Гистохимические методы определения ферментов в тканях

Ферменты можно изучать с помощью как химических, так и гистохимических методов. Последние позволяют исследовать ферменты в нормальных и патологически измененных органах, тканях и клетках, не прибегая к предварительному разрушению (напр., гомогенизации) исследуемого объекта. Гистохимия ферментов служит связующим звеном между их морфологией и биохимией.

Ферменты катализирует метаболические реакции, преобразуя субстрат. Именно на этом основано большинство гистохимических методов выявления ферментов. Другой подход основан на белковой природе ферментов и базируется на иммуно-гистохимических методах. Существуют и авторадиографические методы выявления ферментов, связанные с использованием специфических меченых ингибиторов. При гистохимическом выявлении ферментов важно получить и сделать видимым продукт ферментативной реакции в месте локализации ферментов. При этом структура тканей и клеток должна быть достаточно хорошо сохранена, что необходимо для установления точной локализации ферментов и оценки ферментативной активности, особенно при электронно-микроскопическом исследовании.

При гистохимическом определении ферментов следует как можно более точно соблюдать следующие требования. Подготовка тканей и срезов не должна влиять на распределение и активность исследуемого фермента. Субстрат и вспомогательные реагенты инкубационной среды должны проникать во все клетки и их компоненты с одинаковой скоростью и не препятствовать проявлению ферментативной активности. Необходимо, чтобы субстрат по возможности расщеплялся только одним ферментом, а продукт ферментативной реакции вспомогательные реагенты улавливали очень быстро и независимо от окружающей клетку среды. Требуется, чтобы конечный продукт реакции моментально осаждался и был практически нерастворимым в водных растворах и липидах, имел аморфное или микрокристаллическое строение и оставался стабильным. Вещества, участвующие в реакции, не должны связываться или адсорбироваться с какими-либо структурами, помимо ферментативно активных. Обычно все эти требования удовлетворить довольно трудно, поэтому для каждой гистохимической реакции подбирают компромиссное сочетание требуемых условий.

Гистохимические методы выявления ферментов, связанные с их действием на субстрат, основаны на нескольких типах реакций.

Реакции осаждения включают несколько вариантов. Осаждение продукта ферментативного расщепления субстрата ионами металлов с последующим проявлением образующегося комплекса в виде окрашенного продукта реакции в месте локализации ферментов используется при выявлении фосфатаз, сульфатаз, холинэстеразы; метод одновременного сочетания, при к-ром продукт ферментативного расщепления субстрата вступает в реакцию с сочетающим агентом с образованием нерастворимого красителя, применяется при выявлении фосфатаз, гликозидаз, карбоксилэстераз и пептид-гидролаз; эти же ферменты выявляются с помощью индигогенных методов, при которых в результате реакций расщепления и осаждения образуется синее индиго. Тетразолиевые методы, основанные на образовании формазанов в результате ферментативного окисления субстрата и восстановления соли тетразолия (см. [Тетразолия соли](https://xn--90aw5c.xn--c1avg/index.php/%D0%A2%D0%95%D0%A2%D0%A0%D0%90%D0%97%D0%9E%D0%9B%D0%98%D0%AF_%D0%A1%D0%9E%D0%9B%D0%98" \o "ТЕТРАЗОЛИЯ СОЛИ)), используются для выявления оксидоредуктаз, гексокиназы, альдолазы и других ферментов.

Реакции последовательного сочетания проводят в две стадии: в одной среде идет ферментативное расщепление субстрата с образованием нерастворимого продукта, в другой — реакция сочетания этого продукта для его визуализации с соответствующим агентом; эти реакции применяют при выявлении фосфатаз (см.) гликозидаз и других ферментов.

Реакции синтеза, используемые при выявлении некоторых трансфераз, протекают в две стадии и включают синтез из растворимого субстрата нерастворимого вещества, к-рое делается видимым с помощью другой, специальной реакции.

Реакции с использованием субстратной пленки, содержащей субстрат или состоящей из него, заключаются в том, что на пленку накладывают срез, фермент расщепляет соответствующий субстрат, после чего субстрат окрашивают, места локализации фермента при этом остаются неокрашенными. Этот метод служит для выявления протеаз (см. Пептид-гидролазы), нуклеаз (см.), амилаз (см.).

