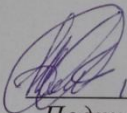


МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«УЛЬЯНОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт медицины, экологии и физической культуры  
Экологический факультет  
Кафедра биологии, экологии и природопользования

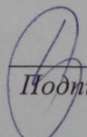
**Отчет по учебной практике**  
по теме  
«ЦИТО- И ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ. МЕТОД  
РАДИОАВТОГРАФИИ»

Выполнил:  
студент группы БМ-О-16/1,  
направление 06.01.04 Биология (уровень магистратуры)  
Толочманова Ольга Владимировна

  
17.06.17  
Подпись, дата

Отлично  
Оценка

Руководитель практики:  
к.м.н., главный врач ГУЗ УОСПК  
Хапман М.Э

  
18.06.17  
Подпись, дата

Ульяновск, 2017

## Оглавление

Введение.....	2
Цито- и гистохимические методы .....	4
Метод радиоавтографии .....	10
Заключение .....	13
Список использованных источников .....	15

## Введение

Для прогресса гистологии, цитологии и эмбриологии большое значение имеет внедрение достижений физики и химии, новых методов смежных наук - биохимии, молекулярной биологии, генной инженерии.

Современные методы исследования позволяют изучать ткани не только как единое целое, но и выделять из них отдельные типы клеток для изучения их жизнедеятельности в течение длительного времени, выделять отдельные клеточные органеллы и составляющие их макромолекулы (например, ДНК), исследовать их функциональные особенности [2].

Такие возможности открылись в связи с созданием новых приборов и технологий - различных типов микроскопов, компьютерной техники, рентгеноструктурного анализа, применения метода ядерно-магнитного резонанса (ЯМР), радиоактивных изотопов и автордиографии, электрофореза и хроматографии, фракционирования клеточного содержимого с помощью ультрацентрифугирования, разделения и культивирования клеток, получения гибридов; использования биотехнологических методов - получения гибридом и моноклональных антител, рекомбинантных ДНК и др [9, 10].

Таким образом, биологические объекты можно изучать на тканевом, клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях. Несмотря на внедрение в естественные науки разнообразных биохимических, биофизических, физических и технологических методов, необходимых для решения многих вопросов, связанных с жизнедеятельностью клеток и тканей, гистология в основе своей остается морфологической наукой со своим набором методов [2, 8]. Последние позволяют охарактеризовать процессы, происходящие в клетках и тканях, их структурные особенности.

Главными этапами цитологического и гистологического анализа являются выбор объекта исследования, подготовка его для изучения в микроскопе, применение методов микроскопирования, качественный и количественный анализ изображений [12].

Объектами исследования служат живые и фиксированные клетки и ткани, их изображения, полученные в световых и электронных микроскопах или на телевизионном экране дисплея [5].

Таким образом, биологические объекты можно изучать на тканевом, клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях. Несмотря на внедрение в естественные науки разнообразных биохимических, биофизических, физических и технологических методов, необходимых для решения многих вопросов, связанных с жизнедеятельностью клеток и тканей, гистология в основе своей остается морфологической наукой со своим набором методов. Последние позволяют характеризовать процессы, происходящие в клетках и тканях, их структурные особенности [3, 10].

Главными этапами цитологического и гистологического анализа являются выбор объекта исследования, подготовка его для изучения в микроскопе, применение методов микроскопирования, качественный и количественный анализ изображений.

Объектами исследования служат живые и фиксированные клетки и ткани, их изображения, полученные в световых и электронных микроскопах или на телевизионном экране дисплея. Существует ряд методов, позволяющих проводить анализ указанных объектов.

## Цито- и гистохимические методы

### *Цитохимические методы исследования*

Цитохимические исследования проводят в препаратах (мазках или отпечатках) костного мозга, крови, различных органов и новообразований, пунктатов; они основаны на использовании специфических химических цветных реакций для определения в клетках различных веществ (под действием специально подобранных реактивов происходит окрашивание тех или иных веществ в цитоплазме, а по степени и характеру окраски судят о количестве или активности исследуемых веществ) [5]. Цитохимические исследования относительно несложны, но уступают в точности количественному анализу, проводимому с помощью биохимических методов [11].

