объективной интерпретации морфологических изменений, а также отличия нормальных микроструктур от патологически измененных. Они помогают проникнуть в химическую организацию аналогичных по строению и функциям клеток у животных, стоящих на различных ступенях зоологической лестницы, и выявить различия, зависящие от места животного в филогенетическом ряду. В последние два десятилетия получила развитие электронная гистохимия, в практике которой используются как модификации классических гистохимических методик, так и собственные методы, разработанные специально для этой отрасли естествознания. Наиболее ценные результаты исследований получены при ультраструктурном изучении локализации энзимов в лизосомах (ЩФ, КФ, НЭ, АТФ-азы), митохондриях (некоторые дегидрогеназы), а также нуклеиновых кислот, белков, белковых функциональных групп в эндоплазматической сети. Большинство таких методов основано на образовании в местах размещения исследуемых веществ тяжелых металлических осадков, рассеивающих поток электронов и способствующих контрастности электронно-микроскопического изображения.

Гистохимия органически связана с аналитической химией. Принципы проведения многих гистохимических реакций, особенно на выявление минеральных соединений в тканях и клетках, позаимствованы из аналитической химии. Тем не менее, гистохимические методы имеют ряд преимуществ перед методами аналитической химии. Из расчетов Лизона (1936) видно, что чувствительность гистохимической реакции на железо в тканях благодаря использованию микроскопа в 10 000 раз превышает чувствительность капельной реакции. Увеличение видимости частиц с помощью современной микроскопической техники позволяет повысить точность химического анализа тканевых микроструктур намного больше, чем во времена Лизона.

Данные, полученные гистохимическим путем, представляют особую ценность для биохимии. Биохимик, изучающий химические процессы в гомогенате какого-либо органа, например, поджелудочной железы, вынужден делать вывод о деятельности «железистой клетки», усредняя свойства и состав паренхиматозных, эндокринных, соединительнотканых, ретикуло-эндотелиальных клеток и форменных элементов крови, которые входят в «навеску железа». Гистохимическое и, особенно, цитохимическое изучение приближает исследователя к выявлению локализации и определению содержания веществ в различных по происхождению, строению и значению клетках (концевых отделов и протоков железы, островков Лангерганса, стенок сосудов, крови, нервных ганглиев, соединительнотканной стромы).

Гисто- и цитохимические методы используют для расшифровки патогенеза, разработки методов диагностики и даже лечения многих болезней человека и животных, что превращает гистохимию из описательной в функционально-морфологическую науку, методы которой совершенно по-новому освещают статику и динамику патологических процессов. Так, с помощью гистохимических методов установлено, что в основе ревматического поражения соединительной ткани кровеносной системы и сердца лежат нарушения физико-химических свойств клеток. Именно выявление ранних сдвигов в химической организации коллагена и основного вещества способствовало разработке методов ранней диагностики и эффективного лечения пороков сердца и склероза сосудов у человека. Гистохимическое изучение соединительной ткани легких при силикозе показало метаболическую этапность развития болезни. Так, структурные изменения в телах фибробластов возникают вследствие нарушения деятельности ферментов энергетического обмена: НАД-диафоразы, НАДФ-диафоразы, СДГ и др. С помощью экспериментальных гистохимических исследований для хирургической практики разработаны малоантигенные коллагеново-эластические протезы из гетерогенного материала, намечены пути восстановления травм кожи, костей, сухожилий, аорты, диафрагмы, сердца и даже роговицы глаза. Гистохимический анализ деятельности ферментов в клетках раневых отпечатков раскрывает новые возможности управления процессами заживления ран у человека и животных.

Работы, выполненные отечественными и зарубежными онкологами, свидетельствуют о большой перспективности использования гистохимических методов для первичной, дифференциальной и гистогенетической диагностики опухолей. Так, в злокачественных опухолях, как правило, наблюдается снижение, а иногда и исчезновение активности СДГ, ЦХО, НАДФ-диафоразы, дегидрогеназы α -глицерофосфатазы и резкое увеличение концентрации ЛДГ, дегидрогеназ глютаминовой кислоты, фосфоглицеринового альдегида, глюкозо-6-фосфата, 6-фосфоглюконата. Такие явления резко выражены в раковых опухолях желудка, кожи, легких, почек, матки и толстого кишечника. Появление в новообразованиях желудка высокой активности аминополипептидазы может служить показателем раковой опухоли. Резкое повышение уровня щелочной фосфатазы в остеобластах доброкачественной гигантоклеточной опухоли является признаком саркоматозной трансформации. Значение таких сведений велико, ибо своевременная первичная и дифференциальная диагностика опухолей является залогом успешного оперативного вмешательства и химиотерапии.

Гистохимические методы широко используются при изучении патогенеза, постановке диагноза и разработке лечения лейкозов. Содержание и локализация в клетках крови и костного мозга больных людей гликогена, липидов, плазмала, аминокислот и некоторых энзимов определяются формой и стадией болезни, видом и степенью зрелости клеток. Отдельные формы острого лейкоза, плазмоцитоза и хронического миелолейкоза можно различать по

наличия и активности в клетках костного мозга и крови больных АТФ-азы, НЭ, γ -глутаминтранспептидазы и 5-нуклеозидазы. Цитохимическое определение в клетках больных детей миелопероксидазы позволяет определить форму лейкозов, разработать прогноз болезни, увидеть направленность дифференцирования клеток.

Новейшие достижения качественного и количественного химического анализа микроструктур тканей и клеток приблизило гисто- и цитохимию к решению других проблем современной биологии и медицины. Так, цитохимическое изучение 11-гидроксилазы в коре надпочечников показывает, что развитие адреногенитального синдрома обусловлено отсутствием в организме энзимов, участвующих в синтезе гидрокортизона. Наличие в тканях циклической АМФ обязательно для каталитического действия фосфорилазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, а также для осуществления обратной физиологической связи между клеткой, синтезирующей тропный гормон, и клеткой — мишенью, размещенной в соответствующей эндокринной железе.

Гисто- и цитохимические методы помогают решить некоторые вопросы медицинской генетики. Оказалось, что падение активности пероксидазы в телах лейкоцитов является патогенетическим признаком наличия лишней γ -хромосомы. При трисомиях и синдроме Дауна в фиброцитах обнаруживается уменьшение активности щелочной фосфатазы. Гистохимический анализ наличия и активности некоторых энзимов в луковице волоса служит основой для диагностики отдельных наследственных болезней. Определение фосфатазной активности в телах нейтрофилов используется для дифференциальной диагностики обтурационной желтухи и болезни Боткина. С помощью гистохимического анализа разработаны рациональные методы терапии некоторых болезней. Так, цитохимическое изучение содержания нуклеиновых кислот в сетчатке глаза послужило основой для создания эффективного метода лечения тапато-ретиальных дистрофий, которые приводят к слепоте в раннем детском возрасте.

Гистохимические методы находят широкое применение и в других областях современной биологии, медицины, животноводства и ветеринарии, фармакологии, токсикологии, стоматологии, дерматологии, паразитологии, акушерстве и гинекологии, судебной медицине и др.

Гистохимия как наука особенно бурно развивается в настоящее время. Перед ней стоят большие неотложные задачи в отношении разработки новых методов для качественного и количественного анализа микроструктур, так как многие ее методы пока недостаточно совершенны и не всегда позволяют давать количественную оценку результатам исследований. Отсутствуют методы, с помощью которых можно оценить локализацию и содержание отдельных видов и разновидностей РНК, белков, аминокислот, углеводов, гормонов, многих витаминов, энзимов и др.

Достижения смежных с гистохимией наук — общей биологии, гистологии, цитологии, эмбриологии, физики, неорганической, аналитической, органической, физической, коллоидной, биологической

и биофизической химии, молекулярной биологии, физиологии, генетики — способствуют дальнейшему развитию гистохимии и всего комплекса биологических наук.

Теоретической основой гистохимии является марксистско-ленинская философия — диалектический материализм, который дает возможность определить место гистохимии в системе наук, осуществлять разработку методов научного исследования, обобщать и систематизировать фактический материал. При интерпретации фактов и явлений, установленных гистохимическими методами, следует руководствоваться философскими положениями диалектического материализма о взаимосвязи и единстве единичного, особенного и общего, содержания и формы, структуры и функции, части и целого в целостном организме человека, животного и растения.

Глава III. ОБОРУДОВАНИЕ ГИСТОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Гистохимические исследования лучше всего проводить в специально оборудованных лабораториях. Большинство гистохимических реакций можно успешно поставить и в условиях институтов, университетов, биологических, медицинских и ветеринарных лабораторий, где имеется оборудование для проведения обычных гистологических, патогистологических и гематологических исследований. Некоторые гистохимические методы можно использовать в работе биологических кабинетов средних учебных заведений.

Комната, где проводятся гистохимические исследования, должна иметь водо- и газопроводы, центральное отопление, приточно-вытяжную вентиляцию, должна быть хорошо электрифицирована. Рабочие места следует планировать так, чтобы прямые солнечные лучи не мешали микроскопированию. В комнате должен быть лабораторный стол с полками для реактивов и материала для исследования, несколько винтовых табуреток, столик для микроскопирования, шкафы для хранения посуды, реактивов, документации, одежды, кронштейны для бутылей с дистиллированной и бидистиллированной водой, весов (технохимических, аптечных, торсионных и аналитических), термостаты, сушильные шкафы, различные газовые горелки, плитки, электрические бани, спиртовки, кипятивники, аппарат для получения одно- и двухперегнанной воды, холодильник, вытяжной шкаф и другое оборудование.

Рабочий стол нужно накрывать толстым стеклом или плексиглазом, под которым можно хранить рецепты часто употребляемых реактивов, фиксирующих средств, таблицы разбавления спиртов и приготовления буферных растворов, молекулярной массы химических соединений и др. Стол устанавливают так, чтобы исследователь мог бы максимально использовать дневной свет при микроскопическом изучении препаратов. Ящики стола используются для хранения реактивов, посуды, препаратов, предметных и покровных стекол, необходимой справочной литературы. На столе выделяется место для микроскопа, осветителя, микротомов, настольной лампы.

Основным прибором для изучения гистохимических препаратов является световой микроскоп. В лабораторной практике используют микроскопы старых (М-10, М-11, МБУ-1) и новых (МБР-1, МБР-1А, МБИ-3, МБД-1, МБР-3, МБИ-11, МББ-1, МББ-1А) конструкций. Чаще всего применяют микроскоп МБР-1, дающий увеличение от $\times 56$ до $\times 1350$. Микроскоп имеет наклонный монокулярный тубус для визуальных наблюдений и прямой — для микрофотографирования. Находит применение также микроскоп «Биолам-70» (рис. 1). Для сравнительного изучения двух препаратов (например, опытных и контрольных) пользуются микроскопом сравнения МС-51. Тонкие цито- и гистохимические исследования проводят с помощью микроскопов специального назначения—МБИ-12, МБИ-13, МБИ-14. Они имеют приспособления для проведения фото- и киносъемки препаратов.

При изучении гистохимии оптически активных веществ (например, многих липидов) применяют поляризационные микроскопы МИН-4, МИН-6, МИН-8 или поляриды — дополнительные поляризационные пленки к микроскопам МБР-3, МББ-1.

Первичную и вторичную люминесценцию тканей и клеток изучают в люминесцентных микроскопах МЛ-2, МЛ-3, МЛ-4 или с помощью специальных дополнительных устройств (ОИ-17) к биологическим микроскопам МБИ-1, МБР-1, МБР-1А, МБИ-3. Проведение цитоспектрофотометрических и электронно-микроскопических исследований требует специальной аппаратуры и отдельного помещения.

Изучение цито- и гистохимических препаратов проводят как при дневном, так и при искусственном освещении. В качестве осветительных ламп в микроскопии используют осветители ОИ-9, ОИ-9М, ОИ-7 и, особенно, ОИ-19 (рис. 2). Применяют также осветители ОИ-24 и ОИ-25. При обычной работе в лаборатории применяют осветитель ОС-1, который имеет матовую лампу мощностью 60 вт.

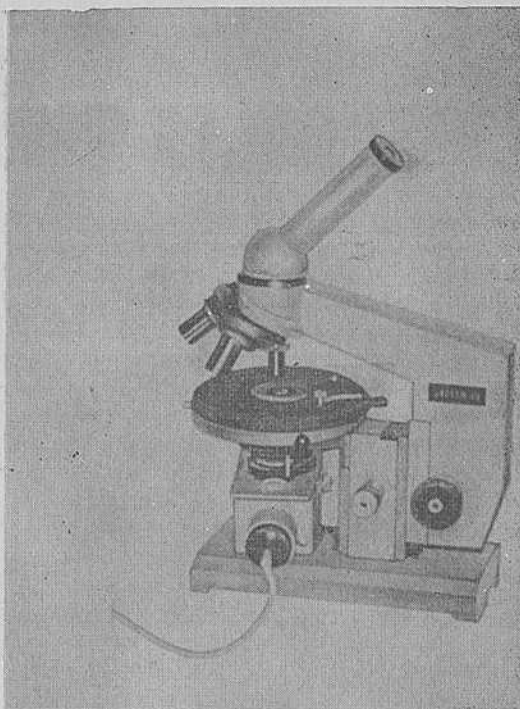


Рис. 1. Микроскоп «Биолам-70».

Срезы для гистологических и гистохимических препаратов изготовляют на санных, замораживающих и ротационных микротоммах. В санных микротоммах нож и объектодержатель движутся на салазках. В одних моделях микротомов блок с материалом поднимается к ножу по вертикали, в других — по наклонной плоскости. На санных и ротационных микротоммах получают тонкие (до 2—10 мкм) парафиновые, целлоидиновые или парафинцеллоидиновые срезы.

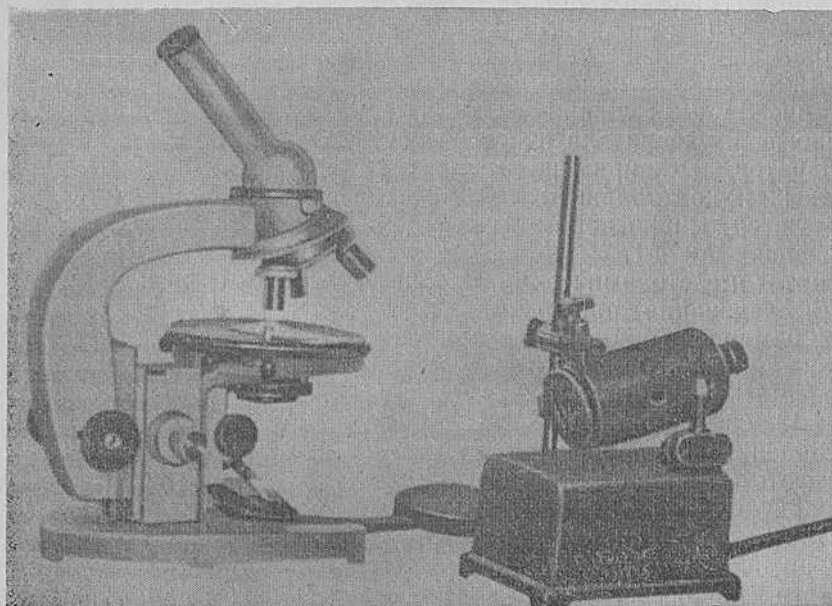


Рис. 2. Микроскоп биологический рабочий МБР-1 с осветителем ОИ-19.

Охлаждение материала в замораживающих микротоммах достигается путем пропускания жидкой углекислоты или с помощью термоэлектрического охлаждающего столика ТЭС. Толщина срезов, которые получают на замораживающих микротоммах, превышает 10 мкм. В цито- и гистохимических исследованиях широко используется микротом-криостат.

В лаборатории должен быть набор посуды — различные сосуды, банки с притертыми пробками, колбы (круглые, конические, плоскодонные), кристаллизаторы, мензурки и цилиндры (на 50, 100, 200, 250, 500, 1000 и 2000 мл), макро- и микропипетки, кюветы, бюксы, чашки Петри, макро- и микробюретки, капельницы, набор бюксов, делительные воронки, фарфоровые ступки, часовые стекла, сосуды Коплина и др. Лабораторное оборудование состоит из штативов для пробирок и пипеток, штативов Бунзена, зажимов для резиновых трубок, держателей пробирок, песочных часов, секундомера, электрических часов с сигналом, электрической (на 1000—3000 об/мин) и ручной центрифуги, сейфа. Следует иметь также

pH-метр, станок для заточки (Ц 1310) и правки (ЛО 4) микротомных ножей, столики для расправки срезов, рисовальный аппарат, приборы для измерения микроскопических объектов, наборы фильтров, карандашей для стекол, общие тетради и конторские книги для записей, необходимую кино- и фотоаппаратуру и др. Реактивы, из которых готовятся красящие смеси и инкубационные среды, хранят в специальных шкафах, некоторые (группа А) — в сейфе, отдельные (летучие) — в вытяжном шкафу. В наборе хирургического инструментария должны быть различного размера анатомические и хирургические пинцеты, пинцеты с изогнутыми браншами и для переноса предметных стекол, зажимы Пеана и Кохера, корнцанги, ножницы (прямые, изогнутые, среднего и малого размеров, глазные и остроконечные), скальпели, лезвия безопасной бритвы, наборы различных шприцов, стерилизаторы, препаровальные иглы (прямые и изогнутые), стеклянные палочки и иглы и др.

При постановке гистохимических реакций необходимо строго соблюдать правила техники безопасности. Остановимся на некоторых из них:

1. В лаборатории должны находиться в образцовом порядке противопожарные средства (огнетушители, песок, вода), газопроводная, электропроводная и водопроводная сети, вентиляционная система, аптечка для оказания первой медицинской помощи пострадавшему.

2. В лаборатории запрещается принимать пищу, пить и курить. Работать в чистых халатах, в некоторых случаях — в передниках. После приготовления реактивов, постановки реакции и перед уходом из лаборатории обязательно мыть руки. После работы с ядами вымыть руки, вычистить зубы и прополоскать рот. Сейф с ядовитыми веществами пломбировать.

3. При работах, связанных с засорением, раздражением глаз и ожогами, надо надевать защитные очки. Во время работы нельзя руками трогать или тереть глаза. Работы, связанные с разбрызгиванием жидкостей, появлением осколков стекла, выделением ядовитых газов и паров, проводить в вытяжных шкафах, застекленных толстым стеклом или плексигласом.

4. Перед постановкой гистохимической реакции детально изучить методику, физические и химические свойства реагентов (особенно в данных условиях), тщательно продумать ход работы, выяснить возможные виды опасностей и принять меры к их предотвращению. Никогда не пробуйте гистохимические реактивы на вкус и не вдыхайте неизвестное вам вещество — они могут быть ядами.

5. При работе с приборами (микротомами, различными видами микроскопов, фото- и киноаппаратурой и др.) строго следовать инструкциям, которые к ним прилагаются.

6. Во время приготовления реактивов следует соблюдать общие правила безопасности, принятые в химических лабораториях. На каждый сосуд, содержащий реактивы, сразу же после приготовления надо наклеить этикетку с указанием названия вещества, назначения и других сведений (например, концентрации).

AXB-BESURS MARKAZI

1984 17

7. При попадании на тело концентрированной кислоты или щелочи пораженный участок немедленно промыть большим количеством воды, после чего (при необходимости) наложить компрессы из 1 %-ного раствора NaHCO_3 (при ожоге кислотами) или из 1 %-ного раствора CH_3COOH (при ожоге щелочами).

Глава IV. МАТЕРИАЛ ДЛЯ ГИСТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для гистохимических исследований используется различный по своему происхождению материал: трупный, боевой (сельскохозяйственные животные и птица), послеоперационный, экспериментальный (лабораторные животные), биопсийный, мазки, соскобы, отпечатки, культуры тканей.

При этом следует руководствоваться определенными правилами:

1. Материал от трупов или убитых животных нужно брать быстро, так как степень нарушений морфологии и химии тканей находится в прямой зависимости от сроков наступления клинической смерти и отделения этих кусочков от организма.

2. После этого материал или фиксируют, или из него на замораживающем микротоме (лучше на микротоме-криостате) готовят срезы, которые используются для гистохимических исследований. Если такой возможности нет, кусочки материала можно временно поместить в холодильник или термос со льдом.

3. Кусочки материала должны быть небольшими (до 0,5 см), но достаточными, чтобы провести нужное исследование. Их размеры, форма, направленность и количество определяются целями работы.

4. Не допускать грубых нарушений (сдавливаний, растяжений, надломов) прижизненного строения органов и тканей. Материал резать острыми инструментами — скальпелями, бритвами (опасной и безопасной), ножницами, пилами (костная ткань).

5. Фиксирующие жидкости должны быть химически чистыми, готовить их нужно точно по прописям, хранить при низких температурах. На фиксирующие жидкости не должны падать прямые солнечные лучи, они не должны соприкасаться с металлическими предметами, при помощи которых режут материал.

6. Кусочки материала следует брать из различных участков органа, чтобы можно было при изучении сравнить нормальную и патологическую морфологическую и химическую архитектуру.

§ 1. Трупный материал

Вскрытие трупов людей чаще всего проводится не раньше, чем через 4 ч после наступления клинической смерти. Трупы животных можно вскрывать раньше, даже через несколько минут после наступления смерти. При оценке материала необходимо учитывать прогрессирующее развитие ранних (охлаждение, гипостазы, окоченение, свертывание крови, начало автолиза) и поздних (разложение органов и тканей под влиянием деятельности гнилостных мик-

роорганизмов) посмертных изменений. Степень таких нарушений определяется многими факторами — сроками получения материала, причиной смерти, продолжительностью болезни и агонии, природой тканей (нервная поражается быстрее, чем другие) и местом их размещения в организме, окружающей температурой. После наступления смерти в тканях и клетках постепенно затухает окислительно-восстановительный метаболизм, уменьшаются и исчезают энергетические запасы (гликоген и глюкоза, АТФ, АДФ и креатинфосфат), инактивируются ферменты, появляются ядовитые продукты автолиза и микробного происхождения, наступают необратимые изменения в структуре и химии интрацеллюлярных образований. Наиболее устойчивыми оказываются ядерная мембрана и гранулярный ретикулум, меньше — агранулярный ретикулум, плазмалемма, комплекс Гольджи. Это косвенно свидетельствует о том, что основа мембран — белки (протеолипиды), фосфатиды и цереброзиды — сравнительно стойкие к этим процессам. Автолиз быстрее всего протекает в различных участках желудочно-кишечного тракта, в органах, обладающих высокой степенью регенерации (лимфоузлах, селезенке, печени), железах. Скорость его сильно возрастает при лучевой болезни и хронических заболеваниях (бруцеллез, туберкулез).

Многие структурные белки, липидные соединения и даже нуклеиновые кислоты на первых этапах автолиза обладают известной стойкостью к таким изменениям. Быстрее других веществ разрушается гликоген. Так, в тканях головного мозга собаки количество гликогена через 5 мин после наступления клинической смерти уменьшается наполовину, а через 15 мин — на 80—85%. Ферменты, принадлежащие к классу гидролаз, более устойчивы, чем оксидоредуктазы. Щелочная и кислая фосфоэстеразы в ряде органов и тканей сохраняют прижизненную локализацию в течение суток после наступления смерти, а в условиях низких температур — в течение двух суток. Достоверное гистохимическое определение локализации и активности СДГ и НАД-диафоразы в печени и селезенке возможно через 6 ч, почках и миокарде — через 9, аминопептидазы в печени и почках — через 12 ч после смерти, арилсульфатазы там же — через сутки, холинэстеразы в миокарде — через 2 суток, глюкозо-6-фосфатазы в печени и селезенке — через 3—4 суток. К интерпретации результатов гистохимических исследований, проведенных на трупном материале, нужно подходить очень осторожно. В клетках может иметь место посмертная диффузия ферментов и продуктов гистохимических реакций. Многие вопросы достоверного изучения гистохимии секционного материала остаются открытыми и нуждаются в дальнейшем исследовании.

§ 2. Боенский материал

Гистохимия сельскохозяйственных животных находится в состоянии становления. Ее данные в дальнейшем должны помочь биологу, ветеринарному врачу и зооинженеру сознательно управлять реакциями обмена веществ в живых организмах.

Материал для гистохимических исследований получают на мясокомбинатах, бойнях, убойных пунктах и птицекомбинатах. При его оценке следует учитывать содержание, кормление и физиологическое состояние животных в предубойный период, способ убоя животных, сроки получения материала от момента убоя, орган, природу и физиологическое назначение тканей, клеток, изучаемых веществ.

При получении материала исследователь обязан обратить внимание на длительность и способы транспортировки животных к месту убоя. Желательно не брать материал от убитых животных, только что подвергавшихся продолжительному перегону или перевозке, так как здесь иная гистохимическая характеристика многих органов и тканей, чем при обычных условиях. Особенно резко это отражается на содержании и локализации гликогена и окислительно-восстановительных ферментов.

Предубойные животные получают полноценный рацион, не уступающий по своей питательной ценности тому, который был раньше. В цехе предубойной подготовки животных выдерживают на голодном режиме: крупный рогатый скот и овцы — 24 ч, свиньи — 12, кролики — 24, куры, индейки, цыплята — 18, утки и гуси — 24 ч. В это время животные получают воду в необходимом количестве. Водоплавающую птицу выдерживают в водоемах в течение суток. Поить животных прекращают за два часа до убоя. Все это отражается на химической характеристике организма в целом и желудочно-кишечного тракта в частности. Например, изменяется активность и даже локализация многих ферментов (особенно гидролаз) в клетках слюнных, желудочных, кишечных, дуоденальных и поджелудочной желез, а также печени.

Химическая характеристика некоторых органов и тканей зависит от способа убоя животных. Крупных животных (лошади, крупный рогатый скот, иногда свиньи) обычно убивают с предварительным оглушением стилетом, молотом, стреляющими аппаратами, электрическим током, углекислым газом, смесью воздуха, углекислого газа и трихлорметана. Это нужно учитывать при изучении гистохимии различных органов, прежде всего нервной системы и дыхательного аппарата.

На химическую характеристику органов и тканей влияет способ и степень обескровливания животных. После убоя перерезаются крупные сосуды — сонные артерии и яремные вены. На бойнях и убойных пунктах применяется горизонтальное, а на крупных мясокомбинатах — вертикальное обескровливание. В первом случае в некоторых частях туши возможны застойные явления. Последний способ имеет преимущества — быстрота выхода крови, возможность скорее провести ветсанэкспертизу туши, получить нужный материал для исследования. Степень обескровливания зависит от функционального состояния нервной системы, особенно ее вазомоторных центров. Повышенная возбудимость животных перед убоем приводит к потере многими нервными клетками гликогена, увеличению в нейронах активности кислой фосфатазы и др.

При получении боевого материала нужно учитывать быстроту и способ разделки туш. Исследователь должен так организовать свою работу, чтобы подопытные животные были убиты раньше других. Тогда на конвейере он быстрее получит материал. В зависимости от объекта исследования материал берут на различных этапах разделки туш, которая состоит из снятия шкур (у птиц — оперения), нутровки, расчленения и туалета. Кожу можно брать в первые минуты после убоя, ткани головы — после обескровливания, внутренние органы — во время нутровки (у птиц — при потрошении тушек), мышечную ткань, кости, хрящи, спинной мозг — после расчленения туши и т. д.

Кусочки материала, полученные от животных, нужно немедленно поместить в фиксирующие жидкости или термосы со льдом. Промедление переноса материала в фиксаторы или на лед способствует возникновению морфологических и химических артефактов.

При получении материала от животных, убитых на санитарных бойнях, нужно строго придерживаться правил, предусмотренных ветеринарным законодательством СССР и инструкциями по борьбе с соответствующими болезнями.

§ 3. Экспериментальный материал

При изучении препаратов, полученных из трупного и боевого материала, возникают артефакты морфологического и гистохимического характера, не зависящие от исследователя. Причина проста — часто невозможно получить нужный материал в момент наступления клинической смерти. В тканях прекращается прижизненный обмен веществ, изменяется химическая статика и микроскопическое строение. При гистохимическом анализе материала может иметь место неверная интерпретация отдельных явлений. Этого можно избежать, используя в качестве контроля материал, полученный от экспериментальных животных в необходимое для работы время. При этом надо помнить, что в морфологии и гистохимии органов и тканей различных видов животных наряду с общими признаками могут быть особенности, обусловленные местом размещения организма в филогенетическом ряду, условиями обитания, кормления и содержания. Экспериментальные животные, как правило, должны быть клинически здоровыми. Необходимо исключить наличие у них «спонтанных инфекций», характерных для вивариев и питомников (гнойные отиты, спонтанные пневмония, гепатиты, нефриты, нодозный периаортит и др.). Желательно получать материал от SPF-животных¹.

В качестве экспериментальных животных чаще всего используют морских свинок, белых крыс и мышей, кошек, собак, обезьян,

¹ SPF (specific pathogen-free) в переводе с английского — свободные от патогенных микроорганизмов.

иногда сельскохозяйственных (овцы, козы, свиньи, крупный рогатый скот) и хладнокровных (аксолотль, лягушка) животных. При этом учитывается физиологическое состояние животного в предубойный период, наркоз, способ убоя, быстрота получения материала и его дальнейшая обработка. Используя наркотические средства, нужно учитывать вид и возраст животного. Подготовку животных к операции, операцию и послеоперационный уход необходимо проводить при строгом соблюдении правил асептики и антисептики.

Размеры материала должны быть небольшими (длина кусочка — 10—15 мм, ширина — 5—10, толщина — 3—4 мм). Участки, сдавленные пинцетами, удаляют острой бритвой или скальпелем. После этого материал немедленно (*не допускать высыхания!*) подвергают дальнейшей обработке. После отделения от организма в кусочках органов или тканей резко нарушается обмен веществ. Наиболее лабильным и в этом случае является гликоген. Нарушается деятельность ферментативных систем. Так, активность ЦХО и СДГ в гомогенатах печени мышей через 6 ч после наступления смерти составляет 36 и 20% от исходных величин, а к концу первых суток вообще не выявляется.

Если материал, полученный от экспериментальных животных, поместить в холодильник, то химический состав тканей сравнительно мало изменяется на протяжении нескольких дней. Так, в кусочках мозга, сохраняемых при температуре 1—4°C, активность щелочной фосфатазы на четвертые сутки составляет 98,5%, кислой — 80, ЦХО — 37% от исходных величин (по результатам биохимических исследований).

Сведения, полученные при изучении экспериментального материала, можно использовать для оценки достоверности гистохимической картины тканей трупов человека и животных, а также туш и органов животных, убитых на мясо- и птицекомбинатах, бойнях и убойных пунктах.

§ 4. Послеоперационный материал

Гистохимическим методам должно принадлежать особое место при изучении материала, полученного при различных хирургических вмешательствах. При этом патогистолог или гистохимик обязаны строго придерживаться требований инструкции Министерства здравоохранения СССР от 8 июля 1972 г. по исследованию биопсийного и цитологического материала как в отношении фиксации, так и по приготовлению, изучению, оценке и хранению препаратов. В инструкции рекомендуется наряду с классическими гистологическими методами (окраска гематоксилин-эозином, пикрофуксином по ван Гизону, суданами, шарлях-рот, импрегнацией по Футу, Тиббор-Папа, Гомори) при изучении такого материала широко применять гистохимические методы (Браше, ШИК-реакцию и др.). Эти методы должны занять надлежащее место и в ветеринарной лабораторной практике.

Операционный материал можно условно разделить на несколько видов: полученный при несчастных случаях (травмах, переломах, ожогах и др.); удаленный в результате оперативного вмешательства (аппендицитах, тонзиллитах, опухолях, кистах и др.); биопсийный; соскобы; мазки-отпечатки; пунктаты. В любом случае полученный материал нужно очень быстро обработать: зафиксировать, приготовить срезы, поставить гистологические и гистохимические реакции, приготовить постоянные препараты. К такому материалу предъявляются более повышенные требования, чем к трупному, боенскому или экспериментальному, потому что, получая материал от больных людей, исследователь обязан быстро, четко и квалифицированно решать вопросы, связанные с жизнью и здоровьем человека.

Особого внимания заслуживает материал, полученный при биопсии — прижизненном взятии кусочков тканей, органов и пунктатов для проведения исследований по установлению, подтверждению или уточнению диагноза. Биопсию проводят со строгим соблюдением правил анти- и асептики. Различают несколько видов биопсий: экстирпация, гарпунирование, пункция, пункция с прицельной лапароскопией. Получение и обработку биопсийного материала проводят согласно соответствующим инструкциям Министерства здравоохранения СССР (если биопсийный материал берут у человека) и ветеринарного законодательства СССР (если биопсийный материал берут у животных). Биопсийный метод дает возможность диагностировать многие болезни печени (болезнь Боткина, Гоше, анемию Бимена), почек, легких, костного мозга, а также следить за течением лечения. По результатам гистохимического изучения биопсийного материала печени сельскохозяйственных животных можно провести дифференциальную диагностику различных гепатитов, фиброзов и циррозов.

При изучении опухолей кусочки материала берут на границе патологической и здоровой тканей с захватом последней. Большие опухоли имеют омертвевшую сердцевину. Из работ, проведенных советскими и зарубежными учеными, следует, что наличие в опухолях желудка высокой активности аминополипептидазы может служить свидетельством их раковой природы.

Гистохимическим методам исследования должна принадлежать особая роль при изучении химической характеристики соскобов слизистых оболочек. Такие соскобы обычно берут со слизистой оболочки матки женщины для проведения дифференциальной диагностики многих патологических процессов — различных видов воспалений, гормональной гиперплазии, искусственного аборта, новообразований и, в первую очередь, рака. Материалы многочисленных исследований свидетельствуют о том, что для каждого новообразования существует своя цитологическая и цитохимическая характеристика.

Квалифицированное гистохимическое изучение соскобов даст возможность провести раннюю диагностику различных видов рака и обеспечит своевременное лечение.

При исследовании морфологии и цитохимии паренхиматозных органов и эпителиальных покровов слизистых используют их отпечатки. Берут обезжиренное предметное стекло и прижимают к ровному разрезу органа (печень, селезенка, лимфатические узлы, почка, надпочечник) или к тканям. Затем отпечатки подвергают дальнейшей обработке (подсушивают, фиксируют, ставят гистохимическую реакцию, готовят постоянный препарат). Для контроля процессов заживления ран готовят мазки-отпечатки.

В лабораторной практике (медицинской и ветеринарной) для постановки диагноза и контроля за ходом лечения проводят цитологическое и цитохимическое изучение пунктатов костного мозга, лимфатических узлов и некоторых внутренних органов. Техника получения и изучения пунктатов изложена в некоторых специальных руководствах и инструкциях.

§ 5. Другие виды материала

Материалом для цитохимических исследований при постановке диагноза и изучении патогенеза служат мазки крови, лимфы, ликвора и синовиальной жидкости. Различают сухие и влажные мазки. Мазок не должен быть слишком густым. Нельзя допускать раздавливания клеток. После приготовления мазка ему дают подсохнуть, затем фиксируют, ставят соответствующую цитохимическую реакцию, после чего готовят постоянный препарат. Для многих инфекционных и инвазионных болезней характерна своя химическая характеристика форменных элементов крови. Зная это, можно установить диагноз болезни, дифференцировать различные формы лейкозов, увидеть направленность дифференцирования клеток, поставить прогноз заболевания, наметить пути и контролировать эффективность лечения.

Значительный интерес представляет гистохимическое изучение культур тканей и клеток, используемых в экспериментальной биологии и практической вирусологии. Различают первичные культуры, получаемые из органов различных животных и эмбрионов человека (почек, семенников, легких, печени, яичника, матки, щитовидной железы, амниона и др.), и вторичные (клеточные линии и штаммы). Гисто- и цитохимический анализ культур тканей, клеточных линий и клеточных штаммов в различные периоды развития в них вирусов и при неодинаковых условиях внешней среды даст возможность изучить взаимоотношения между клетками и вирусами, установить закономерности тканевой и клеточной дифференциации в условиях патологии.

* * *

Полученный материал этикетировать. Кусочки органов и тканей прошивают нитками и прикрепляют бирки из картона или плотной бумаги. На каждой такой бирке черным карандашом обозначают номер объекта, дату получения материала, название органа или ткани, схему размещения кусочка в участке организма, сроки получения материала с момента наступления клинической смерти. Если

такие кусочки нельзя прошить, их заворачивают вместе с биркой в марлю и подвергают дальнейшей обработке. Предметные стекла с мазками или мазками-отпечатками обычно этикетируют алмазным карандашом.

Глава V. 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 относятся термическая фиксация в кипящей бане, на пламени горелки или 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. Лиофилизация 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 (10^{-3} — 10^{-4} мм рт. ст.) — 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 электронно-микроскопическом уровне. Лиофильная 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. Лиофилированные 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 первым относят обезвоживающие средства (метанол, этанол, ацетон), соли тяжелых металлов (сулема, хлорид платины), альдегиды (формальдегид, глутаральдегид, гидроксидипальдегид), кислоты (уксусная, трихлоруксусная, пикриновая, сульфосалициловая), пиридин и др. К сложным фиксаторам относят различные смеси фиксирующих веществ. В большинстве случаев фиксирующие смеси оказывают лучшее действие на результат фиксации, чем простые фиксаторы. Кроме этого, 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 фиксирующую жидкость.

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

5. Перед погружением в фиксатор материал не промывать водой. Если после погружения материала наступает 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, C_2H_5OH — легкоподвижная жидкость плотностью при $0^\circ C$ $0,806 \text{ г/см}^3$, кипит при $78,3^\circ C$, замерзает при $-110,5^\circ C$. 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 (обрати-

мые 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). О разбавлении этанолов см. стр. 261.

Способ применения. 1. Кусочки материала поместить в бюкс, заполненный этанолом. 2. Фиксировать: пленки — 15—30 мин, кусочки 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 в 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, CH_3OH — легкоподвижная жидкость плотностью при 0°C $0,79 \text{ г/см}^3$, 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 пинцетами и каждый мазок поставить в наклонном положении на фильтровальную бумагу для просушивания. 4. Провести соответствующую цитохимическую реакцию.

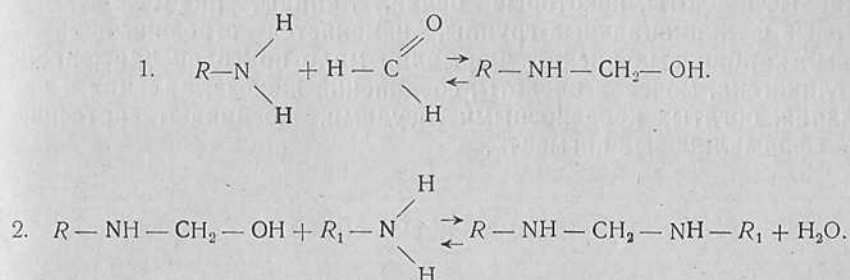
Примечание. Фиксацию метанолом применяют в гематологической, цитологической и цитохимической практике. Удовлетворительные результаты можно получить при изучении цитохимии ДНК, РНК, гистидина, сульфгидрильных групп, некоторых ферментов.

Ацетон, или диметилкетон, $\text{CH}_3-\text{C}-\text{CH}_3$ — летучая с характер-



ным запахом жидкость плотностью при 20°C $0,7980 \text{ г/см}^3$, кипит при $56,2^\circ\text{C}$, смешивается с водой в любых соотношениях, хороший органический растворитель. Применяется продолжительное время для фиксации тканей мозга при диагностике бешенства. Используется

Образовался метиленовый мостик, соединяющий два радикала. Реакция может протекать в обратном направлении, если промывать материал водой. В результате прежняя химическая структура тканей восстанавливается. Белковые функциональные группы, в частности аминные, аналогично реагируют с молекулой формальдегида:



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.

Способ применения. 1. Кусочки материала (0,5 см) поместить в раствор (чаще в 10%-ный) формалина на 24—48 ч при комнатной температуре или на несколько суток при температуре 0—5°C. 2. После окончания фиксации материал перенести в банки, завязать 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. Формалиновые смеси

В практике цито- и гистохимических исследований применяются формалиновые смеси, которые в зависимости от целей работы содержат вещества, улучшающие фиксирующие свойства формалина.

Солевой формалин. В состав смеси введен хлорид натрия, способствующий равномерной диффузии фиксатора в толщу материала. Концентрация соли создает осмотическое давление, аналогичное прижизненному.

Состав. Формалина 100%-ного — 100 мл, хлорида натрия — 8,5 г, проточной или дистиллированной воды — 900 мл.

Способ применения. Такой же, как в предыдущем методе.

Жидкость Бэкера (кальций-формол). Добавление к формалину ионов кальция стабилизирует содержание и локализацию в тканях многих веществ и, прежде всего, липидов (особенно фосфатидов) путем образования сложных комплексных соединений с химическими компонентами клеток. Считают, что хлорид кальция действует осмотически, предохраняя ткани от диффузии липидов. Кроме этого, фиксатор повышает проницаемость мембран клеток для молекул некоторых субстратов — глицерофосфата, нафтолфосфата, при изучении гистохимии энзимов. Хлорид кальция способствует максимальному сохранению содержания липидов в материале (например, в мозжечке — до 90% от исходного количества).

Состав. Применяется несколько прописей жидкости Бэкера:

1. Основная пропись жидкости Бэкера: безводный хлорид кальция — 1 г, 100%-ный формалин — 10 мл, дистиллированная вода — 90 мл. Продолжительность фиксации — 16—24 ч.

2. Жидкость Бэкера в модификации Э. Пирса (1962) : 100%-ный формалин — 150 мл, хлорид кальция (1,3%-ный раствор) — 850 мл. Продолжительность фиксации — 16—24 ч.

3. Жидкость Бэкера в модификации Р. Лилли (1969) : безводный хлорид кальция — 1 г, безводный хлорид кадмия — 1 г, 100%-ный формалин — 10 мл, дистиллированная вода — 90 мл. Продолжительность фиксации 16—24 ч.

Способ применения. Такой же, как при использовании чистого формалина.

Фиксаторы Шабадаша (1949). В смеси удачно сочетаются фиксирующие свойства формалина, нитрата меди, нитрата кальция и этанола.

С о с т а в. Применяются две жидкости Шабадаша. Первая жидкость содержит этанола 96%-ного — 100 мл, нитрата меди — 1,8 г, нитрата кальция — 0,9 г, 100%-ного формалина — 10 мл. Вторая жидкость содержит этанола 96%-ного — 100 мл, нитрата кальция — 2,6 г, 100%-ного формалина — 10 мл.

Способ применения. 1. Небольшие кусочки материала (2—3 мм) поместить на 3—4 ч в первую жидкость Шабадаша. 2. Перенести на 24—48 ч во вторую жидкость Шабадаша или в 96%-ный этанол. В процессе фиксации фиксатор несколько раз заменять свежими порциями. 3. Материал залить в парафин или целлоидин.

Примечание. Один из лучших фиксаторов для гликогена. Применяется для фиксации некоторых белковых веществ и МПС. А. Л. Шабадаш (1949) для максимального сохранения в тканях гликогена рекомендует сразу после убоя подопытного животного вводить внутривенно первую жидкость, промыв перед этим сосуды 10—12%-ным раствором нитрата калия с добавлением флоридзина (на 100 мл раствора — 0,45 г флоридзина).

Смесь Шаффера. Универсальный фиксатор, применяется в морфологии и гистохимии. В смеси удачно сочетаются фиксирующие свойства формалина и этанола. Существует основная пропись и модификации.

С о с т а в. 1. Основная пропись смеси Шаффера: этанол 80%-ный — 2 части, неразбавленный формалин — 1 часть.

2. Смесь Шаффера в первой модификации В. В. Виноградова: 10—12%-ный раствор нейтрального формалина — 1 часть, этанол 96%-ный — 4 части.

3. Смесь Шаффера во второй модификации В. В. Виноградова: 10—12%-ный раствор нейтрального формалина — 1 часть, этанол 96%-ный — 9 частей.

Способ применения. 1. Кусочки материала (0,1—0,5 см) поместить в свежеприготовленную смесь Шаффера на 1—2 и больше суток. 2. Промыть материал в 96%-ном этаноле. 3. Приготовить замороженные срезы или залить в парафин.

Примечание. Основная пропись применяется для фиксации материала, предназначенного для различных морфологических и гистохимических исследований. Модификации В. В. Виноградова используют для фиксации материала, в котором будут изучаться мукполисахариды. Хорошие результаты получены при фиксации белков.

Формалиновые фиксаторы Лилли. Используется первый и второй формалиновые фиксаторы Лилли. В их состав входят нитрат свинца, формалин, дистиллированная вода и этанол. Нитрат свинца обеспечивает осаждение и денатурацию белков тканей. Равно-

мерная фиксация материала достигается наличием в смеси формалина и этанола. Карбонильная группа формальдегида легко и в большинстве случаев обратимо взаимодействует с белковыми функциональными группами. Этанол вызывает обратимое осаждение белковых молекул (в результате снятия с них сольватных оболочек). Кусочки фиксированного материала равномерно уплотняются, а после последующей обработки восстанавливают свои нативные свойства и возвращаются в состояние, близкое к прижизненному.

С о с т а в. 1. Первый формалиновый фиксатор Лилли: нитрат свинца — 8 г, неразбавленный формалин — 10 мл, дистиллированная вода — 10 мл, этанол 96%-ный — 80 мл.

2. Второй формалиновый фиксатор Лилли: нитрат свинца — 8 г, неразбавленный формалин — 10 мл, дистиллированная вода — 11 мл, этанол 96%-ный — 79 мл.

Для приготовления фиксатора нитрат свинца растворяют в 3—5 мл воды, добавляют некоторое количество этанола до появления легкой мути, последнюю растворяют, добавляя остальное количество воды, этанола и формалин до объема 100 мл.

С п о с о б п р и м е н е н и я. 1. Кусочки материала (до 0,5 см) поместить в фиксатор. 2. Сроки фиксации определяются температурой среды: при 25—30°C фиксировать 24 ч, при 0—5°C — 2—3 суток, при —75°C — 10—14 дней. 3. Фиксированные ткани подвергнуть дальнейшей обработке: приготовить замороженные срезы или парафиновые и целлоидиновые блоки.

П р и м е ч а н и е. Фиксаторы применяются при изучении гистохимии мукополисахаридов и мукопротеинов. Фиксация материала при низких температурах почти не вызывает деформации тканевых структур и максимально сохраняет их прижизненный химический состав.

З а б у ф е р н ы й н е й т р а л ь н ы й р а с т в о р ф о р м а л и н а. Использование чистого формалина в качестве фиксатора приводит к возникновению артефактов (сильное сжатие материала, деформация клеток, возникновение отложений «формалинового пигмента»). Лилли (1969 г.) предложил применять в качестве фиксатора забуферный раствор, в котором уменьшается отрицательное действие формалина и обеспечивается надежная фиксация материала. Реакция забуферного раствора, благодаря наличию фосфатов натрия, близка к нейтральной (рН крови человека равен 7,36).

С о с т а в. Неразбавленный формалин — 100 мл, дистиллированная вода — 900 мл, гидрофосфат натрия — 4 г, дигидрофосфат натрия — 6,5 г.

С п о с о б п р и м е н е н и я. Обычный при фиксации формалином. Продолжительность фиксации — 24—72 ч.

С м е с ь Р у ж а. В смеси сочетаются фиксирующие свойства формалина и быстрая способность проникать в ткани уксусной кислоты. Последняя предохраняет материал от чрезмерного сморщивания.

С о с т а в. Неразбавленный формалин — 20 мл, ледяная уксусная кислота — 1 мл, дистиллированная вода — 100 мл.

Способ применения. Обычный при фиксации формалином.

Примечание. Наличие в смеси уксусной кислоты дает возможность максимально сохранить неизменными ядра, хромосомы, мембраны, частично митохондрии. Применяется для фиксации материала, в котором изучается морфология тканей, нуклеиновые кислоты, белки и др.

Смесь Пирсона. При постановке гистохимических реакций на энзимы в срезах материала, фиксированного в формалине, возникают артефакты — диффузия конечных продуктов ферментативных реакций. Их можно предупредить введением в состав фиксатора сахарозы, в результате чего в тканях создается осмотическое давление, близкое к прижизненному.

С о с т а в. Неразбавленный формалин — 10 мл, сахароза — 15 г, концентрированный раствор аммиака — 1 мл, дистиллированная вода (рН=6,7) — 100 мл.

Способ применения. 1. Кусочки материала (до 0,5 см) поместить в смесь на 16—24 ч (лучше в холодильнике). 2. Приготовить замороженные срезы или подвергнуть дальнейшей обработке.

Примечание. Фиксатор эффективен при фиксации материала, предназначенного для изучения холинэстераз: АХЭ и ПХЭ.

§ 3. Жидкость Карнуа

Используется в качестве фиксатора для нуклеиновых кислот, белков, белковых функциональных групп, гликогена, мукополисахаридов, многих ферментов, минеральных веществ, продуктов промежуточного метаболизма. В составе смеси удачно сочетаются фиксирующие свойства этанола, хлороформа и уксусной кислоты. Это дает возможность фиксатору легко и надежно проникать в толщу тканей, быстро осаждавать белки, сохранять реакционную способность многих белковых функциональных групп, препятствовать диффузии отдельных соединений в фиксатор и др.

С о с т а в. Применяется основная пропись и модификации.

1. Основная пропись жидкости Карнуа: абсолютный этанол — 6 частей, хлороформ — 3 части, ледяная уксусная кислота — 1 часть.

2. Модификация Лилли (1969 г.): абсолютный этанол — 75 мл, ледяная уксусная кислота — 25 мл.

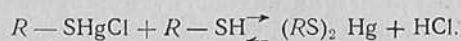
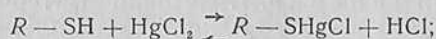
Способ применения. 1. Кусочки материала (3—5 мм) поместить в свежеприготовленную жидкость и фиксировать в течение 0,5—4 ч при 20—25°C или 18—24 ч при 3—5°C. 2. Перенести в абсолютный этанол. 3. Залить в парафин или целлоидин (если такой возможности нет, материал хранить нужное время в 70—80%-ном этаноле).

Примечание. Фиксация материала лучше протекает при низких температурах. Нельзя держать материал дольше указанных сроков.

§ 4. Сулема и сулемовые фиксаторы

Сулема, или хлорид ртути (II), HgCl_2 — 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 сродством 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.

Состав. Для приготовления насыщенного раствора сулемы нужно в 1 л горячей дистиллированной воды растворить 60 г сулемы (*осторожно!*), взболтать, 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, боль-

ше 3 мм — около 6—12 ч. Окончание фиксации определяется по равномерной беловатой окраске поперечного разреза. 3. Перенести в 70%-ный этанол (держать 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 иода (*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 нужно подходить осторожно.

Сулема — 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 — 6 мл.

Способ применения. 1. Кусочки материала (до 0,3 см) поместить в фиксатор на 0,5—24 ч (в зависимости от природы материала). 2, 3, 4, 5 и 6 пункты — см. стр. 34—35.

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. Сулема — 4,5 г, хлорид натрия — 0,5 г, дистиллированная вода — 80 мл, трихлоруксусная кислота — 2 мл, ледяная уксусная кислота — 4 мл, неразбавленный формалин — 20 мл.

Способ применения. 1. Кусочки материала (0,1—0,3 см) поместить в жидкость на 1—24 ч. 2, 3, 4, 5 и 6 пункты — см. стр. 34—35.

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.

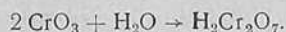
Состав. Сулема — 6 г, безводный ацетат натрия — 1,25 г, дистиллированная вода — 90 мл. Смешать, растворить и добавить в смесь 10 мл неразбавленного формалина.

Способ применения. 1. Кусочки материала (до 0,5 см) поместить в смесь. 2. Продолжительность фиксации — 12—14 ч (печень грызунов фиксировать больше недели). 3, 4, 5 и 6 пункты — см. стр. 35.

Примечание. Фиксатор используют согласно рекомендациям специальных методик.

§ 5. Хромовая кислота и ее соли

Хромовую кислоту получают из хромового ангидрида — кристаллического вещества красно-коричневого цвета — по уравнению реакции



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 типа Cr—O—Cr. Эти комплексы, 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 $K_2Cr_2O_7$ — 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.

С о с т а в. Дихромат калия — 2,5 г, сулема — 5 г, дистиллированная вода — 100 мл.

С п о с о б п р и м е н е н и я. 1. Кусочки материала поместить в смесь на 1—3 суток. 2. 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.

С о с т а в. Дихромат калия — 2—2,5 г, сульфат натрия — 1 г, дистиллированная вода — 100 мл.

С п о с о б п р и м е н е н и я. 1. Кусочки материала (до 0,5 см) фиксировать 1—24 ч (в зависимости от природы и толщины материала). 2. Промывать в проточной воде 20—24 ч. 3. Подвергнуть дальнейшей обработке (приготовить замороженные срезы или залить в парафин).

3. Жидкость Рего.

Используют для фиксации митохондрий и отдельных групп липидов.

С о с т а в. 3%-ный раствор дихромата калия — 80 мл, неразбавленный формалин — 20 мл.

С п о с о б п р и м е н е н и я. 1. Кусочки материала (до 0,5 см) поместить в фиксатор на 4 суток (жидкость менять ежедневно). 2. Перенести в 3%-ный раствор дихромата калия на 8 дней. 3. Промыть в проточной воде (сутки). 4. 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.

С о с т а в. 5%-ный раствор дихромата калия — 80 мл, неразбавленный формалин — 20 мл, ледяная уксусная кислота — 5 мл.

С п о с о б п р и м е н е н и я. 1. Кусочки материала (до 0,5 см) поместить в смесь на 24—48 ч. 2. Перенести на 5—8 суток в 3%-ный раствор дихромата калия. 3. Промыть в проточной воде (сутки). 4. Провести дальнейшую обработку (обезводить в спирте в течение 24 ч, залить в парафин через ксилол или сероуглерод).

Примечание. Заливку в парафин проводить быстро.

5. Жидкость Ценкера.

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

С о с т а в. Дистиллированная вода — 100 мл, дихромат калия — 2,5 г, сульфат натрия — 1 г, сулема — 5 г, неразбавленный формалин — 10 мл.

С п о с о б п р и м е н е н и я. 1. Кусочки материала (размером до 0,5 см) поместить в смесь на 6 ч. 2. Промыть в проточной воде (сутки). 3, 4, 5, 6-й пункты — см. стр. 35.

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

§ 6. Пикриновая кислота и пикриновые фиксаторы

Пикриновая кислота (от гр. *πίκρός* — горький), или 2, 4, 6-тринитрофенол. Кристаллическое вещество желтого цвета с температурой плавления 122,5°C. Растворима в воде: в 100 мл при 20°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 хлорпикрина. Хранить в воде. Не растирать в ступке — возможен взрыв. Используют как фиксатор в микроскопической технике и гистохимии.

П р и н ц и п д е й с т в и я. Пикриновая кислота легко диффундирует в ткани. Вызывает коагуляцию белков. При этом образуются солеобразные соединения, в которых белковая часть является катионом, остаток пикриновой кислоты — анионом. Реакция осаждения белков ускоряется наличием в фиксирующих жидкостях небольших количеств примесей других кислот.

Н а с ы щ е н н ы й р а с т в о р п и к р и н о в о й к и с л о т ы. В чистом виде пикриновая кислота для фиксации применяется редко. Насыщенный раствор служит основой для приготовления многих фиксирующих жидкостей.

С о с т а в. 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.

С м е с ь Б у э н а. Смесь содержит пикриновую кислоту, которая вызывает коагуляцию белков, формальдегид — он обратимо связывает белковые функциональные группы — и уксусную кислоту — ускоряет диффузию фиксаторов.

С о с т а в. Насыщенный раствор пикриновой кислоты — 15 мл, неразбавленный формалин — 5 мл, ледяная уксусная кислота — 1 мл.

С п о с о б п р и м е н е н и я. 1. Кусочки материала (размером до 0,5 см) поместить в смесь на время от 1 до 24 ч. 2. Промыть

в нескольких порциях 80%-ного этанола до исчезновения желтой мути. 3. Подвергнуть дальнейшей обработке (приготовить срезы или блоки).

Примечание. Смесь не вызывает артефактов при фиксации. Материал может длительно находиться в фиксаторе. Смесью 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.

С о с т а в. Насыщенный раствор пикриновой кислоты в 96%-ном этаноле — 85 мл, неразбавленный формалин — 10 мл.

С п о с о б п р и м е н е н и я. 1. Кусочки материала (до 0,5 см) поместить в смесь на 1—4 ч. 2. Промыть в нескольких порциях 80%-ного этанола. 3. Провести через ряд спиртов (80%-, 96%- и 100%-ном этаноле), по два раза в каждом. 4. Просветлить в кислоте. 5. 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 лучшие, чем при лиофильной сушке.

Смесь Буэна — Аллена. Готовить перед употреблением. Перед фиксацией смесь нагреть до $37-38^{\circ}\text{C}$. Используют при фиксации материала, предназначенного для изучения нуклеиновых кислот и при карнологических исследованиях.

С о с т а в. Насыщенный раствор пикриновой кислоты — 75 мл, неразбавленный формалин — 25 мл, ледяная уксусная кислота — 5 мл. Нагреть до $37-38^{\circ}\text{C}$, добавить 1,5 г химически чистого хромового ангидрида, после растворения его кристаллов — 2 г мочевины. Полученный прозрачный темно-коричневый раствор годен к употреблению.

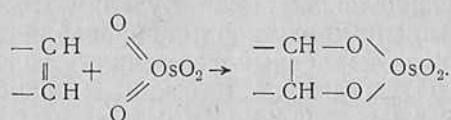
С п о с о б п р и м е н е н и я. 1. Кусочки материала (до 0,5 см) поместить в фиксатор на 2—3 ч. 2. Дать остыть смеси. 3. Материал перенести в 70%-ный этанол. 4. Провести дальнейшую обработку материала (приготовить замороженные срезы или залить в блоки).

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

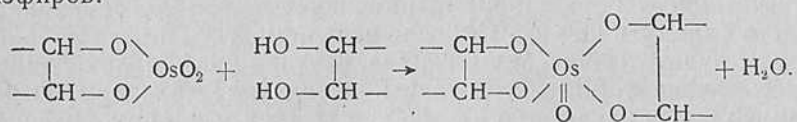
§ 7. Четырехокись осмия и осмиевые фиксаторы

Четырехокись осмия OsO_4 часто называют «осмиевой кислотой». Это кристаллическое вещество бледно-желтого цвета с температурой плавления $40,6^{\circ}\text{C}$ и температурой кипения $131,2^{\circ}\text{C}$. 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 четырехокиси осмия. Водный раствор нейтрален. Лучший фиксатор для электронной микроскопии и электронной гистохимии.

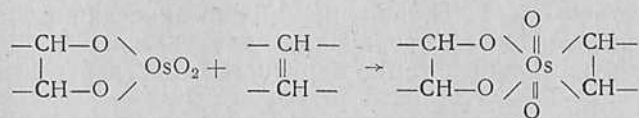
Принцип действия. Под действием OsO_4 в тканях возникают физико-химические изменения, обеспечивающие сохранность в клетках различных химических соединений и прижизненной структуры. Четырехокись осмия вызывает нежную коагуляцию коллоидов клетки. Образуется гель, имеющий мицеллярную и даже мономолекулярную структуру. Фиксатор легко взаимодействует с липидами и, особенно, с нейтральными жирами, молекулы которых содержат остатки непредельных карбоновых кислот (олеиновой, линолевой, линоленовой). Согласно Пирсу здесь происходит разрыв двойных связей:



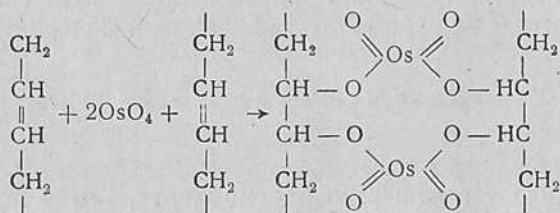
Полученное соединение может взаимодействовать с веществами, содержащими гидроксильные группы, образуя соединения типа диэфиров:



В некоторых случаях (при избытке других непредельных соединений) возникают биоконплексные соединения с координационными связями:



Участки молекул непредельных жирных кислот могут взаимодействовать с фиксатором следующим образом:



Установлен ряд активности четырехокиси осмия в зависимости от химической природы функциональных групп: SH-группа > > C=C-группа > концевая NH_2 -группа > S—S-группа > CHO-группа > концевая OH-группа > OH-группа прилегающего аро-

матического кольца. 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. Чистая четырехокись осмия употребляется редко из-за малой диффузии в толщу материала. Ее раствор служит основой для приготовления ряда смесей.

С о с т а в. 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.

С п о с о б п р и м е н е н и я. 1. На дно широкогорлой банки с притертой пробкой налить нужное количество раствора четырехокси осмия, поставить мазки или мазки-отпечатки так, чтобы они не соприкасались с жидкостью, но подвергались действию паров. 2. Банку закрыть; тонкие мазки фиксировать 30—60 мин, толстые—1—3 ч. 3. 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.

С о с т а в. 2%-ный раствор четырехокси осмия—20 мл, 1%-ный раствор хромовой кислоты—75 мл, ледяная уксусная кислота—5 мл.

С п о с о б п р и м е н е н и я. 1. Кусочки материала (2—2,5 мм) поместить в смесь на 1—3 суток. 2. После фиксации промыть в темноте в проточной воде в течение 24 ч. 3. Обезводить в спиртах. 4. Просветлить в ксилоле. 5. Залить в парафин.

Примечание. Отличный фиксатор для липидных соединений и др.

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

С о с т а в. 5%-ный раствор дихромата калия—1 часть, 2%-ный раствор четырехокси осмия—1 часть.

С п о с о б п р и м е н е н и я. 1. Кусочки материала (1—3 мм) поместить в смесь на сутки. 2. Промыть в проточной воде в течение 24 ч. 3. Обезводить в спиртах. 4. Просветлить в ксилоле. 5. 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.

С о с т а в. 1%-ный раствор хлорида платины—15 частей, 2%-ный раствор четырехокси осмия—4 части, ледяная уксусная кислота—1 часть.

§ 8. Сульфосалициловая кислота и ее фиксаторы

Сульфосалициловая кислота относится к ароматическим кислотам. Молекулярная масса — 218,17, температура плавления 120°C, хорошо растворима в воде в любых соотношениях, этаноле и диэтиловом эфире. Гигроскопична. При медленном испарении растворителя 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. Не пригодна для постановки реакции Браше.

§ 9. Трихлоруксусная кислота

Трихлоруксусная кислота CCl_3COOH — 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 — $1,3 \cdot 10^{-4}$ при 20°C. 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 готовят 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 готовят контрольные гистологические препараты.

§ 10. 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%-ный раствор нейтрального формалина, а также фиксаторы Буэна, Санномия, Шаффера, Буэна — Аллена. При проведении цитологических исследований можно в качестве фиксаторов рекомендовать жидкости Шампи, Буэна, Карнуа, Флемминга, 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 кислоте и жидкости Шабадаша. 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 Чначчио, 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 Шабадаша 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.

Глава VI. 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. Ма-

териал 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 столик. Замораживание объектов на таких микротоме достигается или применением углекислотной установки, или с помощью термоэлектрического охлаждающего столика ТЭС (рис. 3). Работать с этими приборами нужно строго по инструкциям, прилагаемым к ним.