С помощью гистохимических методов получают информацию о локализации и активности ферментов в тканевых срезах. Однако во время подготовки срезов ферментативная активность может значительно снижаться. Кроме того, в процессе фиксации частично или полностью отмываются или диффундируют из ткани в инкубационную среду те ферменты, которые непрочно прикреплены к мембранным структурам, следовательно, с помощью обычных гистохимических методов можно обнаруживать только ферменты, прочно связанные с клеточными структурами или вторично иммобилизованные в результате фиксации ткани. Для гистохимического выявления растворимых ферментов существуют специальные методы, основанные на иммобилизации ферментов в месте их локализации.

Главная цель гистохимических методов обнаружения ферментов — прежде всего установление места их точной локализации, при этом не столь важно, что иногда не соблюдаются оптимальные условия для протекания ферментативных реакций, например, при избранной концентрации субстрата не обеспечивается кинетика реакций нулевого порядка или реакцию приходится проводить при неоптимальных значениях pH и др. Однако при количественных гистохимических исследованиях необходимо не только точно установить локализацию разных ферментов, но и определить различия в их активности, поэтому в данном случае концентрация субстрата, толщина срезов, время инкубации имеют решающее значение. Количественные измерения в процессе гистохимических исследований ферментов возможно производить при наличии инкубационных сред, позволяющих обнаруживать истинные локальные различия в степени активности ферментов без существенных ее потерь. Эти измерения проводят с помощью цитофотометрии (см.), микроденситометрии (см. [Денситометрия](https://xn--90aw5c.xn--c1avg/index.php/%D0%94%D0%95%D0%9D%D0%A1%D0%98%D0%A2%D0%9E%D0%9C%D0%95%D0%A2%D0%A0%D0%98%D0%AF)), интерференционной микроскопии (см. Микроскопические методы исследования) и других способов. Мерой ферментативной активности может служить точное время инкубации, необходимое для образования микроскопически регистрируемого продукта реакции в определенных сравниваемых участках среза, а также другие параметры, например, степень поглощения проходящего света определенной длины волны и др.

Процедура гистохимического выявления ферментов состоит из ряда этапов: взятия сфобы, последующей обработки, инкубации. После взятия пробы ткань следует обрабатывать с максимальной быстротой, так как в результате аутолитических процессов с течением времени локализация и активность ферментов изменяются. Объем и количество материала определяются задачами исследования, характером подготовки, видом органа.

Этапы дальнейшей обработки зависят от изучаемого фермента, задачи исследования, метода выявления. Ферменты, чувствительные к фиксации (большинство дегидрогеназ, трансферазы, цитохромоксидаза, лиазы), лучше изучать на нефиксированных тканях. Другие ферменты (тетразолий-редуктазы, многие гидролазы, некоторые пероксидазы) проявляют относительную устойчивость при фиксации и, следовательно, могут быть обнаружены в фиксированном материале. Многие ферменты растворимы, поэтому должны быть приняты меры против их перехода в инкубационный раствор. С этой целью используют гелевые среды или полупроницаемые мембраны, которые действуют как диффузионный барьер.

Задачи исследования и выбранный метод определяют особенности последующей обработки. При использовании нефиксированной ткани для получения срезов ее предварительно замораживают. В результате замораживания мгновенно прекращаются метаболические процессы, аутолиз, диффузия ферментов и др. Замораживание необходимо проводить очень быстро и при низких температурах (не выше — 70°), чтобы избежать образования кристаллов льда, разрушающих клетки. Для замораживания используют жидкую углекислоту (диоксид углерода), жидкий азот, пропан, охлажденный жидким азотом, петролейный эфир, гексан или гептан, охлажденные смесью ацетона и сухого льда. Срезы из замороженной нефиксированной ткани следует делать в криостате, а затем помещать на предметные или покровные стекла или на полупроницаемые мембраны. Методы замораживания — высушивания и замещения в замороженном состоянии тканевых блоков технически достаточно сложны, требуют много времени и в ряде случаев дают худшие результаты, чем замораживание — высушивание криостатных срезов. Последнее обеспечивает сохранность структур и возможность выявления практически всех ферментов, доступных определению гистохимическими методами.

