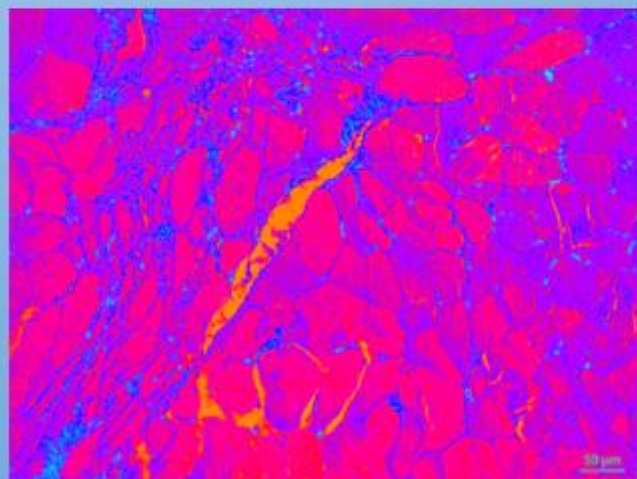
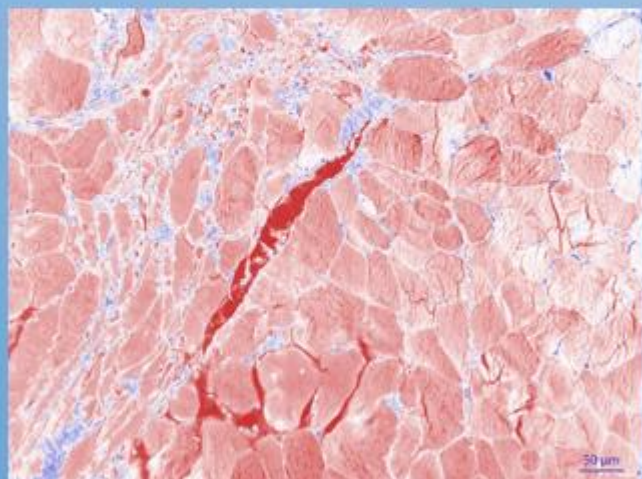
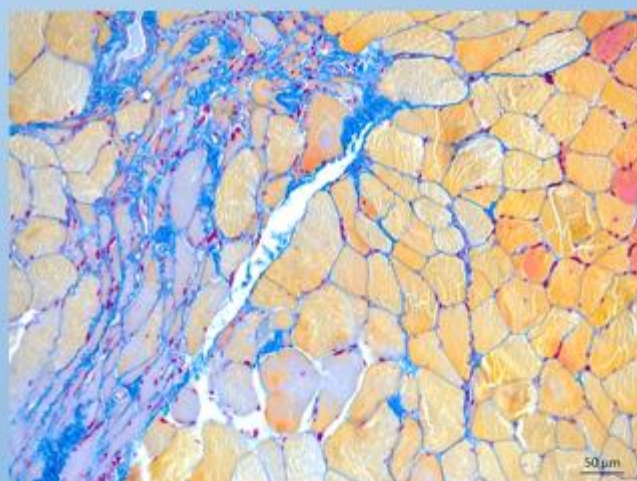
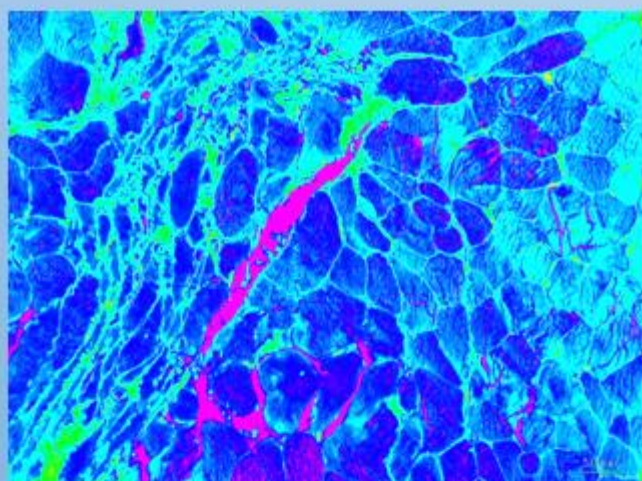
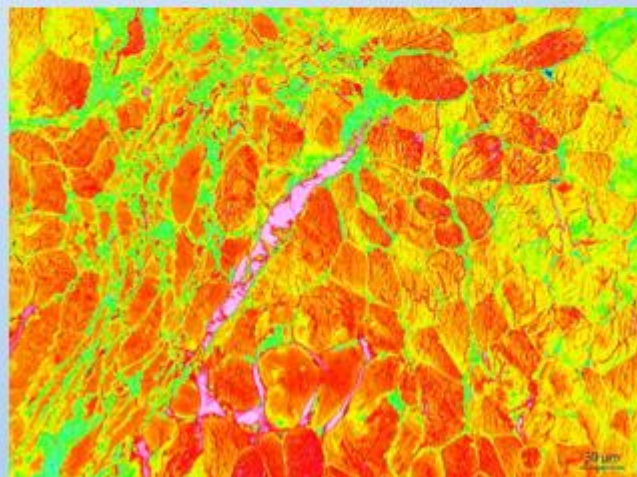
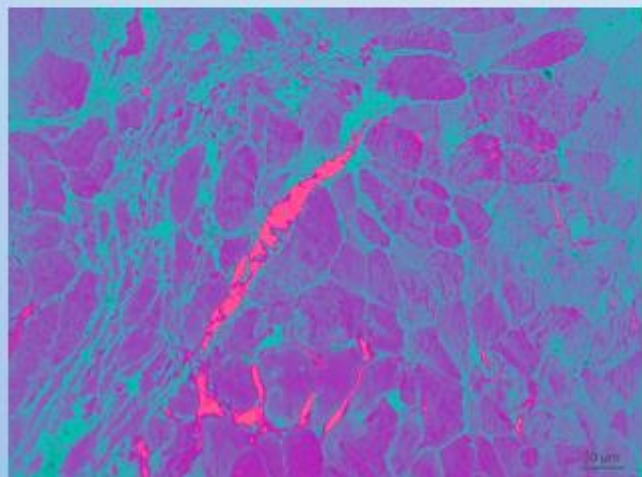


МАВЛИКЕЕВ М.О., АРХИПОВА С.С., ЧЕРНОВА О.Н., ТИТОВА А.А., ПЕВНЕВ Г.О.,  
ШАФИГУЛЛИНА А.К., КИЯСОВ А.П.

# КРАТКИЙ КУРС ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕХНИКИ



Казань – 2020

**КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**  
**ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ**  
*Кафедра морфологии и общей патологии*

**МАВЛИКЕЕВ М.О., АРХИПОВА С.С., ЧЕРНОВА О.Н., ТИТОВА  
А.А., ПЕВНЕВ Г.О., ШАФИГУЛЛИНА А.К., КИЯСОВ А.П.**

**КРАТКИЙ КУРС ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ  
ТЕХНИКИ**

*Учебно-методическое пособие*

**под научной редакцией кандидата медицинских наук, доцента  
Р.В. ДЕЕВА**

**Казань – 2020**

**УДК 57.086.1**  
**ББК 28с**

*Печатается по решению учебно-методической комиссии ИФМиБ КФУ  
Протокол № 4 от 22 января 2020 года*

**Научный редактор:**

кандидат медицинских наук,  
доцент кафедры патологической анатомии Северо-западного  
государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова **Р.В. Деев**

**Рецензенты:**

кандидат медицинских наук,  
доцент кафедры нормальной анатомии Казанского ГМУ **И.М. Газизов**  
кандидат медицинских наук,  
преподаватель кафедры морфологии и общей патологии КФУ **П.Н. Резвяков**

**Мавликеев М.О.**

**Краткий курс гистологической техники. Учебно-методическое пособие** / М.О. Мавликеев, , Архипова С.С., Чернова О.Н., Титова А.А., Певнев Г.О., Шафигуллина А.К., Киясов А.П. – Казань: Казан. ун-т, 2020. – 107 с.

Учебно-методическое пособие подготовлено в соответствии с требованиями учебной программы дисциплины «Методы исследования в биологии и медицине» для медицинских вузов. Учебно-методическое пособие содержит основные сведения о методах гистологической и микроскопической техники, изложены методики подготовки и обработки материала, необходимых для приготовления гистологических препаратов для изучения с помощью световой и электронной микроскопии.

Учебно-методическое пособие может быть использовано обучающимися по направлениям: Лечебное дело, Стоматология, Медицинская биохимия, Медицинская биофизика, Медицинская кибернетика и Фармация, а также аспирантами, биологами- бакалаврами и магистрами и всеми, кто использует в своих научных исследованиях методы гистологической техники.

© Мавликеев М.О., Архипова С.С., Чернова О.Н., Титова А.А., Певнев Г.О., Шафигуллина А.К., Киясов А.П. 2020  
© Казанский университет, 2020

## СОДЕРЖАНИЕ

1. ПРОБОПОДГОТОВКА ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ	5
2. ИЗГОТОВЛЕНИЕ ПАРАФИНОВЫХ СРЕЗОВ	17
3. ИЗГОТОВЛЕНИЕ ЗАМОРОЖЕННЫХ СРЕЗОВ	22
4. ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ОКРАШИВАНИЯ	25
5. ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ	31
6. ИММУНОГИСТОЛОГИЯ	34
7. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ И ПРОБОПОДГОТОВКИ ДЛЯ НЕЕ	70
8. БИБЛИОГРАФИЯ	80
9. ПРИЛОЖЕНИЕ	83

# 1. ПРОБОПОДГОТОВКА ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Получение качественных гистологических препаратов с диагностической и научной целями требует организации лабораторного процесса, строгой стандартизации всех этапов. Вместе с тем, гистологическая техника предполагает большое количество различных технологических нюансов. Данное руководство направлено на формирование детального понимания сути процессов, связанных с изготовлением гистологических препаратов – компетенции, необходимой для функционирования современной гистологической и патогистологической лаборатории.

Важнейшими условиями получения качественных гистологических микропрепаратов являются правильное взятие материала и фиксация.

## Взятие и вырезка материала

Взятие материала предполагает предотвращение высыхания и аутолиза образца ткани до фиксации, деформации инструментами, коагуляции белков электроножом, лазерным коагулятором и т.д. Оптимальный размер кусочков ткани для гистологического анализа определяется задачами исследования и, как правило, составляет не более 1,0×1,0×0,5 см, примерно соответствуя емкости гистологической кассеты для проводки (рис. 1). Подобный размер образцов позволит обеспечить быструю и равномерную пропитку материала фиксатором и предотвратить аутолиз ткани в глубине кусочка ткани.



Рис. 1. Гистологическая кассета

Существуют также кассеты увеличенного размера (рис. 2) и биопсийные (рис. 3) кассеты с уменьшенными отверстиями, иногда разделенные

внутри на несколько отсеков. Альтернативно для малых образцов во избежание их потери можно использовать стандартную кассету и переложить образец внутри двумя тонкими слоями поролона (рис. 4).

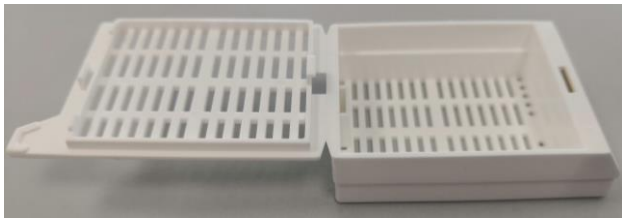


Рис. 2. Гистологическая кассета увеличенного объема

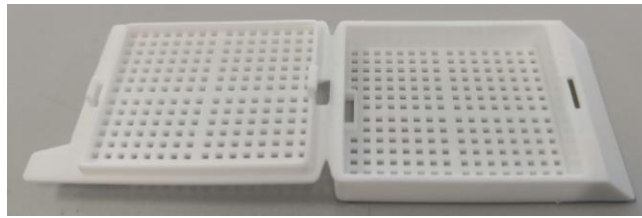


Рис. 3. Биопсийная гистологическая кассета

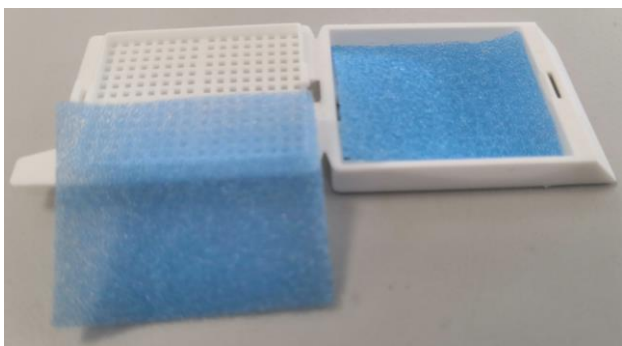


Рис. 4. Поролоновые прокладки для проводки биоптатов

При наличии патологического процесса в ткани или органе вырезку образца для гистологического исследования производят на границе с неизменной тканью. Образцы стенки полых органов и органов, имеющих регионарные особенности (например, корковое и мозговое вещество почки, надпочечника), должны содержать

все слои, капсулу при ее наличии. Для предотвращения деформации в ходе фиксации образцы стенки полых органов можно распластать на отрезке картона или фотобумаге слизистой оболочкой кнаружи, закрепив при необходимости булавками.

Вырезку следует производить острыми инструментами, хирургическим скальпелем или бритвой (лезвием), уверенным одномоментным движением, исключая раздавливание и иное повреждение материала.

Вырезанные кусочки ткани погружают в емкость с фиксирующей жидкостью. Не допускается сдавливание образцов, промывание их водой, очистка поверхности инструментами, пальцами и т.п.

Емкость с фиксирующей жидкостью должна быть изготовлена из прозрачного пластика или стекла (не металла), иметь плотную крышку, широкую

горловину и этикетку с полем для подписи. Также допускается помещение этикетки из фотобумаги с написанным несмываемым карандашом шифром (номером) образца прямо в емкость. Подпись на этикетке должна быть разборчивой и максимально подробной. В условиях стационара, если материал представляет собой биоптат или извлечен во время хирургического вмешательства, он подлежит обязательному исследованию в патологоанатомическом отделении, и должен быть снабжен направлением на патогистологическое исследование установленного образца.

Не рекомендуется, но допускается при отсутствии кассет или при большом объеме исследований помещение в одну емкость нескольких образцов, предварительно завернутых в марлевые мешочки и снабженных этикетками.

Оптимальным решением, предупреждающим путаницу и потерю образцов, является введение системы штрихкодирования (рис. 5), когда образцу ткани/органа при поступлении в лабораторию присваивается уникальный штрих-код, который наносится на этикетку емкости с фиксатором, а затем дублируется на стандартной гистологической кассете с помощью принтера

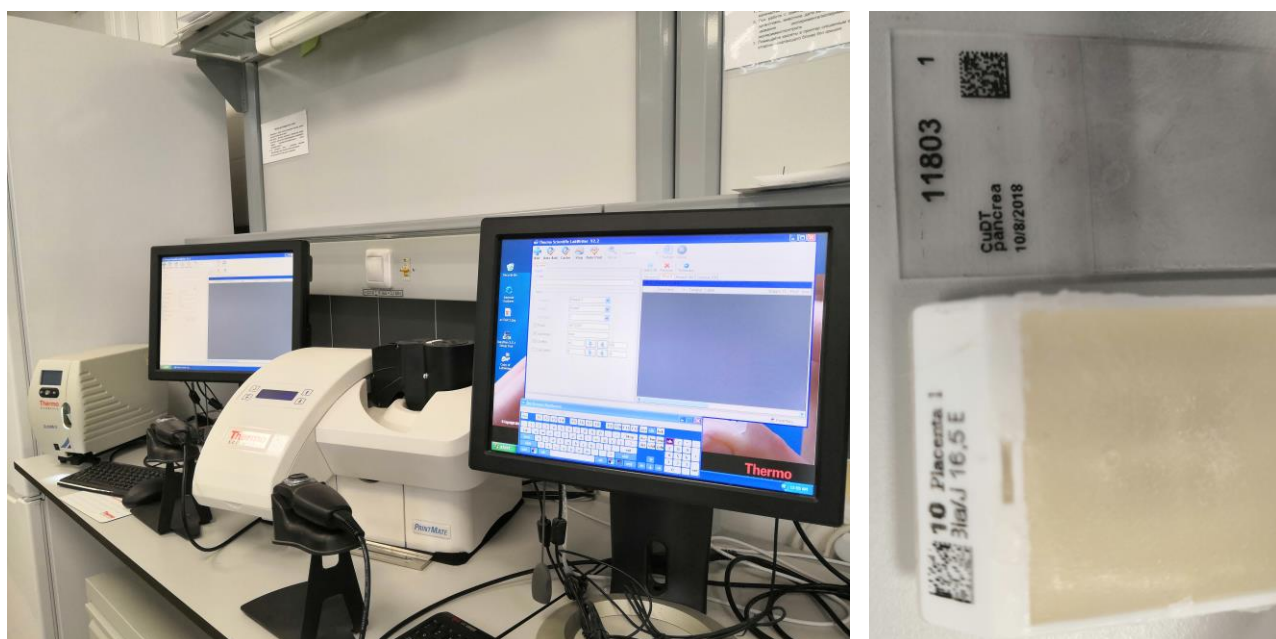


Рис. 5. Система маркировки гистологических кассет и предметных стекол

кассет, в которую помещается образец для фиксации, проводки и заливки в парафин, а также на предметных стеклах с помощью принтера предметных стекол. Такой подход исключает возможность перепутать материал от разных пациентов или экспериментальных объектов.

## **Фиксация материала**

Фиксация – физико-химический процесс, обеспечивающий сохранение прижизненной структуры клеток и тканей путем инактивации лизосомальных ферментов - причины аутолиза, ингибирования бактериального и грибкового роста – причины гетеролиза, коагуляции белков и образования новых связей между биомолекулами. Не существует идеального способа фиксации, подходящего для всех типов микроскопических исследований, все методы фиксации приводят в той или иной степени к образованию артефактов. Следует подчеркнуть, что основная причина неудачного окрашивания (особенно иммуногистологического) заключается в неадекватной фиксации.

Выделяют два основных способа фиксации материала: химический, заключающийся в помещении образцов ткани в раствор фиксатора, и термический, подразумевающий нагревание биологических образцов (как правило, бактериальных мазков). Заморозка образцов при температуре  $-80 - -190^{\circ}\text{C}$  сама по себе не является методом фиксации, так как требует в дальнейшем фиксации замороженных срезов непосредственно перед окрашиванием химическим способом. Химическая фиксация предполагает дальнейшую проводку материала и заливку в парафин (реже в целлоидин, желатин и т.п.) или синтетические смолы.

## **Общие принципы химической фиксации. Фиксация в формалине**

Химические фиксаторы подразделяются на простые и сложные по числу химических компонентов. Простые фиксаторы:

- альдегиды (4% формальдегид, 2,5% глутаровый альдегид), различные окисляющие агенты (1-2% осмиевая кислота, дихромат калия, хромо-



вая кислота, перманганат калия) – обеспечивают образование перекрестных ковалентных связей между белками и другими биомолекулами и обеспечивают фиксацию растворимых белков к цитоскелету;

- спирты (80-100% этанол, метанол), кетоны (ацетон), уксусная кислота – преципитирующие (денатурирующие) фиксаторы, уменьшают растворимость белков, предотвращают их гидрофобное взаимодействие;
- пикриновая кислота, реагенты на основе ртути – образуют нерастворимые металлсодержащие комплексы с белками.

В современной гистотехнике также используется фиксация 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой (HEPES) и глутаминовой кислотами, обеспечивающими морфологию, не уступающую материалу, фиксированному в формалине, хорошую консервацию белковых антигенов для иммуногистологии и гистохимии ферментов, сохранность РНК и ДНК и отсутствие сшивки белков (т.н. Hepar-glutamic acid buffer-mediated organic solvent protection effect - HOPE).

Сложные фиксаторы состоят из нескольких компонентов, например, спирт-формол (смесь 100 мл 70% спирт и 2-5 мл 4% формальдегид), жидкость Ценкера (сулема 5 г, сернокислый натрий 1 г, двуххромовокислый калий 2,5 г, дистиллированная вода 100 мл, ледяная уксусная кислота 5 мл).

Оптимальным и рутинно используемым химическим фиксатором является 4% водный нейтральный (забуференный) раствор формальдегида по Лилли (= 10% раствор формалина). К его преимуществам относятся оптимальное соотношение цены и качества, простота в обращении и хранении, способность сохранять вторичную и частично третичную структуру белка и липиды в тканях. Недостатками являются канцерогенность и токсичность, относительно большое время фиксации, невозможность использования для некоторых методов окрашивания (*in situ* гибридизация, ферментная гистохимия), снижение качества иммуногистологических реакций, вымывание и невозможность детекции некоторых водорастворимых веществ, недостаточная «жесткость» фиксации клеточных ультраструктур.

Наиболее качественная фиксация независимо от фиксатора требует соблюдения следующих условий:

1. Ткань после вырезки должна быть помещена в раствор фиксатора как можно быстрее. Не рекомендуется откладывать фиксацию в формалине более чем на 1 ч.

2. Объем фиксатора должен превышать объем образца в 20-30 раз и составлять не менее 20-30 мл, это позволит избежать разбавления раствора фиксатора тканевой жидкостью и кровью.

3. Если цвет фиксатора изменился после помещения в него образца, раствор фиксатора следует заменить на свежий.

4. Фиксатор должен иметь рН, близкий к тканям (7,35-7,45), это уменьшит изменения объема ткани и денатурацию белков, а также образование темно-коричневого формалинового пигмента (результата взаимодействия с гемоглобином) в случае использования незабуференного формалина, который диспропорционирует в воде на муравьиную кислоту и метанол. Нейтрализацию производят с помощью буфера (например, фосфатного).

5. Температура фиксации может варьировать и обычно производится в пределах +20-+37°C. Более высокая температура может применяться для экспресс-фиксации, однако следует учитывать, что увеличение температуры фиксатора ускоряет процесс, но приводит к большим изменениям в тканях. Фрагменты кишечника и поджелудочной железы рекомендуют фиксировать первые два часа в холодильнике при +4°C для инактивации ферментов и предупреждения аутолиза.

6. Время фиксации следует соблюдать для каждого из фиксаторов, для формалина оптимальное время фиксации 24 ч при комнатной температуре и 18 ч при +37°C, длительное пребывание образцов в растворе формалина возможно, но снижает качество иммуногистологического окрашивания.

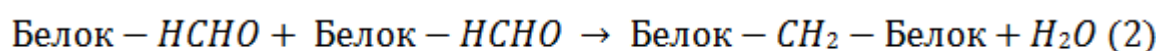
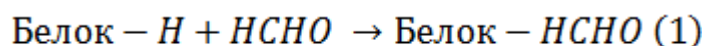
7. Следует избегать попадания прямых солнечных лучей на емкость с фиксируемым образцом.

8. Нельзя допускать повторное использование фиксатора.

9. При долгом стоянии неразбавленного формалина происходит полимеризация формальдегида с выпадением белого осадка, который необходимо растворить нагреванием перед использованием.

Этапы фиксации в формалине:

- 1) Пропитывание ткани формалином (достаточно быстро, скорость – 1 мм/ч);
- 2) Ковалентное связывание (реакция 1);
- 3) Образование метиленовых мостиков (реакция 2).



В процессе этой реакции образуются метиленовые мостики - «сшивки» между аминокислотными остатками (в основном лизин, цистеин, аспарагин и тирозин) индивидуальных белков и между соседними белками, тем самым происходит дублирование пептидных связей и предотвращение распада полипептидов на отдельные фрагменты. Несмотря на то, что пропитывание ткани формалином происходит в считанные часы, завершается фиксация только после формирования перекрестных связей между молекулами белка. С образованием метиленовых мостиков связан и недостаток фиксации в формалине, так как при их образовании происходит постепенное «маскирование» антигенных детерминант, что ослабляет их реакцию с используемыми в иммуногистологическом окрашивании диагностическими антителами. Есть данные, что минимальное время фиксации при комнатной температуре, которое позволяет обеспечить достаточную сохранность морфологии образца при минимальном маскировании антигена, составляет 6 ч.

В экспериментальных исследованиях на малых млекопитающих часто используется кардиальная перфузия формалином, обеспечивающая быструю пропитку тканей через сосудистое русло.

Таблица 1

Выбор фиксатора для последующего выявления на гистологическом срезе различных веществ

Выявляемое на срезе вещество	Оптимальный фиксатор	Неподходящий фиксатор
Белки	Нейтральный забуференный формалин	Тетраоксид осмия
Ферменты	Без фиксации	Химические фиксаторы
Жиры	Без фиксации или глутаральдегид/тетраоксид осмия	Спирты, нейтральный забуференный формалин
Нуклеиновые кислоты	Спирты, НОРЕ	Альдегиды
Мукополисахариды	Без фиксации	Химические фиксаторы
Биогенные амины	Жидкость Боуэна, нейтральный забуференный формалин	
Гликоген	Спирты	Тетраоксид осмия

### Декальцинация

Декальцинация требуется для изготовления срезов из костной ткани и кальцифицированного материала (образцы некоторых опухолей, измененных артерий, пораженных атеросклерозом, некротизированных тканей), при работе с трепанбиопсиями костного мозга.

Декальцинации по возможности подвергают объекты толщиной не более 0,5 – 1,0 см. Соотношение объема объекта и объема декальцинирующей жидкости – 1:25-50. Рекомендуется производить смену раствора каждые 24 часа, одновременно проверяя степень декальцинации при помощи иглы. Когда объект становится мягким и эластичным, а игла свободно проходит сквозь ткань, декальцинацию следует считать оконченной. После этого рекомендуется произвести промывку образца водопроводной водой в течение 30 мин.

Проверку полноты декальцинации можно произвести при помощи рентгеновского излучения или химическим способом, смешав и инкубировав в течение ночи 5 мл декальцинирующего раствора и 10 мл смеси 5% гидроскида аммония и 5% оксалата аммония (1:1). Декальцинация считается полной при отсутствии в смеси осадка.

Различают кислотные и бескислотные декальцинирующие реагенты. Кислотные декальцинирующие реагенты (азотная, сернистая, муравьиная, соляная, трихлоруксусная кислоты) эффективно растворяют соли кальция, но существенно повреждают структуру ткани. Бескислотные декальцинирующие реагенты (например, щелочной раствор этилендиаминтетраацетата натрия, ЭДТА) связывают кальций благодаря хелатированию ионов кальция, практически не изменяет структуру ткани, но декальцинация может длиться несколько дней и даже недель. В настоящее время применяют коммерческие декальцинирующие растворы, обеспечивающие сочетание полноты декальцинации и сохранности материала при приемлемой скорости (в течение нескольких суток) декальцинации (например, СофтиДек на основе муравьиной кислоты и формиата натрия). Применяют также специальные приборы – декальцинаторы, в которых декальцинация производится с помощью ультразвука или электролиза.