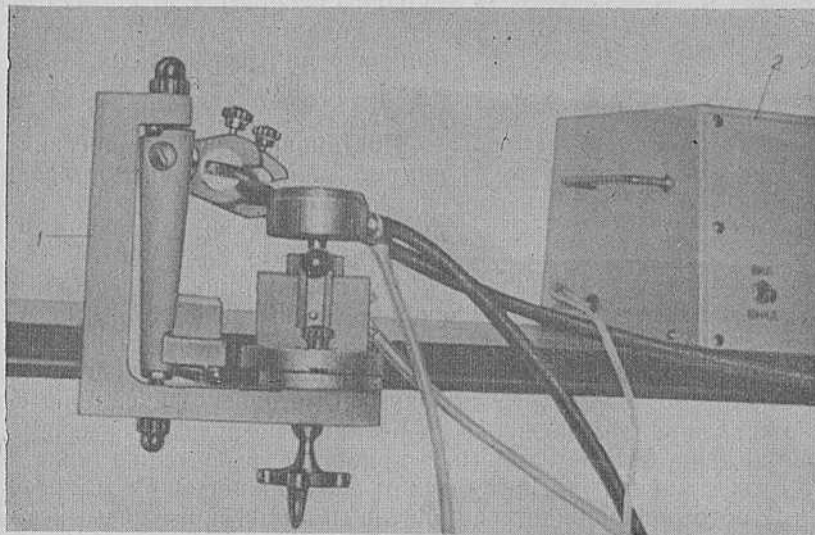


Рис. 3. Микротом замораживающий модели «х»:
1 — термоохлаждающий столик ТЭС-2; 2 — селеновый выпрямитель.

На поверхность замораживающего столика кладут мокрую прокладку из фильтровальной бумаги, затем на нее наносят несколько 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 ткани в криостате. Сейчас во многих отечественных лабораториях используется микротом-криостат МК-25 (рис. 4). На нем получают срезы

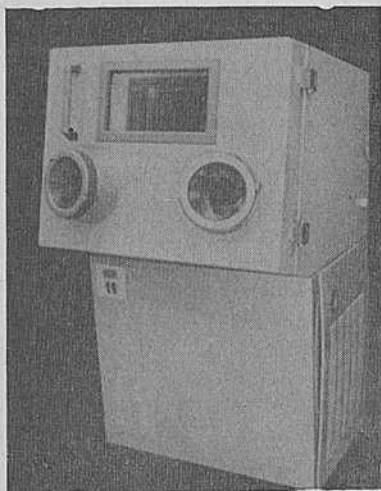


Рис. 4. Микротом-криостат МК-25.

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.

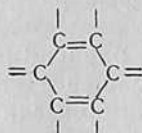
4. Для каждой серии гистохимических препаратов ставить соответствующий гистохимический контроль, предусмотренный методикой.

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, 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), 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 о 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 люминесцентного 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. Такими группами являются $-\text{N}=\text{N}-$, $-\text{C}\equiv\text{C}-$, $-\text{C}=\text{C}-$, $-\text{C}=\text{O}$, $-\text{COOH}$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{C}=\text{N}-$, $-\text{C}=\text{S}$, $-\text{N}=\text{O}$, $-\text{NO}_2$ и др. Особое значение имеет образование хиноидных структур:



Хромофорными свойствами обладают вещества, молекулы которых содержат ядра антрацена, хинолина, нафталина, пиридина, бензола, пиримидина, пиррола. На возникновение окраски оказывают

существенное влияние полярные группы — ауксохромы, к которым относятся фенольная —OH, аминогруппы —NH₂ (первичная), —NH—CH₃ (вторичная) и —N—CH₃ (третичная), CH₃—O—, хлор,



—SH, бром и др. Под влиянием ауксохромов красящее вещество способно закрепляться на тканях, усиливается и часто углубляется 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 (—NO₂) и одна — ауксохромов (—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 диформазанов 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, 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 в начале 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 в 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 — оригановое, 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 прописей 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 пришлифованной пробкой сосуд. Затем наливают растворитель (ксилол, бензол, толуол и др.) с таким расчетом, чтобы жидкость полностью покрыла смолу, и оставляют до полного растворения (иногда для ускорения процесса смесь ставится в термостат при 37—40°). Если возникает консистенция жидкого меда, бальзам готов к употреблению. Раствор бальзама обычно имеет слабокислую реакцию. Если такая реакция наносит вред гистохимическому препарату, то для нейтрализации бальзама в смесь добавляют щепотку карбоната натрия или калия. Сосуд закрывают. Для повседневного пользования в небольшой флакон наливают раствор бальзама, закрывают его хлорвиниловой пробкой или картонной крышечкой. В середине крышечки прокалывают дырку для стеклянной палочки, с помощью которой наносят бальзам на предметное стекло. Вместо канадского бальзама иногда пользуются его заменителями — кедровым или пихтовым 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 консистенции жидкого меда. Если раствор полистирола становится в банке густым, нужно добавить немного ксилола (толуола). Если раствор

слишком жидкий, открыть пробку и дать улетучиться нужному количеству растворителя. Чтобы полистирольная пленка на срезах была прочной и эластичной, в раствор добавляют пластификатор — дибутилсебацат. Методика заключения простая: 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, растворяются в органических растворителях, которые применяются для обезвоживания 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 — белкового вещества животного происхождения, которое получают после выварки костей, хрящей, обрезков кожи и т. д. Содержит еще фенол — C_6H_5OH .

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 $CH_2OH-CHOH-CH_2OH$ — 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 микроструктуры 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 Апати. Состоит из гуммиарабика (прозрачной смолы аравийской акации), сахарозы и тимола. Используют для заключения срезов, предназначенных для изучения мукополисахаридов, плазмалы, многих липидов и ферментов. Рекомендуется 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 физико-химические процессы, что в материале, из которого готовились замороженные срезы (см. стр. 44).

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. Пара-

фин и целлоидин нерастворимы в воде. 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 спиртов с различной концентрацией (50%, 60, 70, 80, 96 и 100%, причем последние два спирта взять по два раза), а также для промежуточных и основной сред. Если материал после фиксации промывали этанолом меньшей концентрации, то обезвоживание нужно начинать со следующего за ним спирта. Например, материал промывали в 70%-ном этаноле, промывку 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, в следующих спиртах — от 12 до 24 ч. Кусочки материала размером 1 мм можно 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.

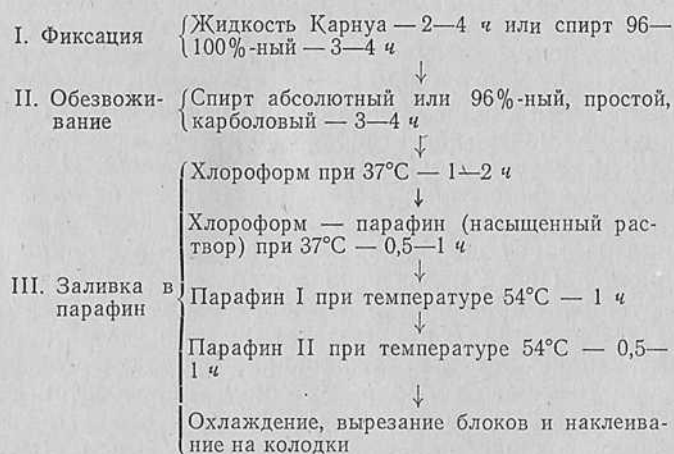
З а л и в к а в п а р а ф и н. Большинство веществ, прежде всего ферментов, изучают в срезах, приготовленных из материала, залитого в парафин. Парафин — это смесь предельных углеводородов с 20—30 атомами углерода. Для заливки материала применяют парафины, имеющие температуру плавления 52—56°C. Для пластичности 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 см^2 и толщину не более $3-5 \text{ мм}$, можно рекомендовать схему, предложенную Г. И. Роскиным и Л. Б. Левинсоном (1957):

1) 40%-ный этанол — $2-4 \text{ ч}$; 2) 70%-ный этанол — $4-6 \text{ ч}$ (материал в нем можно сохранять продолжительное время); 3) 96%-ный этанол — $6-12 \text{ ч}$; 4) 100%-ный этанол — $6-12 \text{ ч}$ (дважды сменить раствор); 5) смесь 100%-ного этанола и ксилола (1 : 1) — $1-2 \text{ ч}$; 6) ксилол — $2-4 \text{ ч}$ (дважды сменить раствор); 7) ксилол — парафин (приготовить насыщенный раствор парафина в ксилоле, то есть растворить столько парафина, чтобы был его небольшой осадок) — $2-12 \text{ ч}$ при 37°C ; 8) парафин — $4-6 \text{ ч}$ при $55-56^\circ\text{C}$ (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 схеме Г. А. Меркулова (1969):



Можно применить более простой способ ускоренной заливки материала в парафин: 1. Кусочки тканей толщиной $2-3 \text{ мм}$ поместить на $30-90 \text{ мин}$ 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 $20-30 \text{ мин}$ в хлороформ. 4. Поместить в смесь бензол — парафин при 37°C (или хлороформ — парафин) на $20-30 \text{ мин}$. 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 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 нужный размер и форму (рис. 5). Перед заливкой края формочки смазывают глицерином, наливают горячий (58—60°C) парафин и переносят в нее кусочки материала.

Для заливки материала в парафин чаще всего применяют бумажные формочки, последовательные этапы изготовления которых (а—е) показаны на рис. 6. В коробочку наливают горячий (58—60°C) парафин, затем нагретым пинцетом или шпателем из термостата переносят кусочек материала и монтируют иглами

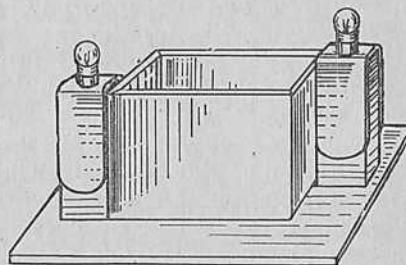


Рис. 5. Металлическая формочка для заливки материала в парафин.

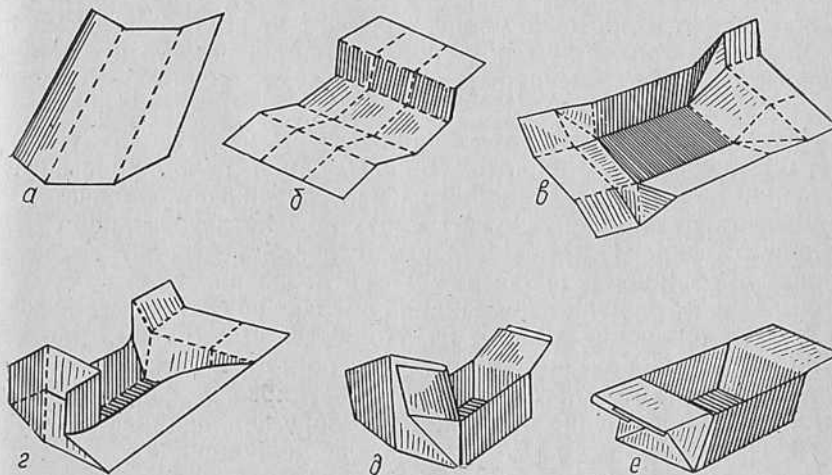


Рис. 6. Изготовление бумажной формочки для заливки материала в парафин или парафин — целлондин (по В. Г. Елисееву, 1954).

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 этикетировывают (делают надписи на колодочках).

З а л и в к а в ц е л л о и д и н. 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, обработывая 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 часо-

вым 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 микроструктуру 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. 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 в 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 готовят блоки.

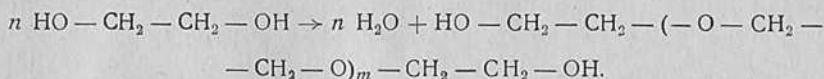
Для приготовления 2%-ного раствора целлоидина нужно взять 100 мл смеси 100%-ного этанола и диэтилового эфира (1 : 1) и добавить 2 г целлоидина. Кусочки материала перед внесением в хлороформ осушить фильтровальной бумагой.

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 готовят 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.

Заливка в желатину. Метод применяют для заливки кусочков органов, богатых соединительной тканью. Материал для заливки берут из яичников, матки, трубчатых органов кишечного тракта и др. Метод ценный при изучении в тканях локализации и содержания различных липидов, многих минеральных веществ и некоторых ферментов. Используют для заливки эмбрионального материала.

Существует много вариантов заливки в желатину. Перед заливкой готовят рабочие растворы: 1%-ный раствор фенола на дистиллированной воде и два раствора желатины на феноле: 12,5%-ный (жидкий) и 25%-ный (густой). Растворы готовят перед самой заливкой и хранят в холодильнике. Заливку проводят так.

1. Небольшие кусочки материала (до 0,5 см) после фиксации в жидкости Бэкера или 10%-ном растворе нейтрального формалина промывают в проточной воде.
2. Материал после промывки переносят в раствор жидкой желатины на 3—20 ч при 37°C.
3. После пропитывания жидкой желатиной материал поместить в 25%-ный раствор желатины на 3—20 ч при 37°C.
4. В формочки налить 25%-ный раствор желатины и немедленно перенести исследуемый материал.
5. Формочки охладить в холодной воде.
6. Вырезать небольшие блоки с таким расчетом, чтобы вокруг кусочка материала была каемка желатины толщиной 2—3 мм.
7. Уплотнить блоки в 20—25%-ном растворе формалина в течение суток.
8. Перенести для хранения в 10%-ный раствор формалина.
9. Приготовить срезы на замораживающем микротоме и поставить соответствующую гистохимическую реакцию.
10. Если требует гистохимический метод, желатину удаляют из срезов обработкой 10%-ным раствором КОН в течение 10 мин.
11. Срезы промыть в водопроводной воде, поставить гистохимическую реакцию.

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 специально для парафиновых срезов (рис. 7) и санный (рис. 8). 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 резания и наклона ножа. Нож укрепляют или

перпендикулярно к длиннику микротом (когда надо получить ленты срезов), или косо (при резании 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,

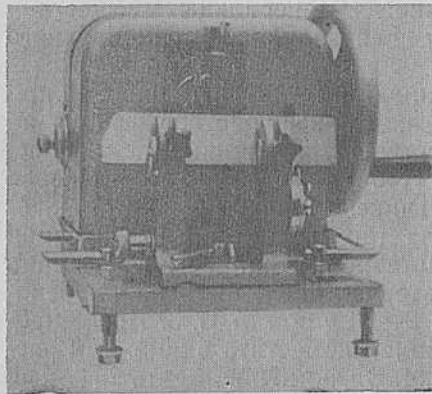


Рис. 7. Микротом для парафиновых срезов.

правильно подобраны углы резания и наклона ножа, лезвие острое, то срезы размещаются на поверхности ножа в виде ровной ленты (рис. 9, а). При неправильной обрезке блока срезы имеют угловатые контуры (рис. 9, б и в), при наличии зазубрин ножа — рвутся (рис. 9, г). С помощью санного микротом получают срезы толщиной 5—6 мкм, а при хорошей подготовке блоков даже 1—2 мкм.

При изготовлении срезов возможны погрешности, которые нужно своевременно распознать и устранить: 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 высокая темпера-

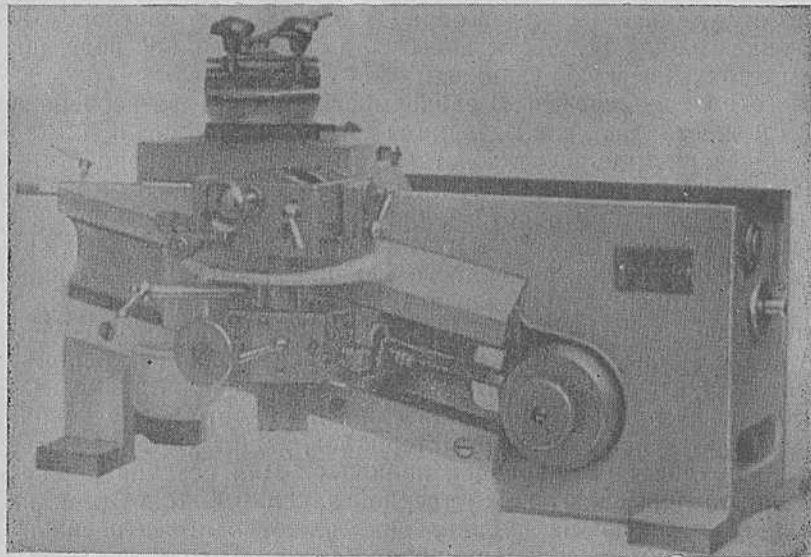


Рис. 8. Саный микротом МС-2.

тура 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 обезживание).

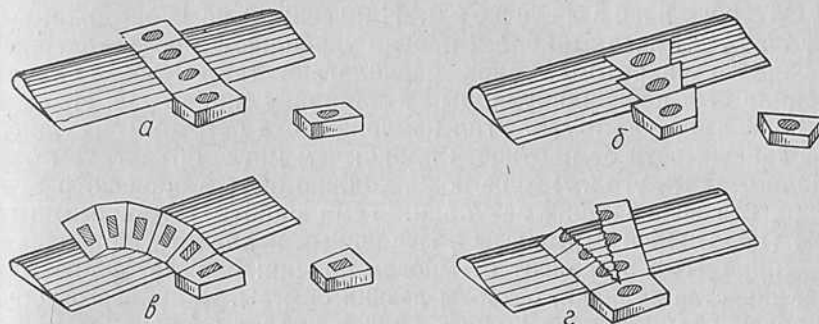


Рис. 9. Получение срезов из парафиновых блоков (по В. Г. Елисееву, 1956).

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 подводят 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 сушат 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°C и высушивают в термостате. Иногда срезы помещают прямо на предметное стекло, на которое предварительно

наносят несколько капель 30—40%-ного этанола, подогретого до 45—50°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 этикетировать.

Целлоидиновые срезы. Наклеенный на кубик блок вынимают из 70%-ного этанола и прочно укрепляют в объектодержателе санного микротомата. Блок располагают так, чтобы длинник материала был перпендикулярным к длиннику микротомата. 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, заполненную 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 дистилли-

рованную воду. 4. После промывки ставят соответствующую гистохимическую реакцию.

Целлоидин-парафиновые срезы. Резание блоков аналогично резанию парафиновых. Угол резания более прямой, чем при изготовлении 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). Изготовить 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.

Желатиновые срезы. Изготавливают на замораживающем и санном микротоме. Удобны для изучения гистохимии липидов и многих минеральных веществ. Приводим пропись приготовления срезов на санном микротоме:

1. Готовый блок приклеивают к кубичку густым (25%-ным) раствором желатины.
2. Переносят в 25%-ный раствор формалина на 12—24 ч (для уплотнения).
3. Закрепляют в объектодержателе.
4. Приготавливают срезы.
5. Мягкой кисточкой срезы переносят в 30%-ный этанол.
6. Срезы монтируют на обезжиренные предметные стекла.
7. Промокают срезы фильтровальной бумагой.
8. Высушивают в термостате при 37°C в течение 10—20 мин. Если позволяет метод, срезы покрывают смесью белка и глицерина.
9. Промывают в теплой воде при 37°C .
10. Ставят соответствующую гистохимическую реакцию.

Поливаксовые срезы. Резание блоков аналогично резанию парафиновых. Срезы переносят мягкой кисточкой в теплую воду, где они расправляются. Под нужный срез подводят обезжиренное предметное стекло и монтируют на нем будущий постоянный препарат. Срезы готовить небольшими партиями, сразу же вылавливать из воды и монтировать постоянные препараты, так как поливакс быстро растворяется в воде и срезы разрыхляются.

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 возникает 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: аптечный 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 затвердевающей 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 карбоваксовых 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.

Глава VII. 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 органелл, ультраструктур и даже молекул (рис. 10). 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 ультрамикрoхимическими, так как с их помощью удается 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

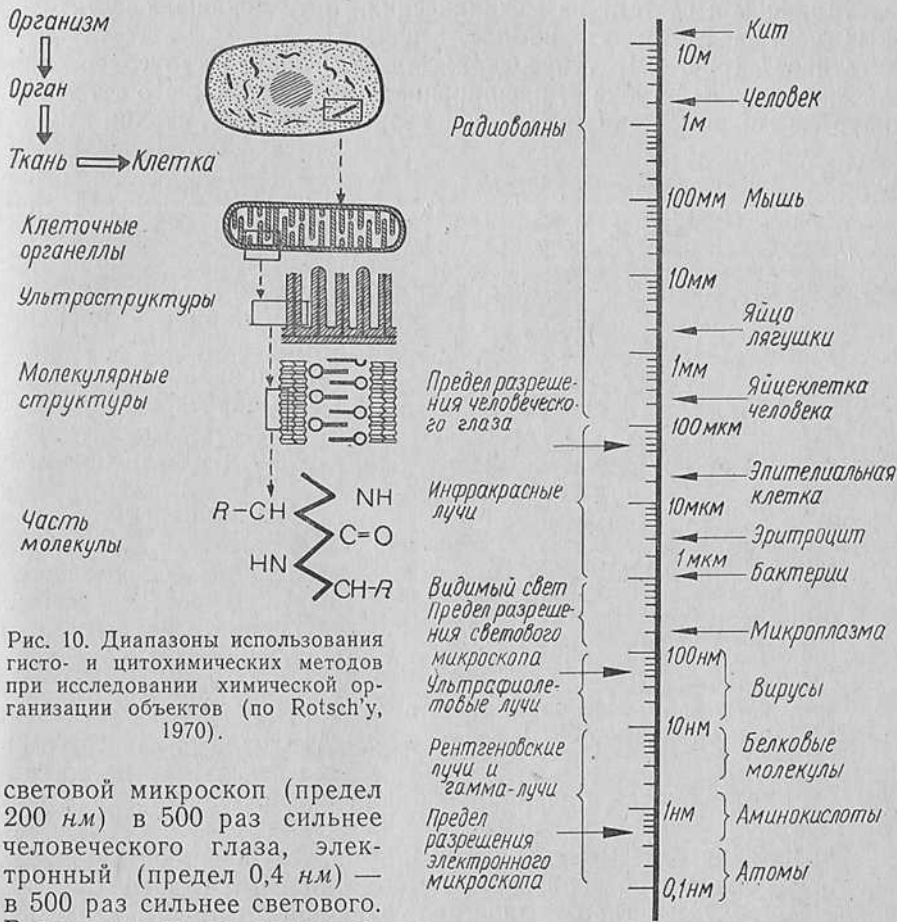


Рис. 10. Диапазоны использования гисто- и цитохимических методов при исследовании химической организации объектов (по Rotsch'y, 1970).

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 тканей, клеток и субклеточных структур (рис. 11). 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.

Рис. 11. Схема величин различных биологических объектов и возможные методы их выявления (по Вилли и Детье, 1974).

§ 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 1 (рис. 12), тубусодержатель 2, головка тубусодержателя 3, наклонный тубус 4, расширенная часть наклонного тубуса 5, коробка микромеханизма 6, револьверная система 7, столик микро-

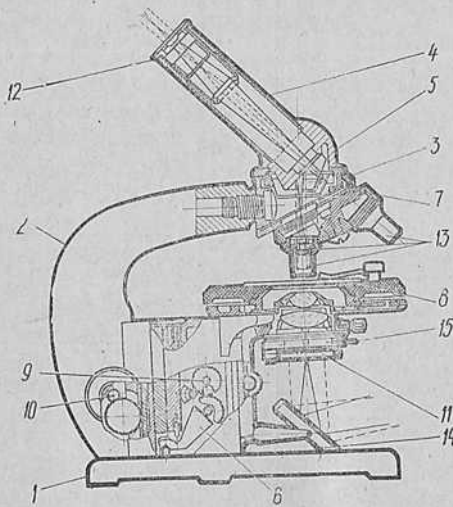


Рис. 12. Схема строения биологического микроскопа МБИ-1.

скопа 8, кремальера грубой наводки 9, микрометрический винт 10, винт конденсора 11. Для микрофотографирования прилагается вертикальная монокулярная насадка. Оптические части состоят из набора окуляров 12 (к микроскопу МБИ-1 прилагается три окуляра: х7, х10 и х15) и объективов 13 (к микроскопу МБИ-1 прилагается три объектива: х8, х40 и х90, последний — иммерсионный). В состав осветительного устройства входит зеркало 14, конденсор с ирисовой диафрагмой 15. 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—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 (рис. 13).

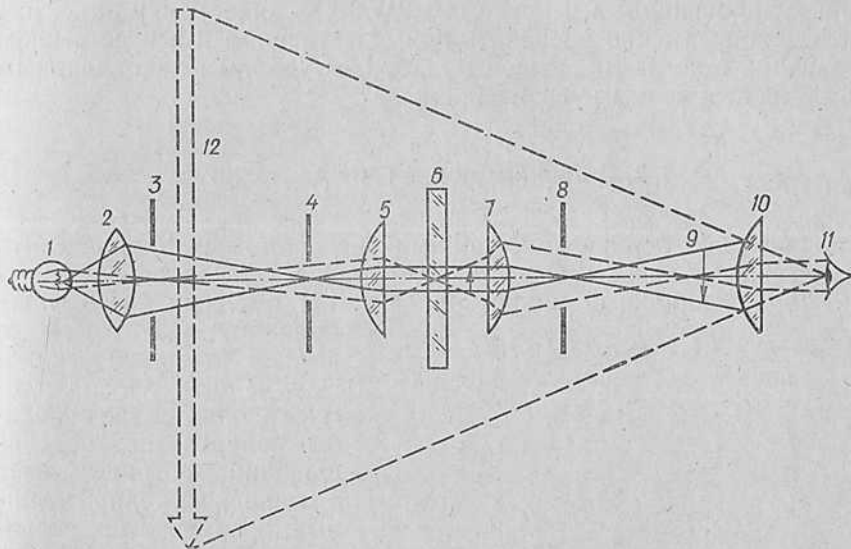


Рис. 13. Оптическая схема биологического микроскопа (по Л. А. Федину, 1965):

1 — источник света; 2 — коллектор; 3 — полевая диафрагма; 4 — апертурная диафрагма; 5 — конденсор; 6 — препарат; 7 — объектив; 8 — выходной зрачок объектива; 9 — действительное изображение объекта; 10 — окуляр; 11 — глаз наблюдателя; 12 — мнимое изображение объекта.

Разрешающую способность микроскопа определяют по формуле

$$a = 0,61 \cdot \frac{\lambda}{n \sin \alpha},$$

где a — минимальное расстояние между двумя точками препарата; λ — длина волны света; n — показатель преломления среды, которая находится между покровным стеклом препарата и объективом; $\sin \alpha$ — угол дифракции лучей. Величина знаменателя является постоянной для каждого объектива и называется его численной апертурой. Апертуру и увеличение обозначают на оправе объектива. Апертуру можно увеличить с помощью иммерсии. Так, n для иммерсионного масла равно 1,515, воды — 1,33, глицерина — 1,45. Повысить разрешающую способность микроскопа можно, уменьшая длину волны света. Так, при использовании зеленого света ($\lambda=0,55$) разрешающая способность микроскопа возрастает до 0,24 мкм, фиолетового ($\lambda=0,45$) — до 0,18 мкм.

Современные модели светового микроскопа обладают совершенной оптикой, устраняющей сферическую и хроматическую aberrацию. 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 (рис. 14) построен по тому же принципу, что и обыкновенный световой микроскоп.

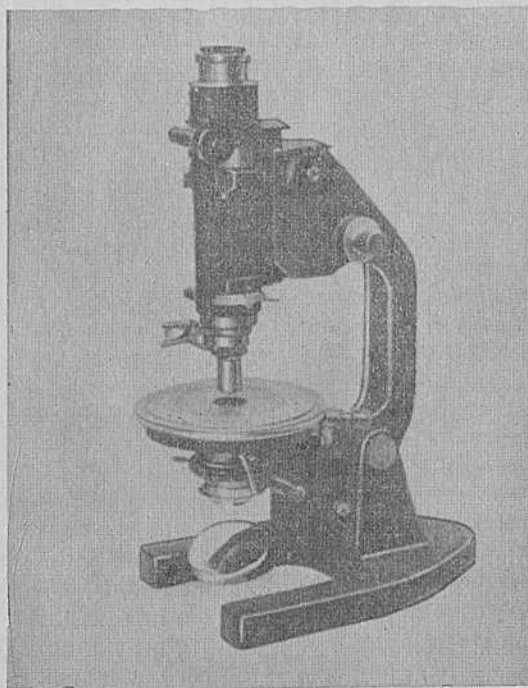


Рис. 14. Микроскоп поляризационный МИН-4.

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 (рис. 15), пройдя через поляризатор 1, конденсор 2, препарат 3, объектив 4, компенсатор 5, анализатор 6 и окуляр 7, 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 лучепреломле-

нием 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, задер-

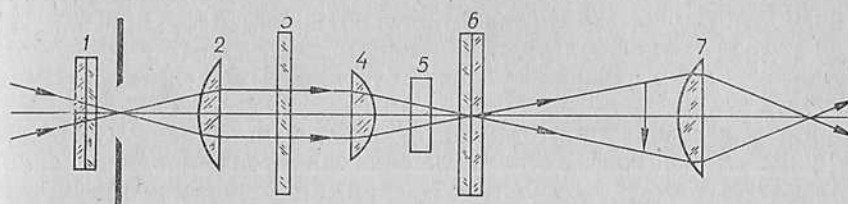


Рис. 15. Оптическая схема поляризационного микроскопа (по Л. А. Федину, 1965):

1 — поляризатор; 2 — конденсор; 3 — препарат; 4 — объектив; 5 — компенсатор; 6 — анализатор; 7 — окуляр.

жутся 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 асимметричная 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

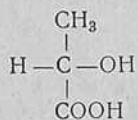
проходят такие лучи через волокна, состоящие из нуклеопротеидов, то возникает одноосное и отрицательное лучепреломление.

Структурная анизотропия наблюдается в тех случаях, когда ультрамикроскопические частицы, имеющие асимметрическое строение, определенным образом ориентированы в среде, имеющей иной 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 (Лилли, 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 изомерии 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, полипептиды, 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 (рис. 16) 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 1 (рис. 17) коллекторной линзой и зеркалом 4 направляются в конденсор 5, который их концентрирует на препарате 6. Последний в лучах уже собственной (первичной или вторичной) люминесценции изучается или фотографируется с помощью системы обычного светового микроскопа 7. Первый светофильтр 3

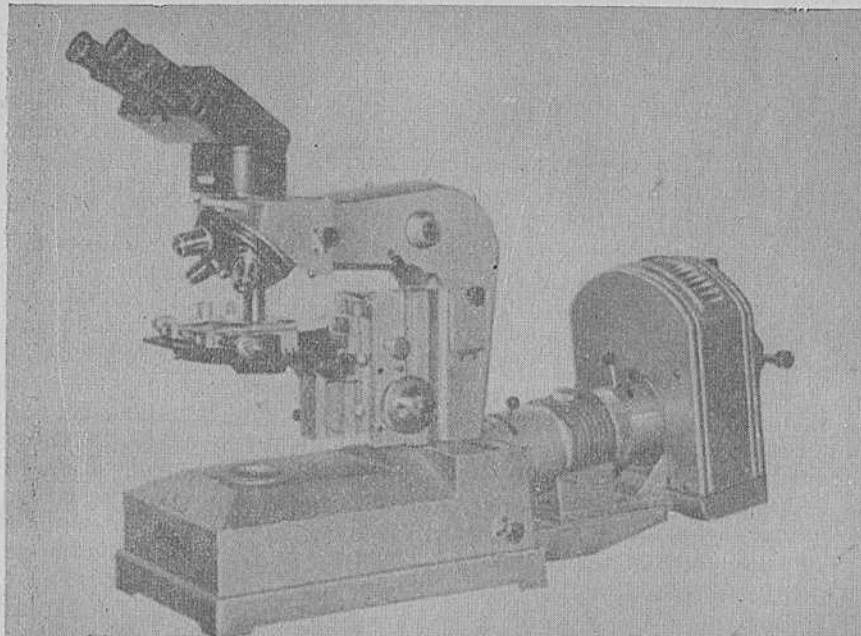


Рис. 16. Микроскоп люминесцентный МЛ-2.

из общей массы излучения пропускает те лучи, которые вызывают люминесценцию препарата — ультрафиолетовые и сине-фиолетовые. Второй (запирательный) светофильтр 9, 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-2б, 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 пропорциональна 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 η . Величина такого выхода для различных веществ неодинакова и колеблется от 0 до 100%. Она зависит от многих факторов: природы вещества, флуорохрома (при вторичной лю-

минесценции), растворителя, наличия посторонних примесей, особенно «тушителей» люминесценции (осмия, ртути, иода), рН, температуры. Квантовый выход люминесценции не зависит от длины волны света, который вызывает люминесценцию, лишь до определенного предела. 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» светофильтра 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, гранул — желтоватая флуоресценция. Отложения кальция имеют желтовато-белое, свободные порфирины — интенсивно-красное свечение. Для хлорофилла типична ярко-красная люминесценция. Канцерогенные вещества типа 3,4-бензпирена 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 количе-

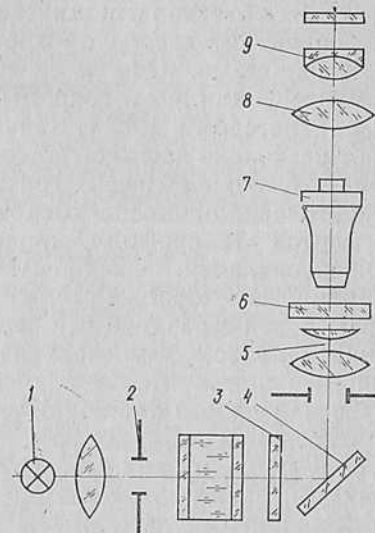


Рис. 17. Оптическая схема люминесцентного микроскопа (по Е. М. Брумбергу, 1965):

1 — источник света; 2 — полевая диафрагма коллектора; 3, 9 — светофильтры; 4 — зеркало осветителя; 5 — конденсор; 6 — препарат; 7 — объектив; 8 — окуляр.

ственный 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 Хайтингером в 1932 г. Сейчас в люминесцентном анализе применяют несколько десятков естественных и искусственных флуорохромов — тиазиновых, ксантогеновых, хинолиновых, акридиновых, азокрасителей, алкалоидов (берберин, кверцетин, хинин), естественных пигментов (хлорофилл, липохромы, порфирины), углеводов (дибензантрацен, бензпирен). 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 рН. Объект накрывают 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 люминесценция 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 рассматривании 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 конструкции фазово-контрастного микроскопа вместо ирисовой апертурной диафрагмы введена кольцевая диафрагма 1 (рис. 18), которая конденсором 2 и объективом 4 изображается в выходном

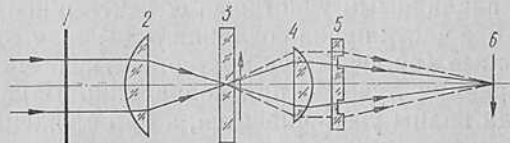


Рис. 18. Оптическая схема фазово-контрастного микроскопа (по Л. А. Федину, 1965):

1 — кольцевая диафрагма; 2 — конденсор; 3 — препарат; 4 — объектив; 5 — фазовая пластинка; 6 — изображение объекта.

зрачке объектива вблизи заднего фокуса, где размещена фазовая стеклянная пластинка 5 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, больший — 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 гисто- и цитологии. Служит контролем при проведении цитохимических исследований пунктатов костного мозга, количественного определения резистентности эритроцитов, изучения состояния и числа ретикулоцитов, тромбоцитов, пунктатов опухолей и др.

§ 5. Интерференционная микроскопия

Основана на тех же принципах, что и фазово-контрастная микроскопия. Применяется для выявления тканевых и клеточных структур на живом неокрашенном материале, дает их цветное контрастное изображение, используется для определения количества сухого вещества клетки, содержания в ней белковых соединений и других количественных вычислений.

В интерференционном микроскопе пучок параллельных лучей, идущий от источника света, раздваивается на две части: верхнюю (луч сравнения) и нижнюю (рабочий луч). Луч сравнения проходит мимо исследуемого объекта через среду, где находятся срезы (мазки, мазки-отпечатки). Рабочий луч проходит через объект, задерживается и запаздывает, происходит фазовый сдвиг. Величина такого запаздывания определяется показателями преломления света различными участками объекта и его толщиной. После препарата обе части пучка соединяются между собой. Поскольку они теперь разные (рабочий луч претерпел фазовый сдвиг), происходит интерференция лучей — при совпадении максимумов колебания амплитуда волны увеличивается, а при сложении максимума волны одного луча и минимума другого амплитуда волны уменьшается. Оптическая система микроскопа дает возможность видеть в одних частях препарата усиление, в других — ослабление освещенности. На препарате возникает цветное изображение тканевых или клеточных микроструктур.

Существует много моделей интерференционного микроскопа. Высокой оценки заслуживает интерференционно-поляризационный микроскоп МРІ-5, выпускаемый в ПНР. Общим принципом для таких микроскопов является то, что в фокальной плоскости конден-

сора 3 (рис. 19) перед осветителем размещается поляризатор 1 и призма Волластона 2, где и раздваивается пучок света. Оба луча проходят через конденсор 3, препарат 4 и в задней фокальной плоскости объектива 5 они соединяются второй призмой Волластона 6, где и происходит явление интерференции. Объединенный пучок

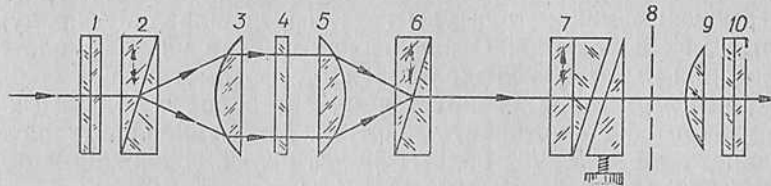


Рис. 19. Оптическая схема интерференционного микроскопа (по Л. А. Федину, 1965):

1 — поляризатор; 2, 6 — призмы Волластона; 3 — конденсор; 4 — препарат; 5 — объектив; 7 — компенсатор; 8 — плоскость изображения препарата; 9 — окуляр; 10 — анализатор.

чок световых лучей поступает в компенсатор 7, где по барабану винта можно измерить сдвиги фаз, которые произошли в зависимости от свойств изучаемых объектов. Изображение препарата возникает за компенсатором (плоскость 8) и рассматривается окуляром 9, который снабжен анализатором 10.

§ 6. 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 части 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 реакций. 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 и зависит от коэффициента экстинкции данного вещества K : $E = KCd$. Исходя из этого, содержание изучаемого вещества в клетке можно определить по формуле

$$C = \frac{E}{Kd}.$$

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 (рис. 20). 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 хромоскоп. Один из них изучают в синих, второй — в зеленых, третий — в красных

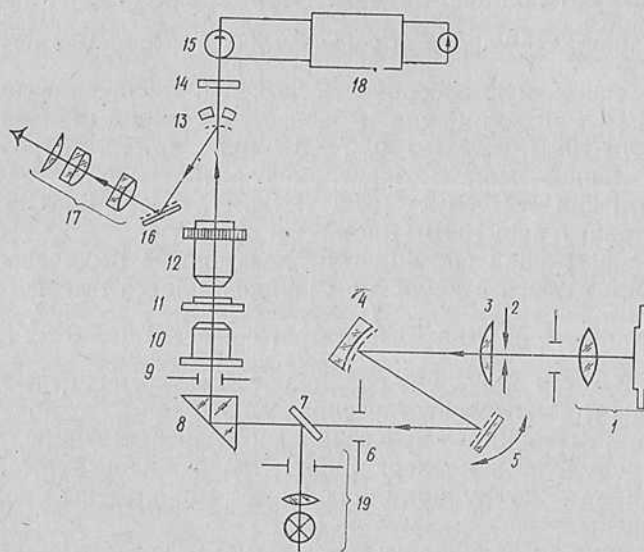


Рис. 20. Принципиальная схема однолучевого цитоспектрофотометра (по Н. В. Королеву и Л. С. Агроскину, 1957):

1 — осветитель; 2 — входная щель монохроматора; 3 — линза; 4 — вогнутое зеркало; 5 — дифракционная решетка; 6 — полевая диафрагма; 7 — пластинка; 8 — призма; 9 — апертурная диафрагма; 10 — конденсор; 11 — препарат; 12 — микрообъектив; 13 — вогнутое зеркало; 14 — фотозатвор; 15 — фотоумножитель; 16 — зеркальце; 17 — визирная труба; 18 — усилитель фототока; 19 — усилитель для визуальных наблюдений.

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 Зелигмана.

§ 7. 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: Elmiskop 1 (ФРГ), Tesla (ЧССР), Hitachi 11С (Япония), Jem 7 (Япония), Jem 100В (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 (см. главу III), 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 (рис. 21) от катода 1 — раскаленной вольфрамовой нити — направляется к аноду 2, проходит через его отверстие и фокусируется магнитной катушкой 3 на поверхности объекта 4. Магнитная катушка выполняет роль конденсора. Полученное изображение с помощью второй магнитной катушки — своеобразного объектива 5 — увеличивается. Поток электронов проходит через третью магнитную катушку, выполняющую функцию окуляра или проекционной линзы 6, после чего изображение объекта 7 увеличивается и изучается на флуоресцирующем экране или фотографируется. Введение в оптическую систему электронного микроскопа дополнительных линз дает 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 Å) 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, боенского, биопсийного, послеоперационного), его фиксации (префиксация и постфиксация), обезвоживании, пропитывании затвердевающей 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 гистохимии.

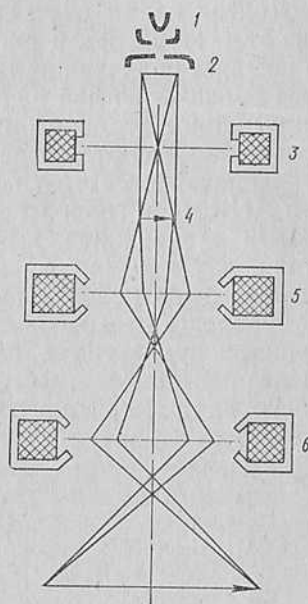


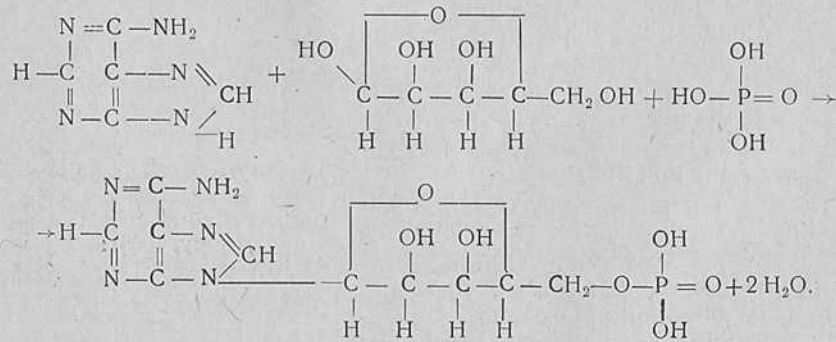
Рис. 21. Схема потока электронов в электронном микроскопе (по В. Ф. Машанскому, 1965):

1 — катод; 2 — анод; 3 — конденсор; 4 — объект; 5 — объектив; 6 — проекционная линза; 7 — конечное изображение.

Глава VIII. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Нуклеиновые кислоты — важнейшие органические соединения, с которыми связаны основные процессы жизнедеятельности организмов. Открыты Мишером в 1868 г. в ядрах клеток гноя. В дальнейшем выявлены 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 — животная и растительная. Животная нуклеиновая кислота 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, пентоз и фосфорной кислоты. Это можно проиллюстрировать 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 уридиловой кислот. Использование методов цитохимии и фракционирования клеточных структур показало, что обе нуклеиновые кислоты являются обязательными компонентами животных и растительных клеток. Оказалось,

кулярную массу — от 35 тыс. до 2 млн. 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. Растворимая, или транспортная, РНК (s-РНК, или т-РНК) представлена более чем 20 разновидностями, свойственными для каждой

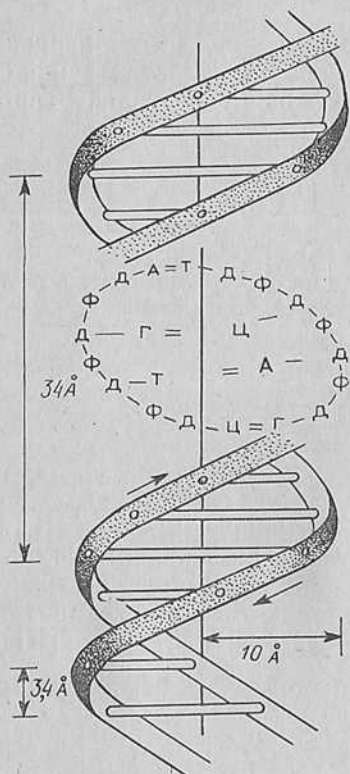


Рис 22. Схема строения молекулы ДНК.

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

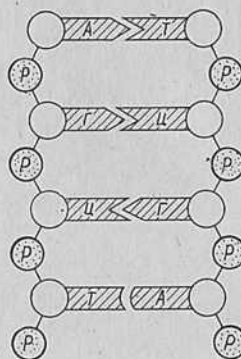


Рис. 23. Соединение нуклеотидов в молекуле ДНК.

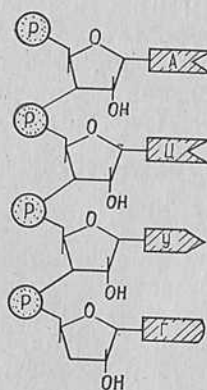


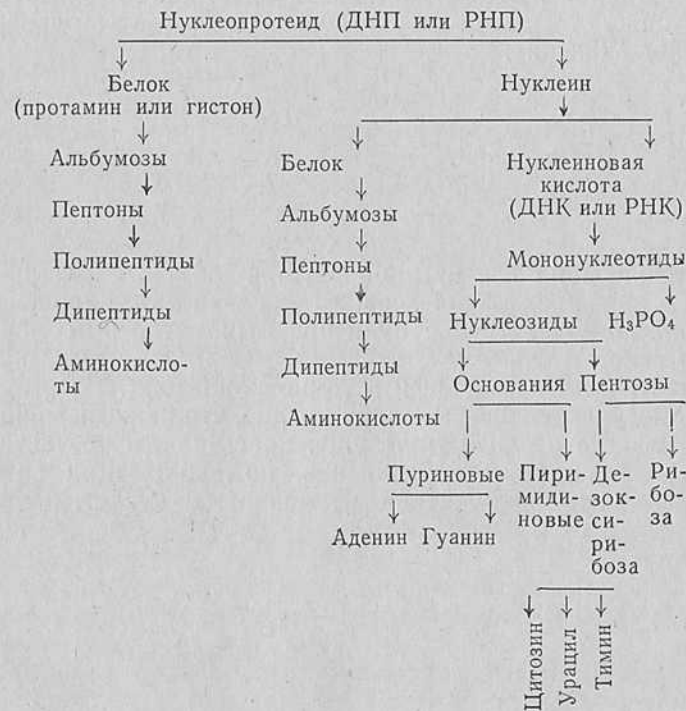
Рис. 24. Схема строения молекулы РНК.

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 *нг*, почек — 6,5, легких — 6,5, сердца — 6,3 *нг*. Различно также количество ДНК в одной клетке в зависимости от размещения организма в филогенетическом ряду. Так, у человека клетка в среднем содержит 6,8 *нг*, крокодила — 5, курицы — 2,3 *нг* 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. Гидролиз нуклеопротеидов клетки можно представить в виде схемы:

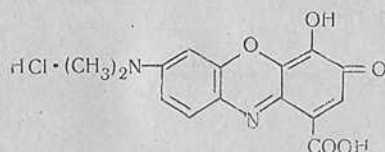


§ 1. Выявление нуклеиновых кислот по методу Эйнарсона

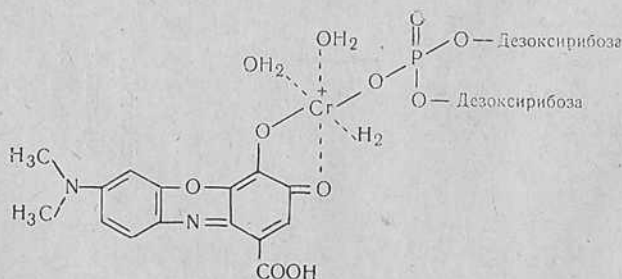
(Жидкость Карнуа, 96%-ный этанол, 10%-ный раствор формалина, желательно избегать фиксаторов, содержащих ртуть и хром; парафиновые и замороженные срезы)

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 pH от 0,8 до 4,3. Перекрашивание исключено. При уменьшении pH интенсивность окрашивания уменьшается, но специфичность возрастает, достигая максимума при pH = 1,5—1,75. Высокая специфичность реакции ГХК с нуклеиновыми кислотами доказана при pH = 0,8—1,75 на нервной ткани ультрафотометрически.

П р и н ц и п в ы я в л е н и я. Теоретическое обоснование метода разработано Эйнарсеном 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 темно-синий цвет. Из результатов цитофотометрических исследований видно, что каждый моонуклеотид 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 (см. стр. 89, 97). 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 нужное 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 рН окрашиваются и другие вещества. Оптимальное значение рН 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.

Количество добавляемой 1 М HCl, мл	рН	Количество добавляемой 1 М NaOH, мл	рН
10	0,83	0	1,64
9	0,90	1	1,84
8	0,92	2	2,16
7	0,94	3	2,90
6	1,02	4	3,42
5	1,10	5	3,76
4	1,14	6	3,98
3	1,18	7	4,07
2	1,29	8	4,18
1	1,44	9	4,27
0	1,64	10	4,35

§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.

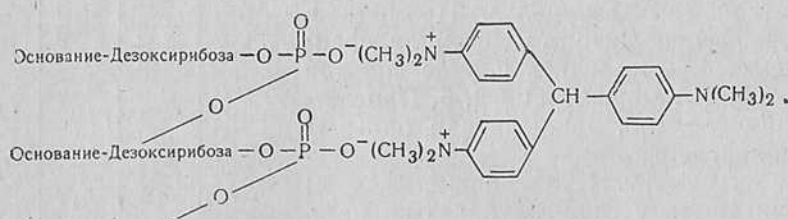
Метод Браше (1942)

(Жидкость Карнуа, 10%-ный раствор нейтрального формалина, другие фиксаторы: свежемороженые 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.

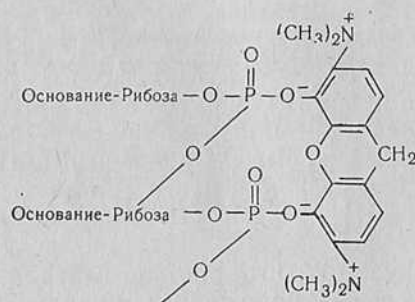
Принцип выявления. Изучен недостаточно. Принято считать, что реакции метилового зеленого и пиронина с обеими ну-

кленновыми 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 и может иметь вид:



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 сине-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 $\text{pH}=4,8$ (см. стр. 257). 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.

П о с т а н о в к а р е а к ц и и. 1. Если срезы парафиновые, довести до воды. 2. Контрольные срезы поместить в раствор РНК-азы на 1 ч при 37°C . 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 балзам или синтетическую среду.

Р е з у л ь т а т. Структуры, содержащие 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.

П р и м е ч а н и е. Для некоторых тканей, в частности нервной, обезвоживание срезов лучше проводить в спиртах с возрастающей концентрацией.

Окрасивание смесью метилового зеленого с пиронином по методу Курника (1955)

(Жидкость Карнуа, 80%-ный этанол, холодный ацетон, 10%-ный раствор нейтрального формалина; парафиновые, свежемороженые и лиофилизированные срезы)

Модификация Курника дает возможность получить хорошую цветопередачу.

П р и н ц и п в ы я в л е н и я. Основан на тех же физических явлениях и химических реакциях, что и предыдущий. Автор модификации установил, что интенсивность и характер окраски препарата определяется степенью полимеризации 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.

Р е а к т и в ы. 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 *n*-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 *n*-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. Метилловый зеленый очищают от примесей метилового 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 на 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 бальзам.

Результат. Клеточные структуры, содержащие РНК, окрашиваются пиронином в ярко-красный цвет, 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 G и Y. Метиловый 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 $pH=4,8$ (см. стр. 257). 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 $37^{\circ}C$. 3. Опытные и контрольные срезы перенести в рабочий раствор и держать там от 10 мин до 24 ч (Г. И. Роскин и Л. 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—60 с 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).

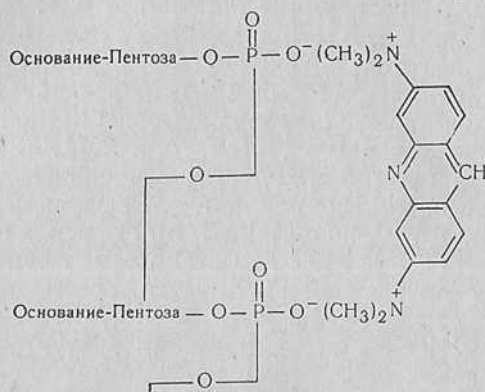
§ 3. Выявление нуклеиновых кислот акридиновым оранжевым (Пирс, 1962)

(Свежие мазки, срезы из свежемороженой ткани, изготовленные в криостате и наклеенные на предметные стекла; можно фиксировать в смеси уксусная кислота — этанол)

Установлено, что после окраски срезов тканей акридиновым оранжевым и последующего изучения в люминесцентном микроскопе в цитоплазме и ядрышках выявляются флуоресцирующие вещества красного, в ядре — зеленого цвета. Первые из них разрушаются РНК-азой.

Принцип выявления. Основан на способности нуклеиновых кислот взаимодействовать с молекулами акридинового оранжевого. В результате образуется комплекс красителя с нуклеиновой кислотой, который может вначале поглощать ультрафиолетовые лучи, затем испускать световую энергию в виде красной или зеленой люминесценции. Присоединение акридинового оранжевого

к одноцепочным участкам нуклеиновых кислот чаще всего происходит с участием ионных сил, образованных кислотными группировками ДНК или РНК и основными группами флуорохрома:



Установлено, что причиной красной люминесценции является образование полимерного соединения катиона и РНК. Зеленая люминесценция обусловлена взаимодействием катиона с ДНК и образованием мономерного соединения.

Реактивы. 1. 0,1%-ный раствор акридинового оранжевого в дистиллированной воде. 2. Исходный раствор Кребса — Рингера: 0,9%-ный раствор NaCl (0,154 M) — 80 частей, 1,15%-ный раствор KCl (0,154 M) — 4 части, 0,11 M раствор CaCl₂ — 3 части, 2,11%-ный раствор KH₂PO₄ (0,154 M) — 1 часть, 3,82%-ный раствор MgSO₄·7H₂O — 1 часть.

Перед использованием рН исходного раствора Кребса — Рингера довести до 6—6,5, добавляя 0,1 M раствор Na₂HPO₄. После этого приготовить рабочий раствор: к 9 частям исходного раствора добавить 1 часть раствора акридинового оранжевого.

Постановка реакции. 1. На срезы или мазки нанести несколько капель рабочего раствора на 15 мин и больше. 2. Промокнуть фильтровальной бумагой. 3. Залить раствором Кребса — Рингера. 4. Накрыть покровным стеклом. 5. Изучать в люминесцентном микроскопе при синем свете.

Результат. Локализация ДНК определяется по зеленой, РНК — по красной люминесценции. Соединительнотканые волокна люминесцируют зеленым цветом.

§ 4. Выявление ДНК

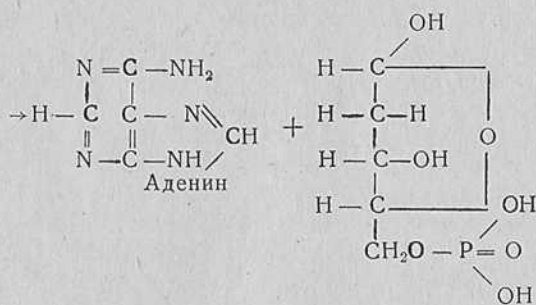
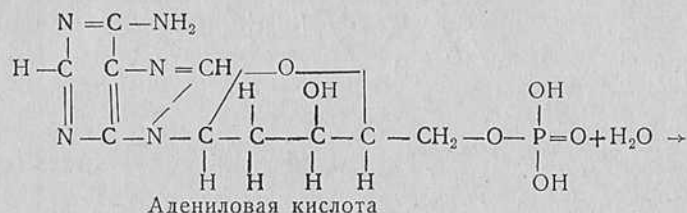
Существует ряд методов, с помощью которых определяется локализация и содержание ДНК. Местами типичной локализации ДНК являются кариоплазма, хромосомы и ядрышки.

Метод Фельгена — Россенбека (1924)

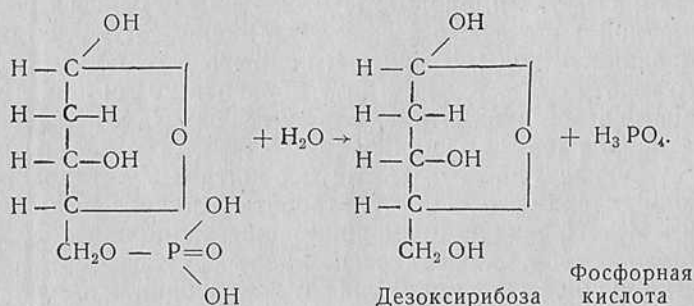
(Все фиксаторы, кроме смеси Буэна; парафиновые, целлоидиновые и замороженные срезы; мазки и мазки-отпечатки)

Одна из первых и безупречных реакций современного этапа развития гистохимии. На препаратах можно провести качественные и количественные исследования ДНК. Использование метода дало 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 — в 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:



Дезоксирибозо-5-фосфат



Дезоксирибоза Фосфорная кислота

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 (см. главу V. Фиксация и фиксирующие средства). 2. Сполоснуть 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 гассерова узла.

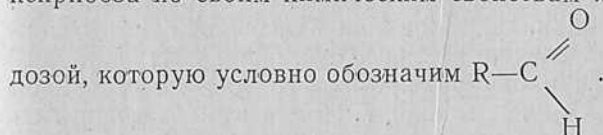
Примечание. При проведении гидролиза нужно учитывать характер и сроки фиксации материала. Так, если материал фиксировался в растворе формалина, сроки кислотного гидролиза определяются 8 ч, формалина — сулемы — 8, жидкости Рего — 14, Карнуа — 8, Карнуа в модификации Лилли — 6, суза — 18, Ценкера — 5, Буэн-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 (1951)

(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 мононуклеотиды, которые гидролизуются до пуриновых и пиримидиновых оснований, дезоксирибозы и фосфорной кислоты. Дезоксирибоза по своим химическим свойствам является пентозой-аль-



разида 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 В при 0°C и рН=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 $MgSO_4$ 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.

Глава IX. 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»¹.

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.

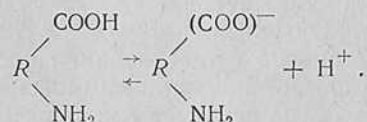
В тканях и клетках белки выполняют ряд жизненно важных функций. Основными из них являются структурная, биокаталитическая и защитная. Биоконплексные соединения белков с другими

¹ Маркс К. и Энгельс Ф. Сочинения, т. 20, М., Госполитиздат, 1961, с. 82—83.

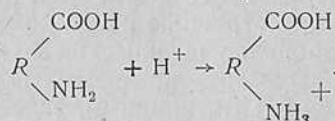
соединениями (например, липидами) составляют основу многочисленных клеточных мембран. Все известные ферменты (около 1000) имеют белковую природу. Благодаря наличию в молекуле химически активных функциональных групп, белки могут обезвреживать ядовитые вещества, которые образуются в организме в результате 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 протеинов при гидролизе распадается главным образом до аминокислот. К протеинам относят альбумины, глобулины, проламины, протамины, гистоны, глютелины, альбуминоиды. 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.

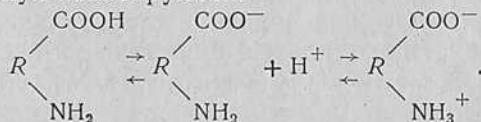
Белки имеют высокую молекулярную массу (РНК-аза — 13700, белок вируса гриппа — 322 000 000), хорошо растворимы в воде, образуют коллоидные растворы (золи и гели), высаливаются под влиянием нейтральных солей, а после действия сильных кислот, щелочей, солей тяжелых металлов, алкалоидных реактивов, некоторых 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: $(\text{H}_2\text{N})_m\text{—R—}(\text{COOH})_n$. При диссоциации карбоксильных групп белки приобретают свойства слабых органических кислот:



Ионы водорода могут присоединяться к аминогруппам, тогда белки приобретают свойства слабых органических оснований:



Во время растворения ионы водорода, которые образовались при диссоциации, присоединяются к аминогруппам 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

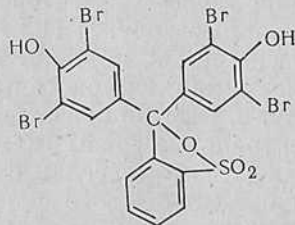
Суммарные, или общие, белки в тканях человека, животных и растений представлены различными видами протеинов и протеидов. Количество белковых веществ в клетках и тканях определяется многими факторами: их происхождением, спецификой функции, зрелостью организма, ткани и клеток, степенью физиологической 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)

Основа на окрашивании клеток и тканей бромфеноловым синим. Метод применяют в биохимических исследованиях. Модифицирован для гистохимических целей. В гистохимических срезах, которые окрашивались бромфеноловым синим, количество связанного красителя пропорционально содержанию в них белковых веществ.

П р и н ц и п в ы я в л е н и я. Реактив представляет собой бесцветные или розоватые кристаллы, растворимые в воде, спирте и эфире. Молекула бромфенолового синего имеет сложное строение:



Химизм реакций красителя с белками изучен мало. Можно предположить, что в результате гистохимической реакции между краси-

телем 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%-ном 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. ЗаклЮчить в канадский бальзам или синтетическую среду, например в полистирол.

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

Выявление белков бромфеноловым синим по прописи В. Г. Елисеева, М. Я. Субботина, Ю. И. Афанасьева, Е. Ф. Котовского (1967)
(Жидкость Карнуа, 10%-ный раствор формалина; парафиновые и замороженные срезы)

Авторы применили два раствора бромфенолового синего — водный и сулемовый. По их мнению первый раствор выявляет общие, второй — основные белки.

Принцип выявления. Тот же, что и в предыдущем методе. Химизм реакций изучен мало.

Реактивы. 1. Водный раствор красителя: 0,1 г бромфенолового синего растворить в 100 мл дистиллированной воды. 2. Сулемовый раствор красителя: к 100 мл дистиллированной воды добавить 10 г сулемы, нагреть до кипения, охладить и отфильтровать, после чего добавить 0,1 г бромфенолового синего. 3. Буферный раствор, рН=6,5: в 2000 мл дистиллированной воды растворить 1,144 г лимонной кислоты и 3,291 г Na_2HPO_4 . 4. 0,5%-ный водный раствор уксусной кислоты.