При цитохимическом исследовании чаще пользуются полуколичественной оценкой результатов, используя принцип Астальди, основанный на выявлении различной степени интенсивности специфической окраски. В зависимости от нее исследуемые элементы делят на 4 группы: с отрицательной реакцией (-), слабоположительной (+), положительной (++) и резко положительной (+++). Для количественного выражения результатов подсчитывают 100 клеток определенного вида, дифференцируя их по указанному принципу, затем число клеток с одинаковой интенсивностью окраски умножают на соответствующее данной группе число плюсов, сумма этих произведений составляет условные единицы. Например, при исследовании активности щелочной фосфатазы в нейтрофилах из 100 просмотренных клеток в 60 клетках активность фермента не выявлена (-), в 35 - специфическая окраска была слабой (+) и в 5 - более интенсивной (++) . Результат определения активности щелочной фосфатазы в нейтрофилах в таком случае составит  $(60*0)+(35*1)+(5*2)=0+35+10=45$  ед[5, 11].

Можно выразить результат в виде среднего цитохимического показателя по L. Karlow (1955) или среднего цитохимического коэффициента

(СЦК). С этой целью также дифференцируют 100 исследуемых клеток по указанной выше системе. Полученный процент клеток в каждой группе умножают на соответствующее данной группе число плюсов. Сумма этих величин, деленная на 100, представляет собой СЦК для одной клетки. В указанном примере СЦК щелочной фосфатазы нейтрофилов равен 0,45 [12].

В тех случаях, когда изучаемые вещества локализуются в клетках в виде единичных гранул (например, активность неспецифической эстеразы в лимфоцитах и др.), результат цитохимической реакции целесообразно выражать в процентах клеток, дающих положительную реакцию [1, 12].

Метод полуколичественной оценки является ориентировочным, но позволяет сравнивать распределение исследуемых веществ в разных клеточных элементах или в одних и тех же клетках при различных патологических состояниях организма, а также в зависимости от течения заболевания, степени его тяжести и в связи с проводимой терапией [2, 5, 12].

Следует иметь в виду, что цитохимический метод может быть использован только в качестве дополнения к морфологическому исследованию, но не может его заменить. Недостатком всех цитохимических реакций является их приблизительная качественная оценка, основанная на степени интенсивности окраски [8, 12].

Наиболее часто проводятся следующие цитохимические исследования:

- определение гликогена
- определение липидов
- определение железа (негемоглобинового)
- определение нуклеиновых кислот (ДНК и РНК)
- определение активности ферментов:
  - миелопероксидазы,
  - щелочной фосфатазы,
  - кислой фосфатазы,
  - цитохромоксидазы,

- дегидрогеназ
- сукцинатдегидрогеназы
- альфа-глицерофосфатдегидрогеназы
- неспецифических эстераз
- альфа-нафтилацетат-эстеразы,
- кислой альфа-нафтилацетат-эстеразы,
- нафтол-AS-ацетат-эстеразы,
- нафтол-AS-D-хлорацетат-эстеразы
- определение катионного белка
- тест восстановления нитросинеготетразолия.

### ***Гистохимические методы исследования***

Гистохимические методы исследования (Г. м. и) — методы изучения химических свойств тканей и выявления особенностей обмена веществ в тканевых структурах [9, 10].

Г. м. и. делят на разрушающие и неразрушающие. Неразрушающие методы требуют соблюдения определенных физических констант (кристаллографические характеристики, электромагнитные лучи, люминесценция и т. п.) и химических показателей (*invivo*, после холодной промывки, фиксации и реакции). К разрушающим методам относят растворение, распыление, микровозгонку, гистоспектрографию, экстракцию с ферментами и другими реагентами, гистопиролизис и др. Кроме того, существуют так называемые методы разделения, к которым относят микрозонд, микротомные срезы, экстракцию с растворителями, дифференциальное центрифугирование с использованием микрогравиметрической, калориметрической, полярографической, радиометрической и микробиол, техники [7].