### **Проводка и заливка ткани в парафин**

Проводка осуществляется путем инкубации образцов ткани или органа в спиртах и органических растворителях. Целью проводки является полное прекращение всех химических реакций в образце путем замещения полярных компонентов тканей (в основном воды) последовательно на менее полярные спирты (обезвоживание, дегидратация) и неполярные углеводороды (просветление), в которых электрохимические взаимодействия и реакции окисления-восстановления сведены к минимуму. Дальнейшая замена жидких неполярных углеводородов на твердые при комнатной температуре парафины позволяет произвести уплотнение образца ткани, необходимое для получения

достаточно тонких (как правило, 4-6 мкм) срезов, оптимальных для световой микроскопии.

Исторически с целью обезвоживания и просветления использовались растворы этанола возрастающей концентрации в сочетании с ацетоном, хлороформом, толуолом, ксилолом. В настоящее время эти реагенты ввиду их высокой токсичности для персонала заменены сочетанием 100% изопропанола (2-пропанола) и минерального масла (смесь нефтепродуктов – предельных алифатических углеводородов низкой температуры плавления).



Рис. 6. Тканевый процессор STP 420D (Thermo Fisher) вакуумного типа

Проводка может производиться как вручную, так и при помощи коммерческих тканевых процессоров карусельного и вакуумного типов (рис. 6), обеспечивающих автоматическую смену растворов, необходимую температуру и давление для наилучшей пропитки тканей реагентами. Этапу проводки может предшествовать кратковременная (20-30 мин) промывка материала в проточной воде с целью удаления остатков формалина и фосфатов.

Существует большое количество различных протоколов проводки, позволяющих достичь высокого качества пропитки материала парафином (см. приложение).

Критично важным для обеспечения качества и стандартизации проводки, а также сохранности оборудования, является регулярная смена реагентов с учетом количества проводимых образцов и рекомендаций производителя оборудования и реагентов для проводки, а также соблюдение температурных и временных параметров (см. приложение). Не рекомендуется превышать температуру парафина выше 62°C, так как некоторые готовые парафиновые смеси содержат полимеры, которые разрушаются от высокой температуры

Окончательная заливка в парафин производится при помощи диспенсера (рис. 7), в котором парафин поддерживается нагретым до температуры  $+56-58^{\circ}\text{C}$ , снабженный нагревательной и охлаждающей платформами. Гистологические кассеты с образцами тканей, пропитанными парафином, извлекаются из тканевого процессора. Образцы помещают и ориентируют в пространстве необходимым образом при помощи горячего пинцета в предварительно нагретые специальные пластиковые или металлические формочки, наполненные горячим парафином, накрывают и плотно прижимают гистологической кассетой, долив сверху парафин до краев кассеты, и помещают на охлаждающую плату или хладагент, где происходит застывание парафинового блока при  $-20^{\circ}\text{C}$ .



Рис. 7. Диспенсер парафина, снабженный нагревательной платформой

Ориентировка образцов в формочке производится в соответствии с целями гистологического исследования и готовится на этапе вырезки. Прямоугольные объекты следует помещать длинной стороной параллельно длиннику кассеты. Паренхиматозные органы следует укладывать ровной плоской поверхностью на дно формочки таким образом, чтобы в срез попали все слои (при их наличии) и капсула органа. Полые органы, кожу следует укладывать узкой стороной, так, чтобы срез проходил через все слои. Для этого удобно после наполнения формочки парафином перенести ее на 2-3 с на охлаждающую платформу и только после этого поместить в нее образец. Стоит отметить, что для образцов скелетных мышц, трубчатых структур наиболее информативными являются поперечные срезы.

При заливке множественных образцов в одну формочку (например, лимфатических узлов), их следует ориентировать одинаково и помещать в ряд друг за другом вдоль длинника формочки.

Допускается заливка в самодельные или импровизированные формочки, однако это может потребовать дополнительной инкубации в термостате для устранения пузырьков воздуха, а также прикрепления парафинового блока на деревянные бруски для последующей микротомии. Использование стандартизированных формочек (рис. 8) с углублениями, подобранными под размер образца, и стандартных гистологических кассет, предотвращающих скопление пузырей воздуха, имеющих поле для маркировки и подходящих к столикам-зажимам современных микротомов, является удобным решением для современной гистологической лаборатории.



Рис. 8. Пластиковые формочки для заливки в парафин

Заливку в целлоидин, желатин, водорастворимые пластмассы и синтетические смолы используют крайне редко. Так заливка в целлоидин может быть необходима для обработки труднорежущихся, содержащих полости и лакуны, хрупких тканей (глазное яблоко, кости и окружающие их ткани), объектов больших размеров (например, эмбрионов), а также во избежание воздействия высоких температур на ткань. Заливка в желатин применяется тогда, когда невозможна заливка объекта в другие среды (парафин, целлоидин), например из-за необходимости выявления липидов или ферментов, но его физические свойства (рыхлость, мягкость, наличие в составе большого количества жира) не позволяют порезать его на замораживающем микротоме



без предварительного заключения в желатин. При этом заливка в альтернативные плотные среды не дает преимуществ по использованию особых методов окрашивания.

## 2. ИЗГОТОВЛЕНИЕ ПАРАФИНОВЫХ СРЕЗОВ

Для изготовления срезов парафиновых блоков используют ротационные (рис. 1) и санные микротомы (рис. 2). Толщина стандартного среза составляет 4-6 мкм и определяется средним размером клеток тканей млекопитающих.



Рис. 1. Ротационный микротом



Рис. 2. Санный микротом

Современные микротомы оснащаются одноразовыми микротомными лезвиями со специальной клиновидной заточкой.

До начала изготовления срезов подготавливают предметные стекла для наклейки срезов. Чистые предметные стекла предварительно обезжириваются в смеси М.Н. Никифорова (96% этанол:диэтиловый эфир – 1:1). Современные предметные стекла, поставляемые в заводской упаковке, часто не требуют очистки и обезжиривания. После высушивания на предметные стекла наносится тонкий равномерный слой смеси яичного альбумина и глицерина, скоагулированный над пламенем горелки в течение 3-5 с до появления легкого

белого дыма. Также эффективно использование коммерческих адгезивов на основе желатина. Лучше всего срезы удерживаются на специальных положительно заряженных предметных стеклах, покрытых полилизинном или силанизированными.

Перед порезкой рекомендуется придать конусообразную форму, удалив излишки парафина с помощью лезвия, это уменьшит сопротивление лезвию при порезке.

Порядок работы на санном микротоме

1. Парафиновый блок с образцом, закрепленный в стандартной кассете, помещают в объектодержатель-зажим.

2. Установив оптимальный угол наклона ножа ( $5-15^\circ$ ), медленно подводят каретку с лезвиедержателем к блоку и регулируют его высоту при помощи макровинта до легкого соприкосновения блока с лезвием.

3. Производят подрезку (тримминг) с целью устранения излишков парафина и полировки поверхности блока. С этой целью на микрометрической шкале устанавливают толщину срезов 20-25 мкм и получают толстые срезы, которые выбрасываются. Тримминг целесообразно производить не самой острой частью лезвия, которая была ранее в работе, это экономит ресурс лезвия.

4. Устанавливают толщину срезов в 4-6 мкм и приступают к получению срезов, при этом первые несколько срезов рекомендуется выбросить.

5. Полученные срезы снимают тонкой кисточкой, смоченной в воде (рис. 3а), и помещают в емкость (лучше с темными стенками) с дистиллированной водой температурой около  $40^\circ\text{C}$  для расправления срезов (рис. 3б). Удобным является использование водяной бани с электронагревом и контролем температуры. Срезы должны быть лишены складок, деформаций, морщин, разрывов и пузырей воздуха под ними, т.к. это частые причины отклеивания срезов с предметного стекла при дальнейших манипуляциях.



Рис. 3. Этапы получения парафиновых срезов.

А – снятие готового среза кисточкой; Б – помещение срезов на водяную баню; В – перенос среза на предметное стекло.

Длительное (месяцы и годы) хранение срезов, наклеенных на стекла, не рекомендуется ввиду окисления белков кислородом воздуха и дальнейшей непригодности для иммуногистологического окрашивания, при этом срезы остаются годными для простых гистологических окрашиваний.

Особенностью работы на ротационном микротоме является то, что движение блока происходит относительно неподвижно закрепленного лезвия, а не наоборот, как в санном микротоме. Кроме того, движение маховика с закрепленным блоком в ротационном микротоме осуществляется путем вращения рукоятки микротоме, отчего микротоме и получил свое наименование. В остальном алгоритм работы на ротационном микротоме не отличается от санного.

6. После расправления срезы аккуратно переносятся на предметное стекло при помощи кисточки (рис. 3в), после чего высушиваются в вертикальном положении для стекания воды на специальных штативах в течение 12-24 часов при 37-56°C (рис. 4).



Рис. 4. Сушка парафиновых срезов

В последние годы распространение получили ротационные микротомы с каскадной системой переноса срезов (рис. 5), где получаемый срез соскальзывает по водной горке и попадает на водяную баню без использования кисточки. Это обеспечивает получение высококачественных серийных срезов.



Рис. 5. Ротационный микротом с системой переноса срезов

Таблица 2

Проблемы при получении парафиновых срезов, их причины и способы устранения

<b>Проблема</b>	<b>Причина</b>	<b>Устранение</b>
Крошится парафин	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Слишком твёрдый материал.</li> <li>2. Блок медленно охлаждался при заливке.</li> <li>3. Низкая температура окружающей среды; большой угол наклона ножа.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Согреть блок дыханием.</li> <li>2. Изменить угол наклона ножа.</li> <li>3. Перезалить тканевый объект.</li> </ol>
Ткань отделяется от парафина	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Заливка проводилась холодным парафином.</li> <li>2. Плохая пропитка материала.</li> <li>3. При проводке остались следы спирта.</li> </ol>	Перезалить блок, предварительно поместив его в промежуточную среду для удаления спирта.

<b>Проблема</b>	<b>Причина</b>	<b>Устранение</b>
Материал плохо режется: белесоватого цвета, срезы сморщенные, плохо расправляются	Недостаточное обезвоживание ткани	Блок расплавляют в термостате и пропускают по батарее в обратном порядке до 100% спирта, затем снова проводят по схеме.
Нож «подскакивает», не срезая ткань или на срезах образуются поперечные борозды	Переуплотнение или пересушивание материала при фиксации или обезвоживании	Резать материал, поместив на него кусочек льда.
Срезы сморщенные, прилипают к поверхности ножа, закручиваются	1. Недостаточный угол наклона ножа. 2. Высокая температура в помещении. 3. Материал залит в легкоплавкий парафин.	1. Изменить угол наклона ножа. 2. Перед срезами материал поместить в холодильник. 3. Перезалить в более тугоплавкий парафин.
Срезы покрыты полосами и легко раскрываются	1. Плохое качество ножа: зазубрины. 2. Загрязнение парафина: плотные соринки; наличие в ткани солей кальция	1. Сменить или передвинуть нож 2. Декальцинировать материал. 3. Использовать специальные ножи (для керамики, синтетики, плотных тканей).
Срез прилипает к ножу	Электризация	Увлажнить блок дыханием

### 3. ИЗГОТОВЛЕНИЕ ЗАМОРОЖЕННЫХ СРЕЗОВ

Заморозка материала для приготовления замороженных срезов должна производиться путем выдерживания в течение 15-20 с в изопентане, предварительно охлажденном в жидком азоте до появления твердых кристаллов (рис. 1). Способ позволяет избежать формирования артефактов-разрывов в богатых водой тканях в результате неравномерного формирования кристаллов льда (рис. 2). Замороженный материал может в дальнейшем храниться в



Рис. 1. Изопентан, охлажденный в жидком азоте до появления кристаллов

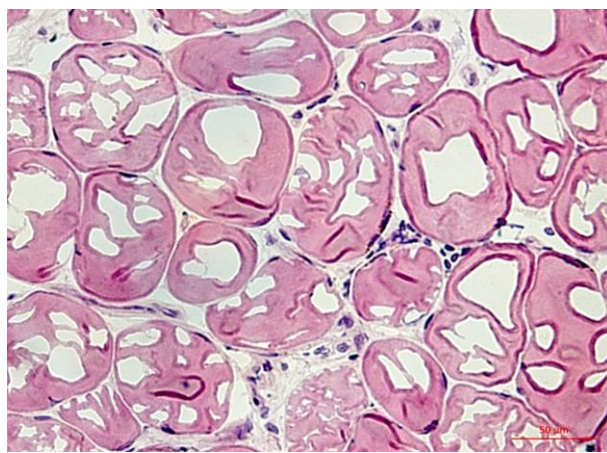


Рис. 2. Артефакты в виде дыр на поперечных срезах мышечных волокон – следствие неправильной заморозки

жидком азоте или в холодильнике при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  в течение года.

Допускается замораживание объектов небольших размеров непосредственно в камере криотома. Замораживание при помощи жидкого азота, углекислоты, хлорэтила показывает худшие результаты.

Свежезамороженный образец помещается в криотом (ротационный микротом, помещенный в камеру с охлаждением) и крепится на предметном столике при помощи коммерческих сред, содержащих поливиниловый спирт (например, O.C.T. – Optimum Compound Temperature). Важным этапом является подбор температуры резки, которая варьирует для различных тканей в диапазоне от  $-10$  до  $-20^{\circ}\text{C}$  (табл. 3).

Таблица 3

Рекомендуемая температура для получения замороженных срезов различных тканей и органов (согласно рекомендациям производителя криостата Shandon Cryotome для модели FSE (Thermo).)

Ткань/орган	Температура порезки в °С
Мозг	-12
Печень	-13
Лимфатические узлы	-14
Почка	-15
Щитовидная железа	-15
Скелетная мышца	-16
Кожа	-16
Селезенка	-16
Молочная железа	-25
Молочная железа с подкожным жи- ром	-30 и ниже
Жировая ткань	-30 и ниже

В дальнейшем порезка производится аналогично порезке парафиновых блоков на ротационном микротоме. Полученные срезы толщиной 5-8 мкм (для нервной ткани – до 20 мкм) переносятся на чистое обезжиренное предметное стекло с или без специального адгезивного покрытия, высушиваются на воздухе, после чего их можно хранить до нескольких месяцев в холодильнике при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  завернутыми в фольгу.

Перед иммуногистологическим окрашиванием замороженных срезов рекомендуется дофиксировать их в охлажденном до  $-20^{\circ}\text{C}$  чистом ацетоне (не использовать повторно!), метаноле или 4% нейтральном формальдегиде (в зависимости от дальнейшего метода окрашивания) в течение 10 мин с последующим высушиванием на воздухе до полного испарения фиксатора. Следует избегать фиксации замороженных срезов в ацетоне для последующего имму-

ногистологического выявления ядерных антигенов, антигенов, связанных с жировыми структурами, а также избегать использования сурфактантов (Triton X-100 и Tween 20) после фиксации ацетоном. Отмечается разрушение многих человеческих антигенов CD при фиксации в метаноле.

### **Выбор метода фиксации и дальнейшей пробоподготовки**

Выбор метода фиксации и дальнейшей пробоподготовки тесно связан с дальнейшими целями гистологического анализа. Парафиновые и замороженные срезы обладают рядом достоинств и недостатков, которые необходимо принимать во внимание в ходе планирования лечебно-диагностического и экспериментального процесса.

Материал, залитый в парафин, хорошо хранится и оптимально подходит для создания архива гистологического материала. Кроме того, правильно подобранная проводка позволяет получить срезы с отлично сохраненной морфологией даже неопытному лаборанту-микротомисту. В целом преимущества материала, залитого в парафин, ограничены: особенности фиксации и проводки приводят к полному удалению липидов, растворимых минеральных и органических веществ, повреждению нуклеиновых кислот и белков, инактивации большинства ферментов. Таким образом, лучшим вариантом для выявления липидов, проведения гистохимических реакций, особенно для выявления ферментов, иммуногистологических окрашиваний является заморозка материала с последующим приготовлением замороженных срезов. Техника их приготовления хотя и требует определенного навыка, но при достаточном опыте криотомия позволяет приготовить срезы, не отличающиеся по качеству от парафиновых. Краткий отрезок времени, проходящий от момента взятия материала до получения окрашенных препаратов из замороженных срезов, обусловил их активное применение для срочного патогистологического анализа в лечебных учреждениях. Срок хранения замороженного материала и особенно криосрезов существенно ограничен и сопряжен с необходимостью



наличия низкотемпературного холодильника или поддержания достаточного уровня жидкого азота в криохранилище.

## **4. ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ОКРАШИВАНИЯ**

### **Общие принципы окрашивания гистологических препаратов**

Целью гистологического окрашивания является отчетливое выявление различных компонентов клеток и тканей. Выделяют следующие основные виды гистологических окрашиваний:

1. Простые гистологические окрашивания – в их основе лежат реакции физико-химической природы (диффузия, абсорбция, растворимость и т.д.), как правило, неселективные в отношении конкретного химического компонента объекта, но селективные в отношении микроструктурного компонента или конкретной ткани (ядра, цитоплазмы, соединительной ткани). Это наиболее традиционные методы окрашивания, их разработка имела эмпирический характер. Характерные представители – окрашивания гематоксилином и эозином, трихромами по Вайгерту и по Маллори.

2. Гистохимические окрашивания – качественные химические реакции на срезе. В их основе лежат конкретные известные химические реакции, направленные на демонстрацию в ткани конкретного вещества, иона, радикала, химически активной группы. Примерами могут служить ШИК-реакция для выявления гликогена, гистохимическая реакция для выявления АТФазы.

3. Иммуногистологические окрашивания – подход, сочетающий в себе нанесение иммуноглобулинов (антител), полученных искусственным путем против известного белка, на гистологический срез (реакция «антиген-антитело» на стекле) и детекцию сформировавшихся иммунных комплексов при помощи предварительно нанесенной на антитело ферментной или флуоресцентной метки.

Простые гистологические красители подразделяются на:

1. основные – основания и их соли, они окрашивают структуры кислой природы, называемые базофильными (ДНК хроматина в ядре, РНК ядрышка, РНК рибосом в цитоплазме, а также некоторые белки соединительной ткани и цитоплазмы, например, саркомеров мышечных волокон). Примеры: гематоксилин, тионин, кармин, метиловый зеленый;

2. кислые – кислоты и их соли, окрашивающие структуры основной природы, называемые оксифильными (большинство цитоплазматических белков). Примеры: эозин, кислый фуксин, эритрозин;

3. нейтральные красители – как правило, нерастворимые в воде, но растворимые в спиртах или других органических растворителях. Подобные красители способны растворяться в липидах окрашиваемого объекта и используются для их выявления. Примеры: судан III, oil red O.

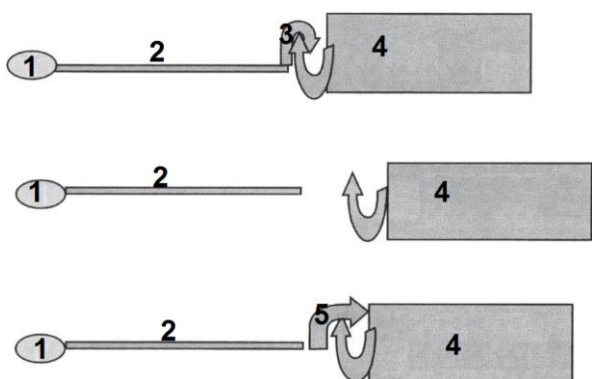


Рис. 1. Структура гистологических красителей. 1 – хромофор, 2 – углеродный скелет молекулы красителя, 3 – ауксофор, 4 – окрашиваемая структура, 5 – ион-протрава

Большинство используемых в гистологии красителей обладают общими свойствами химической структуры (рис. 1). Их молекулы содержат группировку атомов, формирующую цвет (как правило, парахиноновое кольцо и азо-группа) – хромофоры, и радикалы, которые в водном растворе ионизируются и обуславливают связывание с окрашиваемыми структурами путем ионного взаимодействия (амидный остаток, тиоловая, гидроксильная, карбоксильная

группы) – соль-формирующие группы или ауксофоры. Красители, у которых отсутствует ауксофор, требуют дополнительных компонентов – протрав, служащих мостиком между молекулой красителя и окрашиваемыми структурами. Примером подобного красителя служит гематоксилин (точнее, его окисленная форма гематеин), требующий ионов железа или алюминия для окрашивания.

Процесс окрашивания делят на прогрессивный и регрессивный, прямой и непрямой, простой и сложный. При прогрессивном окрашивании процесс проводят до тех пор, пока не будет достигнуто интенсивное проникновение красителя в ткань, при регрессивном производят изначально переокрашивание структур с дальнейшим дифференцированием до нужного уровня окрашивания в воде, спирте, щелочном растворе. Если перед окрашиванием требуется предварительная обработка среза протравой, то оно называется непрямой, если не требуется – прямым. Окрашивание одним красителем – простое, несколькими – сложное.

Следует отметить, что цвет красителя на срезе не всегда соответствует его цвету в растворе. Например, при окрашивании тканей, подверженных мукоидному набуханию, толуидиновым синим, наблюдают феномен метахромазии – окрашивание в фиолетовый цвет, а не синий.

### **Депарафинизация и регидратация парафиновых срезов**

Предварительным этапом при использовании парафиновых срезов является удаление парафина при помощи органического растворителя (толуола, ксилола) с последующей промывкой в спирте и воде (протокол см. в приложении). Для реализации качественного иммуногистологического окрашивания следует следить за качеством реагентов для депарафинизации и вовремя их менять (после 40-50 препаратов), а также применять при необходимости качающую платформу.

Во избежание склеивания предметных стекол и повреждения срезов во время депарафинизации и последующего окрашивания удобно использовать емкости Хеллендейла (рис. 2), вмещающие до 18 стекол одновременно.

Во время любого окрашивания стоит избегать высыхания срезов, для чего их следует держать в воде или нейтральном буфере.

## Просветление и заключение срезов

После окрашивания срезов следует обеспечить их прозрачность, а также защиту от высыхания и загрязнения. Это достигается просветлением и заключением в монтирующие среды. Монтирующие среды подразделяются на водорастворимые (глицерогель) и не растворимые в воде, но растворимые в органических растворителях (канадский бальзам, полистирол). Выбор монтирующей среды зависит от растворимости красителя в полярных или неполярных растворителях.

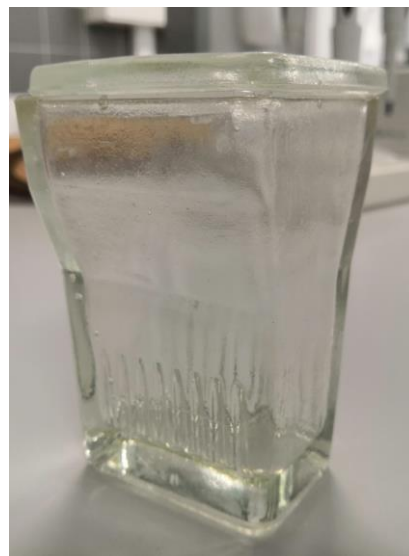


Рис. 2. Емкость Хеллендейла

Перед заключением в глицерогель его предварительно разогревают на водяной бане (но не на плитке во избежание образования пузырей) до жидкого состояния. После заключения и застывания глицерогеля в течение 6-12 часов рекомендуется отмыть предметное стекло от излишков монтирующей среды теплой водой, вытереть насухо и окантовать по краям покровного стекла бесцветным лаком для ногтей. Заключение в глицерогель лучше всего подходит для препаратов, окрашенных иммуногистохимически. Для заключения срезов, окрашенных иммунофлуоресцентно, применяют специальные коммерческие среды, не дающие аутофлуоресценции и содержащие флуоресцентный ядерный краситель.

Перед заключением в монтирующие среды, растворимые в органических растворителях, требуется предварительное быстрое обезвоживание в этанолах восходящей концентрации (70%, 80%, 96%) с обезжириванием и просветлением в ксилоле примерно в течение 1 минуты.

Покровные стекла подбираются соответственно размеру срезов и хранятся в этиловом спирте. Перед заключением их тщательно протирают, наносят каплю монтирующей среды на срез стеклянной палочкой, затем аккуратно накрывают срез покровным стеклом при помощи маленького пинцета, стара-

ясь избежать образования пузырьков воздуха под стеклом, повреждения срезов скользящим покровным стеклом (рис. 3). Излишки монтирующей среды и мелкие пузырьки можно выдавить из-под покровного стекла аккуратным надавливанием. Срез, заключенный в глицерогель с пузырьками, можно перезаклучить, предварительно опустив предметное стекло в горячую (не кипящую) воду, дождавшись, пока покровное стекло отпадет самостоятельно под действием силы тяжести.

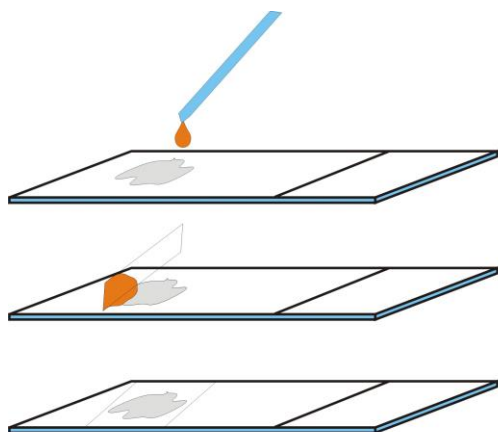


Рис. 3. Техника заключения под покровное стекло

После полного высыхания монтирующей среды следует очистить готовый препарат от излишков монтирующей среды: при помощи органического растворителя либо теплой воды (в случае водорастворимой монтирующей среды). После этого покровное стекло следует окантовать по краю бесцветным лаком для ногтей.

### **Перезаклучение, повторное окрашивание срезов. Починка разбитых препаратов**

При погрешностях заключения под покровное стекло допускается перезаклучение после предварительного удаления покровного стекла (при использовании синтетической монтирующей среды – путем помещения в ксилол при 56-60°C на 15-20 мин, при использовании глицерогеля – путем помещения в дистиллированную воду при тех же условиях).

Также возможно повторное окрашивание неправильно окрашенного или выцветшего образца (подходит не для всех окрасок, но допустимо для гематоксилина и эозина). После удаления покровного стекла и синтетической монтирующей среды образец регидратируется путем помещения в несколько смен абсолютного, 96%, 70% этанола, затем в дистиллированную воду. При необходимости можно произвести обесцвечивание путем инкубации в 1%

растворе соляной кислоты в 70% этаноле с последующей промывкой в дистиллированной воде. Дальнейшее окрашивание следует производить согласно протоколу.

