

**Методические рекомендации для контролируемой  
самостоятельной работы студентов по теме:  
ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.**

**I. Учебная программа по теме.**

Специальные методы изучения микрообъектов – гистохимия, электронная гистохимия.

**II. Целевая установка:** изучить суть гистохимического метода исследования, особенности и основные этапы подготовки материала для гистохимических исследований. Ознакомиться с принципами и методами гистохимического исследования основных классов химических соединений, имеющих в клетках и тканях. Ферментная гистохимия, ее принципы.

**III. Учебно-методическая литература.**

1 Методы исследования в гистологии : учебно-метод. пособие под ред. С.М. Зиматкина. – Гродно : ГрГМУ, 2010. – С. 44–78.

2 Гистологические методы исследования : учеб. пособие для магистрантов / С. М. Зиматкин [и др.] ; под ред. проф.С. М. Зиматкина. – Гродно : ГрГМУ, 2015. – С. 53–87.

3 Гистология, цитология и эмбриология : учебник / С. М. Зиматкин [и др.]. – Минск, Вышэйшая школа, 2018. – С. 10–11.

4 Кузнецов, С. Л. Гистология, цитология и эмбриология : учебник / С. Л. Кузнецов, Н. Н. Мушкамбаров. – 3-е изд., испр. и доп.. – М. : ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2016. – С. 31–32.

5 Зиматкин, С. М. Гистология, цитология и эмбриология: практикум для студентов медико-диагностического факультета / С. М. Зиматкин, Я. Р. Мацюк, Л. А. Можейко – Гродно: ГрГМУ, 2018. – С. 68–71.

**IV. Краткий конспект.**

Гистохимия – наука, связывающая гистологию и биохимию. При проведении химических реакций в срезах органов получают точную картину тканевого (собственно гистохимия), клеточного (цитохимия) и субклеточного (электронная гистохимия) распределения содержания веществ или активности ферментов. Гистохимические методы могут значительно быстрее и точнее, чем гистологические, выявить в клетках и тканях функциональные, возрастные и патологические изменения. Их используют для выяснения патогенеза, диагностики и разработки новых методов лечения многих заболеваний. Электронно-микроскопическая гистохимия – проведение

гистохимических исследований в ультратонких срезах с помощью электронного микроскопа открывает перспективы для исследования содержания различных химических веществ и активности ферментов в клетках на ультраструктурном уровне и их изменений в физиологических и патологических условиях.

Для гистохимических исследований используется разнообразный по своему происхождению материал: экспериментальный (от лабораторных животных), трупный (при аутопсии умерших людей), хирургический (взятый во время операции), биопсийный, мазки, соскобы, отпечатки, культуры тканей.

При взятии материала следует руководствоваться следующими правилами: материал для гистохимического исследования следует брать как можно быстрее, так как степень структурных и, особенно, химических нарушений находится в прямой зависимости от сроков после смерти. Кусочки материала должны быть небольшими (до 5 мм), но достаточными, чтобы провести нужное исследование. Материал быстро замораживают в парах жидкого азота. Затем в криостате (при  $-10-20^{\circ}\text{C}$ ) готовят срезы толщиной 10-20 мкм, монтируют на предметные стекла и используют для гистохимических исследований.

Вместе с тем, некоторые гистохимические реакции можно проводить и на парафиновых срезах. В этих случаях для гистохимических исследований материал фиксируют. Например, для выявления полисахаридов и нуклеиновых кислот образцы фиксируют в жидкости Карнуа с последующим заключением в парафин, а для выявления активности щелочной фосфатазы материал фиксируют в ацетоне. Для выявления содержания липидов материал перед замораживанием фиксируют в формалине или жидкости Буэна. В случае заливки материала в затвердевающие среды (парафин, целлоидин и др.) перед постановкой гистохимических реакций их следует из срезов полностью удалить, как это делается при изготовлении гистологических препаратов.