Важнейшим свойством большинства Г. м. и. является возможность дифференцировать тканевые (клеточные) химические компоненты, основываясь на их различном сродстве к красящим веществам и взаимодействии красителей или химических реагентов со специфическими группировками белков, полисахаридов, жиров, ферментов и т. Д [7, 9].

Для проведения гистохимических исследований необходима строгая прижизненная локализация искомого хим. соединения, что возможно лишь при сохранении структуры тканей и клеток в состоянии, близком к тому, которое имеется в живом организме. Это достигается получением срезов свежемороженых тканей с помощью ножа глубокого охлаждения и криостата. Каждый метод должен быть специфичным, то есть избирательно выявлять группу определенных веществ или определенное химическое вещество, а также высокочувствительным [3, 8].

Результаты гистохимического исследования могут оцениваться качественно и количественно. Качественная оценка реакции основывается на выявлении характерной окраски искомого вещества (гистохимической реакции), типичного распределения ферментных гранул (гистоферментохимической реакции), специфического свечения (иммуногистохим. реакции), для чего пользуются световым или люминесцентным микроскопами. Возможно сочетание гисто(cito)химического метода с электронно-микроскопическим. Для количественной оценки гистохимической реакции пользуются методами цитофотометрии, автордиографии [12].

Г. м. и. применяют для определения различных тканевых (клеточных) химических компонентов, например, белков, витаминов, гормонов, пигментов и др [3, 5].

Для гистохимического определения белков применяют ряд методов, выявляющих аминокислоты, входящие в их. В основе выявления нуклеиновых кислот лежат реакции на все компоненты, которые образуются в результате их гидролиза (фосфорная кислота, пуриновые, пиримидиновые



основания, углеводы). Нуклеиновые кислоты существуют в различных формах — РНК и ДНК [8, 9].

При гистохимическом выявлении специфических белков — ферментов, которые играют роль биологических катализаторов, учитывают их термостабильность (оптимум действия 37—40°), высокую чувствительность к изменению среды, выраженную специфичность действия. Методы выявления липолитических ферментов (липаз и эстераз) основаны на их способности расщеплять эфиры жирных кислот. Липазы и эстеразы относятся к группе карбоновых эстераз и расщепляют многочисленные алифатические и ароматические эфиры карбоновых кислот [11, 12].

Большую группу ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные процессы, составляют дегидрогеназы. Дыхательные ферменты, содержащие железо, относятся к цитохромам, которые в зависимости от природы гемопростетической группы делятся на Цитохромы А, В и С. В животных тканях после обработки их водными фиксаторами и заливки в парафин выявляется единственный представитель группы полисахаридов — гликоген. Для обнаружения полисахаридного и белкового комплексов гликопротеидов, которые являются сложными белками, используют ряд Г. м. и. Муцины в тканях определяются с помощью альцианового синего и др. Выявление липидов основано на растворении инертных бис-азосоединений или других красителей в самих жирах [2, 5].

Для гистохимического выявления липопротеидов применяют те же методы, что и для определения белков. Методы определения гормонов основаны на хим. взаимодействии их реактивных групп (белков, полисахаридов, жиров) с различными хим. веществами. Для выявления витаминов используют ряд специфических методик. Г. м. и. пигментов зависят от наличия определенных, входящих в их состав, групп [12].

Г. м. и. находят широкое применение в эмбриологии и гистологии, цитологии, патологической анатомии, экспериментальной и клин. патологии для решения как теоретических, так и практических задач [8, 9, 11, 12].

С помощью разнообразных методов современной гистохимии можно судить не только об особенностях хим. реакций различных тканевых структур, но и определять характер и темп обмена в тканях и клетках, а главное специфику функций, специализированных структур, что позволяет изучать самые ранние (функциональные) проявления многих заболеваний [8, 10].

