

ОСНОВЫ ГИСТОХИМИИ

Раздел 4. Типы гистохимических реакций

СОДЕРЖАНИЕ

(используйте гипертекст)

[Глава 1. Общая классификация методов гистохимии](#)

[Глава 2. Гистохимические реакции](#)

[2.1. Красители, поглощающие свет в видимой области спектра](#)

[2.1.1. Окраска общих белков амидочерным 10В](#)

[2.1.2. Выявление суммарных белков с использованием бромфенолового синего](#)

[2.1.3. Окраска нуклеиновых кислот хромовым крапплаком галлоцианина \(метод Эйнарсона\)](#)

[2.1.4. Окраска ДНК и РНК смесью метиловый зеленый – пиронин](#)

[2.1.5. Окраска липидов жирорастворимыми красителями](#)

[2.1.5.1. Суданы](#)

[2.1.6. Окраска липидов нильским голубым](#)

[2.2. Флуоресцентные красители](#)

[2.2.1. Акридиновый оранжевый](#)

[2.2.2. Другие флуорохромы](#)

[2.3. Реакции с переходом лейкоформ красителей в хромоформную форму](#)

[2.3.1. Реакция Фельгена](#)

[2.3.2. Реакция Шифф-иодная кислота \(Реакция ШИК\)](#)

[2.3.3. Реакция с Шифф-надуксусной \(надмуравьиной\) кислотой](#)

[2.4. Реакции, в результате которых непосредственно в срезах тканей образуются красители в местах локализации исследуемых соединений](#)

[2.5. Реакции с ионами тяжелых металлов](#)

[2.6. Реакции с использованием окислительно-восстановительных индикаторов](#)

[2.7. Реакции с образованием продуктов, доступных для визуального микроскопического и микроспектрального](#)

анализа

Контрольные вопросы

Рекомендуемая литература

Глава 3. Комплексные гистохимические технологии

3.1. Иммуногистохимия (иммуноцитохимия)

3.2. Метод гибридизации мРНК in situ

3.2.1. Основные процедуры метода. Типы зондов

3.2.2. Метка зондов

3.2.3. Условия гибридизации

3.2.4. Контрольные процедуры

3.2.5. Ограничения метода

3.2.6. Использование метода гибридизации in situ

Контрольные вопросы

Рекомендуемая литература

Глава 4. Физические методы в гистохимии

4.1. Введение

4.2. Ультрафиолетовая микроскопия (поглощение)

4.3. Ультрафиолетовая микроскопия (флуоресценция)

4.4. Заключение

Контрольные вопросы

Рекомендуемая литература

Глава 1. Общая классификация методов гистохимии

Можно рассмотреть следующую классификацию гистохимических реакций и гистохимических технологий, в которых используются красители, аналитические химические реакции, методы иммунологии и молекулярной биологии, адаптированные к гистохимическому анализу, и прямое использование физико-оптических методов и методов радиоавтографического анализа тканевых срезов:

I. Гистохимические реакции с использованием красителей и химических реакций:

- а) *Прямое взаимодействие красителей* с внутриклеточными и внутритканевыми химическими соединениями:
 - Использование красителей поглощающих свет в видимой области спектра;
 - Флуоресцентные красители;
- б) Реакции с *переходом лейкоформы красителя в хромоформную форму* при взаимодействии с анализируемым соединением;
- в) Реакции, в результате которых непосредственно в срезах ткани *образуются красители в местах локализации исследуемых субстратов*;
- г) *Комплексообразование* субстратов *с ионами тяжелых металлов* и последующее осаждение их в виде окрашенных солей;
- д) Реакции с использованием *окислительно-восстановительных индикаторов*;

е) Реакции химических соединений с эндогенными субстратами, в ходе которых *образуются продукты, доступные для визуального микроскопического анализа* и микроспектрального количественного изучения.

II. Комплексные гистохимические технологии:

- а) Использование иммунологических реакций в цито- и гистохимии (*иммуноцитохимия и иммуногистохимия*);
- б) Использование методов молекулярной биологии в гистохимии (*метод гибридизации мРНК in situ*);
- в) Использование реагентов, меченных радиоактивными изотопами (*гисторадиоавтография*).

III. Физические методы в гистохимии:

- а) *Ультрафиолетовая микроскопия*;
- б) *Интерференционная и поляризационная микроскопия*;
- в) *Микроспектрофотометрия*.

IV. Методы динамической гистохимии:

- а) Методы *суправитальной гистохимии*;
- б) Гистохимическая *кинетика ферментативных реакций*.

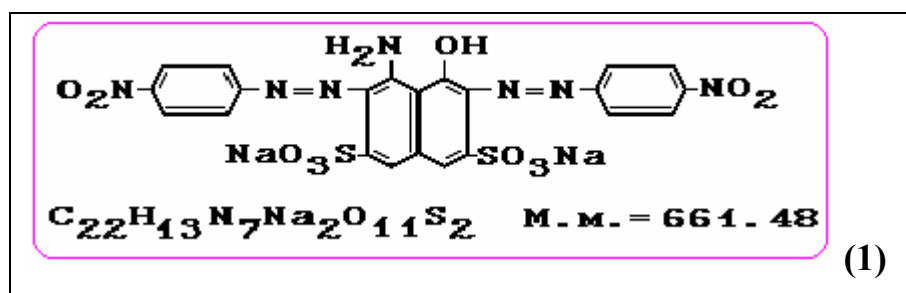
В кратком обзоре невозможно рассмотреть принципы и методики реализации всех подходов, приведенных в данной классификации, однако, главные направления современной гистохимии будут рассмотрены.

Глава 2. Гистохимические реакции

2.1. Красители поглощающие свет в видимой области спектра

2.1.1. Окраска общих белков амидочерным 10В

Краситель амидочерный 10В (1) применяется для окраски белковых полос при электрофоретическом разделении белков. Краситель имеет сложную структуру и относится к диазокрасителям:



Механизм реакции амидо-черного 10В с белками до конца не исследован. Считается, что при взаимодействии красителя с белками возможно образование ионной химической связи и физической адсорбции. Ионные связи могут образовываться между кислыми группами молекулы красителя и основными группировками белков (аминогруппы лизина, гуанидиновая группа аргинина, имидазольное кольцо гистидина). Различные белки могут связывать разное количество красителя, что, по-видимому, приводит к широкому спектру окраски комплекса белок-краситель (от черного до красного цвета).

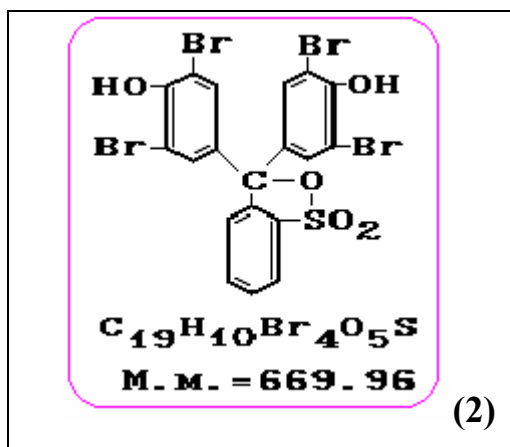
Обычно гистохимические реакции этого типа реализуются достаточно просто: инкубацией среза ткани в растворе красителя и отмывкой не связавшегося красителя растворителем ("дифференцировка" окраски). В случае окраски общих белков амидо-черным 10В допускается фиксация ткани в 10% растворе формалина, фиксаторе Карнуа, использование срезов свежемороженой ткани, или срезов, приготовленных из ткани залитой в парафин.

В практике используется 0,02% раствор амидо-черного 10В в смеси ледяной уксусной кислоты и метилового спирта (1:9 по объему).

Окраска в растворе красителя продолжается в течение 2-10 мин, затем проводится отмывка ("дифференцировка") в 1% растворе уксусной кислоты. Окраска белков амидо-черным 10В устойчива к спиртам, поэтому возможно обезвоживание окрашенных срезов в серии спиртов восходящей концентрации, проведение через ксилол и заключение в канадский бальзам или полистерол.

2.1.2. Выявление суммарных белков с использованием бромфенолового синего

Бромфеноловый синий (2) является кислотнo-основным индикатором, относящимся к группе арилметановых красителей (производные трифенилметана):



Показано, что в срезах ткани количество связанного бромфенолового синего пропорционально содержанию в них белков, что очень важно для количественного фотометрического анализа содержания белков в тканях. Химические реакции между бромфеноловым синим и белками изучены мало. Можно предположить, что появление в молекуле красителя, который является лейкоформой ауксохромных групп, в частности, аминогруппы белков может быть причиной перехода лейкоформы в окрашенную форму комплекса краситель+белок.

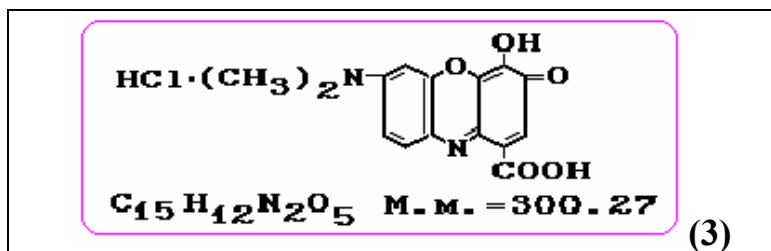
Раствор бромфенолового синего в воде или спирте имеет желтую окраску, но в разбавленных растворах щелочей и аммиака дает раствор синего цвета.

Так как бромфеноловый синий плохо растворим в воде для приготовления рабочих растворов красителя используются спиртовые растворы. Реакция окрашивания белков при помощи бромфенолового синего проводится в присутствии сулемы. По-видимому, для реакции окрашивания необходимо блокирование сульфгидрильных групп белков.

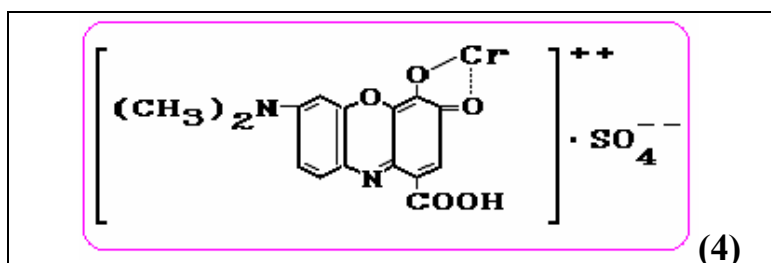
Окраска срезов бромфеноловым синим возможна после фиксации материала в 10% растворе формалина, жидкости Карнуа, но можно использовать срезы из свежемороженой ткани или из образцов ткани, залитых в парафин.

2.1.3. Окраска нуклеиновых кислот хромовым краплагом галлоцианина (метод Эйнарсона)

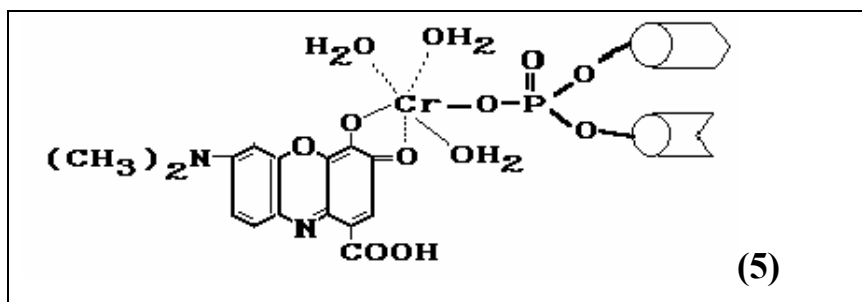
Теоретическое обоснование метода дано Л.Эйнарсонем в 1951 году. Галлоцианин (3) - оксазиновый краситель. Солянокислый галлоцианин имеет следующую структуру:



Галлоцианин хорошо растворим в воде и при кипячении с хромокалиевыми квасцами образуется хромовый крапплак галлоцианина (4):



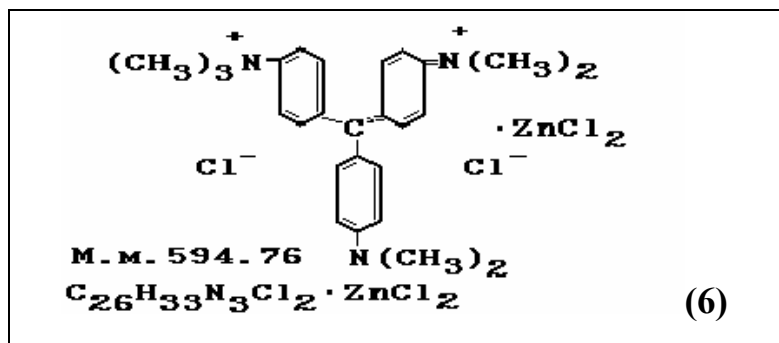
Хромовый крапплак галлоцианина взаимодействует с остатками фосфорной кислоты молекулы ДНК (5):



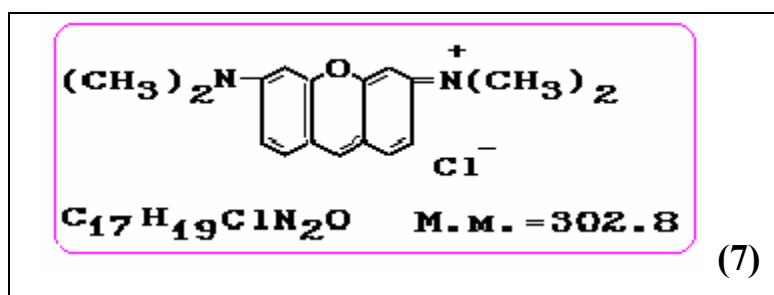
Считается, что каждая фосфатная группа нуклеотида связывается с одной молекулой красителя, в связи с этим метод с галлоцианином может использоваться для количественного цитофотометрического анализа.