Фиксацию применяют преимущественно при исследовании внутриклеточной локализации ферментов. С этой целью обычно используют альдегиды (см.) и их смеси, фиксацию ткани проводят как в блоках, так и в срезах. Фиксация в ацетоне с последующей заливкой в парафин пли целлоидин не рекомендуется. При фиксации в формальдегиде или глутаральдегиде, используемых наиболее часто, результаты (ферментативная активность, сохранность морфологической структуры) зависят от концентрации и чистоты альдегида, типа растворителя, величины pH, времени фиксации, температуры. Раствор формальдегида следует готовить из параформальдегида без добавления муравьиной кислоты и метанола, имеющихся в коммерческом формальдегиде. Раствор глутаральдегида необходимо периодически очищать от примесей, например, путем фильтрации через животный уголь. Чувствительность различных ферментов к фиксации колеблется в широких пределах, и это необходимо учитывать в каждом конкретном случае. Для повышения остаточной активности ферментов ткань после фиксации следует тщательно промыть. Эта процедура повышает остаточную активность фермента в 2 — 3 раза. Для промывания используют проточную или дистиллированную воду, различные буферные растворы, физиологический раствор, раствор сахарозы. Отдельные ферменты по-разному выдерживают промывание: активность некоторых из них возрастает с увеличением времени промывания (таковы кислая фосфатаза, арилсульфатаза, НАДН-тетразолий-редуктаза), в этих случаях ткань можно хранить в промывочной жидкости при 4° по меньшей мере 1 неделю. Активность других ферментов возрастает только в начале промывания, а при его продолжении снижается (напр., у щелочной фосфатазы, АТФ-азы). Методика замораживания фиксированных тканевых блоков для получения срезов в криостате или (реже) на замораживающем микротоме в принципе не отличается от методики замораживания нефиксированной ткани, за исключением того, что скорость замораживания фиксированных тканевых блоков не имеет существенного значения. Температура замораживания колеблется от —10° до —30 в зависимости от вида жидкости, использованной для промывания. Склонность срезов некоторых органов с гетерогенной структурой (кожа, селезенка и др.) к распаду можно предотвратить предварительным пропитыванием тканевых блоков после промывания глицерин-желатиной.

В блоках ткани, залитых в парафин, при соблюдении ряда условий, можно параллельно с получением постоянно окрашенных гистологических препаратов выявить некоторые ферменты: щелочную фосфатазу, пептидгидролазы, глюкамилазы в щеточной каемке; эстеразы в эндоплазматическом ретикулуме и лизосомах; p-N-ацетилглюкозаминидазу, Р-глюкуронидазу в клетках с высокой физиологической активностью.

Ответственными этапами гистохимической идентификации ферментов являются инкубация, заключающаяся в выдерживании срезов в среде, содержащей субстрат и вспомогательные реагенты, и приготовление препарата, пригодного для микроскопического исследования. Инкубацию проводят, как правило, при 37°. Ткани с высокой ферментативной активностью следует инкубировать при комнатной температуре во избежание избыточного образования продукта реакции и его диффузии. Гистохимическое выявление растворимых ферментов также проводят при комнатной температуре. Иногда требуется инкубация при 4°, особенно при выявлении кислых гидролаз, пептид-гидролаз, лактазы, что снижает неспецифическую фоновую окраску. При инкубации используют свободноплавающие срезы либо срезы, прикрепленные к предметному или покровному стеклу, в случае необходимости срезы могут быть помещены на полупроницаемые мембраны. Как правило, инкубацию продолжают до получения удовлетворительной положительной реакции в исследуемых клетках и тканях. Этот момент легко определить при применении методик прямого выявления ферментов (метод одновременного сочетания, индигогенные и тетразолиевые методы). При использовании методов непрямого выявления ферментов (методы с применением солей металлов, последовательного сочетания, реакции синтеза, большинство методов с субстратными пленками) развитие реакции не поддается визуальному контролю. в этих случаях нужно инкубировать одновременно несколько срезов и проявлять их через различные интервалы времени.