Разбитый препарат, в котором покровное стекло сохранило свою целостность, легко починить, наклеив разбитое предметное стекло на неразбитое, при помощи клея, нерастворимого в ксилоле, и дать ему высохнуть в течение суток.

Осколки препарата с поврежденным стеклом, но визуальным целым срезом, также необходимо наклеить на целое предметное стекло как описано выше. После этого необходимо удалить остатки покровного стекла и монтирующей среды и нанести на предметное стекло коллодий, дав избытку стечь в вертикальном положении. После полного высушивания стекла (процесс занимает несколько часов) стекло следует поместить в дистиллированную воду для разрыхления коллодия (5 мин – 1 час). Затем нужно поддеть край коллодиевой пленки острым лезвием и отслоить пленку вместе со срезом от предметного стекла. Пленка со срезом переносится на предварительно покрытое адгезивом новое предметное стекло, коллодий удаляется промывкой в нескольких сменах ацетона при помощи пипетки, производится заключение под покровное стекло при помощи синтетической монтирующей среды.

### **Основные простые методы окрашивания, применяемые в патоморфологической лаборатории**

В настоящее время существует большое количество простых гистологических окрашиваний. В приложении приведены протоколы для окрашиваний, рекомендованных для патоморфологических лабораторий Российской Федерации, а также некоторых, используемых рутинно с научно-исследовательскими целями. Следует подчеркнуть, что протоколы окрашиваний могут существенно отличаться между лабораториями. При выборе протокола стоит опираться на рекомендации производителя, а также определить

собственный внутрилабораторный стандарт окрашиваний, контролируя процесс и результат под микроскопом.

## 5. ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ

Гистохимические методы окрашивания являлись ценным инструментом в изучении микроструктур живых организмов с середины XIX века, и хотя с развитием иммуногистологических методов гистохимия постепенно отошла на второй план, ее методы имеют важное диагностическое значение. По нашему мнению, на данный момент потеря интереса к гистохимии в России связана в большей степени с дороговизной, сложностью хранения реагентов, подготовки материала и реализации окрашивания.

Как было отмечено выше, гистохимические окрашивания направлены на выявление в ткани конкретного вещества, иона, радикала, химически активной группы. Это могут быть:

### 7. Неорганические компоненты:

- а) заряженные частицы – анионы (хлорид-ион, сульфат-ион, фосфат-ион) и катионы (металлы, аммоний, а также позитивно заряженные органические ионы);
- б) Незаряженные частицы (нейтрально-заряженные соединения металлов с белками (например, железо в составе гемоглобина, гемосидерина), нейтральные соли (фосфаты кальция в составе костной ткани).

### 8. Органические компоненты:

- с) конкретные химические вещества (крахмал, гликоген, аминокислоты, стероиды);
- д) радикалы, химически активные группы (альдегидная, гидроксильная, карбоксильная, аминогруппа, дисульфидные и метиленовые связи);
- е) ферменты (фосфатаза, пероксидаза, эстераза).

С учебно-образовательной точки зрения целесообразно разделить гистохимические методы окрашивания, направленные на выявление ферментов

(ферментная гистохимия), и все остальные гистохимические окрашивания, поскольку в первых изучаемое вещество (фермент) лишь катализирует качественную реакцию.

Условия к проведению гистохимического окрашивания накладывают жесткие требования к пробоподготовке материала:

1. Изучаемое вещество должно присутствовать в гистологическом срезе, пробоподготовка не должна влиять на его концентрацию и распределение в тканях. Это вызывает существенные трудности при выявлении веществ, которые хорошо растворимы в воде и легко вымываются при инкубации в различных растворах (например, аскорбиновая кислота, многие ионы).

2. Изучаемое вещество должно сохранять свою реакционную способность. Например, фиксация в формалине и заливка в парафин приводит к инактивации большинства ферментов (но не всех, активность пероксидазы, щелочной фосфатазы ослабевает, но сохраняется), что обуславливает использование замороженных срезов для ферментной гистохимии.

3. Изучаемое вещество должно вступать в достаточно специфичную качественную реакцию. Это условие ограничивает научную и диагностическую ценность гистохимического окрашивания белков, поскольку все многообразие белков живых организмов состоит из одних и тех же аминокислот, при этом свойства белков определяются в большей степени последовательностью, а не количественным составом аминокислот. Задача выявления конкретных белков выполняется с помощью иммуногистологических методов окрашивания.

4. Продукт гистохимической реакции должен быть окрашенным и видимым с помощью световой микроскопии.

5. Продукт гистохимической реакции должен быть стабильным и нерастворимым, т.е. выпадать в осадок и маркировать изучаемое вещество.

Протоколы основных гистохимических окрашиваний, применяемых в патоморфологической и научно-исследовательской лаборатории, изложены в приложении.



## Принципы ферментной гистохимии

Ферменты – макромолекулы, наиболее существенный компонент которых представлен белком. В живых организмах ферменты служат биокатализаторами, способствующими протеканию метаболических реакций благодаря наличию в них активных центров, преобразующих строго определенный для каждого из ферментов субстрат. Именно на этом основан гистохимический способ выявления ферментов. Выявление ферментов, как и любых других белковых молекул, возможно и с помощью иммуногистологических методов, однако наличие фермента в тканях не тождественно наличию его активности. В то же время с научной и диагностической целью (в основном для выявления наследственных ферментопатий) важно именно выявление активности ферментов (а ферментная гистохимия, строго говоря, выявляет не сам фермент, а его активность).

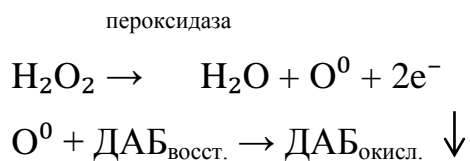
Выделяют 6 классов ферментов в зависимости от катализируемой ими реакции:

1. Оксидоредуктазы
2. Трансферазы
3. Гидролазы
4. Лиазы
5. Изомеразы
6. Лигазы (синтетазы)

Вне зависимости от реакции, которую катализирует фермент, гистохимическое выявление фермента состоит из двух этапов: собственно ферментативной реакции (1) и одновременной или последовательной реакции «захвата» с образованием конечного окрашенного нерастворимого продукта – хромогена (2):



На примере выявления фермента пероксидазы (катализирует окисление пероксида водорода) при помощи 3,3'-диаминобензидина (ДАБ) реакция выглядит следующим образом:



Данная реакция также служит для детекции комплексов антиген-антитело при иммуногистохимическом окрашивании.

Все известные гистохимические реакции определения ферментативной активности разделяются на реакции осаждения ионами металлов, окислительно-восстановительные реакции, индигогенные методы, реакции диазосочетания, реакции со вспомогательными ферментами и реакции синтеза. Мы не будем останавливаться подробно на протоколах гистохимических окрашиваний, а лишь приведем примеры наиболее часто используемых в приложении.

## 6. ИММУНОГИСТОЛОГИЯ

Своим рождением иммуногистология обязана Альберту Хьюэту Кунсу (рис. 1), американскому врачу, патологу и иммунологу, который предложил использовать антитела, конъюгированные с флуоресцентными красителями, для визуализации антигенов в тканях. В 1941 году он опубликовал свою новаторскую статью, описывающую связывание флуоресцентного красителя флуоресцеина изоцианата с анти-пневмококковой сывороткой. В дополнение к агглютинированию кокков антителами, кокки ярко флуоресцировали и могли быть легко визуализированы под микроскопом.

Другие исследователи обнаружили, что, помимо флуоресцентных зондов, антитела также могут быть помечены многими другими метками, обеспечивающими визуализацию, включая биотин, ферменты, коллоидное золото и серебро и короткие олигонуклеотиды. С момента открытия доктора Куна, были опубликованы сотни и тысячи научных статей о технике иммуногистохимии, и иммуногистология стала незаменимым методом исследований и диагностических приложений. Абсолютно невозможно представить современную биологию и медицину без иммуногистологии, которая по-прежнему остается очень динамично развивающейся областью.



Рис. 1. Альберт Х. Кунс  
(Источник:  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Albert\\_Coons](https://en.wikipedia.org/wiki/Albert_Coons))

### **Теоретические основы иммуногистологии**

Иммуногистологическое окрашивание – метод выявления локализации антигена в ткани при помощи меченых антител, т.е. по своей сути это реакция «антиген-антитело», перенесенная на гистологический срез.

Антиген (англ. antigen от **antibody-generator** — «производитель антител») — любое вещество, которое организм рассматривает как чужеродное и против которого организм обычно начинает вырабатывать антитела. Антигены, как правило, являются белками или полисахаридами. Липиды и нуклеиновые кислоты проявляют иммуногенные свойства только в комплексе с белками.

Антитела – гликопротеины плазмы крови (иммуноглобулины, Ig). Иммуноглобулины способны высокоселективно связываться своими активными участками с эпитопами (характерным фрагментом поверхности или линейной аминокислотной цепи антигена) бактерий или вирусов и препятствовать их размножению или нейтрализовать выделяемые ими токсические вещества.

Антитела синтезируются плазматическими клетками, которые дифференцируются из В-лимфоцитов в процессе иммунного ответа.

У млекопитающих выделяют пять классов антител — IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, различающихся между собой по строению, аминокислотному составу и по выполняемым эффекторным функциям.

Классическая Y-образная форма молекулы IgG (M ~150 кДа) состоит из четырех полипептидных цепей - две идентичные легкие цепи (L, light chain) (каждая из них имеет молекулярную массу ~25 кДа) и две одинаковые тяжелые цепи (H, heavy chain) (каждая имеет молекулярную массу ~50 кДа) - которые связаны дисульфидными связями (рис. 2).

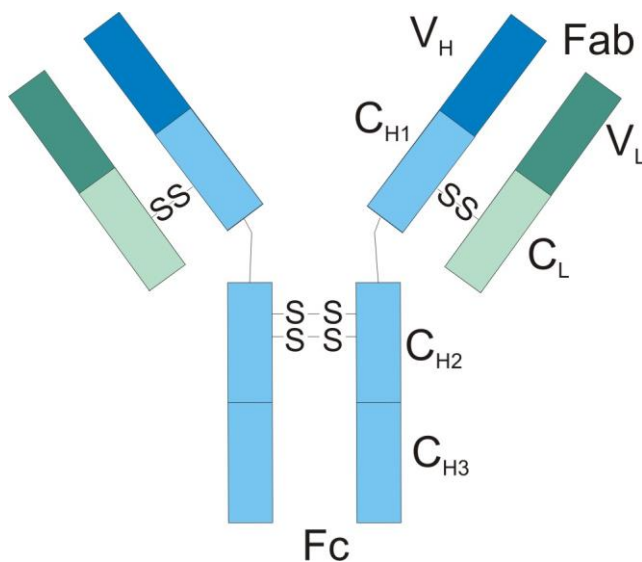


Рис. 2. Схема строения иммуноглобулина G

Каждый конец раздвоенной части «Y» называется F<sub>ab</sub>-фрагментом (F – fragment, фрагмент, ab - antigen-binding, антигенсвязывающий) и отвечает за связывание с антигеном. F<sub>ab</sub>-фрагмент состоит из переменного сегмента легкой цепи (V<sub>L</sub>) и переменного сегмента тяжелой цепи (V<sub>H</sub>) на N-конце. Легкая цепь и сегмент тяжелой цепи связаны дисульфидными связями. F<sub>c</sub>-

фрагмент (F – fragment, фрагмент, c - crystallizable, кристаллизующийся) представляет собой область антитела, состоящую из двух константных сегментов (C<sub>H</sub>) тяжелых цепей на C-конце. F<sub>c</sub> имеет множество эффекторных функций (например, связывание комплемента, связывание с рецепторами клеток на макрофагах и моноцитах и т. д.), а также определяет видовую специфичность иммуноглобулинов, т.е. F<sub>c</sub>-фрагмент IgG кролика будет отличаться от F<sub>c</sub>-фрагмента IgG мыши, что крайне важно для иммуногистологии.

Молекулы IgG, IgE, IgD представляют собой мономеры, IgM – пентамер, IgA – димер, содержащий секреторный компонент. Большинство первичных антител, используемых в иммуногистологии, относятся к типу IgG, который, в свою очередь, представлен четырьмя классами или изотипами: IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> и IgG<sub>4</sub>.

Как было отмечено выше, антитела очень селективны в распознавании конкретного антигена. Антигены индуцируют продукцию антител в естественных условиях, но тот же процесс можно имитировать искусственно путем выделения или синтеза антигенов, напоминающих структуру встречающегося в природе белка, с последующим системным введением лабораторным животным - овцам, козам, кроликам и т. п.

Например, если необходимо обнаружить клетки, продуцирующие инсулин в ткани поджелудочной железы, то можно использовать полноразмерную молекулу инсулина либо ее короткий фрагмент, уникальный для молекулы инсулина, в качестве антигенов (иммуногенов). После инъекции раствора инсулина человека в организм, например, кролика (иммунизации), происходит выработка антител различными клонами плазматических клеток, которые затем секретируются в кровоток. Под клоном подразумеваются группа клеток-потомков конкретного В-лимфоцита, вырабатывающие идентичные антитела. Разные клоны могут вырабатывать антитела к различным участкам одного и того же белка-антигена. После иммунизации производится отбор сыворотки крови у животного, очистка от других сывороточных белков и аффинное выделение фракции иммуноглобулинов, связывающих инсулин человека.

Если нанести раствор данных антител на срез поджелудочной железы, то они стабильно свяжутся с клетками, содержащими инсулин – β-клетками островков Лангерганса – и никакими другими.

## **Получение диагностических антител. Поликлональные и моноклональные антитела**

Полученные вышеописанным способом антитела будут представлять собой коктейль из различных антител, происходящих от разных клонов плазматических клеток и связывающихся с различными участками белка, и будут носить название «поликлональных» (рис. 3). Данный тип диагностических антител обладает существенным недостатком – низкой специфичностью. Под специфичностью понимают способность антител связываться с конкретным участком антигена, но не с другими участками и не с другими антигенами, обладающими схожей структурой. Многие белки организма млекопитающих обладают существенным сходством (гомологией), что обуславливает возможную кросс-реактивность (перекрестную реактивность) антител, которая будет приводить к ошибочным результатам иммуногистологического окрашивания.

Проблема низкой специфичности поликлональных антител для иммуногистологии была решена в 1975 г. Дж. Келером и С. Мильштейном, за что им в 1984 г. была присуждена Нобелевская премия в области физиологии или медицины. Они добились выделения из селезенки мыши клона В-клеток, продуцирующего высокоспецифичные антитела к определенному эпитопу, культивировали данные клетки *in vitro*, а затем осуществили их слияние с клетками плазмоцитомы – злокачественной опухоли, клетки которой обладают потенциалом к неограниченной пролиферации и секреции иммуноглобулинов. Получающаяся таким способом совокупность клеток – «гибридома» - служит источником высокоспецифичных моноклональных антител как в условиях изолированной культуры, так и при введении животным в брюшинную полость с последующим сбором богатой антителами асцитической жидкости (рис. 4).

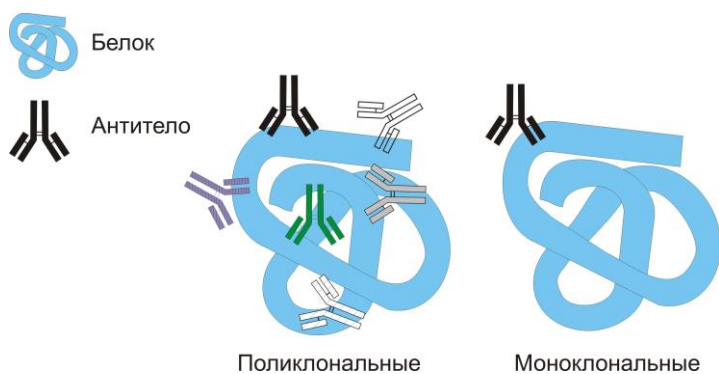


Рис. 3. Поликлональные и моноклональные антитела

Чувствительность диагностических антител определяется количеством эпитопов белка, которые могут быть распознаны (по определению поликлональные антитела чувствительнее) и аффинностью (сродством) антител к эпитопу, т.е. силой связывания антител с эпитопом, которая зависит от химической структуры антигена и антител. Таким образом, моноклональные антитела, традиционно получаемые от мышей, более специфичны, но менее чувствительны, чем поликлональные, традиционно получаемые от кролика. Вместе с тем, кроличьи моноклональные антитела, приобретающие популярность в последние года, до 10-ти раз более аффинны и чувствительны, чем мышинные моноклональные. Кроме того, некоторые антигены, индуцирующие образование антител у кроликов, могут быть неиммуногенны для мышей. В научной лаборатории, где часто приходится использовать мышей в качестве объекта исследования, кроличьи монокло-

Необходимо отметить, что моноклональные антитела при более высокой специфичности по сравнению с поликлональными антителами, полученными от того же животного, обладают более низкой чувствительностью – способностью вы-

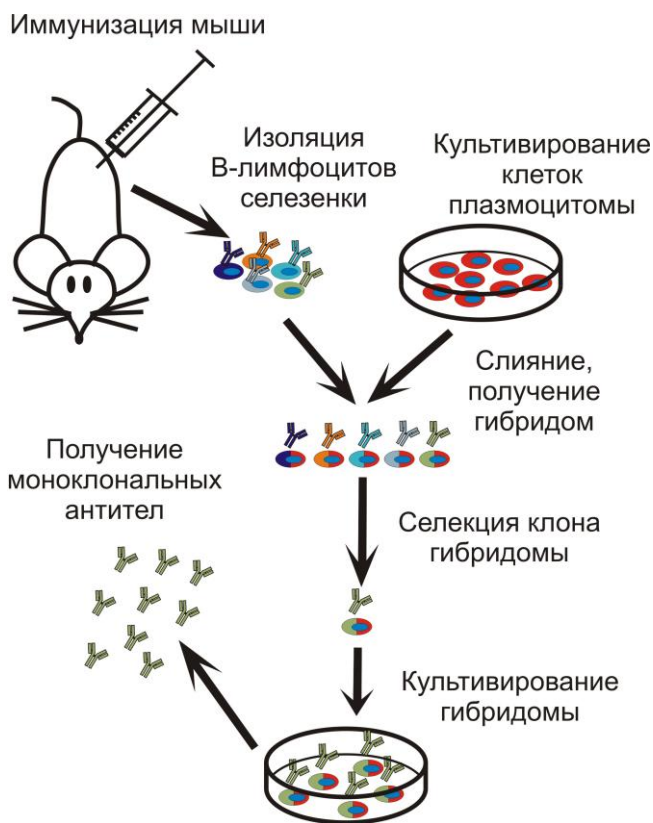


Рис. 4. Гибридомный метод получения антител

нальные антитела – наилучший выбор, поскольку мышинные моноклональные антитела при использовании на срезах тканей мышцы будут с высокой вероятностью обуславливать неспецифическое окрашивание.

Выбор моноклональных и поликлональных антител для иммуногистологического окрашивания диктуется различными аспектами. Производство поликлональных антител дешевле моноклональных, однако, количество сыворотки, которое можно получить у иммунизированных животных, ограничено, в то время как моноклональные антитела могут быть получены от гибридом в теоретически неограниченном количестве, и рыночная стоимость поликлональных и моноклональных антител примерно одинакова. В диагностической практике отдается предпочтение моноклональным антителам, поскольку требуется высокая точность детекции, которой отдается предпочтение в противовес чувствительности. В то же время низкая специфичность поликлональных антител позволяет детектировать в условиях научной лаборатории гомологичные белки у различных млекопитающих. Это позволяет экономить средства, поскольку отпадает необходимость покупки антител, например, к десмину человека, крысы, кролика, если лаборатория работает над изучением функции данного белка в филогенезе и высокая чувствительность окрашивания важнее.

Стоит отметить, что подбор антител – задача врача-патолога и научного сотрудника, а не лаборанта, и, как правило, это длительный эмпирический процесс, поскольку, по нашему опыту, конкретные коммерческие антитела не обеспечивают качественного окрашивания, несмотря на представленные рекомендации и гарантии производителя.

### **Мечение антител. Визуализация (детекция) комплекса «антиген-антитело» на гистологических срезах**

Для визуализации участков взаимодействия антител с антигеном необходимо ковалентно связать (конъюгировать) с антителом метку, которая хо-



рошо видима под микроскопом, поскольку сам по себе комплекс «антиген-антитело» бесцветен. В качестве подобной метки служат:

1. электронно-непрозрачная метка (ферритин, коллоидное золото) – подобный подход позволит визуализировать антиген с помощью электронного микроскопа, что очень ценно в научном, но дорогостояще в финансовом смысле.

2. флуорофор – это позволит визуализировать комплекс антиген-антитело в виде свечения при просмотре с помощью флуоресцентного микроскопа, метод исследования будет носить название «иммунофлуоресцентное окрашивание». Иммунофлуоресценция чрезвычайно полезна, поскольку дает возможность сравнительно легко реализовать множественное иммуногистологическое окрашивание (т.е. выявить несколько антигенов на одном и том же срезе при помощи антител, «светящихся» при различной длине волны УФ), а также важна для конфокальной микроскопии, имеющей высокое разрешение. При этом некоторые особенности иммунофлуоресценции (необходимость спецоснащения, короткий срок хранения окрашенных образцов, отсутствие методов амплификации сигнала, трудность морфологического анализа ввиду того, что не видна общая морфологическая структура ткани) лимитировали ее применение в клинике и ограничили научно-исследовательскими лабораториями. На сегодняшний день на рынке представлены диагностические антитела, меченные широким спектром флуорофоров: Fluorescein isothiocyanate (FITC), Rhodamine (TRITC, Rhodamine Red X), красители Cy® (Cy2, Cy3, Cy5, CY7, etc.), Alexa Fluor® (350, 405, 488, 546, 610), DyLight® Fluor (DyLight 350, DyLight 488, DyLight 550) и Oyster® dyes (Oyster-488, Oyster-550, Oyster-645, Oyster-800).

3. фермент – выявление активности фермента, фиксированного на антителах, т.е. сочетание ферментной гистохимии с иммуногистологией (иммуногистохимии) позволяет детектировать локализацию антигена с помощью светлопольной микроскопии. В современной иммуногистохимии в качестве ферментной метки используются пероксидаза хрена (horseradish peroxidase,

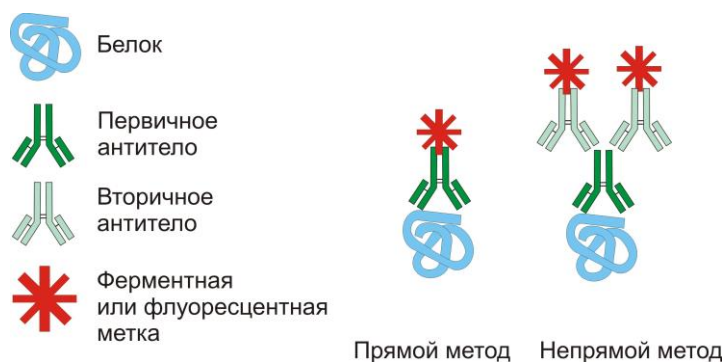
HRP) и щелочная фосфатаза (alkaline phosphatase, AP), глюкозооксидаза, бета-галактозидаза, уреазы не получили по разным причинам широкого распространения. Принцип выявления пероксидазной активности описан выше. В качестве хромогенов, помимо коричневого ДАБ (нерастворим в органических растворителях), можно использовать красный 3-амино-9-этилкарбазол (АЭК) (растворим в спиртах, заключать только в водную монтирующую среду), синий 4-хлоро-1-нафтол (ХН) (также растворим в спиртах), темно-синий п-фенилендиамин дигидрохлорид (реагент Хэнкера-Йейтса, нерастворим в органических растворителях) и др. Выявление активности щелочной фосфатазы (получаемой из кишечника телят) основано на использовании фосфатов нафтолов с добавлением солей диазония, при этом в качестве хромогенов используются синий нитро тетразолий, прочный красный TR, фуксиновый «плюс» (Fuchsin+) и другие красители. В нашей лаборатории мы используем сочетание бром-хлоро-индолил-фосфата с нитро-синим тетразолием (Bromo-chloro-indolyl-phosphate/Nitro blue tetrazolium, BCIP/NBT) для синего окрашивания. Применение щелочной фосфатазы необходимо для реализации двойного иммуногистохимического окрашивания и в меньшей степени для окрашивания тканей с высокой активностью эндогенной пероксидазы.

4. прочие молекулы – биотин, дигоксигенин, динитрофенол – сами по себе не служат для визуализации, но необходимы для реализации принципов амплификации (усиления) иммуногистохимического окрашивания.

Конъюгация антител с меткой – трудоемкий и дорогостоящий процесс, поэтому в настоящее время клинические и научные лаборатории пользуются в основном коммерческими антителами, что также обеспечивает стандартизацию окрашивания.

## Прямой и непрямой методы детекции иммунных комплексов – продуктов иммуногистологических реакций

Существуют два подхода к визуализации комплексов «антиген-антитело» на гистологическом срезе. Первый предполагает использование меченых первичных антител (т.е. антител к искомому антигену), метод детекции в таком случае называется прямым. Второй предполагает использование комбинации неконъюгированных первичных антител и вторичных антител (т.е. антител к  $F_c$ -фрагменту первичных антител, который, напомним, обладает видовой специфичностью), которые, в свою очередь, несут на себе метку (рис. 5). Такой подход объединяет непрямые методы детекции. Прямой метод детекции удобен своей простотой, однако обладает низкой чувствительностью, т.к. в этом случае на одну молекулу антигена приходится одно меченое антитело и один условный сигнал. Непрямой метод используется значительно чаще, поскольку использование меченых антител увеличивает интенсивность



сигнала вдвое, поскольку с одной молекулой первичных антител (и, соответственно, одной молекулой антигена) способны связаться две молекулы вторичных антител.

Рис. 5. Прямой и непрямой методы визуализации

Производят вторичные антитела по тому же принципу,

что и первичные, только в качестве антигена выступает  $F_c$ -фрагмент (или целая молекула иммуноглобулина) иммуноглобулинов (или одного из подклассов, например  $IgG_2$ ) какого-либо животного. При этом вторичные антитела против кроличьего иммуноглобулина можно получить от любого животного, кроме кролика. При использовании непрямого метода детекции нужно подбирать вторичные антитела в зависимости от того, какому животному принадлежат первичные, например, при использовании первичных кроличьих ан-

тител необходимо использовать ослиные антитела против кроличьего иммуноглобулина.

В качестве вторичных антител могут быть использованы как конъюгированные цельные молекулы иммуноглобулина, так и конъюгированные  $F_{ab}$ -фрагменты (моно- и биваленты), которые обладают меньшим размером и большей проникающей способностью для детекции внутриклеточных и внутриядерных антигенов, а также большей специфичностью.