2.1.4. Окраска ДНК и РНК смесью метиловый зеленый – пиронин

Метиловый зеленый (6) является арилметановым красителем:

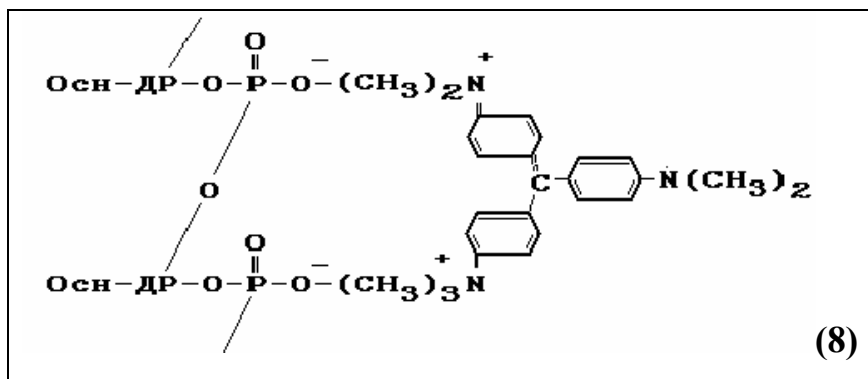


Пиронин (7) входит в группу ксантеновых красителей:

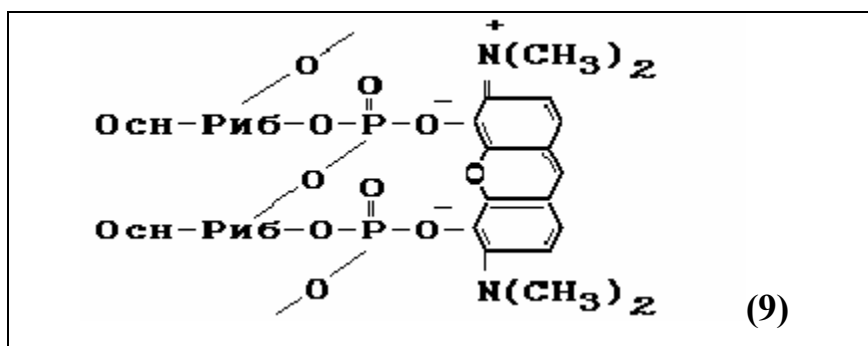


Первые работы по выявлению нуклеиновых кислот, при помощи смеси двух красителей: пиронина G и метилового зеленого, были проведены А.Паппенгеймом в конце XIX века. В 1942 году Ж.Браше разработал специальный метод с использованием этих красителей для выявления нуклеиновых кислот и активно использовал его для гистохимического изучения клеток животных. В этих ранних работах метод использовался как эмпирический и механизм взаимодействия красителей с нуклеиновыми кислотами был неизвестен. Считалось, что метиловый зеленый связывается с сильно полимеризованной нуклеиновой кислотой – ДНК, в то время как пиронин с менее полимеризованной нуклеиновой кислотой – РНК. Такое предположение основывалось на том наблюдении, что при деполимеризации, ДНК начинает окрашиваться пиронином. Метиловый зеленый относится к основным красителям трифенилметанового ряда и имеет две заряженные метилированные аминогруппы, которые являются реакционно-активными. Детальные исследования В.Г.Конарева (1966) показали, что именно эта группа

красителя взаимодействует с ДНК с образованием комплекса следующего вида (8):



Аналогичный комплекс с РНК образует пиронин G (9):



Максимумы поглощения красителя лежат в области 548,3 и 509,6 нм и при взаимодействии красителя с РНК образуется комплекс красного цвета. На основе флуориметрических и спектральных данных В.Г.Конарев делает вывод, что пиронин вступает во взаимодействие со свободной или слабо связанной с белками РНК, образуя окрашенное комплексное соединение.

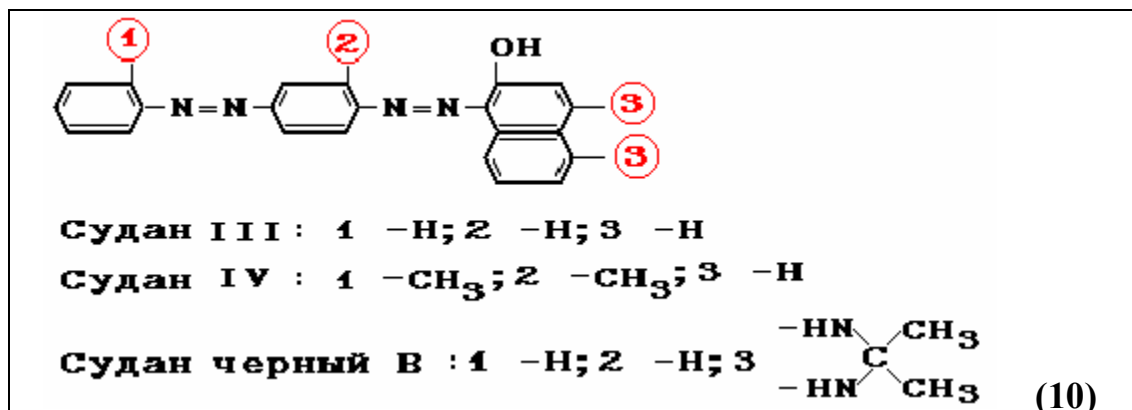
2.1.5. Окраска липидов жирорастворимыми красителями

Одним из гистохимических методов обнаружения липидов в клетках и тканях является их окраска при помощи специальных красителей ("жировые красители"). Главная особенность этих красителей заключается в их жирорастворимости, в связи с чем, окрашивание липидов представляет собой обычный процесс растворения красителя в липидсодержащих

структурах клеток и тканей. Таким образом, процесс окрашивания липидов носит чисто физический, а не химический характер. В связи с этим, избирательное окрашивание отдельных липидов разного химического состава при помощи таких красителей невозможно. Для этой цели можно использовать методы экстракции отдельных групп липидов разными системами растворителей перед проведением гистохимической реакции.

2.1.5.1. Суданы

Для «физического» окрашивания липидов широко используется группа красителей известных под названием "Суданы" (Судан черный В, Судан III, Судан IV и др.). Это азо- или диазокрасители, имеющие следующие химические структуры (10):



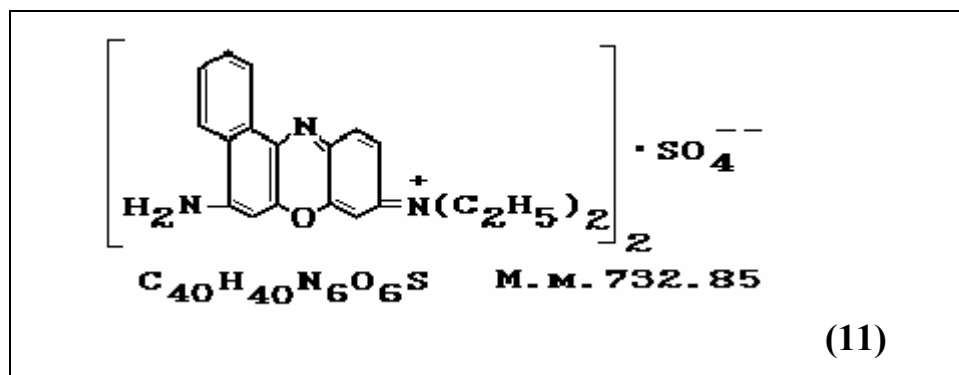
Указанные красители не растворимы в воде, но растворимы в органических растворителях. Для проведения гистохимического окрашивания обычно используются в качестве растворителей спирты, смесь Герксхаймера (равные части 70% этанола и ацетона) и др. Выбор растворителя Суданов имеет очень большое значение, т.к. растворитель не должен экстрагировать клеточные липиды. Экстракция липидов полностью предотвращается при использовании коллоидных растворов, например, раствора Джексона (С. Jackson) - этанол-фенол-уксусная кислота или Говена (A.D.T. Govan) - уксусная кислота-желатина.

В конечном итоге процесс гистохимического окрашивания липидов при помощи жирорастворимых красителей заключается в том, что их растворимость выше в липидах, чем в исходных органических растворителях. Поэтому при использовании этих красителей происходит просто переход их в липидные компоненты клеток.

2.1.6. Окраска липидов нильским голубым

В случае использования нильского голубого (нильский синий А сульфат) происходит сложное взаимодействие с липидами. Нильский голубой А относится к ряду основных оксазиновых красителей и состоит, согласно А.И.Кононскому, из трех компонентов:

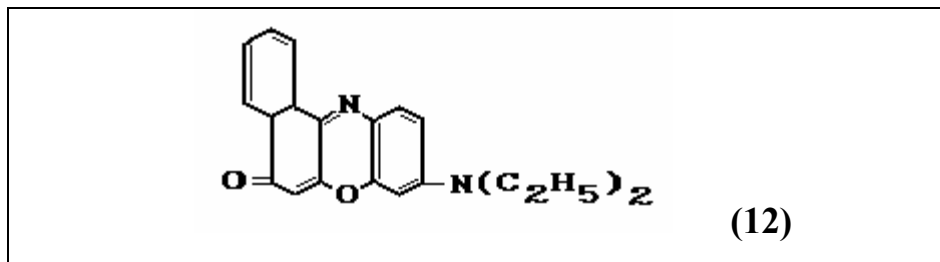
- **оксазин-сульфат** (11) - краситель синего цвета, не растворимый в нейтральных жирах и растворимый в воде и этаноле:



Этот компонент легко взаимодействует с жирными кислотами.

- Второй компонент - **свободное основание оксазина Нильского голубого**, вещество красного цвета, не растворимое в воде и растворимое в жирах. Окрашивает нейтральные жиры как обычный жирорастворимый краситель.

- Третий компонент - **оксазон-дериват** (12), вещество красного цвета (Нильский красный по Лизону), практически совсем не растворим в жирах.



Кислые липиды растворяют 2 и 3 красные компоненты и вступают в химические реакции, образуя соли, прежде всего с компонентом 1 и компонентом 2, окрашиваясь в голубые и синие тона. В результате такого сложного взаимодействия появляется возможность получить окрашивание отдельных видов липидов.

При окрашивании липидов по методу А.Кайна происходит следующая реакция между липидами и Нильским голубым. Используются две концентрации красителя: 1.0 % - раствор и 0.02 % - раствор. В более разбавленном растворе Нильского голубого происходит более сильная диссоциация оксазинсульфата, освобождение значительного количества оксазина и, таким образом, усиливается его взаимодействие с липидами.

Процедура окраски выглядит следующим образом: контрольные срезы окрашивают раствором Судана черного В - происходит реакция на суммарные липиды; первые параллельные срезы окрашивают 1.0 % раствором Нильского голубого - жирные кислоты и их соли окрашиваются в темно-синий цвет, фосфатиды и цереброзиды - в голубой цвет; в 0.02 % растворе окрашиваются вторые параллельные срезы. В этом случае нейтральные липиды (жиры, холестерин - эфиры, стероиды, высшие спирты) окрашиваются в красный цвет, а кислые липиды окрашиваются в голубой или синий цвет.

Таким образом, Нильский голубой можно рассматривать как смесь жирорастворимых красителей и основного красителя, а взаимодействие его компонентов с липидами и жирными кислотами можно отнести к

комплексному физическому и химическому взаимодействию с липидными соединениями.

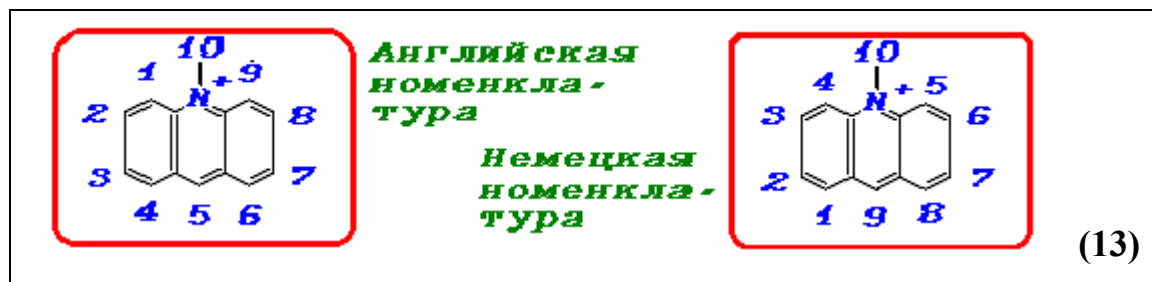
2.2. Флуоресцентные красители

2.2.1. Акридиновый оранжевый

Детальное описание использования флуоресцентного красителя - акридинового оранжевого для изучения нуклеиновых кислот также, как принципы, методы и приборная реализация флуоресцентного спектрального анализа клеток, дано в монографиях А.В.Зеленина (1967) и В.Н.Карнаухова (1978).

Необходимо отметить, что флуоресцентная микроскопия в настоящее время нашла широкое и разнообразное применение в гистохимии. Метод с акридиновым оранжевым относится к типичной группе классических методов, в которых используются специальные красители - флуорохромы. Характерной особенностью акридинового оранжевого является его способность существовать в растворе как в мономерной, так и в димерной форме с соответствующими максимумами флуоресценции в области 530 нм и 640 нм. Соотношение содержания этих форм акридинового оранжевого в растворе зависит от концентрации красителя.

Акридиновый оранжевый и другие флуорохромы акридинового ряда являются производными акридина. Известны английский и немецкий варианты номенклатуры акридиновых красителей (13), зависящие от порядка нумерации углеродных атомов в молекуле флуорохромов:



В ряду акридиновых флуорохромов наибольший интерес представляют акридиновый оранжевый, акридиновый желтый, профлавин, корифосфин, ауорофосфин В, ауорофосфин, акрифловин, эухризин 2GNX и др.

Структура некоторых флуорохромов акридинового ряда (14) представлена в таблице:



(14)

Метахроматичность флуоресценции акридинового оранжевого при окраске гистологических препаратов впервые обнаружена независимо С.Штруггером и Ф.Букачем и М.Хайтингером в 1940 году, а в работах М.Н.Мейсея в 1951-1952 годах. Было показано, что эта метахроматичность обусловлена взаимодействием акридинового оранжевого с нуклеиновыми кислотами. При обработке фиксированных клеток акридиновым оранжевым при $pH = 4 - 5$, мономер красителя связывается с двухспиральными (максимум флуоресценции 530 нм), а димер с односпиральными нуклеиновыми кислотами (максимум флуоресценции 640 нм).

Помимо двухспиральных нуклеиновых кислот, комплексы с мономером красителя могут образовывать и белки. Однако при $pH = 4 - 4.6$ вклад комплекса белок+мономер акридинового оранжевого в флуоресценцию с максимумом 530 нм чрезвычайно мал. По данным Р.Риглера (1966) при $pH =$

4.1 98% комплекса акридинового оранжевого с белками образовано электростатическим взаимодействием красителя с отрицательно заряженными группами белков. Существуют ряд способов контроля этого процесса. Например, предварительная обработка тканевых и клеточных препаратов красителем, прочно связывающимся с отрицательно заряженными полярными группами белков. Необходимо учитывать, что димеры красителя могут образовывать комплексы с мукополисахаридами при $pH = 2$.