Постановка реакции. 1. Парафиновые срезы довести до воды. 2. Часть срезов поместить на 20 мин в водный, часть — в сулемовый растворы бромфенолового синего. 3. Промыть в 0,5%-ном водном растворе уксусной кислоты в течение 15 мин. 4. Перенести на 20 мин в дистиллированную воду. 5. Промывать буферным раствором до тех пор, пока из срезов не будет выделяться краситель. 6. Сполоснуть во второй порции буферного раствора. 7. Просушить фильтровальной бумагой. 8. Быстро обезводить в абсолютном ацетоне. 9. ЗаклЮчить в нейтральные среды (дамарлак или нитролак).

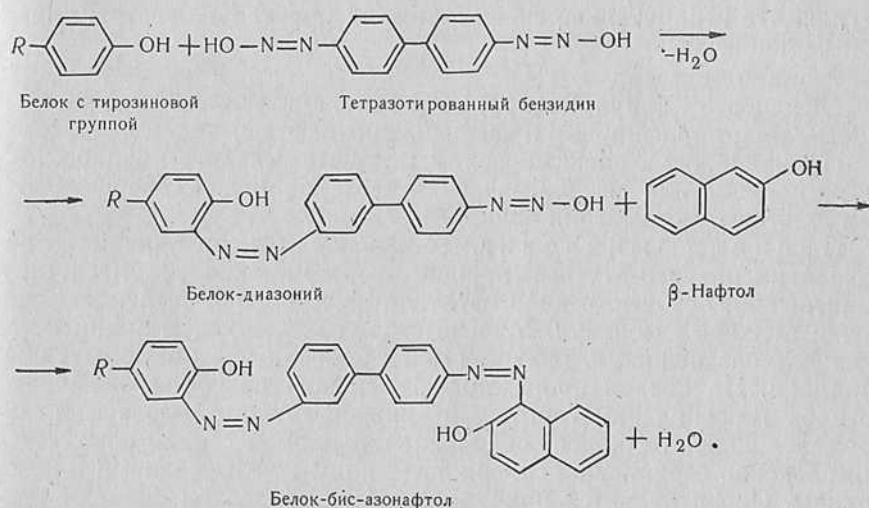
Результат. Общие и кислые белки в препаратах, окрашенных водным раствором бромфенолового синего, выявляют по темно-фиолетовой окраске. Основные белки в препаратах, окрашенных сулемовым раствором красителя, определяют по синей и фиолетовой окраске.

Реакция тетразониевого сочетания

(Жидкость Карнуа, этанол, 10%-ный раствор формалина; парафиновые и свежемороженые срезы)

Метод предложен Даниелли в 1947 г. По мнению автора, реакция в тканях и клетках выявляет три аминокислоты: тирозин, триптофан и гистидин. В дальнейшем было установлено, что методом Даниелли можно обнаружить суммарный белок.

Принцип выявления. Метод основан на взаимодействии аминокислот с тетразотированным бензидином при $\text{pH}=9$ и температуре 4°C с последующим сочетанием одной оставшейся диазогруппы с фенолом или ароматическим амином (Э. Пирс, 1962). Реакция протекает в две стадии с образованием в первой стадии промежуточного соединения коричневого цвета (белка-диазония) и во второй стадии — конечных продуктов реакции белка, диазония и β -нафтола ярко-красного цвета (белок-бис-азонафтол), по которым определяют локализацию белков:



Реактивы. 1. Рабочий раствор: 18 мг бензидина и 0,83 мл концентрированной азотной кислоты растворить в 50 мл дистиллированной воды (Д. Кисели, 1962). Охладить на ледяной бане, после чего добавить 14 мг нитрита натрия, растворенного в 1 мл дистиллированной воды. Перемешивать смесь в течение 10 мин. Подщелочить 10—20%-ным раствором едкого кали или натра (до $\text{pH}=9$). Раствор приобретает коричневый цвет. Годен в течение часа. М. Берстон (1955) для этих же целей рекомендует применять 0,2%-ный водный раствор прочного синего В в трис-буфере ($\text{pH}=9,2$). 2. 0,1 н. раствор HCl . 3. Веронало-ацетатный буфер с $\text{pH}=9,2$ (см. стр. 258), насыщенный β -нафтолом или H -кислотой (1 г на 50 мл буфера). По прописи Берстона — трис-буфер с $\text{pH}=9,2$. 4. 1%-ный водный раствор уксусной кислоты.

Постановка реакции. 1. Парафиновые срезы довести до воды. 2. Промыть в дистиллированной воде. 3. Сполоснуть в буферном растворе. 4. Перенести в свежеприготовленный раствор тетразотированного бензидина на 20 мин или раствор прочного синего В на 5 мин. 5. Промыть в дистиллированной воде. 6. Сполоснуть в холодном растворе 0,1 н. раствора HCl. 7. Промыть в дистиллированной воде. 8. Перенести на 15 мин в вероналово-ацетатный буфер, насыщенный β-нафтолом или H-кислотой (по прописи Берстона — в трис-буфере). 9. Промыть в дистиллированной воде. 10. Сполоснуть в 1%-ном водном растворе уксусной кислоты. 11. Обезводит спиртами. 12. Просветлить в ксилоле. 13. ЗаклЮчить в бальзам (дистрен — дибутилфталат — ксилол).

Результат. Белки тканей окрашиваются в различные оттенки красновато-коричневого цвета.

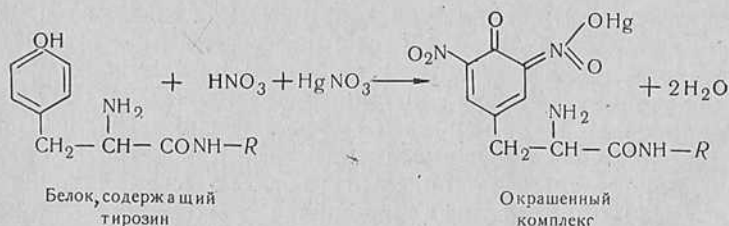
Примечание. Следует избегать фиксации материала формалином, так как ионы водорода в бензольных ядрах тирозина, триптофана и фенилаланина необратимо замещаются остатками формальдегида, что отрицательно сказывается на постановке гистохимической реакции.

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. Усовершенствована для цитофотометрии белков.

П р и н ц и п в ы я в л е н и я. 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. Эти процессы можно суммировать уравнением:



Р е а к т и в ы. 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 ацетоном. 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 бюксы или чашки). 4. Сполоснуть в 2%-ном растворе азотной кислоты. 5. Обезводить в спиртах. 6. Просветлить в ксилоле. 7. Заключить в балзам.

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

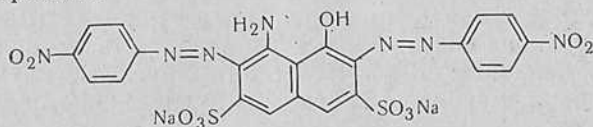
Примечание. Фиксаторы, содержащие этанол, отрицательно влияют на постановку реакции Миллона. Аналогичным действием обладают и некоторые другие соединения: хлориды, пероксиды, соли тяжелых металлов.

Выявление белков раствором амидочерного 10 В

(10%-ный раствор формалина, жидкость Карнуа: парафиновые и свежзамороженные срезы)

Амидочерный 10 В применяют в биохимии при изучении электрофоретических фракций белков, в гистохимической практике — при изучении белков тканей и клеток.

П р и н ц и п ы я в л е н и я. Химизм процессов взаимодействия реактива и белковых веществ исследован мало. По-видимому, здесь имеют место явления физического (адсорбция) и химического (образование ионной химической связи) характера. Краситель имеет сложное строение:



Возникновение окраски связано с образованием ионных связей между кислотными группами молекул красителя и основными группировками белков (аминогруппами лизина, гуанидиновой группой аргинина и имидазольным кольцом гистидина). Различные белковые вещества связывают неодинаковое количество молекул красителя.

Р е а к т и в ы. 1. Рабочий раствор: 0,2 г амидочерного 10 В и 100 мл ледяной уксусной кислоты растворить в 900 мл химически чистого метанола. 2. 1%-ный раствор уксусной кислоты (готовить на 70%-ном этаноле).

П о с т а н о в к а р е а к ц и и. 1. Если срезы парафиновые, депарафинировать. 2. Срезы (мазки, мазки-отпечатки) поместить на 2—10 мин в раствор красителя. 3. Дифференцировать в 1%-ном

растворе уксусной кислоты. 4. Обезводить в спиртах. 5. Просветлить в ксилоле. 6. ЗаклЮчить в канадский бальзам или полистирол.

Результат. Суммарные белки окрашиваются в различные цвета — от черного до красного. И. В. Шуст считает, что основные белки окрашиваются в голубой цвет различной интенсивности, кислые — в черный, коричневый и красный цвета. Это утверждение нуждается в экспериментальном обосновании.

§ 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 остатков диаминомонокарбоновых ациклических (орнитина, аргинина, лизина, оксализина) и некоторых циклических (гистидина) амино- и иминокислот (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 моноаминокислот (аспарагиновой, глутаминовой), например глутелины содержат до 43% глутаминовой кислоты. Проявление кислых свойств сложных белков, например фосфопротеидов, 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), рН=2,4. 2. 1%-ный спиртовый 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, стерин, фосфатиды, цереброзиды), жирные кислоты, каротины, витамины 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.

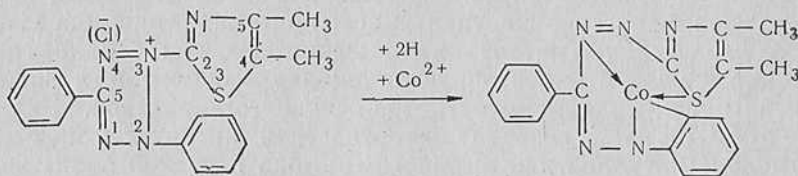
Значение липопротеидов велико. Их молекулы составляют основу клеточных мембран (наружной плазматической и ядерной), рибосом и эндоплазматической сети, митохондрий и лизосом, комплекса Гольджи и микротелец. Отдельные липопротеиды участвуют в таких жизненно важных процессах, как свертывание крови (тромбопластин),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

Метод Кармихалла (1963)

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

П р и н ц и п выявления. Липопротеиды, в состав которых входят холин, этаноламин или серин, 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:



Р е а к т и в ы. 1. 0,1 М раствор гидрохинона. 2. Основной раствор: 0,25 мл 0,2 М трис-буфера с рН=8,1 (см. стр. 258) 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 (рН=8,1) и 40 мл дистиллированной 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.

П о с т а н о в к а 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.

Р е з у л ь т а т. 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.

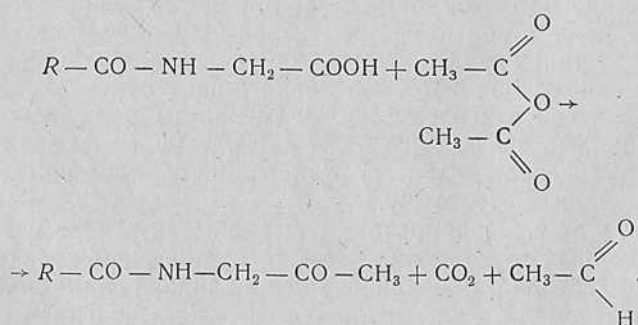
§ 4. Определение белковых функциональных групп

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 и коэнзимов по отношению к каталитическому центру и др. Некоторые белковые группы можно определить гистохимически.

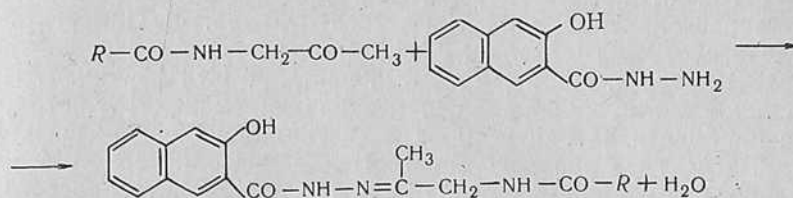
Выявление α -ациламидокарбоксильных групп по Барнетту и Зеллиману в модификации Л. М. Герштейн и И. В. Цветковой
(Сулема — формол; парафиновые срезы)

Для многих белков характерно наличие большого количества свободных — COOH -групп, представленных концевыми α -карбоксильными группами полипептидных цепей и ω -карбоксильными группами аспарагиновой и глутаминовой кислот. Они обеспечивают сохранение нативной конформации белковой молекулы, вступают во взаимодействие с группами основного характера, образуя водородные, амидные и, возможно, эфирные связи. Такие группы нередко входят в акцепторную площадку ферментов в качестве контактной группы для субстратов основного характера. С наличием — COOH -групп связана биологическая активность некоторых гормонов (инсулина, лактогенного гормона передней доли гипофиза) и таких соединений, как овомукоид, лизоцим, кротоксин и др.

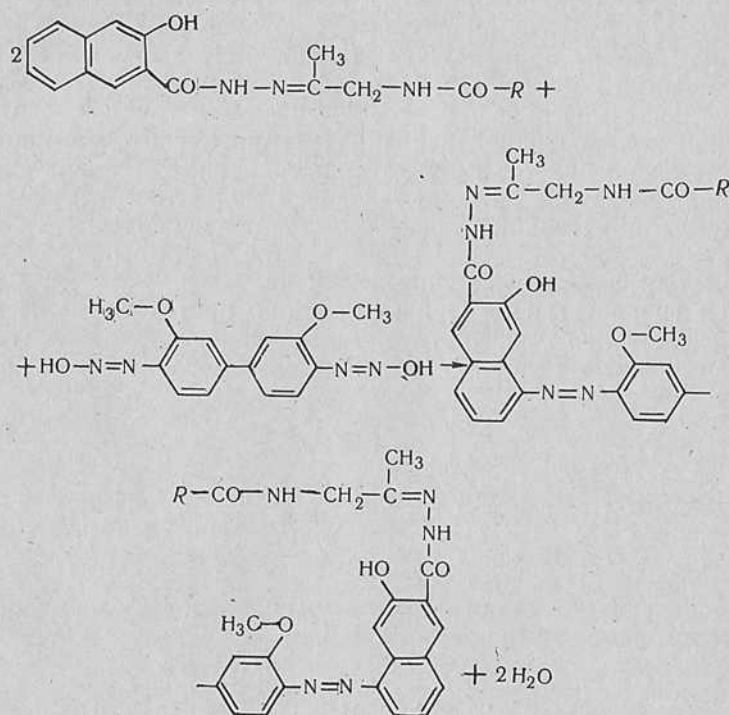
Принцип выявления. Различают три стадии реакции. Так, вначале α -ациламидокарбоксильные группы под влиянием уксусного ангидрида превращаются в кетонные:



После кетонная группа реагирует с гидразидом 2-окси-3-нафтойной кислоты:



Полученное соединение выявляют с помощью реакции азосочетания с тетразотированным *o*-дианизидином:



Реактивы. 1. Смесь уксусного ангидрида с пиридином (4:1). 2. 0,1%-ный раствор гидразида 2-окси-3-нафтойной кислоты (50 мг гидразида 2-окси-3-нафтойной кислоты растворить в 2,5 мл горячей ледяной уксусной кислоты и добавить 47,5 мл 50%-ного этанола). 3. Раствор прочного синего В (1 мг на 1 мл 0,1 М фосфатного буфера с pH=7). Авторы рекомендуют вместо прочного синего В применять диазоль черный К в таком же количестве (окраска монокроматическая).

Постановка реакции. 1. Срезы депарафинировать в ксилоле и промыть в двух сменах абсолютного этанола. 2. Поместить на 15 мин в смесь уксусного ангидрида с пиридином. 3. Промыть в нескольких сменах 100%-ного этанола. 4. Поместить на 30 мин в раствор гидразида. 5. Промыть в трех сменах 50%-ного этанола 10 мин. 6. Промыть в 0,5 н. растворе HCl 15 мин. 7. Промыть в дистиллированной воде, нескольких сменах 1%-ного раствора карбоната натрия и снова в дистиллированной воде. 8. Перенести в раствор прочного синего В или диазоля черного К (оптимальное время окрашивания 10 мин). 9. Обезводить, просветлить в ксилоле и заключить в бальзам.

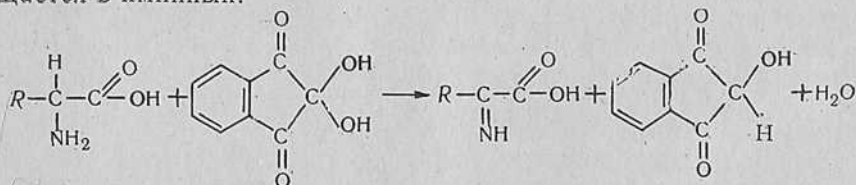
Результат. Места размещения групп окрашены в синий цвет различной интенсивности.

Выявление NH₂-групп, связанных с белками

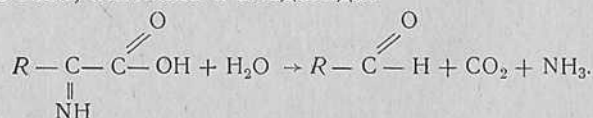
(10%-ный раствор формалина, 85%-ный этанол, жидкость Карнуа, Ценкера; свежемороженые и парафиновые срезы)

Аминогруппам принадлежит важная роль в строении и функциях белковых молекул. Происхождение свободных NH₂-групп различное: концевые группы белковой молекулы, группы боковых ответвлений полипептидной цепочки (α -аминокислот, ϵ -аминогруппа лизина и оксализина, δ -аминогруппа орнитина). Особое значение имеет ϵ -аминогруппа лизина, так как в молекулах ферментов она участвует в образовании связей между апо- и коферментами, при катализе — с субстратами. Для выявления таких аминогрупп чаще всего используют нингидриновый метод.

Принцип выявления. Реакция протекает в несколько стадий. Вначале в результате окислительного дезаминирования α -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 нингид-

рина 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. Обезвожить 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.

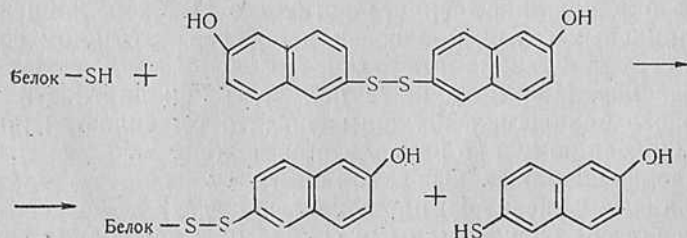
Примечание. Перед обезвоживанием срезы можно докрасить гемалауном Майера (окраска ядер), промыть в проточной воде и дифференцировать в 1%-ном спиртовом растворе уксусной кислоты. В некоторых случаях нингидрин заменяют 1%-ным раствором аллоксана.

Выявление сульфгидрильных групп по Барнетту и Зелигману

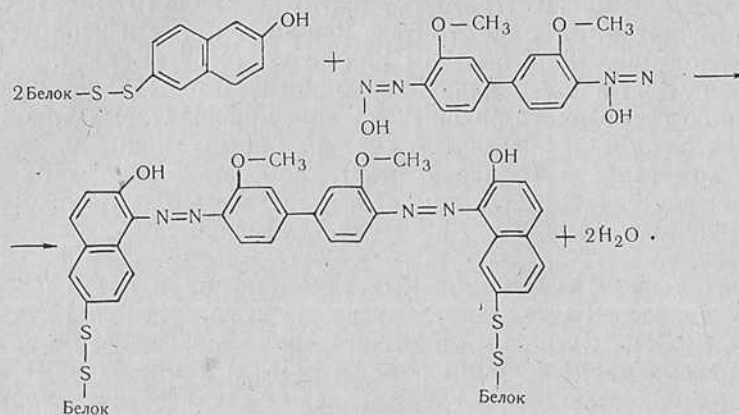
(Жидкость Карнуа, смесь Буэна, 85%-ный этанол, 1%-ный раствор CCl_3COOH , 10%-ный раствор формалина; свежемороженые и лиофилизированные ткани; парафиновые и замороженные срезы)

С активностью $-\text{SH}$ -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 $-\text{SH}$ -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:



На следующей стадии происходит реакция диазосочетания, в результате которой образуется азокраска красно-синего цвета:



Реактивы. 1. Раствор ДДД: 25 мг ДДД растворить в 35 мл 0,1 М веронал-ацетатного буфера (по Михаэлису, рН = 8,5, см. стр. 258) и добавить 15 мл 100%-ного этанола. 2. 0,01%-ный раствор уксусной кислоты (рН = 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 рН 7,4 (см. стр. 258).

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 об-

разуется 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. Нередко 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 (см. главу «Фиксация и фиксирующие средства»). 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 глутаминовая 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 глутами-

новая 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)

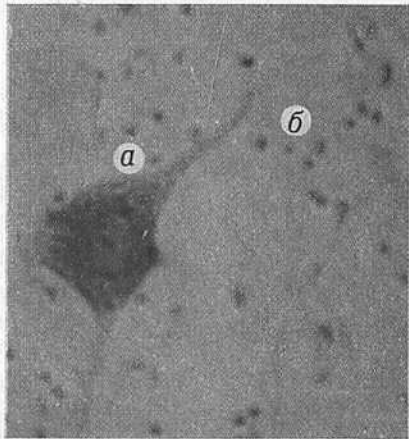
Метод разработан Сакагуши для биохимического анализа белков. Модифицирован для гистохимических исследований. Фактически выявляет основные белки, содержащие от 15 до 30% аргинина от всего количества аминокислот, и свободный аргинин.

П р и н ц и п в ы я в л е н и я. Положительную реакцию Сакагу-

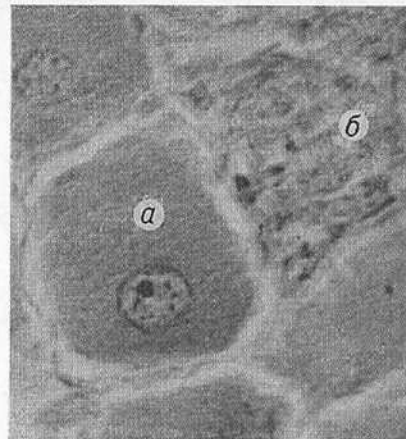
ши дают производные гуанидина $\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \diagup \\ \text{C}=\text{NH} \\ \diagdown \\ \text{NH}_2 \end{array}$, в молекуле которого

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.

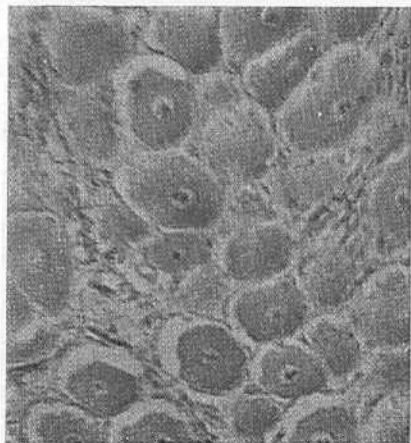
Р е а к т и в ы. 1. 1%-ный раствор целлоидина на смеси абсолютного этанола с диэтиловым эфиром (1 : 1). 2. Рабочий раствор: в 2 мл 1%-ного раствора NaOH растворить две капли 1%-ного раствора α -нафтола в 70%-ном этаноле, добавить четыре капли раствора гипохлорита натрия (100 мл дистиллированной воды,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



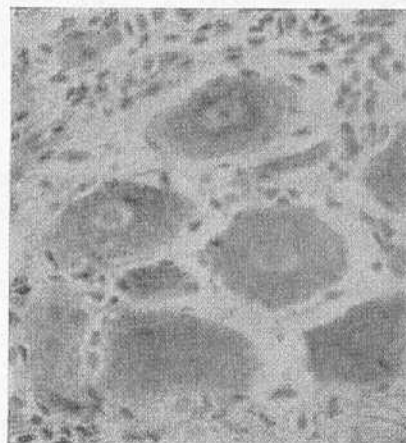
Микрофото 1. Нуклеиновые кислоты в моторном ядре спинного мозга свиньи: а — нервная клетка; б — глиоцит. Браше. $\times 120$.



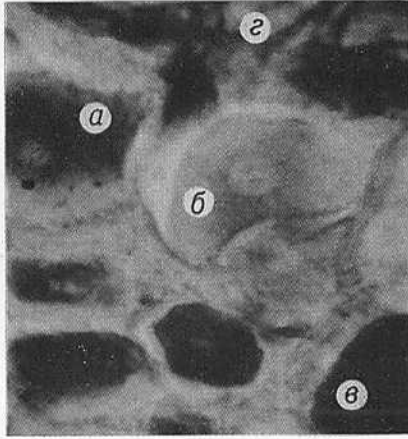
Микрофото 2. Суммарный белок в нервных клетках звездчатого ганглия овцы: а — нервная клетка; б — нейропиль. Бонхег. $\times 600$.



Микрофото 3. Локализация белков в спинальном ганглии курицы. Амидоловый черный 10 В. Препарат М. И. Борзака. $\times 280$.



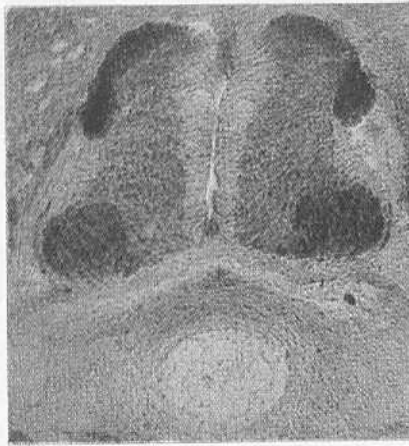
Микрофото 4. Локализация нуклеиновых кислот в нервных клетках спинального ганглия курицы. Эйнарсон. $\times 400$.



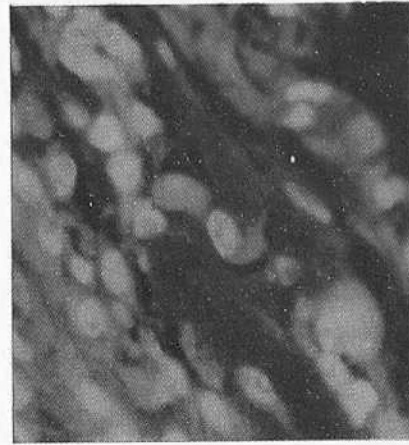
Микрофото 5. Липиды в спинальном ганглии свиньи, больной инфекционным атрофическим ринитом: *a* — нервная клетка с участком краевого лизиса; *б* — нервная клетка без видимых изменений; *в* — пикноморфный нейрон; *г* — нейропилль. Лизон. $\times 600$.



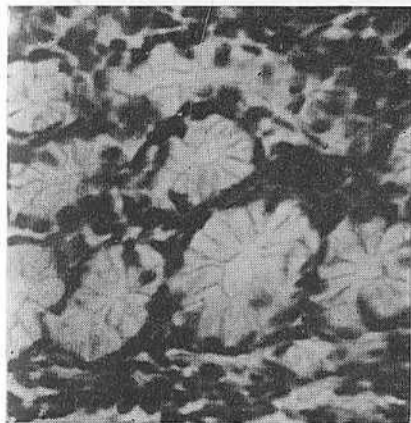
Микрофото 6. Гликоген в микроструктурах подчелюстной железы коровы. ШИК-реакция. Препарат В. А. Костенко. $\times 280$.



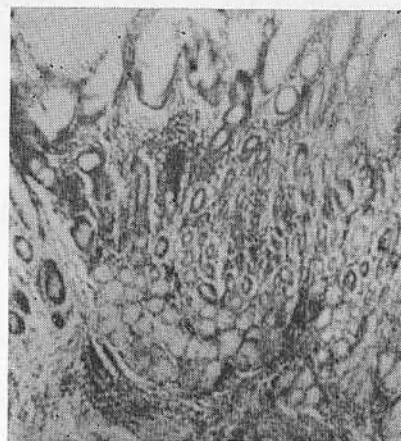
Микрофото 7. Активность ацетилхолинэстеразы в микроструктурах спинного мозга и спинальных ганглиев семидневного куриного эмбриона. Гомори. Препарат М. И. Борзака. $\times 80$.



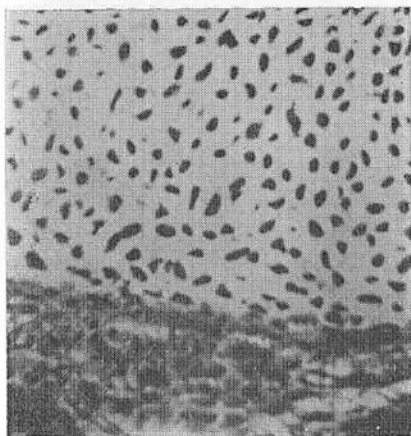
Микрофото 8. Нуклеиновые кислоты в микроструктурах периоста бедренной кости плода крысы. Акридиновый оранжевый. Люминесцентная микроскопия. Препарат Е. И. Домашневской. $\times 280$.



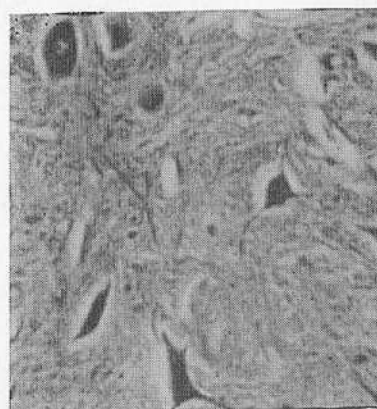
Микрофото 9. Нуклеиновые кислоты в тканях дна желудка человека. Эйнарсон. $\times 400$.



Микрофото 10. Нуклеиновые кислоты в стенке желудка человека на первой стадии язвенной болезни. Эйнарсон. Препарат Г. Д. Ковбасюка. $\times 56$.



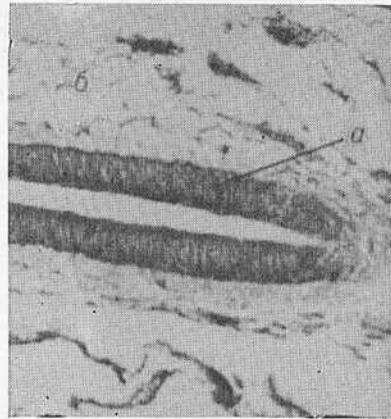
Микрофото 11. Основные и кислые белки в хряще 14-дневного куриного эмбриона. Микель — Кальво. $\times 280$.



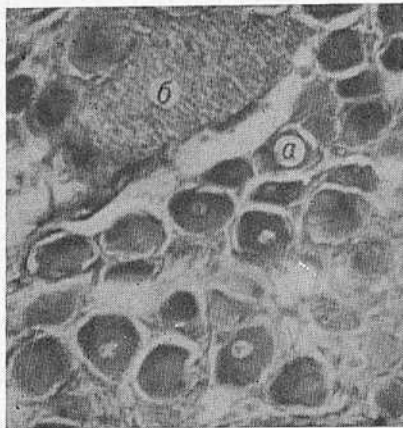
Микрофото 12. Основные и кислые белки в моторном ядре спинного мозга свиньи. Микель — Кальво. $\times 56$.



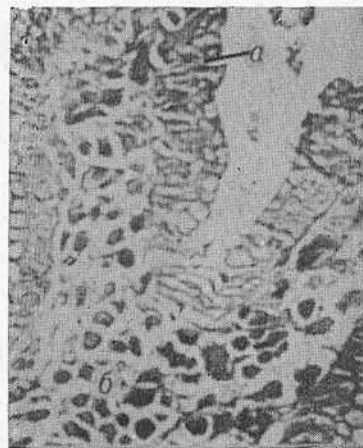
Микрофото 13. Гемоглобин в сосудах слизистой оболочки желудка человека. Слонимский. Препарат Г. Д. Ковбасюка. $\times 56$.



Микрофото 14. Белки в микроструктурах артерии человека: *a* — артерия; *b* — прослойки соединительной ткани. Микель—Кальво. $\times 80$.



Микрофото 15. Основные и кислые белки в краниальном шейном симпатическом узле свиньи: *a* — нервная клетка; *b* — пучки нервных волокон. Микель — Кальво. $\times 120$.



Микрофото 16. Тиоловые группы в срезе стенки пилорического отдела желудка человека: *a* — эпителиальный слой слизистой; *b* — собственный слой слизистой. Барнетт и Зелигман. $\times 320$.

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.

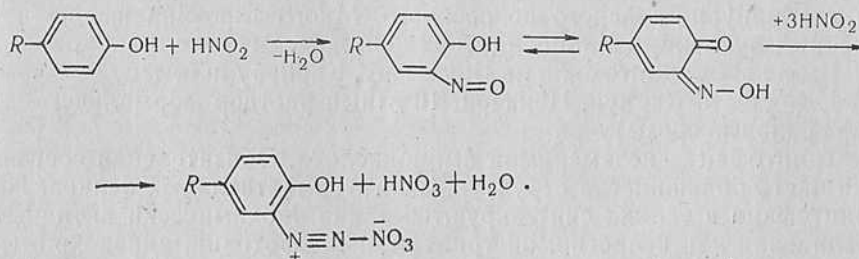
Примечание. Локализация и содержание аргинина в тканях определяется стадией развития, природой ткани и ее физиологическим состоянием. Резко уменьшается в форменных элементах крови при некоторых формах лейкозов.

Выявление тирозина методом Мореля и Сислея

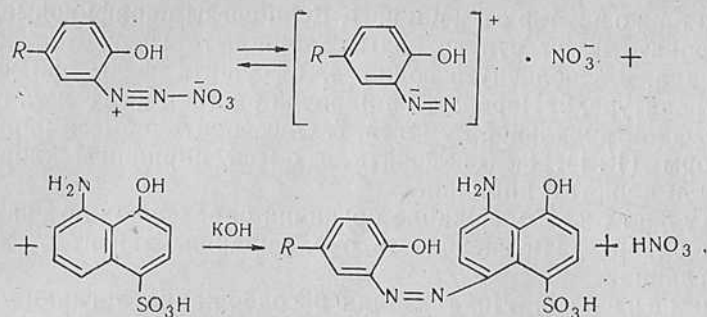
(10%-ный раствор формалина, жидкость Карнуа, другие фиксаторы; парафиновые и замороженные срезы)

Тирозин входит в состав многих белков. Он служит основой для синтеза гормонов щитовидной железы (тироксин, трийодтиронин) и надпочечника (адреналин, норадреналин), пигментов (меланин), многих ферментов. Один из методов выявления тирозина в тканевых белках рассмотрен выше (см. реакцию Миллона). 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:



S-кислота

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 (стр. 226).

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. Заключение 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.

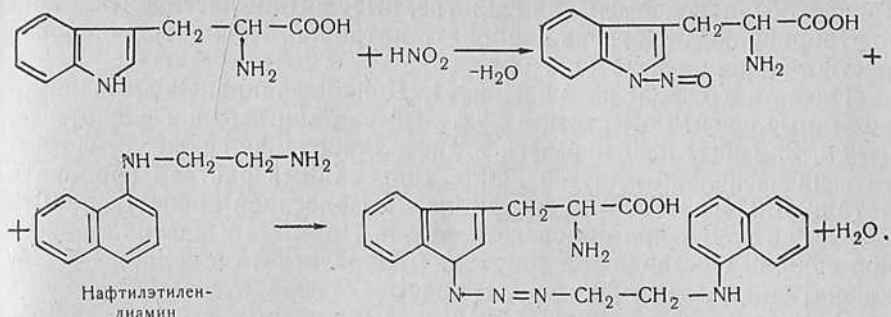
Выявление триптофана по Бруммеру, Карнеру и Томасу

(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 нейрого르몬 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 на 95%-ном этаноле. 3. 70%-ный *трет*-бутанол, содержащий несколько капель H_2SO_4 . 4. Абсолютный 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°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 пурпуро-красному окрашиванию.

Выявление гистидина по Брунsvику

(Жидкость Карнуа, 10%-ный раствор нейтрального формалина, свежемороженая 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, профиль-

тровать, 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.

§ 6. Приготовление контрольных препаратов

Для приготовления контрольных препаратов при изучении гистохимии белковых соединений используют методы, которые условно можно разделить на три группы: использование протеолитических ферментов, применение веществ, блокирующих белковые функциональные группы, и приготовление контрольных препаратов без проводки через растворы, определяющие цветную реакцию при соответствующем методе. Остановимся на некоторых из них.

Обработка раствором пепсина

(Различные фиксаторы; парафиновые срезы, мазки)

Пепсин — фермент, вырабатываемый главными клетками слизистой дна желудка. Расщепляет большинство белков (кроме муцинов, кератинов, фиброина) до альбумоз, пептонов, а при длительном действии — до полипептидов, дипептидов и аминокислот. Активно действует на расщепление связей между α -карбоксыльными группами моноаминодикарбоновых и аминокетонами ароматических аминокислот. Оптимальное значение рН для пепсина равно 1,2—2. 1 г кристаллического фермента за два часа расщепляет около 50 кг денатурированного яичного белка.

Приготовление раствора. В нужном объеме 0,01 н. раствора HCl (рН=1,6) растворить определенное количество кристаллического препарата, чтобы 1 мл содержал 2 мг пепсина.

Постановка реакции. 1. Срезы или мазки довести до воды. 2. Поместить в раствор фермента на 2—3 ч при 37°C. 3. Промыть водой. 4. Поставить параллельно соответствующую гистохимическую реакцию.

Обработка раствором трипсина

(Жидкость Карнуа, все фиксаторы; мазки или парафиновые срезы)

Трипсин — фермент, который вырабатывается в клетках поджелудочной железы. Участвует в расщеплении свыше 30% всех пептидных связей белков. Оптимальное значение рН для трипсина равно 7,8. Активно расщепляет пептидные связи, образованные карбоксыльными группами аргинина и лизина. В процессе гидролити-

ческого расщепления пептидных связей под влиянием трипсина образуются пептиды и небольшое количество аминокислот.

Приготовление раствора. В 0,05 М фосфатном буфере (рН=8,9) растворяют очищенный трипсин из расчета 0,1 мг трипсина на 1 мл буфера. Иногда применяют и другой раствор: в 0,05 М боратный буфер берут 0,2 мг фермента на 1 мл буфера.

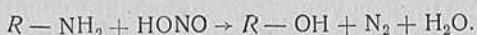
Постановка реакции. 1. Срезы или мазки довести до воды. 2. Поместить в раствор трипсина 15—60 мин при 37°C. 3. Промыть в воде. 4. Включить в постановку соответствующей гистохимической реакции на белковые вещества.

Результат. На контрольных препаратах расщепляются многие белки, в первую очередь гистоны. Они удаляются из тканей и не окрашиваются.

Блокирование аминогрупп

Существует много способов блокирования аминогрупп: окислительное дезаминирование, нитробензоилирование, ацетилирование и др. Дезаминирование легко происходит под действием азотистой кислоты.

Механизм действия. Дезаминирование происходит по схеме:



Быстрее дезаминируются концевые α-аминогруппы белков (4 мин); медленнее — ε-группа лизина (20 мин), медленно — аминогруппа гуанидиновой группировки аргинина (6 ч).

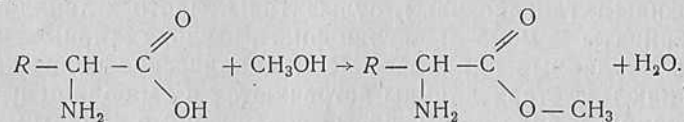
Постановка реакции. 1. Срезы или мазки довести до воды. 2. Перенести в смесь, состоящую из равных частей 10%-ного раствора уксусной кислоты и 5%-ного раствора нитрита натрия, на 18—24 ч при 4°C. 3. Промыть в воде. 4. Поставить гистохимическую реакцию.

Результат. На контрольном препарате нет окрашивания, типичного для локализации аминогрупп.

Блокирование карбоксильных групп

Блокирование карбоксильных групп достигается применением метанола, диметилсульфата, метилиодата, diaзометана. Рассмотрим метилирование.

Механизм действия. При действии метанола образуется эфир:



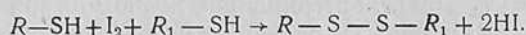
Постановка реакции. 1. Срезы или мазки довести до воды. 2. Поместить на 2—3 суток в 0,1 н. раствор HCl в абсолютном метаноле. 3. Промыть в воде. 4. Поставить гистохимическую реакцию.

Результат. На препаратах, которые подверглись метилированию, нет типичной окраски, характерной для —COOH-групп.

Блокирование сульфгидрильных групп

Для блокирования сульфгидрильных групп употребляются многие вещества: иод, иодацетат, малеинамид, меркаптиды и др. Наиболее доступно блокирование раствором иода.

Механизм действия. Сульфгидрильные группы взаимодействуют с иодом. После этого они становятся недоступными для выявления гистохимическими реагентами:



Постановка реакции. 1. Срезы или мазки довести до воды. 2. Поместить на 4 ч в водный раствор иода (3,8 мг иода и 32 мг KI растворить в 100 мл H₂O, рН довести 0,01 н. раствором HCl до 3,2). 3. Промыть в воде. 4. Поставить гистохимическую реакцию.

Результат. Контрольные препараты не содержат сульфгидрильных групп по сравнению с опытными.

Глава X. 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 макроэргических соединений: АТФ, АДФ, креатинфосфат, серинфосфат

и др. Различные виды и подгруппы простых и сложных липидов (стерины и стериды, фосфатиды, цереброзиды, в растений — воски) являются основными составными частями экстра- и интрацеллюлярных мембран. Считают, что все клеточные мембраны построены по одному типу: внешний слой представлен одномолекулярным слоем белков, средний — липидов, внутренний — белков (рис. 25).

§ 1. Определение общих липидов

В тканях и клетках отдельные липиды сравнительно редко встречаются в чистом виде. Обычно они находятся в виде биоконплексных соединений и механических смесей, в которых один липид взаимно растворен в других. Известны липопротеидные, протеолипидные, липоглюцидные и

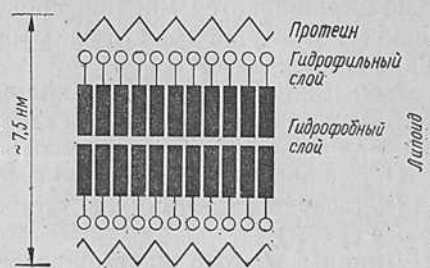


Рис. 25. Схема строения клеточной мембраны (по Даниелли, 1962).

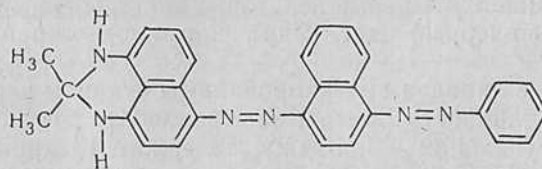
глюцидोलипопротеидные комплексы. Выявлены комплексы, образованные лецитином и холестерином, лецитином и кефалином, фосфатидами и цереброзидами, сфингомиелином и цереброзидом. Для выявления общих, или суммарных, липидов чаще всего используют окрашивание срезов или мазков растворами судана черного В, который 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.

П р и н ц и п в ы я в л е н и я. 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:



Р е а к т и в ы. 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 (см. главу VI, § 2).

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 (см. стр. 226).

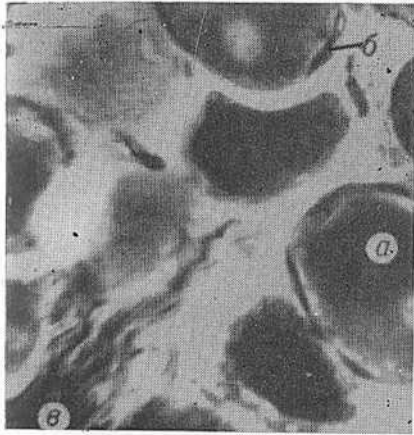
Постановка реакции. 1. Срезы депарафинировать и довести до воды. 2. Сполоснуть в 70%-ном этаноле. 3. Перенести в раствор судана на 30 мин. Если материал не подвергали хромированию, время окрашивания можно удлинить до 16 ч, даже при 60°C (для плотных тканей). 4. Промыть в 70%-ном этаноле. 5. Сполоснуть 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.

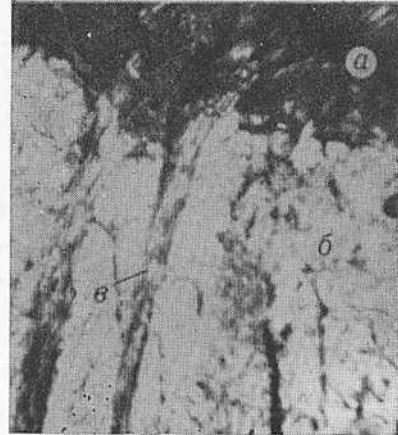
Окрашивание липидов ацелированным суданом черным В

(Формалин, жидкость Бэкера; замороженные срезы, мазки)

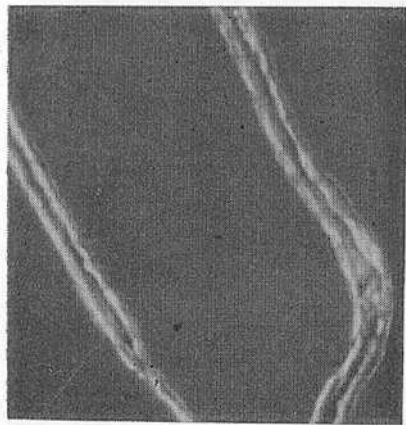
Судан, поступающий в продажу, содержит 10 хроматографических фракций. Суданы, выпускаемые различными зарубежными фирмами, различаются между собой соотношениями красно-оранжевой и синей фракций. Отдельные фракции отрицательно сказываются на качестве гистохимической реакции. Кассельман в



Микрофото 17. Липиды в краниальном шейном симпатическом ганглии свиньи: *а* — нервная клетка; *б* — ее капсула; *в* — пучок нервных волокон. Лизон. $\times 600$.



Микрофото 18. Оптически активные липиды в вентральном участке спинного мозга коровы: *а* — серое мозговое вещество; *б* — белое мозговое вещество; *в* — пучки нервных волокон вентрального корешка. Поляризационная микроскопия. $\times 300$.



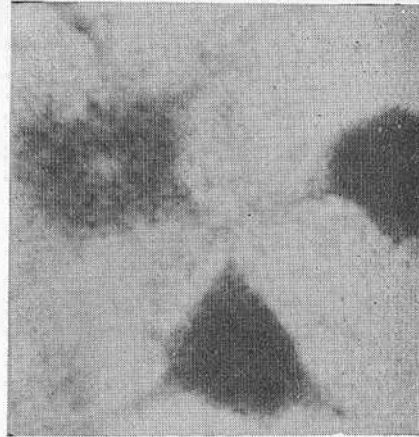
Микрофото 19. Нервные волокна в поляризованном свете. $\times 200$.



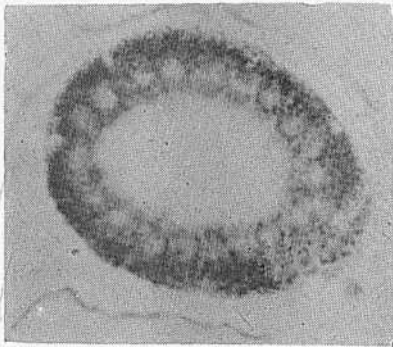
Микрофото 20. Гликоген в нервных клетках краниального шейного симпатического узла свиньи. Шабдаш. $\times 600$.



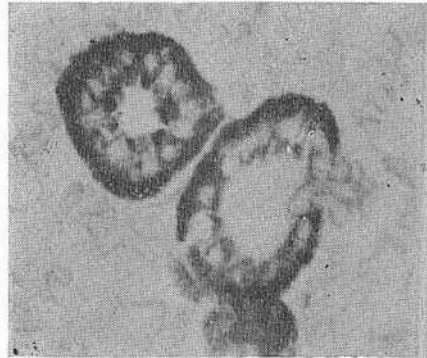
Микрофото 21. Сукцинатдегидрогеназа в нервных клетках спинального ганглия свиньи.
Нахлас, Валькер и Зелигман. $\times 600$.



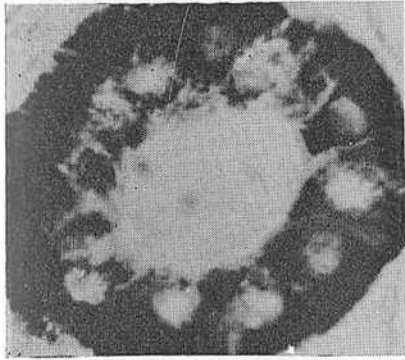
Микрофото 22. Сукцинатдегидрогеназа в моторных нервных клетках спинного мозга свиньи.
Нахлас, Валькер и Зелигман, $\times 400$,



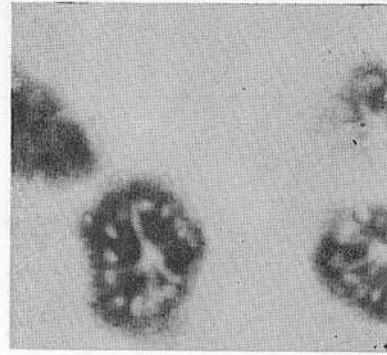
Микрофото 23. Сукцинатдегидрогеназа в слюнной трубке подчелюстной железы хряка.
Нахлас, Валькер и Зелигман. Препарат В. А. Костенко. $\times 280$.



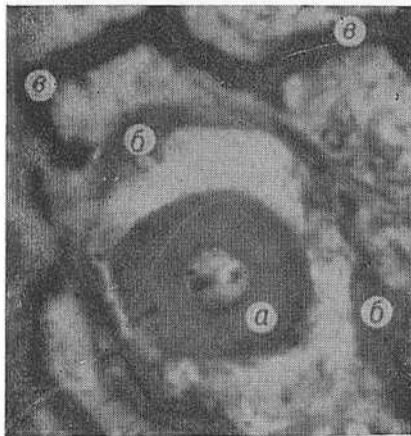
Микрофото 24. Малатдегидрогеназа в слюнных трубках подчелюстной железы коровы.
Гесс, Скарпелли и Пирс. Препарат В. А. Костенко. $\times 200$.



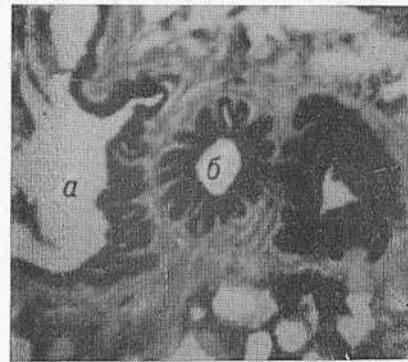
Микрофото 25. НАД-диафораза в слюнных трубках подчелюстной железы коровы. Helta, Withers (1958). Препарат В. А. Костенко. $\times 340$.



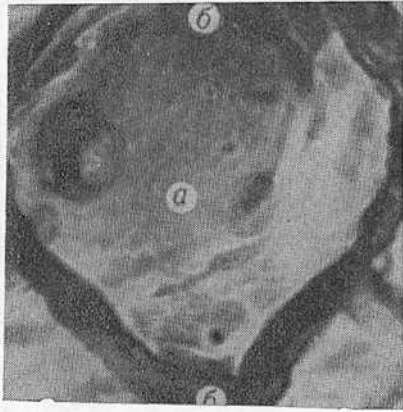
Микрофото 26. «Неспецифическая эстераза» в слюнных трубках подчелюстной железы овцы. Нахлас, Зелигман и Гомори. Препарат В. А. Костенко. $\times 200$.



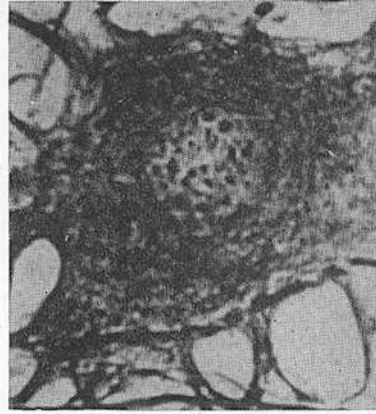
Микрофото 27. Щелочная фосфатаза в гассеровом узле свиньи: *a* — нервная клетка; *б* — капсула; *в* — капиллярная сеть. Гомори — Такаматчу. $\times 400$.



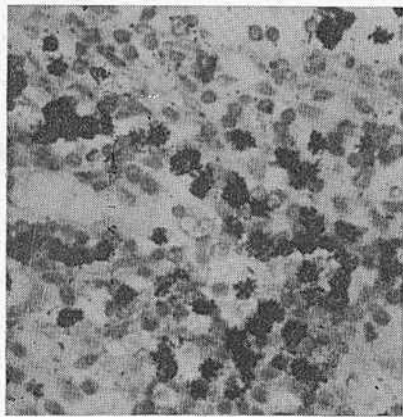
Микрофото 28. Щелочная фосфатаза в легких свиньи: *a* — средний бронх; *б* — мелкий бронх. Гомори — Такаматчу. Препарат Г. М. Цехмистренко. $\times 63$.



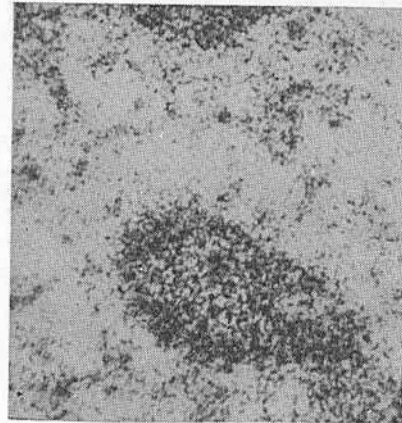
Микрофото 29. Локализация щелочной фосфатазы в нервной клетке межмышечного сплетения сычуга овцы: *a* — нервная клетка; *b* — капилляр. Гомори — Такаматчу. Препарат Ю. С. Шиха. $\times 840$.



Микрофото 30. Распределение кислой фосфатазы в теле нервной клетки межмышечного сплетения сычуга овцы. Гомори. Препарат Ю. С. Шиха. $\times 960$.



Микрофото 31. Автограф мозговой субстанции мезентериального лимфоузла крысы. Фиксация через 6 ч после инъекций ^3H -тимидина. Окраска гематоксилин-эозином Майера. Препарат О. Д. Бондаренко. $\times 400$.



Микрофото 32. Автограф мозговой субстанции мезентериального лимфоузла крысы. Фиксация через 15 мин после инъекции метионина- ^{35}S . Окраска по Паппенгейму. Препарат О. Д. Бондаренко. $\times 200$.

1954 г. эмпирически провел ацелирование судана, после чего исчезли артефакты, типичные для обычного метода: красное и красно-оранжевое окрашивание.

П р и н ц и п выявления. Реакция основана на тех же принципах, что и в предыдущих методах.

Р е а к т и в ы. 1. Приготовление ацелированного 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 ацелированного 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.

П о с т а н о в к а 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.

Р е з у л ь т а т. 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 миелина, 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, α -нафтол и др.

Определение связанных липидов методом экстракции по Спангофу

(Свежий материал; замороженные срезы)

В тканях постепенно экстрагируются липидные вещества.

П р и н ц и п выявления. Постепенной обработкой срезов тканей группой растворов удаляются свободные липиды. Остаются связанные липиды в виде биоконплексных соединений. Они и обнаруживаются окрашиванием суданом.

Р е а к т и в ы. 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.

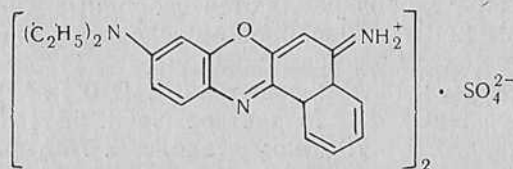
Постановка реакции. 1. Срезы депарафинировать. 2. Промыть в течение 12—14 ч в проточной воде. 3. Сполоснуть в абсолютном ацетоне. 4. Перенести в раствор красителя на 1—24 ч при 37°C. 5. Промыть ксилолом до исчезновения облачек красителя в течение 5—10 мин. 6. ЗаклЮчить в канадский бальзам или синтетическую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

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

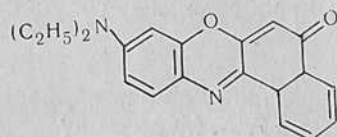
§ 3. Выявление нейтральных и кислых липидов по Кайну

(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, имеет следующую формулу:



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 (серинфосфатиды, 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 тоже 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 100 мл дистиллированной воды. 2. 1%-ный водный раствор сульфата нильского голубого. 3. 0,02%-ный водный раствор сульфата нильского голубого. 4. 1%-ный раствор уксусной кислоты. 5. Насыщенный раствор судана черного В в 70%-ном этаноле.

Постановка реакции. 1. Кусочки тканей поместить в раствор дихромата калия на 18 ч (процедура не обязательная). 2. Промыть в проточной воде 2 ч. 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, окрашенные растворами сульфата нильского голубого, быстро промыть в дистиллированной воде при 60°C. 6. Дифференцировать в 1%-ном растворе уксусной кислоты. 7. ЗаклЮчить в глицерин — желатину.

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. Нейтраль-

ные 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. Исследование липидов в поляризованном свете по Г. А. Меркулову

(Свежий материал, формалин, жидкость Бэкера;
замороженные срезы)

Липиды по отношению к поляризованному лучу света можно разделить на две группы: оптически не активные (нейтральные жиры, высокомолекулярные кислоты) и оптически активные (холестерин, стериды, фосфатиды, цереброзиды, сульфатиды). Оптическая активность веществ второй группы обусловлена наличием в их молекулах асимметрических атомов углерода, способных отклонять луч поляризованного света от обычного его направления. Так, молекула холестерина содержит 8 асимметрических атомов углерода, что позволяет вывести 256 оптических изомеров (128 правых и 128 левых).

Принцип выявления. Установлено, что оптическая активность холестерина и его эфиров исчезает после нагревания срезов и восстанавливается при охлаждении. Молекулы остальных оптически активных липидов (фосфатидов, цереброзидов, миелинов) сохраняют свою оптическую активность и при нагревании срезов.

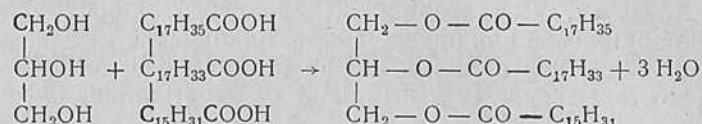
Реактивы. Химически чистый глицерин.

Постановка реакции. 1. Приготовленные срезы промыть в дистиллированной воде и положить на предметные стекла. 2. На каждый срез нанести 1—2 капли глицерина и накрыть предметными стеклами. 3. Препарат поместить на предметный столик поляризационного микроскопа и приступить к исследованию: найти нужное место (при малом увеличении), повернуть анализатор вокруг оси, добиваясь скрещивания плоскостей поляризации; если на препарате находится оптически неактивное вещество (например нейтральный жир), поле зрения будет темным; если на срезах размещается оптически активное соединение, то структуры, где его молекулы сконцентрированы, будут видны на темном поле в виде светящихся образований. 4. Для дифференцировки отдельных групп липидов препарат нагреть на спиртовке или газовой горелке и исследовать в поляризованном свете.

Результат. До нагревания выявляются в виде светящихся образований все оптически активные липиды на темном поле зрения. В нагретых препаратах выявляются фосфатиды, цереброзиды, миелин. Метод позволяет дифференцировать в различных отделах нервной системы локализацию стероинов и стеридов от размещения фосфатидов и цереброзидов.

§ 5. Выявление нейтральных жиров

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



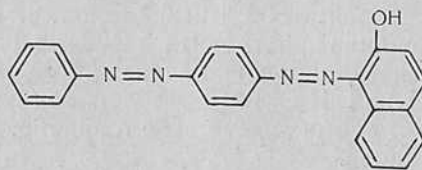
В состав природных жиров входят остатки насыщенных (масляной, капроновой, каприловой, каприновой, лауриновой, миристиновой, пальмитиновой, стеариновой, арахидовой и др.) и ненасыщенных (олеиновой, линолевой, линоленовой, эруковой и др.) карбоновых кислот с четным числом углеродных атомов. Несколько реже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

П р и н ц и п в ы я в л е н и я. 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 краси-



тель, состоит из судана красного (он экстрагируется жирами), судана оранжевого и судана желтого. Влияние двух последних на окраску не изучено.

Р е а к т и в ы. 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.

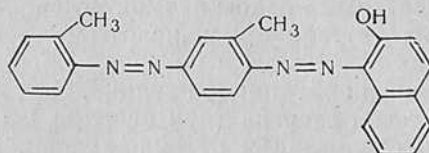
Результат. Локализацию нейтрального жира определяют по красно-оранжевой или оранжево-желтой окраске.

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.

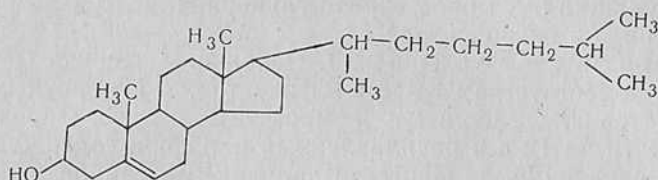
Реактивы. 1. Раствор красителей: равные количества судана 3 и судана 4 (по 0,25—0,35 г на 100 мл) смешать и растворить в смеси ацетона с 70%-ным этанолом (1:1); дать раствору созреть в течение нескольких суток, профильтровать на холоде или отсосать пипеткой надосадочную жидкость; работать с закрытыми 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 — $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 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.

§ 6. Стерины и стериды

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



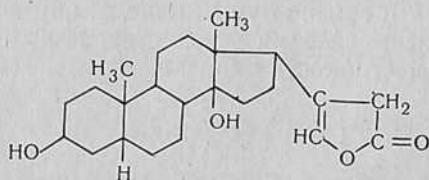
Содержится во всех клетках организма человека и животных, участвуя в образовании мембран. Много холестерина в нервной и мышечной ткани, печени, надпочечниках. В теле человека весом 70 кг в среднем содержится 140 г холестерина, причем в нервной системе — 2%, надпочечниках 10%, сердце, легких, почках, 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, ксантоматоза кожи и костей, возрастного помутнения роговицы, некрозов и др. Некоторые производные холестерина (метилхолантрен) являются причиной раковых опухолей. Обмен холестерина в организме 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 железозамониевых квасцов $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. 3. Ледяная уксусная кислота. 4. Концентрированная серная кислота.