Метод, при котором используются первичные и вторичные антитела против первичных, называется непрямой двухшаговый. Этот метод чаще всего применяется для иммуногистологического окрашивания на замороженных срезах, где антиген сравнительно интактен и не требуется амплификации. На парафиновых срезах подобный подход малоэффективен, что требует использования методов амплификации.

Существуют также трехшаговый непрямой метод (с третичными антителами против вторичных), непрямой метод с использованием ферментных-антиферментных иммунных комплексов, однако они в настоящее время не применяются ввиду наличия более качественных методов амплификации.

Использование вторичных антител, помимо увеличения времени окрашивания, увеличивает вероятность неспецифического связывания и фонового окрашивания. В то же время, использование непрямых методов позволяет применять одни и те же антитела и для иммуногистохимии, и для иммунофлуоресценции.

### **Маркировка антител. Подбор коммерческих антител**

Ниже представлена типичная схема этикетки коммерческих антител (рис. 6).

Строка 1: антитела были изготовлены для реакции с молекулами C-kit человека (h - human), мыши (m - mouse) и крысы (r - rat). Другими словами, такие антитела подходят для иммуногистологического окрашивания срезов

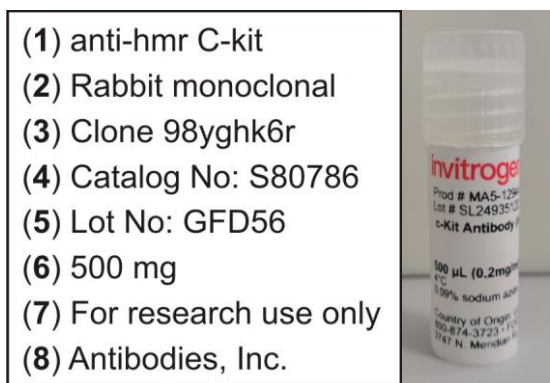


Рис. 6. Схема и пример этикетки коммерческих антител

тканей человека, мыши и крысы. При этом реакция с тканями других видов не исключена, но не тестировалась.

Строка 2: антитела являются моноклональными и получены от кролика.

Строка 3: номер клона, указанный изготовителем. Разные клоны могут подходить для разных целей, один клон подходит для иммуногистохимии, другой для проточной цитометрии, третий для иммуноблота.

Для поликлональных антител клон не указывается.

Строка 4: каталожный номер, присвоенный производителем, который помогает найти антитела на веб-сайте поставщика.

Строка 5: номер партии продукции, присвоенный изготовителем, обычно группе флаконов с теми же антителами, которые были получены в одно время из одного сырья. Иногда разные партии одних и тех же антител отличаются по качеству.

Строка 6: количество антител во флаконе. Если антитела поставляются в сухом (лиофилизированном) виде, количество указывается в миллиграммах (mg) или в микрограммах (может записываться либо как µg, либо ug). Если антитела поставляются в жидкой форме, их объем указывается в миллилитрах (mL) или в микролитрах (µL или uL). Когда антитела поставляются в виде жидкости, на этикетке также указывается их концентрация в мг/мл. Знание исходной концентрации первичных антител очень важно для правильного рабочего разведения.

Строка 7: предполагаемое назначение антител. Если антитела сделаны для исследования, а не в диагностических целях, производитель должен указать это на этикетке. В отличие от антител для исследования, диагностические антитела для применения в клинике должны быть подвергнуты значи-

тельно более строгому тестированию качества и должны иметь регистрационное удостоверение.

Строка 8: название компании-поставщика антител. Независимо от того, как много информации представлено на этикетке, всегда полезно посетить веб-сайт поставщика антител и внимательно прочитать фактическое техническое описание антител, которое, помимо прочего, также может содержать примеры изображений иммуногистологических окрашиваний, а также протокол окрашивания и рекомендации по оптимизации окрашивания.

Процесс подбора нужных антител должен учитывать много факторов, прежде всего, необходимо исходить из цели иммуногистологического исследования.

Подбор антител удобнее всего производить на веб-странице производителя (не поставщика) антител. Как правило, на сайте присутствует удобная система критериев подбора, которые позволяют сузить потенциальный поиск.

Рекомендуется начать с внимательного изучения информации о свойствах изучаемого антигена: его функции, тканевой и клеточной локализации, характерного для конкретной ткани паттерна экспрессии. Данную информацию можно получить на ресурсе <https://www.proteinatlas.org/>.

Далее стоит произвести поиск антител на порталах, которые собирают сведения о продуктах для иммуногистологии с сайтов различных производителей: <https://www.linscottsdirectory.com/>, <http://antibodydirectory.com/>, <https://www.antibodyresource.com/>. На этих же ресурсах необходимо сразу ограничить поиск по самым главным критериям – назначение антител (ИГХ на парафиновых срезах – ИНС-Р, иммунофлуоресценция – ИФ и т.д.) и клональность и реактивность – в зависимости от целей (человек, мышь, крыса). Выбор хоста (вида, от которого получены антитела) необходимо производить с учетом вторичных антител и систем детекции, которые имеют в распоряжении лаборатории.

После этого необходимо перейти на веб-страницу поставщика, где с помощью встроенных форм для поиска можно уточнить другие важные пара-

метры антител. Нужно обратить внимание на эталонное изображение, которое предоставляет производитель, на его качество и соответствие ожидаемой картине. Плохое качество или отсутствие изображения с заявленным производителем назначением антител должны насторожить. Также важно соотношение цены и поставляемого количества антител с учетом рекомендуемого производителем титра.

Кроме того, следует обращать внимание на иммуноген (конкретную аминокислотную последовательность), который был использован для получения антител. Так, стандарт иммуногистологического исследования миодистрофии Беккера для подтверждения частичной утраты дистрофина/экспрессии укороченного белка предполагает использование 3-х разных антител: к С-концевой части, к N-концевой части и к род-домену дистрофина.

После выбора подходящего лота необходимо связаться с официальными дистрибьютерами данного поставщика в России, контакты которых также можно найти на сайте.

Диагностические антитела, используемые для диагностических целей, должны быть снабжены соответствующим регистрационным удостоверением. Прежде чем внедрять окрашивание с новыми антителами в рутинную клиническую или исследовательскую практику, рекомендуется произвести их тестирование в сравнении с уже имеющимися антителами к данному антигену. При этом важно использовать достаточно специфичную и чувствительную систему детекции, широкий спектр контрольных образцов (как нормальных, так и при необходимости – с патологией), которые будут отражать различные паттерны распределения антигена. Крайне важно сопоставлять полученные результаты с внешними референсными центрами, литературой и коллегами.

### **Хранение антител. Титр (разведение) антител**

Коммерческие антитела обычно поставляются в трех формах:

1) «сухие» (лиофилизированные) – такие антитела удобны для длительного хранения при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Перед использованием их необходимо разве-

сти (в буфере, деионизированной воде, согласно рекомендациям поставщика) и далее хранить при +4°C.

2) жидкий концентрат – такие антитела обычно требуют холодной доставки. Антитела, рекомендованные для хранения при -20°C, рекомендуется заранее разделить на 10-20 малых аликвот и заморозить, избегая повторных циклов разморозки-заморозки.

3) разведенные готовые к использованию (ready-to-use) – требуют хранения при +4°C.

Сухие разведенные антитела и концентраты перед использованием требуют разведения до оптимальной концентрации, которая будет давать четкое окрашивание без фонового окрашивания. Такое разведение называется титром. Титр обозначается в виде дроби 1:n, где n – объем растворителя, который необходимо добавить к изначальному (стоковому) раствору антител. Обычно титр первичных антител варьирует от 1:10 до 1:1000, титр вторичных – от 1:100 до 1:4000. Изначальный диапазон титров указывается производителем, но обычно требует калибровки с учетом вида окрашиваемой ткани, применяемого метода детекции, а также срока эксплуатации антител. Рекомендуется откалибровать титр вновь поступивших антител, начав с пилотного окрашивания различными разведениями, в том числе в 2-3 раза превышающим рекомендованное производителем. Рабочий титр – строго индивидуальная тканеспецифичная характеристика конкретных антител в данный промежуток времени.

Разведение антител осуществляется с помощью буферов (TBS pH 7,4, PBS), блокирующих растворов на основе буферов или специального коммерческого растворителя. Имеются сообщения, что высокая ионная сила растворителя (которая достигается за счет электролитов, например, в случае TBS это натрия хлорид) приводит к потере свойств антител. Во избежание этого рекомендуется использовать специальный буфер 0,05 М Трис pH 6,0 или 8,6.

С практической точки зрения разведение антител удобно производить в микропробирках-«эппендорфах» объемом 1 мл с плотно закрывающейся



крышкой с учетом объема антител, необходимого для окрашивания определенного количества срезов (оптимально 50 мкл раствора антител на срез). Так, если требуется окрасить 8 стекол с разведением антител 1:100, необходимо взять  $8 \times 50 = 400$  мкл разведенных антител. Для разведения нужно будет взять  $400/100 = 4$  мкл стокового раствора антител и  $400-4 = 396$  мкл растворителя. Обычно мы пренебрегаем объемом антител и берем 400 мкл растворителя.

Нужно учитывать, что больше не значит лучше: большая концентрация антител увеличивает интенсивность окрашивания лишь до определенной степени, одновременно способствуя возникновению фонового окрашивания.

Раствор антител готовится *ex tempore* и хранится далее при  $+4^{\circ}\text{C}$ . По нашему опыту, готовый раствор антител может сохранять свою активность в течение примерно 7-14 дней. Важно снабжать микропробирки подробной подписью с указанием названия антител, титра и даты разведения.

Отметим, что срок хранения стоковых растворов сильно варьирует в зависимости от производителя и может быть существенно больше гарантийного. У нас был опыт сохранения активности антител даже после 10 лет после истечения гарантийного срока хранения. Перед утилизацией просроченных антител рекомендуется протестировать их и при необходимости откалибровать титр.

### **Методы (системы) амплификации детектируемых сигналов от продуктов иммуногистологических реакций**

Необходимость амплификации (усиления) сигнала при иммуногистологическом (и, прежде всего, иммуногистохимическом) окрашивании (далее просто амплификации) диктуется низким уровнем экспрессии некоторых антигенов-объектов выявления, а также потерей иммуногенности антигенов в процессе фиксации в формалине и заливки в парафин. Кроме того, использование методов амплификации позволяет существенно снижать концентрацию

используемых первичных и вторичных антител, делая иммуногистологические окрашивания более дешевыми и доступными.

### Авидин-биотиновые системы амплификации

Авидин-биотиновые системы амплификации основаны на высоком сродстве биотина – низкомолекулярного витамина – с гликопротеином авидином, впервые выделенным из яичного белка. Сильно гликозилированный авидин обладает свойством неспецифически связываться с тканями и в настоящее время заменен его негликозилированным гомологом стрептавидином из бактерии *Streptomyces avidinii*. В подобную систему детекции (например, LSAB – labeled Streptavidin-Biotin) входят вторичные антитела (как правило, смесь из анти-кроличьих и анти-мышинных), конъюгированные с биотином, и стрептавидин, конъюгированный с несколькими молекулами фермента или флуорофора (рис. 7). Таким образом повышается чувствительность окрашивания. Следует принимать во внимание, что многие ткани млекопитающих

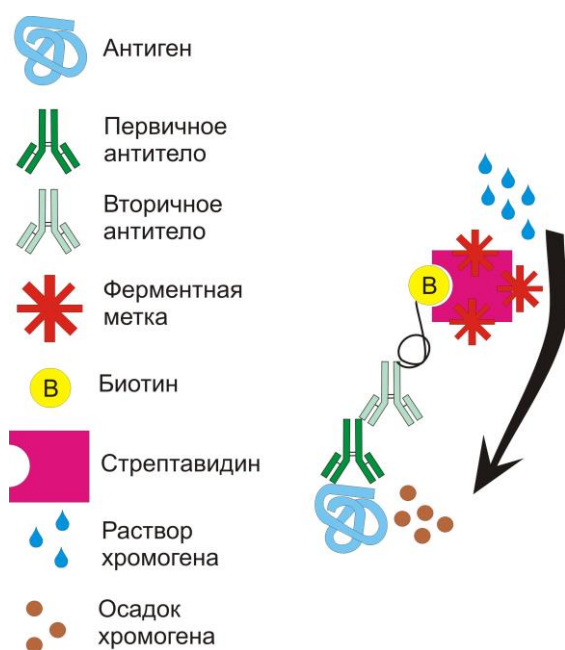


Рис. 7. Авидин-биотиновая система амплификации

содержат биотин, использование этого метода на замороженных срезах может требовать блокирования эндогенного биотина, хотя парафиновые срезы лишены этого недостатка.

Другой разновидностью авидин-биотиновых систем амплификации является ABC (Avidin-Biotin Complex), которая в настоящее время используется редко ввиду низкой проникающей способности образующегося авидин-биотинового комплекса.

На похожем принципе основаны улучшенные 3-этапные системы детекции на основе вторичных антител, конъюгированных с 3-гидроксихиноксалином

(3-HydroxyQuinoxaline, HQ), которые служат гаптенем для третичных анти-тел, конъюгированных с пероксидазой (например, Optiview, Ventana/Roche).

### **Полимерные системы амплификации**

Следующим этапом развития систем амплификации стали полимерные методы, в которых молекула инертного полимера (например, декстрана) несет на себе большое количество (десятки-сотни) молекул фермента (пероксидазы или щелочной фосфатазы) и до нескольких десятков молекул вторичных антител (рис. 26). Данная система обеспечивает не только более чем десятикратное усиление сигнала по сравнению с авидин-биотиновыми системами детекции, но и исключает фоновое окрашивание по вине эндогенного биотина.

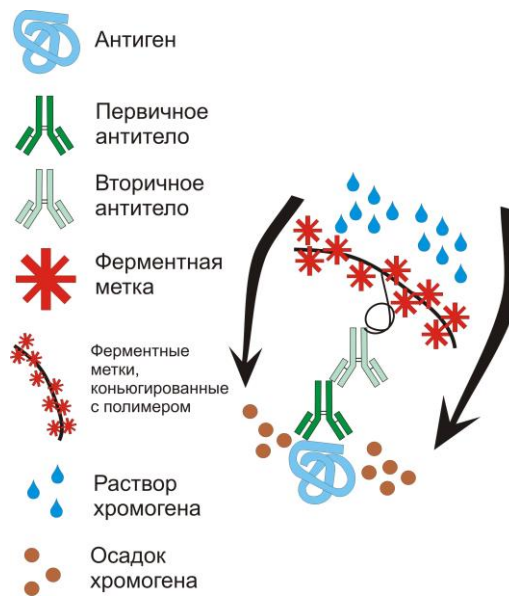
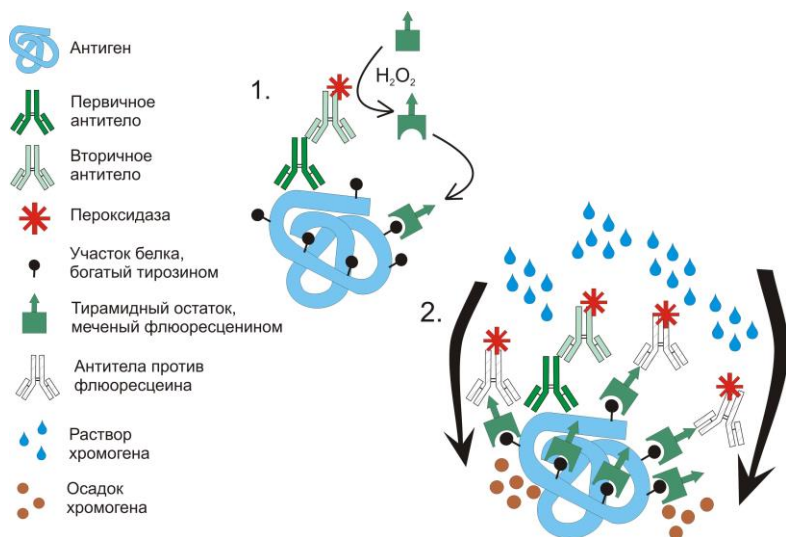


Рис. 8. Полимерная система амплификации

### **Тирамидные системы амплификации**

Данная система амплификации предполагает использование тирамидных конъюгатов в качестве субстратов пероксидазы, которая фиксирована к вторичным антителам. Фенольное кольцо тирамидных остатков в присутствии пероксида водорода быстро окисляется пероксидазой и ковалентно связывается с богатыми электронами участками белков, непосредственно окружающих участок связывания комплекса «антген-первичное антитело» с вторичным антителом. Поскольку каждый тирамидный остаток сам может быть конъюгирован с ферментом, флуорофором, биотином или эпитопом, которые в свою очередь способны связаться со стрептавидином или антителами, конъюгированными с несколькими молекулами фермента, это приводит к примерно 100-1000-кратной амплификации сигнала по сравнению с обычным непрямым методом (рис. 9). Существуют комбинации полимерного метода



амплификации с тирамидным. Данные методы позволяют достичь отличного качества окрашивания даже на парафиновых срезах и детектировать антигены, экспрессируемые на очень низком уровне.

Рис. 9. Тирамидная система амплификации

### Способы оптимизации качества иммуногистологического окрашивания

Основным показателем, характеризующим качество иммуногистологического окрашивания, является соотношение желательного сигнала и фонового окрашивания («сигнал/шум»). Фоновое окрашивание является результатом неспецифического связывания диагностических антител, наличия эндогенной активности ферментов и биотина, аутофлуоресценции живых тканей. Для повышения качества окрашивания стараются увеличить интенсивность желательного сигнала, применяя вышеописанные методы амплификации и демаскировку антигенных детерминант, и уменьшить фоновое окрашивание за счет блокировки неспецифического связывания и эндогенной активности ферментов.

#### *Демаскировка антигенных детерминант*

Маскирование антигенных детерминант связано с фиксацией в формальдегиде: «полезный» механизм образования метиленовых мостиков имеет обратную сторону – изменение нативной конформации белка, образование сшивок с соседними белками, что препятствует взаимодействию антител с антигеном. В подобном случае парафиновый срез требует предварительной обработки ферментами или нагревания с целью разрыва избыточных связей,

раскрытия антигенных детерминант и восстановления, по крайней мере, частично нативной трехмерной структуры белка (рис. 10).

Наиболее часто используемым методом демаскировки является раскрытие эпи-

топов, индуцируемое нагреванием (Heat-induced epitope retrieval, HIER). С практической точки зрения HIER представляет

собой кипячение предварительно депарафинизированных срезов в 0,01-0,1 М цитратном буфере (рН 6,0) или 0,001-0,1 М Трис-ЭДТА (рН 8,0-9,0) при температуре 90-110°C в течение 30-60 мин в термостойкой стеклянной емкости на плитке, на водяной бане, в микроволновой печи или пароварке-стимере. Подбор конкретных условий строго индивидуален и зависит от конкретного антигена и антител. В нашей лаборатории мы чаще всего применяем кипячение в 0,01 М цитратном буфере, рН 6,0 в течение 30 мин на плитке или водяной бане с последующим остыванием срезов в течение 20-30 мин. Определенным лимитирующим фактором является отставание срезов от предметного стекла в процессе бурного кипения, буферы с щелочным рН дополнительно омыляют срезы и способствуют их отслолке. Для предотвращения подобных проблем следует тщательно следить за качеством срезов, правильностью нанесения адгезивного покрытия, достаточно просушивать срезы или применять специальные предметные стекла с адгезивным покрытием. Кроме того, высокие результаты показывает демаскировка под покровным стеклом: после депарафинизации, регидратации и инкубации в нейтральном буфере, на срез наносится большая капля буфера для HIER, после чего срез накрывается покровным стеклом и аккуратно прижимается пластиковым зажимом, избегая появления пузырей воздуха, после чего стекло подвергается кипячению. По-

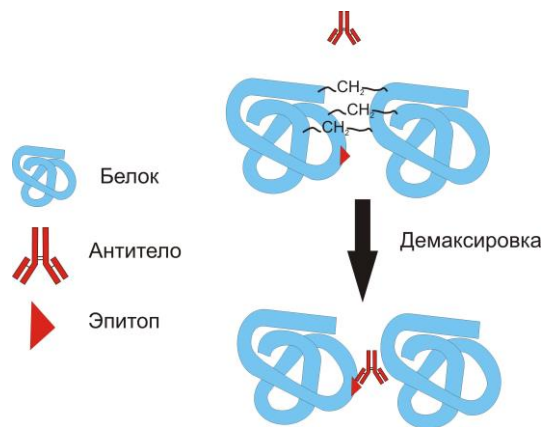


Рис. 10. Демаскировка антигенных детерминант

сле кипячения охлажденное стекло помещается в дистиллированную воду вертикально, после чего дожидаются отпадения покровного стекла.

В целом следует отметить, что для большинства коммерческих антител предпочтительно использование щелочных буферов на основе ЭДТА pH 8,0, некоторые антигены (EP-CAM, GP200, CD21, CD61, NGFR, Desmoglein-3) для успешного выявления требуют модифицированных буферов с низким pH. При этом эффективность ИИЕР прямо пропорциональна как температуре, так и длительности инкубации, так что можно модифицировать протокол демаскировки, увеличивая температуру с одновременным сокращением времени кипячения, и наоборот. Перефиксированный в формалине материал требует увеличения времени демаскировки.

Вторым методом демаскировки является ферментная обработка 0,05-0,1% протеиназой К, проназами, пепсином, трипсином в течение 5-30 мин при 37°C, однако такая демаскировка отличается низкой степенью стандартизации и избирательности и приводит к «перевариванию» антигенных детерминант. Не более 2% коммерческих антител требуют ферментной демаскировки (например, FVIII, LMV СК, PAN СК, EGFR, TCR, белки внеклеточного матрикса - коллаген III, ламинин, коллаген IV) или не требуют ее вообще. Ферментная демаскировка требует титрования концентрации фермента, подбора времени (избыточная ферментации ухудшает качество визуализации) и температуры (повышение температуры увеличивает до определенной степени эффективность демаскировки).

Для замороженных срезов из ткани, фиксированной в формалине, применяют также демаскировку с помощью 1% додецилсульфата натрия (sodium dodecyl sulfate, SDS) в 0,01 М фосфатном буфере в течение 5 мин при комнатной температуре с последующей тщательной промывкой в фосфатном буфере.

### **Блокирование неспецифического связывания антител**

Неспецифическое связывание антител связано с присутствием в тканях рецепторов F<sub>c</sub>-фрагментов и иммуноглобулиноподобных белков на мембранах макрофагов, моноцитов, гранулоцитов, лимфоцитов и других клеток (рис. 11). Кроме того, возможно возникновение гидрофобных, ионных, водородных связей между антителами и иррелевантными белками тканей (как правило, компонентами соединительной ткани – коллаген, эластин, ламинин). Предотвратить неспецифическое связывание лучше всего инкубацией срезов с не-

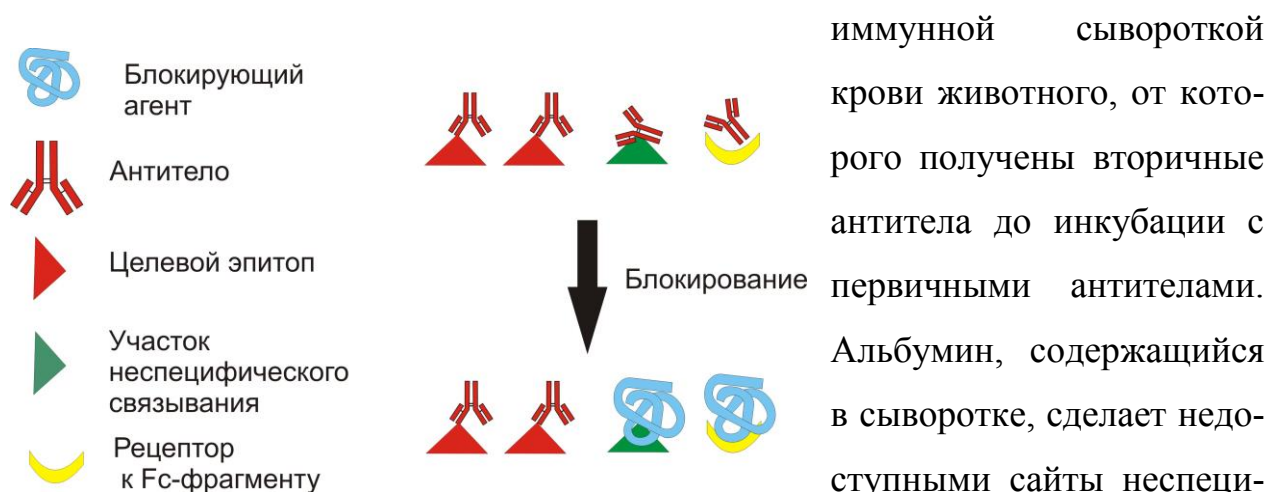


Рис. 11. Блокирование неспецифического связывания антител

и вторичными антителами, полученными от мыши или кролика, можно использовать 1% раствор альбумина бычьей сыворотки (bovine serum albumin, BSA) в буфере.

По нашему опыту и по свидетельству других исследователей, в большинстве случаев при использовании современных систем детекции в данном этапе отсутствует необходимость.

### **Блокирование эндогенной активности пероксидазы и щелочной фосфатазы**

Эндогенную активность пероксидазы в аспекте иммуногистохимического окрашивания можно определить как любые реакции, ведущие к распаду пероксида водорода и осаждению хромогена с образованием неспецифиче-

ского окрашивания. Пероксидазной активностью обладают гемоглобин, миоглобин, цитохромы в гранулоцитах и макрофагах, каталаза в печени и почках. Блокирование эндогенной пероксидазной активности (или просто эндогенной пероксидазы) осуществляется инкубацией гистологических срезов в 0,03-3% растворе пероксида водорода в фосфатном буфере (Phosphate-buffer saline, PBS) или Трис-буфере (Tris-buffer saline, TBS) с pH 7,4. Избыточное количество субстрата приводит к тому, что ресурс эндогенных ферментов вырабатывается и происходит их инактивация. При избыточном выделении пузырьков кислорода, угрожающих механическим разрушением срезам, рекомендуется использовать меньшее разведение пероксида водорода или использовать в качестве растворителя метанол (11 частей 3% перекиси водорода, 4 части метанола). Применение блока пероксидазы возможно как до, так и после НИ-ЕР. Блокирование эндогенной пероксидазы – рутинный этап иммуногистохимического окрашивания, который, однако, не требуется при применении систем детекции на основе щелочной фосфатазы и флуорохромоов.

Эндогенная активность щелочной фосфатазы присуща для печени, костей, кишечника, плаценты, некоторых лейкоцитов и опухолей. Эндогенная щелочная фосфатаза блокируется 1мМ раствором левамизоля непосредственно в момент выявления активности ферментной метки (проявки). Кишечная изоформа щелочной фосфатазы таким образом не может быть заблокирована, для этого требуется промывка в слабой кислоте, например, 0,03-0,5 М соляной или 1 М лимонной. Кроме того, активность эндогенной щелочной фосфатазы существенно снижается при НИЕР.