Количественное соотношение концентрации одно- и двухспиральных нуклеиновых кислот можно выразить при помощи специального коэффициента α (впервые предложен Р.Риглером), который равен отношению интенсивности флуоресценции димера красителя (λ_d) к интенсивности флуоресценции мономера красителя (λ_m).

Используя этот параметр - коэффициент α , клетки периферической крови, например, могут быть разделены на 2 группы (Карнаухов, 1978):

а) гранулоциты отличающиеся в норме узким диапазоном изменения α , величина которого связана со степенью зрелости клетки:

Зрелые сегментоядерные нейтрофилы	- 0,14 - 0,20
Палочкоядерные нейтрофилы	- 0,35 - 0,45
Юные нейтрофилы	- 0,55 - 0,60
Промиелоциты	- 0,75 - 0,80
Миелобласты	- 0,80 - 0,90.

б) Лимфоциты отличаются широким диапазоном изменения параметра α - от 0,3 до 1,7. Для интерпретации этих данных необходимо проанализировать функциональный смысл коэффициента α .

Учитывая особенности метода окрашивания ($pH = 4.6$) и отсутствия в клетках мукополисахаридов, можно считать, что коэффициент отражает отношение односпиральных (НК1) к двухспиральным (НК2) нуклеиновым кислотам:

$$\alpha = I(640 \text{ нм}) / I(530 \text{ нм}) = A1 \text{ НК1} / \text{НК2}$$

где $A1$ - коэффициент пропорциональности.

В пул НК1, помимо РНК, входят односпиральные ("расплетенные") участки ДНК, а в пул НК2, кроме молекул ДНК, входят и двухспиральные участки РНК. Таким образом, в этом случае, коэффициент альфа не отражает точно соотношения концентраций РНК/ДНК в клетках.

В случае дифференцированных клеток, у которых только 5-10 % (в зависимости от типа клеток) их ядерной ДНК может находиться в активной форме, допустимо пренебречь вкладом односпиральных участков ДНК в интенсивность "красной" люминесценции. Тогда, с достаточной для практических целей точностью, можно полагать, что величина рассматриваемого коэффициента α характеризует отношение РНК/ДНК в клетке:

$$\alpha = I(640 \text{ нм}) / I(530 \text{ нм}) = A2 \text{ РНК/ДНК}$$

где $A2$ - коэффициент пропорциональности, кстати учитывающий вклад двухспиральных участков РНК в "зеленую" люминесценцию.

Таким образом, в ряде клеток периферической крови, нервных, глиальных и др. клетках, коэффициент α имеет ясный физиологический смысл: так как концентрация ДНК постоянна в неделящейся клетке, коэффициент альфа отражает количество РНК на единицу ДНК, а его изменение (увеличение) свидетельствует об увеличении функциональной, синтетической активности данной клетки. Активация синтетических процессов в клетке неизбежно приводит к повышению величины коэффициента альфа либо за счет появления "расплетенных" участков ядерной ДНК при активации генома клетки, или оба процесса одновременно дают вклад в величину коэффициента α .

2.2.2. Другие флуорохромы

Как отмечалось выше, кроме акридинового оранжевого имеется ряд флуорохромов акридинового ряда: корифосфин, эухризин 2GNX, аурофосфин, акрифлавин, акридиновый желтый и др., которые обладают в разной степени выраженной метахромазией по отношению к одно- и двухспиральным нуклеиновым кислотам.

В настоящее время одно из интересных направлений флуоресцентной гисто- и цитохимии заключается в использовании комбинации флуорохромов для одновременного изучения разных химических соединений в клетках.

Особое значение в этом направлении приобретает использование микроспектрального анализа. Можно привести, для примера, несколько хорошо

отработанных комбинаций флуорохромов для указанных целей:

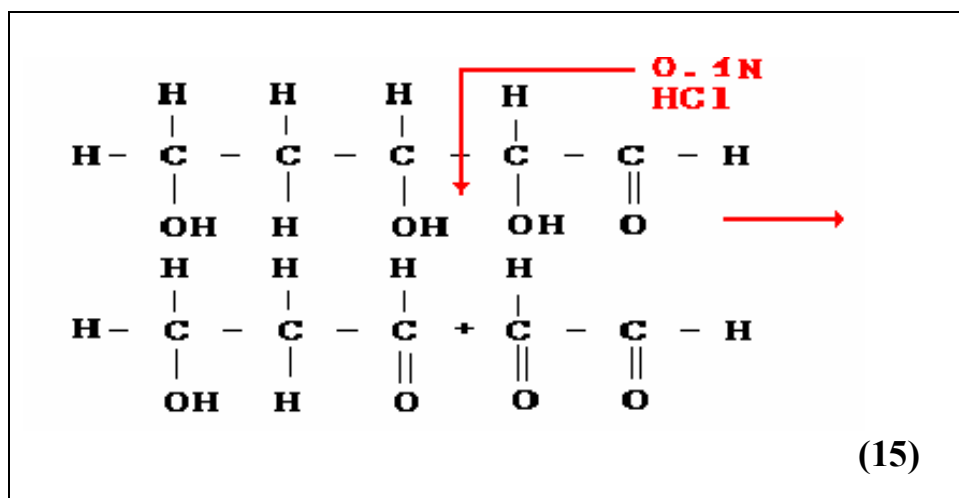
- Этидиум бромид (красное свечение) + проционовые красители (сине-зеленое свечение) для выявления нуклеиновых кислот и белков;
- Бензпирен бромид (голубое свечение) + проционовые красители (сине-зеленое свечение) для одновременного выявления липидов и белков;
- Этидиум бромид (красное свечение) + бензпирен бромид (голубое свечение) для комплексного обнаружения нуклеиновых кислот и липидов.

2.3. Реакции с переходом лейкоформ красителей в хромоформную форму

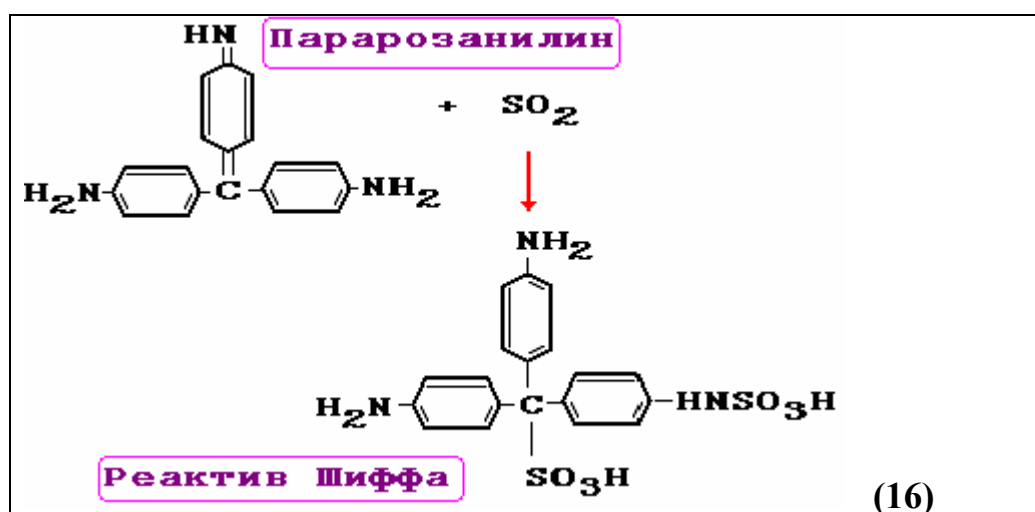
2.3.1. Реакция Фельгена

Эта реакция была предложена Р.Фельгеном и Г.Россенбекком в 1924 году в качестве специфической реакции на ДНК. В основе этого метода лежит следующая последовательность реакций. Вначале проводится мягкий

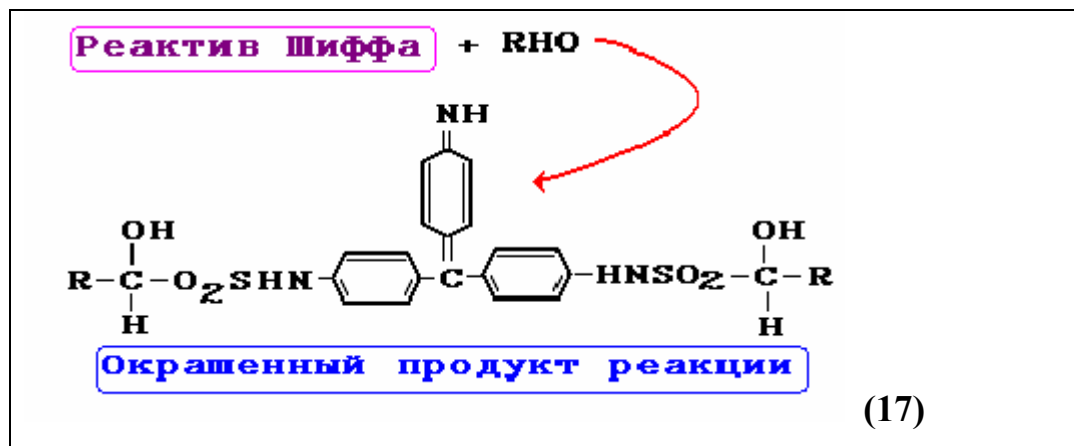
кислотный гидролиз (1 N HCl при 60° C) для освобождения альдегидных групп дезоксирибозы (15) - углевода, входящего в состав ДНК:



После гидролиза и промывки ткань переносится в реактив Шиффа, который реагирует с альдегидными группами с образованием пурпурной окраски. В данном методе используется известная в аналитической химии реакция Шиффа для выявления альдегидов. Фуксинсернистая кислота, или реактив Шиффа, обычно получается из парарозанилина пропусканием через его раствор при встряхивании сернистого газа (SO_2) (Метод О.Итикава, Я.Огура, 1954) до обесцвечивания раствора. При этом происходят следующие реакции (16):

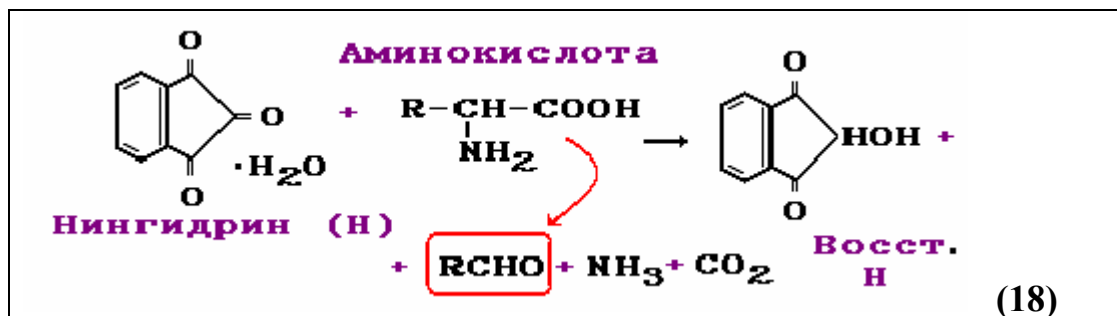


Бесцветное лейкосоединение - реактив Шиффа, обладает высокой реактивностью к альдегидам, реакция с которыми протекает следующим образом (17):



Как видно из приведенных уравнений, в основе гистохимической реакции Фельгена лежит превращение лейкоформы красителя фуксина в хромный продукт, в связи с внутримолекулярной перегруппировкой остатка сернистой кислоты, при реакции реактива Шиффа с альдегидами. Этот механизм цветных превращений реактива Шиффа был предложен Г.Виландом и Г.Шейнгом в 1921 году, однако, дальнейшие исследования методами хроматографии и электрофореза показали, что реакция реактива Шиффа с альдегидами происходит несколько сложнее.

Реактив Шиффа используется также в гистохимии белков. Например, метод А.Ясума и Т.Итикава (1952, 1953) основан на обнаружении в тканях стабильных альдегидов, образующихся в ходе окислительного дезаминирования в результате действия нингидрина (18) на аминокислоты, входящие в состав белков. Известно, что нингидрин реагирует со свободными аминогруппами альфа-аминокислот с образованием восстановленного нингидрина, аммиака, альдегида и углекислоты:

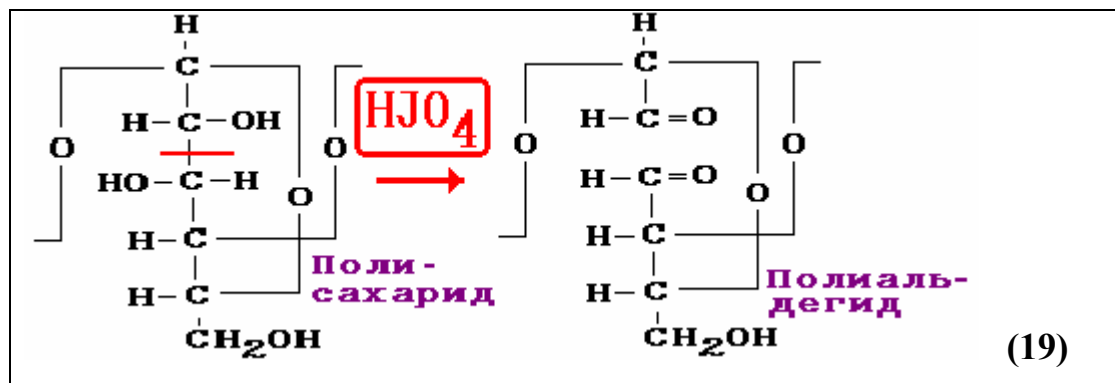


Метод А.Ясума и Т.Итикава дает отрицательные результаты, если перед окислительным дезаминированием провести дезаминирование с использованием, например, азотистой кислоты, ацетилирование или использовать агенты, блокирующие альдегидные группы, например, гидроксилламин, семикарбазид, цианид, бисульфит и т.д.

2.3.2. Реакция Шифф-иодная кислота (Реакция ШИК)

Вся современная гистохимия полисахаридов, мукополисахаридов и мукопротеидов связана с реакцией Шифф - иодная кислота (реакция ШИК).