**Постановка гистохимических реакций.** На срезы (мазки) ткани, располагающиеся на предметных стеклах, наносят инкубационный раствор. В нем содержится химические реактивы для специфической реакции с субстратом, входящим в состав клеточных и тканевых структур. Постановку реакции проводят в соответствии с требованиями гистохимического метода (время инкубации, рН, концентрации компонентов среды, условия послеинкубационной обработки).

В результате гистохимических реакций в срезах (мазках) тканей образуются соответствующие окрашенные продукты, которые прочно

связываются с биологическими структурами и показывают локализацию и содержание изучаемых химических соединений, либо активность ферментов. Возникновение окраски при постановке гистохимических реакций – сложный физико-химический процесс, в котором могут преобладать физические (при окраске липидов) или химические (при выявлении активности ферментов) факторы.

**Приготовление постоянного гистохимического препарата.** В постоянном препарате закрепляется состояние срезов органов и тканей, достигнутое в результате гистохимической реакции. Если позволяет гистохимический метод, окрашенный срез обезвоживают, просветляют и заключают в полистирол или канадский бальзам, как при изготовлении обычных гистологических препаратов. При этом получают *постоянные* препараты, которые можно длительно хранить в затемнённом месте. Если изучаемое вещество или краситель растворяются в органических растворителях, применяемых для обезвоживания и просветления, то для заключения срезов используют жидкие затвердевающие среды: глицерин-желатина, глицерин и др. Тем не менее, эти препараты долго храниться не могут и называются *временными*. Затем, готовые гистохимические препараты изучают с помощью микроскопов (микроскопируют).

## НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

**Нуклеиновые кислоты** – биополимеры, состоящие из цепочек нуклеотидов: из азотистого основания (пуринового или пиримидинового), рибозы или дезоксирибозы и фосфорной кислоты. Различают дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), которые расположены преимущественно в ядре и рибонуклеиновые кислоты (РНК – информационные, рибосомальные, транспортные), расположенные преимущественно в ядрышках и рибосомах цитоплазмы.

**Выявление нуклеиновых кислот по методу Эйнарсона.** Даёт возможность количественно выявить на препарате ДНК и РНК. При окрашивании галлоцианином-хромовыми квасцами (ГХК) образуется устойчивая окраска, которая не изменяется при обезвоживании спиртами. При этом методе перекрашивание срезов исключено. Максимальная специфичность окраски при pH 1,5-1,75. При кипячении галлоцианина с квасцами образуется хромовый крапак, который образует солевые связи с остатками фосфорной кислоты нуклеотидов. Такой комплекс имеет тёмно-синий цвет. При этом каждый нуклеотид связывается с одной молекулой красителя. Для гистохимического исследования этим методом используют парафиновые и криостатные срезы, мазки после фиксации в жидкости Карнуа и формалине. Нуклеиновые кислоты окрашиваются в серо-

голубоватый цвет.

**Выявление нуклеиновых кислот смесью метилового зелёного-пиронина по методу Браше.** В качестве красителей используют метиловый зелёный и пиронин. В результате, пиронин окрашивает РНК ядрышек и цитоплазмы в красный цвет, а метиловый зелёный окрашивает ДНК хромосом в зелёный цвет. Метод даёт очень красивую, яркую окраску, но не пригоден для количественного исследования нуклеиновых кислот.

**Выявление нуклеиновых кислот акридиновым оранжевым.** Метод основан на способности акридинового оранжевого взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами и образовывать комплекс, который поглощает ультрафиолетовые лучи, а затем даёт красную (при взаимодействии с РНК) и зелёную (при взаимодействии с ДНК) люминесценцию. Соединительнотканые волокна люминесцируют зеленым цветом.

**Выявление ДНК по Фельгену.** Метод основан на гидролитическом расщеплении ДНК (обычно под влиянием 1 н. раствора HCl) с последующим взаимодействием реактива Шиффа с дезоксирибозой. В результате ДНК окрашивается в пурпурный цвет. Метод пригоден для количественной оценки содержания ДНК. Реакцию Фельгена используют для изучения различных форм деления клеток и подсчета индекса митозов.