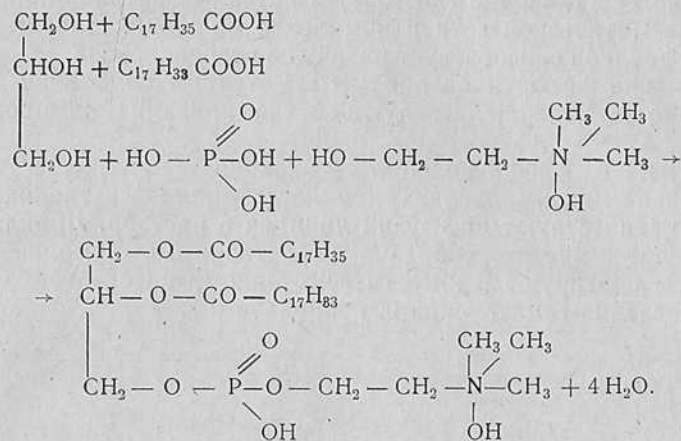
Постановка реакции. 1. Промыть замороженные срезы в дистиллированной воде. 2. Поместить срезы в раствор квасцов при 37°C на 24 ч, при комнатной температуре — на несколько суток. 3. Сполоснуть в дистиллированной воде и монтировать на предметные стекла. 4. Осушить фильтровальной бумагой. 5. Нанести на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

§ 7. Фосфатиды

Фосфатиды — сложные эфиры, образованные спиртами (чаще многоатомными), высокомолекулярными жирными кислотами, фосфорной кислотой и азотистым основанием. Примером может быть

лецитин, образованный глицерином, стеариновой и олеиновой кислотами, фосфорной кислотой и холином:



В зависимости от спиртового остатка различают три подгруппы фосфатидов: глицеро-, инозит- и сфингофосфатиды. Подгруппу глицерофосфатидов по азотистым основаниям можно разделить на несколько видов: холин- (лецитины), серин-, коламин-, треонин-, ацетальфосфатиды. В подгруппе инозитфосфатидов различают фосфатидилинозиты и дифосфоглицеридоинозиты. Молекула фосфатидов состоит из двух частей — аполярной (гидрофобной) и полярной (гидрофильной). Из приведенной схемы (рис. 26) видно, что гидрофильная «голова» (цвиттерион) имеет отрицательный заряд фосфата и положительный — азота, т. е. представляет перманентный диполь. Гидрофобный «хвост» формируется длинными алифатическими цепями остатков высокомолекулярных жирных кислот. Благодаря такой структуре фосфатиды образуют коллоидные растворы и мицеллярные структуры, хорошо растворяются в органических растворителях. Фосфатиды обладают поверхностно-активными свойствами и легко формируют пленочные структуры в монослое на границе раздела сред. Они вместе с другими липидами (стеринами, стероидами, цереброзидами) участвуют в создании клеточных мембран, обуславливают их избирательную проницаемость для различных веществ, участвуют в реакциях дыха-

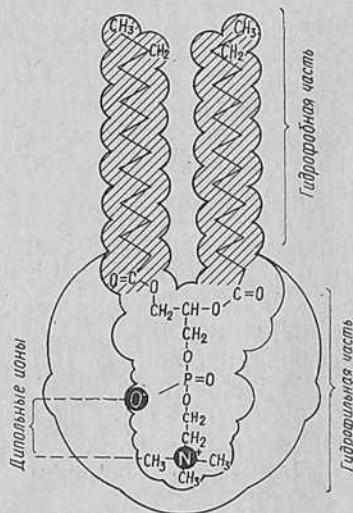


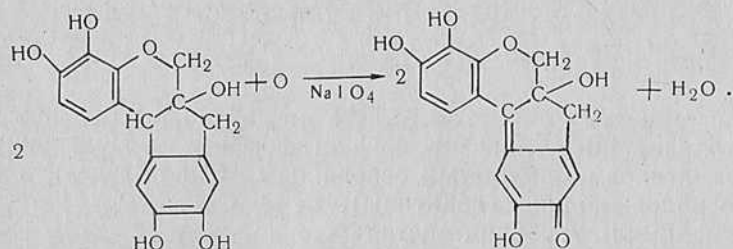
Рис. 26. Схема строения молекулы фосфатида.

ния и переносе электронов. Больше всего фосфатидов находится в нервной ткани (26% в пересчете на сухой вес), печени (до 16%), почках (до 11%), сердце (до 10%). Синтез фосфатидов происходит в эндоплазматической сети и комплексе Гольджи. Нарушение обмена фосфатидов способствует развитию атеросклероза.

Выявление фосфатидов кислым гематеином по Бэкеру

(Жидкость Бэкера, последующее хромирование; замороженные срезы)

Принцип выявления. Фиксация в жидкости Бэкера обеспечивает максимальную сохранность липидов в тканях. Ионы кальция препятствуют диффузии липидов в раствор. Липиды взаимодействуют с хромом, образуя нерастворимые комплексы. Эти комплексы реагируют с кислым гематеином, который образуется после окисления гематоксилина периодатом:



Гематеин присоединяется к хромовому комплексу, образуя соединение типа лака. Дифференцировка бурой и гексациано-(III) ферратом калия способствует удалению несвязанной с липидами краски.

Реактивы. 1. Раствор дихромата кальция: к 100 мл дистиллированной воды добавить 5 г дихромата калия и 1 г хлорида кальция. 2. Кислый гематеин: к 0,05 г гематоксилина добавить 48 мл воды и 1 мл 1%-ного раствора периодата натрия, нагреть до кипения и влить 1 мл ледяной уксусной кислоты. 3. Раствор для дифференцировки: в 100 мл воды растворить 0,25 г гексациано-(III) феррата калия и 0,25 г буры (хранить в темноте).

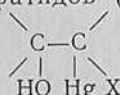
Постановка реакции. 1. Материал фиксировать 6—30 ч в жидкости Бэкера. 2. Перенести в раствор дихромата кальция на 18 ч при 22°C. 3. Перенести еще в одну порцию раствора дихромата кальция на 24 ч при 60°C. 4. Промыть проточной и дистиллированной водой в течение 6 ч. 5. Перенести в желатину на 10—14 ч при 37°C. (Процедура не обязательная). 6. Приготовить замороженные срезы. 7. Протравить в дихромате кальция 1 ч при 60°C. 8. Дважды промыть в дистиллированной воде. 9. Поместить в раствор кислого гематеина на 5 ч при 37°C. 10. Сполоснуть в дистиллированной воде. 11. Дифференцировать в растворе бура — гексациано-(III) феррат калия 18 ч при 37°C. 12. Промыть в дистиллированной воде. 13. ЗаклЮчить в глицерин — желатину.

Результат. Фосфатиды окрашены в темно-синие или синеватые тона. Контрольные срезы обработать пиридином.

Выявление фосфатидов с применением меркуридифенилкарбазона

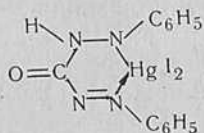
(Жидкость Бэкера, 10%-ный раствор формалина; замороженные срезы)

Принцип выявления. Основан на присоединении ионов двухвалентной ртути к ненасыщенным связям остатков жирных кислот, входящих в состав молекул фосфатидов (например лецитина), с образованием соединения типа:



Полученное

соединение, по-видимому, вступает в реакцию с дифенилкарбазоном, образуя цветной продукт конечной реакции. Причем, один эквивалент катиона вытесняет водород из группы —NH—, а с ближайшим атомом азота соединяется координационно:



Реактивы. 1. 0,65%-ный раствор хлорида магния в абсолютном ацетоне. 2. 10 мл насыщенного раствора нитрата ртути в 60%-ном этаноле и 0,2 мл 0,2%-ного раствора хлорида натрия. 3. 5%-ный раствор иодида калия. 4. 2%-ный раствор ацетата натрия. 5. Насыщенный раствор дифенилкарбазона в 90%-ном этаноле.

Постановка реакции. Применяется основной метод и две модификации.

Основной метод. 1. Срезы поместить на 48 ч в раствор хлорида магния. 2. Промыть в дистиллированной воде. 3. Перенести в раствор нитрата ртути на 24 ч при 0—4°C. 4. Промыть в дистиллированной воде. 5. Поместить в раствор KI на 4—5 мин. 6. Промыть в дистиллированной воде 10 мин. 7. Перенести в раствор ацетат натрия на 10 мин. 8. Обработать раствором дифенилкарбазона 10 мин. 9. Тщательно промыть в воде и заключить в глицерин — желатину.

Модификация для выявления лецитинов и сфингомиелинов. 1. Провести процедуры 1—3 основного метода. 2. Сполоснуть в абсолютном ацетоне. 3. Обработать диэтиловым эфиром 48 ч. 4. Сполоснуть в ацетоне и промыть в дистиллированной воде. 5. Провести процедуры 5—9 основного метода.

Модификация для выявления сфингофосфатидов. 1. Срезы промыть в ацетоне (удаляются все липиды, кроме сфингомиелинов). 2. Промыть в диэтиловом эфире 48 ч (удаляются остатки других липидов, кроме выявляемых). 3. Сполоснуть в абсолютном ацетоне. 4. Провести 2—9 процедуры основного метода.

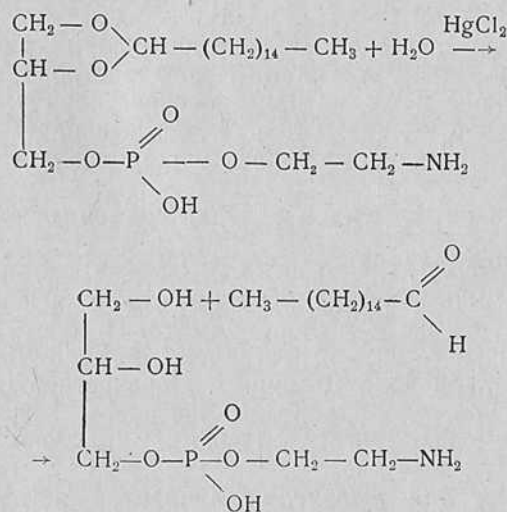
Результат. Основной метод выявляет общие фосфатиды, которые окрашиваются в синевато-фиолетовый цвет (частично и цереброзиды). Первая модификация выявляет по сине-фиолетовой окраске сфингомиелины и лецитины, вторая — сфингофосфатиды (сфингомиелины). Данные, полученные с помощью метода и модификации, интерпретировать осторожно, сравнивая с результатами других методов.

Выявление ацетальфосфатидов по Хейесу

(Нефиксированный материал, 10%-ный раствор формалина; замороженные срезы, мазки, мазки-отпечатки)

Выявление ацетальфосфатидов основано на постановке плазмалевой реакции. Плазмалоген представляет собой смесь альдегидов высших жирных кислот. Ацетальфосфатиды составляют 12% от всей массы фосфатидов тканей. Этаноламинкефалиновая фракция тканей мозга на $\frac{2}{3}$ состоит из ацетальфосфатидов. 55—60% липидов сперматозоидов представлено холинсодержащими ацетальфосфатидами. Р. Лилли (1969) считает, что плазмалоген на 90% состоит из ацетальфосфатидэтаноламинов.

Принцип выявления. Под влиянием сулемы происходит гидролиз ацетальфосфатидов, в результате которого освобождается плазмаль — смесь стеаринового, пальмитинового (иногда и олеинового) альдегидов:

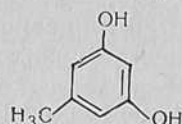


Альдегиды вступают в реакцию с лейкофуксином, образуя комплекс альдегида и красителя пурпурного цвета (см. реакцию Фельгена — Россенбека на ДНК).

Реактивы. 1. 1%-ный раствор хлорида ртути (сулемы). 2. Реактив Шиффа по прописи де Томази (см. метод Фельгена — Россенбека). 3. Сернистая вода (см. там же). 4. Раствор для дополнительной окраски: 0,5%-ный раствор метилового зеленого в 0,5%-ном растворе уксусной кислоты.

Биохимический метод видоизменен для гистохимического анализа.

Принцип выявления. Возникновение окраски в местах размещения липидов связано с реакциями между цереброзидами и ганглиозидами с одной стороны и составными частями рабочего раствора — с другой. В состав рабочего раствора входят орсин



и серная кислота. Эти реакции основаны на действии составных частей реакционной смеси на продукты гидролиза липидов — гексозы и пентозы. Химизм этих процессов изучен мало.

Реактивы. Рабочий раствор: 1 мл 2%-ного водного раствора орсина (3,5-диокситолуола) и 10 мл 2 н. раствора серной кислоты.

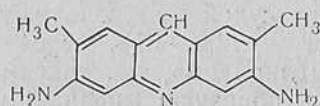
Постановка реакции. 1. Парафиновые срезы довести до воды. 2. Нанести на каждый срез 2—3 капли рабочего раствора. 3. Поместить в термостат до возникновения окраски при 90—100°C. 4. Накрывать покровным стеклом и исследовать.

Результат. Цереброзиды и ганглиозиды окрашиваются в различные оттенки от красного до синевато-красного цвета.

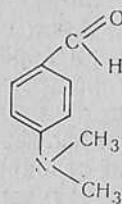
Выявление серных эфиров цереброзидов по Холлендеру (10%-ный раствор формалина; замороженные срезы)

Сложные эфиры цереброзидов с серной кислотой называют сульфатидами. Впервые обнаружены в нервной системе. Составляют 20—25% всех цереброзидов. Содержатся почти во всех органах и крови млекопитающих. Способны образовывать соли, связывая калий и амины. Выявлены комплексы с норадреналином, гистамином, ацетилхолином, 5-гидроксилтриптамином.

Принцип выявления. Теоретические основы метода мало разработаны. В окрашивании сульфатидов принимают участие акрифлавин и *n*-диметиламинобензальдегид, кислый гемалаун Майера, буферный раствор и изопропанол:



Акрифлавин



n-Диметиламино-бензальдегид

Реактивы. 1. Раствор красителя: в 100 мл 0,1 М цитрат + HCl буфера (pH = 2,5) растворить 5 мг акрифлавина. 2. 70%-

ный изопропиловый спирт. 3. Смесь 15 мл 2%-ного раствора *n*-диметиламинобензальдегида в 6 н. HCl и 35 мл изопропилового спирта. 4. Кислый гемалаун Майера.

Постановка реакции. 1. Срезы поместить в раствор красителя на 6 мин. 2. Промыть в 70%-ном изопропиловом спирте 1 мин. 3. Сполоснуть в смеси *n*-диметиламинобензальдегида и изопропилового спирта 75 с. 4. Промыть в дистиллированной воде. 5. Докрасить гемалауном. 6. Промыть в проточной воде 15 мин. 7. Обезводить в восходящем ряду спиртов. 8. Просветлить в ксилоле. 9. ЗаклЮчить в канадский бальзам или в подходящую синтетическую среду.

Результат. Сульфатиды окрашиваются в красный цвет, ядра — в голубой.

§ 9. Высшие жирные кислоты

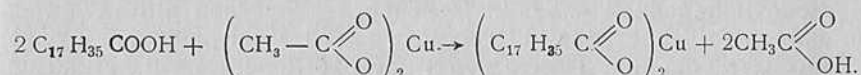
В тканях животных и человека содержатся свободные ВЖК. Они образуются в результате гидролиза липидов, синтезируются или приносятся кровью и межклеточной тканевой жидкостью.

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 гематоксилин 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.

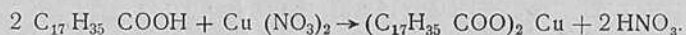
Результат. Места размещения ВЖК определяют по темно-синей окраске. Срезы, которые находились для контроля в пиридине, не окрашиваются.

Метод Окамото

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

Метод получил широкое применение в гистохимической практике. С его помощью расшифрованы некоторые стороны процесса 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 100 мл воды растворить 0,5 мл того же раствора). 3. Раствор красителя: к 95 мл абсолютного этанола, содержащего 2% ацетата натрия, добавить 5 мл насыщенного раствора *n*-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.

§ 10. 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 кетостерониды. 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 12 ч). 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 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.

Глава XI. УГЛЕВОДЫ

Углеводы — большая группа органических веществ, молекулы которых чаще всего состоят из трех элементов — углерода, водорода и кислорода, количественное соотношение между которыми обычно напоминают 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 имеются другие 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.

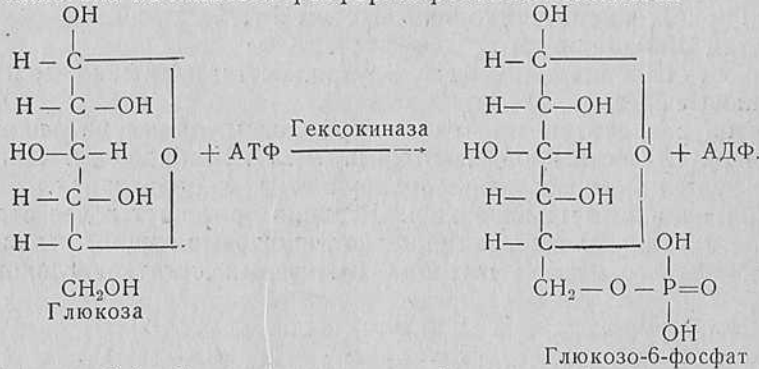
Среди гетерополисахаридов различают мукополисахариды и гликополисахариды.

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).

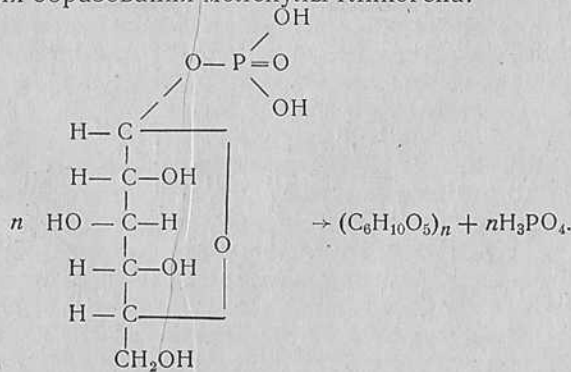
Гликополисахариды имеют сходное строение молекул с мукополисахаридами, но не содержат остатков гексозаминов. К ним относят пектиновые вещества, специфические полисахариды микробов (иммунополисахариды), камеди, слизи и др. Они характеризуются разнообразной структурой и свойствами.

§ 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%.

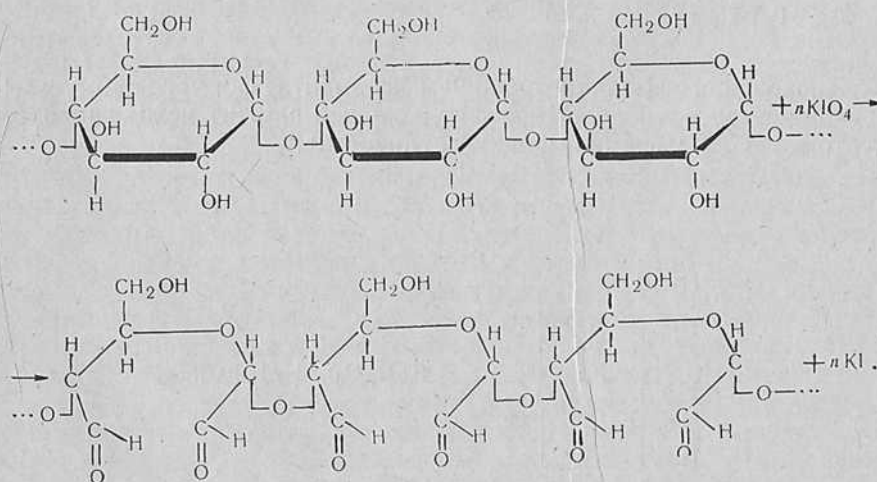
Строение молекул гликогена у животных, принадлежащих к различным типам (моллюски и позвоночные) и классам (амфибии и млекопитающие), различно. Расщепление гликогена происходит под влиянием фермента амилазы (амилолиз) или фосфорилазы (фосфоролиз). Фосфоролиз представляет собой начальный этап анаэробной фазы распада гликогена, в результате чего в виде макроэргов (АТФ) выделяется химическая энергия, необходимая для жизни клеток, тканей, органов и организма. Богаты полисахаридом 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 целлюлозные срезы)

Метод разработан советским морфологом, одним из основоположников отечественной гистохимии А. Л. Шабадашем. Широко используется в отечественных и зарубежных лабораториях.

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



Образуется высокомолекулярное альдегидное соединение со спиртовыми функциональными группами, которое выявляется реак-

тивом Шиффа. Если это соединение условно обозначить $R-C \begin{array}{l} \text{O} \\ // \\ \text{H} \end{array}$

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).

Р е а к т и в ы. 1. Раствор периодата: перед постановкой реакции приготовить 0,01 M раствор KIO_4 или $NaIO_4 \cdot 3H_2O$ на дистиллированной воде (банку обернуть темной бумагой). Для получения ориентировочных препаратов концентрацию периодата снижать (0,003, 0,002 и 0,001 M) 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.

П о с т а н о в к а р е а к ц и и. 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.

Р е з у л ь т а т. Гликоген окрашивается в интенсивный фиолетово-вишневый цвет, мукоиды и глюкопротеиды — красноватые.

П р и м е ч а н и е. 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.

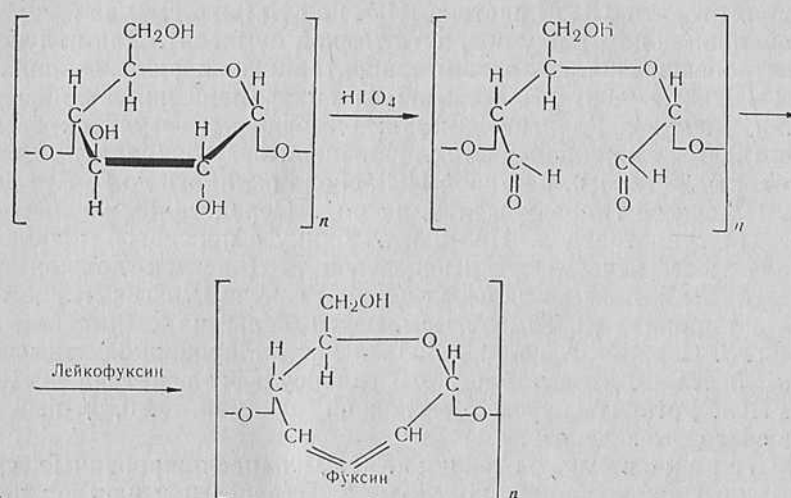
Метод Шифф-иодная кислота (ШИК) по Мак-Манусу

(Жидкость Карнуа, Беста, Шабадаша, 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 полиса-

харидов. 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 лейкофуксин, 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 0,25 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.

П о с т а н о в к а р е а к ц и и. 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.

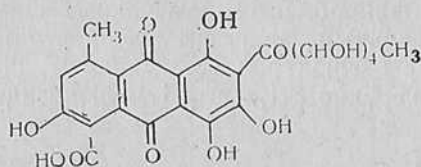
Р е з у л ь т а т. Гликоген окрашивается в темно-красный цвет, глюкотеины и мукополисахариды — в различные оттенки пурпурного цвета.

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 (рН=4,0—4,5) имеет свойства кислого красителя. Строение кармина полностью не расшифровано. Он является производным оксиантрахинона и представляет собой алюминиево-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).

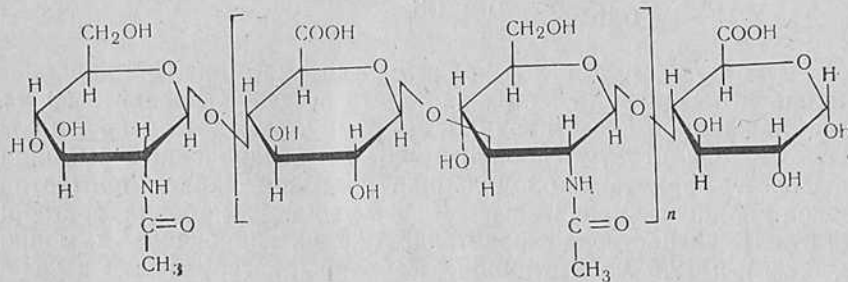
Постановка реакции. 1. Срезы довести до абсолютного этанола. 2. Поместить в 1%-ный раствор целлоидина, приготовленного на смеси абсолютного этанола и диэтилового эфира (1:1) на 2 мин. 3. Высушить на воздухе. 4. Провести через ряд спиртов до дистиллированной воды. 5. Окрасить гематоксилином Эрлиха (см. стр. 226). 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

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.

Гиалуроновая 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-гликозидными связями:

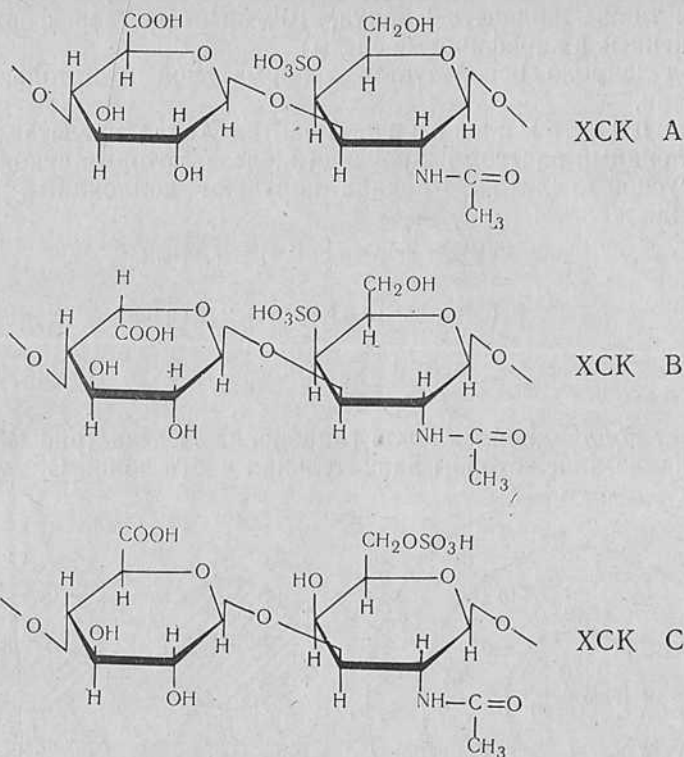


ГК обладает высокой степенью метаболизма (период полураспада молекулы — 2 суток). Способна к полимеризации и деполимеризации. Именно на этих свойствах основаны гистохимические методы выявления мукополисахаридов.

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 представляет собой неразветвленную полимерную цепь, состоящую из N-ацетил-галактозаминсульфата и глюкуроновой кислоты, связанных между собой β -1,3- и β -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 метахроматическую 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.

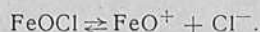
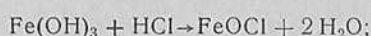
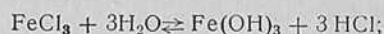
Кератосульфат — кислый мукополисахарид, построенный из остатков N-ацетилглюкозамина, галактозы и серной кислоты. Обнаружен в стенке аорты, межпозвоночных дисках, хрящах, роговице.

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 (рис. 27). Проводят диализ, при котором значительная часть ионов Cl^- удаляет-

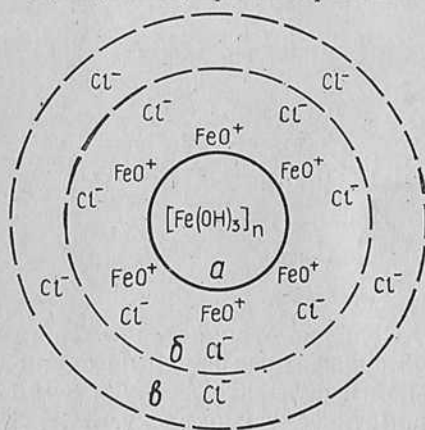


Рис. 27. Схематическое строение мицеллы гидроксида железа:
а — ядро; б — адсорбционный слой;
в — диффузный слой противоионов.

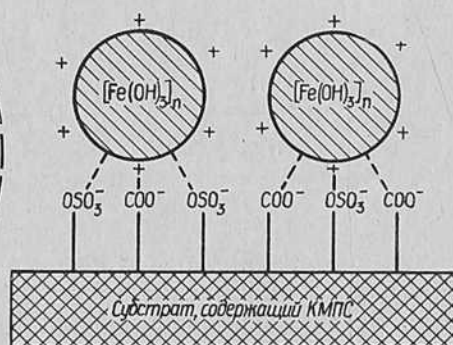
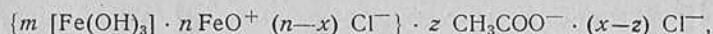


Рис. 28. Схема образования окрашенного комплекса гидроксида железа — КМПС (по В. В. Виноградову, 1971).

ся. Затем добавляют в коллоидный раствор гидроксида железа уксусную кислоту, после чего состав мицеллы изменяется, так как в состав диффузного слоя вошли ионы CH_3COO^- :



где $z > (x-z)$.

В процессе постановки гистохимической реакции молекулы гидроксида железа взаимодействуют с функциональными группами КМПС. Образуется своеобразный комплекс (рис. 28), 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.

Р е а к т и в ы. 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 .

П о с т а н о в к а р е а к ц и и. 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.

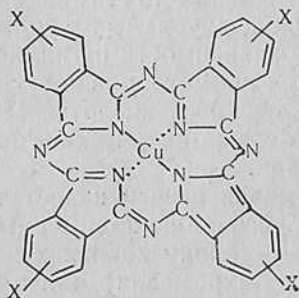
Р е з у л ь т а т. Структуры, содержащие КМПС, окрашиваются в синий цвет.

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

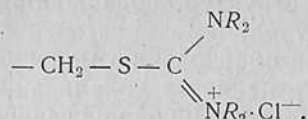
Выявление кислых мукополисахаридов алциановым синим по Стивдену

(Свежий материал, жидкость Карнуа, Ценкера, смесь Буэна, сулема — формалин; замороженные и парафиновые срезы)

П р и н ц и п в ы я в л е н и я. В гистохимической практике используют несколько алциановых красителей: алциановые синие 8Sx, 8Gs, 8Gx, 5Gx, 8G_N, 150, алциановые зеленые — 2 Gx, 3Vx, люксовый синий и др. Алциановый синий 8Sx — водорастворимый краситель типа фталоцианина, в молекулу которого введены остатки молекул сульфокислот, карбоновых кислот и хлорметильные остатки. Точный состав красителя неизвестен. Химическое строение молекулы красителя наиболее удачно отображено у Р. Лилли:



X представлен азотистым основанием:



Химизм окрашивания полностью не раскрыт. Считают, что эти процессы связаны с образованием солевых связей молекулы красителя с кислотными группами КМПС посредством изотиоуроновых групп. Предполагают также, что краситель связывается с КМПС ковалентными связями.

Реактивы. 1. Краситель: 0,1%-ный раствор алцианового синего в 3%-ном растворе уксусной кислоты. 2. Гемалаун Эрлиха или 1%-ный раствор нейтрального красного. 3. 1%-ный раствор этанола.

Постановка реакции. 1. Срезы довести до воды. 2. Поместить в раствор красителя на 10—30 сек. 3. Промыть в дистиллированной воде. 4. Докрасить гемалауном Эрлиха или 1%-ным раствором нейтрального красного. 5. Дифференцировать в 1%-ном растворе этанола. 6. Промыть в водопроводной воде. 7. Обезводить в спиртах. 8. Просветлить в ксилоле. 9. ЗаклЮчить в канадский бальзам.

Результат. Кислые мукополисахариды окрашиваются в сине-зеленый цвет, ядра — темно-синий или темно-красный.

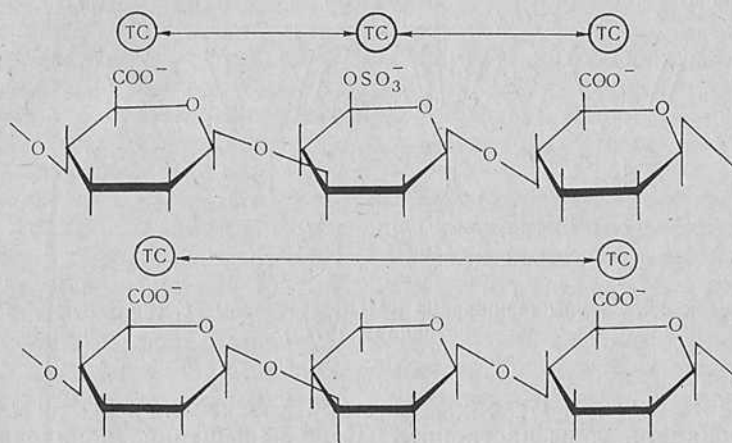
Примечание. При использовании 1%-ного раствора нейтрального красного пункты 5 и 6 опустить. Для выявления гиалуроновой кислоты и хондроитинсульфатов Э. Пирс рекомендует следующий вариант метода: 4. Докрасить 1%-ным раствором нейтрального красного 30 сек. 5. Быстро сполоснуть в воде. 6. Тщательно осушить на воздухе при температуре 22—37°C. 7. Просветлить в ксилоле. 8. ЗаклЮчить в бальзам или дистрен — дибутилфталат — ксилол. При этом исследуемые вещества окрашиваются в интенсивный сине-зеленый цвет, а цитоплазматические и ядерные структуры окрашиваются нейтральным красным.

§ 3. Изучение углеводов на основе метахромазии

Метахромазия — изменение цвета водных растворов тиазиновых красителей (тионина, азура А, толуидинового синего, метиленового синего и др.) в зависимости от наличия в клетках и тканях хромотропов. В качестве хромотропов могут быть кислые мукополисахариды, реже — нуклеиновые кислоты, сернокислые эфиры высших спиртов и др. Метахроматическая окраска не подчиняется закону Ламберта — Бэра.

Механизм метахромазии изучен недостаточно. Наличие хромотропов способствует образованию полимерных форм красителя и пик адсорбции смещается в сторону коротких волн. Вещества окрашиваются в красный (γ -метахромазия) или в красно-фиолетовый (β -

метахромазия) цвета. По мнению некоторых авторов возникновение метахроматической окраски связано с агрегацией молекул красителя под влиянием межмолекулярных сил субстрата. Наиболее высокой способностью притягивать к себе полярные части красителя, заряженные положительно, обладают группы $-\text{OSO}_3^{2-}$, меньшей $-\text{COO}^-$. Обязательным условием для появления метахроматического окрашивания является упорядоченное размещение кислотных групп в субстрате; если этого нет — возникает ортохроматическое окрашивание. Наиболее интенсивное окрашивание возникает при расстоянии между отрицательными зарядами меньше 4 Å. В качестве примера можно привести возникновение метахромазии в комплексах ГК + ТС (гиалуроновая кислота + толуидиновый синий) и ХСК + ТС (по В. В. Виноградову, 1971):



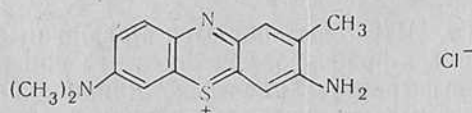
Расстояние между двумя связанными молекулами ТС в комплексе ХСК + ТС в два раза меньше, чем в комплексе ГК + ТС.

Выявление КМПС раствором ТС

(Жидкость Карнуа, Ценкера, 10%-ный раствор формалина; парафиновые срезы)

Относится к наиболее специфическим методам выявления КМПС.

П р и н ц и п в ы я в л е н и я. Эмпирически доказано, что присутствие в тканях КМПС, особенно сульфатированных, заставляет адсорбированный краситель давать обширную гамму окраски — от голубого до темно-красного цвета. По своим химическим свойствам ТС — основание:



ТС с КМПС образует солеобразные комплексы. Обнаружен ряд убывающей эффективности метахромазии в зависимости от химической природы субстрата: сульфат > карбоксил > фосфорил. Интенсивность и характер метахромазии зависит от степени полимеризации красителя. Последнее свойство определяется химическим строением высокополимерного субстрата — КМПС. При окраске тканей может возникать несколько видов метахромазии: α -форма (мономерная — синяя), β -форма (димерная — фиолетовая) и γ -форма (полимерная — красная). Метахромазия — следствие упорядоченного размещения молекул красителя на поверхности субстрата. При этом возникают дополнительные связи между молекулами ТС с помощью мостиков из воды (рис. 29).

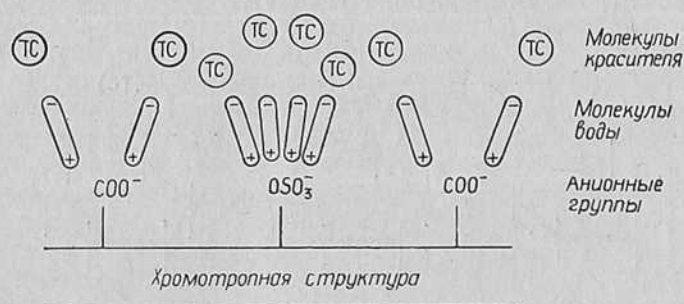


Рис. 29. Схема окрасивания КМПС раствором ТС (по В. В. Виноградову, 1971).

Реактивы. 1. Исходный раствор красителя: в 5—10 мл дистиллированной воды растворить ТС до насыщения (появления небольшого осадка на дне сосуда); насыщенный раствор в течение суток созревает и может сохраняться продолжительное время после добавления к нему 5—10 мл 96%-ного этанола. 2. Цитратно-фосфатный буферный раствор с различным значением pH (см. стр. 256). 3. Рабочий раствор ТС: нужный объем исходного раствора красителя разбавить в 20—50 раз буферными растворами с соответствующими значениями pH (может сохраняться в течение недели). 4. 5—10%-ный раствор молибдата аммония.

Постановка реакции. 1. Срезы довести до воды. Перенести в рабочий раствор ТС на 5—15 мин. 2. Сполоснуть в дистиллированной воде. 3. Погрузить в профильтрованный раствор молибдата аммония на 30—60 мин. 4. Тщательно промыть в воде. 5. Обезводить в спиртах. 6. Просветлить в ксилоле (нельзя применять карбол — ксилол, срезы быстро обесцвечиваются). 7. Заклочить в бальзам.

Результат. МПС окрашиваются в различные тона — от фиолетового до вишнево-красного. Считают, что при pH=4 и меньше метахромазия вызывается кислыми мукополисахаридами, при pH>4 — мукопротеидами и глюкотеидами.

Метод сохранения метахромазии в постоянных препаратах (Жидкость Карнуа, Ценкера, 10%-ный раствор формалина; парафиновые срезы)

Во время приготовления постоянных препаратов тканевые срезы теряют метахроматическое окрашивание. Г. И. Кутах и М. Г. Шубич (1965) разработали оригинальный метод сохранения первоначальной метахромазии тканей после окрашивания ТС или азуром А.

П р и н ц и п выявления. Возникновение метахромазии тканевых срезов основано на тех же физических и химических явлениях, что и в предыдущем методе. В некоторых случаях во время обработки окрашенных срезов нарушается связь между молекулами красителя и МПС, особенно при наличии в растворе молибдата аммония. Для закрепления метахромазии рекомендуют рН молибдата аммония приводить в соответствие с рН раствора красителя.

Р е а к т и в ы. 1. Цитратно-фосфатный буферный раствор по Мак-Ильвейну (см. стр. 256). 2. Растворы красителей: 0,1%-ный раствор толуидинового синего или 0,02%-ный раствор азура А (готовят на соответствующих буферных растворах, чаще с рН=4,5 или 3). 3. 2%-ный раствор молибдата аммония на буферном растворе того же значения рН.

П о с т а н о в к а реакции: 1. Депарафинировать срезы и довести до воды. 2. Перенести в один из растворов красителей (время окраски для различных тканей и при неодинаковом значении рН подбирается эмпирически). 3. Промыть в буферном растворе 1 мин. 4. Поместить срезы в 2%-ный раствор молибдата аммония на 5 мин. 5. Промыть в дистиллированной воде 2—3 мин. 6. Быстро обезвожить в спиртах. 7. Просветлить в ксилоле. 8. Заключить в балъзам.

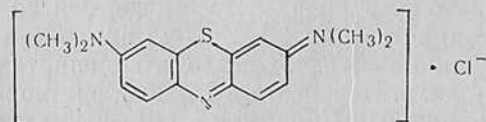
Р е з у л ь т а т. Тональность метахроматического окрашивания изменяется мало.

Обесцвечивание метиленового синего

(Разнообразные фиксаторы; парафиновые срезы)

Метиленовый синий (МС) относится к метахроматическим красителям. Используется в биохимическом анализе, нейрогистологии и гистохимической практике. Краситель применяется для дифференциации КМПС от мукопротеинов.

П р и н ц и п выявления. МС существует в окисленной или восстановленной формах (первая из них имеет синюю окраску, вторая — бесцветная). Окисленная форма МС имеет следующую структуру:



МС способен вступать в реакцию с отрицательно заряженными группами КМПС, проявляя базофильные свойства. Степень базофилии определяется наличием свободных анионов КМПС. Количество анионов определяется химической природой субстрата и рН.

Изменяя рН, можно выявить отдельные вещества. К. С. Митиным (1966) установлено, что коллагеновые волокна не окрашиваются МС при рН = 6—5, а основное вещество средней оболочки аорты, построенное из хондроитинсульфатов, обладает γ -метахромазией при рН = 2,5—3, интима обесцвечивается при рН = 4, тучные клетки и нейроны окрашиваются в фиолетовый цвет при рН = 1,5—2.

Реактивы. 1. Веронал-ацетатные или ацетатные буферные растворы с различным значением рН — от 2,62 до 8,18 (см. стр. 258). 2. Растворы красителя: в каждом буферном растворе растворить МС в концентрации 0,0005 М (пробирки закупорить).

Постановка реакции. 1. Срезы или мазки (мазки-отпечатки) довести до воды. 2. Поместить на 24 ч в растворы красителя при 22—17°C. 3. Сполоснуть в дистиллированной воде (можно в соответствующем буферном растворе). 4. ЗаклЮчить в глицерин-желатину (можно обезводить в ацетоне и просветлить в ксилоле), после чего заклЮчить в канадский бальзам.

Результат. Способность субстратов связывать МС при рН < 4 свидетельствует о наличии в тканях хондроитинсульфатов и гепарина, если исключено наличие нуклеиновых кислот.

§ 4. Постановка контролей при изучении полисахаридов

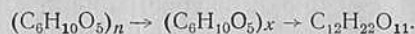
Правильность постановки гистохимической реакции проверяется сравнением опытных препаратов с контрольными. Выбор контроля определяется природой органа, ткани или клеток, свойствами изучаемых веществ и методом гистохимического исследования.

Применение диастазы по Лилли (1969)

(Различные фиксаторы; парафиновые срезы)

Используется диастаза солода. В гистохимическую практику фермент введен для постановки контроля при изучении гликогена.

Принцип действия. Под влиянием фермента происходит гидролитическое расщепление молекулы гликогена до амило-, эритро-, ахро-, мальтозодекстринов и дисахарида мальтозы:



Реактивы. 1. Раствор диастазы (1:1000) на 0,8%-ном растворе поваренной соли. 2. 1%-ный раствор целлоидина на смеси абсолютный этанол — диэтиловый эфир (50:50). 3. 80%-ный этанол. 4. Реактивы соответствующего метода (Шабадаша, Беста, Мак-Мануса и др.).

Постановка реакции. 1. Срезы довести до воды. 2. Поместить в раствор диастазы на 30—40 мин при 35—45°C. 3. Промыть в дистиллированной воде. 4. Обезводить в спиртах или растворах ацетона и ксилола. 5. Перенести в 1%-ный раствор целлоидина. 6. Подсушить 1—2 мин. 7. Поместить в 80%-ный этанол на 5—10 мин. 8. Включить в постановку гистохимической реакции (см. метод).

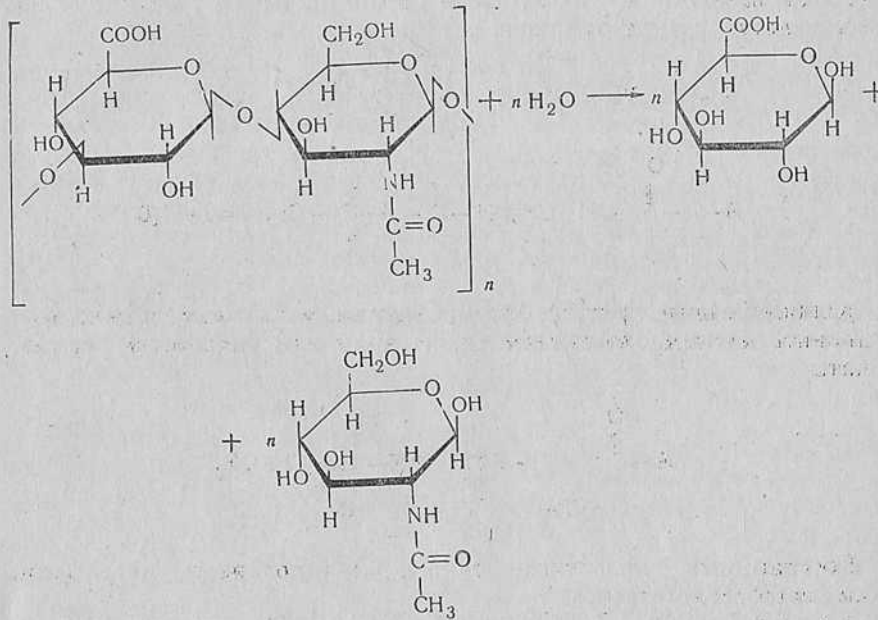
Результат. На срезах, обработанных диастазой, нет гликогена.

Обработка гиалуронидазой по Пирсу (1962)

(Свежая ткань, различные фиксаторы; срезы, изготовленные в криостате, замороженные и парафиновые срезы)

В гистохимии применяется несколько видов гиалуронидазы — тестикулярная, пневмококковая, стрептококковая, стафилококковая, клостридиальная и др. Установлено, что тестикулярная гиалуронидаза действует на все КМПС за исключением ХСК В, пневмококковая — только на гиалуроновую кислоту и ХСК С, стрептококковая — на гиалуроновую кислоту и хондроитины.

Принцип действия. Под влиянием ферментов происходит гидролиз соответствующих полисахаридов до мономеров. Так, под влиянием гиалуронидазы димеры гиалуроновой кислоты расщепляются до глюконовой кислоты и ацетилглюкозамина:



Реактивы. 1. Растворить в 0,85%-ном растворе поваренной соли один из ферментов из расчета 1 мг на 1 мл раствора. 2. Толуидиновый синий (см. метод) — 0,5%-ный водный раствор.

Постановка реакции. 1. Срезы довести до воды. 2. Перенести в раствор фермента на 3 ч при 37°C. 3. Промыть в дистиллированной воде. 4. Окрасить в растворе толуидинового синего 20 мин. 5. Сполоснуть в воде. 6. Заключение в воду, после чего сравнить со срезом, окрашенным основным методом (см. метод) без ферментативной обработки.

Результат. В зависимости от фермента на срезах не выявляются определенные виды КМПС. К. С. Митин (1966) считает, что если после обработки бактериальной гиалуронидазой остается

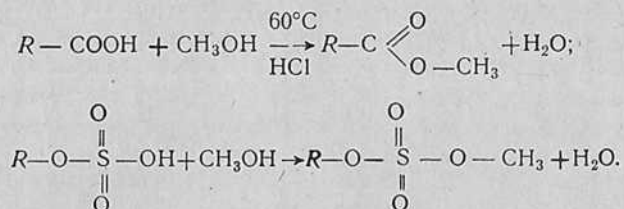
метахромазия, то причиной ее является наличие на срезах ХСК В или С. Исчезновение метахромазии свидетельствует о наличии в тканях гиалуроновой кислоты и (или) ХСК А. Возникновение метахромазии на срезах после обработки тестикулярной гиалуронидазой подтверждает наличие ХСК В.

Метилирование и деметилирование

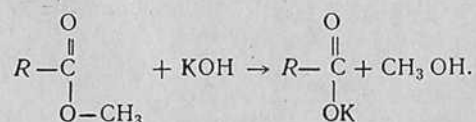
(Различные фиксаторы; парафиновые срезы)

Поскольку явление метахромазии могут вызывать кроме КМПС другие вещества (нуклеиновые кислоты, липиды, сернокислые эфиры высших спиртов) нужно выяснить природу хромотропов. Метилирование используется как контроль хромазии, вызываемой толуидиновым синим.

Принцип действия. Метанол может вступать в реакцию с карбоксильными и сульфатными группами КМПС, блокируя их, что и подавляет метахромазию:



Карбоксильные группы, блокированные метанолом, можно восстановить мягким омылением едким кали или раствором перманганата:



Восстановить сульфатные группы, блокированные метанолом, этим способом не удастся.

Реактивы. 1. 1%-ный раствор HCl в абсолютном метаноле. 2. 1%-ный раствор KOH на 70%-ном этаноле. 3. Рабочий раствор толуидинового синего (см. метод). 4. 5—10%-ный раствор молибдата аммония. 5. Буферные растворы (см. метод). 6. Абсолютный метанол.

Постановка реакции. 1. Срезы довести до воды. 2. Часть срезов поместить в закрытый сосуд с метанолом на 24 ч при 60°C, часть окрасить по соответствующему методу. 3. Метилированные срезы сполоснуть в воде. 4. Несколько метилированных срезов погрузить в раствор KOH на 45 мин при 20—22°C. 5. Метилированные и деметилированные срезы окрасить согласно методу. 6. Обезводить, просветлить и заключить в бальзам.

Результат. Оцениваются три группы препаратов: опытные, метилированные и деметилированные. Если метахромазия вызвана

группами — COOH гиалуроновой кислоты, то после метилирования она исчезает и восстанавливается после деметилирования. Метахромазия, обусловленная наличием в тканях хондроитинсульфатов, гепарина и кератосульфатов, исчезает после метилирования и не восстанавливается деметилированием.

§ 5. Схема дифференциации кислых мукополисахаридов

При гистохимическом изучении полисахаридов возникает потребность их дифференциации. Существует много схем, по которым определяют химическую природу отдельных углеводов. Наиболее распространена схема К. С. Митина, в которой суммирован комплекс гистохимических методов, изложенный выше:

- | | |
|--|---|
| I. Выявление кислых мукополисахаридов (групповые реакции) | 1. Метахромазия (толуидиновый синий)
2. Алциановый синий
3. Реакция Хейля |
| II. Подтверждение природы группы | 1. Метилирование
2. Обработка гиалуронидазой |
| III. Разделение сульфатированных и несulfатированных мукополисахаридов | 1. Связывание метиленового синего
2. Деметилирование |
| IV. Идентификация типов сульфатированных мукополисахаридов | Действие тестикулярной и бактериальной гиалуронидаз |

Глава XII. 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. Лунным 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 жирорастворимые. 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, E, K, Q и F. Водорастворимые витамины не растворяются во многих органических растворителях, термолабильны, не устойчивы

снуть в дистиллированной воде, цокласть 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.

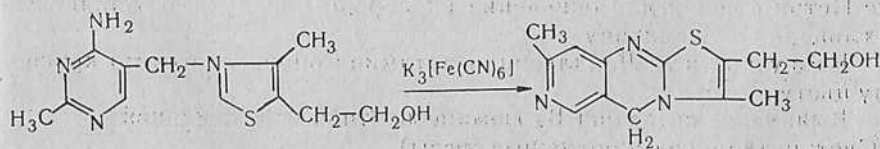
Результат. Возникает ярко-зеленая люминесценция, которая быстро затухает (10—60 сек). Много витамина в гепатоцитах, меньше — коре надпочечников, клетках желтого тела, клетках Купфера.

§ 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 В₁ люминесцентной микроскопией (Нефиксированный материал; замороженные срезы)

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



Реактивы. 5%-ный раствор $K_3[Fe(CN)_6]$ на 0,1 н. растворе NaOH.

Постановка реакции. 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. После фиксации исчезает и восстанавливается при нагревании срезов до 60—70°C.

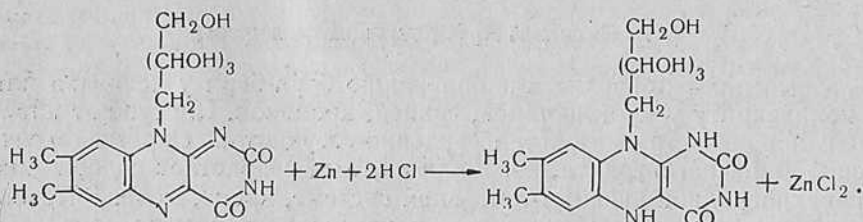
§ 3. Витамин B_2 (рибофлавин, лактофлавин, овофлавин)

При авитаминозе приостанавливается рост животных, выпадают волосы у человека и шерсть у животных, поражаются слизистые, возникают судороги, себорейные 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, оксидазы, 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 B_2 люминесцентной микроскопией

(Свежая ткань; замороженные срезы)

Метод позаимствован из биохимического анализа, в котором

определяется ФАД, общее количество флавинов и свободный рибофлавин с помощью флуорометра.

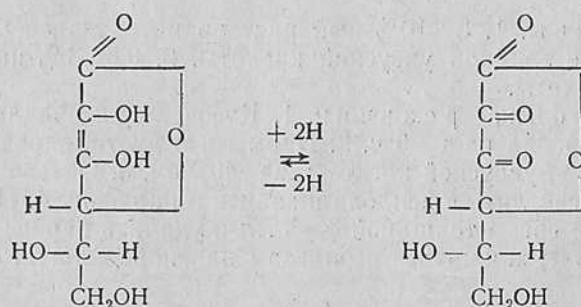
Принцип выявления. Рибофлавин обладает собственной люминесценцией, так как его молекула представляет систему конденсированных ядер с сопряженными связями. Полоса флуоресценции его нейтральных растворов размещена в области 515—613 нм с максимумом 535 нм.

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 желтовато-зеленая люминесценция с замедленным (по сравнению с витамином А) затуханием.

§ 4. Витамин С (аскорбиновая кислота, антискорбутный, или антицинготный витамин)

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 гидроксигировании и окислении гормонов коры надпочечников, синтезе ДНК, предохраняет, по-видимому, от окисления SH-группы белков, в том числе тиоловых ферментов, служит актив-

ной 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 одновременного действия света или тепла). Эта реакция осуществляется восстановленной формой аскорбиновой кислоты. Окисленная форма витамина переводится в восстановленную (см. выше), которая и взаимодействует с иодидом. 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. Обезводить 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 положить 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. Спиртовой раствор аммиака: 5 мл водного раствора гидроксида аммония прибавить к 95 мл 70%-ного этанола.

Постановка реакции. 1. Кусочки свежего материала ($2 \times 2 \times 2$ мм) поместить в раствор нитрата серебра на 24 ч при $0-3^\circ\text{C}$ в темноте ($\text{pH} = 2,0-2,5$). 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.

Глава XIII. 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, вазопрессин, 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 Э. 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.

на 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. Некоторые гормоны используют в медицинской и ветеринарной практике (инсулин, окситоцин, вазопрессин, фолликулин, эстрон, эстриол, эстрадиол и др.). Существуют гистохимические методы выявления локализации гормонов.

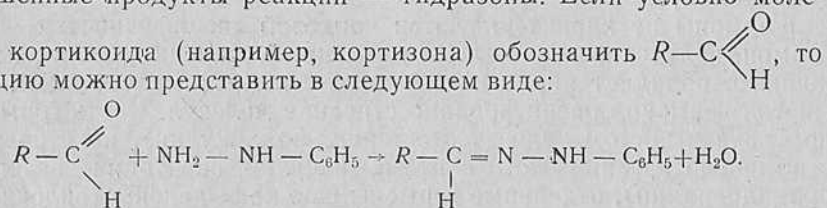
§ 1. Гормоны коркового слоя надпочечников

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)

П р и н ц и п в ы я в л е н и я. Выявление кортикоидов основано на реакции их альдегидо- и кетогрупп с гидразинами. Образуются окрашенные продукты реакции — гидразоны. Если условно молекулу кортикоида (например, кортизона) обозначить $R-C \begin{matrix} \nearrow O \\ \searrow H \end{matrix}$, то реакцию можно представить в следующем виде:



Р е а к т и в ы. 1. Раствор гидразина: 5 г фенилгидразина, 10 мл ледяной уксусной кислоты, 40 мл дистиллированной воды.

П о с т а н о в к а р е а к ц и и. 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.

Р е з у л ь т а т. В местах локализации кортикоидов возникает

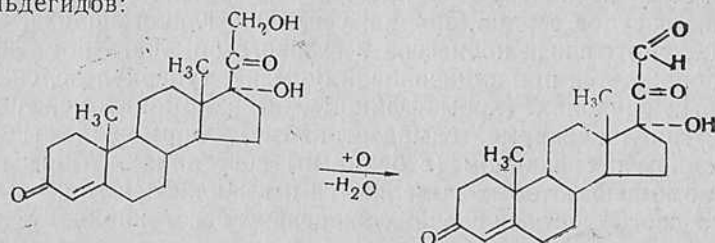
желтая окраска. Желательно применять синий или зеленый фильтры.

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 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 α -кетогрупп кортикоидов по Канолкару

(Свежие ткани; срезы, приготовленные в криостате и на замораживающем микротоме)

Принцип выявления. Многие кортикоиды коры надпочечников — кортизон, гидрокортизон, кортикостерон, 11-дезокортикостерон, альдостерон — являются α -кетоспиртами. На первом этапе под влиянием хлорида железа α -кетоспирты окисляются до кетоальдегидов:



В дальнейшем срезы обрабатывают реактивом Шиффа. Перед проведением реакции альдегиды тканей блокируют смесью Лилли, что обеспечивает специфичность метода.

Р е а к т и в ы. 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.

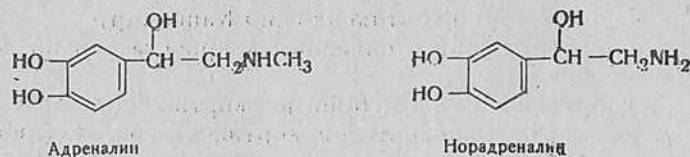
П о с т а н о в к а р е а к ц и и. 1. Срезы погрузить в смесь Лилли на 20 мин. 2. Промыть в дистиллированной воде 1—3 мин. 3. Перенести в раствор хлорида железа на 30 мин при 50°C. 4. Промыть в дистиллированной воде. 5. Поместить в реактив Шиффа на 20 мин. 6. Промыть в трех порциях дисульфидной воды (по 2 мин в каждой). 7. Заключить в глицерин — желатину.

Р е з у л ь т а т. Выявляются две группы гормонов коры надпочечников — глюкокортикоиды и минералокортикоиды. Они определяются по красной окраске. Андрогены, эстрогены 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 пронеуробластов 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:



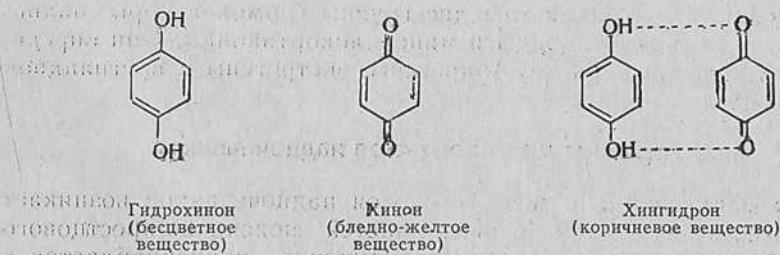
Гормоны способствуют усилению сердечной деятельности, расширению сосудов сердца, зрачка, усилению гликогенолиза, активации окислительных процессов и газового обмена. Хромаффинная ткань поражается при аддисоновой болезни, туберкулезе, сифилисе, некоторых опухолях (хромаффиноме, феохромоцитоме, параганглиоме, 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 феохромными, 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, обезводить в спиртах, просветлить в ксилоле, заклЮчить в бальзам).

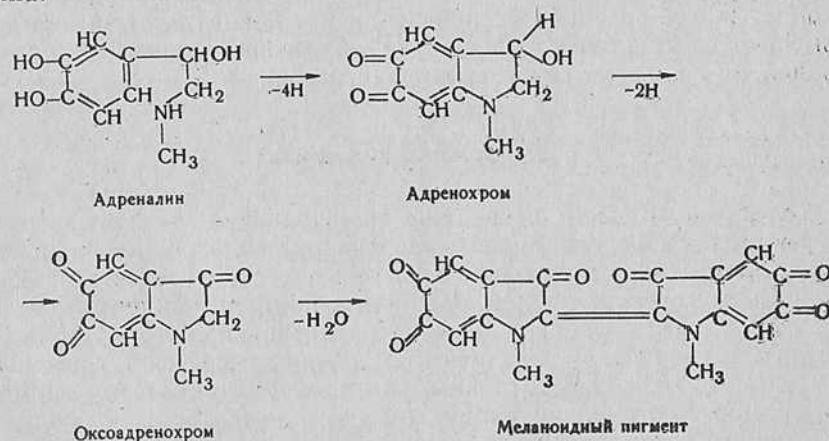
Результат. Хромаффинное вещество окрашивается от темно-коричневого до желтоватого цвета. Клетки, содержащие адреналин, приобретают темно-коричневую, норадреналин — желтоватую и желтовато-коричневую окраски.

Выявление норадреналина по Хилларпу и Хёкфельту

(Свежие ткани; замороженные срезы)

Авторы метода установили, что после окисления KIO_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. Это можно иллюстрировать на примере 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 клет-

ках параганглиев брюшной полости, энтерохромаффинных клетках желудка и т. д. Адреналин выявляется через 20—24 ч.

Люминесцентный метод выявления норадреналина по Эрэнке (Свежие ткани; замороженные срезы)

Автор метода установил корреляцию между интенсивностью люминесценции клеток мозгового слоя надпочечников и содержанием в них норадреналина.

Принцип выявления. После фиксации в формалине клетки мозгового слоя надпочечника обладают желтовато-зеленой флуоресценцией. Максимум спектра возбуждения имеет длину волны 285 нм, флуоресценции — 325 нм. Локализация медиатора подтверждается предыдущим методом.

Реактивы. Раствор формалина: 1 объем неразбавленного формалина, который имеется в продаже, 5 объемов 2%-ного раствора хлорида кальция, 4 объема дистиллированной воды.

Постановка реакции. 1. Приготовить срезы (на обычном замораживающем микротоме, в криостате или на замораживающем микротоме с ножом глубокого охлаждения) толщиной до 50 мкм. 2. Поместить в раствор формалина на 2—6 ч. 3. Сполоснуть в дистиллированной воде. 4. Наклеить на предметные стекла. 5. Исследовать в люминесцентном микроскопе.

Результат. Цитоплазма клеток, содержащих норадреналин, обладает желто-зеленой люминесценцией. Такие клетки обычно размещаются группами. Клетки, не обладающие яркой флуоресценцией, по-видимому синтезируют адреналин.

§ 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 интермедин — меланоцитостимулирующий гормон, принимающий участие в регуляции пигментного обмена. В задней доле вырабатываются гормоны, с деятельностью которых связано сокращение мускулатуры матки (окситоцин) 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 вазопрессин и окситоцин.

В клинике встречаются патологические нарушения деятельности гипофиза и его отдельных долей. В частности, повышение или по-

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 тирозином.

Глава XIV. ФЕРМЕНТЫ

Ферменты (от лат. fermentum — закваска) — вещества белковой природы, способные каталитически ускорять течение химических реакций. Синтезируются в клетках человека, животных, растений, микробах и вирусах. Часто употребляется синоним слова «фермент» — энзим (от гр. εν — внутри и ζυμη — закваска).

Значение ферментов огромно. Они обеспечивают успешное протекание различных химических реакций, лежащих в основе существования живой материи. И. П. Павлов назвал ферменты истинными двигателями всех жизненных процессов.

Ферменты известны человеку с глубокой древности. С деятельностью этих веществ связано приготовление человеком многих продуктов питания — сыров, кефира, хлеба, вин. Ферменты широко использовались при изготовлении многих лекарств и предметов быта. Изучение ферментов начато в 1600 г. Я. Ван-Гельмонтом, который сравнил реакции пищеварения с процессами спиртового брожения. Русский ученый К. Кирхгоф в 1811—1814 гг. установил, что экстракт солода разлагает крахмал на декстрины и мальтозу. Несколько позже из солодового экстракта было выделено вещество, катализирующее эти процессы, и назвали его диастазой. Т. Шванн в 1836 г. получил из желудочного сока пепсин. А. Я. Данилевский в 1862 г. выделил из сока поджелудочной железы трипсин, амилазу и липазу. Ценные данные по многим ферментам получены Л. Пастером, Ю. Либихом, Э. Бухнером, М. М. Манассеиной, Э. Фишером и др.