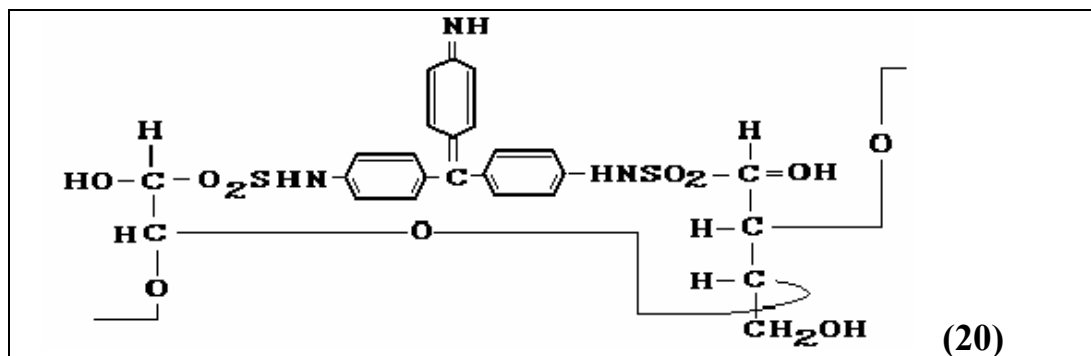
Иодная кислота служит окислителем и разрывает -C-C- связи в различных соединениях, содержащих две смежные гликолевые группы в положении 1,2 (-CHOH-CHOH-), превращая такие соединения в диальдегид (CHO-CHO) (19):



Необходимо отметить очень важное обстоятельство: иодная кислота окисляет только до образования диальдегидов и в этом преимущество этого

реактива перед другими окислителями, используемыми в гистохимии для окисления -С-С- связей, которые приводят к дальнейшему окислению образовавшихся альдегидов до спиртов (перекись водорода, хромовая кислота, марганцовокислый калий и др.). Альдегиды, образующиеся при действии иодной кислоты на соответствующие субстраты, выявляются при помощи реактива Шиффа и в результате реакции ШИК образуется красноокрашенный продукт.

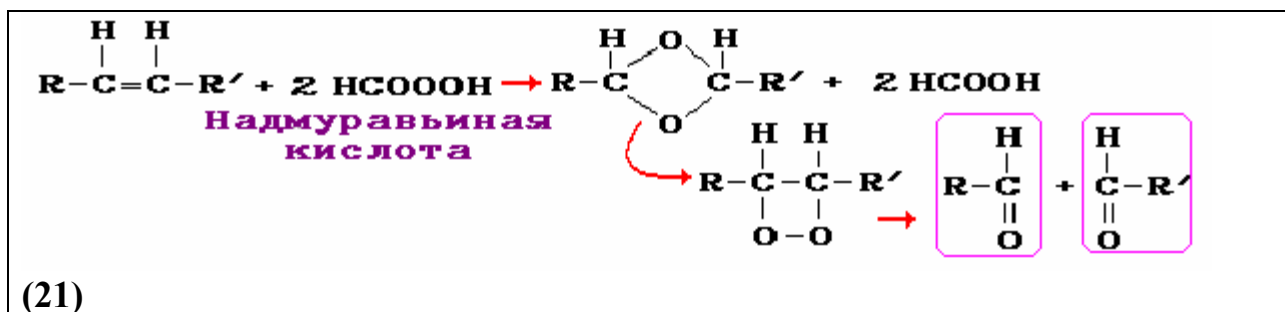
Считается, что при взаимодействии реактива Шиффа с диальдегидом, образуется новое соединение, а не окисленный реактив Шиффа, как это вначале предполагалось. В этом случае реакция Шиффа с диальдегидами проходит следующим образом (20):



2.3.3. Реакция с Шифф-надуксусной (надмуравьиной) кислотой

Реактив Шиффа используется для изучения липидов в тканях. Вначале проводится окисление двойных ненасыщенных связей жирных кислот до альдегидов и выявление последних при помощи фуксинсернистой кислоты.

Для окисления двойных ненасыщенных связей липидов используется надмуравьиная (21) или надуксусная кислота:



На эту реакцию было обращено внимание после того, как Дж.Верн в 1929 году показал, что при мягком окислении жировых веществ, содержащих ненасыщенные связи, например, при окислении лецитина, образуются группы, дающие все реакции на альдегиды.

Таким образом, применение реактива Шиффа для выявления различных соединений в клетках и тканях является классическим примером использования в гистохимии достижений аналитической химии органических соединений. Необходимо отметить, что реакция Фельгена является одной из самых распространенных цитохимических реакций, используемых в цитофотометрических исследованиях. Этот метод в качественном и количественном варианте широко использовался и используется для изучения ploидности клеток в норме и на фоне различных лекарственных и гормональных препаратов и оперативных вмешательств. Был установлен закон постоянства среднего содержания ДНК в хромосомном наборе данного вида животных и растений, а также установлено, что синтез ДНК происходит только во время интерфазы.

Микроспектрофотометрические измерения интенсивности окраски по Фельгену для количественного анализа содержания ДНК в фиксированных ядрах были начаты в 1947 году А.Поллистером и его сотрудниками. Совершенно очевидно, что для проведения количественного цитоспектрофотометрического анализа с использованием реакции Фельгена, как впрочем при любом другом гистохимическом методе, имеющем

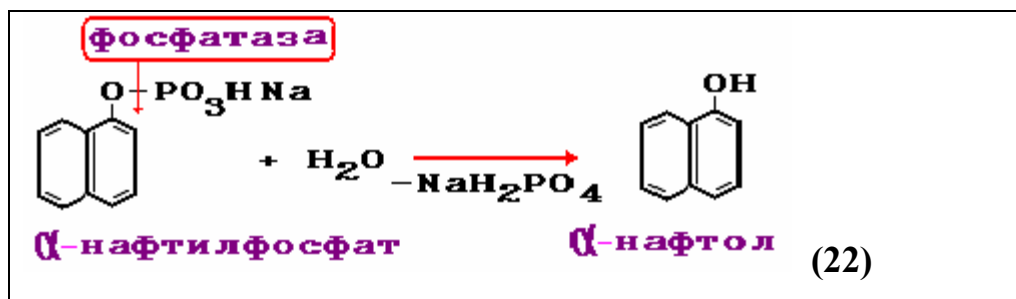
количественный вариант, необходима строгая стандартизация всех процедур и постановка специальных контрольных опытов.

2.4. Реакции, в результате которых непосредственно в срезах тканей образуются красители в местах локализации исследуемых соединений

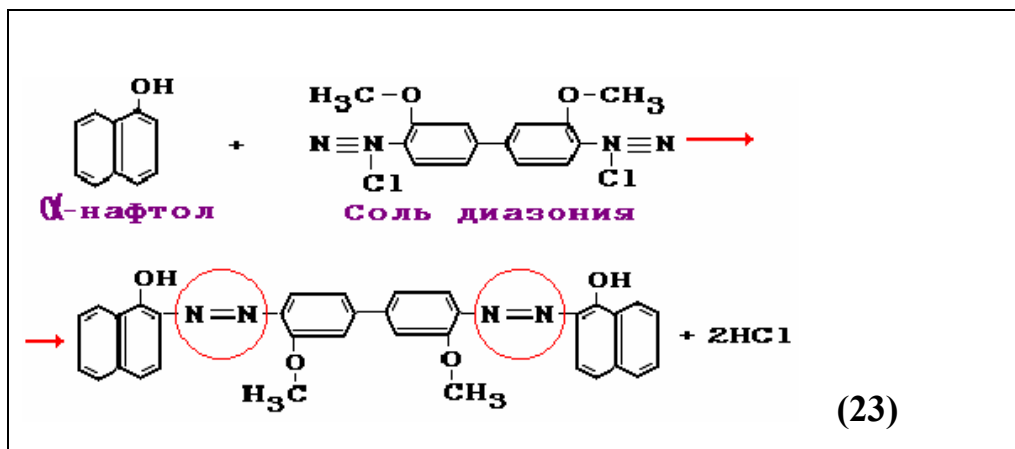
Этот тип гистохимических реакций часто используется для изучения некоторых гидролитических ферментов, например, кислых и щелочных, фосфатаз, различных эстераз. Для этого применяется несколько методов, в частности метод "одновременного азосочетания", который имеет широкое распространение в гистохимии. Принцип этого метода заключается в том, что продукты, образованные в результате действия гидролитического фермента, сразу же вступают в реакцию с гистохимическим реагентом в результате чего образуются азокрасители.

В этом случае соль диазония (гистохимический реагент) вступает в реакцию с азосоставляющей, по мере того, как она образуется из субстрата под действием фермента. Например, в случае щелочной фосфатазы, по одному из методов, в качестве субстрата используется натриевая соль альфа-нафтилфосфата и реакция проходит в два этапа.

На первом этапе происходит образование из субстрата α -нафтола (22):

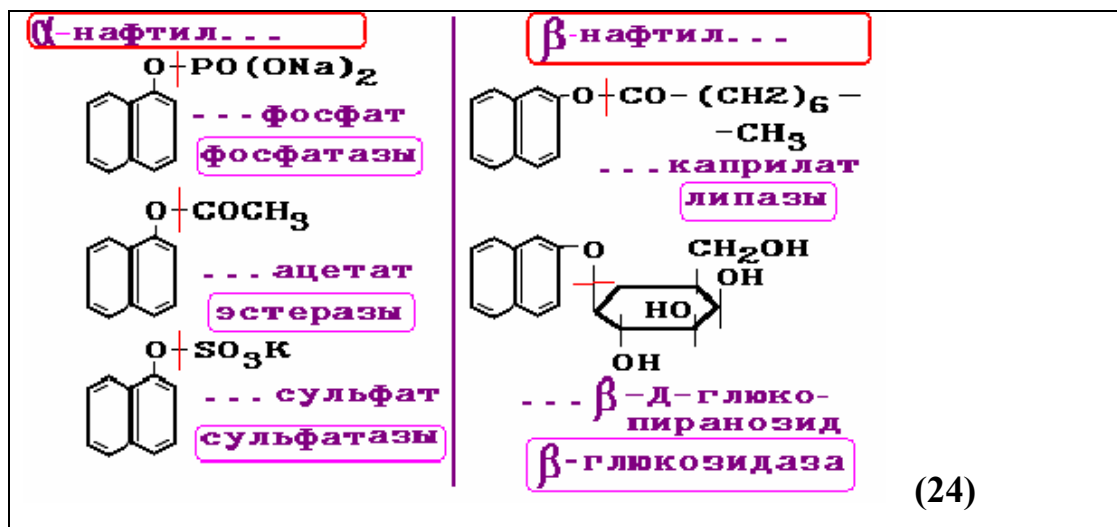


Во второй реакции из α -нафтола, в результате взаимодействия с солью диазония, образуется азокраситель (23).

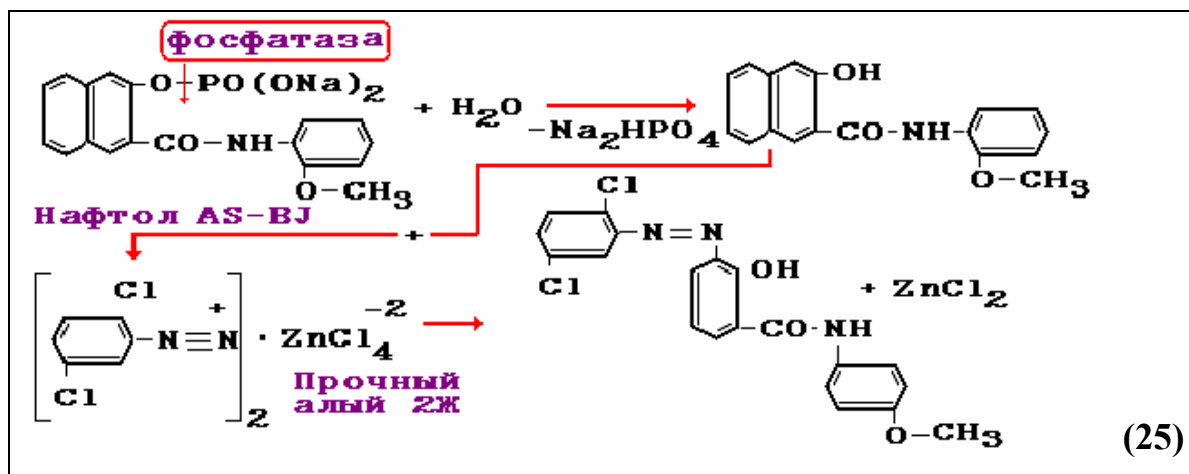


Обе реакции происходят последовательно в два этапа, но в одной инкубационной среде. Поэтому метод называется "одновременным азосочетанием", в отличие от "последовательного азосочетания", когда обе реакции проводятся в отдельных инкубационных средах.

Этот метод был использован Р.Барнеттом и А.Зелигманом (R.J.Barnett, A.M.Seligman) для гистохимического исследования холинэстераз. В гистохимической практике используются разные альфа- и бета-нафтиловые эфиры (24), которые применяются как субстраты для обнаружения локализации различных гидролитических ферментов. В результате реакций этих искусственных субстратов с ферментами образуется α - или β -нафтолы, которые вступают в реакции с солями диазония, как показано выше (23).

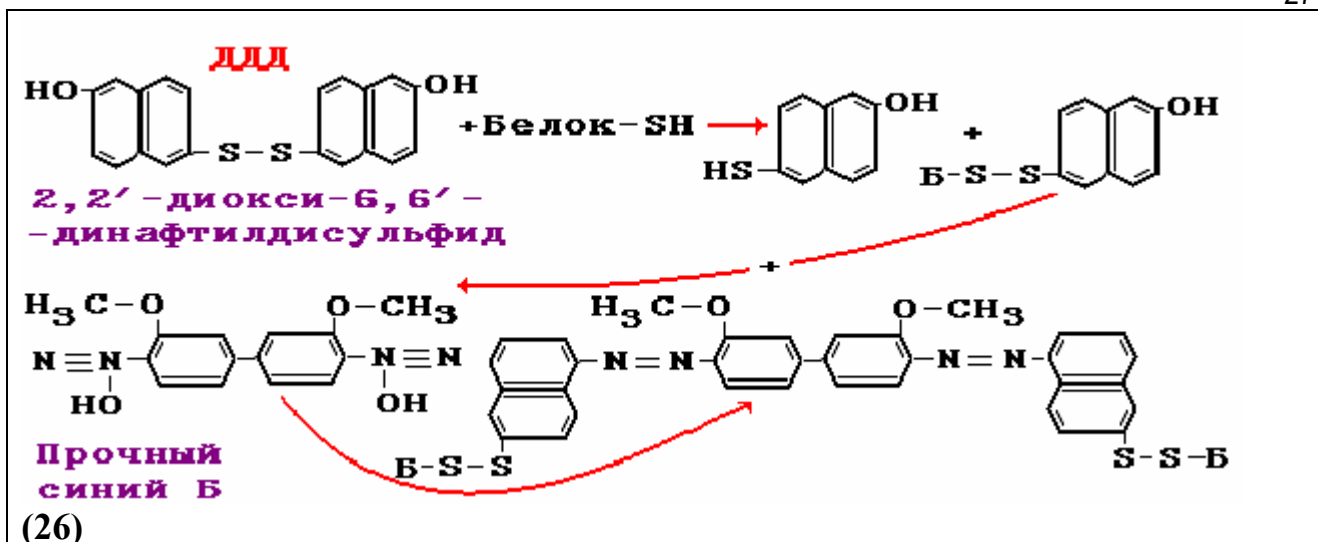


В конце 50-х годов был синтезирован ряд нафтолов (азотолов) - производных 2-гидрокси-3-нафтойной кислоты и различных аминов. Нафтолы успешно используются в гистохимическом анализе разных ферментов методом одновременного азосочетания (25).