### ***Блокирование эндогенного биотина***

Биотин содержится в больших количествах в почке, печени, селезенке. Использование авидин-биотиновых систем амплификации на замороженных срезах данных органов требует блокирования эндогенного биотина при помощи последовательной инкубации в 0,01% растворе авидина и 0,05% биотина в фосфатном буфере в течение 10-15 мин каждый до инкубации с первич-



ными антителами, сопровождаемое промывкой в фосфатном буфере между инкубациями.

### *Аутофлуоресценция*

Аутофлуоресценция тканей млекопитающих, возникающая в основном благодаря флавинам и порфиринам (гемоглобин), липофусцину, эластину, коллагену, существенно ограничивает применение иммунофлуоресценции. Как правило, аутофлуоресценция перекрывает спектр флуоресценции большинства известных флуорофоров. Для устранения аутофлуоресценции предлагается использовать флуорофоры с большей длиной поглощения (Cy5, Cy7), алгоритмы программной постобработки изображений. Подходы, включающие обработку срезов борогидридом натрия, глицином, толуидиновым синим, продемонстрировали свою низкую эффективность. Своего рода «по-

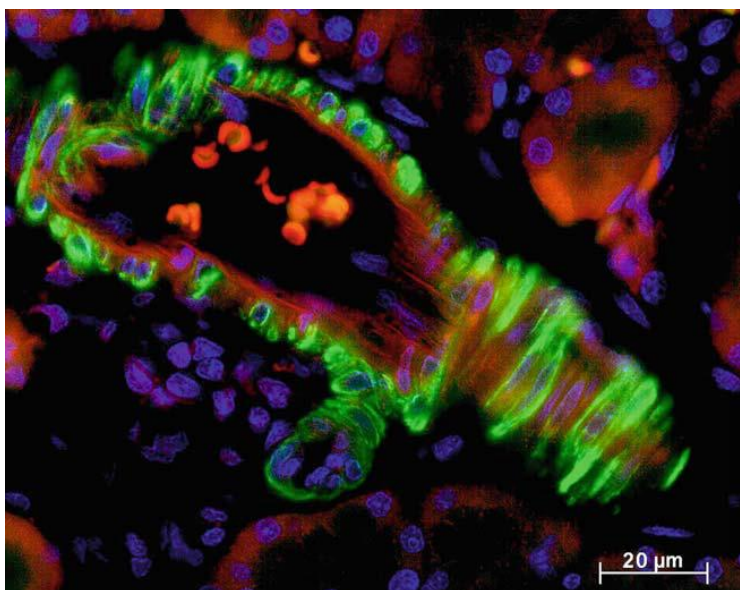


Рис. 12. Иммунофлуоресцентное окрашивание  $\alpha$ -гладкомышечного актина (FITC, зеленый канал) в стенке кровеносных сосудов почки. Красная аутофлуоресценция эритроцитов, эластических волокон и почечных канальцев, ядра докрашены DAPI (синий канал). Источник: I.V. Buchwalow, W. Bocker *Immunohistochemistry: Basics and Methods*, 2010.

зитивным» подходом является предложение использовать аутофлуоресценцию как естественную окраску в дополнение к специфическому окрашиванию (рис. 12). Так, эластические мембраны сосудов обладают существенной аутофлуоресценцией в спектре от 350 до 650 нм, что перекрывает спектр большинства флуорофоров. В этом случае можно использовать зеленый флуоресцеин изотиоцианат в качестве метки для специфической флуоресценции, производя детекцию

флуоресценции в зеленом фильтре на короткой экспозиции, а в красном на длинной, объединив изображения в одно.

Ввиду гетерогенности антигенов различных тканей, различий антител и способов пробоподготовки не существует идеального протокола иммуногистологического окрашивания. В приложении приведены принципиальные схемы основных иммуногистологических окрашиваний. Мы предпочитаем использовать иммунофлуоресценцию для замороженных срезов, а иммуногистохимию для парафиновых. Это связано с тем, что замороженные срезы дают сильное фоновое окрашивание при пероксидазном методе, а двухшагового непрямого иммунофлуоресцентного метода обычно недостаточно для визуализации антигенов на парафиновых срезах.

### **Контроль иммуногистологического окрашивания**

Критически важным для иммуногистологических окрашиваний является параллельное проведение контрольных окрашиваний с целью оценки соответствия полученной при окрашивании картины реальности. С этой целью используют два вида контроля: 1) контроль специфичности окрашивания 2) контроль свойств ткани.

#### ***Контроль специфичности окрашивания***

Контроль специфичности бывает положительный и отрицательный.

Положительный контроль представляет собой срез ткани, в котором точно присутствует исследуемый антиген. Так, для диагностики карциномы при помощи антител к цитокератинам в качестве положительного контроля можно взять срезы эпителия, где этот цитокератин экспрессируется. Данный вид контроля важен при тестировании новых антител, при применении ранее используемых антител на новом объекте. Отсутствие окрашивания на положительном контроле требует пересмотра протокола, изменения титра антител, системы детекции, проверки качества использованных реагентов. Ограничением иммуногистологического метода является то, что отсутствие выяв-

ления экспрессии какого-либо антигена иммуногистологически при наличии окрашивания положительного контроля де-факто не говорит напрямую об отсутствии экспрессии данного антигена, можно лишь говорить об отсутствии окрашивания с использованием данного конкретного метода детекции с присущим ему ограничением чувствительности.

Набор образцов – положительных контролей критически необходим для любой лаборатории, проводящей иммуногистологические исследования.

Отрицательный контроль представляет собой срез ткани, в котором точно отсутствует исследуемый антиген. Так, для выявления антигенов вируса гепатита В в качестве отрицательного контроля можно взять срезы печени здорового человека. Наличие окрашивания в отрицательном контроле говорит о недостаточной специфичности первичных антител и (или) необходимости оптимизации протокола окрашивания.

Точно установить неспецифическое связывание, или кросс-реактивность, первичных антител может абсорбционный контроль. При этом антитела инкубируют с избытком иммуногена, ожидая, что произойдет нейтрализация антител и добавление этой смеси для иммуногистологического окрашивания не приведет к окрашиванию. Если иммуноген-нейтрализованные антитела производят окрашивание, то оно, скорее всего, неспецифическое.

Удобно применять внутренний положительный и отрицательный контроли, когда в исследуемом образце заведомо идентифицируются структуры, которые экспрессируют или не экспрессируют антиген. Например, звездчатые клетки печени (клетки Ито) в печени крыс идентифицируются по экспрессии десмина, внутренним положительным контролем в этом случае будут являться гладкомышечные клетки кровеносных сосудов печени. Другим примером может являться слабая в норме экспрессия эстрогеновых рецепторов эпителием протоков молочной железы при анализе экспрессии эстрогеновых рецепторов опухолью молочной железы.

### ***Контроль свойств ткани***

Данная разновидность контроля необходима, чтобы убедиться, что в ткани отсутствуют эндогенные субстанции, которые могут скрыть или симулировать специфическое окрашивание. Данный вид контроля очень важен для иммунофлуоресцентного окрашивания. Так, предварительным этапом иммунофлуоресцентного окрашивания может быть изучение под флуоресцентным микроскопом неокрашенного среза с целью детекции аутофлуоресценции. При наличии аутофлуоресценции в определенном канале следует взять вторичные антитела, меченные флуорофором, имеющим пик свечения в другом канале.

Использование этого вида контроля необходимо также для того, чтобы отличить неспецифическое окрашивание (за счет неспецифического связывания вторичных антител, эндогенной ферментной активности и т.д.) от специфического. Для этого необходимо произвести одновременное окрашивание двух срезов образца, причем один из срезов нужно окрашивать по протоколу, а на второй нанести растворитель антител, проводя в остальном те же манипуляции, что и с первым. Наличие окрашивания на втором срезе говорит о недостаточной специфичности вторичных антител, необходимости увеличить инкубацию в блокирующих растворах, оптимизировать титр или поменять вторичные антитела. Если вместо растворителя антител использовать изотипический (т.е. содержащий тот же изотип – IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>) неиммунный иммуноглобулин от того же животного, что и первичные моноклональные антитела, можно исключить неспецифическое связывание первичных антител. В случае окрашивания в данном случае имеет смысл приобрести антитела другого изотипа.

При подозрении на неспецифическое окрашивание вследствие эндогенной ферментной активности рекомендуется произвести выявление ферментной активности сразу после блока эндогенного фермента.

## Алгоритм оптимизации иммуногистологического окрашивания

Так как не всегда удается получить качественное иммуногистологическое окрашивание новыми антителами с первого раза, чаще всего требуется оптимизация рекомендуемого производителем протокола. Как правило, по соотношению интенсивности специфического сигнала и фонового окрашивания исходы иммуногистологического окрашивания укладываются в 9 вариантов и отражены в таблице 4.

Таблица 4

Исходы иммуногистологического окрашивания

	Специфическое окрашивание		
Фоновое окрашивание	Сильное	Слабое	Отсутствует
Отсутствует	A	D	G
Слабое	B	E	H
Сильное	C	F	I

Для оптимизации окрашивания используется следующий алгоритм:

1. Убедитесь, что отсутствуют принципиальные погрешности протокола, пройдя чек-лист:

1.1. Убедитесь, что выполняются все шаги и инструкции протокола.

1.2. Сверьтесь со спецификацией антител и убедитесь, что используется правильный титр, правильный метод HIER, правильная блокирующая сыворотка.

1.3. Подтвердите совместимость вторичных антител к виду и подклассу иммуноглобулина первичных антител.

1.4. Убедитесь, что используете правильный позитивный контроль, не поврежденный в процессе пробоподготовки и хранения.

1.5. Убедитесь, что температура в термостате, где хранятся срезы, не превышает 60°C.

1.6. Проверьте все реагенты на правильность приготовления, срок годности, условия хранения.

1.7. Имейте в виду, что неадекватная фиксация (недостаточная фиксация), неуместный фиксатор (иной помимо 10% нейтрального забуференного формалина), и высокая кислотность или длительная декальцинация могут привести к ложноотрицательному результату для многих антител.

2. Если чек-лист пройден, то приступайте к выполнению алгоритмов оптимизации в зависимости от исходов:

*A. Сочетание сильного специфического окрашивания и отсутствие фонового:*

- проверьте первичные антитела в нескольких больших разбавлениях, чтобы получить максимальное разведение с оптимальным окрашиванием, чтобы сэкономить первичные антитела и сократить расходы.

*B. Сочетание сильного специфического окрашивания и слабого фонового:*

- уменьшите концентрацию первичных антител;
- сократите время инкубации первичных антител;
- сократите время инкубации вторичных антител;
- увеличьте время инкубации в блокирующих растворах.

*C. Сочетание сильного специфического окрашивания и сильного фонового:*

- уменьшите концентрацию первичных антител;
- сократите время инкубации первичных антител;
- сократите время инкубации вторичных антител;
- увеличьте время инкубации в блокирующих растворах;
- попробуйте другие методы демаскировки антигена.

*D. Сочетание слабого специфического окрашивания и отсутствие фонового:*

- увеличьте концентрацию первичных антител;
- увеличьте время инкубации первичных антител;

- увеличьте время инкубации вторичных антител;
- используйте более чувствительную систему детекции;
- попробуйте другие методы демаскировки антигена.

*Е. Сочетание слабого специфического окрашивания и слабого фонового:*

- увеличьте концентрацию первичных антител, уменьшив время инкубации;
- увеличьте время инкубации в блокирующих растворах;
- увеличьте время инкубации вторичных антител;
- используйте более чувствительную систему детекции;
- попробуйте другие методы демаскировки антигена;
- используйте другие первичные антитела.

*Ф. Сочетание слабого специфического окрашивания и сильного фонового:*

- увеличьте время инкубации в блокирующих растворах;
- используйте более чувствительную систему детекции;
- попробуйте другие методы демаскировки антигена;
- используйте другие первичные антитела.

*Г, Н, I. Сочетание отсутствия специфического окрашивания и отсутствия, слабого или сильного фонового:*

- еще раз поэтапно пройдите чек-лист;
- увеличить концентрацию первичных антител и время инкубации;
- попробуйте другие методы демаскировки антигена;
- используйте более чувствительную систему детекции;
- обратитесь в технический отдел поставщика первичных антител за помощью;
- используйте другие первичные антитела.

Независимо от наличия или отсутствия специфического окрашивания при использовании новых антител рекомендуется использовать подход тест-батарей, который предполагает тестирование антител с помощью ряда прото-

колов, включающих различные разведения антител, условия демаскировки и т.д., одновременно. Ниже представлен вариант такой тест-батареи (табл. 5).

Таблица 5

Тест-батарея для отработки протокола окрашивания

	Разведение 1 (рекомендованное производителем)	Разведение 2 (выше рекомендованного)	Разведение 3 (ниже рекомендованного)
<b>Условия демаскировки</b>	Без демаскировки		
	Трипсин в течение 5 мин.		
	ННЕР в цитрате с рН 6,0 в течение 30 мин.		
	ННЕР в трис-ЭДТА с рН 9.0 в течение 30 мин.		
	ННЕР в цитрате с рН 6.0 в течение 20 мин + трипсин в течение 10 мин.		
	ННЕР в трис-ЭДТА с рН 9.0 в течение 60 мин.		
	Трипсин в течение 10 мин + ННЕР в трис-ЭДТА с рН 9.0 в течение 30 мин.		
	Трипсин в течение 20 мин.		

Таким образом, реализуется 33 различных протокола, из которых в дальнейшем выбирается протокол с наилучшим результатом.

### **Выявление нескольких антигенов на одном гистологическом срезе**

Одновременное выявление нескольких антигенов на одном срезе требуется для выявления различных популяций клеток, выявления клеток, находящихся в различных функциональных состояниях, установления колокализации различных антигенов. Для этих целей могут подойти серийные срезы, однако их получение сопряжено с трудностями и иногда не позволяет достоверно установить колокализацию, поскольку размер клеток может быть

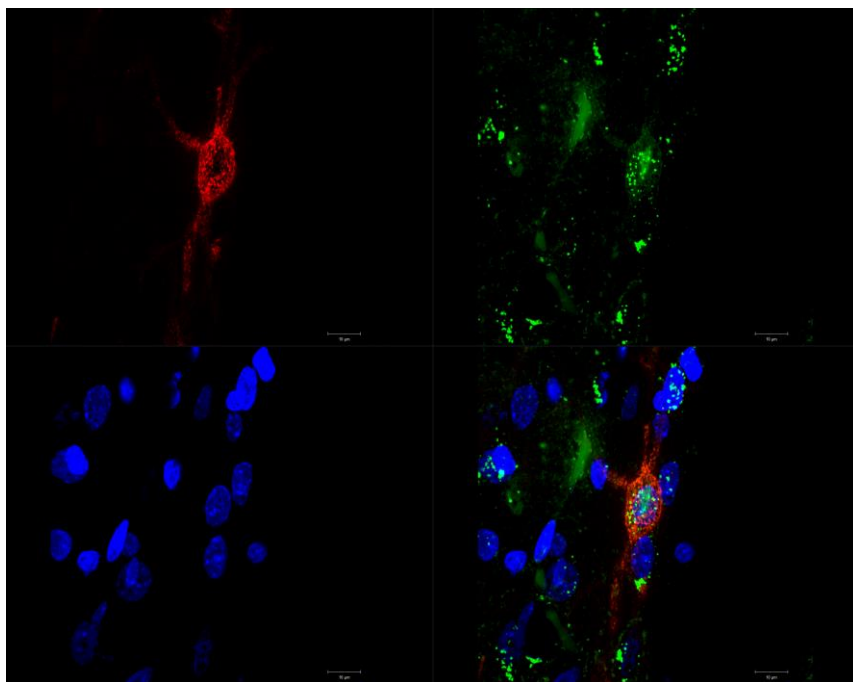


меньше толщины среза. Отметим, что множественное иммуногистологическое окрашивание требует хорошо отработанных одинарных окрашиваний.

Существует два принципиальных подхода для выявления нескольких антигенов на одном срезе: одновременный и последовательный.

### **Одновременное двойное (множественное) иммуногистологическое окрашивание**

Множественное иммуногистологическое окрашивание можно реализовать использованием первичных антител от различных видов (например, для одного антигена от мыши, для другого от кролика) с соответствующими вторичными антителами от одного животного, мечеными разными флуорофорами (например, ослиные анти-мышинные, меченные FITC и ослиные анти-кроличьи, меченные Alexa Fluor 555) (рис. 13) или разными ферментами (пероксидаза и щелочная фосфатаза).



Альтернативно это можно сделать при помощи систем детекции, селективно реактивных против соответствующих антител и несущих разные ферментные метки (например, полимерный-АР против мышинных первичных антител и полимерный-HRP метод против кроличьих). При этом срез инкубируется со

Рис. 13. Нейрон IV слоя соматосенсорной коры, мозг мыши. Перинейрональная сеть (красный, агглютинин *Wisteria floribunda*, конъюгированный с Alexa 633), парвальбумин (зеленый, антитела к парвальбумину, конъюгированные с Alexa 488) ядра (синий, DAPI). Фото Мельниковой А.А.

смесью антител от разных видов и смесями реагентов (рис. 14). Кроме того,

можно использовать моноклональные антитела от одного вида, но разного изотипа с соответствующими изотип-специфичными вторичными антителами. Данный способ хорошо подходит для изучения колокализации антигенов.

При одновременном двойном иммуногистохимическом окрашивании важно правильно подобрать сочетание хромогенов для достаточного контраста окрашиваний. Наиболее частые варианты:

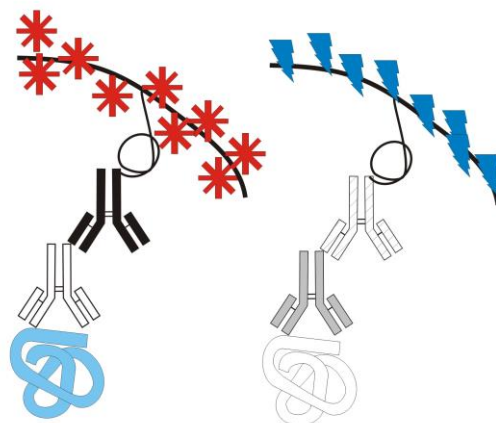
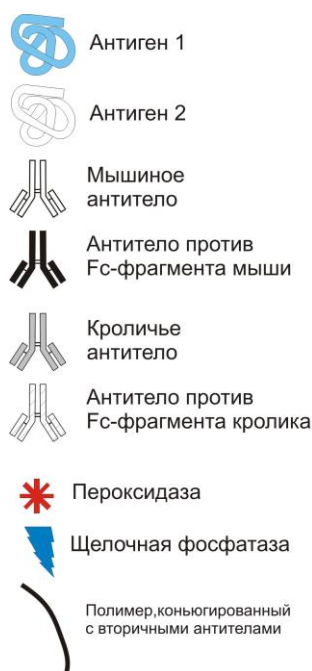


Рис. 14. Одновременное двойное иммуногистохимическое окрашивание

- ВСIP/NBT (щелочная фосфатаза, синий)+АЭК (пероксидаза, красный)+метиленовый зеленый в ацетатном буфере pH 5,5 (докраска ядер), заключение в глицерогель. Этот вариант не слишком удачен, поскольку метиленовый зеленый изменяет цвет красного хромогена на коричневый, а синий хромоген «ложится» достаточно диффузно и часто не позволяет наблюдать колокализацию, хотя при качественной реакции колокализация видна в виде четкого вишневого окрашивания;

- ДАБ (пероксидаза, коричневый)+Fuchsin+ (щелочная фосфатаза, пурпурный)+гематоксилин (докраска ядер), заключение в глицерогель. Вариант достаточно удачный, но за счет отсутствия эффекта наложения цветов между красным и коричневым плохо видна колокализация;

Особенности окрашивания разными хромогенами могут потребовать повторного титрования антител для достижения наилучшего контраста.

## Последовательное двойное (множественное) иммуногистохимическое окрашивание

Данный способ используется только для иммуногистохимии, подходит для одновременной детекции нескольких антигенов, находящихся в разных клетках или в разных компартментах одной клетки (например, ядре и цитоплазме), и плохо подходит для колокализации. При этом нанесение первичных антител к разным антигенам, детекция и визуализация иммунных комплексов производится последовательно двумя разными

системами детекции на основе разных ферментов (пероксидазы и щелочной фосфатазы) и двух хромогенов (например, ДАБ и Fuchsin+) (рис. 15, 16). Первичные антитела могут быть от одного или разных видов, одного или разных изоформ. Возможность использовать антитела

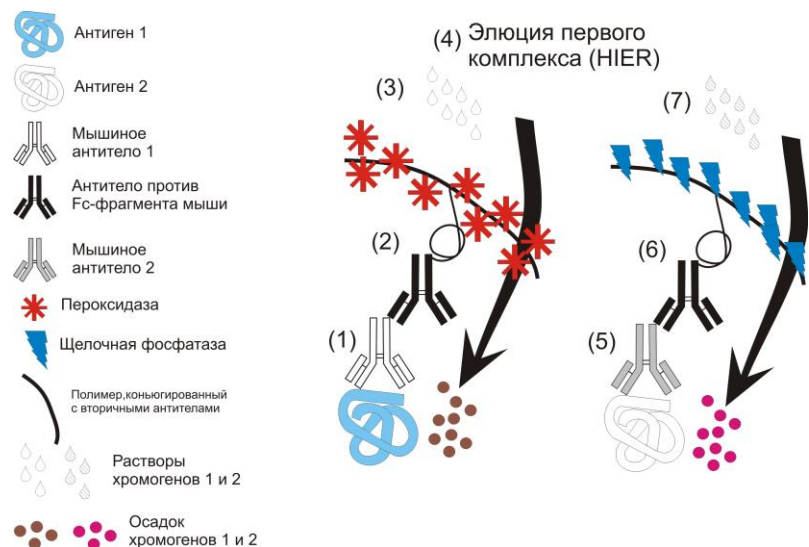


Рис. 15. Последовательное двойное иммуногистохимическое окрашивание

одного вида и изоформ, не опасаясь кросс-реактивности вторичных антител, возможна благодаря проявке ДАБ при выявлении первого антигена, который выступает «щитом» и блокирует взаимодействие вторичных антител при втором окрашивании с первичными антителами от первого.

Если в качестве первого хромогена используется не ДАБ, то лучше использовать первичные антитела от разных видов. При этом после визуализации первого антигена рекомендуется производить отмывку (элюцию) комплексов «антиген-антитело» при помощи кипячения в цитратном буфере pH 6,0 в течение 10 мин.

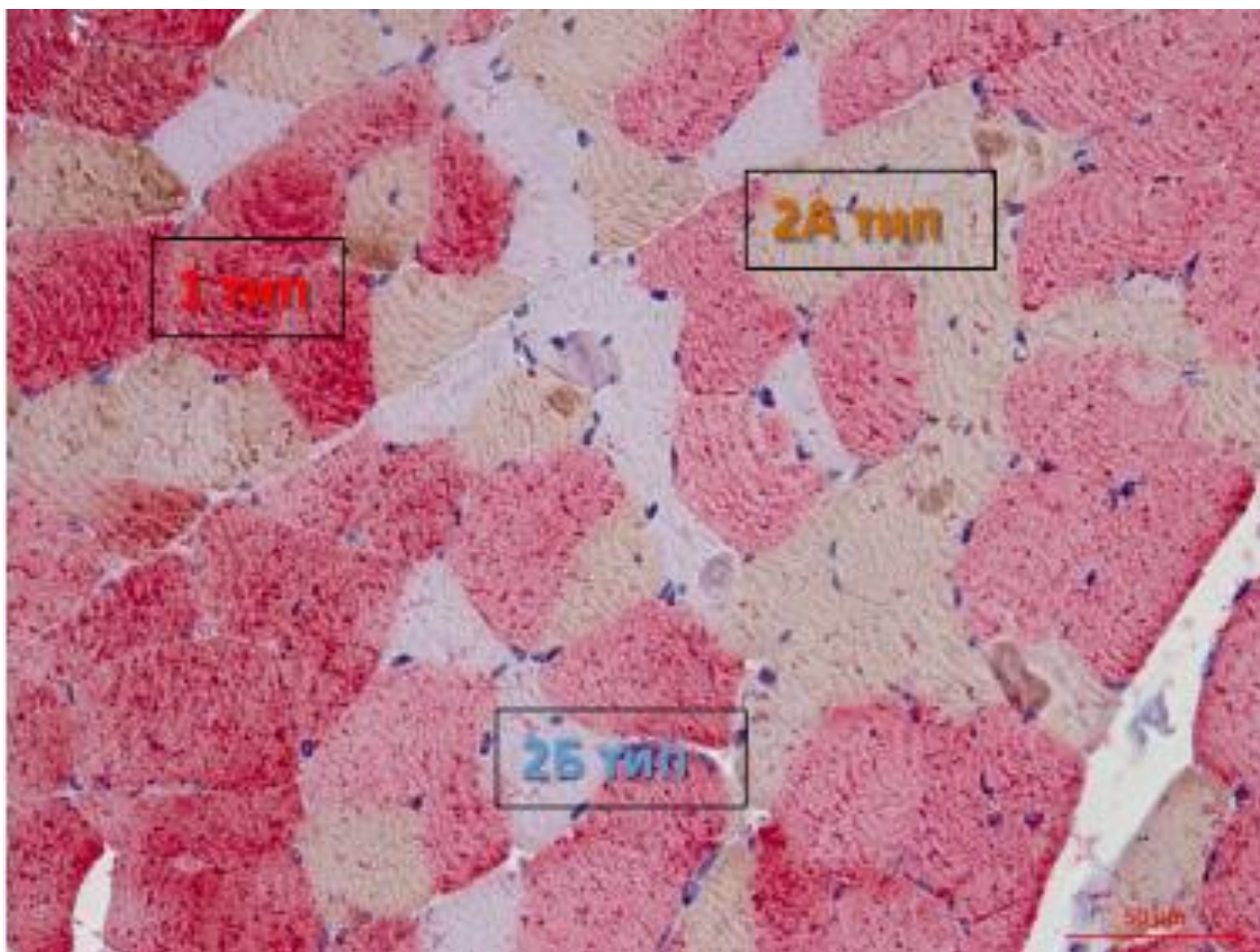


Рис. 16. Срез скелетной мышцы, окрашенный последовательно иммуногистохимически с антителами к тяжелым цепям медленного миозина (фосфатазный метод, хромоген Fuchsin+), тяжелым цепям быстрого миозина (изоформа MYH2, пероксидазный метод, хромоген ДАБ), докраска ядер гематоксилином (по В. Udd). Мышечные волокна 1 типа пурпурные, 2А типа коричневые, 2Б типа синие

К последовательным методам двойного иммуногистохимического окрашивания также относится технология упрощенного двойного окрашивания SIMPLE (Sequential Immunoperoxidase Labelling and Erasing Method – метод последовательного иммунопероксидазного мечения и удаления).