## Метод радиоавтографии

Метод радиоавтографии основан на введении в исследуемый объект соединения, "меченого" радиоактивным атомом и выявлении места его включения путем фотографической регистрации излучения. Основой получения изображения является воздействие ионизирующих частиц, образующихся при распаде радиоактивного атома, на ядерную фотоэмульсию, содержащую кристаллы галоидного серебра [4, 6].

Меченые атомы широко применяются в цитологии для изучения разнообразных химических процессов, протекающих в клетке, например для изучения синтеза белков и нуклеиновых кислот, проницаемости клеточной оболочки, локализации веществ в клетке и т. д. [4]. Для этих целей применяются соединения, в которые введены радиоактивная метка. В молекуле меченого вещества, например аминокислоты или углевода, один из атомов замещен атомом того же вещества, но обладающим радиоактивностью, т. е. радиоактивным изотопом. Известно, что изотопы одного и того же элемента не отличаются друг от друга по своим химическим свойствам, и, попав в организм животного или растения, они ведут себя во всех процессах так же, как и обычные вещества. Однако благодаря тому, что эти изотопы обладают радиоактивным излучением, их можно легко обнаружить, применяя фотографический метод [11].

Автордиография, аутордиография, радиоавтография, метод изучения распределения радиоактивных веществ в исследуемом объекте наложением на объект чувствительной к радиоактивным излучениям фотоэмульсии. Содержащиеся в объекте радиоактивные вещества как бы сами себя фотографируют (отсюда и название). Методом Автордиография широко пользуются в физике и технике, в биологии и медицине - всюду, где применяются изотопные индикаторы [6, 12].

После проявления и фиксации фотоэмульсии на ней получается изображение, отображающее исследуемое распределение [4]. Существует несколько способов прикладывания фотоэмульсии к объекту. Фотопластинку можно прямо наложить на отшлифованную поверхность образца или же можно наносить на образец тёплую жидкую эмульсию, которая при застывании образует плотно прилегающий к образцу слой и после экспозиции и фотообработки исследуется [6]. Распределение радиоактивных веществ изучают, сравнивая плотность почернения фотоплёнки от исследуемого и эталонного образца [4, 11]. Второй метод состоит в подсчёте следов, образуемых ионизирующими частицами в фотоэмульсии, с помощью оптического или электронного микроскопа (микрорадиография). Этот метод значительно чувствительнее первого. Для получения макроавтографов применяются диапозитивные и рентгеновские эмульсии, для микроавтографов - специальные мелкозернистые эмульсии [6, 11].

Фотографическое изображение распределения радиоактивных веществ в исследуемом объекте, полученное методом Авторадиография, называется авторадиограммой, или радиоавтографом [4, 10].

Введение в организм соединений, меченных радиоизотопами, и дальнейшее исследование тканей и клеток методом авторадиографии позволяет получить точные данные о том, в каких именно клетках или клеточных структурах происходят те или иные процессы, локализуются те или иные вещества, установить временные параметры ряда процессов [6, 10, 12]. Так, например, применение радиоактивного фосфора и Авторадиография дали возможность обнаружить присутствие интенсивного обмена веществ в растущей кости; применение радиоиода и авторадиографии позволили уточнить закономерности деятельности щитовидной железы; введение меченых соединений - предшественников белка и нуклеиновых кислот, и авторадиография помогли уяснить роль в обмене этих жизненно важных соединений определённых клеточных структур [4]. Метод авторадиографии позволяет определить не только локализацию радиоизотопа

в биологическом объекте, но и его количество, поскольку число восстановленных зёрен серебра эмульсии пропорционально количеству воздействующих на неё частиц [6, 11]. Количественный анализ макроавтографов проводят обычными приёмами фотометрии, а микроавтографов - подсчётом под микроскопом зёрен серебра или следов-треков, возникших в эмульсии под действием ионизирующих частиц. Авторадиография начинают успешно сочетать с электронной микроскопией [4, 10].