## БЕЛКИ

Гистохимические методы позволяют выявить локализацию белковых соединений в клетках и тканях, качественный состав белков и их количество (поскольку количество красителя, связанного с белками, пропорционально содержанию белковых веществ в тканях).

**Выявление суммарных белков.** Существует несколько методов использующих различные красители, позволяющих выявлять белки. Реакции проводят на парафиновых и криостатных срезах после фиксации материала в 10% формалине или жидкости Карнуа.

**Метод Бонхега** основан на окрашивании срезов бромфеноловым синим. При этом количество связанного красителя (интенсивность окраски) пропорционально содержанию в структурах белковых веществ. Локализацию белковых соединений определяют по темно-синему окрашиванию.

**Реакция Миллона.** Это биохимический метод выявления белков, модифицированный для количественного гистохимического исследования. Метод основан на образовании нитрозортутных производных аминокислот тирозина и триптофана, которые входят в состав полипептидных цепей белков. Белки, содержащие тирозин или триптофан, окрашиваются в розово-красный или оранжевый цвет. Окраска устойчива в течение нескольких месяцев. Протамины и коллагены не окрашиваются.

**Определение белков раствором амидочерного 10 В.** Возникновение окраски связано с образованием ионных связей между кислотными группами молекул красителя и основными группировками белков (аминогруппами лизина, гуанидиновой группой аргинина и имидозольным кольцом гистидина). Метод очень прост, но поскольку различные белки связывают неодинаковое количество молекул красителя, по-видимому, непригоден для цитофотометрии. Суммарные белки окрашиваются в различные цвета – от черного до красного.

**Выявление функциональных групп белков.** Гистохимическими методами можно выявить карбоксильные (COOH), аминогруппы (NH<sub>2</sub>) и сульфгидрильные (SH) группы белков по методу **выявления сульфгидрильных групп по Бернетту и Зелигману**. Место локализации выявляют по широкой гамме цветов – от розового до темно-синего. В качестве контроля используют препараты, в которых срезы перед окраской на белки обрабатывают протеолитическими ферментами (пепсин, трипсин), либо блокаторами функциональных групп белков. При этом в контроле белки не окрашиваются.

**Гистохимическое выявление аминокислот.** Свободные аминокислоты в срезах не определяются из-за их растворимости в воде. Возможно выявление аминокислот связанных с белками в виде остатков. При этом достоверно можно определить четыре аминокислоты: аргинин, тирозин, триптофан и гистидин.

## ЛИПИДЫ

Это большая группа органических соединений, различающихся по строению и значению. В клетках и тканях липиды находятся в виде смесей и комплексных соединений. Они не растворяются в воде, но растворяются в органических растворителях. Поэтому при гистохимическом исследовании липидов следует полностью исключить контакт образцов исследуемого материала с органическими растворителями (спирт, хлороформ, бензол, эфир, ацетон) и заливка кусочков ткани в парафин или целлоидин является недопустимой. Гистохимическое исследование липидов проводится на замороженных срезах тканей, фиксированных формалином, жидкостью Бэкера, формоловыми смесями (не более двух суток). Выявление общих (суммарных) липидов

**Окраска суданом чёрным по Лизону.** Основано на растворении судана чёрного в липидах, особенно в фосфатидах (фосфолипидах).

В качестве красителя используют насыщенный раствор судана черного в 70% этаноле. Липиды окрашиваются в черно-серый цвет. Хорошо окрашивается миелин, проводящие пути центральной и периферической

нервной системы. Выявлены синапсы на моторных нейронах спинного мозга.

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

**Выявление нейтральных жиров (триглицеридов)** основано на том, что диазокрасители судан III и IV очень хорошо растворяются в нейтральных жирах, поэтому из худшего растворителя (этанола) они экстрагируются нейтральным жиром, окрашивая последний в оранжевый цвет.