Сущность метода:

- 1) окрашивание гематоксилином (лучше использовать гематоксилин Гарриса для слабого окрашивания) депарафинизированного среза;
- 2) заключение в глицерогель;
- 3) получение цифровых изображений (сканирование образцов целиком);

- 4) удаление покровного стекла при помощи горячей воды;
- 5) использование пероксидазного метода детекции для первых первичных антител;
- 6) визуализации с помощью АЭК;
- 7) заключение в глицерогель;
- 8) получение цифровых изображений (сканирование образцов целиком);
- 9) удаление покровного стекла при помощи горячей воды;
- 10) смывание АЭК при помощи 70% этанола или ацетона;
- 11) элюция комплекса «антиген-антитело» кипячением в цитратном буфере рН 6,0 10 мин;
- 12) использование пероксидазного/фосфатазного метода детекции для вторых первичных антител;
- 13) визуализация АЭК или ВСIP/ NBT;
- 14) заключение в глицерогель;
- 15) получение цифровых изображений (сканирование образцов целиком) и так далее. В дальнейшем полученные изображения накладываются при помощи программного обеспечения или анализируются отдельно (рис. 17).

Описано много протоколов тройного и четверного иммуногистохимического окрашивания, их реализация всегда сопряжена с существенной потерей качества изображения и существенным фоновым окрашиванием.

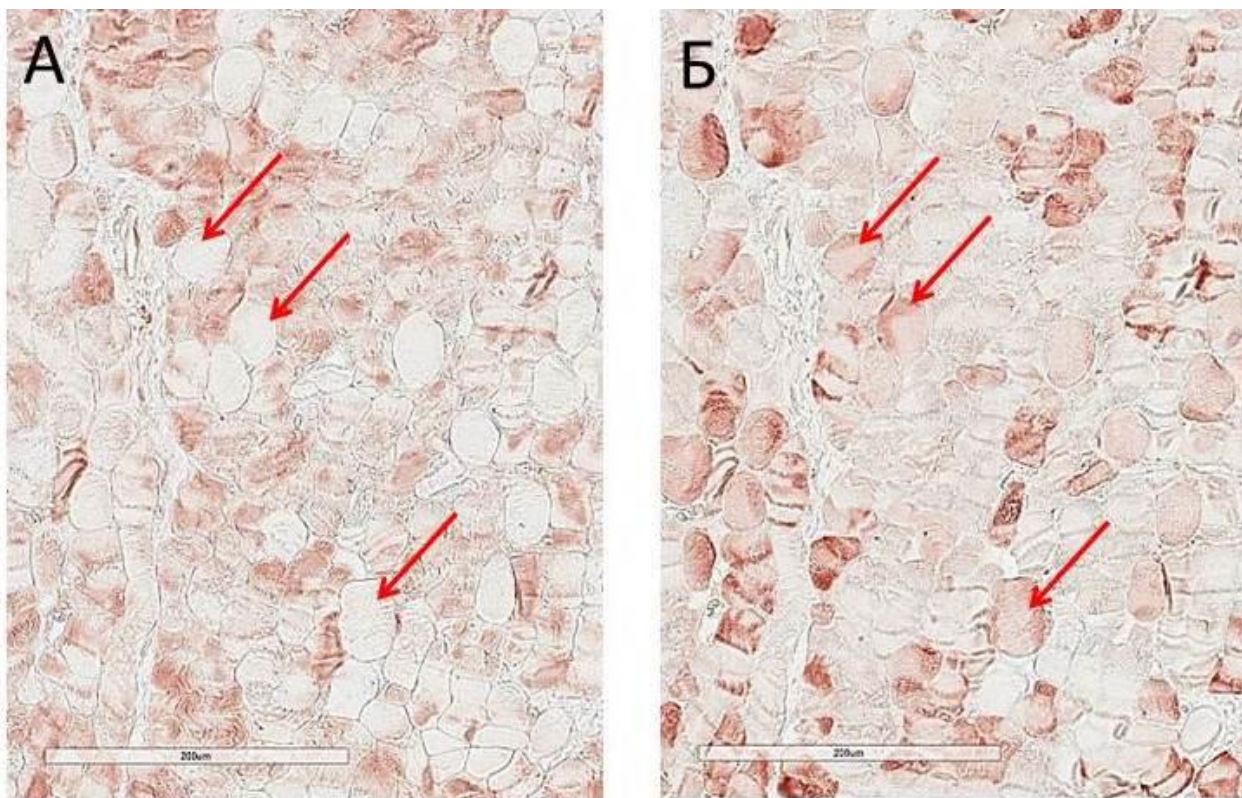


Рис. 17. Срез скелетной мышцы, окрашенный иммуногистохимически по методу SIMPLE, с антителами к плектину (пероксидазный метод, хромоген АЭК) (А), тяжелым цепям медленного миозина (пероксидазный метод, хромоген АЭК) (Б). Стрелками указаны плектин<sup>+</sup>/миозин<sup>+</sup> мышечные волокна

## 7. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ И ПРОБОПОДГОТОВКИ ДЛЯ НЕЕ

Метод электронной микроскопии позволяет заглянуть внутрь клетки, увидеть внутриклеточные структуры, органоиды и даже цитоскелет, проследить тонкие детали межклеточных взаимодействий, показать внутри- и внеклеточную локализацию отдельных белков, рецепторов или других функциональных молекул – изучить ультраструктуру клетки. Ультраструктурная характеристика клеток и тканей дает подробную информацию о том, как функционирует клетка, какие процессы в ней происходят. Например, ультратонкая организация митохондрий может рассказать о том, как протекает процесс

энергетического обеспечения клетки, а также программируемая гибель клетки.

Таким образом, изучив особенности ультраструктуры тех или иных клеток и тканей в норме с помощью метода электронной микроскопии, можно произвести морфофункциональный анализ этих клеток при различных патологических состояниях или воздействиях извне, в частности, при разработке новых лекарственных средств.

При исследовании многих заболеваний, патогенез которых до сих пор остается не до конца изученным, данные о морфологических изменениях внутриклеточных структур или межклеточных взаимодействиях крайне необходимы.

Принципиально различают два вида электронной микроскопии: трансмиссионную (просвечивающую) и растровую (сканирующую).

### **Принцип работы трансмиссионного электронного микроскопа (ТЭМ)**

Принципиальную схему электронного микроскопа часто сравнивают с привычным световым. В конструкции электронного микроскопа так же присутствует источник частиц (как и источник света в случае светового микроскопа) – электронов. За генерацию электронов отвечает электронно-лучевая трубка. В простейшем случае, если на пути луча поместить объект, задерживающий электроны, мы получим «теневое» изображение этого объекта.

Наиболее эффективным методом построения изображения является учет отраженных от объекта и проходящих через него электронных лучей. Для этого с использованием электрических и электростатических линз формируется электронный пучок – точно-направленный поток электронов. Линзы представляют собой электромагнитные катушки, действующие аналогично собирающей линзе светового микроскопа. Фокусное же расстояние этой линзы можно изменять, регулируя электрическое напряжение.

Плотные компоненты образца при микроскопии рассеивают электроны, в результате чего на результирующем изображении мы так же получаем тем-

ные участки. Если объект рассеивает менее 5% луча, увидеть его при помощи электронной микроскопии невозможно. Рассеяние электронов зависит от ускоряющего напряжения, от которого также зависит контрастность изображения. Большая часть биологических образцов содержит малорассеивающие атомы (серы, углерода, азота, кислорода, фосфора, водорода). Для контрастирования изображений используются различные фиксаторы и контрастирующие вещества, в частности, соли тяжелых металлов. Современные электронные микроскопы оснащены системой автоматической передачи изображения на экран компьютера в режиме реального времени.

Теоретическое максимальное разрешение электронного микроскопа составляет 0,02 ангстрем ( $\text{Å}$ ,  $1 \text{ Å} = 0,1 \text{ нм}$ ), для биологических объектов оно чаще всего составляет 10-20  $\text{Å}$ , для прочих – практически достигаемый предел 2-4  $\text{Å}$ . При этом увеличение при электронной микроскопии может варьировать от  $\times 10$  до  $\times 1000000$ .

### **Сканирующий электронный микроскоп (СЭМ)**

Схема и специфика сканирующего и просвечивающего электронного микроскопов различаются, хотя и имеют общие принципы.

Изначально сканирующий микроскоп сильно отставал от просвечивающего, однако сейчас разрешающие способности этих видов микроскопии сравнялись, на данный момент эти два способа микроскопии различаются в большей степени по специфике, а не по качеству изображений. Особенностью сканирующей электронной микроскопии стоит назвать малый угол апертуры «сжимающего» объектива, в результате чего возникает возможность освещать крайне малую часть объекта, почти в точечном режиме. Фиксируются не проходящие лучи, а интенсивность отраженных и так называемых вторичных электронов (испускаемых при воздействии луча), вкупе с малой «освещенной зоной» мы имеем возможность фактически сканировать поверхность образца, получая информацию о его трехмерной структуре, электронном потенциале и атомном составе. Тем не менее, при наличии специальных зондов,



такую информацию мы так же можем получить и на просвечивающем микроскопе.

### **Пробоподготовка образцов ткани для ТЭМ**

Наиболее широко используемым методом анализа ультраструктуры является метод подготовки образца при комнатной температуре с применением химических фиксаторов, прежде всего, глутаральдегида, и заливкой в эпоксидную смолу. Методика заключения в смолу – это эмпирически выведенная последовательность действий по преобразованию свежей ткани, клетки или изолированных органелл в тонкие срезы. Основные этапы пробоподготовки для СЭМ:

1. химическая фиксация;
2. дегидратация;
3. заливка в смолу;
4. получение ультратонких срезов.

### ***Фиксация материала***

Как было отмечено выше, фиксация предотвращает посмертные изменения в тканях и клетках: обеспечивает стабилизацию внутриклеточных структур, останавливает аутолиз, стабилизирует локализацию структур.

Основная особенность взятия материала для электронной микроскопии – образец должен быть гораздо меньше, чем для световой микроскопии, не более 0,1×0,1×0,5 см, чтобы избежать плохо профикированных, не до конца пропитанных глубинных участков образца ткани. Как правило, производится забор нескольких (3-4) образцов с одного изучаемого объекта. Время между забором материала и его фиксацией должно быть сокращено до минимума, поскольку посмертные изменения, незаметные на светооптическом уровне, появляются очень рано на ультрамикроскопическом уровне.

Необходимо отметить особенности фиксации нервной ткани, в частности спинного и головного мозга. Так как ткань очень мягкая, перед забором

ткани у экспериментального животного целесообразно провести кардиальную перфузию формалином с добавлением 0,2% глутаральдегида. После перфузии нервная ткань становится более твердой, ее будет легче извлечь неповрежденной. Для лучшей пропитки рекомендуется произвести нарезку тканей мозга на вибротоме на срезы толщиной 200 мкм, далее выделить интересующую исследователя область мозга и проводить пробоподготовку в соответствии с приведенной ниже методикой.

Выбор фиксатора для электронной микроскопии зависит от того, какие именно структуры исследователь планирует выявить. В классическом случае фиксацию тканей проводят 2,5% глутаральдегидом на 0,1 М фосфатном или 0,05 М натрий-какодилатном буфере с pH 7,2-7,4 в течение 4-6 ч. Если время до следующего этапа пробоподготовки превышает 12 часов, то ткань следует фиксировать в 1% глутаровом альдегиде (в растворе такой концентрации образец может храниться до 3-х месяцев).

Для трансмиссионной электронной микроскопии, как правило, используют постфиксацию 1-2% тетраоксидом осмия ( $\text{OsO}_4$ ) на том же буфере с добавлением сахарозы (2,5 мг на 1 мл фиксирующего раствора) для выравнивания осмолярности раствора. Постфиксация тетраоксидом осмия выполняется для стабилизации и контрастирования мембранных структур за счет фиксации липидов.

### *Дегидратация*

Дегидратация производится по тому же принципу, что и при заливке в парафин для световой микроскопии. Ткани проводят через спирты с постепенным повышением концентрации от 30% до 96%. При этом вода в цитоплазме клеток и межклеточном веществе постепенно замещается на спирт. После 100% этанола образец переносят в чистый ацетон. Далее спирт необходимо заместить растворителем для заливочной среды. В электронной микроскопии в классическом случае в качестве заливочных сред используют нерас-

творимые в воде эпоксидные смолы. Растворителем служит ацетон или пропиленоксид.

### ***Пропитка заливочной средой***

Следующий этап – постепенное замещение растворителя на жидкую смолу. Для выявления особенностей ультраструктуры используют четырехкомпонентную эпоксидную смолу эпон либо менее твердую после полимеризации смесь смол эпон-аралдит. В случае если планируется провести иммуногистологическое окрашивание, рекомендуется использовать водорастворимую смолу LR White. Смолу смешивают с растворителем в различных соотношениях, затем образец выдерживают в смесях при комнатной температуре, далее смесь заменяют чистой смолой. Образец помещают в специальные заливочные формы (рис. 1) и помещают в термостат для дальнейшей полимеризации. Полимеризация смолы происходит при постепенном повышении температуры.

Получаются блоки из полимеризованной смолы, содержащие в себе кусочки ткани (рис. 2).

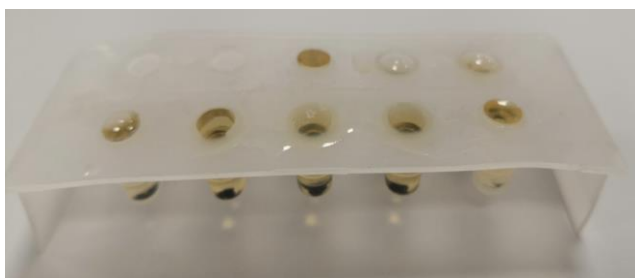


Рис. 1. Заливочные формы для заливки



Рис. 2. Блоки из смолы эпон

Детальный протокол заливки изложен в приложении.

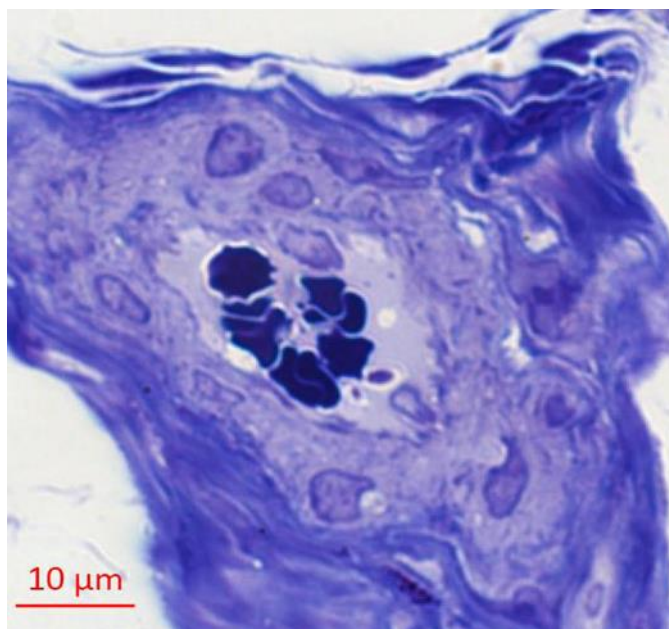
### ***Заточка блоков***

После того как полимеризация ткани в блоке со смолой будет завершена, необходимо заточить блок для последующей нарезки на ультратоме. Для этого используются приборы пирамитомы, либо заточка производится вруч-

ную с помощью лезвий. При заточке изготавливаются пирамидки, верхняя грань которых срезается по краю ткани параллельно поверхности стола. Далее удаляется лишняя смола вокруг ткани таким образом, чтобы получилась площадка в форме трапеции. При этом грани пирамидки должны затачиваться под углом примерно  $60^\circ$ .

### ***Изготовление и окрашивание полутонких срезов***

Не обязательно изготавливать пирамидку с трапецией в основании, но такая форма очень удобна для получения серии срезов, следующих друг за другом, с нее также удобно снимать отдельные срезы, не захватывая последующие. Если срезы снимаются на воду, то на поверхностной пленке воды будут плавать ленточки трапециевидных срезов, которые параллельными сторонами держатся друг за друга. Толщина полутонких срезов варьирует от 0,5 до 2 мкм. Далее срезы монтируют на обычное предметное стекло, окрашивают толуидиновым или метиленовым синим и просматривают с использованием



светового микроскопа (рис. 3). На полутонком срезе выбирается небольшой интересующий исследователя участок, и на блоке затачивается маленькая пирамидка, сторона трапеции которой должна быть не больше 0,2 мм. Допустимо также использование многоцветных методов окрашивания, например по Nayat (см. приложение).

Рис. 3. Полутонкий поперечный срез капилляра, окраска метиленовым синим. Фото доц. Р.В. Деева

### ***Изготовление ультратонких срезов***

Срезы для электронной микроскопии гораздо тоньше, чем для световой - от 0,1 до 0,4 мкм, что связано с очень низкой энергией электронов. Их изготавливают с помощью ультрамикротомов (рис. 4).

Чтобы получить столь тонкие срезы, необходимо использовать ножи с алмазным покрытием или одноразовые стеклянные ножи. Стеклянные ножи изготавливают непосредственно перед нарезкой на специальном приборе – найфмейкере (knifemaker), оснащают ванночкой для воды, на поверхность которой будут сниматься срезы. Далее срезы монтируются на специальные сеточки (рис. 5) для электронной микроскопии (медные или никелевые), предварительно покрытые тончайшей формваровой или карбоновой пленкой (имеются в фирмах, специализирующихся на продаже оборудования для электронной микроскопии).



Рис. 4. Ультратом

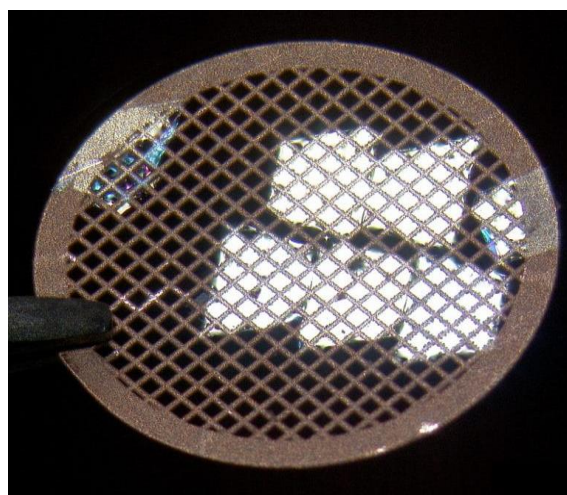


Рис. 5. Медная сеточка для  
монтирования ультратонких  
срезов

### ***Контрастирование солями тяжелых металлов***

Для улучшения контраста тканей срезы далее контрастируют солями тяжелых металлов:

1. 2% водным раствором уранилацетата натрия 10 мин. при 60°C, отмывают дистиллированной водой в трех емкостях по 20 с в каждой;

2. цитратом свинца, приготовленным по Reynolds (см. приложение) 5-30 мин. при комнатной температуре в парах щелочи (NaOH или KOH), затем подкисляют среду, препятствуя выпадению цитрата свинца в осадок на срезы. Для этого в чашку Петри кладут несколько крупинок щелочи и растворяют ее в воде по окружности чашки. В центр кладут парафиновую пленку (Parafilm) с каплями цитрата свинца и инкубируют в них сетки. Далее сетки отмывают в трех сменах дистиллированной воды по 20 с в каждой, высушивают и складывают в специальный бокс для хранения и последующего исследования с использованием ТЭМ. В результате можно получить черно-белое изображение ультраструктур клеток (рис. 6).

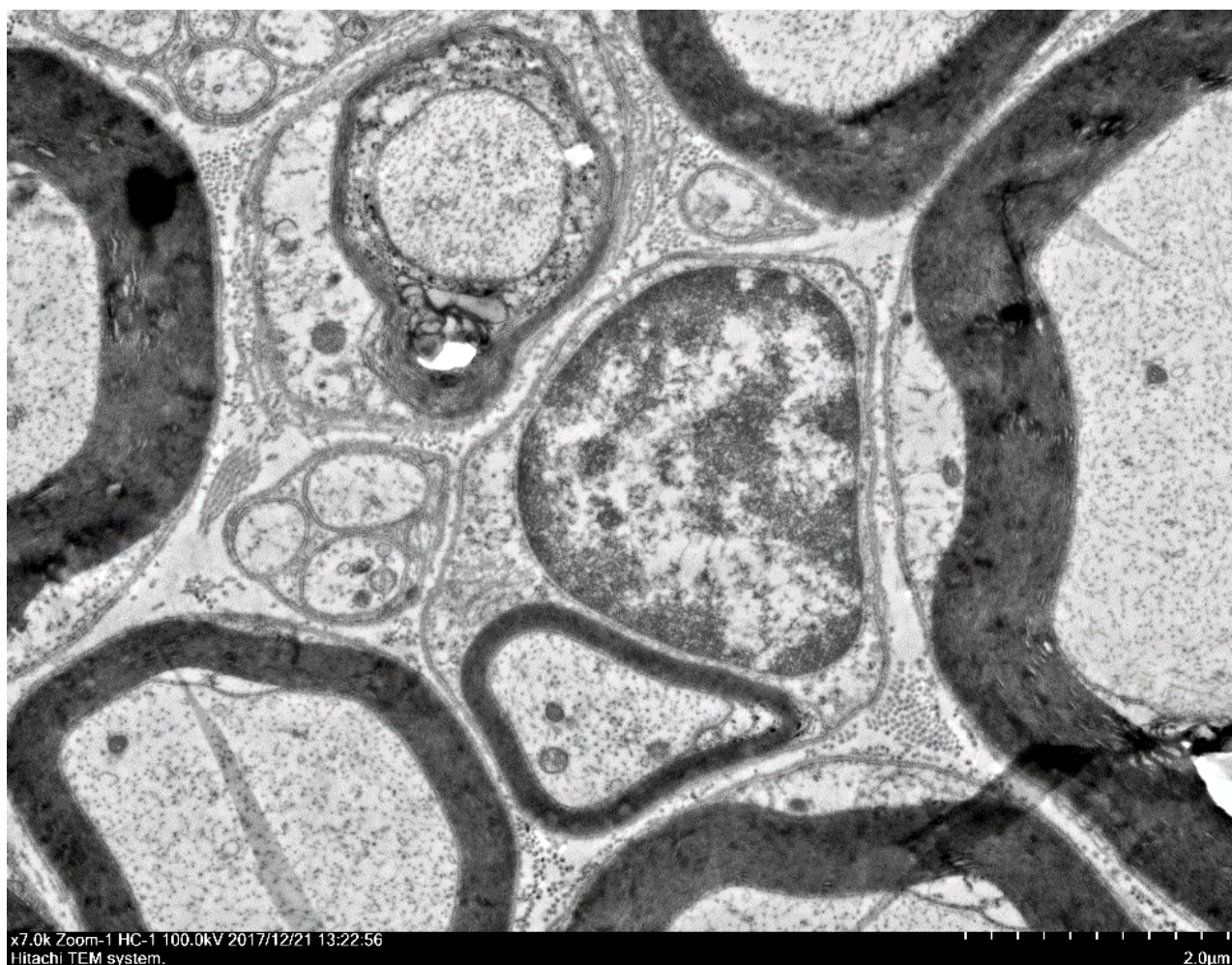


Рис. 6. Ультраструктура шванновской клетки и миелиновых волокон седалищного нерва крысы

## **Пробоподготовка для СЭМ**

Фиксация и дегидратация образца ткани для СЭМ производится как для ТЭМ. После проведения через ряд спиртов возрастающей концентрации образец следует выдержать в ацетоне 2 раза по 15 мин. и высушить ткань в критической точке в специальной установке.

### ***Сушка в критической точке***

Сушка в критической точке (например, с использованием камеры Quorum K850) позволяет избежать деформаций и разрушения хрупких образцов в процессе высушивания в условиях высокого вакуума и готовит их к напылению электропроводящего слоя. В процессе сушки происходит вытеснение воды и водяных паров жидкой углекислотой в критической точке с последующим вытеснением и высушиванием углекислым газом. После процедуры сушки объект переносится в вакуумную установку для напыления.

### ***Вакуумное напыление***

В процессе вакуумного напыления производится нанесение на образцы сверхтонких покрытий углерода, хрома, золота и золота/палладия методом катодного и термического напыления в условиях среднего и высокого вакуума для получения проводящей поверхности. Напыление золотом и (или) палладием необходимо для получения изображений сверхвысокого разрешения и работы детекторов автоэмиссионного сканирующего электронного микроскопа. Также в вакуумных установках проводится ионное утонение и ионная очистка поверхностей, это позволяет получать изображения наноморфологии поверхностей без учета искусственных неровностей.

## 8. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Bozolla J.J., Russel L.D. Electron Microscopy. Sudbury : Jones and Bartlett Pub. Inc., 1999. 670 p.
2. Buchwalow I.B., Bocker W. Immunohistochemistry: Basics and Methods. Berlin Heidelberg : Springer-Verlag, 2010. 149 p.
3. Davenport H.A. Histological and histochemical technics. Philadelphia : W. B. Saunders, 1961. 401 p.
4. Eckhard A.H. et al. Mechanical compression of coverslipped tissue sections during heat-induced antigen retrieval prevents section detachment and preserves tissue morphology // J Histochem Cytochem. 2019. Vol. 67(6). P. 441–452.
5. Kalyuzhny A.E. Immunohistochemistry. Essential Elements and Beyond. Springer International Publishing Switzerland, 2016. 85. p.
6. Liu F., Prichard J. Handbook of Practical Immunohistochemistry. Frequently Asked Questions. LLC : Springer Science+Business Media, 2011. 619 p.
7. Prophet E.B. et al. Laboratory methods in histotechnology. Washington, D.C. : American Registry of Pathology, 1992. 278 p.
8. Ramos-Vara J. A.. Technical Aspects of Immunohistochemistry // Veterinary Pathology. 2005. Vol. 42. P. 405–426.
9. Ramos-Vara J.A., Miller Ramos-Vara M. A. When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry—The Red, Brown, and Blue Technique // Veterinary Pathology. 2014. Vol 51(1). P. 42-87.
10. van der Loos C. M. Multiple Immunoenzyme Staining: Methods and Visualizations for the Observation With Spectral Imaging // J Histochem Cytochem. 2008. 56(4). P.313–328.
11. Берстон М. Гистохимия ферментов. М. : Мир, 1965. 464 с.
12. Биссерова Н.М. Визуализация биологических ультраструктур. М. : МГУ им. Ломоносова, 2017. 101с.
13. Гайер Г. Электронная гистохимия. М. : Мир, 1974. 488 с.