## Заключение

При помощи цито- и гистохимических реакций удастся не только выявить то или иное химическое соединение, но и установить локализацию вещества в клетках, проследить за изменением его в процессе жизнедеятельности, то есть изучить обменные процессы. В настоящее время имеются гистохимические методики, позволяющие изучить основные этапы обмена белков, липидов, полисахаридов, активность ряда ферментов, основные неорганические компоненты клеток [1, 12]. К гистохимическим реакциям применимы некоторые основные требования:

1. сохранение строгой прижизненной локализации химического соединения;
2. специфичность и высокая чувствительность реакции;
3. химические реактивы не должны вступать в обменные процессы;
4. проведение контрольных реакций (удаление изучаемого вещества);
5. конечный продукт реакции должен быть окрашен.

Гистохимические реакции дают качественную оценку, в сочетании с цитофотометрическими исследованиями они позволяют определить количество исследуемого компонента.

### ***Выявление ДНК.***

1. Метод Фельгена: гидролиз в 1 N растворе HCl для освобождения альдегидных группировок дезоксирибозы (составной части молекулы ДНК). Обработка реактивом Шиффа – фуксинсернистой кислотой – бесцветным соединением, обладающим высокой степенью чувствительности к альдегидам. Соединяясь с фуксинсернистой кислотой, альдегиды переводят ее в осединение, окрашенное в яркий красно-фиолетовый цвет. Реакция специфичная [5, 7].

2. Метод Браше: окраска пиронином-метиловым зеленым. Сущность метода заключается в избирательном присоединении основных красителей к нуклеиновым кислотам – пиронина к РНК (дает красное окрашивание),

метилового зеленого к ДНК (дает зеленое окрашивание). Для контроля РНК перед окрашиванием требуется обработка препаратов рибонуклеазой [5, 8].

### ***Выявление полисахаридов.***

Метод основан на окислении полисахаридов при помощи 0,5%-ного раствора йодной кислоты до высокомолекулярных альдегидных соединений, которые затем выявляются реактивом Шиффа [1, 12]. Полисахариды окрашиваются в яркий красно-фиолетовый цвет. Контроль с амилазой позволяет отдифференцировать от других полисахаридов. Реакция на полисахариды носит название ШИК-реакция (аббревиатура от Шифф-йодная кислота), а метод окраски назван по имени автора – Шабдаша-Мак Мануса-Хочкиса [7, 8].

Метод электронной автордиографии оказался наиболее эффективным для изучения информационных процессов, так как в отличие от других методов он не только отражает состояние макроорганизма, но и позволяет определить многие особенности микроорганизмов — скорость размножения, уровень жизнеспособности, интенсивность различных биосинтетических процессов [3, 4]. Имеется опыт успешного применения электронной автордиографии для определения участков клетки, в которых происходит репликация вирусных нуклеиновых кислот [6, 10].

## Список использованных источников

1. Akzessori-sche Methoden in der Histochemie, hrsg. v. G. Geyer u. H. Lippa, Jena, 1975;
2. Gewebe-vorbehandlung und Fixation in der Histo-chemie-Problemebiologischer Farbstoffe, hrsg. y. D. Wittekind, Jena, 1973;
3. Popp A, Urbach A, Witte OW, Frahm C (2009). «Adult and embryonic GAD transcripts are spatiotemporally regulated during postnatal development in the rat brain». PLoS ONE 4 (2): e4371. DOI:10.1371/journal.pone.0004371. PMID 19190758.
4. Rogers A.W. Practical autoradiography, Amersham UK, 1982
5. Библиогр.: Берстон М. Гистохимия ферментов, пер. с англ.. М., 1965;
6. Епифанова О.И. и др. Радиоавтография М., «Высш.школа», 1977
7. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия, пер. с англ., М., 1969;
8. Пирс Э. Гистохимия, пер. с англ., М., 1962;
9. Принципы и методы гистоцитохимического анализа в патологии, под ред. А.П. Авцына и др., Л., 1971, библиогр.
10. Саркисов Д.С. Перов Ю.Л. Микроскопическая техника М.: «Медицина», 1996
11. Справочник "Лабораторные методы исследования в клинике" под ред. проф. В. В. Меньшикова Москва "Медицина" 1987 г.
12. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования под ред. Е. А. Кост. Москва "Медицина" 1975 г.