### УГЛЕВОДЫ

Гистохимическими методами выявляются лишь те углеводы, которые при фиксации остаются в составе структур, не вымываются и не диффундируют. К ним относятся высокомолекулярные биополимеры (полисахариды) и вещества с более низким молекулярным весом типа олигосахаридов, но прочно связанные с белками в единый комплекс (мукоили гликопротеиды). Полисахариды легко растворяются в воде, но не в спиртах и органических растворителях, поэтому они хорошо выявляются на парафиновых срезах органов и тканей, фиксированных жидкостями Карнуа, Шабадаша и Бауэра. Свободные моно- и олигосахариды из-за хорошей растворимости в воде гистохимическими методами не выявляются.

**Гистохимическое определение гликогена и нейтральных мукополисахаридов** – самым распространённым методом в гистохимии углеводов является ШИК (Шифф-Йодная Кислота) или PAS (Periodic Acid-Schiff) реакция. Она основана на избирательном окислении йодной кислотой (или её солями) 1,2-гликольных (спиртовых) групп углеводных соединений до альдегидов. Образовавшиеся диальдегидные группы выявляют с помощью реактива Шиффа, представляющего собой водный раствор фуксинсернистой кислоты.

**Метод Шабадаша.** Основан на окислении спиртовых групп глюкозных остатков гликогена периодатом калия или натрия с выявление образующихся альдегидных соединений реактивом Шиффа, с образованием конечного окрашенного продукта красного цвета, по локализации которого определяется гисто- и цитотопография гликогена. Гликоген окрашивается в интенсивный фиолетово-вишневый цвет, мукоиды и гликопротеиды – красноватые.

К кислым полисахаридам относятся гиалуроновая кислота, хондроитинсерная кислота, гепарин, кератосульфат, гепаринсульфат.

Выявление кислых мукополисахаридов альциановым синим, является простым и надёжным методом дифференцированного выявления сиало- и сульфомуцинов при разных значениях pH. Альциановый синий – сложный

основной краситель, хорошо взаимодействующий с карбоксильными и сульфатными группами кислых мукополисахаридов при низких значениях рН. При рН=2,5 гиалуроновая кислота и сиаломуцины окрашиваются в тёмно-голубой цвет, сульфатированные МПС окрашиваются слабо, а при рН 1 в тёмно-голубой цвет окрашиваются только сульфомуцины (гепарин, гепаринсульфат, кератосульфат).

### **ГИСТОХИМИЯ ФЕРМЕНТОВ**

Ферменты – белки с каталитическими свойствами. Они определяют направление, скорость и саму возможность осуществления большого числа химических реакций протекающих в живом организме. Ферменты катализируют метаболические реакции благодаря наличию в них активных центров, преобразующих субстрат.

В настоящее время известно более тысячи ферментов, которые разделяют на 6 классов: 1) оксидоредуктазы, 2) трансферазы, 3) гидролазы, 4) лиазы, 5) изомеразы, 6) лигазы. Более чем для 100 ферментов разработаны гистохимические методы исследования. При проведении гистохимической реакции должен образоваться нерастворимый окрашенный продукт, указывающий на локализацию данного фермента в клетках и тканях. При этом интенсивность окраски реакции (в оптимальных условиях) определяется активностью фермента.

В гистохимических методах выявления ферментов можно выделить несколько видов химических реакций:

#### **1. Реакции осаждения (наиболее распространены):**

а) С ионами металлов (в качестве захватывающего агента используются  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Pb}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$  или  $\text{Ba}^{++}$ ) - тип Гомори;

б) Одновременное азосочетание (в качестве субстрата применяют производные нафтола, а для сочетания и осаждения используют соли диазония – прочные синий, красный, гранатовый, которые реагирует с продуктом первичной реакции с образованием водонерастворимого азокрасителя).

в) Индигогенные методы (в качестве субстрата применяют производные индоксила или индоксиламина, которые в присутствии окислителя (феррицианид калия, феназинметасульфат, соль тетразолия) окисляются до синего индиго, который осаждается в виде нерастворимого синего красителя).

г). Тетразолиевые методы (при окислении субстрата дегидрогеназами происходит восстановление присутствующей в инкубационной среде растворимой соли тетразолия до нерастворимого формазана, который выпадает в осадок в местах локализации изучаемого фермента).