14. Елисеев В.Г. и др. Основы гистологии и гистологической техники, 2-е изд., перераб. и доп. М. : Медицина, 1967. 268 с.
15. Киясов А.П. Современные методы морфологических исследований. Казань : КГМУ, 2001. 38 с.
16. Кларк Э.Р., Эберхардт Кларк К.Н. Микроскопические методы исследования материалов. М. : Техносфера, 2007. 367 с.
17. Кононский А.И. Гистохимия. Киев : Издательское объединение «Вища школа», 1976. 260 с.
18. Коржевский Д.Е., Кирик О.В., Карпенко М.Н. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии: руководство. СПб. : СпецЛит, 2012. с.110.
19. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М. : Мир, 1969. 646 с.
20. Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. М. : Мир, 1982, 272 с.
21. Мальков П.Г., Франк Г.А., Пальцев М.А. Стандартные технологические процедуры при проведении патолого-анатомических исследований; клинические рекомендации RPS1.1. М. : Практическая медицина, 2017. 136 с.
22. Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники, 4-е изд. Л. : "МЕДГИЗ", 1961. 343 с.
23. Мухитов А.Р., Архипова С.С., Никольский Е.Е. Современная световая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях. М. : Наука, 2011. 140 с.
24. Петров С.В., Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека, 4-е изд., доп. и перераб. Казань, 2012. 624 с.
25. Ромейс Б. Микроскопическая техника. М. : Издательство иностранной литературы, 1953. 719 с.
26. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника: руководство. М. : Медицина, 1996. 554 с.

27. Семченко В.В., Барашкова С.А., Ноздрин В.Н. Гистологическая техника: учебное пособие, 3-е изд., доп. и перераб. Омск-Орел: Омская областная типография, 2006. 290 с.

## 9. ПРИЛОЖЕНИЕ

### ПРОТОКОЛЫ И ПРОПИСИ РАСТВОРОВ

#### 1. Протоколы заливки в парафин

В качестве предварительного этапа следует фиксация материала (10% нейтральный забуференный формалин в течение 24 ч).

*Таблица 1*

Протокол для проводки в тканевом процессоре STP 420D (Thermo Scientific)

Реагент	Дли- тельность ин- кубации, мин	Темпе- ратура, °С
Проточная фильтрованная вода	30	20
Изопропанол I	30	37
Изопропанол II	60	37
Изопропанол III	60	37
Изопропанол IV	60	37
Изопропанол V	90	40
Промежуточная смесь I (изопропа- нол:минеральное масло – 5:1)	90	45
Промежуточная смесь II (изопропа- нол:минеральное масло – 2:1)	90	45
Минеральное масло	120	45
Парафин I	60	58
Парафин II	60	58
Парафин III	60	58
Парафин IV	60	58

Далее следует заливка в чистый парафин в формочки.

Допускается инкубация в минеральном масле до нескольких дней в случае необходимости более позднего окончания проводки.

Изопропанол в I емкости выливать после проводки 40-45 кассет, в остальных емкостях перелить на этап выше (1-2 цикла проводки).

Промежуточные смеси и минеральное масло нужно менять после 120-150 кассет (или 10 циклов проводки).

Парафин менять после 200-300 кассет (или 10-12 циклов проводки).

Не превышайте температуру парафина выше 62°C, так как некоторые готовые парафиновые смеси содержат полимеры, которые разрушаются от высокой температуры.

Таблица 2

Протокол для проводки ручным методом

Реагент	Длительность инкубации, мин	Температура, °C
Проточная фильтрованная вода	30	комнатная
Изопропанол I	60	комнатная
Изопропанол II	60	комнатная
Изопропанол III	60	комнатная
Изопропанол IV	60	комнатная
Изопропанол V	90	комнатная
Промежуточная смесь I (изо-пропанол:минеральное масло – 5:1)	90	комнатная
Промежуточная смесь II (изо-пропанол:минеральное масло – 2:1)	90	комнатная
Минеральное масло	360	комнатная, последний час 37
Парафин I	60	56-58
Парафин II	60	56-58

Парафин III	60	56-58
-------------	----	-------

Далее следует заливка в чистый парафин в формочки.

Допускается инкубация в минеральном масле до нескольких дней в случае необходимости более позднего окончания проводки.

Не превышайте температуру парафина выше 62°C, так как некоторые готовые парафиновые смеси содержат полимеры, которые разрушаются от высокой температуры.

## 2. Протокол заливки в смолу для электронной микроскопии

1. Фиксация 2,5% глутаровым альдегидом (на фосфатном или какодилатном буфере рН 7,2 – 7,4) 2 ч – несколько суток при 4°C.

2. После отмывки тем же буфером 2 раза по 15 мин - постфиксация 0,5% - 1% тетраоксидом осмия от 30 мин до 2 ч

3. Этанол 30% I - 10 мин

4. Этанол 30% II – 10 мин

5. Этанол 50% I – 10 мин

6. Этанол 50% II – 10 мин

7. Этанол 70% I – 10 мин

8. Этанол 70% II – 10 мин

9. Этанол 80% I – 10 мин

10. Этанол 80% II – 10 мин

11. Этанол 96% I – 10 мин

12. Этанол 96% II – 10 мин

13. Ацетон I – 15 мин

14. Ацетон II – 15 мин

15. Пропиленоксид I – 15 мин

16. Пропиленоксид II – 15 мин

17. Пропиленоксид (2 части) + смола (1 часть) +4°C на 12-24 часа

18. Пропиленоксид (1 часть) + смола (1 часть) – +4°C на 12-24 часа

19. Пропиленоксид (1 часть) + смола (3 части) – +4°C на 12-24 часа

Заливка образцов в смолу в формочки (смола должна полностью покрыть образец и формочку) – держать при комнатной температуре 1,5 часа. Дальше образцы в смоле полимеризуются в термостате с возрастающей температурой:

- 37°C – 24 часа
- 45°C – 24 часа
- 60°C – 24 часа

Образцы достаются из формочек и хранятся при комнатной температуре.

Приготовление смеси эпоксидных смол (из расчета на 1 образец примерно 1 мл смолы) производится при постоянном помешивании на магнитной мешалке при комнатной температуре следующим образом:

1. к Epon 812 добавляется DDSA – мешать 30 мин
2. далее добавляется MNA – 30 мин
3. в последнюю очередь DMP – все мешается 30 мин

*Таблица 3*

Расчетные объемы компонентов для приготовления смеси эпоксидных смол

<b>Компонент</b>	<b>Объем в мл</b>
Epon 812	9
Epon DDSA	6
Epon MNA	4
DMP	0,2

### 3. Протоколы основных окрашиваний

#### *Протокол депарафинизации и регидратации*

1. Ксилол I – 7 мин.
2. Ксилол II – 7 мин.
3. Этанол 96° I - 5 мин.
4. Этанол 96° II - 5 мин.
5. Дистиллированная вода – 3 мин.

Растворы ксилола и этанола следует менять после депарафинизации 15-20 стекол, при этом растворы I выливаются, в их емкость переливаются растворы II, в емкости растворов II наливаются свежие реагенты.

#### *Окрашивание гематоксилином и эозином*

Данный метод является обзорным, но в то же время информативным, и обязателен для каждого образца.

*Материал:* замороженные или предварительно депарафинизированные парафиновые срезы, фиксированные клеточные культуры, выдержанные в дистиллированной воде.

*Реагенты:* водный гематоксилин Майера, 1% водный или спиртовый эозин.

*Протокол:*

1. Раствор гематоксилина – 1-3 мин (под контролем микроскопа).
2. Проточная вода – 5-10 мин (можно дольше).
3. Раствор эозина – 10 с – 5 мин (под контролем микроскопа).
4. Дистиллированная вода – 1 мин.

5. Заключение в глицерогель (водный эозин), дегидратация и просвет-

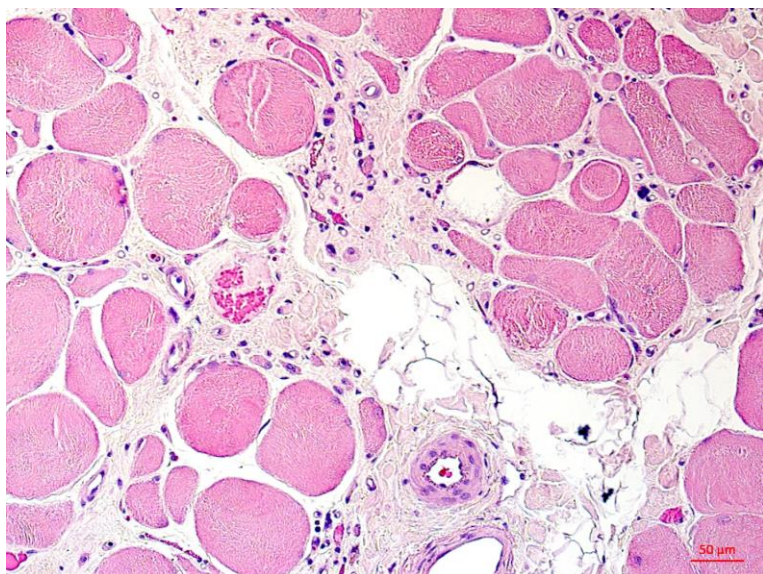


Рис. 1. Срез скелетной мышцы, окрашенный гематоксилином и эозином

ление с заключением в синтетические среды (спиртовый эозин).

*Результат:* ядра синие, цитоплазма и межклеточное вещество розовые (рис. 1).

В практике патоморфологических лабораторий часто наблюдается потеря красящей способности эозина, которая может быть свя-

зана с изменением pH раствора. Его следует поддерживать в пределах pH 4,3 – 4,8, подкисляя при необходимости ледяной уксусной кислотой.

### ***Трихромное окрашивание по Маллори***

Метод предназначен для выявления соединительной ткани. Похожий результат дает трихромное окрашивание по Массону. Мы не используем окрашивание по Ван Гизону ввиду его «капризности» и плохой воспроизводимости.

*Материал:* депарафинизированные срезы, выдержанные в дистиллированной воде.

*Реагенты:* 0,5% раствор карболового фуксина, кислотный буфер (ацетатный), 1% раствор фосфорномолибденовой кислоты, полихромный раствор по Маллори (0,5 г анилинового синего, 2 г оранжа G, 100 мл дистиллированной воды).

*Протокол:*

1. Карболовый фуксин – 10 мин.
2. Промывка в дистиллированной воде.



3. Кислотный буфер – 2 мин.
4. Быстро (2-3 с) промыть в проточной воде.
5. Фосфорномолибденовая кислота – 5 мин.
6. Просушить, не промывая.
7. Полихромный раствор – 1 мин.
8. Промывка в дистиллированной воде.
9. Быстро дегидратировать в спиртах возрастающей концентрации, про- светлить, заключить в полистирол.

*Результат:* ядра, волокна нейроглии, хрящ, кость – красные, коллагеновые волокна – темно-синие, эритроциты, миелин, мышечные волокна – насыщенно-желтые, эластические волокна - бледно-розовые, желтые или не окрашиваются (рис. 2).



Рис. 2. Срез скелетной мышцы, окрашенный по Маллори

Растворы фосфорномолибденовой кислоты со временем окисляются и меняют цвет с желтого на ядовито-зеленый, в этом случае стоит увеличить время инкубации до 15-20 мин или заменить раствор свежим.

### ***Трихромное окрашивание по Гомори***

Данное трихромное окрашивание хорошо подходит для замороженных срезов и чрезвычайно диагностически информативно для срезов скелетной мышечной ткани.

*Материал:* нефиксированные замороженные срезы.

*Реагенты:* водный гематоксилин Гарриса, трихромный раствор по Гомори (Fast green FCF 0,75 г, chromotrope 2R 1 г, фосфорновольфрамная кислота 1,5 г, ледяная уксусная кислота 2,5 мл, 250 мл дистиллированной воды).

*Протокол:*

1. Гематоксилин Гарриса – 5-20 мин.
2. Промывка в дистиллированной воде – 10 мин.
3. Трихромный раствор по Гомори – 10-30 мин.
4. Промывка в 0,2% уксусной кислоте.

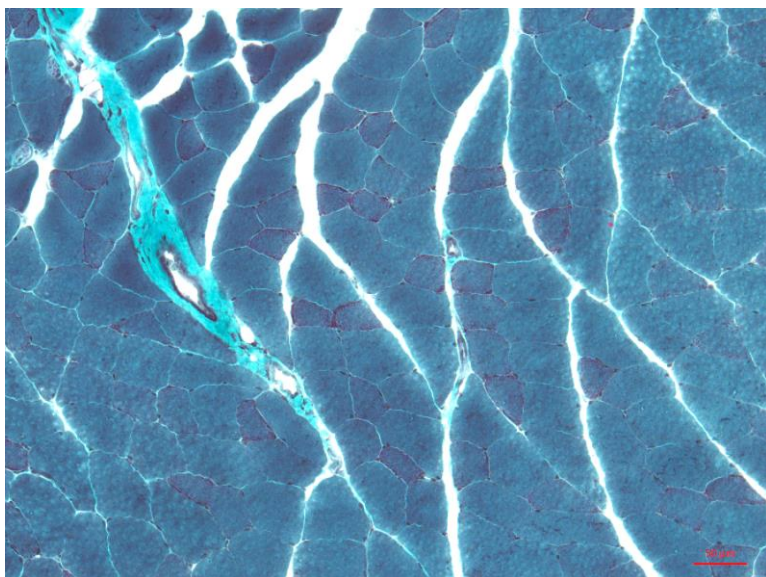


Рис. 3. Срез скелетной мышцы, окрашенный по Гомори

5. Быстро дегидратировать в спиртах возрастающей концентрации, просветлить, заключить в полистирол.

*Результат:* ядра, митохондрии, нервные волокна – красные, цитоплазма, мышечные волокна – зелено-голубые, collagen – голубой (рис. 3).

### **Окрашивание конго красным**

Данное окрашивание необходимо для выявления амилоида.

*Материал:* депарафинизированные парафиновые срезы, выдержанные в дистиллированной воде.

*Реагенты:* 1% водный раствор конго красного, гематоксилин Майера.

*Протокол:*

1. Конго красный – 1-3 мин.
2. Промывка в водопроводной воде.
3. 70-80% этанол – дифференцировать до бледно-розового цвета срезов.
4. Промывка в водопроводной воде.
5. Раствор гематоксилина – 1-3 мин.
6. Промывка в водопроводной воде.

7. Быстро дегидратировать в спиртах возрастающей концентрации, просветлить, заключить в полистирол.

*Результат:* ядра – синие, амилоид красный (рис. 4).

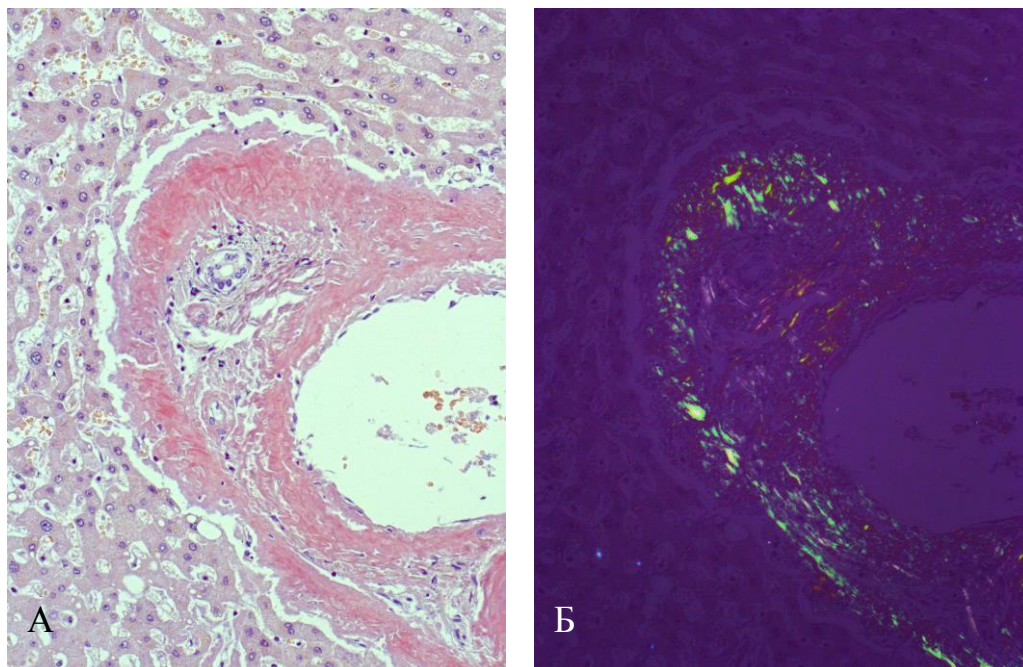


Рис. 4. Срез печени, окрашенный конго красным (А). Тот же срез при поляризационной микроскопии (Б). Фото доц. Р.В. Деева

### ***Окрашивание суданом III***

Данное окрашивание необходимо для выявления нейтральных жиров.

*Материал:* замороженные срезы из фиксированной или нефиксированной в формалине ткани, выдержанные в дистиллированной воде.

*Реагенты:* 1% водный раствор конго красного, гематоксилин Майера.

*Протокол:*

1. 50-70% этанол – 2-3 мин.
2. Насыщенный спиртовой раствор (70% этанол) судана III, предварительно профильтрованный – 15-30 мин.
3. 50-70% этанол – быстро ополоснуть.
4. Промывка в дистиллированной воде.
5. Раствор гематоксилина – 1-3 мин.

6. Промывка в водопроводной воде.

7. Заключение в глицерогель

*Результат:* нейтральные жиры оранжево-красного цвета, ядра — синие (рис. 5).

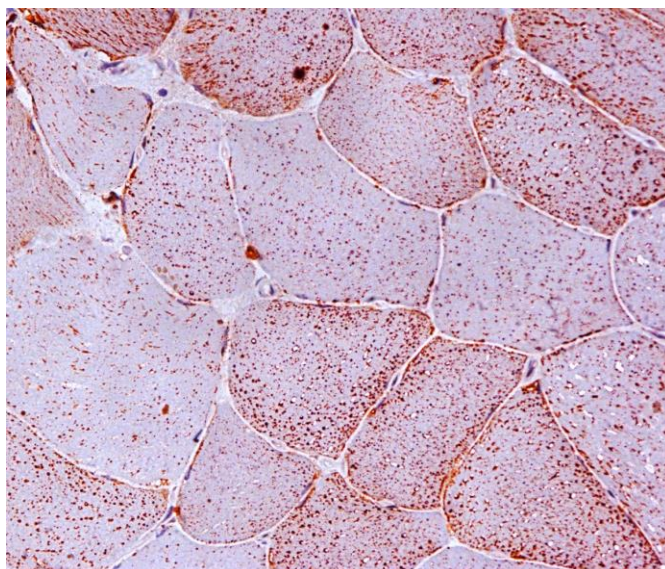


Рис. 5. Срез скелетной мышцы, окрашенный суданом III, увеличение ×400

### ***Импregnация ретикулярных волокон серебром (по Футу)***

Данное окрашивание необходимо для выявления ретикулярных волокон и других аргирофильных (имеющих сродство к серебру) компонентов. После предварительного окисления перманганатом калия образец обрабатывается трехвалентным железом (ферроаммоний сульфат). Ионы железа, более реактивные, чем ионы серебра, быстро связываются с аффинными функциональными группами аргирофильных веществ. В дальнейшем катионы серебра из аммиачного раствора заменяют ионы железа в образцах. Затем формальдегид путем восстановления приводит к образованию металлического серебра, обеспечивая его отложение на аргирофильных структурах и визуализацию. Невосстановленный комплексный катион удаляется при помощи тиосульфата натрия путем формирования растворимого комплекса, не подлежащего окислению.

В процессе окрашивания следует использовать только деионизированную, полностью очищенную от хлора воду, особо чистую стеклянную посуду, избегать попадания пыли на образцы и не допускать контакта реактивов с металлическими объектами (пинцетами и т.п.).

Метод является чрезвычайно удобным в реализации и дает стабильный результат в противоположность ранее использовавшимся методам импрегнации.

*Материал:* замороженные или предварительно депарафинизированные срезы

*Реагенты:* 0,25% раствор перманганата калия, активирующий кислотный буфер (3% серная кислота), 5% раствор щавелевой кислоты, 2,5% раствор ферроаммоний сульфата, раствор аммиачного серебра, нейтральный 4% раствор формальдегида, 5% раствор гипосульфита натрия.

Раствор аммиачного серебра: 20 мл 10% водного (используйте свежую деионизированную воду) раствора нитрата серебра, 20 капель 40% раствора гидроксида натрия, затем добавить медленно, по каплям 28% раствор аммиака до почти полного растворения коричневого осадка, довести объем дистиллированной водой до 80 мл и профильтровать.

Хранить готовые реагенты необходимо в холодильнике при +4°C.

*Протокол:*

1. Нанести на срез равное количество перманганата калия и активирующего кислотного буфера на 5 мин
2. Промыть в дистиллированной воде
3. Нанести последовательно растворы щавелевой кислоты, ферроаммоний сульфата, аммиачного серебра на 3 мин каждый, с промывкой в дистиллированной воде между растворами
4. Промыть в дистиллированной воде
5. Нанести последовательно растворы формальдегида и гипосульфита натрия на 5 мин каждый с промывкой в дистиллированной воде между растворами
6. Промыть в проточной воде
7. Быстро дегидратировать в спиртах возрастающей концентрации, просветлить, заключить в полистирол.

*Результат:* ретикулярные и нервные волокна черные, соединительная ткань коричневая, коллаген золотисто-желтый (рис. 6).

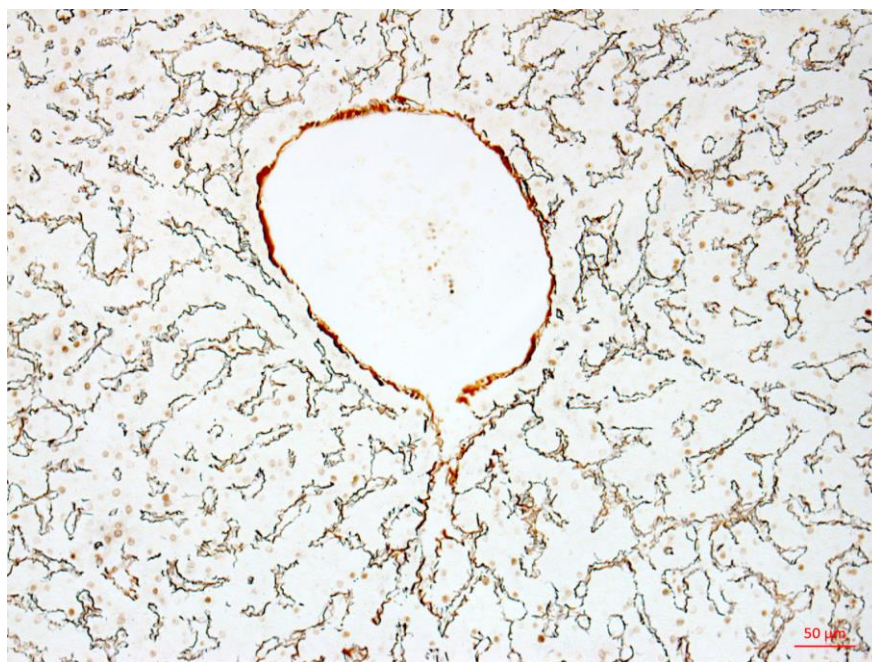


Рис. 6. Срез печени, импрегнированный серебром по Футу

### ***Выявление гликогена с помощью ШИК-реакции (по Мак-Манусу)***

Выявление гликогена в срезах печени и мышц является ценным методом диагностики болезней накопления – наследственных гликогенозов. Окрашивание часто применяется в комбинации с диастазой в качестве негативного контроля и для выявления аномальных гликогенов. Помимо гликогена, данная реакция выявляет гликопротеины, гликолипиды и муцины. Метод основан на окислении перйодной кислотой 1,2-гликолевых групп (двух гидроксильных групп, располагающихся у соседних атомов углерода), которыми богаты сахара, до альдегидных, которые затем выявляются с помощью основания Шиффа.

*Материал:* замороженные или предварительно депарафинизированные парафиновые срезы, выдержанные в дистиллированной воде.

*Реагенты:* водный гематоксилин Майера, реактив Шиффа (фуксинсернистая кислота), 0,5-1% водный раствор перйодной кислоты.

*Протокол:*

1. Просушить срезы (аккуратно).
2. Раствор йодной кислоты – 7 мин.

3. Промыть в дистиллированной воде.
4. Реактив Шиффа – 20 мин.
5. Промыть в проточной воде – 10 мин.
6. Гематоксилин Майера –

30 с.

7. Быстро дегидратировать в спиртах возрастающей концентрации, просветлить, заключить в полистирол.

*Результат:* ядра синие, гликоген пурпурно-фиолетовый (рис. 7).

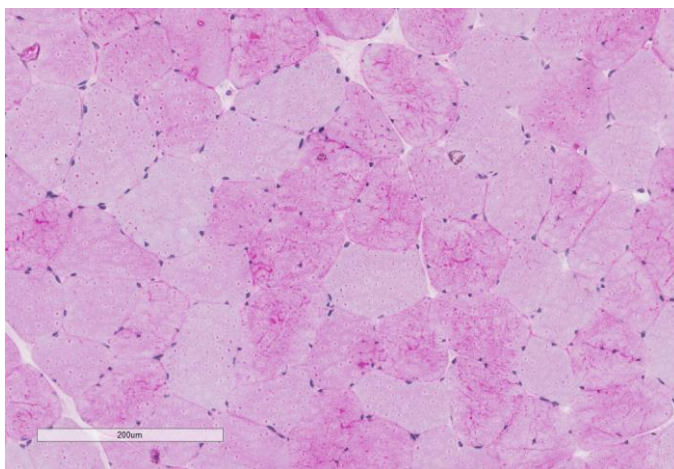


Рис. 7. Срез скелетной мышцы, ШИК-реакция

### ***Выявление трехвалентного железа (по Перлсу)***

Выявление трехвалентного железа в тканях необходимо для детекции отложений пигмента гемосидерина – продукта деградации гемоглобина - и основано на его взаимодействии с гексацианоферратом (II) калия («желтой кровяной соли») с образованием синего осадка гексацианоферрата (II) железа (III) («берлинская лазурь»).

*Материал:* предварительно депарафинизированные парафиновые срезы, выдержанные в дистиллированной воде.