При ферментативном расщеплении фосфатов нафтолов гидролазами образуются практически нерастворимые нафтолы, что позволяет получать довольно точную локализацию ферментативной активности в ткани, фиксированной определенным способом.

В качестве высокоспецифического реагента на SH- и SS-группы в тканевых белках используется специальное соединение - 2,2'-диокси-6,6'-динафтилдисульфид (ДДД), который был впервые использован в гистохимии Р.Барнеттом и А.Зелигманом (1952). При взаимодействии SH-групп белков с ДДД образуются производные нафтола, которые затем реагируют с солями диазония с образованием азокрасителей (26):



Аналогично образованию азокрасителей, при использовании эфиров индоксила можно выявить активность ряда ферментов, например, неспецифических эстераз. Первая стадия процесса связана с ферментативным гидролизом и образованием свободного индоксила.

На второй стадии индоксил окисляется кислородом воздуха до образования практически нерастворимого красителя индиго. С.Холт (S.J.Holt) с сотрудниками детально исследовали кинетику гистохимической реакции выявления ферментов на примере индоксилацетатных методов, и их данные можно использовать для рассмотрения различных реакций "одновременного захвата".

Согласно гипотезе С.Холта, можно последовательно рассмотреть несколько этапов: начальный процесс (НП), образование первичного продукта реакции (ППР) и образование конечного продукта реакции (КПР).

Начальный процесс связан с проникновением субстрата и гистохимического реагента в ткани. Это условие выполняется, если субстрат и реагент довольно хорошо растворимы в воде (чтобы обеспечить высокую концентрацию в инкубационной среде). Для быстрой диффузии оба агента должны иметь низкий молекулярный вес и низкую степень полярности с тем, чтобы проходить через липиды и не абсорбироваться белками.

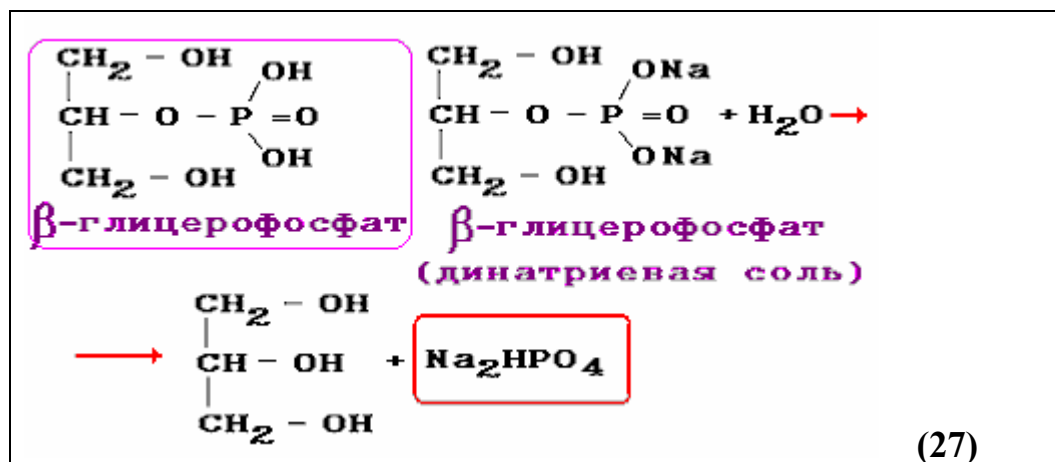
Известно, что в случае, когда концентрация субстрата высока по сравнению с концентрацией фермента, реакция следует кинетике нулевого порядка, т.е. скорость реакции не зависит от концентрации субстрата, а определяется концентрацией фермента. В противоположном случае, когда концентрация субстрата низка, реакция следует кинетике первого порядка и скорость реакции прямо пропорциональна концентрации субстрата. В реальных условиях гистохимической реакции быстрое проникновение субстратов к месту ферментативной активности обуславливает образование ППР следующее кинетике нулевого порядка. Таким образом, при быстрой диффузии субстрата, скорость образования ППР будет являться количественной мерой концентрации фермента.

Продолжительность жизни ППР и образование конечного продукта реакции взаимосвязаны между собой и чем выше скорость образования КПР, тем, естественно, меньше будет продолжительность жизни ППР. Последняя определяется двумя обстоятельствами: диффузией и захватом ППР. Очевидно, что чем ниже константа диффузии ППР, и чем больше константа скорости реакции захвата, тем более точно можно установить локализацию КПР.

Рассмотренная качественная картина кинетики гистохимических реакций определяет оптимальные физико-химические условия для эффективного выявления гидролитической ферментативной активности в тканевых препаратах.

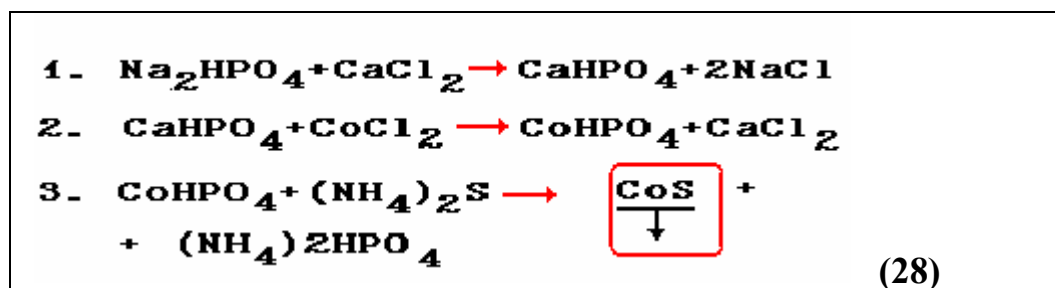
2.5. Реакции с ионами тяжелых металлов

Этот тип гистохимических реакций можно рассмотреть на примере группы методов Гомори (G.Gomori) для выявления фосфатаз. В качестве субстратов для выявления щелочной фосфомоноэстеразы используются глицерофосфаты (бета- или смесь альфа- и бета-глицерофосфатов), которые гидролизуются с высвобождением фосфорной кислоты или ее соли (27):

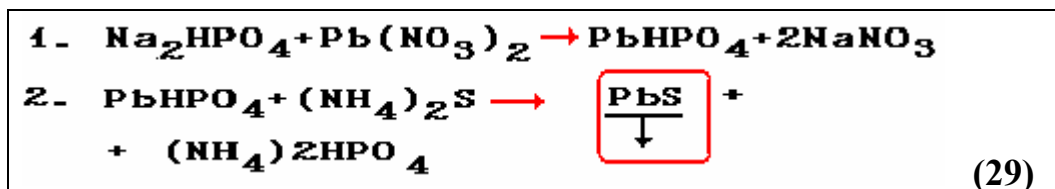


Содержащиеся в инкубационной среде хлорид кальция и хлористый кобальт взаимодействуют с фосфорной кислотой, с образованием на конечной стадии нерастворимого гидрофосфата кобальта.

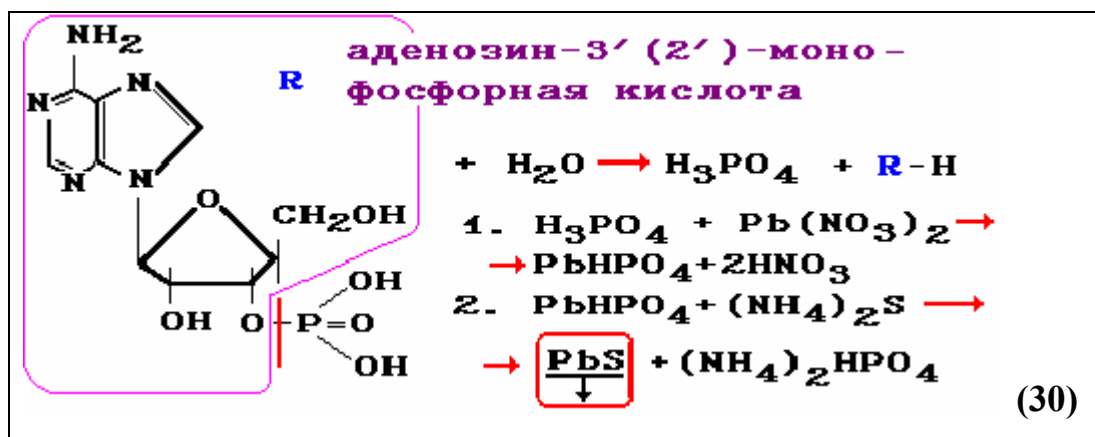
Однако, гидрофосфат кобальта бесцветен, но при его взаимодействии с сульфидом аммония происходит осаждение нерастворимого сульфида кобальта черного цвета, который является конечным продуктом каскада приведенных реакций и место его локализации выявляет распределение щелочной фосфомоноэстеразной активности (28):



В случае кислой фосфомоноэстеразы, реакцию необходимо проводить в кислой буферной среде, и вместо солей кальция (растворимых в кислых условиях), использовать азотнокислый свинец. Остальные этапы методики аналогичны реакции Гомори для выявления щелочной фосфомоноэстеразы (29):



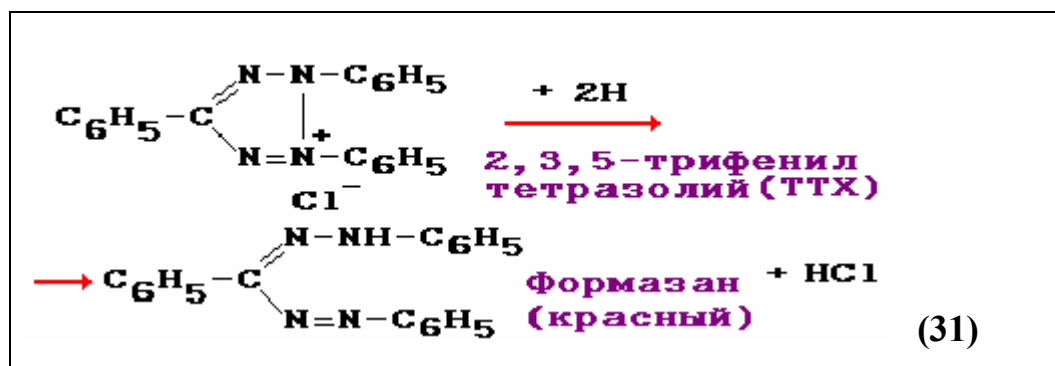
Локализация активности кислой фосфоэстеразы определяется благодаря черно-коричневому осадку сульфида свинца в тканях. В качестве еще одного примера реакции с осаждением солей тяжелых металлов можно привести реакцию Пирса и Рейса для выявления специфической 5-нуклеотидазы с субстратом аденозинмонофосфатом и последующим осаждением кислого фосфорнокислого свинца сульфидом аммония (30), как описано выше:



Разработано много модификаций методов с использованием ионов тяжелых металлов и их осаждением в виде сульфидов, детально изучены отдельные этапы гистохимической процедуры, накоплен опыт использования этой группы гистохимических реакций в области светооптической и электронно-микроскопической гистохимии, определены границы и условия использования указанных методов для количественных измерений. Невзирая на утверждения, иногда приводимые в научной литературе, что методы с солями тяжелых металлов имеют только исторический интерес, можно считать, что методы Гомори и методы с азокрасителями являются классическими для выявления активности ряда ферментов.

2.6. Реакции с использованием окислительно-восстановительных индикаторов

Соли тетразолия широко используются для изучения дегидрогеназ - группы ферментов катализирующих окислительно-восстановительные реакции. Р.Кун и Д.Ерхель (R.Kuhn, D.Jerchel) в 1941 году показали, что бесцветные соли тетразолия восстанавливаются в окрашенные соединения (формазаы) согласно следующему уравнению (31):

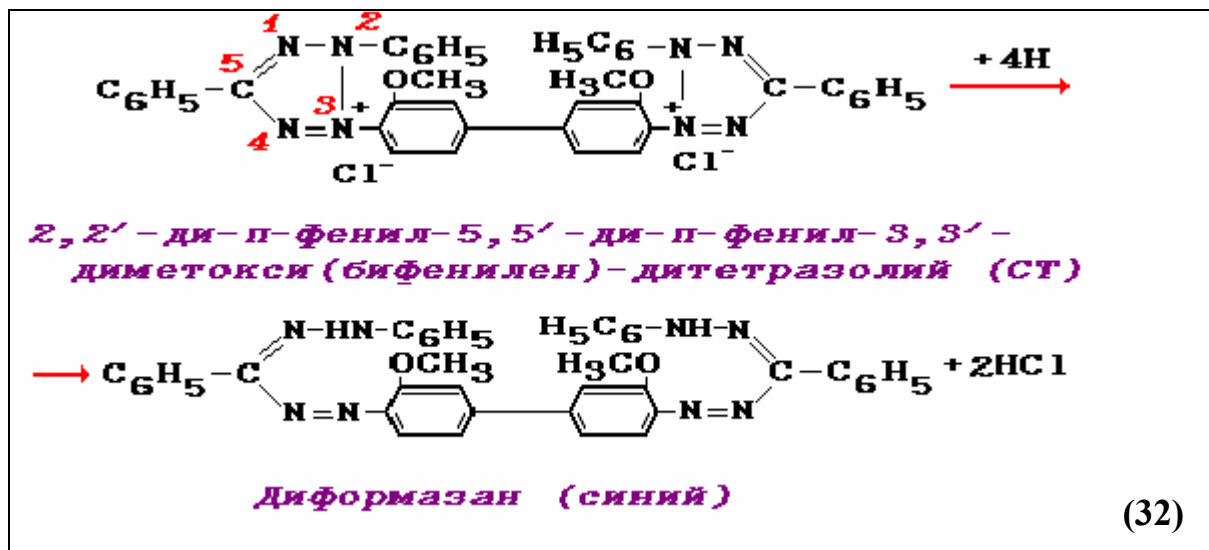


Р. Кун и Д.Ерхель отметили, что это восстановление происходит не под действием обычных восстановителей (глутатион, аскорбиновая кислота, цистеин), присутствующих в клетках и тканях, т.к. ни один из этих восстановителей не превращает соли тетразолия в формазаы при рН ниже 9,0. Такое же действие на соли тетразолия не оказывают и сахара, т.к. их действие не происходит при рН ниже 11.