В начале XX века начинается новый этап в развитии науки о ферментах — выявление (биохимическое и гистохимическое), выделение, очистка, изучение физических и химических свойств, исследование химического строения и химизма процессов, катализируемых ферментами. Д. Самнер в 1926 г. выделил первый фермент в кристаллическом виде — уреазу. Вслед за ним Д. Нортроп и сотрудники получили в кристаллическом виде пепсин, трипсин и химотрипсин. Сейчас известно свыше 150 ферментов, которые выделены в кристаллическом состоянии. Для некоторых ферментов установлена последовательность расположения аминокислотных остатков в молекуле и выяснена конфигурация.

Исследования Р. Вильштеттера и сотрудников показали, что существует одно- и двухкомпонентные ферменты. Первые по химической природе являются простыми белками, вторые состоят из двух частей: белковой (ферона) и простетической группы (аго-

на). Простетическая группа включает фосфорные эфиры витаминов группы В, нуклеотиды и др.

Для ферментов характерна высокая молекулярная масса (100 тыс. — 1 млн.), термолабильность (наибольшая активность наблюдается при 37—40°C), каждый фермент для своего каталитического действия требует определенное значение рН, ферменты обладают групповой (пепсин, трипсин, амилаза) и индивидуальной (лактаза, каталаза, уреазы) специфичностью, высокой каталитической способностью (одна молекула каталазы при 40°C за 1 сек расщепляет 550 тыс. молекул пероксида водорода), чувствительны к специфическим и неспецифическим активаторам и парализаторам.

В настоящее время известно свыше 1000 ферментов. На V Международном биохимическом конгрессе в Москве в 1961 г. принята новая классификация ферментов и их номенклатура. Все ферменты делят на 6 классов: 1) оксидоредуктазы — осуществляют окислительно-восстановительные реакции; 2) трансферазы — ускоряют реакции переноса молекулярных остатков и атомных групп; 3) гидролазы — с их участием осуществляются реакции гидролитического расщепления и синтеза многих веществ; 4) лиазы — ферменты, ускоряющие негидролитическое отщепление от субстратов атомных групп с образованием двойной связи или присоединение группы атомов по двойной связи; 5) изомеразы — осуществляют изомерные превращения веществ; 6) лигазы — ферменты, катализирующие процессы синтеза, сопряженные с распадом донаторов энергии.

В биохимической и гистохимической практике пользуются тривиальными, или рабочими, и научными, или синтетическими, названиями ферментов. Согласно научной номенклатуре фермент называют по химическому названию субстрата и наименованию реакции, им осуществляемой. Например, фермент, обеспечивающий реакцию переаминирования, протекающую между *L*-аланином и α -кетоглутаровой кислотой, по новой номенклатуре называется *L*-аланин: 2-оксоглутаратамиотрансфераза.

Согласно новой классификации каждый фермент имеет индивидуальный номер, или шифр. Первая цифра такого шифра обозначает класс, вторая — подкласс, третья — подподкласс, четвертая — порядковый номер фермента в данном подподклассе.

Большинство гистохимических методов выявления ферментов основано на способности последних расщеплять естественные или искусственные субстраты. В результате этих реакций в местах размещения молекул ферментов выпадают продукты ферментативного катализа, которые в дальнейшем переводятся в окрашенные соединения, нерастворимые или малорастворимые в воде и органических растворителях. Известно более 100 ферментов, которые можно изучать цито- и гистохимическими методами. Основные из них изложены в настоящей главе. Механизм ферментативных реакций приводится чаще всего по М. Диксону и Э. Уэббу (1966).

§ 1. Класс оксидоредуктаз

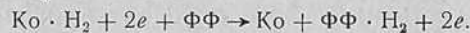
К данному классу относятся ферменты, которые катализируют окислительно-восстановительные реакции, лежащие в основе биологического окисления. Процесс состоит из последовательных и взаимосвязанных реакций дегидрирования и переноса отщепленных протонов и электронов через ряд переносчиков с образованием конечного продукта реакции — воды. В результате клетки получают в виде макроэргов запасы химической энергии, так как клеточное дыхание связано с фосфорилированием. Субстратами могут быть углеводы, продукты их распада, жирные кислоты, глицерин и др.

Основными местами внутриклеточной локализации оксидоредуктаз являются митохондрии. Биологическое окисление начинается с отщепления от субстрата одной из дегидрогеназ протонов H^+ и электронов e . Дегидрогеназы — двухкомпонентные ферменты, состоящие из белка и кофермента Co , или кодегидразы — протестической группы. Последняя представлена НАД или НАДФ, способных присоединять ионы водорода и передавать их на другие акцепторы:



Участие в реакции дегидрирования (окисления) отдельных ферментов определяется субстратом. Так, если субстратом является молочная кислота, эти реакции осуществляет лактатдегидрогеназа, янтарная кислота — сукцинатдегидрогеназа и т. д. После восстановления НАД- или НАДФ-дегидрогеназ специфичность субстрата теряется. Перенос протонов и электронов теперь для всех окисленных субстратов осуществляется одинаково.

Следующим звеном дыхательной цепи являются флавиновые ферменты $F\Phi$, протестической группой которых является FAD . FAD состоит из рибофлавина, двух остатков фосфорной кислоты, рибозы и аденина. Акцептором протонов служит изоаллоксановое кольцо $F\Phi$. Схематически участие $F\Phi$ в переносе протонов и электронов можно изобразить так:



Кофермент в составе соответствующих дегидрогеназ снова вступает в реакцию с новыми молекулами субстрата, а восстановленная форма $F\Phi$ передает протоны и электроны на систему цитохромов. При этом протоны выделяются в окружающую среду, а электроны последовательно переносятся с $F\Phi$ на молекулу цитохрома b , затем на цитохром c и c_1 , потом на цитохром a и, наконец, на цитохром a_1 (цитохромоксидазу). Восстановленная форма цитохромоксидазы (ЦХО) передает электроны молекулярному кислороду. Протоны водорода соединяются с активированным ЦХО кислородом, образуя воду:

тем вступает в реакцию с нитросиним тетразолием (нитро-СТ), восстанавливая его до формазанов (см. выше).

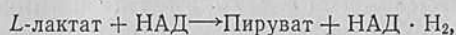
Реактивы. 1. Инкубационная среда: 0,1 мл 1 М раствора *dl*-глицерофосфата натрия, нейтрализованного 0,1 М раствором HCl, 0,1 мл 0,1—1 М раствора НАД, 0,1 мл 0,1 М раствора цианида натрия, 0,25 мл 0,2 М трис-буфера (рН=6,8—7,0), 0,25 мл раствора нитро-СТ (1 мг на 1 мл), долить дистиллированной воды до 1 мл, добавить 75 мг поливинилпирролидона (мол. масса 11 тыс.). 2. Жидкость Бэкера или 10%-ный раствор хлорида натрия в 10%-ном растворе формалина.

Постановка реакции. 1. Приготовить срезы. 2. Каждый срез покрыть инкубационной смесью (0,1—0,2 мл), после чего инкубировать на воздухе при 37°C. 3. Перенести в кальций-формол или формалин-солевой раствор на 10 мин. 4. При необходимости можно докрасить ядра. 5. ЗаклЮчить в глицерин — желатину.

Результат. Места размещения фермента определяются по красным (моноформаза) или синим (диформаза) осадкам. Фермент выявляется в поперечнополосатой мышечной ткани, нервной системе, опухолях и др.

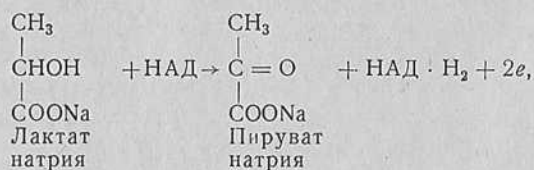
Выявление лактатдегидрогеназы по Гессу, Скарпелли и Пирсу (Свежая ткань; срезы, приготовленные в криостате или на замораживающем микротоме)

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) — один из важнейших ферментов анаэробного и аэробного расщепления углеводов. Шифр — 1.1.1.27, систематическое название — *L*-лактат: НАД-оксидоредуктаза, кофактором является цинк, фермент катализирует реакцию:



содержится в различных тканях животных и микробах, окисляет 1,2-оксимоникарбоновые кислоты, с НАДФ реагирует медленно.

Принцип выявления. Фермент с помощью НАД отщепляет от субстрата протоны и электроны:



которые акцептируются нитро-СТ (см. предыдущий метод).

Реактивы. 1. Инкубационная среда: 0,1 мл 1 М раствора *DL*-лактата натрия, 0,1 мл 0,1—1 М раствора НАД, 0,1 мл 0,1 М раствора цианида натрия, 0,25 мл 0,06 М фосфатного буферного раствора (рН=6,8—7), 0,25 мл раствора нитро-СТ в концентрации 1 мг/мл, долить дистиллированной воды до 1 мл, добавить 75 мг поливинилпирролидона. 2. 10%-ный раствор хлорида кальция или хлорида натрия в 10%-ном растворе формалина.

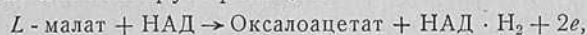
Постановка реакции. 1. На срезы нанести 0,1—0,2 мл

инкубационной среды и инкубировать в течение 5—30 мин при 37°C. 2. Поместить в один из фиксирующих растворов на 10 мин. 3. При необходимости докрасить ядра. 4. ЗаклЮчить в глицерин-желатину.

Результат. Локализацию ЛДГ определяют по красным и синим осадкам формазанов.

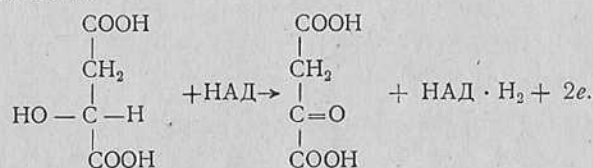
Выявление малатдегидрогеназы по Гессу, Скарпелли и Пирсу (Свежие ткани; срезы, приготовленные в криостате и на замораживающем микротоме)

Фермент широко распространен в различных тканях человека, животных, растений, содержится в дрожжах, бактериях. Малатдегидрогеназа (МДГ) — один из ферментов, принимающих участие в функционировании цикла трикарбоновых кислот Кребса. Шифр — 1.1.1.37, систематическое название — *L*-малат: НАД-оксидоредуктаза. Фермент катализирует реакцию:



окисляет другие 2-оксидикарбоновые кислоты.

Принцип выявления. Фермент осуществляет каталитическое отщепление протонов и электронов от малата натрия или яблочной кислоты:



В дальнейшем протоны и электроны акцептируются молекулами нитро-СТ, что и приводит к образованию осадков моно- и диформазанов (см. предыдущие методы).

Реактивы. 1. Инкубационная среда: 0,1 мл 1 М раствора *L*-малата натрия или *L*-яблочной кислоты, рН довести до 7 добавлением 0,2 М трис-буфера (рН=6,8—7), добавить 0,1 мл 0,1—1 М раствора НАД или НАДФ, 0,1 мл 0,1 М раствора цианида натрия, 0,25 мл фосфатного буферного раствора (0,06 М, рН=6,8—7), добавить 0,25 мл раствора нитро-СТ в концентрации 1 мг/мл, долить дистиллированной воды до 1 мл, добавить 75 мг поливинилпирролидона. 2. Фиксаторы: 10%-ный раствор хлорида кальция или хлорида натрия в 10%-ном растворе формалина.

Постановка реакции. 1. Срезы покрыть 0,1—0,2 мл инкубационной среды и оставить в течение 5—30 мин при 37°C на открытом воздухе. 2. Перенести в один из фиксаторов на 10 мин. 3. Можно окрасить ядра. 4. ЗаклЮчить в глицерин — желатину (чистую или содержащую примесь 0,5 М раствора ацетата кобальта).

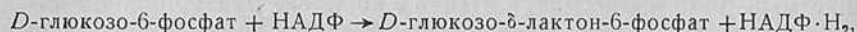
Результат. Локализация фермента определяется по выпадению осадков моно- (красный) и ди- (синий) формазанов. Высокая активность фермента обнаруживается в слюнных трубках подчелюстной железы.

Примечание: Более выражена реакция при наличии в инкубационной среде НАД.

Выявление глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы по Гессу, Скарпелли и Пирсу

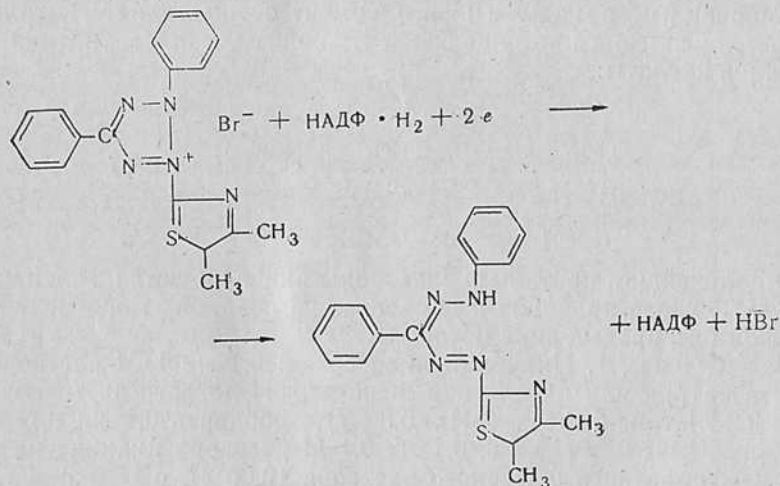
(Срезы, приготовленные из свежемороженой ткани, срезы, приготовленные в криостате и наклеенные на предметные стекла)

Фермент является первым в пентозном цикле окисления фосфорилированной глюкозы. Шифр — 1.1.1.49, систематическое название — *D*-глюкозо-6-фосфат: НАДФ-оксидоредуктаза. Катализирует реакцию:



содержится в тканях животных, растений, дрожжах, бактериях.

Принцип выявления. С помощью НАДФ фермент отщепляет от глюкозо-6-фосфата протоны и электроны, которые акцептируются МТТ — бромид 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолием, превращая его в моно- и диформазаны:



Реактивы: 1. Инкубационная смесь: 0,1 мл раствора двунаптовой или кальциевой соли глюкопиранозо-6-фосфата, 0,1 мл 0,1—1 М раствора НАД, 0,1 мл 0,1 М раствора амиталя или азиды, 0,25 мл 0,2 М трис-буфера (рН=6,8—7), 0,05 мл 0,5 М раствора хлорида кобальта, 0,05 мл фторида натрия (0,01 М раствор), 0,25 мл раствора соли МТТ в концентрации 1 мг/мл, долить дистиллированной воды до 1 мл, добавить 75 мг поливинилпирролидона. 2. Фиксаторы: 10%-ный раствор хлорида кальция или хлорида натрия в 10%-ном растворе формалина. 3. 1%-ный раствор соляной кислоты.

Постановка реакции. 1. Срезы покрыть инкубационной смесью (0,1—0,2 мл) и оставить на воздухе в течение 5—30 мин при 37°C. 2. Промыть срезы в 1%-ном растворе HCl (30 с). 3. Фикси-

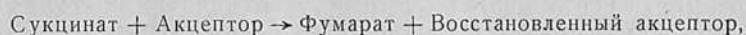
ровать в соответствующем растворе 10 мин. 4. Заключить в чистую или содержащую 0,5 М раствор ацетата кобальта глицерин — желатину.

Результат. Черный осадок кобальт-формазана или темно-пурпурный осадок диформазана свидетельствует о локализации фермента в митохондриях. Не допускать перемораживания ткани.

Выявление сукцинатдегидрогеназы по Нахласу, Валькеру и Зелигману

(Свежая ткань; срезы, приготовленные на замораживающем микротоме и в криостате)

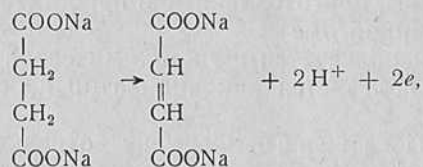
Сукцинатдегидрогеназа (СДГ) относится к числу наиболее распространенных ферментов. Является одним из центральных ферментов цикла трикарбоновых кислот Кребса. Шифр — 1.3.99.1. Систематическое название фермента — сукцинат: (акцептор)-оксидоредуктаза, по химической природе — флавинопротеид, молекула содержит железо, в составе активного центра имеются сульфгидрильные группы. Осуществляет катализ реакции:



содержится во всех клетках животных, дрожжах, бактериях.

Существует ряд методов выявления СДГ, основанных на использовании различных тетразолиев. Лучшие результаты получены при нитро-СТ.

Принцип выявления. Основан на тех же химических реакциях, что и предыдущие методы. Вначале СДГ отщепляет от сукцината протоны и электроны:



которые акцептируются нитро-СТ; при этом молекулы нитро-СТ восстанавливаются до моно- и диформазанов (см. метод «Выявление α -глицерофосфатдегидрогеназы»).

Реактивы. 1. Буферный раствор сукцината натрия: смешать равные объемы 0,2 М фосфатного буферного раствора (рН=7,6) и 0,2 М раствора сукцината натрия. 2. Инкубационная среда: к 10 мл буферного раствора сукцината натрия прибавить 10 мл водного раствора нитро-СТ с концентрацией 1 мг/мл. М. Берстон рекомендует перед приготовлением инкубационной среды нужное количество тетразолия растворить в нескольких каплях этанола. 3. Солевой раствор — 0,85%-ный раствор NaCl. 4. Формалин-солевой раствор — приготовить 10%-ный раствор формалина на солевом растворе. 5. 15%-ный раствор этанола.

Постановка реакции. 1. Срезы поместить в инкубационную среду на 5—20 мин при 37°C. 2. Промыть в солевом растворе. 3. Перенести в формалин-солевой раствор на 10 мин. 4. Промыть

в 15%-ном растворе этанола 5 мин. 5. ЗаклЮчить в глицерин — желатину (можно обезводить в спиртах или растворах ацетона в ксилоле, просветлить в ксилоле и заклЮчить в бальзам или полистирол).

Результаты. Осадки моно- и диформаза свидетельствуют о наличии и локализации СДГ. Высокие концентрации фермента выявляются в различных структурах нервной системы и, прежде всего, в нейронах. Богаты ферментом концевые отделы и выводные протоки пищеварительных желез.

Выявление НАД- и НАДФ-диафораз

Ферменты относятся ко второму звену дыхательной цепи. Это сложные белки, простетическая группа которых состоит из флавинонуклеотидов, содержащих окисленную форму витамина В₂. В отличие от дегидрогеназ, для которых характерна диссоциация на специфические белки и простетическую группу (НАД или НАДФ) во время отщепления протонов и электронов от соответствующих субстратов, диафоразы, или флавиновые ферменты, остаются при этих процессах стабильными соединениями. После присоединения водорода фермент восстанавливается и исчезает желтая окраска.

Шифр фермента — 1.6.1.1, донором служат НАД или НАДФ, систематическое название — НАДФ · Н₂: НАД-оксидоредуктаза. Катализирует реакцию:

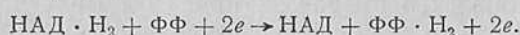


содержится в тканях животных, дрожжах, бактериях, может дополнительно действовать на дезаминокоферменты.

Выявление НАД-диафоразы по Нахласу, Уокеру, Зелигману (Свежая ткань; срезы, приготовленные в криостате или на обычном замораживающем микротоме)

Метод широко используется в гистохимической практике. Реакция на фермент используется как индикатор на состояние митохондрий.

Принцип выявления. Фермент отщепляет водород от восстановленной формы НАД:



В дальнейшем восстановленная форма флавинового фермента (белок · ФАД · Н₂) передает протоны и электроны молекулам нитро-СТ, восстанавливая их до моно- и диформаза (см. «Выявление α-глицерофосфатдегидрогеназы»). Влияние на течение реакций лактата натрия и ЛДГ не получило нужного теоретического обоснования. Оно доказано эмпирическим путем.

Реактивы. 1. Инкубационная среда: 0,6 мл 0,5 М раствора лактата натрия (рН довести фосфатным буферным раствором до 7,4), 0,2 мл 1,5%-ного раствора ЛДГ, 0,3 мл раствора нитро-СТ в концентрации 5 мг/мл, 1 мл 0,2 М фосфатного буфера (рН=7,4), дистиллированной воды — 0,6 мл. 2. 0,85%-ный раствор NaCl. 3. 10%-ный раствор хлорида натрия в 10%-ном растворе формалина.

Постановка реакции. 1. Срезы наклеить на предметные

стекла. 2. Нанести инкубационную среду и инкубировать 5—30 мин при 20—22°C. 3. Сполоснуть в физиологическом растворе. 4. Поместить в фиксатор на 10 мин. 5. ЗаклЮчить в глицерин — желатину.

Результат. Локализация фермента определяется по выпадению синих осадков диформаза. Красное окрашивание расценивается как артефакт и удаляется после обработки 10—15%-ным этанолом.

Выявление НАДФ-диафоразы по Нахласу, Уокеру, Зелигману (Свежий материал; срезы, приготовленные в криостате и на обычном замораживающем микротоме)

Метод широко применяется в гистохимической практике. Авторы метода выявляли фермент внутри и вне митохондрий.

Принцип выявления. Такой же, как в предыдущем методе с той разницей, что в состав инкубационной среды вместо НАД входит НАДФ.

Реактивы. 1. Инкубационная среда: 0,6 мл 1,1 М раствора DL-изоцитрата натрия, 0,5 мл 2,5 М раствора L-малата натрия, 0,3 мл 0,005 М раствора хлорида магния, 0,2 мл раствора НАДФ в концентрации 5 мг/мл, 0,3 мл нитро-СТ в концентрации 5 мг/мл, добавить 1,1 мл 0,05 М веронал-ацетатного буферного раствора (рН=7,4). 2. 0,85%-ный раствор NaCl. 3. Фиксатор: 10%-ный раствор NaCl в 10%-ном растворе формалина.

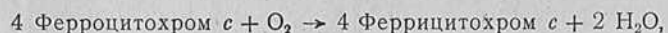
Постановка реакции. 1. Наклеить срезы на предметные стекла. 2. Нанести на них инкубационную среду на 5—30 мин при 20—22°C. 3. Сполоснуть в солевом растворе. 4. Поместить в фиксатор на 10 мин. 5. ЗаклЮчить в глицерин — желатину (можно обезводить в спиртах, просветлить в ксилоле, заклЮчить в бальзам или другую среду).

Результат. Места размещения фермента определяются по осадкам диформаза.

Примечание. Все основные растворы хранить при температуре 4—6°C (до 3 месяцев), растворы ЛДГ, НАДФ — при температуре —20°C.

Выявление ЦХО

ЦХО — заключительный фермент дыхательной цепи, осуществляющий перенос протонов и электронов к атомарному кислороду с образованием воды. ЦХО относится к цитохромам группы А и именуется цитохромом *a₃*. Шифр ЦХО — 1.9.3.1, она оказывает каталитическое действие на группы гема (цитохромы *b* и *c* близки по строению к гему гемоглобина), акцептором служит кислород, систематическое название — цитохром *c*: O₂-оксидоредуктаза, гемопроteid, в молекуле имеется медь. Катализирует реакцию:



широко распространена в тканях животных и растений. Фермент тесно связан со структурой и функциями митохондрий, его молекула содержит 33,2% липидов, в том числе 14,3% фосфатидов.

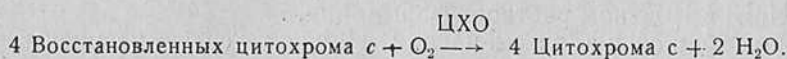
а) G-нади-оксидазная реакция Кейлина и Хартри (Свежая ткань; замороженные срезы)

Реакция открыта Эрлихом в 1885 г. Он установил, что после введения в организм животных α -нафтола и диметил-*n*-фенилендиамина в тканях возникает синяя окраска. Это и послужило причиной названия реакции — нади (нафтол и диметил-*n*-фенилендиамин). Грэфф в 1916 г. установил, что реакция может протекать в нефисированных тканях, после чего ее стали называть «G-нади-реакция» (от нем. Gewebe — ткань).

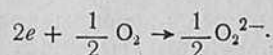
Принцип выявления. На первом этапе реакция протекает так:



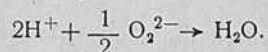
В дальнейшем химизм реакции можно изобразить схемой:



В цитохромной системе клетки эти процессы протекают гораздо сложнее. Электроны постепенно передаются кислороду через систему цитохромов. Восстановленная форма ЦХО реагирует непосредственно с молекулярным кислородом, передавая ему электроны:



Ионы водорода взаимодействуют с ионами кислорода:



Р е а к т и в ы. 1. Инкубационная среда: смешать равные объемы 0,01 М раствора диметил-*n*-фенилендиаминхлорида и 0,01 М раствора α -нафтола (оба раствора готовить на 1%-ном растворе NaCl с добавлением буферного раствора, лучше фосфатного, с рН=5,8). 2. 1-й контрольный раствор: смешать равные объемы раствора «нади» и 0,005 М раствора азиды натрия, приготовленного на физиологическом растворе. 3. 2-й контрольный раствор: смешать равные объемы раствора «нади» и 0,003 М фенилуретана, приготовленного на физиологическом растворе. 4. 0,005 М раствор азиды натрия, приготовленного на физиологическом растворе. 5. 0,003 М раствор фенилуретана, приготовленного на физиологическом растворе. 6. 5%-ный раствор ацетата калия. 7. Раствор Рингера: растворить 9 г хлорида натрия, 0,25 г хлорида кальция, 0,42 г хлорида

калия в 1 л дистиллированной воды (CaCl_2 растворить после NaCl и KCl).

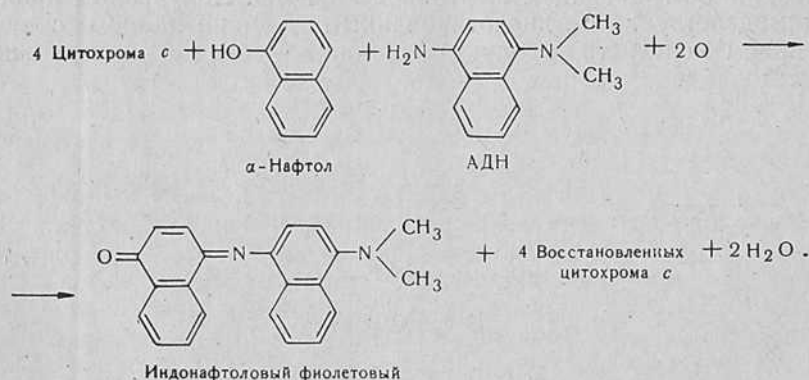
Постановка реакции. 1. Приготовить срезы. 2. Промыть в растворе Рингера. 3. Часть срезов поместить в инкубационную среду на 2—5 мин при 37°C . 4. Часть срезов промыть в растворе азидата натрия и поместить в 1-й контрольный раствор на 2—5 мин, часть — промыть раствором фенилуретана и инкубировать во 2-м контрольном растворе 2—5 мин при 37°C . 5. Промыть в физиологическом растворе. 6. При необходимости докрасить квасцовым кармином 30 мин. 7. ЗаклЮчить в 5%-ный раствор ацетата калия, окантовать парафином.

Результат. Места локализации ЦХО окрашены в синий или синева-фиолетовый цвет. На контрольных препаратах, обработанных растворами азидата натрия, фермент инактивирован. На втором контрольном препарате окраска сохранена, так как фенилуретан подавляет лишь активность дегидрогеназ, способствуя лучшему выявлению ЦХО.

б) Метод Нахласа, Крауфорда, Гольштейна и Зелигмана

(Свежая ткань; срезы, приготовленные в криостате и на замораживающем микротоме)

Принцип выявления. Обнаружение ЦХО основано на тех же реакциях, что и в предыдущем методе. Основное различие заключается в использовании реактива — 4-амино-N-диметилнафтиламина (АДН). Реакция протекает так:



Реактивы. 1. Инкубационная среда: 3 мл 0,1 М фосфатного буферного раствора ($\text{pH}=7,4$), 4 мл раствора α -нафтола в концентрации 1 мг/мл, 3 мл раствора цитохрома *c* в концентрации 5 мг/мл, 1 мл раствора каталазы — в концентрации 30 мг/мл, перед употреблением добавить 4 мл раствора АДН — 2 мг/мл. 2. 0,9%-ный раствор NaCl .

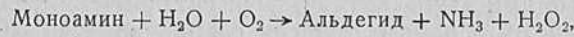
Постановка реакции. 1. Срезы поместить в инкубационную среду на 10—30 мин при комнатной температуре. 2. Сполоснуть в солевом растворе. 3. ЗаклЮчить в глицерин — желатину.

Результат. Локализация ЦХО определяется по гранулам фиолетового цвета. Активность ЦХО уменьшается при карциномах матки и глотки.

Выявление моноаминоксидазы по Келле и Вальку

(Свежая ткань; срезы, приготовленные в криостате и наклеенные на предметные стекла; замороженные срезы).

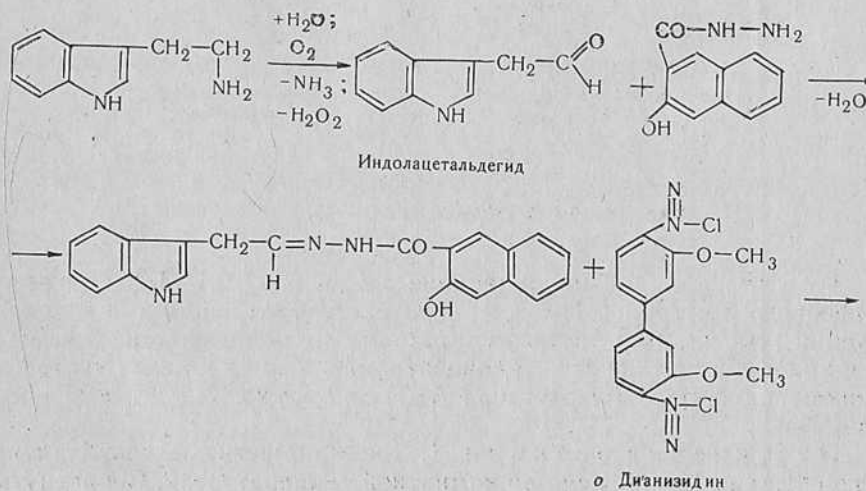
Фермент широко распространен в тканях человека, животных и растений. Шифр — 1.4.3.4, действует на —СН—NH₂-группу доноров, акцептором служит O₂, тривиальное название — моноаминоксидаза (МАО), систематическое название — моноамин: O₂-оксидоредуктаза (дезаминирующая), в молекуле содержится медь. Катализирует реакцию:

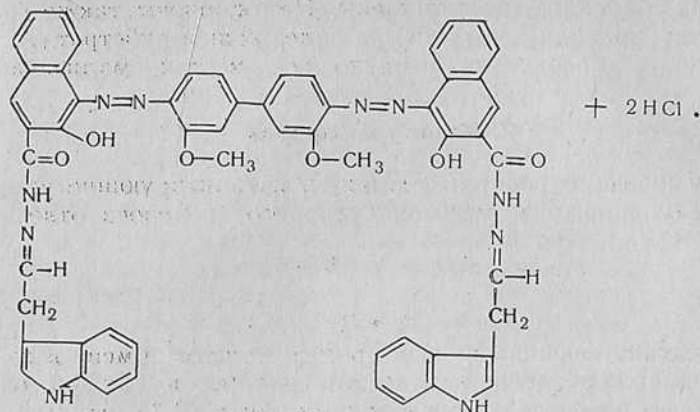


действует на первичные, вторичные и третичные амины.

МАО участвует в обезвреживании ядовитых аминов, разрушении избытков адреналина и норадреналина, дезаминировании серотонина и тирамина. Фермент локализуется в митохондриях. Много его содержится в слизистой кишечника, печени, мозге, легких, коже.

Принцип выявления. Предполагается, что на первой стадии происходит дезаминирование триптамина и образование индолацетальдегида. На следующей стадии индолацетальдегид вступает в реакцию с гидразидом нафтойной кислоты. Полученный продукт взаимодействует с диазотированным *o*-дианизидином с образованием конечного продукта реакции — осадков лилово-синего цвета:





Реактивы: А. Исходные растворы. 1. 0,1 М раствор соляно-кислого гидразина. 2. 40%-ный раствор сульфата натрия, рН которого доведен до 8,6 добавлением NaOH. 3. 0,2 М фосфатный буферный раствор. 4. Гидразид 2-окси-3-нафтойной кислоты. 5. 0,1 М раствор фосфата изоникотинил-2-изопропилгидразина (Марсилада). 6. 0,1 М раствор солянокислого триптамина. 7. 1 н. раствор NaOH.

В. Рабочие растворы. 1. Среда для предварительной инкубации: 3 мл воды, 1,5 мл солянокислого гидразина, 8 мл фосфатного буферного раствора, 7,5 мл раствора сульфата натрия (рН довести до 7,6). 2. Контрольная среда для предварительной инкубации: тот же состав, что и в пункте 1 + 0,15 мл Марсилада. 3. Раствор для промывания: 4,5 мл воды, 3 мл фосфатного буферного раствора, 7,5 мл раствора сульфата натрия. 4. Инкубационная среда: 4,35 мл воды, 0,15 мл раствора NaOH, 3 мл фосфатного буферного раствора, 7,5 мл сульфата натрия; нагреть до 80—90°C, насытить гидразином нафтойной кислоты, охладить, профильтровать, после чего добавить 1 мл раствора триптамина. 5. Контрольная инкубационная среда: тот же состав, что и в предыдущем пункте, но добавить 0,15 мл Марсилада. 6. «Проявитель»: 300 мг прочного синего В растворить в 10 мл воды, смешанной с 5 мл фосфатного буферного раствора (рН=7,4), профильтровать и сразу использовать. 7. 10%-ный раствор формалина.

Постановка реакции. 1. Срезы поместить на 1 ч при 22°C в среду для предварительной инкубации. 2. Промыть в растворе сульфата натрия. 3. Промокнуть фильтровальной бумагой и поместить в инкубационную среду на 2 ч, пропуская через нее кислород. 4. Промыть в воде. 5. Поместить в «проявитель» на 3 мин. 6. Промыть в воде. 7. Поместить в 10%-ный раствор формалина. 8. Контрольные срезы подвергнуть тем же процедурам, инкубируя в соответствующих растворах. 9. ЗаклЮчить в глицерин — желатину.

Результат. Наличие лилово-синей окраски свидетельствует о локализации МАО. Контрольные срезы, инкубированные в средах,

содержащих Марсилит, не окрашены. Не окрашены также срезы, которые инкубировались в среде, не содержащей субстрат. Активность фермента возрастает в опухолях — местах малигнизации и полипах.

§ 2. Класс трансфераз

К этому классу относятся ферменты, катализирующие реакции внутримолекулярного и межмолекулярного переноса отдельных атомов, атомных групп:



или

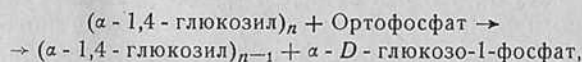


Им принадлежит ведущая роль в промежуточном обмене веществ. Класс трансфераз разделяют на восемь подклассов. Так, ферменты, участвующие в переносе одноуглеродных групп (2.1), альдегидных или кетонных остатков (2.2), ацилтрансферазы (2.3), гликозилтрансферазы (2.4), ферменты, осуществляющие перенос алкильных или родственных им групп (2.5), азотистых групп (2.6), групп, содержащих фосфор (2.7) и серу (2.8).

Выявление фосфоорилазы методом Текеучи

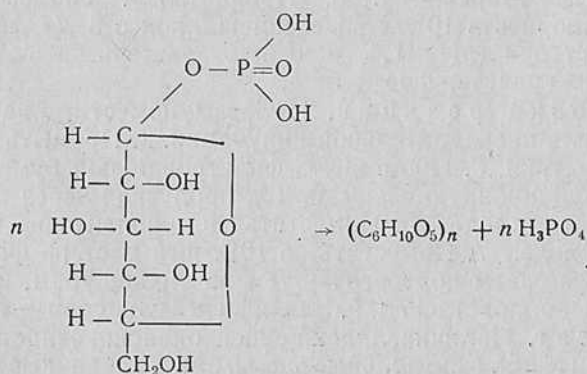
(Свежий материал; срезы, приготовленные в криостате и на замораживающем микротоме)

Фермент широко распространен в природе и, прежде всего, в животных тканях млекопитающих. Шифр фермента — 2.4.1.1, тривиальное название — α -глюканфосфоорилаза, систематическое — α -1,4-глюкан: ортофосфат-глюкозилтрансфераза, простетическая группа представлена пиридоксальфосфатом. Катализирует реакцию:



может кроме гликогена действовать на крахмал, инулин и другие полисахариды.

Принцип выявления. Метод основан на обратимости реакции фосфоорилиза, в результате чего из глюкозо-1-фосфата под влиянием фермента образуется гликоген:



Иодной реакцией можно выявить в тканях гликоген. Раньше считали, что в основе иодной реакции на полисахариды лежит образование химического соединения иод-полисахарид или явление адсорбции. Теперь это рассматривается как результат внедрения иода во внутренние каналцы молекулы полисахарида. Для «затравки» в инкубационную среду добавляется несколько миллиграммов гликогена.

Реактивы. 1. Инкубационный раствор: в 15 мл дистиллированной воды растворить 50 мг глюкозо-1-фосфата (калиевая соль), 10 мг аденозин-5-фосфата, 2 мг гликогена, добавить 10 мл 0,1 М ацетатного буферного раствора (рН=5,6—6), 1 каплю инсулина. 2. Инкубационный раствор для контрольных срезов: те же компоненты без глюкозо-1-фосфата. 3. Люголевский раствор: 2 г иодида калия растворить в 5 мл воды, прибавить 1 г иода, долить воды до 300 мл.

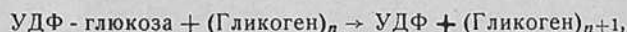
Постановка реакции. 1. Срезы перенести в соответствующие инкубационные среды на 2—3 ч при 37°C. 2. Поместить на несколько минут в раствор Люголя. 3. Заключить в глицерин, содержащий небольшое количество люголевского раствора.

Результат. Места размещения фермента окрашены в красновато-синий и темно-синий цвет. Контрольный срез не окрашен.

Метод Текеучи и Грелнера для выявления УДФГ-гликогенглюкозилтрансферазы

(Свежая ткань; срезы, приготовленные в криостате, на замораживающем микротоме с помощью ножа глубокого охлаждения).

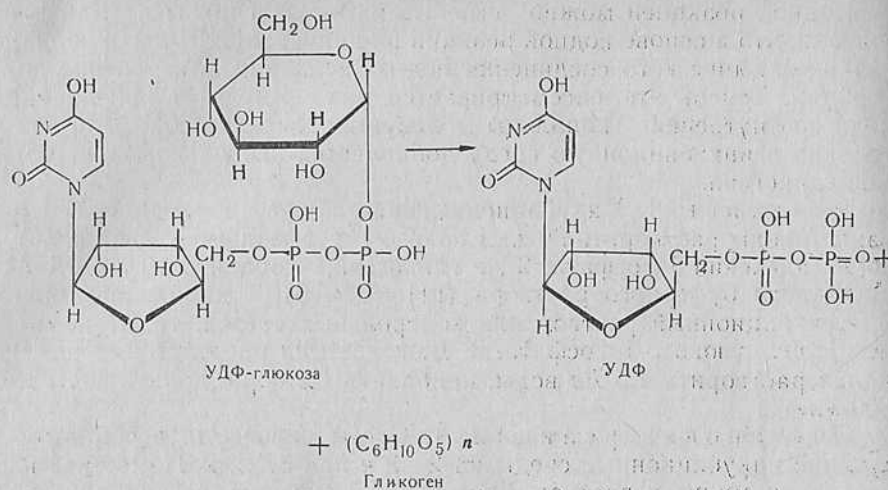
Фермент содержится в тканях животных, дрожжах и бактериях. Относится к подклассу гликозилтрансфераз, подподклассу гексозозилтрансфераз, шифр — 2.4.1.11, тривиальное название — УДФ-глюкоза-гликоген-глюкозилтрансфераза, систематическое наименование — УДФ-глюкоза: гликоген- α -4-глюкозилтрансфераза, активируется ионами магния, кофактором служит сульфгидрильное соединение. Катализирует реакцию:



превращает УДФ-глюкозу в гликоген и УДФ.

Метод позаимствован из биохимии. Модифицирован для гистохимических исследований.

Принцип выявления. Фермент способствует синтезу гликогена из УДФ-глюкозы. Упрощенно химизм этого процесса можно изобразить так:



Обработка срезов раствором иода в KI дает окрашивание образовавшегося гликогена. Инкубационная среда должна содержать некоторое количество гликогена для «затравки».

Р е а к т и в ы. 1. Инкубационная среда: 50 мг УДФ-глюкозы, 10 мг гликогена, 20 мг версена (ЭДТА), 10 мг глюкозо-6-фосфата, 14 мл дистиллированной воды, растворить и добавить 10 мл 0,2 М раствора трис-буфера (рН=7,4), 1 мл 100%-ного этанола. 2. Среда для контроля: те же компоненты, кроме УДФ-глюкозы. 3. Раствор иода (см. предыдущий метод).

П о с т а н о в к а р е а к ц и и: 1. Приготовить срезы. 2. Перенести в инкубационную среду на 1 ч при 25°C, контрольные срезы поместить в среду для контроля. 3. Перенести в раствор иода (до возникновения цветной окраски). 4. ЗаклЮчить в смесь: глицерин — иод (см. предыдущий метод); окантовать парафином.

Р е з у л ь т а т. Локализация фермента определяется по красно-коричневому окрашиванию образовавшегося гликогена. Нативный гликоген, присутствующий в тканях до реакции, не выявляется.

§ 3. Класс гидролаз

К гидролазам относятся ферменты, которые осуществляют каталитическое действие (расщепление и синтез многих веществ) при участии воды:



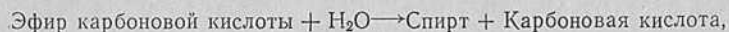
Известно свыше 170 гидролаз, которые в зависимости от субстрата делятся на девять подклассов: гидролазы, действующие на сложноэфирные связи (3.1), гликозидные соединения (3.2), эфир-

ные связи (3.3), пептидные связи — пептид-гидролазы (3.4), С—N-кислотно-ангидридные связи (3.6), С—С-связи (3.7), С—N-связи (3.5), галогенные связи (3.8), Р—N-связи (3.9).

Особого внимания заслуживают гидролазы, действующие на сложноэфирные связи или эстеразы. Они разделяются на шесть подподклассов: гидролазы эфиров карбоновых кислот (3.1.1), тиоловых эфиров (3.1.2), фосфомоноэфиров (3.1.3), фосфодиэфиров (3.1.4), трифосфомоноэфиров (3.1.5) и сульфэфиров (3.1.6).

Выявление «неспецифической эстеразы»

В гистохимии часто применяются реакции на выявление «неспецифической эстеразы» (НЭ). Они позволяют выявить группу эстераз — алиэстеразу, С-эстеразу, ацетилхолинэстеразу (АХЭ) и холинэстеразу. Алиэстераза (карбоксилэстераза, В-эстераза), имеет шифр — 3.1.1.1, систематическое название — гидролаза карбоновых кислот. Катализирует реакции:



сконцентрирована в фракции микросом — от 46 до 70%. С-эстераза (ацетилэстераза) имеет шифр — 3.1.1.6, систематическое название — гидролаза уксусных эфиров. Катализирует реакцию:



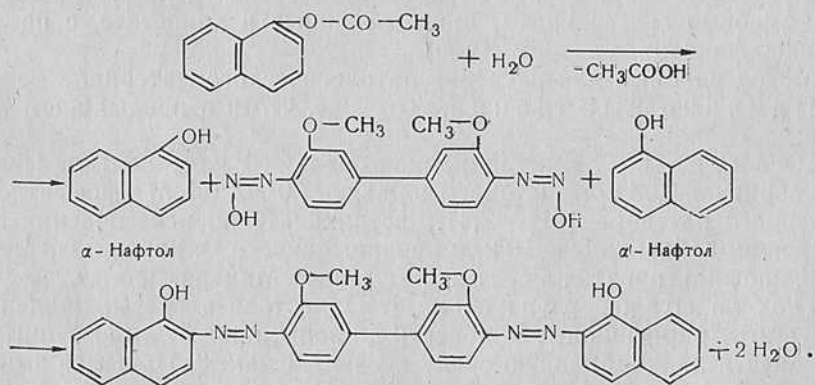
Локализация фермента связана в значительной мере с лизосомами и микросомальной фракцией.

а) Метод Нахласа, Зелигмана и Гомори

(Свежие ткани, фиксировать в охлажденном до 2—4°C растворе 10%-ного формалина; замороженные срезы)

Принцип выявления. α -Нафтилацетат под влиянием НЭ гидролизует до α -нафтола и уксусной кислоты.

α -Нафтол вступает в реакцию диазосочетания с прочным синим В, что приводит к образованию красно-синей азокраски:



Р е а к т и в ы. 1. Инкубационная среда: 20 мг α -нафтилацетата разбавить в 0,25 мл х. ч. ацетона, после чего добавить 20 мл фосфатного буферного раствора Серенсена (рН=7,4), встряхивать (до исчезновения помутнения), затем прибавить 20 мг прочного си-

него В (можно и другой соли диазония), быстро профильтровать. 2. 10^{-5} М раствор эзерина на фосфатном буферном растворе Серенсена (рН = 7,4). 3. Фосфороорганический ингибитор Е-600 (разбавление 1 : 6000).

П о с т а н о в к а р е а к ц и и. 1. Материал (размером 3—4 мм) промыть в проточной и дистиллированной воде. 2. Приготовить срезы. 3. Промыть в воде. 4. Наклеить на предметные стекла. 5. Высушить (под вентилятором). 6. Нанести инкубационную среду на 10 мин. 7. Промыть в нескольких порциях воды (можно 12 ч). 8. ЗаклЮчить в глицерин — желатину (можно обезводить в спиртах, просветлить в ксилоле и заклЮчить в канадский бальзам или синтетические среды).

Р е з у л ь т а т. Фермент выявляется по осадкам красно-синего цвета.

Примечание. Различные ферменты можно дифференцировать по Ф. Л. Лейтис (1971).

Дифференциальное выявление алиэстеразы. Часть срезов поместить в раствор эзерина на 30 мин при 37°C, инактивируется ацетилэстераза. Часть срезов перенести в раствор Е-600, часть — в фосфатный буферный раствор (рН=7,4) на 30 мин. Все три группы срезов промыть в воде 5 мин и поставить реакцию на НЭ (см. метод). Фермент, ингибированный раствором эзерина, расценивается как холинэстеразный. Фермент, ингибированный раствором Е-600, считается алиэстеразным.

Дифференциальное выявление ацетилэстеразы. Часть срезов оставить на некоторое время на предметных стеклах при температуре 0—4°C для фиксации. Обработать по описанному методу. По наличию дискретных гранул в микроструктурах определяется локализация ацетилэстеразы.

б) Метод с α -нафтилацетатом в модификации Э. Пирса

(Холодный формалин, замороженные срезы; холодный ацетон, парафиновые срезы; срезы, приготовленные в криостате, с последующей фиксацией в формалине).

Метод удобный для изучения патологического материала.

П р и н ц и п в ы я в л е н и я. Тот же, что и в предыдущем методе.

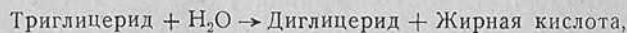
Р е а к т и в ы. 1. Инкубационная среда: 10 мг α -нафтилацетата растворить в 0,25 мл ацетона, добавить 20 мл 0,1 М фосфатного буферного раствора (рН=7,4), встряхивать до исчезновения помутнения, добавить 50—100 мг прочного синего В, хорошо встряхивать, профильтровать на срезы. 2. Гемалаун Майера.

П о с т а н о в к а р е а к ц и и. 1. Приготовить срезы, наклеить, высушить (парафиновые — довести до воды, промыть и высушить). 2. Нанести инкубационную среду на 1—1,5 мин. 3. Промыть в проточной воде 2 мин. 4. Окрасить гемалауном в течение 4—6 мин. 5. Промыть в проточной воде 30 мин. 6. ЗаклЮчить в глицерин — желатину.

Р е з у л ь т а т. Места размещения НЭ определяются по черной окраске, ядра окрашены в темно-синий цвет.

Выявление липазы

Липаза относится к гидролазам эфиров карбоновых кислот, шифр — 3.1.1.3, систематическое название — гидролаза эфиров глицерина, активность фермента связана с наличием в инкубационной среде ионов Ca^{2+} . Катализирует реакцию:



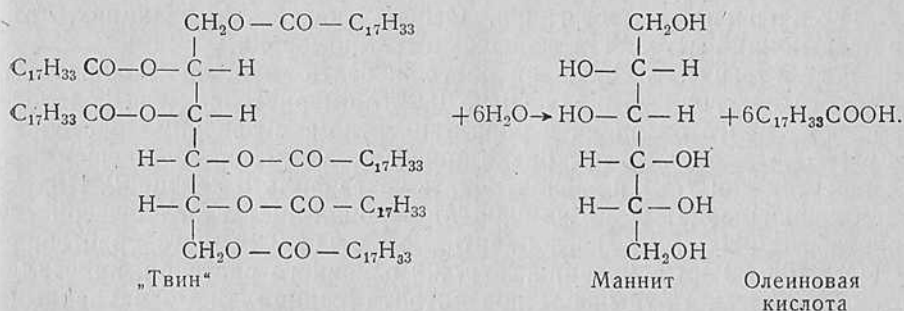
содержится в животных тканях, особенно в поджелудочной железе, растениях, бактериях. Панкреатическая липаза действует на поверхности раздела вода — эфир, гидролизуя преимущественно внешние α -эфирные связи.

Для выявления липаз применяются «твины» — сложные эфиры жирных кислот (лауриновой, пальмитиновой, стеариновой и олеиновой) и гекситов (сорбита и маннита). Скорость гидролиза здесь убывает с увеличением числа атомов углерода в радикале кислот. Причем «твины», содержащие остатки непредельных кислот, расщепляются обычно липазой поджелудочной железы, насыщенных кислот — липазой и эстеразой.

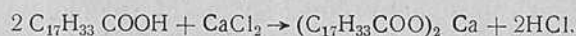
а) Метод «твин» по Гомори

(Холодный формалин, замороженные срезы; холодный ацетон, парафиновые срезы)

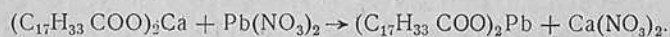
Принцип выявления. На первом этапе происходит гидролиз эфира:



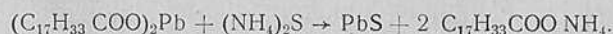
ВЖК вступает в реакцию с хлоридом кальция:



Нерастворимые осадки кальциевого мыла, образовавшиеся в местах размещения фермента, переводят в свинцовые мыла:



Срезы обрабатывают сульфидом аммония, что приводит к возникновению в местах ферментативной активности осадков сульфида свинца:



Реактивы. 1. Исходные вещества: «Твин» 60 («Твин» 80 — для «истинной липазы») — 5%-ный раствор; буферные растворы — трис-(оксиметил)-аминометановый 0,5 М (рН=7,2—7,4) или 0,2 М веронал-ацетатный или гидрокарбонатный; хлорид кальция — 10%-ный раствор; тимол — для консервации субстрата и буферных растворов. 2. Инкубационная среда — один из буферных растворов — 5 мл, хлорид кальция — 2 мл, раствор «Твина» — 2 мл, дистиллированной воды — 40 мл, несколько кристаллов тимола. 3. 1%-ный раствор $Pb(NO_3)_2$. 4. Раствор $(NH_4)_2S$. 5. 1%-ный раствор эозина.

Постановка реакции. 1. Замороженные срезы наклеить на предметные стекла (парафиновые довести до воды). 2. Высушить на воздухе. 3. Поместить в инкубационную среду. 4. Промыть в дистиллированной воде. 5. Перенести в раствор нитрата свинца. 6. Промыть в воде 5 мин. 7. Перенести в разбавленный раствор сульфида аммония на 1—2 мин. 8. Промыть в дистиллированной воде. 9. Окрасить эозином 5 мин. 10. Промыть в проточной и дистиллированной воде. 11. ЗаклЮчить в глицерин — желатину.

Результат. Коричнево-черные осадки сульфида свинца свидетельствуют о локализации фермента. Ценные сведения получены при изучении гистохимии фермента в тканях преджелудков жвачных и печени.

б) Выявление липазы-эстеразы по Мартину

(Формалин, замороженные срезы; ацетон, парафиновые срезы)

Принцип выявления. Основан на тех же реакциях, что и предыдущий метод. «Твин» здесь имеет номер 40.

Реактивы. 1. Основной раствор: взять нужное количество 2%-ного раствора «Твина» 40 на 0,2%-ном растворе $CaCl_2$ (этот раствор приготовлен на веронал-ацетатном буферном растворе с рН=7,4), добавить несколько кристаллов тимола, дать «созреть» двое суток при 37°C, профильтровать через фильтр Зейтца. 2. Инкубационная среда: к 30 мл 0,05 М веронал-ацетатного буферного раствора (рН=7,2—7) добавить 2—3 мл 0,2%-ного раствора $CaCl_2$, 10—20 мл глицерина, 2—4 мл основного раствора, кристаллик тимола. 3. 1%-ный раствор нитрата свинца. 4. Разбавленный раствор сульфида аммония. 5. 1%-ный водный раствор эозина.

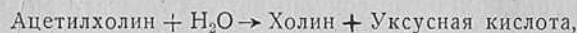
Постановка реакции. 1. Приготовить замороженные срезы и наклеить на предметные стекла (парафиновые довести до воды). 2. Высушить и поместить в инкубационную среду на 3—12 ч при 37°C. 3. Промыть в воде. 4. Поместить в раствор нитрата свинца на 15 мин. 5. Промыть в воде 6 мин. 6. Поместить в раствор сульфида аммония на 1—10 мин. 7. Промыть в воде. 8. Окрасить в эозине 5 мин. 9. Промыть в проточной и дистиллированной воде. 10. ЗаклЮчить в глицерин — желатину.

Результат. Локализация ферментов определяется по размещению коричнево-черных осадков сульфида свинца.

Выявление холинэстераз

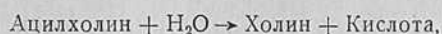
Различают две холинэстеразы — ацетилхолинэстераза (АХЭ) и псевдохолинэстераза (ПХЭ). АХЭ нередко называют «истинной

холинэстеразой», систематическое название — ацетилхолин-ацетилгидролаза, шифр — 3.1.1.7. Катализирует реакцию:



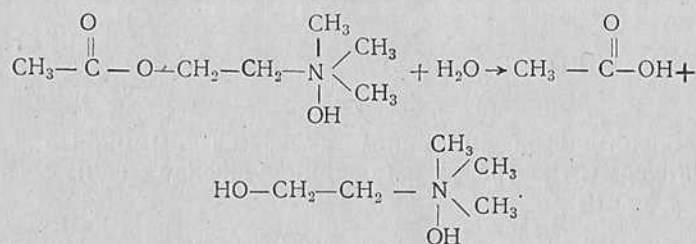
содержится во многих тканях, особенно в нервной, яде змей, действует на различные эфиры уксусной кислоты, катализирует реакции переноса ацетила.

ПХЭ («ложная холинэстераза») имеет шифр — 3.1.1.8, систематическое название — ацилхолин-ацилгидролаза. Катализирует реакцию:



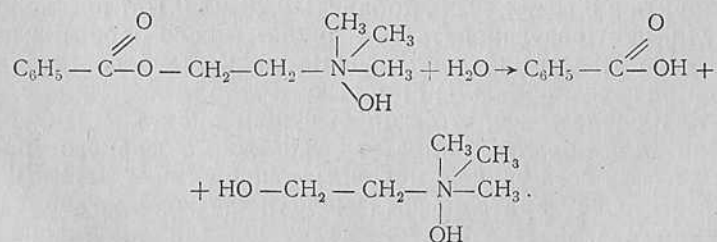
содержится в тканях животных, расщепляет многие эфиры холина и другие вещества.

Оба фермента часто локализованы вместе. АХЭ участвует в передаче нервного импульса, расщепляя ацетилхолин на холин и уксусную кислоту:



Предполагают, что фермент синтезируется в эндоплазматической сети нервной клетки, передвигается по каналам в направлении отростков (дендритов и нейритов) и синапсов, где в синаптических щелях участвует в гидролизе медиатора возбуждения — ацетилхолина. АХЭ из всех эфиров холина имеет наибольшее сродство к ацетилхолину и к ацетилтиохолину.

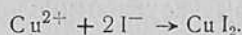
ПХЭ расщепляет эфиры холина с высшими жирными кислотами быстрее, чем ацетилхолин. Может расщеплять бензоилхолин:



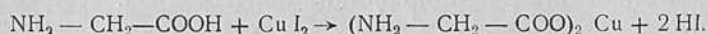
а) Метод Жеребцова

(Свежий материал фиксировать 4—6 ч в 10%-ном растворе нейтрального формалина; замороженные срезы)

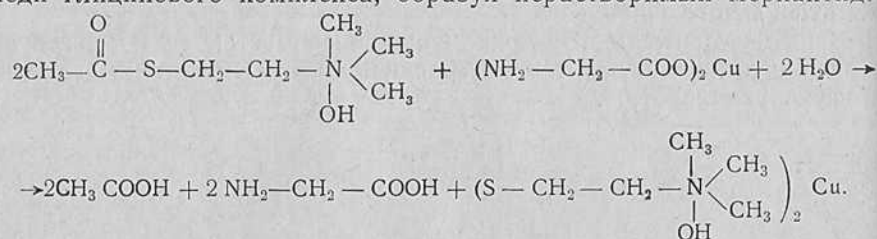
Принцип выявления. В качестве субстрата используется ацетилтиохолиниодид, который полностью или частично ионизирован. В инкубационной смеси имеется сульфат меди и глицин. Реакция протекает в несколько этапов. Вначале взаимодействуют ионы меди с ионами иода:



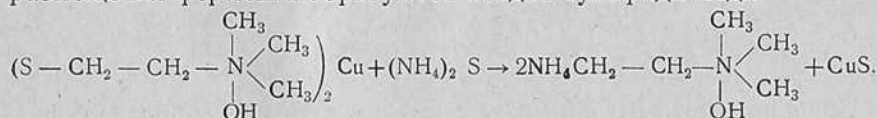
В дальнейшем иодид меди вступает в реакцию с глицином:



Под влиянием АХЭ от ацетилтиохолина отщепляется уксусная кислота, а освобожденная группа тиохолина соединяется с ионами меди глицинового комплекса, образуя нерастворимый меркаптит:



После обработки срезов раствором сульфида аммония в местах размещения фермента образуются осадки сульфида меди:



Реактивы. 1. Исходные растворы (Д. Кисели, 1962): а) ацетатный буферный раствор — 24 мл 0,1 М раствора ацетата натрия, 12 мл 0,1 н. раствора уксусной кислоты (рН=5); б) ацетатный буферный раствор — 39 мл 0,1 М раствора ацетата натрия, 1 мл 1 н. раствора уксусной кислоты (рН=6,2); в) 3,75%-ный раствор глицина в дистиллированной воде; г) 0,1 М раствор сульфата меди; д) раствор ацетилтиохолиниодида — 15 мг субстрата растворить в 0,78 мл воды, добавить 0,26 мл 0,1 М раствора сульфата меди, центрифугировать 10—15 мин (число оборотов в минуту 3500—4000), верхний слой использовать (его достаточно для двух порций среды по 5 мл); е) раствор бутирилтиохолина — 18,5 мг субстрата и сделать все, что в предыдущем пункте. 2. Инкубационная среда для опытных срезов: 2,5 мл буферного раствора с рН=6,2 (для всех тканей, моторных окончаний — рН=5), 1,9 мл воды, 0,1 мл раствора сульфата меди и 0,4 мл раствора ацетилтиохолиниодида. 3. Инкубационная среда для выявления ПХЭ: 2,5 мл буферного раствора (рН=6,2), 1,9 мл воды, 0,1 мл раствора глицина, 0,1 мл раствора сульфата меди, 0,4 мл раствора бутирилтиохолина. 4. 0,5%-ный раствор сульфида аммония. 5. Ингибитор: приготовить 0,1 М основной раствор диизопропилфторфосфата в

пропиленгликоле, после чего разбавить в дистиллированной воде до концентрации 10^{-7} — 10^{-6} М.

Постановка реакции. 1. Материал промыть в воде. 2. Приготовить срезы (20—25 мкм). 3. Погрузить в воду, добавив нейтральный формалин (9:1), фиксировать в течение 30 мин. 4. Промыть в воде 20—30 мин, поместить на предметные стекла и высушить на воздухе 10—15 мин. 5. Поместить в соответствующие инкубационные среды (с ацетилтихолином и бутирилтихолином). Часть срезов промыть в воде, погрузить в раствор диизопропилфторфосфата на 30 сек, промыть в воде, половину из них поместить в первую, половину — во вторую инкубационные среды. 6. Сполоснуть все четыре серии срезов в воде (несколько минут). 7. Перенести в раствор сульфида аммония на 3—5 мин. 8. Промыть в проточной воде 5—10 мин. 9. ЗаклЮчить в глицерин — желатину (можно обезводить, просветлить в ксилоле, заклЮчить в канадский бальзам).

Результат. В местах размещения ферментов выпадают темно-коричневые осадки сульфида меди, фон — бесцветный или бледно-желтый. Первая группа срезов содержит АХЭ, вторая — ПХЭ, третья — АХЭ, так как ингибитор полностью подавляет ПХЭ, а активность АХЭ снижена до 40%. На четвертой группе срезов реакция, видимая на препаратах второй группы, подавлена ингибитором.

Примечание. Исходные растворы хранить в холодильнике. Раствор ингибитора беречь от света и избегать его попадания на тело.

б) Метод Гомори

(Жидкость Бэкера, формалин — охлажденные; замороженные срезы; срезы, приготовленные в криостате; срезы свежих тканей)

Метод Гомори проще предыдущего. Однако его результаты следует контролировать другими методами.

Принцип выявления. Определение фермента основано на тех же реакциях, что и в предыдущем методе.

Реактивы. 1. Основной раствор: 0,3 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,375 г глицина, 1 г $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,75 г малеиновой кислоты, 30 мл 4%-ного раствора NaOH , 170 мл 40%-ного (горячего насыщенного) водного раствора Na_2SO_4 (смесь сохраняется долго, рН около 6). 2. Инкубационная среда: 20 мг ацетилтихолиниодида растворить в нескольких каплях воды, после чего добавить 10 мл основного раствора. 3. Насыщенный раствор сульфата натрия. 4. Разбавленный раствор (0,5%-ный) сульфида аммония. 5. Ядерный краситель.

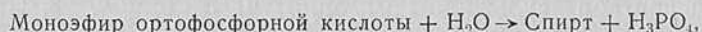
Постановка реакции. 1. Срезы поместить в инкубационную среду на 10—60 мин при 37°C. 2. Сполоснуть в трех порциях насыщенного раствора сульфата натрия. 3. Перенести в раствор сульфида аммония на 2 мин. 4. Если необходимо, докрасить ядерной краской, после чего промыть в проточной и дистиллированной воде. 5. ЗаклЮчить в глицерин — желатину.