*Реагенты:* 2% раствор гексацианоферрата (II) калия или натрия, активирующий кислотный буфер (2% соляная кислота), 1% водный раствор нейтрального красного.

*Протокол:*

1. Смешать в равном соотношении раствор гексацианоферрата (II) калия или натрия и кислотный буфер.
2. Инкубировать срезы в полученном растворе 20 мин.
3. Тщательно промыть в дистиллированной воде.
4. Нейтральный красный – 3-5 мин.

5. Промыть в дистиллированной воде.

6. Быстро дегидратировать в спиртах возрастающей концентрации, про- светлить, заключить в полистирол.

*Результат:* ядра красные, участки локализации трехвалентного железа синие (рис. 8).

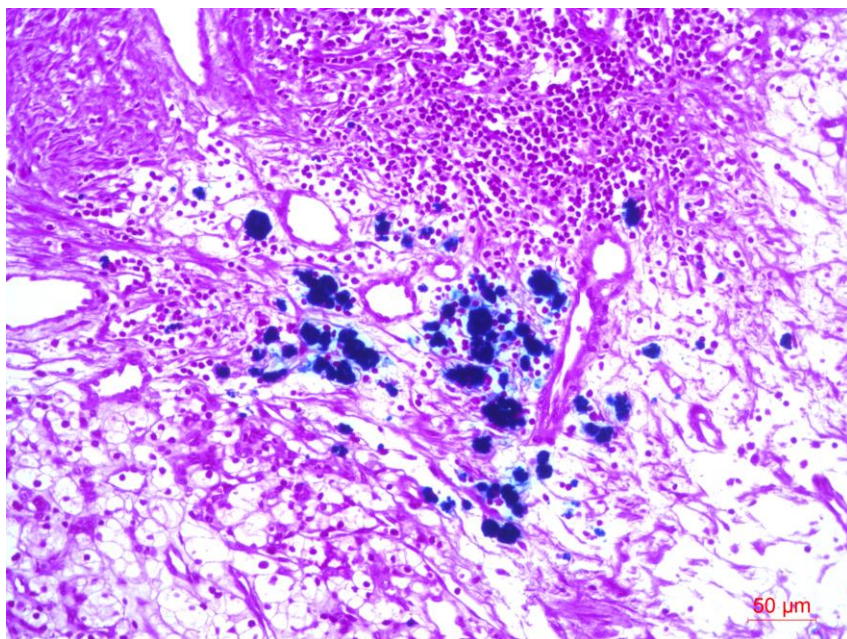


Рис. 8. Срез опухоли почки, окрашивание по Перлсу

### ***Выявление солей кальция (по фон Косса)***

Выявление депозитов кальция в ткани по методу Косса основано на реакции замещения кальция катионами серебра. Впоследствии производится восстановление ионов серебра до металла с его визуализацией.

С ионами серебра реагируют следующие кальциевые соли: карбонаты, фосфаты, оксалаты, сульфаты, ураты, хлориды, сульфоцианиды. Кальций в норме присутствует в тканях млекопитающих в форме карбонатов и фосфатов, поэтому данный метод может быть использован для их выявления. Чтобы избежать ошибочных результатов при нахождении в ткани мочевой кислоты и уратов, данные соли перед началом окрашивания переводятся в растворимую форму под воздействием насыщенного раствора карбоната лития.



*Материал:* замороженные или предварительно депарафинизированные парафиновые срезы, выдержанные в дистиллированной воде.

*Реагенты:* насыщенный раствор карбоната лития, 1-3% раствор нитрата серебра, 5% раствор натрия тиосульфата, кармалаун Майера или 0,1% раствор ядерного красного Fast или основного фуксина.

*Протокол:*

1. Раствор карбоната лития – 10 мин.
2. Промыть в дистиллированной воде.
3. Раствор нитрата серебра – 10-60 мин на свету (рекомендуется использование 60-100 Вт лампы накаливания или лучше источника УФО).
4. Промыть в дистиллированной воде.
5. Раствор натрия тиосульфата – 5 мин.
6. Промыть в дистиллированной воде.
7. Кармалаун Майера или ядерный красный или основной фуксин – 3 мин.
8. Промыть в дистиллированной воде.
9. Быстро дегидратировать в спиртах возрастающей концентрации, просветлить, заключить в полистирол.

*Результат:* ядра красные, депозиты кальция – черные или темно-коричневые, цитоплазма – розовая (рис. 9).

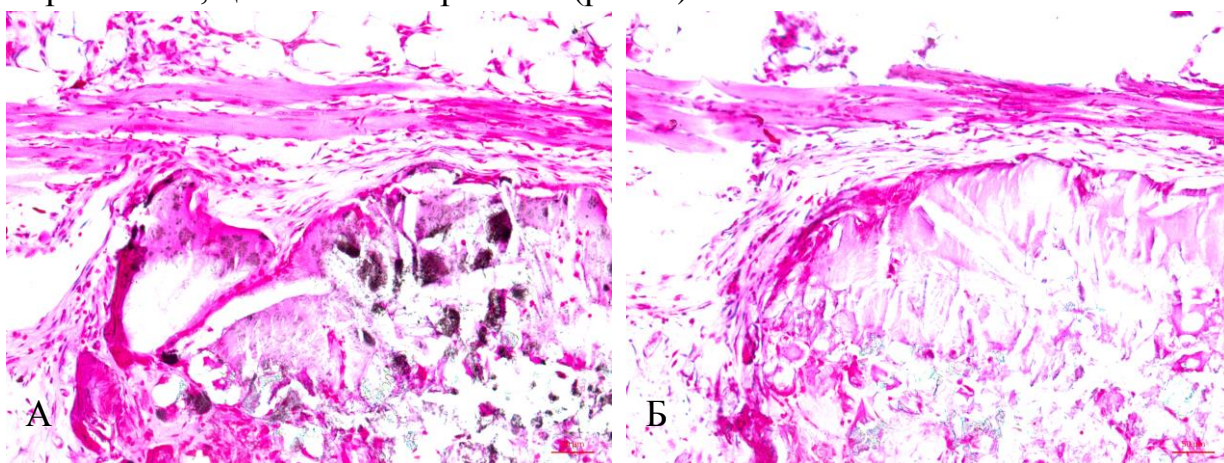


Рис. 9. Срез кальцийсодержащего материала, имплантированного подкожно (А). Тот же материал после предварительной обработки в муравьиной кислоте (Б). Окраска по фон Косса

Если есть сомнения в том, что окрашенные структуры действительно являются депозитами солей кальция, рекомендуем использовать в качестве негативного контроля срез той же ткани, выдержанный после депарафинизации и регидратации в течение 10 мин в 10% растворе муравьиной кислоты.

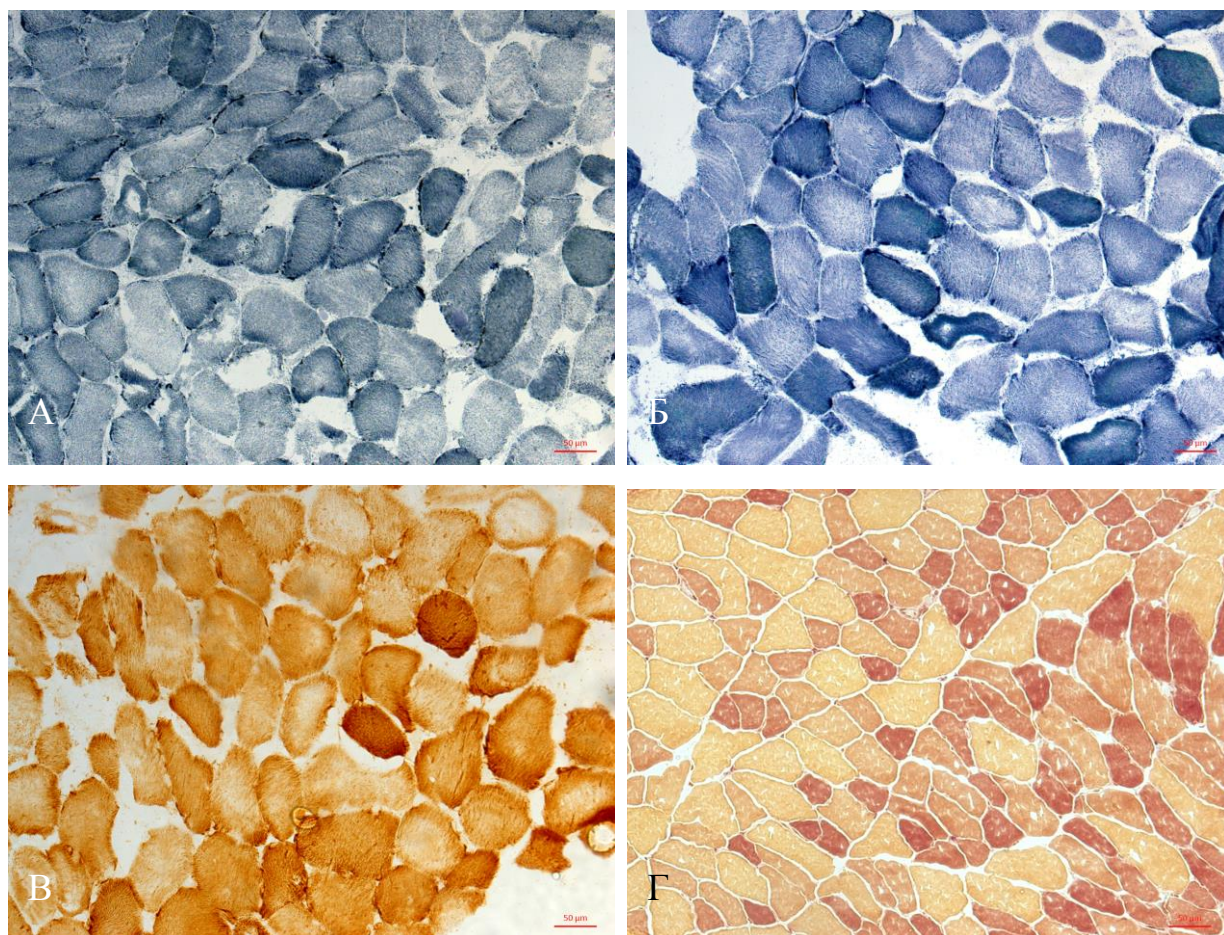


Рис. 10. Срез мышцы, реакция на сукцинатдегидрогеназу (А). Срез мышцы, реакция на НАДН-тетразолий редуктазу (Б). Срез мышцы, реакция на цитохром-с-оксидазу (В). Срез мышцы, реакция на неспецифическую эстеразу (Г).

### *Иммуногистохимическое окрашивание на парафиновых срезах*

1. Депарафинизация и регидратация.
2. Промывка в TBS pH 7.4 – 5 мин.
3. Демаскировка антигенных детерминант (если нет указания производителя антител, что подобная обработка противопоказана) – HIER 30 мин в цитратном буфере pH 6.0 или Трис-ЭДТА pH 8.0 при 97-100°C.
4. Охладить срезы до комнатной температуры в течение 20-30 мин.
5. Промывка в TBS pH 7.4 – 5 мин.
6. Блокирование эндогенной пероксидазы (если пероксидазный метод) – 30 мин.
7. Промывка в TBS pH 7.4 – 5 мин.
8. Блокирование неспецифического связывания антител (протеиновый блок) – 5 мин. По истечении времени инкубации промокнуть реагент салфеткой и, не смывая, перейти к следующему этапу.
9. Первичные антитела – 15-60 мин (согласно протоколу системы детекции).
10. Промывка в двух сменах TBS pH 7.4 – по 5 мин.
11. Вторичные антитела, конъюгированные с ферментом (15-60 мин) или инкубация в реагентах соответствующей системы детекции согласно рекомендациям производителя, сопровождаемая промывкой в двух сменах TBS pH 7.4 по 5 мин между реагентами.
12. Промывка в двух сменах TBS pH 7.4 – по 5 мин.
13. Детекция ферментной активности хромогеном (ДАБ, АЭК для пероксидазного метода, BCIP/NBT с левамизолом 1:1) под контролем микроскопа.
14. Промывка в TBS pH 7.4 – 5 мин.
15. Докрашивание ядер (гематоксилином Майера для пероксидазного метода, метиленовым зеленым для щелочной фосфатазы).
16. Промывка в водопроводной воде – 5 мин.
17. Заключение под покровное стекло в глицерогель (рис. 11-13).

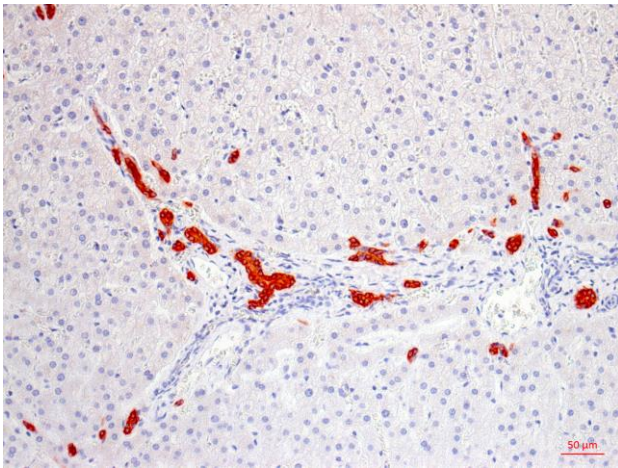


Рис. 11. Срез скелетной мышцы, окрашенный с антителами к дисферлину, хромоген АЭК. Сарколемма красная, ядра докрашены гематоксилином

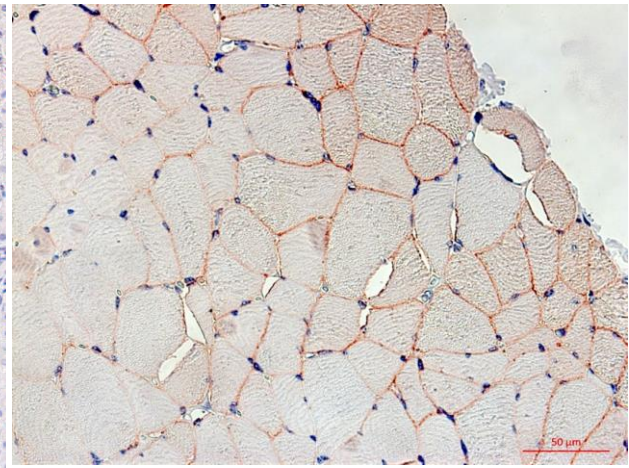


Рис. 12. Срез печени, окрашенный с антителами к СК19 – маркеру холангиоцитов, хромоген АЭК. Желчные капилляры красные, ядра докрашены гематоксилином

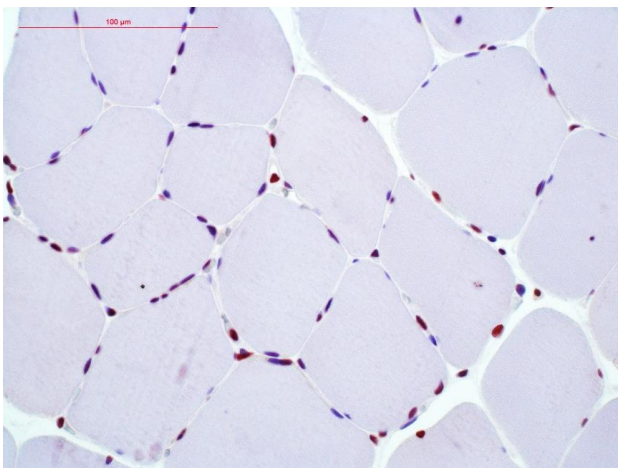


Рис. 13. Срез скелетной мышцы, окрашенный с антителами к Ki-67 – маркеру пролиферирующих клеток, хромоген АЭК, ядра докрашены гематоксилином. Ядра пролиферирующих клеток

### ***Иммунофлуоресцентное окрашивание на замороженных срезах***

1. Просушенные замороженные срезы дофискировать 4% нейтральным формальдегидом - 5 мин при

комнатной температуре. Фиксация в охлажденном ацетоне исключает дальнейшее использование пермеабиллизаторов и выявление антигенов, связанных с липидами. Фиксация в охлажденном метаноле не рекомендуется для поверхностных маркеров.

2. Промывка в PBS pH 7,4 – 5 мин.

3. Окантовать срезы гидрофобным маркером.

4. Блокирование неспецифического связывания антител (протеиновый блок) – 60 мин. По истечении времени инкубации промокнуть реагент салфеткой и, не смывая, перейти к следующему этапу.

**NB!** Выявление цитоплазматических и ядерных антигенов может потребовать добавления в блокирующий раствор пермеабилizаторов–сурфактантов Triton X-100 или Tween-20. Первичные и вторичные антитела в дальнейшем мы рекомендуем разводить в блокирующем растворе.

9. Первичные антитела – на ночь при +4°C.

10. Достать стекла со срезами из холодильника, согреть до комнатной температуры.

11. Промывка в двух сменах PBS pH 7.4 – по 5 мин.

12. Вторичные антитела, конъюгированные с флуорофором 60 мин.

Начиная с этого этапа работать в темноте!

13. Промывка в двух сменах PBS pH 7.4 – по 5 мин.

14. Докрашивание ядер DAPI, Hoechst 33342 (синяя флуоресценция) или пропидий йодидом (красная флуоресценция) – 5 мин.

15. Промывка в дистиллированной воде – 5 мин.

16. Заключение под покровное стекло в глицерогель или специальную среду с низкой аутофлуоресценцией (рис. 14) с последующей как можно более ранней окантовкой покровного стекла бесцветным лаком.

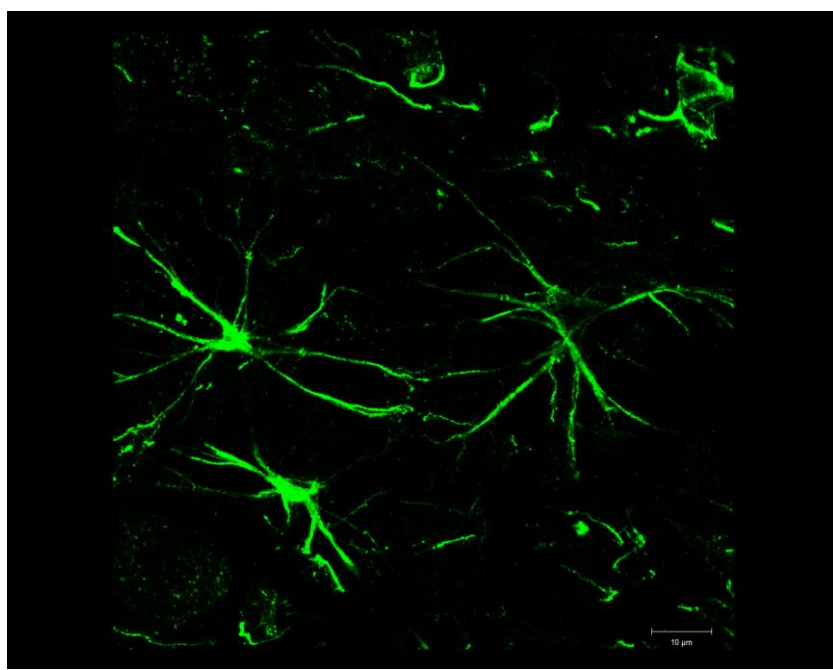


Рис. 14. Астроциты спинного мозга крысы, окрашенный с антителами к кислому глиальному фибриллярному белку, конъюгированными с Alexa 488 (зеленый). Фото А.А. Мельниковой

### **Комментарии к технике иммуногистологического окрашивания**

1. Окрашивание стоит проводить при комнатной температуре, если иное не предусмотрено отдельными этапами, как, например, инкубация антител на ночь.

2. При раскапывании антител необходимо пользоваться серологической пипеткой и одноразовыми наконечниками. В среднем на один срез хватает 50

мкл антител и других реагентов (рис. 15).

3. Во время иммуногистологического окрашивания нельзя допускать высыхания срезов, с этой целью следует производить окрашивание во влажных камерах.

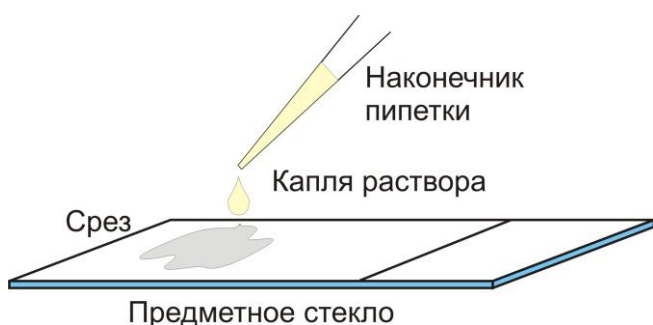


Рис. 15. Техника раскапывания реагентов на предметное стекло

### **Окрашивание полутонких срезов (Hayat, 1986)**

*Материал:* полутонкие срезы (без отмыва от смолы!).

*Реагенты:*

### **Раствор А:**

- метиленовый синий – 0,13 г;
- азури II – 0,02 г;
- глицерин – 10 мл;
- метанол – 10 мл;
- фосфатный буфер (рН 7,0) – 30 мл;
- дистиллированная вода – 50 мл.

### **Раствор Б:**

- основной фуксин – 0,1 г;
- 50% этанол – 10 мл;
- дистиллированная вода – 90 мл.

### *Протокол:*

1. Окрашивание в растворе А – 20-30 мин при 65°C.
2. Промывка в дистиллированной воде – 2 раза.
3. Окрашивание в растворе Б – 1-3 мин при комнатной температуре.
4. Промывка в воде, высушивание.
5. Обезжирить срез в ксилоле, заключить в синтетическую монтирующую среду под покровное стекло (опционально).

*Результат:* цвет структур может варьировать в зависимости от разновидности смолы. Цитоплазма бледно-голубая, ядра темно-синие, соединительная ткань от розового до тёмно-красного, муцин от розового до пурпурного, гликоген и амилопектин от розового до красного, капли жира от серого до светло-голубого, эритроциты зелено-голубые.

## **4. Прописи основных растворов**

*Адгезив на основе яичного белка (по Г.А. Меркулову)*

Яичный белок от 2-3 яиц без примеси желтка взбивают до состояния пены, выливают на рыхлый фильтр, смоченный водой, фильтруют. К фильтрату добавляют равный объем глицерина, размешивают, добавляют кристалл тимола. Хранить при +4°C.

*Глицерогель для заключения под покровное стекло (по Кайзеру, 1880)*

7 г мелкого желатина размачивают в течение 2 ч в 42 мл дистиллированной воды, прибавляют 50 глицерина и несколько кристаллов тимола. Нагревают на водяной бане 10-15 мин при помешивании, фильтруют в горячем виде и остужают. Хранить при +4°C.

Вариант Киссера (1934) содержит меньше воды и предполагает использование 50 г желатина, 175 мл воды и 150 мл глицерина.

*4% забуференный формалин*

Формалин (40% раствор формальдегида) – 100 мл, однозамещенного фосфата натрия моногидрат – 4 г или дигидрата 4,5 г или безводного 3,5 г, двузамещенного фосфата натрия безводного 6,5 г или дигидрата 8 г или двенадцативодного 16,8 г. Довести объем до 1000 мл дистиллированной водой. Хранить при комнатной температуре.

*Трис-НСl-буфер (рН 7,4, 0,05М)*

Концентрированный раствор (×20):

- трис (трис-(оксиметил)-аминометан) – 48,5 г;
- натрия хлорид – 350,6 г;
- дистиллированная вода – 1800 мл.

Смешать, довести рН соляной кислотой до 7,5, довести объем раствора до 2 л дистиллированной водой. Хранить при комнатной температуре.

Для приготовления рабочего раствора взять 1 часть концентрированного и 19 частей дистиллированной воды (50 мл концентрата и 950 мл дистиллированной воды).



С целью пермеабиллизации на основе полученного разведенного раствора готовят TBST, добавляя 0,05% Tween 20.

*Фосфатный буфер (PBS) (pH 7,4, 0,1 M):*

- натрия гидрофосфат (безводный) - 10,9 г;
- натрия дигидрофосфат (безводный) - 3,2 г;
- натрия хлорид - 90 г;
- дистиллированная вода - 1000 мл.

Смешать до растворения и отрегулировать pH до 7,4. Хранить при комнатной температуре. Разбавить 1:10 дистиллированной водой перед использованием и при необходимости отрегулировать pH.

С целью пермеабиллизации на основе полученного разведенного раствора готовят PBST, добавляя 0,05% Tween 20.

*Цитратный буфер (pH 6,0, 0,01M) для NIER:*

- моногидрат лимонной кислоты – 2,1 г;
- дистиллированная вода – 900 мл.

Смешать, довести pH раствора до 6,0 при помощи 2M гидроксида натрия (30 г безводного гидроксида натрия в 500 мл дистиллированной воды), довести объем дистиллированной водой до 1 л. Хранить при +4°C.

*ЭДТА буфер (pH 8,0, 1mM) для NIER:*

- ЭДТА – 0,372 г;
- дистиллированная вода – 1000 мл.

Смешать, довести pH 2M гидроксидом натрия до 8,0. Хранить при комнатной температуре до 3 месяцев и при +4°C дольше.

*Ацетатный буфер (pH 5,0) для проявочного раствора АЭК:*

- 0,2 н уксусная кислота (11,55 ледяной уксусной кислоты в 1000 дистиллированной воды) – 74 мл;

- 0,2 М ацетат натрия (27,2 г тригидрата ацетата натрия в 1000 мл дистиллированной воды) – 176 мл.

Дистиллированной водой довести объем до 1 л. Хранить при +4°C.

Альтернативно:

- натрия ацетата - 2,3936 г;

- воды дистиллированной 400 мл.

Смешать, довести рН до 5,0 ледяной уксусной кислотой, довести объем до 500 мл.

### *Раствор АЭК*

Растворить таблетку АЭК в 5 мл диметилформаида в стеклянной посуде. Хранить при +4°C.

Для приготовления проявочного раствора (на 8 срезов из расчета 50 мкл на срез):

- раствор АЭК – 50 мкл;

- ацетатный буфер рН 5,0 – 450 мкл;

- 3% раствор пероксида водорода – 15 мкл.

Приготовить *ex temporo*, использовать в течение 30 мин.

### *Приготовление цитрата свинца для контрастирования срезов по Reynolds*

Воду для приготовления раствора освободить от углекислого газа (вскипятить, остудить до 40°C).

Нитрата свинца 1,33 г, цитрата натрия 1,76 г всыпать в мерную колбу на 50 мл, смешать, влить 30 мл теплой воды и встряхивать 30 мин, первые 10 мин интенсивно.

Добавить 8 мл свежеприготовленного 1 н (4%) раствора NaOH. Раствор солей в колбе станет прозрачным.

Довести до 50 мл водой, конечный рН 12,0.

Хранить в холодильнике.