В 1942 г. Г.Лакон (G.Lakon) использовал реакцию с хлоридом 2,3,5-трифенилтетразолия как тест для определения жизнеспособности семян, наблюдая появление красного окрашивания в живых тканях. При прогревании тканей до +80 град. С окрашивание не наблюдалось, в связи с чем было сделано заключение, что реакция связана с присутствием в тканях каких-то ферментных систем.

Как видно из приведенной выше схемы реакций, соли тетразолия служат рецелепторами электронов от окисляемого субстрата. На этом принципе основано использование солей тетразолия в гистохимии для обнаружения ферментов, участвующих в окислении субстратов. Рассмотренная соль тетразолия - хлорид 2,3,5-трифенилтетразолия относится к монотетразолиевым солям, формазаны которых легко диффундируют и дают слабую окраску. Это привело к поиску других солей тетразолия, в результате чего был синтезирован ряд дитетразолиевых солей, нашедших широкое применение в гистохимии ферментов: неотетразолий, синий тетразолий, нитросиний тетразолий и др.

При восстановлении синего дитетразолия (бесцветная соль) образуется диформаза с синей окраской (32):



Если происходит восстановление только половины молекулы, в результате этого происходит образование моноформаза красно-пурпурного цвета (продукт полувосстановления дитетразолия). Таким образом, появление пурпурной окраски в срезах, при использовании диформаза, свидетельствует о неполном восстановлении, причинами которого может быть слабая активность фермента или несоблюдение необходимых физико-химических условий в инкубационной процедуре, которые

препятствуют полному восстановлению соли тетразолия. Если электроны от окисляемого субстрата не "перехватывает" тетразолий, то они передаются обычным способом через многочисленные промежуточные переносчики к молекулярному кислороду.

Одним из основных свойств солей тетразолия, определяющих их пригодность для гистохимического использования, является их способность к восстановлению, мерой этой способности является окислительно-восстановительный потенциал, который был определен для разных солей тетразолия с помощью полярографических методов.

Например, потенциал полуволны полярограммы восстановления нитросинего тетразолия (нитро-СТ) составляет всего 0,05 в, а для 2,3,5-трифенилтетразолия (ТТХ) - 0,49 в, что указывает на большую способность нитро-СТ восстанавливаться до формазана, чем ТТХ, что действительно подтверждается на практике при гистохимическом изучении активности дегидрогеназ.

Соли тетразолия, как гистохимические реагенты, обладают рядом положительных характеристик:

- достаточно хорошо растворимы, что позволяет всегда достигнуть необходимую оптимальную концентрацию в инкубационной среде;
- размер молекул солей тетразолия невелик, в связи с чем их константы диффузии достаточно высоки, что обеспечивает высокие скорости их проникновения в ткань, хотя, например, интактные мембраны митохондрий препятствуют проникновению солей тетразолия, поэтому соли тетразолиев нельзя использовать для прижизненных гистохимических исследований;
- соли тетразолия, за исключением нитро-СТ, хорошо растворимы в липидах, что способствует хорошей проницаемости через мембраны.

Из отрицательных особенностей солей тетразолия при их использовании в качестве гистохимических реагентов при изучении ферментов,

катализирующих окислительно-восстановительные реакции, можно указать на следующие:

- при низких концентрациях соли тетразолия прочно связываются с белками и в этом случае проведение ферментативной реакции в инкубационной среде приводит к диффузному отложению формазана;

- ряд солей тетразолиев чувствительны к свету, хотя многие соли, как указывал Э.Пирс, по "счастливному стечению обстоятельств", обладают достаточной устойчивостью к свету;

- соли тетразолия могут ингибировать различные ферментативные реакции, что может приводить к артефактам или затруднениям при анализе результатов гистохимической реакции.

Итак, в результате окислительной реакции между субстратом и ферментом, а также восстановления солей тетразолия образуются, в качестве конечного продукта реакции, формазаны или диформазаны:

- формазаны являются сильно окрашенными соединениями и хорошо отражают свет, что было использовано при наблюдении отложения формазанов с помощью поляризационного микроскопа. Практически все формазаны имеют две полосы поглощения, что и обуславливает их характерную окраску (290-560 нм и 405-675 нм), см. табл.7:

Табл. 7

Соль тетразолия	Максимум поглощения формазанов (нм)				Потенциал полуволны (в)
	λ^*	ϵ^*	λ	ϵ	
ТТХ	290	10000	405	30900	-0.49
ЙНТ	-	-	500	11000	-0.09
НТ	-	-	587	14400	-0.17
СТ	-	-	606	10400	-0.16
Нитро-СТ	355	37900	510	55000	-0.05
МТТ	560	51000	-	-	-0.11
МТТ-Со	560	20000	660	20000	

5ММТ	550	31000	-	-	
5МТТ-Со	550	44000	675	26000	
4ММТ	430	13000	447	41000	
4ММТ-Со	436	39000	-	-	

λ^* - длина волны в максимуме поглощения

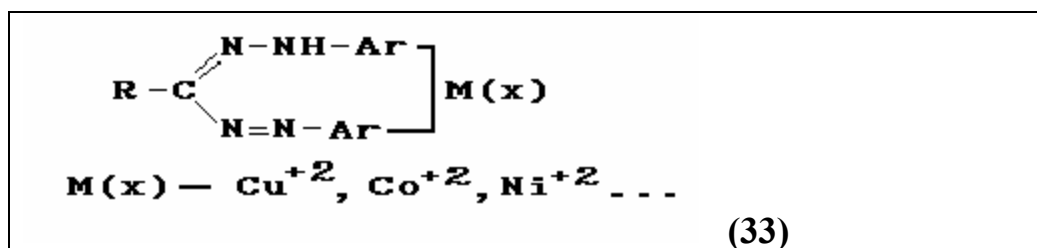
ε^* - коэффициент молярной экстинкции

- как указывалось выше, при восстановлении дитетразолиевых солей могут образоваться два продукта: фиолетовый (или синий) и красный, причем красный формазан является результатом окисления только половины молекулы дитетразолия. Однако, имеются данные, что появление красного продукта может быть обусловлено наличием в составе дитетразолия в качестве примесей монотетразолиевых солей. Во всяком случае присутствие красного окрашивания свидетельствует об активности соответствующих ферментов, хотя природа его образования и способы учета этого продукта при количественном анализе мало изучены.

- моноформазаы и диформазаы образуются в тканях при гистохимических реакциях в виде кристаллов, например, в виде игл (5x1,5 мкм) или коротких палочек (1,5x1 мкм). Эта особенность может затруднять определение точной локализации фермента. В связи с этим применяются некоторые приемы для получения аморфных формазаы. Кристаллизация диформазаы может возникать при определенных манипуляциях со срезами. Например, диформазаы нитро-СТ кристаллизуются, если срезы обезвоживать в спиртах, просветлять в ксилоле и заключать в синтетическую смолу. Поэтому рекомендуется использовать водорастворимую среду, например, смесь глицерин-желатина, для заключения окрашенных срезов сразу, после окраски и промывки.

- формазаы способны образовывать хелатные соединения с ионами таких металлов как медь, никель, кобальт, серебро, образуя клешневидные соединения, что открывает дополнительные возможности использовать соли

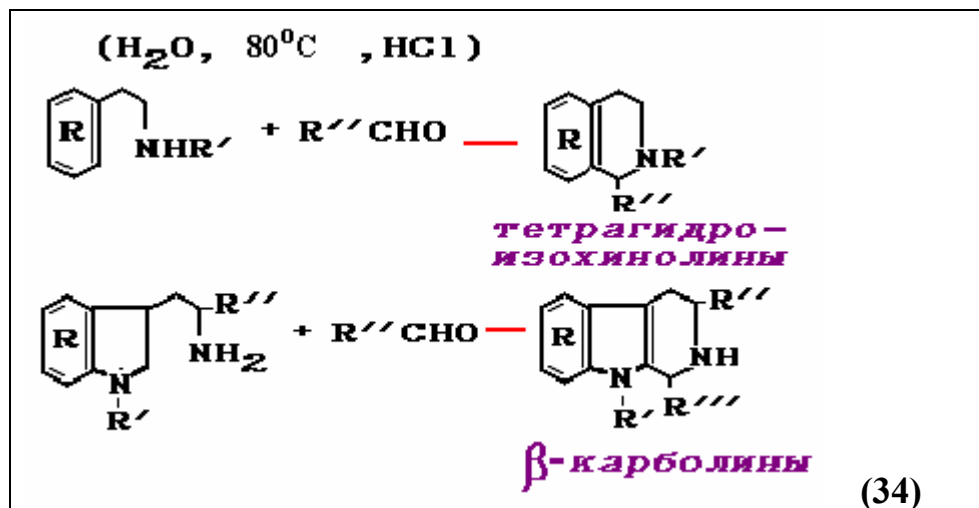
тетразолиев не только в светооптической, но и в электронно-микроскопической гистохимии (33):



2.7. Реакции с образованием продуктов, доступных для микроскопического и микроспектрального анализа

В качестве примера этого типа гистохимических реакций можно рассмотреть широко известный метод Фалька - Овмана для гистохимического выявления локализации в тканях и клетках биогенных моноаминов, которые являются эндогенными физиологически-активными соединениями, участвующими в регуляции многочисленных важных биохимических процессов.

В начале 60-х годов появилось несколько работ шведских исследователей - С.Овмана, А.Карлссона, Б. Фалька, Н.-А.Хилларпа и др. (S.Owman, A.Carlsson, B.Falck, N.-A.Hillarp), в которых был изложен новый метод для гистохимического выявления биогенных моноаминов: катехоламинов, индоламинов и их производных. Смысл метода заключается в том, что при обработке лиофилизированных образцов ткани формальдегидным газом определенной влажности при 80 град. С в течение 1 часа, происходит конденсация формальдегида с катехоламинами и индоламинами с образованием ярко флуоресцирующих продуктов: тетрагидроизохинолинов, и бета-карболинов (34):



Этот метод был широко использован для гистохимического изучения биогенных моноаминов и их функций в симпато-адреналовой системе и в центральной и периферической нервной системе. Необходимо отметить, что на основе результатов, полученных при помощи метода Фалька-Османа было детально разработано представление о моноаминергических нейрональных системах мозга, проведено детальное картирование систем моноаминергических нейронов в мозге (расположение в мозге зон моноаминергических нейронов и их терминалей). Это имело большое значение не только для фундаментальных исследований, но и для прикладных работ, особенно в области фармакологии и понимания этиологии ряда психических заболеваний, связанных с нарушением метаболизма биогенных аминов в организме человека.

В результате работ М.Ритцена, В.Лихтенштейгера и др. (M.Ritzen, W.Lichtensteiger) показано, что метод Фалька-Османа является количественным методом и к настоящему времени накоплен в этом направлении значительный экспериментальный материал.

Контрольные вопросы

1. Амидо-черный 10В - окраска белков. Использование бромфенолового синего.
2. Основные и кислые красители.
3. Базофилия и ацидофилия. Метахромазия.
4. Лаки и хелатные соединения. Выявление нуклеиновых кислот краплением галлоцианина.
5. Смесь метилового зеленого-пиронина в гистохимии нуклеиновых кислот.
6. Жирорастворимые красители и гистохимия липидов. Красители - Суданы и нильский голубой.
7. Акридиновый оранжевый и другие производные акридина в гистохимии нуклеиновых кислот и мукополисахаридов.
8. Прижизненные методы с использованием флуорохромов.
9. Интравитальная микроскопия.
10. Реактив Шиффа. Реакция Фельгена.
11. Использование реактива Шиффа в гистохимии углеводов (ШИК - реакция).
12. Количественная гистохимия - микрофотометрия.
13. Азокрасители. Азосочетание и синтез азокрасителей в ходе гистохимической реакции.
14. Использование азокрасителей в гистохимии ферментов. Нафтолы.
15. Выявление фосфатаз при помощи азосочетаний.
14. Сопряженные реакции в гистохимии.
15. Образование формазанов. Использование солей тетразолия в гистохимии окислительных ферментов.
16. Реакция Гленнера для выявления активности моноаминоксидазы.
17. Использование солей тяжелых металлов в гистохимии ферментов (на примере фосфатаз).
18. Выявление щелочной фосфатазы при помощи нитрата кобальта (Реакция Гомори-Такаматчу). Выявление кислой фосфатазы при помощи нитрата свинца (Метод Гомори).
19. Ферроцианид меди и гистохимия холинэстераз.
20. Реакция Фалька-Хилларпа на биогенные амины.
21. Количественная люминесцентная микроскопия (микрофлуориметрия).



РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА (Раздел 4, Главы 1 и 2)

1. Ромейс Б. Микроскопическая техника, ИИЛ, М., 1954
2. Кисели Д. Практическая микротехника и гистохимия, Изд. АН Венгрии, Будапешт, 1962
3. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. Мир, М., 1980
4. Пирс Э. Гистохимия. Теоретическая и прикладная. ИИЛ, М., 1962
5. Кононский А.И. Гистохимия, Выща школа, Киев, 1978
6. Луппа Х. Основы гистохимии, Мир, М., 1980
7. Ллойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов (Лабораторные методы), Мир, М., 1982
8. Карнаухов В.Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки. Наука, М., 1978
9. Зеленин А.В. Люминесцентная цитохимия нуклеиновых кислот, Наука, М., 1967
10. Берстон М. Гистохимия ферментов, М., Мир, 1965
11. Конарев В.Г. Цитохимия и гистохимия растений, М., Высшая школа, 1965
12. Дженсен У. Ботаническая гистохимия, М., Мир, 1965
13. Буданцев А.Ю. Моноаминергические системы мозга, М., Наука, 1976, стр. 144-162
14. Буйкис И.М. Гистохимия дегидрогеназ развивающегося спинного мозга, Рига, Изд. Зинатне, 1976, стр. 31-47, 53-85
15. Фрайштат Д.М. Реактивы и препараты для микроскопии (справочник), М., Химия, 1980



Глава 3. Комплексные гистохимические технологии

3.1. Иммуногистохимия (иммуоцитохимия)

Введение в практику гистохимии методов иммунологии для выявления внутриклеточной и внутритканевой локализации различных антигенов: белков, ферментов, низкомолекулярных эндогенных соединений и многих других физиологически активных соединений связано с именем А.Кунса и его коллег.