2. **Последовательное азосочетание** (азосочетание как в 1б проводится последовательно в двух разных средах). Используется редко, если соли дазония сильно угнетают изучаемый фермент.

3. **Реакции синтеза.** Лежит в основе выявления гликозилтрансфераз. В результате синтеза образуется полиглюкан, который выявляется реакцией ШИК (как полисахарид).

4. **Методы субстратной плёнки.** Лежит в основе выявления протеиназы, нуклеазы и амилазы. Предметное стекло покрывают плёнкой, содержащей высокомолекулярный субстрат, на неё наносят срез исследуемого органа. Фермент будет расщеплять субстрат до мономеров, которые удаляются при промывке. После проведения реакции плёнки окрашивают; в местах локализации ферментативной активности краска отсутствует.

### **Оксидоредуктазы (дегидрогеназы)**

К данному классу относятся около 200 ферментов, которые катализируют окислительно-восстановительные реакции, лежащие в основе биологического окисления. Дегидрогеназы состоят из белка (апофермента) и кофермента, представленного НАД или НАДФ. Каждый субстрат (группа субстратов) окисляется своей дегидрогеназой; например, молочная кислота – лактатдегидрогеназой, янтарная кислота – сукцинатдегидрогеназой. При этом от субстрата отщепляется водород (протон и электрон), который восстанавливает имеющийся в инкубационной среде бледно жёлтый нитросиний тетразолий (нитро-СТ) до нерастворимых формазанов красного (моно-) и синего (диформазаны) цвета. Все формазаны сохраняются в срезе при заключении их в глицерин-желатину. При изготовлении постоянных препаратов, заключении окрашенных срезов в полистирол (при обезвоживании в спиртах и просветлении в ксилолах) монофармазан растворяется, вымывается и в срезах остаётся только синяя окраска диформазаном.

**Выявление сукцинатдегидрогеназы (СДГ) по Нахласу, Уокеру и Зелигману.** Срезы помещают в инкубационную среду, содержащую субстрат – сукцината натрия и водный раствор нитро-СТ. Осадки ди- и монофармазана свидетельствуют о наличии и локализации СДГ.

### **Трансферазы**

К этому классу относят ферменты, катализирующие реакции внутри-молекулярного и межмолекулярного переноса отдельных атомов и атомных групп. Гистохимически среди них можно выявить фосфоорилазу, карбоангидразу, гликоген-фосфоорилазу и синтазу.



## Гидролазы

Эти ферменты осуществляют расщепление и синтез многих веществ при участии воды. Их делят на несколько подклассов, наиболее важными из которых являются эстеразы, гликозидазы и пептидазы. Известно около 170 гидролаз. Некоторые из них (описаны ниже) можно выявить гистохимически, используя принципы Гомори. При этом первый продукт ферментативной реакции связывают либо хлористым кальцием (его переводят затем в соль кобальта, как при выявлении щелочной фосфатазы), либо нитратом свинца (как при выявлении кислой фосфатазы). Затем бесцветные осадки фосфатов кобальта или свинца с помощью сульфида аммония переводят соответственно в окрашенные осадки сульфидов кобальта или свинца.

**Выявление щелочной фосфатазы (фосфомоноэстеразы) по Гомори.** Кусочки тканей фиксируют в 10% холодном нейтральном формалине (лучше в ацетоне) и заключают в парафин. Вначале под действием фермента происходит гидролиз глицерофосфата, отщепляющаяся фосфорная кислота вступает в реакцию с хлоридом кальция с образованием гидрофосфата кальция, который вступает в реакцию с нитратом кобальта. В заключение срезы обрабатывают сульфидом аммония, в результате чего образуется чёрный нерастворимый осадок сульфида кобальта, который выявляет места ферментативной активности.