Результат. Локализация АХЭ определяется по коричневым осадкам сернистой меди.

Примечание. Контрольные срезы поместить на 30 мин в 10^{-6} M раствор диизопропилфторфосфата в насыщенном растворе сульфата натрия, затем инкубировать в инкубационной среде, содержащей такую же концентрацию ингибитора. ПХЭ исчезает полностью, АХЭ — на 40%.

Выявление щелочной фосфомоноэстеразы

Фермент открыт в рисовых отрубях и в животных тканях. Шифр — 3.1.3.1, систематическое название — фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты, тривиальное — щелочная фосфатаза (ЩФ), активизируется ионами двухвалентных металлов (особенно магния и кальция), содержит цинк (0,15%). Катализирует реакцию:



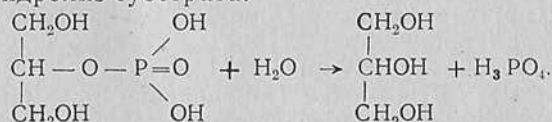
катализирует реакции трансфосфорилирования.

Биологическая роль фермента велика. Участвует в обмене нуклеотидов, белков, липидов, углеводов. Неспособность организма синтезировать ЩФ приводит к гипофосфатазии, которая проявляется в деформации костей, судорогах у грудных детей, остеопорозе и ломкости костей у взрослых. Гиперфосфатаземия наблюдается при рахите, злокачественных опухолях, лейкозах, остеомаляции. Существует ряд гистохимических методов определения ЩФ.

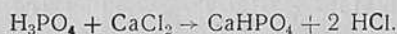
а) Метод Гомори — Такаматчу

(Холодные 10%-ный раствор нейтрального формалина, ацетон, 80%-ный этанол — 12—24 ч; замороженные и парафиновые срезы)

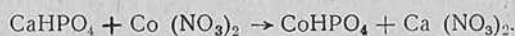
Принцип выявления. Вначале под влиянием фермента происходит гидролиз субстрата:



Дальше фосфорная кислота вступает в реакцию с хлоридом кальция:



Гидрофосфат кальция вступает в реакцию с нитратом кобальта:



Кратковременной обработкой раствором сульфида аммония выявляются места ферментативной активности по осадкам сульфида кобальта:



Реактивы. 1. Инкубационная среда: 0,6 г глицерофосфата (β - или смеси $\alpha + \beta$ -) натрия, 1 г хлорида кальция, 0,5 г веронала (лучше — мединала), 100 мл дистиллированной воды, 0,5 мл хлорида магния, хранить в холодильнике, при помутнении — профильтровать. 2. 1—2%-ный раствор хлорида кальция или нитрата

кальция. 3. 2%-ный раствор нитрата кобальта (можно хлорид, ацетат, сульфид кобальта). 4. 0,5—1%-ный раствор сульфида аммония.

Постановка реакции. 1. Фиксированные кусочки тканей (2—3 мм) обезводить в 96%- и 100%-ном этаноле 12—24 ч, поместить в две порции ксилола, залить в парафин, приготовить срезы (можно готовить замороженные срезы из фиксированного в охлажденном формалине или этаноле материала). 2. Удалить парафин и довести срезы до воды. 3. Перенести на 1—6 ч в инкубационную среду при 37°C. 4. Сполоснуть в растворе хлорида кальция 1—2 мин. 5. Промыть в растворе нитрата кобальта 5 мин. 6. Сполоснуть в четырех порциях дистиллированной воды. 7. Перенести в раствор сульфида аммония. 8. Промыть в проточной воде 10 мин. 8. Обезводить в спиртах, просветлить в ксилоле (можно вначале в карбол-ксилоле), заключить в канадский бальзам.

Результат. Места локализации фермента определяются по темно-коричневым осадкам сульфида кобальта.

Примечание. Контрольные срезы инкубировать в среде, где нет глицерофосфата натрия. Лучше использовать свежий материал.

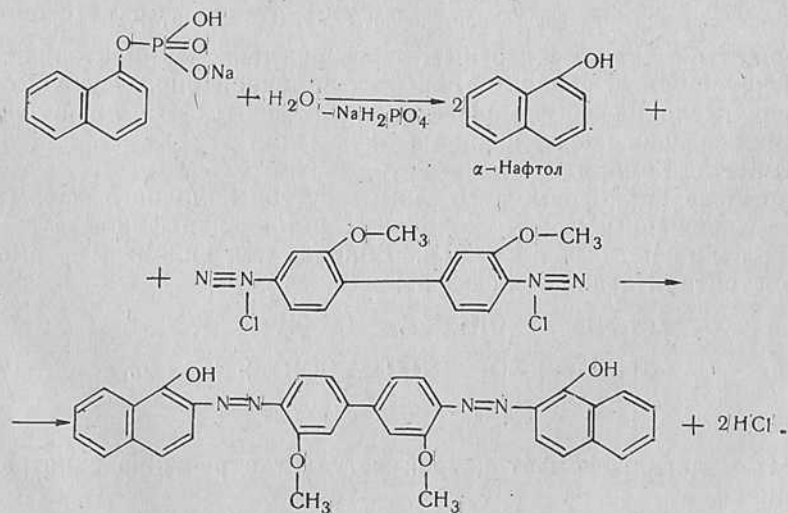
б) Метод азосочетания

(Свежий материал, фиксация в 10%-ном растворе нейтрального формалина в течение 16—24 ч; лиофилизированные и парафиновые срезы)

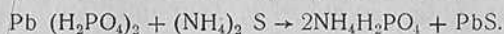
При методе Гомори — Такаматчу возможны артефакты, обусловленные диффузией конечных продуктов реакции. Метод азосочетания лишен таких недостатков.

Принцип выявления. Под влиянием фермента α -нафтилфосфат натрия подвергается гидролизу.

Образовавшийся α -нафтол вступает в реакцию сочетания с солью диазония:



После обработки срезов сульфидом аммония в местах локализации фермента выпадают осадки сульфида свинца:



Реактивы. 1. Инкубационная среда: в 500 мл 0,05 М ацетатного буферного раствора (рН=5) растворить 0,6 г нитрата свинца и добавить 50 мл 3%-ного раствора глицерофосфата натрия, поместить в термостат при 37°C на 24 ч, профильтровать и добавить дистиллированной воды (5% до первоначального объема), хранить в холодильнике (даже несколько месяцев). 2. 1—2%-ный раствор уксусной кислоты. 3. 0,5%-ный раствор сульфида аммония. 4. 1%-ный раствор эозина.

Постановка реакции. 1. Материал (4—6 мм) фиксировать в охлажденном формалине или кальций-формоле 0,5—24 ч. 2. Промыть в воде 30—40—60 мин. 3. Приготовить срезы (парафиновые довести до воды). 4. Поместить в инкубационную среду на 15 мин—24 ч (37°C). 5. Сполоснуть в дистиллированной воде. 6. Перенести на несколько минут в раствор уксусной кислоты. 7. Сполоснуть в воде. 8. Перенести в раствор сульфида аммония на 2—5 мин. 9. Промыть в проточной воде. 10. При необходимости докрасить раствором эозина 5 мин. 11. Промыть в дистиллированной воде. 12. ЗаклЮчить в глицерин — желатину или в канадский бальзам.

Результат. Локализация фермента определяется по осадкам черно-коричневого цвета. Много фермента в опухолях.

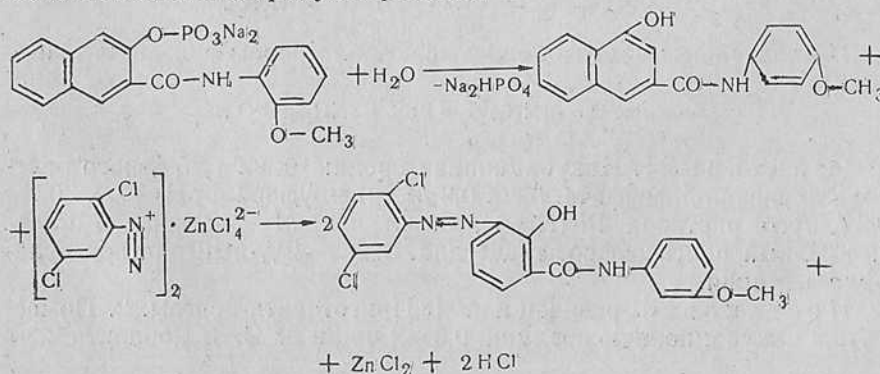
Примечание. При приготовлении инкубационного раствора берут или β-глицерофосфат натрия или смесь α+β (1 : 1). Некоторые авторы (Д. Кисели, 1962) не рекомендуют заливать материал в парафин, так как активность кислой фосфатазы уменьшается на 95%.

б) Метод Берстона

(Леофильная сушка или фиксация в холодном ацетоне; парафиновые срезы)

Принцип выявления. От субстрата фермент отщепляет фосфатную группу.

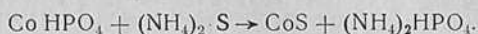
Происходит сочетание нафтаола с солью диазония, что и приводит к образованию в местах локализации фермента окрашенных осадков конечного продукта реакции:



Срезы обрабатывают солью кобальта:



В заключение срезы обрабатывают раствором сульфида аммония:



Реактивы. 1. Инкубационная среда: смешать 20 мл 0,1 М раствора медиана (2,062%-ного), 10 мл 0,18 М раствора хлорида кальция (1,998%-ного), 30 мл дистиллированной воды, 152 мг двуназиевой соли АТФ, после растворения добавить 0,1 М раствор NaOH до pH=9,4, общий объем водой довести до 100 мл. 2. 1%-ный раствор CaCl₂. 3. 2%-ный раствор CoCl₂. 4. 0,5—1%-ный раствор сульфида аммония.

Постановка реакции. 1. Приготовить срезы. 2. Поместить в инкубационную среду от 5 мин до 3 ч при 37°C. 3. Промыть в трех порциях хлорида кальция. 4. Перенести на 3 мин в раствор хлорида кобальта. 5. Сполоснуть в дистиллированной воде. 6. Перенести в раствор сульфида аммония. 7. Если необходимо, докрасить растворами кармина или эозина. 8. Заклчить в глицерин — желатину или обезводить в спиртах, просветлить в ксилоле, заклчить в бальзам.

Результат. В местах размещения фермента выпадают осадки сульфида кобальта черного или серого цвета.

Примечание. Контрольные препараты поместить в раствор *n*-хлормеркурибензоата (2,5 · 10⁻³ М) на несколько минут.

б) Метод Вахштейна — Мейзеля

(Свежая ткань, замороженные срезы; 10%-ный раствор холодного нейтрального формалина; замороженные срезы)

Основой для создания метода послужил метод Гомори. Достоверность результатов подтверждена биохимически.

Принцип выявления. Основан на тех же реакциях, что и в предыдущем методе.

Реактивы. 1. Инкубационная среда: 20 мл 125 мг%-ного раствора двуназиевой соли АТФ, 20 мл 0,2 М трис-HCl-буфера (pH=7,2), 3 мл 2%-ного раствора нитрата свинца, 5 мл 0,1 М раствора сульфата магния, 2 мл дистиллированной воды. 2. 1%-ный раствор сульфида аммония.

Постановка реакции. 1. Приготовить срезы. 2. Перенести в инкубационную среду на 5—60 мин. 3. Сполоснуть в дистиллированной воде. 4. Обработать раствором сульфида аммония. 5. Сполоснуть в дистиллированной воде. 6. Заклчить в глицерин—желатину.

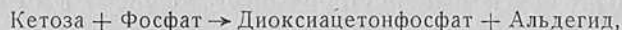
Результат. Локализация фермента определяется по выпадению коричнево-черных осадков. Много АТФ-азы содержится в желчных протоках.

§ 4. Класс лиаз

Ферменты, катализирующие присоединение различных атомных групп к двойным связям или, наоборот, отщепление таких групп с образованием двойных связей. Различают следующие подклассы: углерод-углерод-лиазы (4.1), углерод-кислород-лиазы (4.2), углерод-азот-лиазы (4.3), углерод-сера-лиазы (4.4).

Выявление альдолазы

Фермент содержится практически во всех клетках человека и животных. Много фермента в эритроцитах (0,5% всего белка). С деятельностью фермента связаны процессы эмбриональной дифференциации. Шифр — 4.1.2.7, систематическое название — кето-зо-1-фосфат-альдегид-лиаза. Катализирует реакцию:

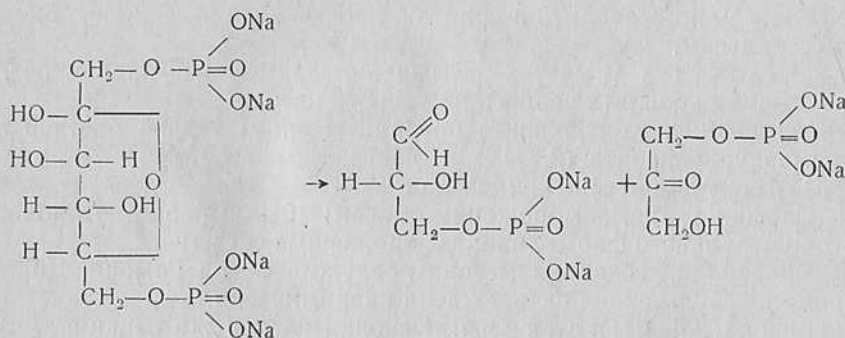


обладает широкой специфичностью.

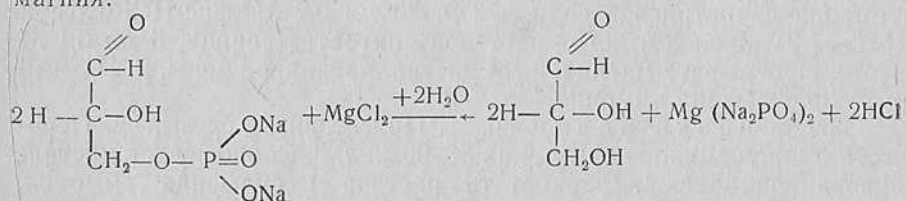
а) Метод Алена и Бурна

(80%-ный этанол — 24 ч; замороженные срезы)

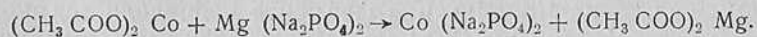
Принцип выявления. Вначале под влиянием фермента фруктозо-1,6-дифосфат натрия расщепляется:



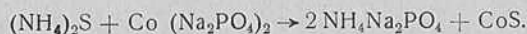
После этого фосфаты натрия вступают в реакцию с солями магния:



Срезы обрабатывают ацетатом кобальта:



После промывки в растворе сульфида аммония выпадает осадок сульфида кобальта:



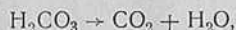
Реактивы. 1. Раствор для осаждения: в 35 мл 5 н. раствора NH_4OH растворить 5,5 г $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ и 7 г NH_4Cl , через час профильтровать, затем добавить 60 мл 4 н. раствора NH_4OH . 2. Растворы очищенного субстрата: *А* — смешать 20 мл 4%-ного раствора гексозодифосфата натрия с 20 мл раствора для осаждения, добавить 20 мл раствора для осаждения и отфильтровать; *Б* — смешать 40 мл 4%-ного раствора гексозодифосфата натрия с 20 мл раствора для осаждения (отфильтровать оба раствора через 30 мин). 3. Рабочий раствор субстрата: *А* — к 10 мл очищенного субстрата *А* добавить 1,7 мл 0,1 М раствора йодацетата натрия, 5 мл дистиллированной воды; *Б* — добавить к 15 мл раствора очищенного субстрата *Б* 2,5 мл 0,1 М раствора йодацетата натрия и 7,5 мл воды. 4. 2%-ный раствор ацетата кобальта. 5. 0,5—1%-ный раствор сульфида аммония.

Постановка реакции. 1. Приготовить срезы. 2. Промыть в дистиллированной воде 3—5 мин. 3. Поместить на предметные стекла и высушить на воздухе при обычной комнатной температуре 1—3 ч. 4. Перенести в инкубационные растворы *А* и *Б* на 1—2 ч при 37°C. 5. Обработать раствором ацетата кобальта 5—10 мин. 6. Сполоснуть в воде. 7. Обработать раствором сульфида аммония 1—2 мин. 8. Промыть в проточной и дистиллированной воде 5—20 мин. 9. Обезводить в спиртах, просветлить в ксилоле и заключить в канадский бальзам.

Результат. Размещение фермента определяется по черно-коричневым осадкам сульфида кобальта.

Выявление карбоангидразы (КАГ)

Фермент имеет шифр 4.2.1.1., систематическое название — карбонат-гидролаза, тривиальное — карбонат-дегидратаза или угольная ангидраза, активируется ионами цинка. Катализирует реакцию:



содержится в тканях человека, животных и растений.

Молекула фермента содержит один атом цинка, способна в течение секунды гидратировать 45000 молекул CO_2 . Главное значение фермента заключается в ускорении отдачи CO_2 в легкие (кровью) и ускорение приема CO_2 из клеток и тканей в кровеносное русло, участвует в образовании HCl в клетках дна желудка, гидрокарбоната в поджелудочной железе и регуляции возбудимости нервной системы.

а) Метод Хаузлера

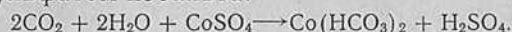
(Срезы из свежей ткани, приготовленные в криостате, с последующей фиксацией в ацетоне; холодный ацетон — 1 ч, парафиновые срезы)

Метод представляет собой модификацию общеизвестного способа Курата, при использовании которого имеют место артефакты — неспецифические осадки.

Принцип выявления. Химизм процесса мало изучен. Можно считать, что вначале под влиянием присутствующих в среде компонентов гидрокарбонат разлагается:



Фермент разлагает H_2CO_3 на CO_2 и H_2O . Последние вступают в реакцию с сульфатом кобальта:



Э. Пирс предполагает, что в дальнейшем реакция идет в направлении:



Причем, реакция катализируется КАГ. Добавлением сульфида аммония карбонат кобальта переводят в сульфид кобальта:



Реактивы. 1. Исходные растворы: *A* — к 1 мл 0,1 М раствора CoSO_4 добавить 6 мл 0,05 М раствора H_2SO_4 ; *B* — растворить 1 г NaHCO_3 в 50 мл 0,1 М раствора Na_2SO_4 (готовить перед постановкой реакции). 2. Инкубационная среда: смешать оба раствора (перед постановкой реакции). 3. Раствор сульфида аммония (в концентрации 1 : 50).

Постановка реакции. 1. Срезы свежемороженых тканей, приготовленные в криостате или с помощью ножа глубокого охлаждения, поместить в ацетон при 0—4°C. 2. Перенести в инкубационную среду на 1,5—2 ч при 18—20°C. 3. Промыть в дистиллированной воде 2 мин. 4. Сполоснуть в растворе сульфида аммония 1 мин. 5. Промыть в дистиллированной воде. 6. ЗаклЮчить в глицерин — желатину.

Результат. Места размещения фермента определяются по осадкам черно-коричневого цвета.

Примечание. Контрольные срезы перед инкубацией поместить на 5—10 мин в натриевую соль диамокса (раствор в концентрации $4 \cdot 10^{-3}$ М).

Выявление цистеиндисульфидразы

Фермент содержится в некоторых тканях, в основном эктодермального происхождения. Шифр — 4.4.1.1, систематическое название — *L*-цистеин-сероводород-лиаза (дезаминирующая), простетической группой является пиридоксальфосфат. Катализирует реакцию:

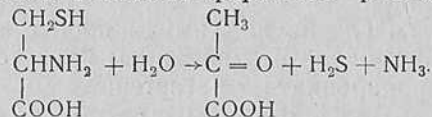


выявляется в тканях человека, животных и бактериях.

а) Метод Джаретта

(Срезы, приготовленные из свежемороженой ткани в криостате; замороженные срезы из свежей ткани, приготовленные с помощью ножа глубокого охлаждения)

Принцип выявления. Химизм процесса полностью не изучен. Вначале под влиянием фермента расщепляется цистеин:



Образовавшийся сероводород служит источником водорода для восстановления тетразолия до моно- и диформазапов (см. методы выявления дегидрогеназ).

Р е а к т и в ы. 1. Инкубационная среда: 20 мг нитро-СТ растворить в 10 мл дистиллированной воды, добавить 10 мл 0,1 М фосфатного буферного раствора (рН=7,6), 64 мг солянокислого цистеина (постепенно), 19 мл дистиллированной воды, 0,1 мл 0,1 М раствора $MgSO_4$ и 10 мг пиридоксин-5-фосфата. 2. 10%-ный раствор нейтрального формалина.

П о с т а н о в к а р е а к ц и и. 1. Приготовить срезы и перенести их на предметные стекла. 2. На срезы нанести инкубационную среду и инкубировать в течение 18—24 ч при 37°C. 3. Сполоснуть в дистиллированной воде. 4. Фиксировать в растворе формалина 10—15 мин. 5. Заклнчить в глицерин — желатину.

Р е з у л ь т а т. Локализация фермента определяется по размещению осадков моно- и диформазапов. На контрольных препаратах, обработанных перед постановкой реакции раствором цианида калия, фермента нет.

Глава XV. 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 таких соединений 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 — остеомаляции, 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 цитолиза. 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 цитовидной 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 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.

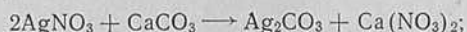
Результат. Кристаллогидрат сульфата кальция выявляется вначале в виде тонких игл, затем призм и, наконец, пластинок.

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 балзам.

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

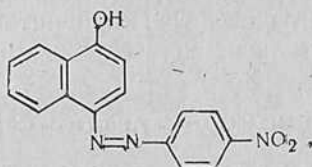
Магний содержится в тех же тканях, что и кальций, в виде фосфатов, карбонатов и фторидов. Кости содержат 1,5% фосфата магния. Его содержание уменьшается при паратиреоидальной тетании, эпилепсии, некоторых злокачественных опухолях. Если межклеточная жидкость содержит ионы калия и хлора, то магний локализован в клетках. Ионы магния выявляются в комплексах миозина и АТФ, они активируют фосфатазы, енолазу, пептидазы, карбоксидазы, лецитиназы. Магний входит в состав хлорофилла, участвует в мышечном сокращении. Обмен магния регулируется паратгормоном.

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-л-нитробензол-азо-1-нафтолу и к некоторым другим красителям. Краситель адсорбируется солями, не изменяя своего красного цвета. Молекула

красителя представляет собой азосоединение нафтола и нитробензола (магнезон II):



Добавление к окрашенным срезам щелочи способствует появлению ярко-синей окраски. Химизм процесса не изучен.

Реактивы. 1. 1%-ный раствор 4-*n*-нитробензол-азо-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% — 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, парнициозноподобной анемии и др. Иногда в организме откладывается эндогенное железо (у шахтеров, электросварщиков) в виде Fe₂O₃.

Метод Перлса

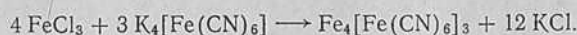
(Свежая ткань, замороженные срезы; 10%-ный раствор формалина — парафиновые срезы)

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 Fe³⁺ 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 темносиний цвет, ядра — в красный.

Примечание. Вода не должна содержать ионы Fe^{3+} . Иголки для работы должны быть стеклянные.

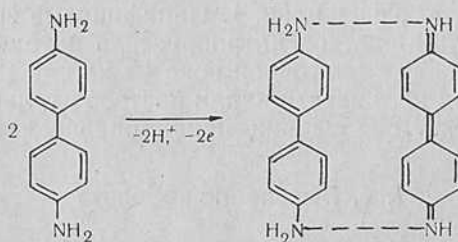
§ 4. Выявление меди

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.

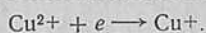
Выявление меди с использованием бензидина.

(10%-ный раствор формалина; парафиновые срезы)

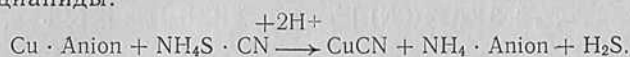
Принцип выявления. Метод основан на способности бензидина в присутствии ионов Cu^{2+} окисляться в бензидиновый синий:



После этого ионы Cu^{2+} восстанавливаются до Cu^+ :



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 *o*-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 мг%), 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 стеклом и под него ввести капли раствора сульфита калия.

Результат. Локализация цинка определяется по осадкам красного цвета.

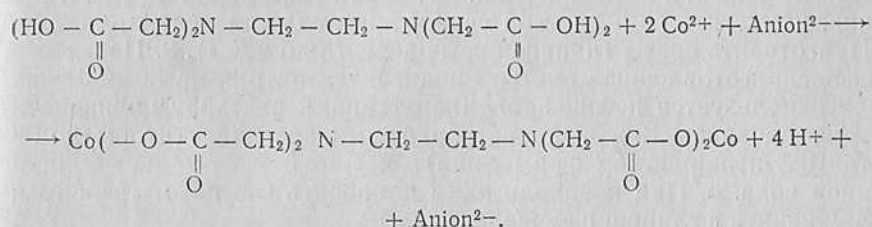
§ 6. Выявление кобальта

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 инсули-

на, кроветворении, синтезе нуклеиновых кислот. При анокальтозах 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. Накрыть покровным стеклом и исследовать.

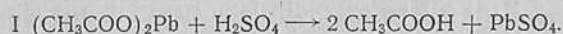
Результат. Голубое или фиолетовое окрашивание свидетельствует о наличии и локализации в тканях кобальта.

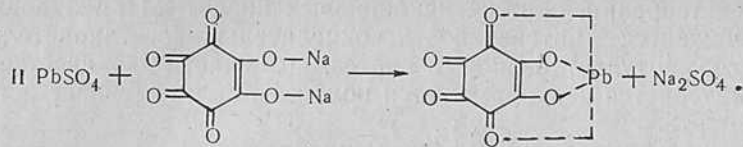
§ 7. Выявление свинца

Свинец — микроэлемент, который входит в состав многих тканей. В среднем в организме человека содержится 1 мг свинца на 1 кг веса. Больше всего свинца в трубчатых костях (1,88 мг%) и печени (0,130 мг%). Биологическая роль свинца изучена мало. Много свинца сконцентрировано в почечных камнях. Его количество возрастает при хроническом отравлении (плюмбизме и сатурнизме).

Метод с использованием родизоната натрия
(Криостат или нож глубокого охлаждения для свежей ткани, замороженные срезы; 10%-ный раствор формалина, парафиновые срезы)

Принцип выявления. Считают, что основой возникновения окраски является взаимодействие солей свинца и родизоната натрия с образованием хелатных соединений:





Реактивы. 1. 5%-ный раствор серной кислоты, содержащий 5—10%-ный раствор Na_2SO_4 . 2. 0,2%-ный раствор родизоната натрия в 1%-ном растворе CH_3COOH . 3. 40%-ный раствор формальдегида. 4. 0,1%-ный раствор светового зеленого SF в 1%-ном растворе уксусной кислоты.

Постановка реакции. 1. Если применяется костная ткань, поместить ее в раствор серной кислоты для декальцинации. 2. Приготовить срезы (парафиновые довести до воды). 3. Перенести в свежеприготовленный раствор родизоната натрия на 30—60 мин. Если используется нефиксированная ткань, к раствору родизоната натрия добавить 40%-ный раствор формальдегида (чтобы получить 10%-ный раствор формалина). 4. Сполоснуть в дистиллированной воде. 5. При необходимости докрасить световым зеленым. 6. ЗаклЮчить в глицерин — желатину.

Результат. Соли свинца окрашены в ало-красный цвет.

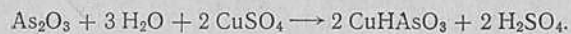
§ 8. Выявление мышьяка

В организме содержится около 0,008—0,02 мг% мышьяка. Он сконцентрирован в коже и волосах (0,6 мг%), ногтях (0,17 мг%), щитовидной железе (0,013 мг%), печени (0,011 мг%). Арсенаты ускоряют распад гексозодифосфатов, стимулируют реакции гликолиза, а арсениты тормозят течение окислительно-восстановительных процессов и угнетают дыхание эритроцитов. Мышьяковистые соединения могут накапливаться при отравлениях, лейкозах, полицитемии, некоторых опухолях. «Точкой приложения» мышьяка служат сульфгидрильные группы ферментов. Ядовит.

Метод Кастела

(10%-ный раствор формалина; парафиновые срезы)

Принцип выявления. Основой для выявления арсенитов и арсенатов в тканях является реакция осаждения их в виде солей меди:



Реактивы. 10%-ный раствор формалина, содержащий 2,5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$.

Постановка реакции. 1. Кусочки тканей поместить в фиксатор. 2. Промыть в проточной воде 24 ч. 3. Обезводить в спиртах, просветлить в ксилоле, залить в парафин. 4. Приготовить срезы, высушить, депарафинировать и заклЮчить в канадский бальзам.

Результат. В местах размещения мышьяка откладываются гранулы зеленого цвета.

Примечание. Для контрастности срезы можно докрасить гематоксилин-эозином, квасцовым кармином или основным фуксином.

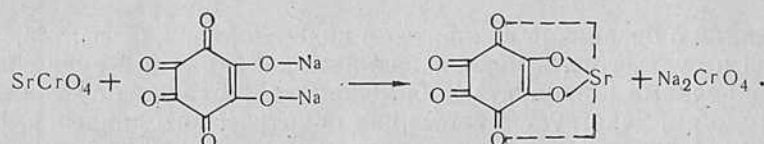
§ 9. Выявление стронция

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 оссификации 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 (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.

§ 10. Выявление ртути

В медицинской и ветеринарной практике сравнительно часто встречаются ртутные отравления. Их причиной могут быть нарушения правил хранения медикаментов, содержащих ртуть, неправильное применение ртутных препаратов, использование пищевых продуктов, обработанных ртутными инсектицидами и т. д. Ртуть блокирует сульфгидрильные группы ферментов. Поражаются различные участки нервной системы, половой аппарат. Как нормальная составная часть организма, ртуть содержится в незначительном количестве в крови (0,15—0,2 мг%), спинномозговой жидкости

(0,8 мг%). Накапливается ртуть в печени, почках, щитовидной железе (2—5 мкг на 100 г свежей ткани).

Метод Ломбардо

(10%-ный раствор формалина; парафиновые срезы)

Принцип выявления. Метод основан на переводе солей ртути в сульфидные соединения или в металлическую ртуть:



Реактивы. Сероводородная вода.

Постановка реакции. 1. Срезы довести до воды. 2. Перенести в сероводородную воду. 3. Промыть в воде. 4. Обезводить в спиртах, просветлить в ксилоле, заключить в бальзам или синтетическую среду.

Результат. Локализация ртути определяется по черным осадкам.

§ 11. Выявление калия

Калий в организме находится в виде хлоридов, фосфатов, карбонатов и сульфатов, в ионизированном состоянии и в виде соединений с белками и продуктами обмена. Калий входит в состав буферных систем, участвует в регуляции осмотического давления, сокращения мышечных волокон, катализирует действие некоторых ферментов (АТФ-азы, пируваткиназы). С деятельностью ионов K^+ связана проницаемость клеточных мембран, так как он является составной частью натрий-калиевого «насоса». Ионы калия участвуют в происхождении и проведении биоэлектрического потенциала в нейронах и мышцах. Ионы K^+ оказывают влияние на синтез белков и тесно связаны с углеводным обменом.

Количество калия в организме животных велико — 0,22—0,23%, в теле человека — около 150 г. Калий в основном сосредоточен в клетках (540—620 мг%) и в незначительных количествах во внеклеточном пространстве (15,5—21 мг%). Больше всего калия содержится в тканях почек (510 мг%), коже и мышцах (до 400 мг%), мозге (340—360 мг%). При многих болезнях происходит угнетение реакций гликолиза, клеточного дыхания, окислительного фосфорилирования, что приводит к нарушению проницаемости клеточных мембран, выходу калия из клетки и нередко замене его натрием. Это и является причиной гибели клеток вследствие увеличения в них осмотического давления и разрушения мембран.

Метод Поппена, Грина и Вренна

(Свежая ткань: замороженные срезы, приготовленные в криостате или на замораживающем микротоме с ножом глубокого охлаждения)

Принцип выявления. Метод основан на взаимодействии составных частей инкубационной среды с ионами калия. Вначале в реакционной смеси возникает гексанитрокобальт натрия — $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$. Он и взаимодействует с солями калия, которые содержатся в тканях. Образуется желтый кристаллический

осадок двойной соли калия и натрия. Осадок для лучшей видимости обрабатывают сульфидом аммония, что приводит к образованию в местах локализации калия коричневых осадков сульфида кобальта.

Реактивы. 1. Инкубационная среда: в 50 мл дистиллированной воды растворить 1,25 г нитрата кобальта, прибавить 12,5 мл ледяной уксусной кислоты, 210 мл 66%-ного раствора нитрата натрия (на дистиллированной воде), смесь перемешать и пропускать воздух до исчезновения запаха азотистой кислоты (реактив сохраняется в холодильнике 3—4 месяца, перед употреблением профильтровать). 2. 0,5%-ный раствор сульфида аммония.

Постановка реакции. 1. Приготовить срезы. 2. Поместить в инкубационную среду (от 30 мин до нескольких часов). 3. Дважды промыть ледяной уксусной кислотой. 4. Срезы поместить на предметные стекла и высушить на открытом воздухе. 5. Поместить в раствор сульфида аммония на 3—5 мин. 6. Промыть в водопроводной воде. 7. Обезводить в спиртах, просветлить в ксилоле, заключить в канадский бальзам.

Результат. Место размещения солей калия обозначается черными осадками сульфида кобальта. При интерпретации результатов исследования следует быть осторожным — возможна диффузия осадков.

Примечание. Контрольные препараты перед инкубацией поместить на 1—3 ч в дистиллированную воду. Можно готовить парафиновые срезы, используя в качестве фиксатора 10%-ный раствор формалина в 96%-ном этаноле. Толщина срезов — 5—7 мкм.

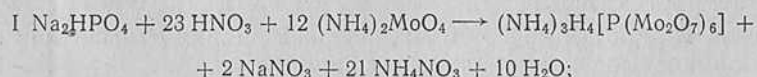
§ 12. Выявление фосфатов

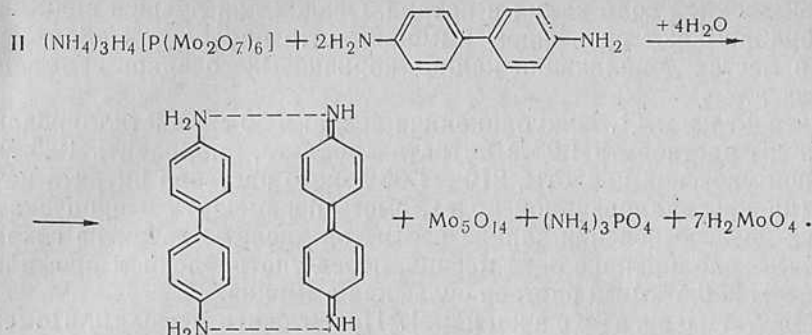
В организме человека содержится до 1% фосфора. Фосфор — составная часть многих биологически важных органических веществ: нуклеиновых кислот, белков, фосфатидов, коферментов, органических макроэргов (АТФ, АДФ, КрФ) и эфиров (глюкозо-1-фосфат, глюкозо-6-фосфат) и др. Основная масса неорганического фосфора сосредоточена в костях в виде апатитов. Часть неорганического фосфора входит в состав «мягких тканей» и жидкостей организма в виде дигидро- и гидрофосфатов. Дигидро- и гидрофосфаты являются составными частями буферных систем крови. Гипофосфатемия возникает при рахите, остеомаляции, лейкемии и др. Гиперфосфатемия наблюдается при гипопаратирозе, нефритах, нефрозах, псевдогипопаратиреоидизме, токсикозах беременности.

Метод Бантинга

(10%-ный раствор нейтрального формалина; парафиновые срезы)

Принцип выявления. Реакция происходит в несколько стадий:





Локализация фосфора в тканях и клетках определяется по выпадению синих осадков двух веществ— бензидинового синего и молибденовой сини. По-видимому, химизм реакций выявления фосфора намного сложнее, чем показано выше.

Реактивы. 1. Кислый молибдат аммония: смешать равные объемы 5%-ного раствора молибдата аммония и 1%-ного раствора азотной кислоты. 2. Раствор бензидина: в 10 мл ледяной уксусной кислоты растворить 5 мг бензидина, после чего объем смеси довести дистиллированной водой до 100 мл. 3. 45%-ный раствор ацетата аммония (насыщенный).

Постановка реакции. 1. Срезы довести до воды. 2. Нанести раствор кислого молибдата аммония на 5 мин. 3. Промыть в дистиллированной воде. 4. Нанести раствор бензидина и окрашивать 1 мин. 5. Залить раствором ацетата натрия, накрыть покровным стеклом, исследовать.

Результат. Места локализации фосфора окрашены в синий цвет.

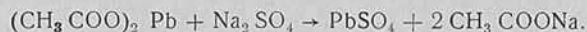
§ 13. Выявление сульфатов

В организме человека и животных содержится около 0,08% серы. Она входит в состав почти всех белков тела, многих гетерополисахаридов (хондроитинсерная кислота, мукоитинсерная кислота, гепарин), содержится в виде неорганических сульфатов и других соединений в метионине, цистеине, цистине, глутатионе, коферменте А, витамине В₁ и т. д. Количество серы в крови и некоторых тканях увеличивается при злокачественных опухолях, ожогах, туберкулезе, остеомалации. Серная кислота, выделяемая как промежуточный продукт обмена, используется печенью для обезвреживания многих ядовитых веществ (индола, скатола, фенола).

Метод Макалума для выявления сульфатов.

(Свежая ткань; замороженные срезы)

Принцип выявления. Ионы SO_4^{2-} осаждаются ацетатом свинца:



После обработки срезов в местах размещения сульфатов выпадают коричневые осадки сульфида свинца:



Реактивы. 1. 0,1 н. раствор ацетата свинца. 2. 0,1 н. раствор азотной кислоты. 3. Смесь, состоящая из равных объемов глицерина и 0,5—2%-ного раствора сульфида аммония.

Постановка реакции. 1. Срезы поместить в раствор ацетата свинца на 10 мин и больше. 2. Тщательно промыть в дистиллированной воде. 3. Сполоснуть в растворе азотной кислоты для удаления карбонат- и хлорид-ионов. 4. Промыть в воде. 5. Поместить в раствор глицерин — сульфид аммония на несколько минут. 6. Промыть в воде. 7. ЗаклЮчить в глицерин или глицерин — желатину.

Результат. Локализация сульфатов определяется по выпадению осадков сульфида свинца коричневого цвета.

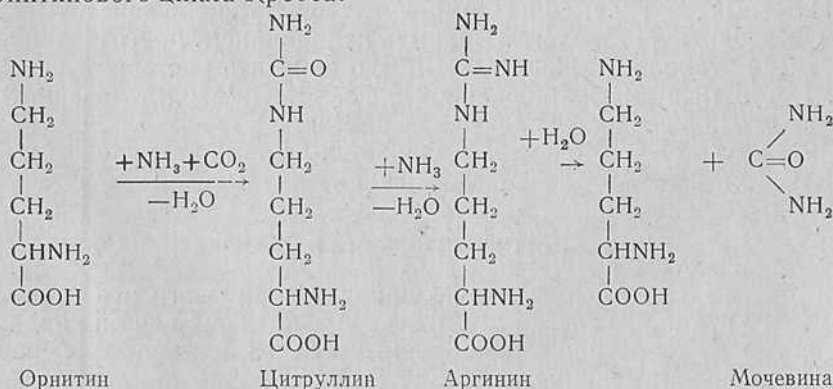
Примечание. Погружение в сульфид аммония можно заменить переносом срезов в 0,5%-ный раствор родизоната натрия. В местах локализации сульфатов возникает темно-фиолетовая окраска.

Глава XVI. ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА

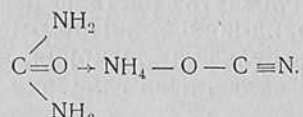
Особого внимания заслуживает использование гистохимических методов при изучении продуктов промежуточного и конечного метаболизма. Здесь перспективны методы иммуногистохимии и патогистохимии, получающие применение в биологии, медицине и ветеринарии. Некоторые вещества, выявляемые гистохимически, могут быть отнесены к нормальным соединениям клинически здоровых организмов (пигменты, нейросекреты).

§ 1. Мочевина

Мочевина — конечный продукт азотистого обмена у большинства позвоночных (некоторых рыб, амфибий, рептилий, млекопитающих). На долю мочевины приходится около 90% азота, выделяемого из организма человека. Образование мочевины является важнейшим процессом нейтрализации аммиака, предохраняющим организм от алкалоза. Мочевина синтезируется в печени с помощью орнитинового цикла Кребса:



Ежесуточно из организма человека с мочой выделяется 20—30 г мочевины. Синтетическая мочевины используется в качестве подкормки для крупного рогатого скота. Корма, содержащие добавки мочевины, нужно сразу же использовать, так как она под влиянием ферментов может таутомеризоваться в яд — цианистый аммоний:

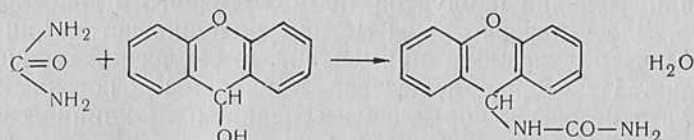


Изучение локализации и содержания мочевины в тканях желудочно-кишечного тракта (преджелудков) и печени представляет большой интерес для ветсанэкспертизы.

Метод Оливери

(Фиксирующая смесь; замороженные срезы)

Принцип выявления. Химизм метода изучен мало. Можно предположить следующий механизм реакции, при которой образуются кристаллы мочевины-ксантгидрола:



Реактивы: 1. Фиксирующая смесь: 5%-ный раствор ксантгидрола в смеси уксусная кислота — этанол (60 мл ледяной уксусной кислоты и 40 мл 96%-ного этанола). 2. 10%-ный раствор формалина. 3. 95%-ный этанол. 4. 1%-ный раствор целлоидина. 5. 1%-ный раствор эозина.

Постановка реакции. 1. Кусочки материала (1—2 мм) поместить на 3—6 ч в фиксирующую смесь при 56—60°C. 2. Промыть 1 ч в дистиллированной воде. 3. Перенести в формалин на 6 ч. 4. Сполоснуть в воде. 5. Приготовить срезы и наклеить на предметные стекла. 6. Промокнуть фильтровальной бумагой. 7. Обезводить в этаноле. 8. Покрывать целлоидином, приготовленным на смеси этанола с эфиром. 9. Быстро окрасить раствором эозина. 10. Промыть в дистиллированной воде. 11. Обезводить в спиртах, просветлить в ксилоле, заключить в бальзам.

Результат. Мочевина выявляется по темно-коричневым, обладающим двойным лучепреломлением, нитевидным кристаллам.

§ 2. Мочевая кислота и ураты

Мочевая кислота — конечный продукт пуринового и азотистого обмена у птиц. У человека и человекообразных обезьян она является одним из таких продуктов. Образуется из пуриновых оснований — аденина и гуанина:

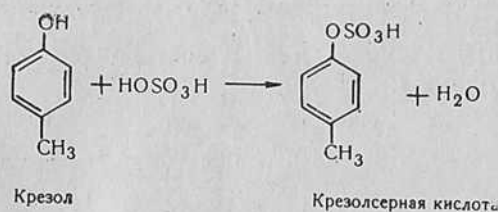
тиосульфата натрия 3 мин. 8. Докрасить эозином. 9. Промыть в воде. 10. Обезводить в спиртах, просветлить в ксилоле, заключить в полистирол или в другую среду.

Результат. Локализация мочевой кислоты и уратов определяется по размещению черных осадков.

§ 3. Фенолы

Фенолы — производные бензола, в молекуле которого один или несколько атомов водорода замещены на группу —ОН. Они являются промежуточными продуктами обмена белков. Чаще всего образуются из аминокислоты тирозина в результате реакций декарбоксилирования и дезаминирования.

В качестве примера приводим конечный продукт — крезол. Он обезвреживается в печени, образуя парные соединения с серной и глюкуроновой кислотами:



При некоторых желудочно-кишечных заболеваниях, недоброкачественном питании и кормлении количество фенолов, что образуются при гниении белковых веществ в кишечнике, увеличивается, вызывая общее отравление организма.

Выявление фенолов по Э. Пирсу

(10% -ный раствор нейтрального формалина; парафиновые срезы)

Метод дает возможность выявить в тканях желудочно-кишечного тракта, энтерохромаффинных клетках ароматические амины и фенолы. Последние образуются в результате декарбоксилирования и дезаминирования ароматических кислот.

Принцип выявления. Метод основан на реакциях между диазотированным *n*-нитроанилином (прочным красным GG) и фенолами с ароматическими аминами. Химизм этих процессов изучен мало.

Реактивы. 1. Краситель: растворить в 0,5 М ацетатном буферном растворе (рН=5,2) диазотированный *n*-нитроанилин из расчета 1 мг на 1 мл. 2. Гематоксилин Майера.

Постановка реакции. 1. Срезы довести до воды. 2. Поместить в раствор красителя на 20—40 мин. 3. Промыть в воде. 4. Докрасить гематоксилином 3 мин. 5. Промыть в воде 30 мин. 6. Обезводить в спиртах, просветлить в ксилоле, заключить в синтетическую среду.

Результат. Локализация ароматических аминов и фенолов определяется по оранжево-красной окраске, другие вещества окрашены слабо.

§ 4. Пигменты

Пигментами называют красящие вещества разнообразной химической природы, находящиеся в тканях и клетках живых организмов. Различают нормальные и патологические пигменты. Все пигменты, которые содержатся в животных тканях, разделяют на пять групп: меланин, липофусцин, гемосидерин, гематоидин и малярийный. Кроме этого, все пигменты можно разделить на гематогенные и аутогенные. К первым относится гемоглобин и его производные (гемосидерин, гематоидин, гематопорфин, билирубин, биливердин, малярийный пигмент), ко вторым — лабильные каротиноиды (липохромы) и пигменты изнашивания (липофусцины, хромолипиды), а также меланин. Существуют и другие классификации пигментов.

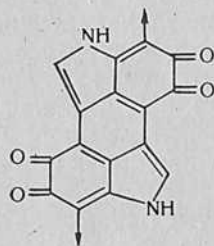
Роль пигментов велика. Растительные пигменты (хлорофиллы, бактериохлорофилл и некоторые каротиноиды) участвуют в фотосинтезе. Многие животные пигменты (гемоглобин, миоглобин, цитохромы, флавиновые ферменты, цитохромоксидаза) участвуют в клеточном дыхании. Меланины кожи поглощают ультрафиолетовую часть спектра, меланины сетчатки являются своеобразными светофильтрами и др. Патологическая пигментация возникает при многих болезнях. Так, желтая пигментация характерна для уремии, микседемы и др. Нарушение пигментного обмена наблюдается при болезни Аддисона, пигментной крапивнице, пеллагре, болезни Гоше, а также при беременности.

Метод Лилли для выявления меланинов

(10%-ный раствор формалина, Карнуа; парафиновые срезы)

Меланины обычно обнаруживаются в эпидермисе, волосах, волосяных фолликулах и в меланомах кожи. В нервной системе человека и животных (особенно у жвачных) выявляется нейромеланин. Пигмент обладает различной окраской — черной, коричневой, желтой и даже фиолетовой. Строение молекулы полностью не расшифровано. Считают, что меланины образуются в результате окисления тирозина под влиянием тирозиназы.

Принцип выявления. Меланины имеют сложное строение молекулы, основой которых является пятиядерное соединение:



Предполагают, что меланины образуют комплекс с двухвалентным железом. Часть меланинового комплекса образует хелатные соединения с *o*-хингидронной конфигурацией (Р. Лилли, 1969). Механизм возникновения окраски мало изучен.

Реактивы. 1. 2,5%-ный раствор сульфата железа. 2. 1%-ный раствор гексациано-(III) феррата калия в 1%-ном растворе уксусной кислоты. 3. 1%-ный раствор уксусной кислоты. 4. Смесь пикриновой кислоты — фуксин (100 мг кислого фуксина растворить в 100 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты).

Постановка реакции. 1. Срезы довести до воды. 2. Поместить в раствор сульфата железа на 1 ч. 3. Промыть в четырех сменах дистиллированной воды. 4. Перенести в раствор гексациано-(III) феррата калия на 30 мин. 5. Промыть в растворе уксусной кислоты. 6. При необходимости докрасить смесью пикриновой кислоты — фуксин 5 мин. 7. Обезводить в 95%-ном и двух сменах абсолютного этанола, спирт-ксилоле, просветлить в двух сменах ксилола, заключить в синтетическую среду.

Результат. Меланины кожи, сосудистой оболочки глаза, нейромеланин и триоксантин окрашиваются в темно-зеленый цвет, фон — бледно-зеленый или не окрашен. При докраске по ван-Гизону, пигмент приобретает красную окраску, цитоплазма — коричневую или желтую.

Метод Шморля для выявления липофусцинов

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

Липофусцины часто называют пигментами старения или изнашивания. Их много в нейронах старых людей или животных. Образуются из липидов и липопротеидов при окислении. Цвет липофусцинов — желтый, оранжевый или красный. Растворимы в органических растворителях. Химическое строение не расшифровано. Липофусцин миокарда содержит около 20% липидов и 14,7% азота.

Принцип выявления. Липофусцины обладают восстанавливающими свойствами. Химизм реакций изучен мало, так как структурные формулы липофусцинов еще не установлены.

Реактивы. 1. Раствор гексациано-(III) феррата калия: смешать три части 1%-ного раствора хлорида железа и одну часть свежеприготовленного 1%-ного раствора гексациано-(III) феррата калия. 2. 1%-ный раствор нейтрального красного.

Постановка реакции. 1. Срезы довести до воды. 2. Перенести на 5—30 мин в раствор гексациано-(III) феррата калия. 3. Промыть в проточной воде. 4. При необходимости срезы дифференцируют (смесь 1%-ного раствора едкого кали в 50%-ном этаноле). 5. Промыть в 70%-ном этаноле. 6. Сполоснуть в дистиллированной воде. 7. Окрасить раствором нейтрального красного 3 мин. 8. Быстро обезводить в спиртах, просветлить в ксилоле и заключить в канадский бальзам или синтетическую среду.

Результат. Пигменты окрашиваются в интенсивно темно-синий цвет.

Примечание. Следует иметь в виду, что могут окрашиваться SH-группы, что снижает специфичность метода. Окрашивается и меланин.

Метод Хуэка для дифференциации меланинов от липофуцинов (Жидкость Карнуа, 10%-ный раствор формалина, этанол; парафиновые срезы)

Принцип выявления. Лилли (1969) связывает возникновение окраски со способностью оксазинсоли сульфата нильского голубого растворяться в частицах липофуцина (формулу см. в методе Кайна). Окрашивание частично возникает в результате образования солевых мостиков между молекулами красителя и пигмента. После обработки срезов пероксидом водорода меланин обесцвечивается.

Реактивы. 1. Насыщенный раствор сульфата нильского голубого. 2. 3—10%-ный раствор пероксида водорода.

Постановка реакции. 1. Срезы довести до воды. 2. Поместить в раствор красителя на 30 мин. 3. Промыть в дистиллированной воде. 4. Перенести в раствор пероксида водорода до 24 ч. 5. Промыть в водопроводной воде. 6. Заключить в глицерин — желатину.

Результат. Липофуцины окрашиваются в синий цвет, меланины бесцветны.

Метод Штейна для выявления желчных пигментов (70% - или 90% -ный этанол; парафиновые срезы)

Желчные пигменты являются продуктами разложения гемоглобина и других гемсодержащих белков. В процессе окисления вначале образуется биливердин, затем билирубин, мезобилирубин, уробилиноген. Из уробилиногена образуется уробилин и стеркобилиноген, а также стеркобилин. Собственно желчными пигментами являются билирубин и биливердин. Биливердин — пигмент зеленого цвета, с ним связана окраска желчи. Билирубин имеет красновато-желтый цвет. Оба желчные пигменты по химическим свойствам являются кислотами, образуют со щелочноземельными металлами соли, нерастворимы в воде. Нарушение обмена этих пигментов наблюдается при желтухах (паренхиматозной, гемолитической, обтурационной), у животных — при фасциолезе и других болезнях печени.

Метод Штейна рассчитан на суммарное выявление желчных пигментов в тканях больного организма.

Принцип выявления. Химизм гистохимических реакций полностью не изучен. Р. Лилли (1969) считает, что под влиянием иода билирубин превращается в вещество зеленого цвета, возможно в биливердин. В пользу этого предположения говорит тот факт, что после удаления избытка иода тиосульфатом реакция стабилизируется вследствие окислительного метаболизма.

Реактивы. 1. Раствор Люголя: 2 г иодида калия растворить в 5 мл дистиллированной воды, добавить 1 г иода и разбавить водой до объема 300 мл. 2. Настойка иода: 10 г иода растворить в 100 мл 96%-ного этанола. 3. Рабочий раствор иода: 2 части раство-

ра Люголя смешать с 1 частью настойки иода. 4. 5%-ный водный раствор тиосульфата натрия.

Постановка реакции. 1. Срезы довести до воды. 2. Перенести в рабочий раствор иода на 12—18 ч. 3. Промыть в проточной воде 5 мин. 4. Перенести в раствор тиосульфата на 30 сек. 5. Промыть в воде. 6. Обезводить в абсолютном ацетоне, просветлить в ксилоле и заключить в канадский бальзам.

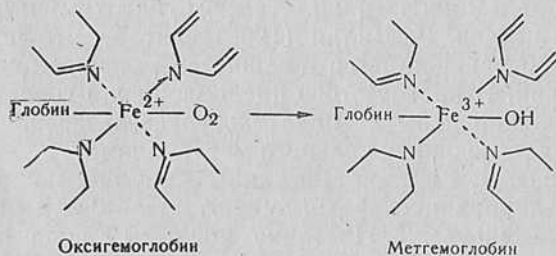
Результат. Желчные пигменты окрашены в темно-зеленый цвет. Реакция протекает лучше в том случае, когда имеются небольшие гранулы пигментов (золотисто-желтый цвет пигментов постепенно переходит в оливково-коричневый).

Примечание. Срезы можно докрашивать гемалауном или кармином Майера 3—18 ч (после 5-го пункта). Кармин красит ядра в красный цвет, пигменты окрашены в темно-зеленый.

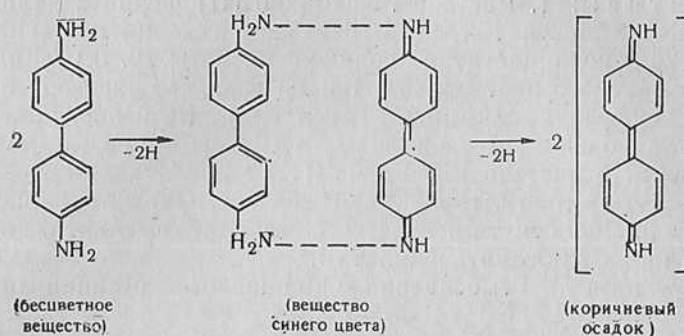
Метод Слонимского — Лапинского для выявления гемоглобина (Специальный фиксатор; парафиновые срезы)

Гемоглобин — красный железосодержащий пигмент крови человека и большинства животных. Выполняет функцию переноса кислорода из органов дыхания к тканям и углекислого газа от тканей в легкие. По химической природе — хромопротеид, который состоит из белка глобина и железопорфирина — гема. Составляет основную массу эритроцитов. Молекула гемоглобина состоит из 4 субъединиц-мономеров, имеющих молекулярную массу 16 500—17 000. Все четыре остатка гема расположены на поверхности молекулы и доступны для взаимодействия с кислородом. В капиллярах легких гемоглобин окисляется и превращается в оксигемоглобин, в тканях отдает кислород и присоединяет углекислый газ, превращаясь в карбогемоглобин. В каждом эритроците содержится около 280 млн. молекул гемоглобина. В организме человека ежедневно образуется около 8 г гемоглобина (красный костный мозг). Обмен гемоглобина нарушается при парциозной и серповидной анемиях, обтурационной желтухе, лейкозах, гематитах.

Принцип выявления. Химизм полностью не изучен. Метод основан на каталитических свойствах железа, входящего в состав молекулы гемоглобина. Обработка тканей раствором гексациано-(III)феррата калия — формалина способствует превращению гемоглобина и оксигемоглобина в метгемоглобин:



Источником водорода для превращения оксигемоглобина в метгемоглобин служит бензидин, что приводит к возникновению в местах размещения гемоглобина коричневых осадков:



Реактивы. 1. Фиксатор: в 100 мл дистиллированной воды растворить 2,5—4 г гексациано-(III) феррата калия и 10—20 мл 40%-ного раствора формальдегида. 2. Раствор бензидина: 0,1—0,2 г бензидина растворить в 2—3 мл 96%-ного этанола, прибавить 2 мл 4%-ного раствора пергидроля и 1 мл раствора бензидина в ледяной уксусной кислоте (0,1—0,2 г растворяется в 2—3 мл кислоты). 3. 70%-ный этанол. 4. Контрастный краситель (метилевый зеленый, сафранин или др.).

Постановка реакции. 1. Кусочки ткани фиксировать в течение 15—24 ч. 2. Промыть в проточной воде 24 ч. 3. ЗаклЮчить в парафин или парафин — целлоидин. 4. Приготовить срезы, высушить, депарафинировать и довести до воды. 5. Поместить в раствор бензидина (контролировать окраску под микроскопом). 6. Окрасить контрастным красителем. 7. Сполоснуть в воде. 8. Быстро обезводить в спиртах, просветлить в ксилоле и заклЮчить в канадский бальзам.

Результат. В местах размещения гемоглобина выпадают коричневые осадки.

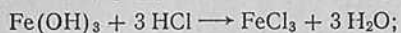
Выявление гемосидерина по Перслу

(10%-ный раствор формалина, жидкость Карнуа, 70%-ный этанол; парафиновые срезы)

Гемосидерин — производное гемоглобина. Предполагают, что он состоит из белка, соединенного с гидроксидом железа. Вырабатывается в местах кровоизлияний клетками ретикуло-эндотелиальной системы. Откалываается обычно в макрофагах (сидероцитах), иногда внеклеточно. Цвет — от золотисто-желтого до буровато-коричневого. Много гемосидерина выявляется в коже (собственный слой) при травмах, укусах, интоксикациях, некоторых инфекциях (болезнь Майокочки, прогрессивный пигментный дерматоз, сетчатый старческий гемосидероз и др.). На периферии очага откалывается гемосидерин, в центре — гематоидин.

Принцип выявления. Метод основан на взаимодействии ионов клеток и межклеточного вещества, содержащих гемоси-

дерин, с гексациано-(II) ферратом калия. Образуется берлинская лазурь:



Р е а к т и в ы: 1. Раствор гексациано-(II) феррата калия: смешать равные части 10%-ного раствора гексациано-(II) феррата калия и 20%-ного раствора соляной кислоты. 2. 0,1 г ядерного прочного красного растворить в 100 мл горячего раствора 5%-ного раствора сульфата алюминия, смесь охладить и профильтровать.

П о с т а н о в к а р е а к ц и и. 1. Срезы довести до воды. 2. Перенести в раствор гексациано-(II) феррата калия на 30 мин. 3. Сполоснуть в дистиллированной воде. 4. Окрасить красителем 2—3 мин. 5. Сполоснуть в воде. 6. Обезводить в спиртах, просветлить в ксилоле, заключить в бальзам.

Р е з у л ь т а т. Гемосидерин окрашивается в синий цвет, ядра — в красный.

Выявление амилоида методом Беннхольда

(10%-ный раствор формалина, жидкость Карнуа, 70%-ный этанол, свежий материал; замороженные и парафиновые срезы)

Амилоид — белковое вещество глобулиновой природы, которое откладывается при некоторых болезнях в тканях почек, печени, селезенки и других органов человека и животных. Термин «амилоид» введен в науку Р. Вирховым в 1853 г. по аналогии с веществом, которое образуется при гидролизе клетчатки. Сейчас амилоид рассматривают как белково-полисахаридный комплекс, состоящий из γ -глобулинов, хондроитинсерной кислоты и сывороточного глюкотеида. При первичном амилоидозе поражается сердечная мышца, вторичном — почки, надпочечники, печень, селезенка и др. Амилоиды откладываются в стенках кровеносных и лимфатических сосудов, в строме органов по ходу ретикулярных волокон. Амилоидоз вызывается многими инфекциями и паразитарными болезнями (туберкулезом, плазмозитозом). Существует несколько теорий патогенеза амилоидоза (диспротеинозная, клеточного локального генеза, аутоиммунитетная).

П р и н ц и п в ы я в л е н и я. Химизм процесса изучен мало. Предполагают (Э. Пирс, 1962), что молекулы красителя соединяются с амилоидами посредством водородной связи, аналогично взаимодействию конго красного с волокнами целлюлозы, обуславливая явление дихроизма.

Р е а к т и в ы. 1. 1%-ный раствор конго красного. 2. Насыщенный раствор карбоната лития. 3. 80%-ный этанол. 4. Гемалаун Майера.

П о с т а н о в к а р е а к ц и и. 1. Срезы довести до воды. 2. Поместить в раствор красителя (парафиновые — на 15—20, замороженные — на 1—2 мин). 3. Поместить в раствор карбоната лития на 0,5—15 мин. 4. Дифференцировать в 80%-ном этаноле (до исчезновения облачек красителя). 5. Сполоснуть в воде. 6. Если необходимо, докрасить гемалауном. 7. Промыть в воде. 8. Обезводить в спиртах, просветлить в ксилоле, заключить в бальзам.

Р е з у л ь т а т. Амилоид окрашивается в кирпично-красный цвет.

Глава XVII. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

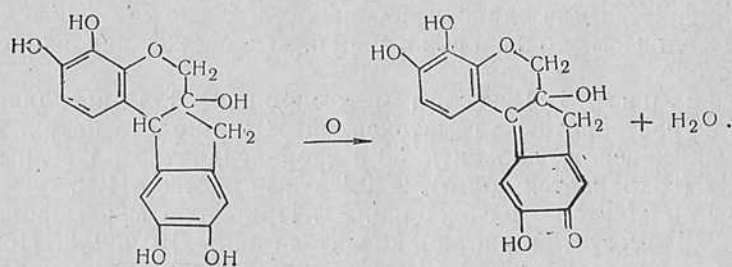
§ 1. Некоторые гистологические методы окраски

Используют для приготовления контрольных препаратов, необходимых для правильной интерпретации результатов гистохимических исследований. Кроме этого, их можно применять для подкраски срезов тканей (мазков, мазков-отпечатков), в которых поставлены гистохимические реакции.

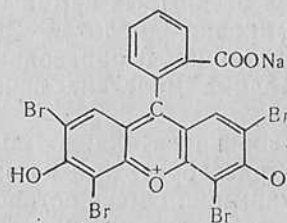
Окрашивание гематоксилин-эозином

Наиболее распространенный метод окраски. Гематоксилин — экстракт древесины кампешового дерева родом из Центральной Америки. Эозин — синтетический краситель. Первый из них обладает основными свойствами (окрашивает ядра), второй — кислый краситель (окрашивает цитоплазму).