Общие принципы гистохимических выявления ферментов с помощью светового микроскопа, изложенные выше, лежат в основе многочисленных методов и электронно-микроскопического обнаружения ферментов (см. Электронная микроскопия). Особенность электронно-микроскопического выявления ферментов заключается в необходимости получения продукта гистохимической реакции, непроницаемого или мало проницаемого для электронов, что дает электронно-плотный осадок. Если сразу образуется нерастворимый продукт реакции, то в случае его достаточной электронной плотности он может непосредственно служить ультраструктурным маркером места нахождения ферментов, в противном случае приходится путем специальной обработки с использованием осмиофильных реагентов переводить продукт реакции в электронно-плотное соединение. Однако чаще инкубационная среда содержит прецииитирующий металлический реагент, посредством к-рого продукт ферментативного расщепления тотчас же превращается в выпадающую в осадок соль металла, хорошо видимую при ультраструктурном исследовании благодаря высокой электронной плотности.

Подробно методы гистохимического выявления ферментов — см. статьи, посвященные отдельным ферментам и их группам, например. [Дегидрогеназы](https://xn--90aw5c.xn--c1avg/index.php/%D0%94%D0%95%D0%93%D0%98%D0%94%D0%A0%D0%9E%D0%93%D0%95%D0%9D%D0%90%D0%97%D0%AB" \o "ДЕГИДРОГЕНАЗЫ), [Лактатдегидрогеназа](https://xn--90aw5c.xn--c1avg/index.php/%D0%9B%D0%90%D0%9A%D0%A2%D0%90%D0%A2%D0%94%D0%95%D0%93%D0%98%D0%94%D0%A0%D0%9E%D0%93%D0%95%D0%9D%D0%90%D0%97%D0%90" \o "ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА), [Липазы](https://xn--90aw5c.xn--c1avg/index.php/%D0%9B%D0%98%D0%9F%D0%90%D0%97%D0%AB) и др.

Ферменты в судебно-медицинском отношении

Качественные и количественные исследования ферментов нашли широкое применение в судебной медицине при проведении научных исследований, а также в экспертной практике. В наиболее полной мере это относится к дифференцированному определению общей и тканеспецифической активности ферментов, а в ряде случаев и количества ферментных белков (цитохромы Р-450 и Р-420) для судебно-медицинского установления срока давности наступления смерти. При этом применяют как определение активности одного какого-то фермента в органах, для которых характерны различные сроки переживания прекращения сердечной деятельности, так и комплексное исследование одного органа, ткани или жидкой среды человеческого организма с определением в них активности разных ферментов. Исследование динамики активности лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфат — дегидрогеназы, кислой и щелочной фосфатаз, [катепсинов](https://xn--90aw5c.xn--c1avg/index.php/%D0%9A%D0%90%D0%A2%D0%95%D0%9F%D0%A1%D0%98%D0%9D%D0%AB" \o "КАТЕПСИНЫ) (см.), холинэстеразной и цитохромоксидазной активности в сочетании с другими методами исследования позволяют довольно точно ответить на вопрос о времени наступления смерти, если срок давности наступления смерти не превышает 48 час. Определение активности и количественная оценка содержания ферментов нашли применение также и при диагностике факта прижизненного происхождения и давности причинения механических повреждений мягких тканей и внутренних органов.

Широкое использование в экспертной практике нашел метод экспресс-диагностики отравления фосфорорганическими соединениями (см.), основанный на определении активности холинэстеразы (см.) в сыворотке крови, так как активность этого фермента резко снижается вплоть до полного исчезновения при отравлении этими соединениями.

Исследования ферментов применяют и при решении некоторых вопросов идентификации личности (см.). В частности, определение изоферментного спектра кислой фосфатазы эритроцитов, фосфатдегидрогеназы, лейцинаминопеитидазы, установление фенотипа холинэстеразы, фосфо-глюкомутазы, аденилаткиназы применяют при исследовании пятен крови для исключения возможного ее происхождения от конкретного подозреваемого, обвиняемого или другого лица.

Исследование изоферментного состава ЛДГ (обнаружение изоферментов ЛДГ, специфичных для семенной жидкости, даже в тех случаях, когда сперматозоиды отсутствуют), определение активности кислой фосфатазы, очень высокой в сперме, применяют для доказательства спермального происхождения пятен.

Определение фенотипа лейцин-аминопептидазы, в частности обнаружение появляющейся начиная с 8—10-й недели беременности и сохраняющейся до 3 недель после родов добавочной фракции этого фермента, применяют для диагностики беременности и бывших родов при исследовании жидкой крови и ее пятен.