**Выявление кислой фосфатазы (фосфомоноэстеразы) по Гомори.** Кусочки тканей или сами криостатные срезы свежемороженых тканей фиксируют в 10% холодном нейтральном формалине. Вначале под действием фермента происходит гидролиз глицерофосфата, отщепляющийся дигидрофосфат натрия вступает в реакцию с нитратом свинца. После обработки срезов сульфидом аммония выпадает нерастворимый окрашенный тёмно-коричневый осадок сульфида свинца, который выявляет места ферментативной активности. Локализация фермента определяется по осадкам тёмно-коричневого цвета. Много фермента в опухолях.

## Лиазы

Эти ферменты катализируют присоединение различных атомных групп к двойным связям или, наоборот, отщепление таких групп с образованием двойных связей. Гистохимически можно выявить альдолазу и карбоангидразу.

## V. Инструкции для выполнения практических заданий.

1. Зиматкин, С. М. Гистология, цитология и эмбриология: практикум для студентов медико-диагностического факультета

/ С. М. Зиматкин, Я. Р. Мацюк, Л. А. Можейко – Гродно: ГрГМУ, 2018. – С. 68–71.

2. Зиматкин, С. М. Гистология, цитология и эмбриология. Атлас учебных препаратов : учеб. пособие / С. М. Зиматкин. – Минск, Высшэйшая школа, 2016. – С. 9,15-16, 21, 39, 47-48, 51, 57.

3. Озвученная мультимедийная презентация:  
[https://www.youtube.com/watch?v=IVGxbv1H\\_X0&list=PL1\\_TM5oTU-4PLSv1CBk7572gS-DdKIdOQ](https://www.youtube.com/watch?v=IVGxbv1H_X0&list=PL1_TM5oTU-4PLSv1CBk7572gS-DdKIdOQ)

#### **VI. Вопросы для самоконтроля.**

1. Принципы гистохимических исследований.
2. Методы выявления нуклеиновых кислот, белков, липидов, углеводов.
3. Общая характеристика и классификация ферментов.
4. Разновидности гистохимических реакций определения активности ферментов.
5. Методы выявления активности ферментов.

#### **Ситуационные задачи:**

1. Исследователю необходимо выявить в нейронах нуклеиновые кислоты и количественно их оценить. Какой метод выявления нуклеиновых кислот он должен выбрать?

2. Перед исследователем поставлена задача одновременно определить локализацию РНК и ДНК в клетке. Какой метод следует использовать?

#### **VII. Темы рефератов для учебно-исследовательской работы студентов.**

1. История развития гистохимии как научного направления.
2. Значение гистохимии для фундаментальных и прикладных исследований в биологии и медицине. Новейшие направления развития гистохимии.
3. Методы оценки результатов гистохимического исследования. Применение систем визуализации и архивации изображений.

#### **VIII. Дополнительная литература.**

1. Методы исследования в биологии и медицине : учебник / В. Канюков; А. Стадников; О. Трубина; А. Стрекаловская. – Оренбург : ОГУ, 2013. – 192 с.

2. Мяделец, О. Д. Гистология, цитология и эмбриология человека.

Часть 1. Цитология, эмбриология и общая гистология: учебник / О. Д. Мяделец – Витебск: ВГМУ, 2014. – 439 с.

3. Овчаренко, Н. Д. Гистологические и гистохимические методы исследования: учеб. пособие / Н. Д. Овчаренко, Е. А. Кучина, Р. В. Тузикова ; АлтГУ. – Барнаул : Изд-во АлтГУ, 2013. – 130 с.

4. Янин, В. Л. Учебно-методическое пособие для аспирантов очной формы обучения к практическим занятиям по дисциплине «Методы исследования в цитологии и гистологии» / В. Л. Янин, О. М. Бондаренко, Н. А. Сазонова – Ханты-Мансийск: БУ «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия», 2015. – 65 с.

#### **IX. Тесты для самопроверки и экзаменационные вопросы.**

Гистология, цитология, эмбриология: тесты и экзаменационные вопросы / С. М. Зиматкин [и др.] ; под ред. С.М. Зиматкина. – Минск : Новое знание, 2014. – С. 6–9.

#### **X. Формы контроля.**

Компьютерное тестирование, итоговое занятие, УИРС.