Механизм окрашивания. Изучен мало. По-видимому, связан с явлениями адсорбции микроструктурами клеток молекул красителей, возникновения между молекулами субстрата и красителей химических связей (ионных, водородных и, возможно, ковалентных). Гематоксилин в процессе «созревания» (окисления) превращается в гематеин, окрашивающий ядра клеток, хромосомы и некоторые другие образования в синий и сине-черный цвет:



Эозин — натриевая соль тетрабромфлуоресцеина, окрашивает микроструктуры тканей, содержащие основные белки, в ярко-красный цвет:



Реактивы. 1. Раствор гематоксилина (пропись Эрлиха): 2 г гематоксилина растворить в 100 мл 96%-ного этанола, добавить 100 мл дистиллированной воды, 100 мл чистого глицерина, 3 г калийных квасцов, 10 мл ледяной уксусной кислоты. Оставить в светлом месте на 15 суток (для «созревания»), колбу закрыть марлей. Светло-красная окраска смеси постепенно переходит в темно-красную. Хранить в банках с притертыми пробками (можно применять для самостоятельной окраски как квасцовый гематоксин Эрлиха). 2. Раствор эозина: 0,1 г краски растворить в 100 мл дистиллированной воды. 3. Солянокислый спирт: к 100 мл 70%-ного этанола добавить 5—6 капель концентрированной HCl.

Постановка реакции. 1. Срезы (мазки, мазки-отпечатки) поместить в 96%-ный этанол на 3—5 мин. 2. Сполоснуть в дистиллированной воде. 3. Поместить в раствор гематоксилина на 2—3 мин. 4. Дифференцировать в солянокислом спирте 20—30 с. 5. Промыть в дистиллированной воде 1—5 мин. 6. Промыть в водопроводной воде 10—15 мин. 7. Перенести в дистиллированную воду на 3—5 мин. 8. Поместить в раствор эозина на 0,5—2 мин. 9. Сполоснуть в дистиллированной воде 0,5—1 мин. 10. Обезводить в спиртах, просветлить в ксилоле, заключить в канадский бальзам.

Результат. Микроструктуры цитоплазмы окрашены в красный цвет, ядра — в синий.

Окрашивание гематоксилином (гемалауном) Майера

Применяется для окраски небольших кусочков тканей и срезов. **Механизм окрашивания.** Такой же, как в предыдущем методе.

Реактивы. 1. Раствор гематоксилина: в 1 л дистиллированной воды растворить 1 г гематоксилина, 0,2 г иодата натрия и 50 г калиевых квасцов, добавить 50 г хлоралгидрата и 1 г лимонной кислоты (сохраняется долго). 2. 0,1%-ный раствор HCl.

Постановка реакции. 1. Приготовить замороженные срезы. 2. Поместить в раствор красителя на 5—10 мин. 3. Промыть в проточной воде 10 мин. 4. Дифференцировать в растворе соляной кислоты 10—30 с. 5. Промыть в проточной воде. 6. Обезводить в спиртах, просветлить в ксилоле, заключить в канадский бальзам.

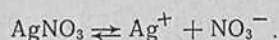
Результат. Микроструктуры тканей окрашены в синий цвет различной интенсивности.

Окрашивание квасцовым кармином

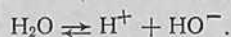
Механизм окрашивания. Кармин — красный краситель, добываемый из тел бескрылых самок червеца кошенилы. Основа красителя — карминовая кислота. Возникновение окраски связано с явлениями адсорбции и образованием между молекулами субстрата и красителя химических связей, в первую очередь ионных.

Реактивы. Раствор красителя: в 100 мл дистиллированной воды (при нагревании) растворить 5 г калиевых или аммониевых квасцов, добавить 1 г кармина. Смесь осторожно кипятить в колбе (на асбестовой пластинке) в течение 20—30 мин. Охладить, про-

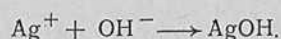
Соль серебра диссоциирует:



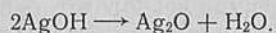
Ткани содержат ионы водорода и гидроксила:



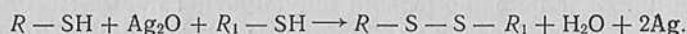
Происходит реакция:



Образовавшийся гидроксид серебра — нестойкое соединение, которое легко распадается:

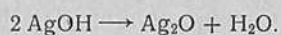
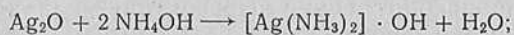
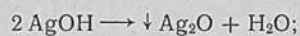


Гемииоксид серебра взаимодействует с белковыми функциональными группами, в первую очередь, с сульфгидрильными:



В микроструктурах, содержащих такие группы, откладываются частицы металлического серебра («серебряные ядра»), которые служат основой для дальнейшего отложения новых слоев металла. Их количество находится в прямой зависимости от содержания в микроструктурах сульфгидрильных групп. Процесс прогрессирует и срезы постепенно меняют окраску — становятся желтыми. Интенсивность импрегнации на этой стадии зависит от многих факторов — содержания в ткани белков, их химического строения, вида животного, участка нервной системы, характера фиксации, pH раствора нитрата серебра и др.

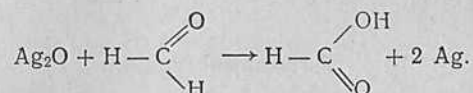
Для усиления импрегнации готовят аммиачное серебро, которым обрабатываются гистологические срезы:



При этом в тканях увеличивается содержание окиси серебра, которая взаимодействует с сульфгидрильными группами белков и в этих местах выпадают осадки металлического серебра. Питерс

(1958) считает, что значительная часть окиси серебра без восстановления соединяется с остатками гистидина белковых молекул.

Дальнейшая обработка срезов раствором формалина приводит к восстановлению серебра, которое содержится в коллоидных растворах тканей или связано с остатками гистидина в белках. Здесь может иметь место следующая химическая реакция:



После обработки срезов раствором тиосульфата натрия из микроструктур удаляется галоидное серебро и другие соли (химизм процессов см. на стр. 246).

Реактивы. 1. 10—15%-ный раствор нейтрального формалина. 2. 20%-ный раствор нейтрального формалина. 3. 2%-ный раствор нитрата серебра. 4. Раствор аммиачного серебра: 5 мл 10%-ного раствора нитрата серебра, прибавить 4—5 капель 40%-ного водного раствора NaOH. Образуется темно-бурый осадок гидроксида серебра. Для его растворения вначале добавить 6—8 капель 25%-ного раствора NH₄OH, потом (при взбалтывании, до растворения, через каждые 20—40 с) по 1 капле, осадок растворяется (не добавлять лишние капли NH₄OH). Объем раствора довести дистиллированной водой до 20 мл, профильтровать и сразу же использовать. 5. 1%-ный раствор хлорида золота. 6. 5%-ный раствор тиосульфата натрия.

Постановка реакции. 1. Небольшие кусочки тканей (размером до 1 см) фиксировать в течение 2—3 недель в 10—15%-ном растворе формалина. 2. Промыть в течение суток в проточной воде и несколько часов — в дистиллированной воде. 3. Приготовить замороженные срезы толщиной 5—10 мкм. 4. Промыть в дистиллированной воде 1—2 ч. 5. Перенести в раствор нитрата серебра на 24—48 ч в темноте. 6. Сполоснуть в дистиллированной воде 2—3 с по одному срезу. 7. Поместить в раствор аммиачного серебра на 5—20 мин. 8. Быстро сполоснуть в дистиллированной воде (по одному срезу). 9. Перенести в 20%-ный раствор формалина на 5—10 мин. 10. Промыть в водопроводной воде 10—20 мин. 11. Обработать в растворе хлорида золота (1—3 капли соли на 1 мл дистиллированной воды) в течение 1—2 ч (срезы становятся серо-фиолетовыми). 12. Промыть в водопроводной воде. 13. Перенести в раствор тиосульфата натрия на 1—2 мин (при переимпрегнировании можно держать и больше). 14. Промыть в водопроводной воде до 24 ч. 15. Обезводить в спиртах. 16. Просветлить в карбол-ксилоле и ксилоле. 17. Заключить в бальзам.

Результат. Внутриклеточные нейрофибрилярные структуры окрашены в черный цвет, фон — серый и серо-фиолетовый.

Примечание. Метод требует исключительной чистоты реактивов и посуды. Пользоваться только стеклянными иглами. В зависимости от целей исследования можно пользоваться модификациями

метода Бильшовского, которые основаны на тех же принципах. Импрегнацию можно улучшить предварительной обработкой срезов пиридином. Первые три пункта проводят по основному методу. В четвертый пункт после промывки дополнительно вводится обработка срезов пиридином в течение 24—48 ч и многократная промывка в воде до исчезновения запаха пиридина. Остальные пункты не изменяются.

§ 2. Авторадиография

Авторадиография (от греч. *αυτός* — сам, лат. *radius* — луч и греч. *γραφω* — пишу) — один из важнейших современных гисто- и цитохимических методов исследования, с помощью которого в тканях и клетках изучают распределение веществ, меченных радиоактивными изотопами.

Берет начало от исследований А. Беккереля (1896 г.), который открыл естественную радиоактивность. Первая авторадиограмма получена русским ученым Е. С. Лондоном в 1904 г., изучавшем поведение радия в организме лягушки. Существенное влияние на развитие авторадиографии оказало открытие Ф. Жолио-Кюри и И. Кюри в 1934 г. искусственной радиоактивности. Были получены изотопы основных химических элементов, входящих в состав ДНК и РНК, белков и углеводов, липидов и минеральных веществ.

Метод авторадиографии обладает высокой чувствительностью к минимальным дозам радиоактивного изотопа в тканях. Так, для исследования вещества самыми точными микрохимическими методами необходимо, чтобы в изучаемом объекте содержалось не менее 10^{16} атомов данного соединения. Спектральным анализом можно выявить такое вещество при более низких концентрациях — 10^{15} атомов. Методом авторадиографии определяют соединение при наличии в клетке 50—60 атомов изотопа.

В специальных лабораториях синтезируют предшественники изучаемых соединений (пуриновые и пиримидиновые основания, нуклеозиды, аминокислоты, моносахариды, жирные кислоты, минеральные соли и др.). В состав молекулы вводят соответствующий изотоп. Так, тимидин (предшественник ДНК) метят ^3H или ^{14}C , уридин (предшественник РНК) — ^3H или ^{14}C , аланин (предшественник белков) — ^{14}C , метионин (предшественник белков) — ^{35}S и ^3H , сульфат натрия (предшественник сульфатированных МПС) — ^{35}S и т. д. Меченные предшественники вводят в организм экспериментальных животных (инъекцией или с кормом), где они включаются во многочисленные реакции обмена веществ. Через определенное время берут материал (после убоя животного или биопсией) и подвергают его обычной гистологической обработке. На срезах (мазках или мазках-отпечатках) определяют локализацию изучаемых веществ. В некоторых случаях (выявление ДНК, дифференциация ДНК от РНК, РНК от ДНК, различных групп МПС) срезы обрабатывают (ставят реакцию Фельгена, Браше, ферментативный контроль). Затем производят контактирование

срезов с фотоэмульсией, которая регистрирует радиоактивный распад изотопов. Этот процесс вызывается особой перегруппировкой нейтронов и протонов, входящих в состав ядер меченых атомов. Он сопровождается испусканием α -частиц (ядер гелия), β -частиц (электронов) и γ -лучей (электромагнитных волн). В гистохимии применяются изотопы с мягким β -излучением, при котором выделяются электроны с небольшим запасом энергии и низкой проникающей способностью. В частности, тритий ^3H испускает электроны с минимальным запасом энергии — 0,018 мэв, ^{14}C — 0,155, ^{32}P — 0,167 мэв. Такие электроны при прохождении через тонкий слой фотоэмульсии вызывают ионизацию и разрушение кристаллической решетки бромида серебра. Свободные электроны, которые появились в результате действия β -частиц на AgBr , перемещаются к центрам чувствительности, где и возникает отрицательный заряд. Электростатическое поле притягивает подвижные ионы серебра. Здесь и появляются зародыши металлического серебра (центры скрытого изображения). Обработка фотоэмульсии проявителем восстанавливает зерна, имеющие скрытое изображение, до металлического серебра. Зерна, которые не содержат зародышей кристаллов, во время обработки эмульсии раствором тиосульфата натрия удаляются (химизм процессов см. стр. 246).

Свободные электроны различных изотопов обладают неодинаковой энергией. Следовательно, во время пробега они ионизируют различное количество зерен бромида серебра эмульсии (рис. 30).

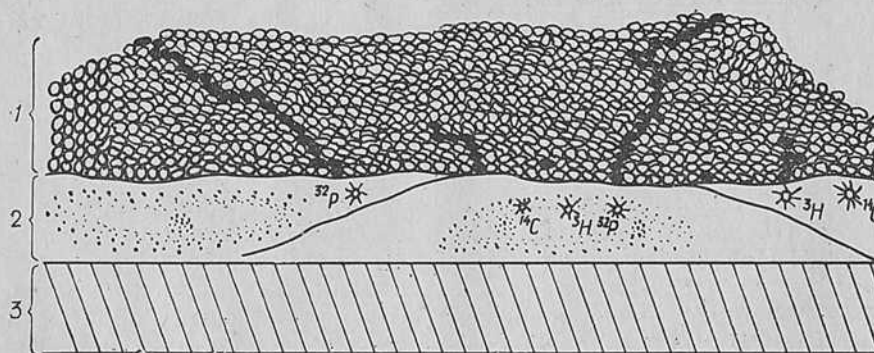


Рис. 30. Схема автордиографа (по А. А. Заварзину, 1965):

1 — эмульсия; 2 — срез ткани; 3 — предметное стекло. Светлые кружочки — intactные зерна AgBr ; темные кружочки — зерна AgBr , ионизированные электронами различной энергии (^3H , ^{14}C , ^{32}P); звездочками обозначены изотопы.

Для гисто- и цитохимических исследований пригодны изотопы с малой энергией электронов (^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S). С их помощью изучается локализация и обмен веществ на уровне клетки и ее органоидов. Подсчитано, что один электрон трития ионизирует 1—2 зерна бромида серебра. Для изотопов со средней и высокой энергией характерна большая длина треков (следов пробега) электронов, что усложняет определение локализации радиоактивного

соединения в клетке. Чтобы получить достоверные результаты исследования, необходимо максимально уменьшить толщину срезов и слоя эмульсии (до 1 мкм). Для этих целей используется мелкозернистая ядерная фотоэмульсия типа «М» или «Р».

Существует несколько способов контактирования срезов (мазков, мазков-отпечатков) с фотоэмульсией. Их выбор определяется задачей работы, микроскопическим строением органа или ткани, наличием в распоряжении исследователя определенных изотопов и реактивов.

Контактная автордиография (рис. 31). Применяется редко. Служит для получения ориентировочных сведений о препарате.

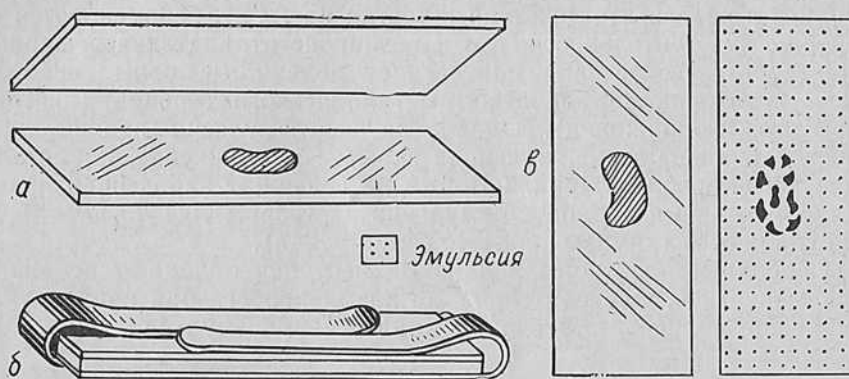


Рис. 31. Контактный метод изготовления автордиографов (по Р. Фитцджеральду, 1957):
а — стекло со срезами и фотопластинка; *б* — зажим; *в* — фотопластинка и препарат после экспозиции и фотообработки.

Приготавливают парафиновые срезы. Монтируют на предметные стекла. На них (в темноте) накладывают фотопластинку (фотопленку). После экспозиции (при $+4^{\circ}\text{C}$) предметное стекло со срезами удаляют и приготавливают по соответствующей методике препарат, фотопластинку подвергают соответствующей обработке (проявлению и закреплению). Препарат и фотопластинку изучают микроскопически. Участки почернения на последней свидетельствуют о локализации в микроструктурах радиоактивного изотопа.

Способ монтирования автордиографов (рис. 32). Используется часто в работе.

С микротомного ножа срезы переносят в теплую (при $+40^{\circ}\text{C}$) дистиллированную воду. В темноте под нужные срезы подводят фотопластинку. Вынимают из воды и срезы приклеиваются к фотоэмульсии. Препарат высушивают и экспонируют в темной камере. Через определенное время парафин удаляют, погружая препарат дважды в ксилол (по 10 мин). Препарат экспонируют, проявляют, фиксируют, промывают и высушивают. Ставят гистохимическую реакцию. Приготавливают постоянный препарат. При

микроскопическом исследовании легко устанавливается связь между структурой ткани и локализацией радиоактивных соединений. Способ обладает высокой разрешающей способностью.

Способ полива жидкой эмульсией (рис. 33). Обеспечивается более тесное взаимодействие меченых соединений и фотоэмульсии.

Приготавливают парафиновые срезы. Монтируют на предметные стекла. Высушивают. Депарафинируют. Дважды погружают в 1%-ный раствор целлоидина в этанол-эфире (1:1) и высушивают в течение 12 ч. В темноте на теплый препарат наносят несколько

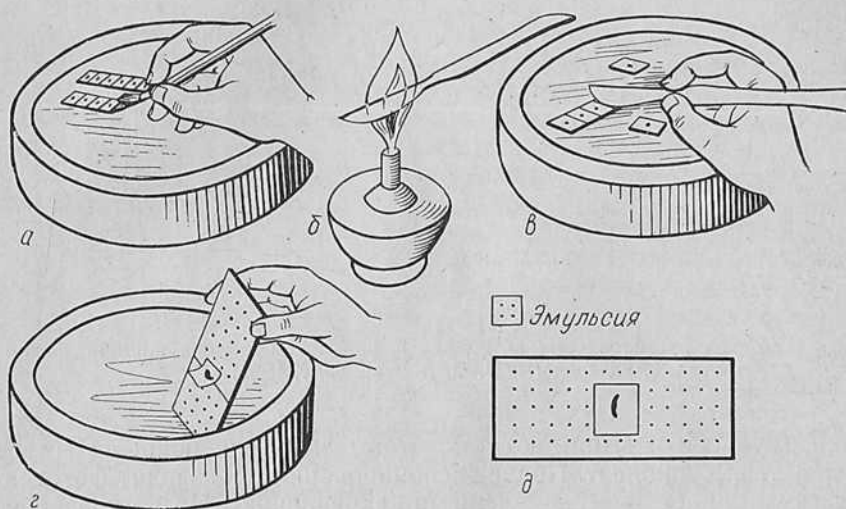


Рис. 32. Метод монтированных автордиографов (по Р. Фитцджеральду, 1957).

капель жидкой фотоэмульсии (при $+37^{\circ}\text{C}$) — из расчета 1 капля на $3-3,5 \text{ см}^2$ препарата, осторожно растирают эмульсию кисточкой из верблюжьего волоса. Препараты нагревают до 37°C в течение 1 мин на горизонтальном нагревательном столике и оставляют в течение 30 мин на холодном участке столика. Препараты экспонируют в горизонтальном положении. Подвергают фотографической обработке. Ставят гистохимическую реакцию. Приготавливают постоянный препарат. Изучают под микроскопом.

Способ съемных эмульсий. Приготавливают парафиновые срезы и переносят в теплую дистиллированную воду. Предметные стекла покрывают желатиновым подслоем. С поверхности воды срезы улавливают на предметные стекла, подсушивают, депарафинируют и доводят до воды. Высушивают. Еще раз покрывают желатиновым подслоем. В темноте на фотопластинке надрезают острым скальпелем или бритвой съемную эмульсию, осторожно отделяют от стеклянной подложки и переносят в чистую теплую ($+20^{\circ}\text{C}$) дистиллированную воду светочувствительным слоем вниз. Через несколько минут предметное стекло со срезами погружают под ку-

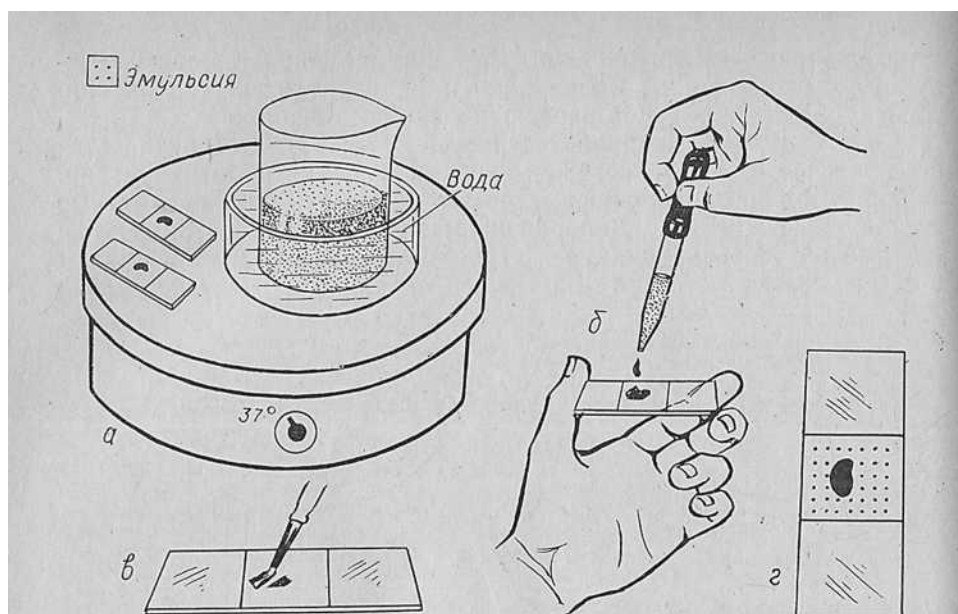


Рис. 33. Метод приготовления автордиографов путем полива жидкой фото-эмульсией (по Р. Фитцджеральду, 1957):

сочки эмульсии и вынимают так, чтобы эмульсия покрыла срезы. Препарат высушивают. После экспонирования производят фотографическую обработку (проявление и закрепление). На части препаратов можно поставить нужную гистохимическую реакцию, остальные препараты остаются не окрашенными. Приготавливают постоянные препараты. Изучаются под микроскопом. Неокрашенные препараты можно изучать с помощью фазово-контрастной микроскопии. Способ обладает высокой степенью разрешения.

Способ погружения в жидкую эмульсию. Приготавливают парафиновые срезы. Депарафинируют и доводят до воды. Наносят желатиново-хромовый слой (см. метод «Выявление нуклеиновых кислот методом Браше с применением изотопов») — предметное стекло со срезами опускают в стакан с подслоем на 2 мин. Протирают тыльную сторону стекла. Высушивают (в вертикальном положении). В темной комнате при зелено-желтом свете фонаря со светофильтром 117 или 118 препараты помещают в стакан с разбавленной фотоэмульсией типа «М» или «Р» (при 40°C). Тыльную сторону препарата вытирают. Препарат высушивают в течение 2—3 ч. Подсохшие препараты складывают (эмульсией вверх) в папки или коробки, заворачивают в темную бумагу и экспонируют в холодильнике (при +4°C). Через определенное время подвергают фотографической обработке — проявлению в амидоловом проявителе (3—5 мин при температуре +19—20°), промывке в дистиллированной воде, закреплению в 40%-ном растворе тиосульфата натрия

(при $+12^{\circ}\text{C}$) до полного просветления эмульсии, промывке в воде. Можно поставить нужную гистохимическую реакцию или окрасить соответствующим гистологическим методом. Приготовить постоянные препараты.

О способах количественной автордиографии

Применяются несколько способов количественного анализа автордиографии: измерение плотности почернения светочувствительной эмульсии, подсчет треков, возникших на фотопластинке под влиянием радиоактивного распада изотопов, и подсчет зерен металлического серебра.

В первом случае используется микрофотометр МФ-2. Стандартом служит почернение эмульсии на фотопластинке от эталона с известной активностью изучаемого изотопа. Активность эталонов измеряется радиометром, в частности с помощью счетной установки Б.

Способ подсчета треков, возникших на фотопластинке или фотопленке, основан на данных, что каждая частица, возникшая в результате радиоактивного распада изотопа, на фотоэмульсии оставляет один след (α -частицы — короткий и прямой, β -частицы — длинный и извилистый). По числу треков определяется количество атомов изотопа в участке ткани, клетки и ультраструктуры. Полученные данные можно подвергнуть математической обработке.

Подсчет зерен металлического серебра проводится при большом увеличении с использованием окуляр-микрометра с сеткой. В. Г. Конарев (1966) рекомендует использовать рисовальный аппарат, с помощью которого на листке бумаги можно проектировать число и размещение в тканях зерен серебра. Данные подвергаются математической обработке.

В работе необходимо строго соблюдать требования инструкций по технике безопасности работы с радиоактивными изотопами.

С помощью метода автордиографии получены ценные сведения для биологии, медицины, ветеринарии и агрономии. Так, изучено перемещение меченых предшественников в живых организмах, их превращения и депонирование в органах, тканях, клетках и интрацеллюлярных структурах, отдельные стороны синтеза биологически важных веществ (ДНК, РНК, белков, липидов, углеводов и др.). Удалось раскрыть некоторые вопросы биосинтеза и механизма действия ферментов, гормонов и витаминов, проникнуть в химическую структуру и процессы репликации хромосом, расшифровать химизм многих иммунных реакций, глубже познакомиться с механизмом проницаемости клетки, установить параметры многих реакций метаболизма и др. Заслуживает высокой оценки метод электронной автордиографии.

Выявление нуклеиновых кислот методом Браше с применением изотопов

(Жидкость Карнуа, смесь Буэна, спирт — уксусная кислота — 3:1, ацетон; избегать формалина и сулемы; парафиновые срезы)

В качестве экспериментальных животных используют кроликов, морских свинок, белых крыс. В качестве предшественников применяют ^3H уридин (синтез РНК) или ^3H тимидин (синтез ДНК). Предшественник разбавляют на физиологическом растворе — 0,1 милликюри на 1 мл. Изотоп вводят путем инъекции (в хвостовую вену, брюшную полость, суставную сумку и т. д.) в индикаторной дозе — 0,5 милликюри на 1 г живого веса.

Принцип выявления. Основан на способности включенных в микроструктуры изотопов α - β - и γ -излучением восстанавливать бромид серебра фотоэмульсии (см. выше). Предварительная обработка срезов растворами ферментов (ДНК-азы или РНК-азы) удаляет из препарата соответствующую нуклеиновую кислоту. Реакция Браше дает возможность конкретизировать размещение РНК и ДНК в тканях (см. метод Браше).

Реактивы. 1. Подслой: в 90 мл дистиллированной воды растворить 0,385 г желатины, добавить 2,5 мл 3%-ного раствора хромовых квасцов, 10 мл 3%-ного спиртового раствора тимола, 0,5 мл жидкого стекла (не обязательно), закрыть банку притертой пробкой и поместить на 12 ч в термостат при $+37^\circ\text{C}$. 2. Раствор фермента: в нужном объеме бидистиллированной воды растворить кристаллическую ДНК-азу или РНК-азу из расчета 1 мг на 1 мл (хранить в холодильнике). 3. Пластификатор: в 30 мл 96%-ного этанола растворить 12 мл глицерина. 4. Дубитель: смешать 10%-ный раствор ацетата хрома, 4%-ный раствор карбоната натрия и дистиллированную воду в соотношении 1 : 1 : 10. 5. Фотоэмульсия — используется двух типов — «М» (менее зернистая) и «Р» (более зернистая), хранить в холодильнике при $+4^\circ\text{C}$ в темной посуде. 6. 10%-ный водный раствор бромида калия. 7. Разбавленный раствор бромида калия — в 1000 мл дистиллированной воды растворить 2 мл 10%-ного раствора бромида калия. 8. Растворы фотоэмульсий: фотоэмульсию расплавить на водяной бане при $+42,5^\circ\text{C}$, отвесить нужное количество в мерный стакан, добавить пластификатор (4,2 мл на 100 г эмульсии), дубитель (1,2 мл на 100 г эмульсии), затем добавить или разбавленный раствор бромида калия (эмульсия типа «Р») в соотношении 1 : 1 (1 : 2), или дистиллированную воду (эмульсия типа «М») в соотношении 1 : 1 (1 : 2). 9. Проявитель: в 1 л дистиллированной воды растворить 3 г амидола, 10 г безводного сульфита натрия и 0,4—0,5 г лимонной кислоты. 10. Закрепитель: в 1 л дистиллированной воды растворить 400 г тиосульфата натрия. 11. Краситель: в 20 г глицерина растворить 0,15 г метилового зеленого, 0,25 г пиронина и 2,5 мл 96%-ного этанола, объем раствора довести до 100 мл добавлением 0,5%-ного раствора фенола.

Постановка реакции. 1. Приготовить срезы. 2. Депарафинировать. 3. Опустить в стакан с подслоем на 2 мин. Для препаратов, меченных тритием, наносить подслой не рекомендуется. Контрольные препараты перед нанесением подслоя обработать раствором РНК-азы или ДНК-азы (см. метод Браше). 4. Протереть тыльную сторону предметного стекла, препарат сушить в верти-

кальном положении. 5. В темноте (при желто-зеленом свете фонаря со светофильтром 117 или 118) препарат опустить в раствор фотоэмульсии. 6. Через 3—6 мин препарат вынуть, тыльную поверхность протереть марлей, сушить на стекле эмульсией вверх. 7. Через 2—3 ч препараты сложить в папки или коробки (эмульсией вверх), завернуть в темную бумагу и хранить в холодильнике при +4°C. 8. Через некоторое время (для ³H-тимидина — 3—15—20 суток, ³⁵S-метионина — 5—7—10 суток, ¹⁴C-аденина — 3—5—7—10—15 суток) провести контрольную пробу различных групп препаратов на следовые автографы. 9. Препарат поместить в проявитель на 3—4 мин. 10. Промыть в воде 5 мин. 11. Перенести в закрепитель на 5 мин и больше. 12. Промыть в проточной воде. 13. Поставить гистохимическую реакцию (окраска длится от 3 до 20 мин). 14. Обезводить в двух порциях бутанола (по 15 мин). 15. Просветлить в двух порциях ксилола (по 20—30 мин). 14. Заключить в канадский бальзам.

Результат. Локализация меченых нуклеиновых кислот выявляется по темным точкам металлического серебра. Локализация РНК определяется по красному, ДНК — зеленому или сине-зеленому окрашиванию. Контрольные препараты, обработанные РНК-азой или ДНК-азой, не содержат соответствующих нуклеиновых кислот.

Примечание. Для подсчета зерен серебра лучше использовать эмульсию типа «М». Работать с чистой посудой, мыть посуду теплой водой без мыла и хромпика. Сушить в термостате.

§ 3. Иммуногистохимия

Иммуногистохимия (от лат. *immunus* — свободный) — отрасль биологии, методы которой позволяют изучать химию иммунитета на тканевых срезах. Иммуногистохимия возникла на стыке трех наук — иммунологии, гистологии и гистохимии.

Основоположником иммуногистохимии является А. Кунс, который в 1932 г. продемонстрировал возможность наблюдать реакцию антитело — антиген на тканевых срезах органов животных, которые погибли от пневмококковой инфекции. Перед постановкой реакции антитела, содержащиеся в сыворотке переболевших данной болезнью, конъюгировались (сопрягались) с изоцианатом флуоресцеина. При этом возникает комплекс антитело+антиген+флуорохром, способный поглощать ультрафиолетовые лучи с длиной волны 290—495 нм и излучать зеленый свет, имеющий длину волны 525 нм. Все методы иммуногистохимии разделяют на три группы: прямой метод, непрямой метод, непрямой метод с добавлением компонента. Их часто называют методами люминесцирующих антител.

Одним из обязательных условий успешного проведения иммуногистохимического исследования является приготовление тканевых срезов (мазков, мазков-отпечатков), в которых максимально сохраняется прижизненное состояние микроструктур, химический состав и антигенные свойства изучаемых веществ. Такие исследо-

вания проводят как на фиксированном (в жидкости Карнуа, этаноле, охлажденном ацетоне, метаноле), так и на свежем материале. Приготавливают парафиновые или замороженные срезы. Толщина срезов — минимальная: 3—5 мкм. Срезы лучше готовить по Сент-Мари: кусочки материала (0,2—0,4 см) фиксируют, обезвоживают и просветляют на холоде (+4°C), заливают в легкоплавкий парафин, после чего приготавливают тонкие парафиновые срезы. Этот способ помог выявить локализацию многих токсинов (столбняка, дифтерии).

Вторая часть исследования — иммунологическая. Состоит из нескольких этапов — выделение антигена в чистом виде, иммунизация антигеном экспериментальных животных (чаще кроликов), получение от них иммунной сыворотки, мечение антител сыворотки флуорохромом (обычно — изоцианатом флуоресцеина, реже — родамином В или сульфохлоридом 1-диметиламиноафталин-5-сульфоукислоты), иммунизация второй группы экспериментальных животных (коз и ослов) гамма-глобулинами кролика и получение от них антисыворотки. Эти препараты патогистолог или гистохимик получает в готовом виде, так как их изготавливают в специальных лабораториях. В некоторых случаях препараты можно приготовить самостоятельно, руководствуясь рекомендациями специальных руководств.

Третья часть исследования — постановка иммуногистохимических реакций. Она будет успешной, если все процедуры предыдущих этапов выполнены правильно. Проводится по прописям соответствующего метода.

Прямой метод. Принципы разработаны в 1950 г. А. Кунсом и М. Капланом. Изготавливают срезы органов и тканей, монтируют их на предметные стекла. Высушивают. Депарафинируют. Ополаскивают забуферным физиологическим раствором (его состав: в 1 л дистиллированной воды растворить 8,75 г NaCl, 0,53 г KH_2PO_4 и 3,28 г Na_2HPO_4). На каждый срез наносят несколько капель люминесцирующей сыворотки, а после экспозиции (20—30 мин) избыток сыворотки сливают, срезы промывают физиологическим раствором и заключают в забуферный раствор глицерина (его состав: 9 частей глицерина и 1 часть приготовленного раньше физиологического раствора, рН=7—7,4). В ходе постановки реакции антигены тканей (рис. 34) взаимодействуют с мечеными антителами сыворотки. Антиген способен связывать 5—10-кратное весовое количество флуоресцирующих антител. Метод используют в диагностической практике как тест на определение различных форм полиэнтеритов, гонорреи, сифилиса, сибирской язвы, коклюша и некоторых видов рака. Использование метода в теоретической гистохимии позволило определить в базофильных клетках гипофиза локализацию АКГГ, выявить размещение в отдельных микроструктурах печени и почек многих веществ.

Непрямой метод. Приготавливают парафиновые срезы. Монтируют на предметные стекла. Высушивают. Ставят иммуногистохимическую реакцию двумя приемами. Вначале на срезы (мазки, маз-

ки-отпечатки) наносят иммунную сыворотку. Происходит взаимодействие двух веществ — антигена и антитела. Через некоторое время на препарат наносят антисыворотку, в которой содержатся антитела против гамма-глобулинов исследуемого животного (например кролика). Они мечены. Возникает люминесцирующий

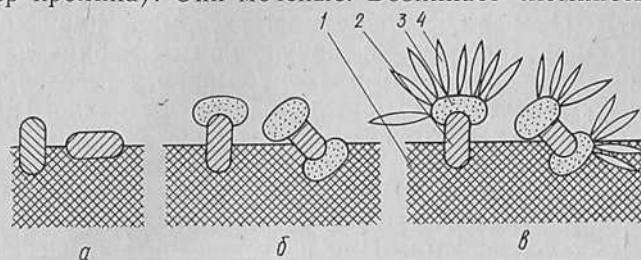


Рис. 34. Постановка иммуногистохимической реакции прямым методом (по Ф. Гауровицу, 1969):

a — срезы тканей, содержащих антигены; *b* — комплекс антиген+антитело; *в* — комплекс антиген+антитело+флуорохром (1 — тканевый срез; 2 — антиген; 3 — антитело; 4 — флуорохром).

комплекс антиген+антитело+анти-антитело. Люминесценция здесь более яркая, чем при прямом методе, так как каждая молекула антигена и антитела соединены с несколькими молекулами флуорохрома (рис. 35).

Метод удобен еще и тем, что нет необходимости для каждой болезни готовить меченую сыворотку исследуемого вида животных. Имеется запас антисыворотки, меченые антитела которой могут при различных вариантах иммуногистохимических реакций выявить гамма-глобулины изучаемого животного и обнаружить их связь с разнообразными антигенами. Метод хорош для идентификации антител, так как после промывки с антигеном, который имеется в срезах, остается связанным лишь то антитело, которое специфично для данного антигена. Если таких антител нет, препарат не люминесцирует. Непрямой метод люминесцирующих антител в 10—12 раз чувствительнее, чем прямой метод.

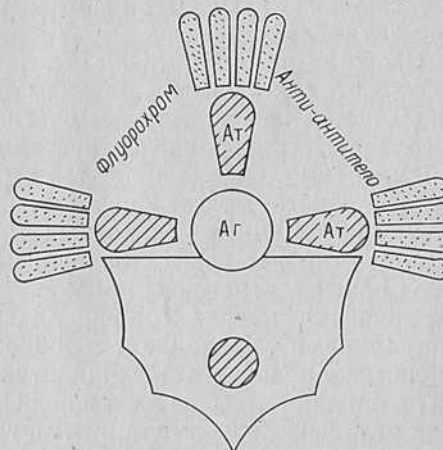


Рис. 35. Образование флуоресцирующего комплекса при постановке иммуногистохимической реакции непрямым методом (по Э. Пирсу, 1969):

На рисунке Ag обозначает антиген, At — антитело.

Непрямой метод с использованием комплемента. Состоит из трех этапов. Вначале изготавливают срезы тканей (мазки-отпечатки,

мазки). Если срезы парафиновые, их депарафинируют и доводят до воды. Промывают забуферным физиологическим раствором. Наносят иммунную немеченую сыворотку. Происходит реакция антиген — антитело. На срезы наносят несколько капель обычной свежей сыворотки исследуемого вида животных (в ней содержится комплемент). Препарат обрабатывают люминесцирующей антикомплемментарной сывороткой, полученной от кроликов, которым для иммунизации вводили комплемент сыворотки исследуемого вида животного. Дальнейшее приготовление постоянного препарата проводят, как и при двух других методах.

При оценке результатов, полученных с помощью трех методов, следует быть осторожным. Прежде всего, реактивы должны быть безупречными. Оптика и освещение в люминесцентном микроскопе должны быть образцовыми. При изучении патологического материала необходимо ставить перекрестную реакцию на контрольных срезах, полученных из органов и тканей клинически здоровых животных. Следует помнить, что меченые сыворотки должны давать реакцию только при соединении с препаратом, в котором имеется специфичный антиген, и не проявлять характерного свечения в том случае, когда в срезах тканей нет такого антигена. При изучении одного и того же объекта рекомендуется использовать прямой и непрямые методы люминесцирующих антител.

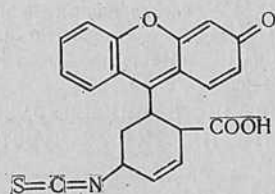
Выявление тельца Негри методом люминесцирующих антител по Константиновой-Зибелист

(Свежий материал; мазки-отпечатки)

Относится к прямым методам флуоресцентного окрашивания. Используется при постановке диагноза на бешенство.

Тельца Негри — диагностический признак бешенства у человека и животных. Они выявляются в различных участках аммоновых рогов головного мозга. Инкубационный период болезни длится в среднем 20—40 дней у животных или 15—55 суток у человека. Люди, контактировавшие с бешеными животными, должны подвергаться профилактическим прививкам антирабической вакциной. Такие прививки иногда сопровождаются осложнениями (парезами и параличами). Возникает необходимость в ранней диагностике бешенства у подозреваемых животных.

Принцип выявления. Основан на реакции взаимодействия антигена бешенства с гамма-глобулинами, мечеными флуорохромами. В качестве флуорохрома чаще всего используется изоцианат флуоресцеина —



при этом образуется комплекс антиген+антитело+флуорохром, способный при анализе в люминесцентном микроскопе поглощать ультрафиолетовые лучи с длиной волны 290—495 нм и излучать зеленый свет с длиной волны 525 нм.

Реактивы. 1. Буферный раствор поваренной соли с $\text{pH} = 7,1$: в 1 л дистиллированной воды растворить 8,50 г NaCl, 1,07 г Na_2HPO_4 (безводного), 0,39 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. 2. Свежеприготовленный буферный раствор глицерина (9 частей глицерина +1 часть раствора, приготовленного выше). 3. Гомологический конъюгат глобулина (получаем в готовом виде или готовят по прописи руководства). 4. Отрицательная конъюгированная сыворотка.

Постановка реакции. 1. На обезжиренных чистых предметных стеклах приготовить отпечатки разреза аммоновых рогов головного мозга подозреваемого в бешенстве и контрольного (клинически здорового) животных. 2. Провести фиксацию на пламени горелки (2—3-кратным проведением мазка-отпечатка по верхушке пламени). 3. На препараты, полученные от подозреваемого в бешенстве животного, наложить антирабический конъюгат глобулина, а на контрольные мазки-отпечатки — конъюгированную отрицательную сыворотку. 4. Препараты поместить на 30 мин во влажные камеры (накрыть чашками Петри). 5. Дважды в течение 10 мин промыть в кювете 0,01 М буферным раствором поваренной соли. 6. Подсушить фильтровальной бумагой. 7. На каждый препарат нанести несколько капель холодного буферного раствора глицерина и накрыть покровными стеклами. 8. Исследовать в люминесцентном микроскопе.

Результат. Тельца Негри представляют собой сгустки антигена. На препаратах, полученных от бешенных животных, выявляются флуоресцирующие светло-зеленым светом тельца Негри и другие включения вирусного происхождения. В контрольных препаратах такое свечение не обнаруживается. Метод дает возможность получить результат уже через четыре дня после заражения.

Примечание. Препараты можно хранить в течение нескольких суток при низких температурах ($+4^\circ\text{C}$) без заметного нарушения люминесцирующих свойств. При работе с таким материалом следует строго придерживаться требований инструкции по борьбе с бешенством. Автор метода считает, что отрицательный результат, полученный при использовании метода, дает основание освободить около 45% лиц, подозреваемых в заражении бешенством, от профилактических антирабических прививок.

Получает применение метод иммунофлуоресцентного исследования отпечатков роговицы (прижизненная диагностика бешенства).

§ 4. Микрофотография

Микрофотографирование — получение увеличенных фотографических изображений микроскопических участков гистологических и гистохимических препаратов. Оно проводится с помощью специ-

альных приборов, образованных сочетанием фотокамер и микроскопов. Такие приборы представлены различными видами установок (рис. 36) для микрофотографирования (ФМН-2 и ФМН-3), микрофотонасадками (МФН-1 — МФН-12, МФНЭ-1) и фотомикроскопами («Ультрафот П», «Фотомикроскоп», «Панфот»). В повседневной лабораторной работе чаще всего применяются микрофотонасадки. При их использовании на фотопластинке (фотопленке) возникает действительное и увеличенное изображение объекта (рис. 37). К каждой микрофотонасадке прилагается вертикальный тубус, ко-

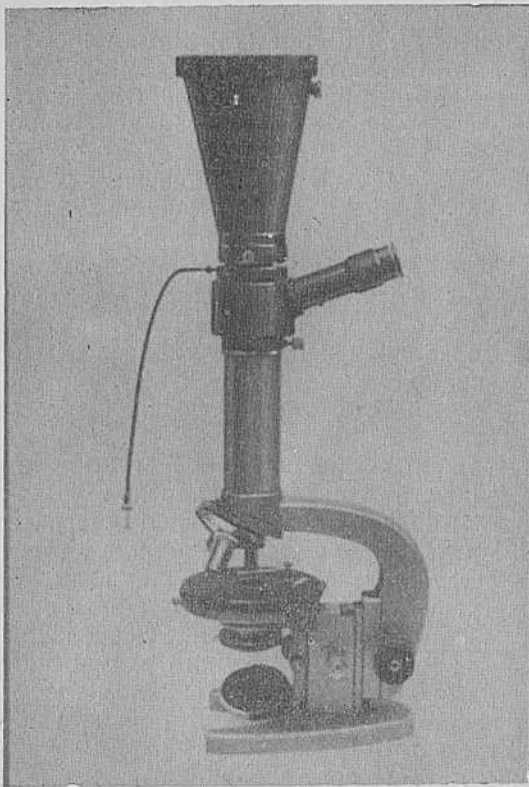


Рис. 36. Микрофотографическая установка.

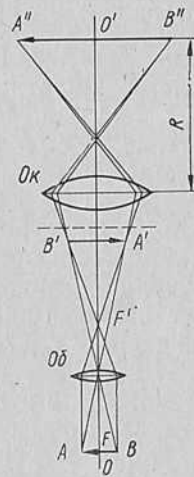


Рис. 37. Ход лучей при микрофотографировании:

Об — объектив; *Ок* — окуляр;
F — передний фокус объектива;
F' — передний фокус окуляра;
AB — объект; *A'B'* — промежуточное изображение; *A''B''* — изображение на фотопластинке (фотопленке); *R* — расстояние от окуляра до кассеты; *ОО'* — оптическая ось.

торый при фотографировании вставляют в микроскоп вместо окулярного тубуса. В ряде случаев в качестве фотонасадки используют фотокамеру фотоаппарата, которая с помощью удлинительных (переходных) колец присоединяется к микроскопу, образуя своеобразную микрофотоустановку. На универсальных микроскопах микрофотографирование проводится параллельно с исследованием.

Техника микрофотографирования подробно изложена в инструкциях к приборам и специальных руководствах.

Кроме приборов, для обработки фотоматериалов нужна специальная затемненная комната, которая имеет водопровод, соответствующие фотореактивы и необходимое оборудование: фотофонари, кассеты, фотобачки, кюветы, посуду для реактивов, мензурки, мерные цилиндры, аптечные и технические весы, разновесы, воронки, фотоэкспонетры, фотоувеличители, копировальные рамки, наборы фотопленок, фотопластинок, фотобумаги, светофильтров, фотоокуляров, фотообъективов, резак, пинцеты, ножницы, катки, электроглянцеватель и др.

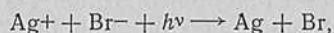
Черно-белая микрофотография. Выбор пленок (фотопластинок) зависит от наличия в лаборатории определенной фотосъемочной аппаратуры, физико-химических свойств исследуемых тканей и вещества, цветности и контрастности конечных продуктов гистохимических реакций. Используются пластинки и плоские пленки (6×9 см, 9×12 см и др.), катушечные (шириной 6 см) и перфорированные (шириной 35 мм) пленки различных типов («Панхром», «Изохром» и «Ортохром»). Негативные фотопленки выбирают по их свето- и цветочувствительности, разрешающей способности, коэффициенту контрастности и фотографической широте. Можно использовать кинопленку «МЗ-2», имеющую высокую чувствительность, большую разрешающую способность и повышенную контрастность. Хорошие результаты можно получить, применяя пленку «Фото-32» и кинопленку «КН-1». Для получения четких негативов следует применять светофильтры: красный — при синей и зеленой, оранжевый — синей и фиолетовой, желтый — фиолетовой, зеленый — красной, синий — красной и желтой окраске микроскопических объектов.

Для приготовления фотоснимков применяют ряд сортов бром-серебряной фотобумаги. Чаще всего используют глянцевую нормальную и контрастную фотобумагу «Унибром» или «Фотобром» различных номеров (обычно № 3 или № 4, реже № 2, № 5, № 6). Подбирая сорт и номер бумаги, можно добиться наилучшего воспроизведения гистохимической картины объекта. Микрофотография должна иметь нейтрально-серую окраску. В последнее время для микрофотографирования применяют фотобумагу зарубежных фирм — «Бромфорт» (ВНР), «Вефота-бром» (ГДР) и др.

Зарядку кассет производят в темноте. Приступают к микрофотографированию. Оно состоит из трех процессов: съемки, приготовления негативов и приготовления снимков.

Съемка. На препарате следует найти нужное место для проведения микрофотографирования, навести микроскоп на резкость, добиться хорошей освещенности объекта (центровкой лучей осветительной лампы, наводкой их на зеркало микроскопа, опусканием и поднятием конденсора, изменением просвета диафрагм, осветителя и конденсора, подбором соответствующих светофильтров). Определить время экспозиции (пробным путем или фотоэлектрическим экспонетром). Проверить резкость установки на фокус и произвести съемку. На фотопластинке или фотопленке под воздействием лучей света возникает скрытое изображение исследуемой части препарата.

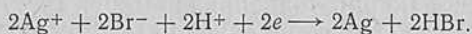
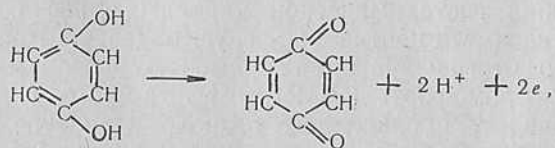
Приготовление негативов. Негативный процесс состоит из нескольких стадий: проявления, ополаскивания, фиксации, промывки и сушки. Проявленная пленка (пластинка) называется *негативом*; на нем светлые места объекта являются темными, темные — светлыми. Во время проявления скрытое изображение с помощью проявляющих растворов превращается в видимое. Эти реакции начинаются при действии лучей света на фотографический слой пленки (пластинки) во время съемки. Основа фотографического слоя заполнена зернами бромида (размером 0,1—3 мкм), частично иодида и хлорида серебра. Структура зерен галоидного серебра представляет собой кристаллическую решетку, узлы которой заполнены ионами серебра и галогена. При действии света ионы серебра поглощают кванты, образуется металлическое серебро в некоторых точках зерен фотографического слоя (скрытое изображение):



где $h\nu$ — энергия; h — постоянная Планка; ν — частота. Возникают центры проявления зерна. Причем, в местах, которые подверглись большему воздействию света, образуется больше зерен, содержащих центры проявления. В период проявления в результате химических реакций проявляющие вещества отдают свои электроны ионам серебра, содержащимся в эмульсии, что и приводит к возникновению в кристаллах скоплений металлического серебра:



где $\text{Red}^- + \text{H}^+$ — проявляющее вещество; Ox — продукт окисления. Чаще всего в состав проявителя входит гидрохинон, который окисляется в хинон, отдавая электроны ионам серебра:



В составе проявителя содержатся следующие вещества: а) проявляющие (гидрохинон, метол и др.); б) предохраняющие проявитель от окисления (сульфит натрия); в) способствующие ускорению проявления (поташ, карбонат натрия, едкий натр); г) противобуляющие (бромид калия). Для *проявления* пленок (пластинок) можно рекомендовать несколько рецептов проявителей. Для их приготовления следует использовать дистиллированную воду (в крайнем случае — прокипяченную). Составные части растворять в воде в таком порядке, как приведено в рецептах. Эмульсионную сторону пленки мягкой сухой тряпочкой протирать

от пыли. Пленку быстро погружать или залить проявителем. Во время проявления бачок или кювету с пленкой равномерно покачивать. Проявитель должен полностью покрывать поверхности обрабатываемых пленок (пластинок). Обрабатывать пленку в темноте.

Проявитель для пленки № 1

Состав	Обычный проявитель	Контрастный проявитель
Метол, г	1	5
Безводный сульфит натрия, г	26	40
Гидрохинон, г	25	6
Карбонат натрия, г	20	40
Бромид калия, г	1	3
Вода дистиллированная, мл	До 1000	До 1000

Время проявления при 20°C — 5—8 мин. Использовать можно долго (несколько месяцев), соблюдая правила хранения. Нельзя смешивать использованный проявитель с чистым.

Проявитель для пленки № 2 (по Шиллаберу Д-61а)

Состав	Количество
Вода, нагретая до 52°C, мл	500
Метол, г	3,1
Сульфит натрия (безводный), г	90
Дисульфит натрия, г	2,1
Гидрохинон, г	5,9
Карбонат натрия (безводный), г	11,5
Бромид калия, г	1,7
Холодная вода, мл	До 1000

Проявитель можно рекомендовать для проявления различных черно-белых пленок и фотопластинок. Время проявления — 3,5—7—8 мин.

Проявитель для пленки № 3 (по Шиллаберу Д-11)

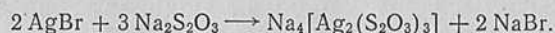
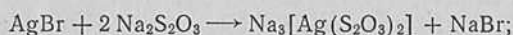
Состав	Количество
Вода, нагретая до 52°C, мл	500
Метол, г	1,0
Сульфит натрия (безводный), г	75,0
Гидрохинон, г	9,0
Карбонат натрия (безводный), г	25,0
Бромид калия, г	5,0
Холодная вода, мл	До 1000

Проявитель предназначен для получения контрастных негативов. Для ослабления контрастности проявитель следует разбавить равным объемом воды. Время проявления — от 5 до 8 мин. Можно

проявлять позитивную фотопленку, предназначенную для приготовления диапозитивов.

Следующим этапом приготовления негативов является *ополаскивание* проявленной пленки (пластинки) в чистой (дистиллированной или прокипяченной) воде. Катушечные пленки ополаскивают в бачках, плоские — в цилиндрах или кюветах. Удаляют остатки проявителя, прекращают проявление и предохраняют фиксаж от занесения в него остатков проявителя. Время ополаскивания — 10 с, дать стечь избытку воды.

При *фиксировании* негативов удаляется непроявленное галогидное серебро (в виде растворимых в воде солей). В составе фиксажей чаще всего имеется гипосульфит или тиосульфат натрия. Здесь имеют место следующие реакции:



Закрепитель для пленок № 1

Состав	Количество
Тиосульфат натрия (кристаллический), г	250
Вода, нагретая до 70—75°C, мл	1000

Раствору дают остыть. Затем фиксируют. Время фиксации при 20°C — 10—12 мин.

Закрепитель для пленок № 2

Состав	Раствор А	Раствор Б
Вода, нагретая до 52°C, мл	1000	80
Тиосульфат натрия (кристаллический), г	240	—
Сульфит натрия (безводный), г	—	15
Уксусная кислота 28%-ная, мл	—	43
Калиевые квасцы, г	—	15

Растворы готовят отдельно. Им дают остыть, затем смешивают. Время фиксации — 25—30 мин. Рекомендуется использовать в летнее время для хорошего проявления пленок (пластинок). В 1 л фиксажа можно обработать до 100 фотопластинок.

Перед внесением пленок (пластинок) в раствор закрепителя их нужно хорошо промыть в воде. Фиксацию проводить до тех пор, пока на обратной стороне пленки («рубашке») не исчезнут молочные пятна. После этого негатив фиксируют еще столько, сколько он находился в закрепителе до исчезновения пятен.

После этого пленки (пластинки) *промывают* в проточной воде в течение 30—40 мин. Можно использовать обыкновенную воду, которую в течение 30 мин следует сменить 5—6 раз.

Последним этапом приготовления негативов является их *сушка*. Сушку проводят в теплом помещении при 26—28°C, с хорошей вентиляцией. Можно использовать сушильные шкафы, имеющие воздушные фильтры, вентилятор и подогреватель воздуха. Для быстрой сушки негативы промывают 70—80%-ным этанолом с последующим просушиванием на открытом воздухе. Во время сушки негативы предохраняют от попадания пыли.

Приготовление снимков состоит из печатания с негатива на фотобумагу, проявления, промывки, фиксации, промывки и сушки. Для микрофотографии лучше использовать глянцевую фотобумагу, так как снимки на ней сохраняют детали микропрепарата. Следует помнить, что в эмбриологии, гистологии, цитологии, гистохимии и цитохимии микрофотография сама может служить объектом исследования, так как она, в отличие от рисунка, почти лишена субъективности.

Прежде всего определяют экспозицию, необходимую для получения микрофотографии нужного контраста. Она зависит от плотности негатива, степени его освещенности, светочувствительности и сроков годности фотобумаги, ее вида, группы и окраски, а также от качества проявителя. Используется метод проб. Прозрачные негативы следует печатать с большей экспозицией и меньшей освещенностью, плотные — с меньшей выдержкой и большей освещенностью. Используется два вида печати — контактный (негатив и фотобумагу кладут в копировальную рамку, выставляют на свет и экспонируют) и проекционный (с помощью фотоувеличителей). Первый вид более приемлем для научной микрофотографии.

Приступают к *проявлению* фотоотпечатка при сильном красном или оранжевом свете. Проявление фотоотпечатков и дальнейшие процедуры приготовления микрофотографии ничем не отличаются от обычной фотографической техники, изложенной в любом руководстве по фотографии. Для приготовления микрофотографии можно рекомендовать проявители следующего состава.

Проявитель для бумаги № 1 (по Шиллаберу Д-72)

Состав	Количество
Вода, нагретая до 52°C, мл	500
Метол, г	3,1
Сульфит натрия (безводный), г	45,0
Гидрохинон, г	12,2
Карбонат натрия (безводный), г	67,5
Бромид калия, г	1,9
Вода, мл	До 1000

Для приготовления рабочего раствора необходимо взять 1 объем основного раствора проявителя, приготовленного выше, и добавить 1,5—2 объема воды при 18°C. Время проявления — в среднем 45 с. Химизм действия проявителя на фоточувствительный слой бумаги аналогичен тому, который типичен для проявления пленки (см. выше).

Если в промывной воде есть следы тиосульфата натрия, то после внесения в 250 мл воды одной капли реактива возникает оранжевая окраска. Затем приступают к сушке отпечатков. Она проводится обычным способом (с использованием электроглянцевателей, зеркального стекла, целлулоидной пленки, плексигласа).

Цветная микрофотография. Цветной микрофотографии принадлежит особое место в цито- и гистохимии, так как правильно выполненные микрофото могут дать представление о природе и свойствах изучаемых веществ в объекте. Для цветного микрофотографирования необходимо то же самое оборудование, что и для черно-белого. Дополнительно следует приобрести наборы кювет, мензурок, колб, термометров (с точностью до 0,5°C), трансформатор, стабилизирующий напряжение, рН-метр, пинцеты, резиновые перчатки и др. Нужен набор светофильтров (желательно «Ямполькор»), негативных и позитивных цветных пленок, реактивов. В нашей стране выпускается ряд видов негативных цветных пленок — ДС (при дневном свете), ЛН (при освещении лампами накаливания), цветные маскированные пленки ДС-5М и ЛН-5М. Высокой оценки заслуживают цветные обратимые пленки «Орвоколор» и «Орвохром», выпускаемые в ГДР, а также обратимые пленки «Фото ЦОД-16» и «Фото ЦОД-32» отечественного производства. Положительной оценки заслуживают два типа позитивных пленок — ЦП-8р и ЦП-10. Используется цветная фотобумага общего («Фотоцвет-2», «Фотоцвет-4», «Фотоцвет-5») и специального (ЦБ-1, СБ-2) назначения. Для обработки цветных пленок и печати фотографий чаще всего используют наборы реактивов. Необходимо строго придерживаться пунктов инструкций, прилагаемых к наборам, так как в состав реактивов входят ядовитые вещества.

Техника съемки. Съемка гистохимических препаратов на цветные пленки основана на тех же самых принципах, что и при черно-белой микрофотографии. Существенным моментом съемки является выбор времени экспозиции. Можно руководствоваться следующей таблицей экспозиции (по Е. Г. Шаеру):

Увеличе-ние объек-тива	Увеличение окуляра	Длина тубуса камеры, мм	Диаметр диафрагмы конденсатора	Экспозиция, с	Примечание
×10	Без окуляра	—	7	1	Конденсор без фронтальной линзы Полная оптическая система конденсора
×10	×7	40	10	2	
×40	Без окуляра	—	10	4	
×40	×7	40	12	8	
×95	×7	40	15	15	
×95	×7	60	18	20	

Различные виды освещения (проходящий и падающий свет, фазовый контраст), а также применение специальных методов микроскопии (флуоресцентного, поляризационного, интерференционного, сравнения) требуют определенных правил, изложенных в спе-

циальных руководствах. Особое место должно принадлежать подбору светофильтров.

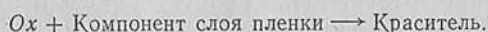
Начальным этапом обработки трехслойных негативных пленок является проявление, что приводит к возникновению в слоях, чувствительных к синим, зеленым и красным лучам, негативного серебряного изображения. Можно рекомендовать проявитель следующего состава.

Проявитель для негативных цветных пленок
(Л. А. Федин, И. Я. Барский, 1971)

Состав	Раствор А	Раствор В
Гидроксиламина сульфат (С-55), г	1,2	—
Диэтилпарафенилендиаминсульфат (ТСС), г	2,75	—
Вода дистиллированная, 40°С, мл	До 500	До 500
Сульфит натрия (безводный), г	—	2,0
Поташ, г	—	75,0
Бромид калия, г	—	2,5

Составные части каждого раствора вводить в последовательности, предусмотренной рецептом. После приготовления раствор В влить в раствор А, постепенно перемешивая. Работать в резиновых перчатках (ТСС поражает кожный покров).

Процесс проявления цветных пленок и черно-белых сходен. Проявитель окисляется, а проэкспонированные кристаллы галоидного серебра восстанавливаются до металлического. Потом окисленная форма проявляющих веществ взаимодействует с химическими компонентами слоев цветной пленки, что и приводит к образованию в определенных участках наряду с атомами металлического серебра молекул красителей. В целом химизм можно представить так:



Во время промывки удаляют остатки проявителя и продукты реакции. При отбеливании растворяются восстановленное при цветном проявлении серебро и коллоидное серебро фильтрового слоя.

Отбеливающий раствор

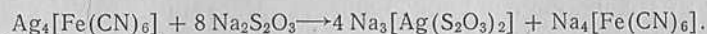
Состав	Количество
Гексациано-(III)феррат калия, г	50,0
Бромид калия (можно хлорид натрия), г	10,0
Вода дистиллированная, мл	До 1000

Химизм взаимодействия гексациано-(III)феррата калия с серебром можно представить так:



Во время второй промывки пленки с ее поверхности удаляют

продукты реакций. Суть *фиксирования* прежде всего заключается в окончательном удалении компонентов серебряного изображения под влиянием тиосульфата натрия:



Раствор для фиксации

Состав	Количество
Тиосульфат натрия кристаллический, г	250,0
Вода дистиллированная, мл	До 1000

При последней промывке удаляются все ненужные продукты реакций. Перед высушиванием обратную эмульсионную сторону пленки тщательно протирают замшей или губкой. Если проявляют негативную пленку, цветное проявление не проводят. Оно необходимо для проявления обратимых пленок:

Цветной проявитель для обратимых пленок

Состав	Количество
Диэтилпарафенилендиаминсульфат, г	6
Сульфит натрия (безводный), г	3,6
Гидроксиламина сульфат, г	1,2
Поташ, г	80,0
Бромид калия, г	2,5
Вода дистиллированная, мл	До 1000

Цветная печать с негативов проводится в темноте или при использовании специальных светофильтров (№ 166), а после останавливающей ванны — при обычном освещении. Принципы цветной печати те же, что и черно-белой. Фотоотпечатки готовят контактным и проекционным способами (в зависимости от вида пленки — плоской или перфорированной). Вначале определяют экспозицию и нужный светофильтр. Постоянное напряжение электросети достигается с помощью стабилизатора. Большинство растворов для приготовления фотоотпечатков те же, что и для цветных пленок, за исключением цветного проявителя для бумаги. Химизм реакций проявления и фиксирования аналогичен. Цветная печать микрофотографий ничем не отличается от приготовления обычных цветных фото, что изложено в любом руководстве по цветной фотографии. Важное место в цветной печати микрофотографий следует отвести подбору соответствующих сортов фотобумаги. В СССР негативам, которые не имеют маски, соответствует бумага «Фоточет» четырех сортов: Ф-1 и Ф-5 нормальная, Ф-2 нормальная и Ф-2 контрастная. Сорта Ф-1 и Ф-5 следует применять для приготовления фотографий с контрастных негативов. Ф-2 нормальная, СР-3 («Орво», ГДР) и «Фортеколор» (ВНР) предназначены для негативов средней контрастности, Ф-2 контрастная и РН погmal (фирма «Фота», ЧССР) — для слабо выраженных негативов.