Следует отметить, что метод А.Кунса открыл новое направление в гистохимии, которое вошло в научную литературу под названием цито- и иммуногистохимия.

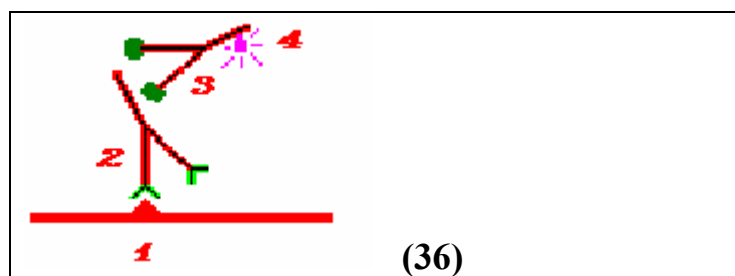
Существует много вариантов иммуногистохимического анализа, которые детально описаны в специальных руководствах (Э.Пирс, 1962; Дж.Полак, С.Ван Норден, 1987; М.В.Угрюмов, 1991 и мн. др.).

В исходной методике использовался прямой метод взаимодействия меченных антител с тканевыми антигенами (35):



Для блокирования неспецифического связывания меченных антител используется, например, предварительная обработка тканевых и клеточных препаратов иммунной сывороткой животных или инертным белком (например, альбумином). Однако, фоновое окрашивание нельзя блокировать полностью этими методами. В связи с этим был разработан ряд непрямых методов иммуномечения изучаемых антигенов.

В качестве примера можно привести методику, в которой на первый слой, содержащий специфические немеченные антитела (2) к γ -глобулину (1) наслаивается второй слой (3), содержащий антитела с меткой (4) к γ -глобулину животного, донора первых антител (36):



Для метки антител в обеих группах методов используется флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ) и родамин для прямого окрашивания

антител и изучения препаратов с использованием флуоресцентной микроскопии. Кроме этого, применяются ряд нефлуоресцирующих красителей для метки антител: ядерный прочный красный, нитропроизводное родамина В, кислотный синий, синий Эванса и др. и изотопная метка с иодом-131 с последующим радиоавтографическим анализом. Использование меченного иода связано с тем, что он при конъюгации с белками не меняет их иммунологической специфичности и сохраняется в комплексе антитело-антиген.

Другой подход связан с использованием в качестве метки пероксидазы, наличие которой затем выявляется при помощи гистохимической реакции с субстратом диаминобензидином. Методы, в которых используются пероксидаза, щелочная фосфатаза или глюкозооксидаза составляют группу иммунноферментных методов.

В настоящее время используется много вариантов основных методов иммуногистохимии: методы для одновременного окрашивания нескольких антигенов, методы с использованием меченных антигенов, метод гаптенного сэндвича, методы с использованием в качестве метки коллоидного золота, авидин-биотиновые методы и др.

При использовании методов иммуногистохимии применяются лиофилизированные или свежемороженые срезы, полученные в криостате или при помощи "ножа глубокого охлаждения". Метод А.Кунса широко используется для самых различных исследований при изучении: а) чужеродных антигенов, например, вирусов свинки, ветряной оспы, антигенной анимии, собачьей чумы и др.; б) судьбы чужеродных белковых антигенов после их парэнтрального введения животным; в) распределения в организмах собственных антигенов (белков, гормонов и др.).

Например, с использованием метода флуоресцирующих антител было изучено распределение АКТГ в гипофизе свинки с использованием кроличьей

антисыворотки против АКТГ свиньи, меченной флуоресцеинизотиоцианатом. Было показано, что гормон обнаруживается только в клетках, которые раньше классифицировались как базофильные. В качестве примера использования иммуногистохимических методов в нейробиологии можно привести масштабное исследование распределения ферментов, пептидов и нейротрансмиттеров в центральной нервной системе животных, результаты которого публикуются в многотомной серии "Handbook of Chemical Neuroanatomy" под редакцией известных шведских гистохимиков А.Бьорклунда и Т.Хекфельта (A.Bjorklund, T.Hokfelt).

3.2. Метод гибридизации мРНК *in situ*

Как показано в предыдущем разделе обзора, иммуногистохимические методы дают ценный материал о внутриклеточной и внутритканевой локализации различных соединений и, в первую очередь, пептидов и белков, включая многочисленные ферменты, для которых не имеется или невозможно разработать прямые гистохимические методы.

Однако при помощи иммуногистохимических методов нельзя получить ответ на вопрос: происходит ли синтез обнаруженных соединений в клетках, дающих на них положительную иммуногистохимическую реакцию? Ответ на этот вопрос имеет важное, а иногда определяющее значение, например, для секретлируемых пептидов, которые, благодаря внутритканевому транспорту и захвату или рецепторному связыванию с клетками-мишенями, могут обнаруживаться на значительном расстоянии от клеточных популяций, в которых они синтезируются.

Для решения вопроса о гистологической локализации синтеза белков и пептидов можно использовать два приема экспериментальной молекулярной биологии. Один метод может быть реализован на целой ткани, из которой экстрагируется общая РНК и затем определяется состав выделенной РНК *in*

in vitro. Другим путем можно изучить индивидуальные мРНК в отдельных клетках тканевого среза при помощи метода, который вошел в научную литературу под названием метода гибридизации мРНК in situ (in situ hybridization histochemistry).

Определение мРНК при помощи гибридизации in situ требует использования зонда с нуклеотидной последовательностью комплементарной ко всей или части целевой молекулы мРНК. При определенных условиях происходит гибридизация зонда и мРНК. Для визуализации локализации мест гибридизации зонда и мРНК, зонд предварительно метится, обычно радиоактивным маркером, а затем, после гибридизации меченого зонда с мРНК при помощи гисторадиографических методов проявляется локализация радиоактивной метки.

3.2.1. Основные процедуры метода. Типы зондов

В качестве зондов могут быть использованы фрагменты молекулы ДНК или РНК разной длины. Для этого можно использовать зонды, образованные путем техники клонирования для получения кДНК или кРНК. С другой стороны, можно использовать синтетические олигонуклеотиды. Для гибридизации мРНК in situ в последнем случае, используются полученные на синтезаторах линейные фрагменты ДНК, имеющие 30-60 комплементарных участков оснований к исследуемой мРНК.

В табл. 7 суммированы достоинства и недостатки естественных и синтетических типов зондов для гибридизации in situ (Harrison, Pearson, 1990) (СО - синтетические олигонуклеотиды):

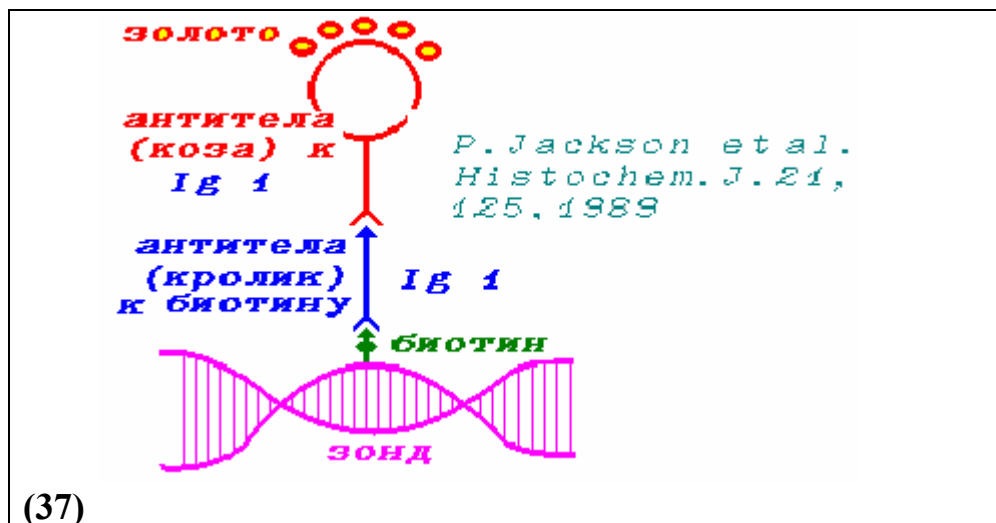
Табл. 7

Зонд	Достоинства	Недостатки
кДНК	Легкость использования Устойчивость (quite robust) Высокая специфическая активность Образуются стабильные гибриды	Сложная технология клонирования Обычно двунитевые зонды (*) Плохая проницаемость в ткани (**)

кРНК	Высокая специфическая активность Однонитевые зонды Очень стабильные гибриды Низкий фон	Неустойчивость (fragile) Высокая адгезия к стеклу Необходим доступ к клонированию Плохая проникаемость зонда в ткань (**)
СО	Легкость приготовления, использования и низкая стоимость Хорошая проникаемость в ткань Возможность изучения продуктов сплайсинга Идентичность предполагаемых кДНК-фрагментов если известна аминокислотная последовательность. Разные контроли	Необходим доступ к синтезатору Необходимо знание последовательности оснований в мРНК Ошибка в отдельном основании приводит к артефактной гибридизации Невысокая стабильность гибрида Ложная гибридизация Высокий уровень фона (?) Необходимо много контролей
<p>* Комплементарные нити могут ренатурировать в растворе, уменьшая способность зонда для гибридизации с тканевой мРНК;</p> <p>** Для достижения достаточной проникаемости зондов их обычно частично расщепляют в щелочных условиях для получения более коротких фрагментов. Кроме этого, может применяться специальная дополнительная предгибридизация, которая создает условия для использования зонда полной длины.</p>		

3.2.2. Метка зондов

Для метки зондов широко используются радиоактивные метки - H^3 , P^{32} , S^{35} и I^{125} и последующий радиоавтографический анализ срезов ткани после процедуры гибридизации *in situ*. Однако, в последние годы широко используются биотинилированные ДНК-зонды. В данном случае гистохимическое выявление локализации зонда осуществляется при помощи иммуноцитохимических методов. Срезы ткани после гибридизации с биотинилированием ДНК-зондом обрабатываются антителами к биотину, меченными флуоресцентными метками, или меченными ферментом вторичными антителами (пероксидаза хрена), или белком А, меченным золотом (37):



Кроме этого, описан метод, основанный на высоком средстве биотина к белку стрептовидину, который, в свою очередь, образует комплекс с поли-щелочно-фосфатазным комплексом. Данный метод сравним по чувствительности с пероксидазным методом, однако, обладает некоторыми недостатками, в частности, довольно продолжительная инкубация с субстратом (до 4 часов) приводит к увеличению фоновой реакции и недостаточно стабильным цветным продуктам реакции, которые могут вымываться при проведении обезвоживания срезов перед заключением. Однако, заключение препаратов в водорастворимые среды практически полностью решает вторую проблему, хотя применение таких сред приводит к ограничению использования дополнительных красителей для "подкраски" срезов, способных вымываться в водорастворимых средах.

Тем не менее, по-видимому, главное преимущество метода с щелочной фосфатазой заключается в отсутствии необходимости использовать диаминобензидин, обладающий канцерогенной активностью, который используется в пероксидазном методе. Сравнительные данные об использовании разных способов метки зондов приведены в табл. 8 (Harrison, Pearson, 1990):

Типы меток (*)				
	H^3	S^{35}	P^{32}	Биотин(**)
Время экспозиции	месяцы	недели	дни	часы
Время полужизни изотопа	2 лет	3 месяца	2 недели	-
Локализация метки	Очень хорошая	Хорошая	Средняя	Очень хорошая
Чувствительность	Хорошая	Хорошая	Хорошая	Средняя
Фон	Низкий	Может быть высоким	Средний	Может быть высоким
Сохранность	Очень хорошая	Хорошая	Средняя	Отличная
Специфическая активность	Низкая	Высокая	Высокая	-
<p>* I^{125} также может быть использован для гистохимической гибридизации мРНК in situ. Использование изотопа иода ограничено высоким уровнем радиации;</p> <p>** Биотин может быть визуализирован несколькими путями, например, при помощи авидина, щелочной фосфатазы, пироксидазы или иммунофлуоресцентных методов.</p>				

3.2.3. Условия гибридизации

Главные усилия при подборе условий гибридизации направлены на увеличение интенсивности реакции и уменьшение неспецифического связывания зонда с мРНК. В инкубационные среды добавляются разные соединения (например, формамид), позволяющие уменьшить температуру инкубации, что в свою очередь, уменьшает разрушение ткани в процессе гибридизации и уменьшает фоновое, неспецифическое, связывание зонда с тканевой мРНК.

Инкубация обычно проводится при температуре 15-25°C, т.е. ниже температуры плавления, при которой около половины гибридов

диссоциирует. Этот фактор особенно важен для олигонуклеотидных зондов, т.к. уменьшение гибридов происходит в узком температурном диапазоне.

В большинстве методик гибридизация проводится в течение ночи. Однако, для каждого конкретного зонда кинетика специфической и неспецифической гибридизации различны и поэтому правильный выбор продолжительности инкубации является важным параметром, определяющим общий успех всей процедуры.

После гибридизации срезы промываются для уменьшения неспецифической реакции. На этой стадии применяется также обработка срезов SI нуклеазой или РНКазой, которые разрушают, соответственно, ДНК или РНК, не вступившие в реакцию гибридизации.

3.2.4. Контрольные процедуры

Два типа контрольных процедур обычно используются при гистохимической гибридизации мРНК *in situ*:

- 1) общие контрольные инкубации, часто аналогичные тем, которые проводятся при рецепторной радиоавтографии;
- 2) группа процедур, необходимая для контроля специфичности гибридизации зонда с исследуемой мРНК.

Обычно **общие контрольные опыты** могут включать следующие приемы: а) обработку срезов РНКазой до гибридизации для определения связывания зонда с мРНК, а не с другими макромолекулами внутри клеток; б) проведение гибридизации в присутствии большого излишка немеченного зонда, что создает конкуренцию связыванию меченного зонда, в случае специфического взаимодействия зонда с мРНК; в) можно использовать температурный фактор в контрольных опытах. В связи с тем, что гибрид зонда и мРНК стабилен при определенной температуре, проведение гибридизации при повышенной температуре должно приводить к уменьшению положительной реакции.

В случае "специфических" контрольных опытов можно использовать несколько методов. Для изучения специфичности связывания зонда с целевой мРНК можно провести инкубацию с двумя различными олигонуклеотидами, комплементарными разным участкам одной и той же мРНК. Идентичность полученного распределения мРНК в данном случае является хорошим контролем специфичности реакции. Другой метод заключается в сравнительном анализе связывания зонда с мРНК методом Нозерн-блоттинга и гибридизации *in situ*. Если связывание происходит в одной полосе, это показывает, что только один фрагмент мРНК определяется *in situ*. Эти и другие контрольные опыты приведены в табл.9:

Табл. 9

Метод	Результат
Обработка РНКазой до гибридизации	Разрушение тканевой РНК (отрицательная реакция)
Увеличение температуры инкубации	Параллельное уменьшение интенсивности реакции
Добавление избытка немеченного зонда	Конкурентное уменьшение интенсивности реакции
Использование некомплементарных последовательностей	Подтверждение специфичности реакции с зондом
Нозерн-блоттинг	(а) Подтверждение присутствия мРНК (б) Подтверждение специфичности реакции
Иммуногистохимия	Показывает наличие кодируемого белка в клетках, содержащих мРНК
Разные зонды к той же целевой мРНК	Подтверждение специфичности локализации целевой мРНК

3.2.5. Ограничения метода

Гибридизация мРНК *in situ* является методом, определяющим локализацию определенной (целевой) мРНК в отдельных клетках, однако, метод не позволяет

определять динамические характеристики генной экспрессии в клетках. Поэтому интерпретация количественных изменений уровня реакции с определенным зондом затруднительна и не всегда однозначно свидетельствует о количественных параметрах синтеза белка.

Имеется ряд факторов, мешающих правильной интерпретации результатов гистохимической реакции - факторы, влияющие на стабильность и разрушение мРНК, включая некодируемые области и поли(А)-концы мРНК; активность внутриклеточных рибонуклеаз и др.

Интерпретация отрицательной реакции при гибридизации мРНК *in situ* должна проводиться с осторожностью, так же как в случае иммуногистохимических реакций. Особенно сложная ситуация возникает в случае, когда параллельное иммуногистохимическое исследование дает положительную реакцию на изучаемый белок, а гибридизация *in situ* показывает отрицательный результат. Аналогичные затруднения возникают при обратной ситуации. В таких случаях необходимы тщательные дополнительные исследования с использованием разных методов.

3.2.6. Использование метода гибридизации *in situ*

Метод гибридизации мРНК *in situ* является одним из последних методов, вошедших в арсенал современных гистохимических лабораторий. Практическая реализация этого метода требует условий и реагентов, часто недоступных для обычной гистохимической лаборатории, поэтому метод пока не является широко распространенным, не взирая на его использование в последние 10-15 лет. Тем не менее накоплен значительный экспериментальный материал и опубликовано много статей и специальных монографий о результатах использования данного метода в фундаментальных биологических и медицинских исследованиях.

При помощи метода гибридизации мРНК *in situ* изучалась клеточная локализация синтеза многих нейроспецифических пептидов, рост-стимулирующих белков, включая инсулин подобных факторов и факторов роста нервов, G-белков и других белков - вторичных посредников рецептор-лигандных взаимодействий, онкогенов, эндогенных факторов, связанных с патологическими процессами и др.

В заключение необходимо отметить, что методы иммуногистохимии и метод гибридизации мРНК *in situ* являются мощными средствами, обогатившими и дополнившими классическую гистохимию новыми возможностями в изучении химических процессов на уровне морфологически неразрушенных клеток и тканей.

Контрольные вопросы

1. Методы иммуноцитохимии. Общие принципы
2. Использование иммуноцитохимии в гистохимии пептидов и белков.
3. Иммуноцитохимия низкомолекулярных соединений.
4. Контроли и артефакты в иммуноцитохимии.
5. Флуоресцентная иммуноцитохимия.
6. Место метода гибридизации мРНК *in situ* в современной гистохимии. Основные принципы
7. Артефакты и проблемы метода гибридизации мРНК *in situ*.
8. Изучение локализации синтеза белков в тканях методом гибридизации мРНК *in situ*



РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА (Раздел 4, Глава 3)

1. Угрюмов М.В. Современные методы гистохимии. Изд. ВИНТИ, М. 1992

2. Полак Дж., Ван Норден С. Введение в иммуноцитохимию: современные методы и проблемы, Мир, М., 1987
3. Пирс Э. Гистохимия. Теоретическая и прикладная. ИИЛ, М., 1962
4. Луппа Х. Основы гистохимии, Мир, М., 1980
5. Гайер Г. Электронная гистохимия, М., Мир, 1974



Глава 4. Физические методы в гистохимии

4.1. Введение

К физическим методам, используемым для гистохимических целей, необходимо отнести ряд специальных видов микроскопии и, прежде всего, методы фазово-контрастной, поляризационной, интерференционной, флуоресцентной и ультрафиолетовой микроскопии, микроспектрального анализа и др. Каждый из перечисленных видов микроскопии имеет разный вклад в развитие гистохимических исследований и имеет свои особые возможности для изучения клеток и тканей. В кратком обзоре невозможно детально описать границы, преимущества и проблемы, связанные с использованием указанных направлений физической аналитической гистохимии, но основные области их использования можно кратко обозначить.

Главное преимущество **фазово-контрастной микроскопии** заключается в

возможности визуализировать фазовые микроскопические объекты, к которым относится большинство нативных клеток животных. Это преимущество особенно важно для прижизненного анализа структуры клеток и тканей.

Поляризационная микроскопия позволяет наблюдать биологические структуры с высокой степенью молекулярной ориентации, структуры, обладающие двойным лучепреломлением, т.е. структуры имеющие вид ориентированных волокон, кристаллы и др.

Интерференционная микроскопия позволяет количественно определять содержание сухого вещества в клетках, определять толщину срезов, создавать интерференционный контраст, улучшающий визуализацию клеточных и тканевых структур.

Микроспектральный анализ представляет основу количественной гистохимии и позволяет также получить ценную информацию о химическом взаимодействии красителей с клеточными и тканевыми структурами, процессах, связанных с собственными спектральными характеристиками клеток и тканей и т.д.

4.2. Ультрафиолетовая микроскопия (поглощение)

Значительное влияние на развитие гистохимических методов, особенно методов изучения нуклеиновых кислот, несомненно, имело введение в гистохимическую практику методов ультрафиолетовой микроскопии.

Применение ультрафиолетовой микроскопии для изучения биологических структур связано с классическими работами Т.Касперсона, проведенными в 1936-1940 годах при изучении нуклеиновых кислот.

Молекулы нуклеиновых кислот, благодаря содержанию в них пуриновых и пиримидиновых оснований, обладают высоким поглощением в области 260 нм, поэтому измерение поглощения УФ при этой длине волны лежит в основе

прямого (без использования красителей) качественного и количественного метода определения нуклеиновых кислот.

Ультрафиолетовая микроскопия имеет следующие преимущества, по сравнению с гистохимическими методами выявления нуклеиновых кислот при помощи реакций с красителями:

- Изучение поглощения света в ультрафиолетовой области спектра нуклеиновыми кислотами является прямым методом их качественного и количественного определения. В некоторых случаях этот метод можно использовать для прижизненного изучения клеток, но при этом метод становится полуколичественным, т.к. нельзя дифференцировать поглощение, обусловленное ДНК, РНК и белками, а также учесть влияние рассеянного света. Кроме этого, УФ оказывает повреждающее действие на живые клетки, которое можно уменьшить при использовании телевизионных микроскопов с бегущим пятном;

- Можно исследовать растворимые компоненты (растворимая РНК или низкомолекулярные нуклеотиды), которые вымываются из тканевых и клеточных препаратов при классических методах окраски. Соли лантана не влияют на поглощение в УФ области спектра, поэтому для определения количества растворимой РНК можно в качестве фиксатора использовать смесь лантан-трихлоруксусная кислота с последующим применением специальных методов экстракции растворимой РНК;

- Применение метода, основанного на поглощении УФ, очень важно для проверки результатов, полученных с помощью световой микроскопии. Например, были получены дополнительные доказательства существования хромосомной РНК; проводилось изучение потери пуринов в ходе реакции Фельгена и др.

- Наибольший интерес представляет использование метода ультрафиолетового поглощения для изучения экспериментально вызванных

изменений в молекулах ДНК с конечной целью получить цитохимические оценки соотношения оснований в различных участках хромосомы. Поскольку при тепловой денатурации ДНК поглощение УФ увеличивается, а температура денатурации зависит от соотношения оснований, исследование возрастания локального поглощения УФ хромосомами при нагревании позволяет судить о соотношении оснований в данном участке молекулы ДНК.

При использовании метода ультрафиолетового поглощения для изучения нуклеиновых кислот обязательно используются рибонуклеаза и дезоксирибонуклеаза для выделения специфического поглощения УФ ДНК и РНК и неспецифического поглощения белков при 260 нм.

Однако имеется несколько проблем при использовании методов ультрафиолетовой микроскопии. Например, возникают большие сложности при подборе прозрачной для УФ среды для заключения препаратов. В качестве такой среды обычно используется глицерин ($n=1.475$).

Необходимо правильно определить химические фиксаторы, которые не должны содержать ионов, поглощающих УФ (хром, ртуть и др.). Нельзя применять очень кислые фиксаторы, способные привести к гидролизу фенольных групп белков, что приведет к изменению спектров поглощения. Необходимо избегать фиксаторов, денатурирующих ДНК.

4.3. Ультрафиолетовая микроскопия (флуоресценция)

В 1956-1960 годах Е.М.Брумбергом был предложен **метод микроскопического анализа УФ-люминесценции**. Этот метод имеет важное значение для цито- и гистохимии по нескольким обстоятельствам:

- УФ-люминесценция обусловлена белками, содержащимися в клетках, в

наибольшей степени за счет входящих в них ароматических аминокислот. Кроме этого, УФ-люминесценцией обладают нуклеиновые кислоты, свободные нуклеотиды, некоторые коферменты и витамины;

- параметры УФ-люминесценции белков очень чувствительны к изменению структуры белковых макромолекул. Это открывает возможность получать информацию об особенностях макромолекулярной организации белков внутриклеточных структур, а также регистрировать конформационные превращения белков в процессе жизнедеятельности клетки;

- метод УФ-люминесценции можно использовать для изучения живых клеток. Например, показано, что ряд соединений в клетках обладают выраженной УФ-флуоресценцией: нативный актин - 325 нм (инактивация актина приводит к сдвигу флуоресценции в область 337 нм); витамин В-12 - 305 нм; основание В-12 - бензимидазол - 365 нм; витамин Е - α -токоферол - 340 нм; эстрогены - 325-330 нм, и др. Однако, измерение УФ-флуоресценции используется, в основном, для изучения динамических характеристик белков в клетках.

4.4. Заключение

В кратком обзоре невозможно отразить все направления развития современной гистохимии, ее достижения и проблемы. Однако хотелось бы еще раз обратить внимание на две тенденции в развитии светооптической гистохимии.

Во-первых, невзирая на довольно сложную и продолжительную историю развития гистохимии, как важного раздела экспериментальной цитологии, насчитывающую около 160 лет, необходимо отметить, что гистохимия получила научное признание, как направление клеточной и тканевой биохимии, по-видимому, в середине прошлого столетия, когда появился

большой набор специализированных международных журналов в области гистохимии. Такой "взрыв" интереса к гистохимическим публикациям нельзя не оценить, как отображения важной роли гистохимии в современных фундаментальных и прикладных исследованиях на клеточном уровне.

Во-вторых, важное значение для развития гистохимии имеет проникновение новейших достижений и методик современных экспериментальных наук и, прежде всего, идей и методов иммунологии и молекулярной биологии. На стыке этих наук и современной гистологии и цитологии возникли чрезвычайно информативные технологии гистохимического анализа.

По сути, современная светооптическая гистохимия представляет смесь классических подходов, часто во многом эмпирических, основанных на использовании различных красителей, индикаторов и аналитических реакций; методов прямого оптического анализа клеточных и тканевых препаратов с использованием разных видов микроскопии и комплексных технологий, разработанных на основе сочетания методов сопредельных направлений молекулярной биологии и методов гистологической микротехники.

В последнее десятилетие в области гистохимии революционное значение имеет развитие новых методов оптической аналитической микроскопии, особенно в области флуоресцентной микроскопии. Не менее важный прогресс имеется в области развития новых типов красителей, которые расширили круг задач, решаемых гистохимией. Особенно необходимо отметить расширение арсенала флуорохромов для изучения белков, нуклеиновых кислот, для исследования ионов и др. Активно изучаются и внедряются в гистохимическую практику так называемые «зеленые белки», позволившие уже сейчас ставить и решать сложные задачи белковой гистохимии. За открытие и исследование

«зеленых белков» американским ученым Р.Тсьену, М.Чалфи и О.Шимомуре присуждена Нобелевская премия 2008 г. по химии.

Контрольные вопросы

1. УФ-микроскопия и микроскопия собственной флуоресценции внутриклеточных соединений, использование в гистохимии.
2. Проблема артефактов в гистохимии. Контрольные препараты в гистохимии
3. Микробиохимия - вариант количественной гистохимии.
4. Динамическая гистохимия (кинетика гистохимических реакций).
5. Значение гистохимии в фундаментальных цитологических исследованиях (изучение клеточного метаболизма, клеточного цикла и др.).
6. Гистохимия и медицина (цитопатология, цитодиагностика).



РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА (Раздел 4, Глава 4)

1. Пирс Э. Гистохимия. Теоретическая и прикладная. ИИЛ, М., 1962
2. Луппа Х. Основы гистохимии, Мир, М., 1980
3. Карнаухов В.Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки. Наука, М., 1978
4. Методы цитологического анализа. Ред. Меллорс Р., ИИЛ, М., 1957
5. Введение в количественную цитохимию. Ред. Вейд Г., Мир, М., 1969
6. Черногрядская Н.А., Розанов Ю.М., Богданова М.С., Боровиков Ю.С. Ультрафиолетовая флуоресценция клеток, Л., Наука, 1978
7. Бродский В.Я. Трофика клетки. Наука, М., 1966
8. Хруст Ю.Р., Литинская Л.Л., Соколова Г.А., Оглобина Т.А. Методическое пособие по количественной цитохимии. Изд. МГУ, М., 1973
9. Журавлева Т.Б., Прочуханов Р.А. (ред.) Введение в количественную гистохимию ферментов. Медицина, М., 1978