Глава XVIII. РАСТВОРЫ

Для приготовления гистохимических препаратов пользуются растворами разнообразнейших веществ. Раствор — это физико-химическая система, состоящая из двух и более компонентов: один из них обычно преобладает и называется растворителем, остальные равномерно распределяются в растворителе и являются растворенными веществами. В зависимости от агрегатного состояния растворителя растворы делят на газообразные, жидкие и твердые. По размерам частиц растворенных веществ различают три типа растворов: истинные (размер частиц до 1 нм), коллоидные (от 1 до 100 нм) и механические смеси — суспензии и эмульсии (размер частиц свыше 100 нм). Среди истинных растворов различают молекулярно-дисперсные (неэлектролиты) и ионно-дисперсные (электролиты) системы. В молекулярно-дисперсных системах растворимое вещество находится в виде молекул (например растворы глюкозы и мочевины), в ионно-дисперсных — в виде ионов (например раствор соляной кислоты, едкого натра, поваренной соли). Изучаемые ткани и клетки являются своеобразными коллоидными системами, состоящими из гелей (клеточные мембраны) и золь (матрикс). Многие реактивы, особенно красители и субстраты, применяются в виде коллоидных растворов. При постановке гистохимических реакций в местах локализации изучаемых веществ возникают окрашенные продукты, которые можно отнести к суспензиям (например осадки сульфида свинца при выявлении кислой фосфомоноэстеразы). Отдельные реактивы применяют в виде эмульсий (например «Твины»).

Растворы различаются между собой концентрацией — весовым или объемным содержанием растворенных веществ в определенном количестве раствора. Раствор, в котором содержится значительное количество растворенного вещества, близкое к насыщению, называют концентрированным. Понятие «концентрированный» следует отличать от «насыщенный». Насыщенным раствором называют такой раствор, в котором содержится максимально возможное количество растворенного вещества в данных условиях. Например, если в 100 г воды растворить 50 г натриевой селитры, получим концентрированный раствор. Его нельзя назвать насыщенным, так как при 20°C в таком же объеме воды растворяется 87,5 г селитры. Растворы, концентрация которых меньше, чем насыщенного раствора, называют ненасыщенными, больше (при той же температуре) — пересыщенными.

§ 1. Способы выражения концентрации растворов

Процентная концентрация. Растворы с процентной концентрацией используются часто в гистохимической практике. Процентная концентрация показывает, сколько граммов растворенного вещества содержится в 100 г раствора. Например, для приготовления 5%-ного раствора поваренной соли нужно взять 5 г хлорида натрия

и растворить в 95 г воды. Если растворимое вещество кристаллогидрат, при расчетах нужно учитывать кристаллизационную воду. Например, приготовить 80 г 10%-ного раствора глауберовой соли из $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$. Сначала находим количество безводной соли, которое нужно взять для приготовления 80 г 10%-ного раствора: $x_1 = 80 \cdot 0,1 \text{ г} = 8 \text{ г}$. Затем находим грамм-молекулярную массу безводной соли и кристаллогидрата: для безводной соли она составит 142 г, для кристаллогидрата — 322 г. Составляем пропорцию: $142 : 8 = 322 : x_2$, откуда

$$x_2 = \frac{322 \cdot 8}{142} = 18,14 \text{ г}.$$

Чтобы узнать сколько взять воды для приготовления нужного количества раствора, нужно от 80 г вычесть 18,14 г, что составит 61,86 г. Таким образом, для приготовления 80 г 10%-ного раствора глауберовой соли следует взять 18,14 г кристаллогидрата и добавить 61,86 г воды.

Молярная концентрация. Грамм-молекула, или моль, — количество граммов вещества, равное его молекулярной массе. Молярная концентрация выражается количеством грамм-молекул, или молей, растворенного вещества в 1 л раствора. Различают одно- (1 М), дву- (2 М), деци- (0,1 М), санти- (0,01 М) молярные растворы и др. Так, в одномолярном растворе количество растворенного вещества составляет 1 моль на 1 л, в децимолярном — десятую часть грамм-молекулы и т. д. Например, нужно приготовить 500 мл 0,01 М раствора $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Грамм-молекулярная масса $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ равна 294 г. Сотая часть от этой цифры равна 2,94 г. Следовательно, для приготовления 1 л 0,01 М раствора дихромата калия нужно взвесить навеску 2,94 г. Нам нужно приготовить 500 мл такого раствора. Составляем пропорцию: $1000 : 500 = 2,94 : x$, откуда

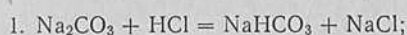
$$x = \frac{2,94 \cdot 500}{1000} = 1,47 \text{ г}.$$

Навеску дихромата калия высыпем в мерную колбу и до метки 500 мл добавляем нужное количество дистиллированной воды.

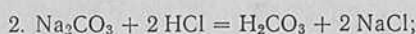
Нормальная концентрация. Нормальная концентрация выражается количеством грамм-эквивалентов (ГЭ) растворенного вещества в 1 л раствора. Грамм-эквивалент химического элемента численно равен частному от деления атомной массы элемента на его валентность. Например, грамм-эквивалент железа (атомная масса 55,847) двухвалентного равен 27,92 г, трехвалентного — 18,62 г. Грамм-эквивалент кислоты равен ее грамм-молекулярной массе, деленной на основность. Например, для фосфорной кислоты грамм-эквивалент равен $\frac{98}{3} = 32,7 \text{ г}$. Грамм-эквивалент основания равен грамм-молекулярной массе, деленной на валентность металла. Например, для гидроксида бария грамм-эквивалент равен $\frac{171,38}{2} = 85,69 \text{ г}$. Грамм-эквивалент соли равен ее грамм-молекулярной

массе, деленной на произведение числа атомов металла и валентности. Так, для сульфата железа (III) грамм-эквивалент равен $\frac{400}{2 \cdot 3} = 66,7 \text{ г}$.

Величина грамм-эквивалента может определяться химизмом реакции, в которую вступают вещества. Так, карбонат натрия с соляной кислотой реагирует двояко, что отражается на величине грамм-эквивалента соли:



$$\Gamma_{\text{Э}_{\text{Na}_2\text{CO}_3}} = \frac{106}{1} = 106 \text{ г}$$



$$\Gamma_{\text{Э}_{\text{Na}_2\text{CO}_3}} = \frac{106}{2} = 53 \text{ г}$$

Различают одно- (1 н.), полу- (0,5 н.), деци- (0,1 н.), санти- (0,01 н.) нормальные растворы и другие. Для приготовления раствора соответствующей нормальности нужно взвесить определенное количество вещества, высыпать его в мерную колбу, растворить в небольшом количестве воды и разбавить водой до метки. Например, для приготовления 1 л 0,01 н. раствора хлорида бария вначале определяют его грамм-молекулярную массу: $\Gamma M_{\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} = \frac{244}{244}$

Затем определяют грамм-эквивалент соли: $\Gamma_{\text{Э}_{\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}} = \frac{244}{2} = 122 \text{ г}$. После этого определяют количество вещества, которое нужно взять для приготовления 0,01 н. раствора: $122 \text{ г} \cdot 0,01 = 1,22 \text{ г}$. В колбу высыпают навеску, добавляют небольшое количество воды, после растворения вещества добавляют воду до метки 1000 мл.

Растворы, приготовляемые из фиксаналов. Фиксаналы представляют стеклянные запаянные ампулы, которые содержат 0,1 г-экв вещества и предназначены для приготовления 1 л раствора нужной концентрации. Следует пользоваться инструкцией, прилагаемой к набору ампул фиксанала.

§ 2. Буферные растворы

При постановке большинства гистохимических реакций нужно создавать среду с определенным значением pH. Это не случайно, так как в тканях и клетках различные реакции метаболизма протекают при соответствующих значениях pH. Малейшее отклонение pH в кислую или щелочную сторону грозит извращением реакций обмена веществ и даже патологией (алкалозом или ацидозом). В организме есть ряд буферных систем, способных удерживать pH на определенном уровне при поступлении в ткани или клетки избытка ионов H^+ или OH^- . Так, в плазме крови содержатся бикар-

бонатная $\left(\frac{\text{H}_2\text{CO}_3}{\text{NaHCO}_3}\right)$, фосфатная $\left(\frac{\text{NaH}_2\text{PO}_4}{\text{Na}_2\text{HPO}_4}\right)$, белковая $\left(\frac{\text{H} \cdot \text{белок}}{\text{B} \cdot \text{белок}}\right)$, гемоглобиновая $\left(\frac{\text{H} \cdot \text{Hb}}{\text{B} \cdot \text{Hb}}\right)$, оксигемоглобиновая $\left(\frac{\text{H} \cdot \text{HbO}}{\text{B} \cdot \text{HbO}}\right)$, органических кислот и их солей $\left(\frac{\text{орг. к-та}}{\text{B} \cdot \text{орг. к-та}}\right)$. (В буферных растворах В — это ионы Na^+ или K^+).

Буферными растворами называют смеси, в составе которых содержатся в определенном количественном соотношении слабые кислоты и их соли с сильными основаниями $\left(\frac{\text{H}_2\text{CO}_3}{\text{NaHCO}_3}\right)$ или слабые основания и их соли с сильными кислотами $\left(\frac{\text{NH}_4\text{OH}}{\text{NH}_4\text{Cl}}\right)$. Меняя количественные соотношения между составными частями отдельных буферных систем, получают растворы с различным значением рН.

Основными свойствами буферных растворов является то, что их рН сравнительно мало изменяется при разбавлении нейтральным растворителем (водой); на рН не оказывает заметного воздействия окружающая температура; рН буферных растворов не изменяется при добавлении к ним небольших количеств сильных кислот или оснований; для каждой буферной системы характерна буферная емкость, которая определяется количеством 0,1 н. HCl или NaOH , которое необходимо добавить к 1 л буферного раствора, чтобы сдвинуть его рН на ± 1 .

Роль буферных растворов в успешном проведении гистохимических реакций велика. Ткани, удаленные из живого организма, находятся в особых условиях. К ним прекратился доступ питательных веществ и кислорода. Продукты обмена не удаляются. Изменяется рН. Фиксация материала способствует сохранению прижизненного состояния тканей и клеток. Для выявления отдельных веществ, особенно ферментов, с помощью буферных растворов создается нужная среда для нормального протекания химических реакций.

Для приготовления буферных растворов нужно использовать дистиллированную и бидистиллированную воду. Реактивы должны иметь марку х. ч. Особое внимание обратить на молекулярную массу и наличие кристаллизационной воды в веществах. Значение рН контролировать рН-метром, потенциометром или колориметром. Приводим таблицы приготовления ряда буферных растворов.

Буферная смесь Уолпола (1914)

Исходные растворы: А — 1 н. раствор ацетата натрия; В — 1 н. раствор соляной кислоты.

Способ приготовления: для приготовления буферной смеси с определенным значением рН нужно взять 50 мл раствора А и соответствующее количество раствора В (по таблице), добавить воды до 250 мл:

рН	<i>B</i>	рН	<i>B</i>	рН	<i>B</i>
0,65	100	1,99	52,5	3,79	42,5
0,75	90	2,32	51	3,95	40
0,91	80	2,64	50	4,19	35
1,09	70	2,72	49,72	4,39	30
1,24	65	3,09	48,5	4,58	25
1,42	60	3,29	47,5	4,76	20
1,71	55	3,49	46,25	4,92	15
1,85	53,5	3,61	45	5,20	10

1 М ацетат-солянокислый раствор по Спаннгофу (1967)

Исходные растворы: *A* — 1 М раствор ацетата натрия (136,09 г соли растворить в 1000 мл дистиллированной воды); *B* — 1 н. раствор соляной кислоты.

Способ приготовления: 100 мл соответствующего буферного раствора с определенным значением рН готовят по таблице, смешивая нужное количество растворов *A* и *B*, добавив определенный объем дистиллированной воды:

рН	<i>A</i>	<i>B</i>	H ₂ O	рН	<i>A</i>	<i>B</i>	H ₂ O
0,65	20	40	40	3,49	20	18,5	61,5
0,91	20	32	48	3,61	20	18	62
1,24	20	26	54	3,79	20	17	63
1,42	20	24	56	3,95	20	16	64
1,71	20	22	58	4,19	20	15	65
1,99	20	21	59	4,39	20	12	68
2,32	20	20,5	59,5	4,58	20	10	70
2,64	20	20	60	4,76	20	8	72
3,09	20	19,5	60,5	4,92	20	6	74
3,29	20	19	61	5,20	20	4	76

Цитратно-фосфатный буферный раствор по Мак-Ильвейну (1921)

Исходные растворы: *A* — 0,2 М раствор гидрофосфата натрия (0,2 М раствор содержит 35,61 г соли в 1 л); *B* — 0,1 М раствор лимонной кислоты (0,1 М раствор содержит 21,01 г кислоты в 1 л воды).

Способ приготовления: для приготовления 200 г буферного раствора с определенным значением рН нужно взять соответствующее количество миллилитров растворов *A* и *B* (по таблице):

pH	A	B	pH	A	B
2,2	4	196	5,2	107,2	92,8
2,4	12,4	187,6	5,4	111,5	88,6
2,6	21,8	178,2	5,6	116	84
2,8	31,7	168,3	5,8	120,9	79,1
3	41,1	158,9	6	126,3	73,7
3,2	49,4	150,6	6,2	132,2	67,8
3,4	57	143	6,4	138,5	61,5
3,6	64,4	135,6	6,6	145,5	54,5
3,8	71	129	6,8	154,5	45,5
4	77,1	122,9	7	164,7	35,3
4,2	82,8	117,2	7,2	173,9	26,1
4,4	88,2	111,8	7,4	181,7	18,3
4,6	93,5	106,5	7,6	187,3	12,7
4,8	98,6	101,4	7,8	191,5	8,5
5	103	97	8	194,5	5,5

Ацетатный буферный раствор Уолпола (1914)
Исходные растворы: А — 0,1 М раствор уксусной кислоты (6,005 г ледяной уксусной кислоты на 1000 мл воды); В — 0,1 М раствор ацетата натрия (13,609 г соли на 1000 мл воды).

Способ приготовления: для приготовления 100 мл буферного раствора с определенным значением рН нужно руководствоваться таблицей:

pH	A	B	pH	A	B
3,6	92,5	7,5	4,8	40	60
3,8	88	12	5	29,5	70,5
4	82	18	5,2	21	79
4,2	73,5	26,5	5,4	14,5	85,5
4,4	63	37	5,6	9,5	90,5
4,6	51	49			

Фосфатный буферный раствор по Спаннгофу (1967)

Исходные растворы: А — 0,06 М раствор гидрофосфата натрия (растворить в 1 л воды 11,876 г соли); В — 0,06 М раствор дигидрофосфата калия (растворить в 1 л воды 9,078 г соли).

Способ приготовления: готовят 100 мл буферного раствора с определенным значением рН, смешивая соответствующие объемы растворов А и В по таблице:

pH	A	B	pH	A	B
5,4	3,1	96,9	6,8	50	50
5,6	5	95	7	61	39
5,8	8	92	7,2	72	28,2
6	12	88	7,4	80,8	19,2
6,2	18,5	81,5	7,6	87	13
6,4	26,2	73,8	7,8	91,5	8,5
6,6	36	64	8	94,5	5,5

Фосфатный буферный раствор по Ф. Л. Калинину, В. П. Лобову, В. А. Жидкову (1971)

Исходные растворы: А — 0,2 М раствор гидрофосфата натрия (35,61 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ растворить в 1000 мл воды или 71,64 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ растворить в 1000 мл воды); В — 0,2 М раствор дигидрофосфата натрия (27,6 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ растворить в 1000 мл воды или 31,21 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ растворить в 1000 мл воды).

Способ приготовления: смешивать растворы А и В, используя таблицу:

pH	А	В	pH	А	В
8,45	95	5	11,14	50	50
8,79	90	10	11,39	49	51
9,22	80	20	11,92	45	55
9,56	70	30	12,21	40	60
9,98	60	40	12,48	30	70
10,32	55	45	12,66	20	80
10,90	61	39	12,77	10	90

Веронал-ацетатный буферный раствор Михаэлиса

Исходные растворы: основной раствор — в 500 мл дистиллированной воды растворить 9,714 г $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ и 14,714 г барбитурата; А — 5 мл основного раствора + 2 мл 8,5%-ного раствора хлорида натрия; В — 0,1 н. раствор соляной кислоты.

Способ приготовления: взять 7 мл раствора А, добавить нужное для соответствующего рН количество раствора В и добавить (18—В) количество дистиллированной воды (см. таблицу):

pH	В	pH	В	pH	В	pH	В
2,62	16	4,66	10	7,25	5,5	6,68	0,75
3,20	15	4,93	9	7,42	5	8,9	0,5
3,62	14	5,32	8	7,66	4	9,16	0,25
3,88	13	6,12	7	7,90	3	9,64	0
4,13	12	6,75	6,5	8,18	2		
4,33	11	6,99	6	8,55	1		

Трис-буфер Мак-Мануса и Мауэра

Исходные растворы: 0,2 М раствор триоксиметиламинометана (взять 24,3 г триоксиметиламинометана и добавить дистиллированной воды до 1000 мл); В — 0,1 н. раствор соляной кислоты.

Способ приготовления: для получения раствора с нужным значением рН необходимо взять по таблице соответствующие количества растворов А и В и добавить до объема 100 дистиллированной воды:

pH	A	B	H ₂ O	pH	A	B	H ₂ O
7,19	25	45	30	8,23	25	22,5	52,5
7,36	25	42,5	32,5	8,32	25	20	55
7,54	25	40	35	8,41	25	17,5	57,5
7,66	25	37,5	37,5	8,51	25	15	60
7,77	25	35	40	8,62	25	12,5	62,5
7,87	25	32,5	42,5	8,74	25	10	65
7,96	25	30	45	8,92	25	7,5	67,5
8,05	25	27,5	47,5	9,10	25	5	70
8,14	25	25	50				

Буферный раствор Зеренсена

Исходные растворы: A — 0,1 н. растворы глицина и поваренной соли (в равных количествах); B — 0,1 н. раствор NaOH. Чтобы приготовить 1 л 0,1 н. растворов берут 7,507 г глицина, 5,845 г NaCl, 4 г NaOH.

Способ приготовления: смешать растворы A и B (по таблице). Учитывать температуру окружающей среды и растворов (см. таблицу):

pH			A	B	pH			A	B
18°C	24°C	30°C			18°C	24°C	30°C		
8,58	8,45	8,32	95	5	11,31	11,14	10,97	50	50
8,93	8,79	8,67	90	10	11,57	11,39	11,22	49	51
9,36	9,22	9,08	80	20	12,10	11,92	11,74	45	55
9,71	9,56	9,42	70	30	12,40	12,21	12,03	40	60
10,14	9,98	9,83	60	40	12,67	12,48	12,29	30	70
10,48	10,32	10,17	55	45	12,86	12,66	12,47	20	80
11,07	10,90	10,74	51	49	12,97	12,77	12,57	10	90

Буферный раствор бура—NaOH по М. Берстону (1965)

Исходные растворы: A — 0,05 M раствор буры (19,05 г буры в 1 л водного раствора); B — 0,2 M раствор NaOH.

Способ приготовления: 50 мл раствора A + x мл раствора B разбавить до объема 200:

pH	x	pH	x
9,28	0	9,7	29
9,35	7	9,8	34
9,4	11	9,9	38,6
9,5	17,6	10,0	43
9,6	23	10,1	46

Какодилатный буферный раствор по Берстону (1965)

Исходные растворы: А — 0,2 М раствор какодилата натрия (42,8 г $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ на 1000 мл воды); В — 0,2 М раствор соляной кислоты.

Способ приготовления: для получения раствора с нужным значением рН необходимо взять 50 мл раствора А, добавить x мл раствора В и добавить до объема 200 мл дистиллированной воды:

рН	x	рН	x	рН	x
7,4	2,7	6,4	18,3	5,6	39,2
7,2	4,2	6,2	23,8	5,4	43,0
7,0	6,3	6,0	29,6	5,2	45,0
6,8	9,3	5,8	34,8	5,0	47,0
6,6	13,3				

§ 3. Разбавление спиртов

В гистохимической практике применяют спирты различной концентрации. Чаще других используют этанол, реже — метанол, пропанола, бутанола, пентанола. Исходным спиртом обычно является спирт-ректификат — 95—96%-ный раствор этанола в воде. Градус любого спирта представляет собой его объемный процент в растворе. Например, 96-градусный этанол представляет собой водный раствор этанола, в котором содержится 96 объемных процентов абсолютного этанола и 4 объемных процента воды.

Процентный состав спиртов определяют специальным ареометром-спиртомером, с внесением поправки на окружающую температуру. Для приготовления из исходного этанола растворов с заданной концентрацией можно пользоваться следующими расчетами. Так, имеется $a\%$ -ный раствор исходного спирта, нужно получить $b\%$ -ный раствор этанола. Для этого нужно взять b частей a спирта и прибавить $(a - b)$ частей растворителя. Например, из 96%-ного этанола получить 70%-ный. К 70 мл 96%-ного этанола прибавляем $(96 - 70)$ мл воды.

Для работы часто используют абсолютный этанол. Его обычно готовят из 96%-ного этанола из расчета: к 100 мл спирта-ректификата добавить 10 г безводного медного купороса (оставить на 24—48 ч).

Чтобы быстро получить спирты нужной концентрации, можно пользоваться таблицей:

Для получения 100 мл спирта	Для разбавления взять миллилитров							
	96%-ного спирта	H ₂ O	99%-ного спирта	H ₂ O	80%-ного спирта	H ₂ O	70%-ного спирта	H ₂ O
40%-ного	42	58	44	56	50	50	57	43
45%-ного	47	53	50	50	56	44	64	36
50%-ного	52	48	56	44	63	37	71	29
60%-ного	63	37	67	33	75	25	86	14
70%-ного	73	27	78	22	88	12	—	—
80%-ного	83	17	89	11	—	—	—	—
90%-ного	94	6	—	—	—	—	—	—

Глава XIX. БИОМЕТРИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА МАТЕРИАЛА

Биометрия — раздел биологии, содержанием которого является планирование и обработка результатов исследований методами математической статистики. Цель такой обработки — дать объективную оценку количественной стороне изучаемых явлений, чтобы в выводах не допустить субъективных обобщений.

Планирование исследований — решающий этап любой научной работы. Биометрия располагает рядом методов эффективной постановки опытов (схемы дисперсного анализа, последовательный анализ, планирование отсеивающих экспериментов и др.). Существенным моментом в любом исследовании является выбор объекта и количество объектов. Число последних должно быть достаточным (не менее трех), чтобы можно было полноценно выполнить поставленные задачи. Схема постановки эксперимента должна быть построена с рациональной последовательностью, чтобы при минимальной затрате средств и времени можно было получить максимум информации об объекте. Обязательным условием успешной постановки любого опыта должен быть достоверный контроль.

Метод Монцевичюте-Эрингене

Разработан в 1964 г. Широко используется в биологии, медицине, ветеринарии и зоотехнии. Приемлем и для оценки результатов некоторых гистохимических исследований, так как позволяет определить коэффициент достоверности полученных данных. Рассмотрим пример. Имеется две группы животных — опытная (n) и контрольная (n_1). В клетках (например нейронах спинального ганглия) определяется активность одного из ферментов. Она выражается целыми цифрами — единицами активности — от 0 до 14. В состав опытной группы входит 8 животных ($n=8$), контрольной — 6 ($n_1=6$). При изучении результатов гистохимических реакций получают ряд числовых характеристик. Их записывают в определенном порядке (согласно номеру исследуемого животного в обеих группах). Возникает два вариационных ряда — для n и n_1 :

Номера животных	Числовая характеристика активности фермента		Номера животных	Числовое выражение отклонений отдельных вариантов σ от среднего арифметического	
	опытной группы ($n=8$)	контрольной группы ($n_1=6$)		опытной группы ($n=8$)	контрольной группы ($n_1=6$)
1	11	8	1	0 (11-11=0)	0 (8-8=0)
2	12	9	2	1	1
3	11	7	3	0	1
4	14	6	4	3	2
5	13	8	5	2	0
6	14	10	6	3	2
7	13		7	2	
8	1		8	10	

После построения вариационного ряда приступают к определению среднего арифметического \bar{x} по формуле:

$$\bar{x} = \frac{\Sigma V}{n},$$

где Σ — знак суммирования, V — варианты, n — количество вариантов или наблюдений. Получают следующее выражение среднего арифметического:

$$\bar{x} = \frac{(11 + 12 + 11 + 14 + 13 + 14 + 13 + 1)}{8} = \frac{89}{8} = 11;$$

$$\bar{x}_1 = \frac{(8 + 9 + 7 + 6 + 8 + 10)}{6} = \frac{48}{6} = 8.$$

Определяется отклонение α отдельной варианты от среднего арифметического (см. выше таблицу).

Приступают к определению суммы отклонений для каждой группы животных: $\Sigma=21$ и $\Sigma_1=6$. Определяют ошибку среднего арифметического: константу умножают на сумму отклонений. Константу узнают по прилагаемой таблице, зависит она от числа вариантов в ряду (см. табл. 1): $m = 0,0592 \cdot 21 = 1,2432$; $m_1 = 0,0934 \cdot 6 = 0,5604$. После этого приступают к определению коэффициента достоверности t по формуле:

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{x}_1}{\sqrt{m^2 + m_1^2}} = \frac{11 - 8}{\sqrt{1,24^2 + 0,56^2}} = \frac{3}{\sqrt{1,53 + 0,31}} = \frac{3}{\sqrt{1,84}} = \frac{3}{1,35} = 2,2.$$

Проводят оценку коэффициента достоверности по табл. 2, где против цифры 2,2 размещается полоса достоверности «удовлетворительная».

Таблица 1. Константы K для средних ошибок, вычисляемых по формуле

$$m = \Sigma \alpha K, \text{ где } K = \frac{1}{0,79788 \cdot n \sqrt{n-1}}$$

Число вариант n	Константа K	Число вариант n	Константа K	Число вариант n	Константа K	Число вариант n	Константа K
3	0,2904	33	0,0067	63	0,0025	93	0,0014
4	0,1809	34	0,0064	64	0,0025	94	0,0014
5	0,1253	35	0,0062	65	0,0024	95	0,0014
6	0,0934	36	0,0059	66	0,0024	96	0,0014
7	0,0731	37	0,0056	67	0,0023	97	0,0013
8	0,0592	38	0,0054	68	0,0023	98	0,0013
9	0,0492	39	0,0052	69	0,0022	99	0,0013
10	0,0418	40	0,0050	70	0,0022	100	0,0013
11	0,0360	41	0,0048	71	0,0021	101	0,0012
12	0,0315	42	0,0047	72	0,0021	150	0,00062
13	0,0278	43	0,0045	73	0,0020	200	0,00045
14	0,0248	44	0,0043	74	0,0020	250	0,00032
15	0,0223	45	0,0042	75	0,0019	300	0,00024
16	0,0202	46	0,0040	76	0,0019	350	0,00019
17	0,0184	47	0,0039	77	0,0019	400	0,00016
18	0,0169	48	0,0038	78	0,0018	450	0,00013
19	0,0156	49	0,0037	79	0,018	500	0,000107
20	0,0144	50	0,0036	80	0,0018	550	0,000097
21	0,0133	51	0,0035	81	0,0017	600	0,000085
22	0,0124	52	0,0034	82	0,0017	650	0,000076
23	0,0116	53	0,0033	83	0,0017	700	0,000068
24	0,0109	54	0,0032	84	0,0016	750	0,000061
25	0,0102	55	0,0031	85	0,0016	800	0,000055
26	0,0096	56	0,0030	86	0,0016	850	0,000050
27	0,0091	57	0,0029	87	0,0016	900	0,000046
28	0,0086	58	0,0029	88	0,0015	950	0,000043
29	0,0082	59	0,0028	89	0,0015	1000	0,000040
30	0,0078	60	0,0027	90	0,0015		
31	0,0074	61	0,0027	91	0,0015		
32	0,0070	62	0,0026	92	0,0015		

Полуколичественная визуальная оценка интенсивности гистохимических реакций по В. В. Соколовскому (1971)

Метод Соколовского используется для сравнения различных показателей, типичных для контроля и опыта, клинически здорового и больного организма, отдельных стадий индивидуального развития, неодинакового функционального состояния (состояние покоя и возбуждения) и др. Применяя этот метод, необходимо, чтобы срезы тканей имели одинаковую толщину для всех исследуемых случаев (контрольные и больные животные), а постановку гистохимических реакций проводить в одинаковых условиях. Причем, желательно на одно и то же предметное стекло поместить и опытный, и контрольные срезы и др.

Применяется оценка интенсивности реакции с помощью баллов. Например, на гистохимическом препарате имеются одни и те же клетки с различной интенсивностью окраски. Слабая окраска оценивается одним баллом, умеренная — двумя, сильная — тремя. На

Таблица 2. Оценка достоверности

Части достоверности	Коэффициент достоверности, f	Степени свободы L																Коэффициент достоверности, f	Полосы достоверности
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	30	50	∞		
Недостоверная	0,1	94	93	93	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	0,1	Недостоверная
	0,2	87	86	86	85	85	85	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	0,2	
	0,3	82	79	78	78	78	77	77	77	77	77	77	77	77	76	76	76	0,3	
	0,4	76	73	72	71	71	71	70	70	70	70	70	69	69	69	69	69	0,4	
	0,5	70	67	65	64	64	64	63	63	63	63	63	62	62	62	62	62	0,5	
	0,6	66	61	59	58	58	57	57	56	56	56	56	55	55	55	55	55	0,6	
	0,7	61	56	54	52	52	51	51	50	50	50	50	49	49	49	48	48	0,7	
	0,8	57	51	48	47	46	45	45	44	44	44	44	43	43	43	43	42	0,8	
	0,9	54	46	44	42	41	40	40	39	39	39	39	38	38	37	37	37	0,9	
	1,0	50	42	39	38	36	36	35	34	34	34	34	33	33	32	32	32	1,0	
	1,1	47	39	35	33	32	31	31	30	30	30	29	29	29	28	28	27	1,1	
	1,2	44	35	32	30	28	28	27	26	26	26	25	25	24	24	23	23	1,2	
	1,3	42	32	28	26	25	24	24	23	23	22	22	21	21	20	20	19	1,3	
	1,4	39	30	26	23	22	21	20	20	20	19	18	18	18	17	16	16	1,4	
	1,5	37	27	23	21	19	18	18	17	17	16	16	15	15	14	14	13	1,5	
	1,6	36	25	21	18	17	16	15	15	14	14	13	13	12	12	11	11	1,6	
	1,7	34	23	19	16	15	14	13	13	12	12	11	11	10	10	9	9	1,7	
	1,8	32	21	17	15	13	12	12	11	10	10	10	9	9	8	8	7	1,8	
	1,9	31	20	15	13	12	11	10	9	9	8	8	7	7	7	6	6	1,9	
	2,0	30	18	14	12	10	9	8	8	8	7	7	6	6	5	5	5	2,0	
	2,1	28	17	13	10	9	8	7	7	7	6	6	5	5	4	4	4	2,1	
	2,2	27	16	12	9	8	7	6	6	6	5	5	4	4	4	3	3	2,2	
	2,3	26	15	11	8	7	6	6	5	5	4	4	4	3	3	2	2	2,3	
	2,4	25	14	10	7	6	5	5	4	4	4	3	3	3	2	2	1,6	2,4	
	2,5	24	13	9	7	5	5	4	4	3	3	3	2	2	2	1,6	1,2	2,5	
	2,6	23	12	8	6	5	4	4	3	3	3	2	2	2	1,4	1,2	0,9	2,6	
	2,7	23	11	7	5	4	4	3	3	2	2	2	2	1,4	1,1	1,0	0,7	2,7	
	2,8	22	11	7	5	4	3	3	2	2	2	1,6	1,4	1,1	0,9	0,7	0,5	2,8	
	2,9	21	10	6	4	3	3	2	2	2	1,6	1,3	1,1	0,9	0,7	0,6	0,4	2,9	
	3,0	20	10	6	4	3	2	2	2	1,5	1,3	1,1	0,9	0,7	0,6	0,4	0,3	3,0	

3,1	20	9	5	4	3	2	2	1,5	1,2	1,1	0,9	0,8	0,6	0,4	0,3	0,2	0,1	3,1	Высокая
3,2	19	9	5	3	2	2	1,5	1,2	1,1	1,0	0,8	0,6	0,5	0,3	0,3	0,1	0,1	3,2	
3,3	19	8	5	3	2	1,6	1,3	1,1	0,9	0,8	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,1	3,3	
3,4	18	8	4	3	2,9	1,4	1,1	1,0	0,8	0,7	0,6	0,4	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	3,4	
3,5	18	7	4	2,5	1,8	1,3	1,0	0,8	0,7	0,6	0,4	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	3,5	
3,6	17	7	3,7	2,3	1,6	1,1	0,9	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	3,6	
3,7	17	7	3,4	2,1	1,4	1,0	0,8	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	3,7	
3,8	16	6	3,2	1,9	1,3	0,9	0,7	0,5	0,4	0,4	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	3,8	
3,9	16	6	3,0	1,8	1,2	0,8	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	3,9	
4,0	16	6	2,8	1,6	1,0	0,7	0,5	0,4	0,3	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	4,0	
4,2	15	5	2,4	1,4	0,9	0,6	0,4	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	4,2	
4,4	14	5	2,2	1,1	0,7	0,5	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	4,4	
4,6	14	4	1,9	1,0	0,6	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	4,6	
4,8	13	4	1,7	0,9	0,5	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	4,8	
5,0	13	4	1,5	0,8	0,4	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	5,0	
5,2	12	4	1,4	0,7	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	5,2	
5,4	12	3	1,2	0,6	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	5,4	
5,6	11	3	1,1	0,5	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	5,6	
6,0	10	3	0,9	0,4	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	6,0	
6,4	10	2	0,8	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	6,4	
6,8	9	2	0,7	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	6,8	
7,2	9	2	0,6	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	7,2	
7,6	8	2	0,5	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	7,6	
8,0	8	1,5	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	8,0	
8,5	7	1,3	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	8,5	
9,0	7	1,2	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	9,0	
10	6	1,0	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	10	
12	5	0,6	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	12	
14	4,5	0,5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	14	
16	4,0	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	16	
19	3,2	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	19	
22	2,9	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	22	
26	2,4	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	26	
31	2,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	31	

Меньше 0,1%

Очень высокая

препарате подсчитывается количество клеток или структур, окраска которых соответствует одной из градаций. Затем умножают эти цифры на соответствующий балл, а сумму трех производных делят на сумму исследуемых клеток или структур. Полученный результат и является характеристикой средней интенсивности гистохимической реакции для изучаемого объекта. Для примера возьмем препарат определенного участка нервной системы, на котором необходимо определить среднюю активность сукцинатдегидрогеназы для отдельного нейрона у клинически здорового и больного организма. Проводим параллельно подсчеты таких клеток в контрольном и опытном срезах, где поставлена гистохимическая реакция в идентичных условиях. Часть клеток не содержит видимых количеств формазанов и такое состояние реакции обозначают одним баллом, в части клеток выявляется моноформазан, свидетельствующий об умеренном количестве фермента, а некоторые нейроны содержат скопления диформазана. Во втором случае интенсивность фермента обозначается двумя, в третьем — тремя баллами. Допустим, что первая градация у контрольного животного представлена 15 клетками, вторая — 10 и третья — 5. Производим расчеты:

$$15 \times 1 = 15;$$

$$10 \times 2 = 20;$$

$$5 \times 3 = 15.$$

Определяем сумму: $15+20+15=50$. Вычисляем среднее содержание фермента на одну клетку: $50 : 30=1,7$. В дальнейшем таким же путем определяем среднее содержание фермента и для больного организма. Такие же определения проводим и для остальных опытных и контрольных животных. Приступаем к оценке результатов биометрического исследования (см. выше): строим вариационные ряды, определяем средние арифметические величины, отклонения отдельных вариантов от средней арифметической величины, ошибки средней арифметической величины и коэффициента достоверности.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Гистохимические реактивы

Гистохимические реактивы — это такие вещества, которые используются для выявления и определения отдельных химических соединений в тканях и клетках. Многие реактивы характеризуются сложным составом и строением молекул. В основном гистохимия пользуется теми же реактивами, что аналитическая и биологическая химия. Многие из них применяются самостоятельно (например галлоцианин, пиронин G, судан черный B), часть используется в качестве окислителей и восстановителей, растворителей, коагуляторов, ингибиторов, эмульгаторов, фиксаторов, катализаторов и др. Химические реактивы должны иметь марку х. ч. (по ГОСТу). Если проводят тонкий анализ веществ в тканях и клетках, применяют реактивы марки ч. д. а. При проведении цитоспектрофотометрических исследований применяют реактивы ос. ч.

При использовании реактивов для гистохимического анализа обязательно учитывать сроки годности, так как со временем реактивы разлагаются и в их составе появляются вредные примеси, наличие которых отрицательно сказывается на постановке реакций.

Реактивы следует предохранять от попадания солнечных прямых лучей, держать в темной посуде или в специальной упаковке, не допускать поступления влаги, соблюдать температурный режим, особенно при хранении ферментов (РНК-азы, ДНК-азы, трипсина, пепсина, лидазы, гиалуронидазы). Свойства и строение молекул отдельных реактивов изучены мало. Иногда наименование и свойства реактивов, синтезируемых в различных странах, отличаются. Многие зарубежные фирмы не приводят формулы некоторых реактивов из-за коммерческих соображений. Приводим таблицу реактивов, применяемых чаще всего в гистохимии:

Название реактива	Молекулярная масса
Аденозиндифосфат	427,20
Аденозин-5-монофосфат, двунариевая соль	481,28
Аденозин-5-трифосфат, натриевая соль	551,16
Азид натрия	65,02
Акрифлавин	—
Аллоксан	160,09
Алциановый синий	—
Алюминиевокалиевые квасцы	474,39
Амидочерный 10Б	357,63
α -Амилаза	—
β -Амилаза	—
5-Аминоакридин солянокислый	230,50
8-Амино-1-нафтол-3,6-дисульфокислота (Н-кислота)	319,30
8-Амино-2-(оксиметил)-1,3-пропандиол (трис)	121,20
8-Амино-1-нафтол-5-сульфокислота (S-кислота)	239,25
Амитал (амобарбитал)	226,30
Амитал натрия (амобарбитал натрия)	248,30
Анилин	93,00
L-Аскорбиновая кислота (витамин С)	176,12
Ацетальдегид	44,23
Ацетат кобальта (4H ₂ O)	249,10
Ацетат меди (H ₂ O)	199,65
Ацетат натрия (3H ₂ O)	136,09
Ацетилтиохолиниодид	288,00
Ацетилхлорид	78,50
Бензидин солянокислый	140,57
Бензидин уксуснокислый	304,35
Борная кислота	61,84
5-Броминдиксилацетат	254,00
6-Бром-2-нафтил- β -D-галактопиранозид	385,23
6-Бром-2-нафтил- β -D-глюкопиранозид	385,23
n-Бутанол	74,12
Бутирилтиохолиниодид	224,00
Веронал натрия (мединал, барбитурат натрия)	206,18
Галлоцианин	300,27
Гексамин (гексаметилентетрамин)	140,19
Гексациано-(II) феррат калия	422,21
Гексациано-(III) феррат калия	329,26
Гексозодифосфат натрия	—
Гематоксилин	356,32
Гидразид-2-окси-3-нафтойной кислоты	246,00
Гидразиндигидрохлорид	104,98
Гидрокарбонат натрия	84,00
Гидроксиламин солянокислый	69,50
Гидросульфит натрия (дитионит)	174,13
Гидрофосфат калия	228,21
Гидрофосфат натрия	141,97
Гидрофосфат натрия (12H ₂ O)	358,16
Гидрохинон	110,11
Гликоген	—
Гликокол (глицин)	75,07
α -Глицерофосфат натрия	324,13
β -Глицерофосфат натрия (5H ₂ O)	306,12
Глюкозо-1-фосфат (двукальциевая соль)	372,36
Глюкозо-1-фосфат натрия	—
Глюкозо-6-фосфат (двунариевая соль)	304,1

Название реактива	Молекулярная масса
Диастаза	—
Дигидрофосфат калия	136,09
Дигидрофосфат натрия	156,01
Дигитонин	125,30
Диизопропилфторфосфат (ДФФ)	174,15
<i>n</i> -Диметиламинобензальдегид	149,20
Диметил- <i>n</i> -фенилендиамингидрохлорид	209,13
Диоксан	88,10
2,2'-Диокси-6,6'-динафтилдисульфид (ДДД)	—
Дифенилкарбазон	256,30
3, 4, 5-дифенотиолин-тетразолий	—
Дифосфопиридиннуклеотид (ДПН, или НАД)	663,44
Диэтил- <i>n</i> -нитрофенилфосфат (препарат Е 600)	259,20
Индоксилацетат	175,20
Инсулин	227,96
Иодацетат натрия	180,10
Иодид калия	166,01
Иодная кислота (2Н ₂ О)	227,96
Иодуксусная кислота	185,96
Карбонат калия	138,21
Карбонат лития	73,89
Карбонат натрия	106,00
Кармин	—
Каталаза	225000,00
Коккарбоксилаза	478,00
Конго красный	696,67
Ксантгидрол	198,21
Лактат натрия	112,07
Лактатдегидрогеназа	100000,00
Лизаза	—
Малат натрия (1/2Н ₂ О)	187,07
Малатдегидрогеназа	—
Малеиновая кислота	16,08
Марсилид	—
Метанол	32,00
Метиленовый зеленый	407,99
Метиленовый зеленый	458,46
Метиленовый синий (свободный от цинка)	374,00
Молибдат аммония	235,86
Мочевина	160,06
НАД (никотинамид-адениндинуклеотид, ДПН)	663,44
НАДФ (никотинадениндинуклеотидфосфат)	743,42
Нитропруссид натрия	297,97
α -Нафтол	144,17
β -Нафтол	144,00
Нафтол AS-BI фосфат	452,21
Нафтол AS-TR фосфат	391,76
α -Нафтилацетат	186,21
Нейтральный красный	288,78
Неотетразолий	703,65
Нингидрин	178,14
Нитрат кальция (безводный)	164,09
Нитрат меди (3Н ₂ О)	241,60
Нитрат натрия (безводный)	85,00
Нитрат ртути (I) (2Н ₂ О)	561,22
Нитрит натрия	69,00
Нитроанилин	138,12

Название реактива	Молекулярная масса
Нитробензол	123,11
Нитро-синий тетразолий (нитро-СТ)	817,72
Норадреналин кислый виннокислый	317,00
Оксалат натрия	134
2-Окси-3-нафтойная кислота	188,17
2-Окси-3-нафтойная кислота, гидразид	246,00
Орсин	142,15
Осмиевая кислота (четыреокись осмия)	254,20
Пепсин	—
Периодат калия	230,01
Периодат натрия	267,94
Пиридоксаль-5-фосфат (кодекарбоксилаза)	247,15
Пиронин G	302,79
Поливинилпирролидон (ПВП)	11000,00
Прочный красный	—
Прочный синий В	727,67
Прочный синий ВВ	399,18
Резорцин	110,11
Рибозо-5-фосфат (натриевая соль)	366,00
Рибонуклеаза (РНК-аза)	—
Родизонат натрия	214,05
Родинидаза	—
Сафранин	350,80 и 364,90
Световой зеленый	765,00
Световой зеленый	792,86
Семикарбазид солянокислый	111,54
Синий тетразолий (СТ)	727,67
Судан 3	352,38
Судан 4	380,45
Судан черный В	456,49
Сукцинат натрия	270,16
Сульфаниловая кислота	209,22
Сульфат кобальта (7H ₂ O)	281,12
Сульфат натрия (безводный)	142,06
Сульфат нильского голубого	732,92
Сульфит калия	174,27
Твин-40	—
Твин-60	—
Твин-80	—
Тетраборат натрия	201,03
Тетраметилдиаминотрифенилметан	330,00
Тиогликолевая кислота	92,12
Тиосульфат натрия (5H ₂ O)	248,19
Тиоуксусная кислота	76,12
Тиоцианат аммония	76,12
Толуидиновый синий	305,80 и 747,93
Трилон В	—
Трипсин	—
Триптамин солянокислый	196,69
Трис-(оксиметил)-аминометан (2-амино-2-оксиметил-1,3-пропандиол)	121,18
Трифосфопиридиннуклеотид (ТПН, или НАДФ)	743,42
Трихлоруксусная кислота	163,4
УДФ-глюкоза	—
Уксусная кислота	60,00
Уксусный ангидрид	102,05

Название реактива	Молекулярная масса
Фенилгидразон солянокислый	144,61
Фенилуретан	165,17
Фуксин кислый	571,5
Фуксин основной (смесь <i>n</i> -розанилина — мол. м. 323,82 и розанилина — мол. м. 337,84)	
Хлорид аммония	53,49
Хлорид висмута	315,37
Хлорид железа (6H ₂ O)	270,32
Хлорид кадмия (2,5H ₂ O)	228,36
Хлорид калия	74,55
Хлорид кальция (безводный)	110,99
Хлорид марганца	197,92
Хлорид натрия	58,45
Хлорид платины	337,06
Холинхлорид	324,13
Хромовые квасцы (24H ₂ O)	998,87
Хромовый ангидрид	100,01
Целистиновый голубой	—
Цианид натрия	49,02
Цистеин солянокислый	—
Цитохром <i>c</i>	13000
Эзерин	275,36
Яблочная кислота	134,09
Янус зеленый В	—

Приложение 2

Метрология

Метрология (от гр. *μετρον* — мера и *λογος* — учение) — учение об измерениях. Основными задачами современной метрологии являются установление единиц измерения физических величин, их воспроизведение с помощью эталонов и разработка методов передачи правильных значений единиц от эталонов к рабочим мерам. В настоящее время функционирует международная система единиц (СИ). Используются основные, дополнительные и производные единицы СИ.

С 1962 г. рекомендованы еще две дольные приставки — «фемто» и «атто». «Фемто» (ф, или f) соответствует дольности 10^{-15} , «атто» (а, или a) соответствует дольности 10^{-18} .

Таблица 1. Важнейшие единицы СИ

Наименование величин	Единица измерения	Сокращенное название единиц	
		русскими буквами	латинскими буквами
<i>Основные единицы</i>			
Длина	метр	<i>м</i>	m
Масса	килограмм	<i>кг</i>	kg
Время	секунда	<i>с</i>	s
Сила электрического тока	ампер	<i>А</i>	A

Наименование величин	Единица измерения	Сокращенное название единиц	
		русскими буквами	латинскими буквами
Термодинамическая температура	градус Кельвина	градус К	K
Сила света	кандела	кд	cd
Количество вещества	моль	моль	mol
<i>Дополнительные единицы</i>			
Плоский угол	радиан	рад	rad
Телесный угол	стерадиан	ср	sr

Таблица 2. Образование кратных и дольных единиц

Название приставки	Сокращенное обозначение		Кратность и дольность
	русскими буквами	латинскими и греческими буквами	
тера-	T	T	1 000 000 000 000 = 10 ¹²
гига-	G	G	1 000 000 000 = 10 ⁹
мега-	M	M	1 000 000 = 10 ⁶
кило-	к	k	1 000 = 10 ³
гекто-	г	h	100 = 10 ²
дека-	да	da	10 = 10 ¹
деци-	д	d	0,1 = 10 ⁻¹
санти-	с	c	0,01 = 10 ⁻²
милли-	м	m	0,001 = 10 ⁻³
микро-	мк	μ	0,000 001 = 10 ⁻⁶
нано-	н	n	0,000 000 001 = 10 ⁻⁹
пико-	п	p	0,000 000 000 001 = 10 ⁻¹²

Таблица 3. Единицы измерения, используемые в современной морфологии и гистохимии

Наименование величин	Единица измерения	Сокращенное обозначение единицы		Размерность единицы
		русскими буквами	латинскими буквами	
Длина	метр	м	m	1 м
	дециметр	дм	dm	10 ⁻¹ м
	сантиметр	см	cm	10 ⁻² м
	миллиметр	мм	mm	10 ⁻³ м
	микрометр	мкм	μm	10 ⁻⁶ м
	нанометр	нм	nm	10 ⁻⁹ м
	ангстрем	Å	Å	10 ⁻¹⁰ м
	пикометр	пм	pm	10 ⁻¹² м
	фемтометр	фм	fm	10 ⁻¹⁵ м
	аттометр	ам	am	10 ⁻¹⁸ м
Масса	килограмм	кг	kg	1 кг
	грамм	г	g	1 г
	дециграмм	дг	dg	10 ⁻¹ г

Продолжение табл. 3

Наименование величин	Единица измерения	Сокращенное обозначение единицы		Размерность единицы
		русскими буквами	латинскими буквами	
Объем жидкостей и газов Количество ве- щества	сантиграмм	<i>сг</i>	<i>cg</i>	10^{-2} г
	миллиграмм	<i>мг</i>	<i>mg</i>	10^{-3} г
	микрограмм	<i>мкг</i>	μ g	10^{-6} г
	нанограмм	<i>нг</i>	<i>ng</i>	10^{-9} г
	пикограмм	<i>пг</i>	<i>pg</i>	10^{-12} г
	фемтограмм	<i>фг</i>	<i>fg</i>	10^{-15} г
	аттограмм	<i>аг</i>	<i>ag</i>	10^{-18} г
	литр	<i>л</i>	<i>l</i>	1 л
	миллилитр	<i>мл</i>	<i>ml</i>	10^{-3} л
	моль	<i>моль</i>	<i>mol</i>	1 моль
	децимоль	<i>дмоль</i>	<i>dmol</i>	10^{-1} моль
	сантимоль	<i>смоль</i>	<i>cmol</i>	10^{-2} моль
	миллимоль	<i>ммоль</i>	<i>mmol</i>	10^{-3} моль

ЛИТЕРАТУРА

- Авцын А. П., Струков А. И., Фукс Б. Б. Принципы и методы гисто- и цитохимического анализа в патологии. Л., «Медицина», 1971.
- Агеев А. К. Гистохимия щелочной и кислой фосфатаз человека в норме и патологии. Л., «Медицина», 1969.
- Берстон М. Гистохимия ферментов. М., «Мир», 1965.
- Бродский В. Я. Трофика клетки. М., «Наука», 1966.
- Бродский В. Я., Поляков Н. И. Введение в количественную цитохимию. М., «Мир», 1969.
- Герштейн Л. М., Цветкова И. В. Цитология, 1960, 2.
- Глик Д. Методика гисто- и цитохимии. М., «Изд. иностр. лит.», 1950.
- Гольдин Л. С. Основы гистологической техники электронной микроскопии. М., «Гос. изд. мед. лит.», 1963.
- Джексен У. Ботаническая гистохимия. М., «Мир», 1965.
- Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М., «Мир», 1966.
- Елисеев В. Г., Субботин М. Я., Афанасьев Ю. И., Котовский Е. Ф. Основы гистологии и гистологической техники. М., «Медицина», 1967.
- Жинкин Л. Н., Румянцев П. П. Руководство по цитологии. Т. I. М.—Л., «Наука», 1965.
- Зеленин А. В. Люминесцентная цитохимия нуклеиновых кислот. М., «Наука», 1967.
- Кисели Д. Практическая микротехника и гистохимия. Будапешт, «Изд. Академии Наук Венгрии», 1962.
- Конарев В. Г. Цитохимия и гистохимия растений. М., «Высшая школа», 1966.
- Краевский Н. А. Гистохимические методы в диагностике опухолей. М., «Медицина», 1968.
- Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М., «Мир», 1969.
- Меллорс Р. Методы цитологического анализа. М., «Изд. иностр. лит.», 1957.
- Меркулов Г. А. Курс патологистологической техники. Л., «Медицина», 1969.
- Митин К. С. Гистохимия соединительной ткани сосудов при ревматизме. М., «Медицина», 1966.
- Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. М., «Изд. иностр. лит.», 1962.
- де Робертис Э., Новинский В., Саэс Ф. Биология клетки. М., «Мир», 1973.
- Ромейс Б. Микроскопическая техника. М., «Изд. иностр. лит.», 1953.
- Роскин Г. И., Левинсон Л. Б. Микроскопическая техника. М., «Советская наука», 1957.
- Сабо Д. Цветная медицинская микрофотография. Будапешт, «Изд. Академии Наук Венгрии», 1967.
- Соколовский В. В. Гистохимические исследования в токсикологии. Л., «Медицина», 1971.
- Федин Л. А., Барский И. Я. Микрофотография. Л., «Наука», 1971.
- Шабадаш А. Л. Гистохимия гликогена нормальной нервной системы. М., «Гос. изд. мед. лит.», 1949.
- Шахрова М. М. Курс фотографии. К., «Вища школа», 1972.
- Шиллабер Ч. Микрофотография. М., «Изд. иностр. лит.», 1951.

- Юденфренд С. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. М., «Мир», 1965.
- Barka T. and Anderson P. J. *Histochemistry. Theory, Practice and Bibliography*. Hoeber, New York, 1963.
- Casselmann W. G. B. *Histochemical Technique*. Methuen, London, 1959.
- Danielli J. F. *Cytochemistry*. New York, Chapman and Hall, London, 1953.
- Eränkő O. *Quantitative Methods in Histology and Microscopic Histochemistry*. Karger, Basel and New York, 1955.
- Glick D. *Quantitative chemical techniques of histo- and cytochemistry*. Vol. 1, 2. New York — London, Interscience, 1961—1963.
- Gomori G. *Microscopic Histochemistry. Principles and practice*. Chicago, 1958.
- Graumann W. und Neumann K. (Hrsg.). *Handbuch der Histochemie*. Bd. I—VII. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1958—1960.
- Gurr E. *Methods of analytical Histology and Histo—Chemistry*. London, Leonard Hill, 1958.
- Klein G. *Practicum der Histochemie*. Berlin, 1929.
- Lison L. *Histochimie Animale*. Gautier—Villars, Paris, 1936.
- Lison L. *Histochimie et Cytochimie Animales*. Volume I, II. Gautier—Villars, Paris, 1960.
- Mc Manus J. F. A. and Mowry R. W. *Staining Methods Histologic and Histochemical*. Hoeber, New York, 1960.
- Pearse A. G. E. *Histochemistry, Theoretical and Applied*. Vol. 1. 3 edition. Little, Brown Company, Boston, 1968.
- Pearse A. G. E. *Histochemistry, Theoretical and Applied*. Vol. 2. 3 edition. London, Churchill Livingstone, 1972.
- Spannhof L. *Einführung in die Praxis der Histochemie*. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1967.

СОДЕРЖАНИЕ

	Принятые в книге обозначения	3
	Предисловие	4
	Введение	6
Глава I.	Из истории развития гистохимии	7
Глава II.	Значение гистохимических методов	10
Глава III.	Оборудование гистохимической лабораторий	14
Глава IV.	Материал для гистохимических исследований	18
	§ 1. Трупный материал	18
	§ 2. Боевой материал	19
	§ 3. Экспериментальный материал	21
	§ 4. Послеоперационный материал	22
	§ 5. Другие виды материала	24
Глава V.	Фиксация и фиксирующие средства	25
	§ 1. Простые фиксаторы	26
	§ 2. Формалиновые смеси	30
	§ 3. Жидкость Карнуа	33
	§ 4. Сулема и сулемовые фиксаторы	34
	§ 5. Хромовая кислота и ее соли	36
	§ 6. Пикриновая кислота и пикриновые фиксаторы	38
	§ 7. Четырехокись осмия и осмиевые фиксаторы	39
	§ 8. Сульфосалициловая кислота и ее фиксаторы	42
	§ 9. Трихлоруксусная кислота	42
	§ 10. Выбор фиксатора	43
Глава VI.	Техника приготовления гистохимических препаратов	44
	§ 1. Препараты из замороженных тканей	44
	§ 2. Препараты из материала, залитого в затвердевающие среды	52
Глава VII.	Принципы микроскопии гистохимических препаратов	64
	§ 1. Световая микроскопия	66
	§ 2. Поляризационная микроскопия	68
	§ 3. Люминесцентная (флуоресцентная) микроскопия	71
	§ 4. Фазово-контрастная микроскопия	75
	§ 5. Интерференционная микроскопия	76

	§ 6. Ультрафиолетовая микроскопия	77
	§ 7. Электронная микроскопия	80
Глава VIII.	Нуклеиновые кислоты	82
	§ 1. Выявление нуклеиновых кислот по методу Эйнарсона	86
	§ 2. Раздельное выявление ДНК и РНК смесью метилового зеленого с пиронином	87
	§ 3. Выявление нуклеиновых кислот акридиновым оранжевым (Пирс, 1962)	91
	§ 4. Выявление ДНК	92
Глава IX.	Белковые вещества	97
	§ 1. Выявление суммарных белков	99
	§ 2. Выявление основных и кислых белков	104
	§ 3. Выявление липопротеидов	105
	§ 4. Определение белковых функциональных групп	106
	§ 5. Гистохимическое изучение аминокислот	111
	§ 6. Приготовление контрольных препаратов	116
Глава X.	Липиды	118
	§ 1. Определение общих липидов	119
	§ 2. Определение связанных липидов	121
	§ 3. Выявление нейтральных и кислых липидов по Кайну	122
	§ 4. Исследование липидов в поляризованном свете по Г. А. Меркулову	124
	§ 5. Выявление нейтральных жиров	125
	§ 6. Стерины и стериды	127
	§ 7. Фосфатиды	128
	§ 8. Цереброзиды	133
	§ 9. Высшие жирные кислоты	135
	§ 10. Постановка гистохимического контроля	136
Глава XI.	Углеводы	137
	§ 1. Гистохимическое определение гликогена	139
	§ 2. Кислые мукополисахариды	144
	§ 3. Изучение углеводов на основе метакромазии	148
	§ 4. Постановка контролей при изучении полисахаридов	152
	§ 5. Схема дифференциации кислых мукополисахаридов	155
Глава XII.	Витамины	155
	§ 1. Витамин А (ретинол, аксерофтол)	156
	§ 2. Витамин В ₁ (тиамин, антинеурин)	157
	§ 3. Витамин В ₂ (рибофлавин, лактофлавин, овофлавин)	158
	§ 4. Витамин С (аскорбиновая кислота, антискорбутный, или антицинготный, витамин)	159

Глава XIII.	Гормоны	161
	§ 1. Гормоны коркового слоя надпочечников	162
	§ 2. Гормоны мозгового слоя надпочечников	163
	§ 3. Гормоны гипофиза	166
Глава XIV.	Ферменты	168
	§ 1. Класс оксидоредуктаз	170
	§ 2. Класс трансфераз	182
	§ 3. Класс гидролаз	184
	§ 4. Класс лиаз	200
Глава XV.	Минеральные вещества	203
	§ 1. Выявление кальция	204
	§ 2. Выявление магния	205
	§ 3. Выявление железа	206
	§ 4. Выявление меди	207
	§ 5. Выявление цинка	208
	§ 6. Выявление кобальта	208
	§ 7. Выявление свинца	209
	§ 8. Выявление мышьяка	210
	§ 9. Выявление стронция	211
	§ 10. Выявление ртути	211
	§ 11. Выявление калия	212
	§ 12. Выявление фосфатов	213
	§ 13. Выявление сульфатов	214
Глава XVI.	Изучение некоторых продуктов метаболизма	215
	§ 1. Мочевина	215
	§ 2. Мочевая кислота и ураты	216
	§ 3. Фенолы	218
	§ 4. Пигменты	219
Глава XVII.	Дополнительные методы исследования	225
	§ 1. Некоторые гистологические методы окраски	225
	§ 2. Автордиография	230
	§ 3. Иммуногистохимия	237
	§ 4. Микрофотография	241
Глава XVIII.	Растворы	252
	§ 1. Способы выражения концентрации растворов	252
	§ 2. Буферные растворы	254
	§ 3. Разбавление спиртов	260
Глава XIX.	Биометрическая обработка материала	261
	Приложения	267
	Литература	274

147207

ADTI
AXB-BESURS MARKAZI
№ 1984

БИБЛИОТЕКА
Государственного
медицинского института
гор. Андижан

КОНОНСКИЙ АЛЕКСЕЙ ИВАНОВИЧ

ГИСТОХИМИЯ

Допущено Министерством высшего и среднего специального образования УССР в качестве учебного пособия для студентов биологических специальностей вузов

Издательское объединение «Вища школа»
Головное издательство

Редактор *Н. Д. Рогоза*

Литредактор *А. П. Ковальчук*

Художественный редактор *Е. Н. Прокофьев*

Технический редактор *Т. И. Мазюк*

Корректор *Е. Ф. Самойленко*

Сдано в набор 16. 07. 1975 г. Подписано к печати 21. 01. 1976 г.
Формат бумаги 60×90^{1/16}. Бумага тип. № 2. Печ. л. 17,5+0,5 цв.
вкл. Уч.-изд. л. 20,06. Тираж 8000. Изд. № 2159. БФ 15815. Цена
1 руб. Зак. № 278.

Головное издательство издательского объединения «Вища школа», 252054, Киев, 54, Гоголевская, 7.

Белоцерковская книжная фабрика республиканского производственного объединения «Поліграфкнига» Государственного комитета Совета Министров УССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли, ул. К. Маркса, 4.

Издательское объединение «Вища школа»

для студентов технологических вузов

**готовит к выпуску
новое учебное пособие:**

Дудкин М. С. Введение в химию углеводов. Язык русский; 11 л., 40 коп., 1976 г.

В пособии даны классификация и номенклатура углеводов, рассмотрены их строение, физические и химические свойства, характерные реакции; освещены вопросы биосинтеза углеводов; описаны отдельные представители этого класса соединений, их производство и применение. Пособие содержит также описание лабораторных работ по малому практикуму и синтезу на основе углеводов, анализу углеводов методом хроматографии.

Уважаемые читатели!

Заказы на эту книгу направляйте в магазины местных книготоргов, потребсоюзов, магазины «Книга — почтой», а также Головному издательству издательского объединения «Вища школа» (252054, Киев-54, ул. Гоголевская, 7).