

# Глава 1 ГИСТОЛОГИЯ И ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В НЕЙ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

|   |           |  |           |
|---|-----------|--|-----------|
| <b>ПОДГОТОВКА ТКАНЕЙ К ИССЛЕДОВАНИЮ</b> | <b>14</b> | <b>АВТОРАДИОГРАФИЯ</b>                                   | <b>24</b> |
| Фиксация                                | 15        | <b>КУЛЬТУРА КЛЕТОК И ТКАНЕЙ</b>                          | <b>25</b> |
| Заливка и приготовление срезов          | 16        | <b>ГИСТОХИМИЯ ФЕРМЕНТОВ</b>                              | <b>25</b> |
| Окрашивание                             | 16        | <b>ВИЗУАЛИЗАЦИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ</b>                | <b>26</b> |
| <b>СВЕТОВАЯ МИКРОСКОПИЯ</b>             | <b>18</b> | Иммуногистохимия   | 27        |
| Микроскопия в светлом поле              | 18        | Методы гибридизации                                      | 28        |
| Флуоресцентная микроскопия              | 19        | <b>ИНТЕРПРЕТАЦИЯ СТРУКТУР НА СРЕЗАХ ТКАНЕЙ</b>           | <b>30</b> |
| Фазово-контрастная микроскопия          | 19        | <b>КРАТКИЙ ОБЗОР ОСНОВНЫХ ДАННЫХ САМОКОНТРОЛЬ ЗНАНИЙ</b> | <b>31</b> |
| Конфокальная микроскопия                | 20        |  | <b>32</b> |
| Поляризационная микроскопия             | 21        |  |           |
| <b>ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ</b>          | <b>21</b> |  |           |
| Трансмиссионная электронная микроскопия | 22        |  |           |
| Сканирующая электронная микроскопия     | 24        |  |           |

Гистология — наука, изучающая ткани тела и то, каким образом эти ткани располагаются и взаимодействуют, образуя органы. Этот предмет включает в себя все аспекты биологии тканей, причем основное внимание в нем уделяется тому, как структура и расположение клеток оптимальным образом обеспечивают выполнение функций, специфичных для каждого органа.

Ткани состоят из двух взаимодействующих компонентов: клеток и межклеточного вещества, или внеклеточного матрикса (ВКМ). ВКМ включает многие виды макромолекул, большинство из которых образуют сложные структуры, такие как, например, коллагеновые фибриллы. ВКМ поддерживает клетки и содержит жидкость, транспортирующую питательные вещества к клеткам и уносящую их шлаки и секреторные продукты. Клетки производят ВКМ локально и, в свою очередь, сильно зависят от молекул матрикса. Многие компоненты матрикса связываются со специфическими рецепторами на поверхности клеток, которые пронизывают клеточные мембраны и соединяются со структурными компонентами внутри клеток. Таким путем образуется единая непрерывная система, в которой клетки и ВКМ функционируют совместно хорошо скоординированным образом.

В процессе развития клетки и связанный с ними матрикс приобретают функциональную специализацию и дают начало основным типам тканей с характерными структурными особенностями. Органы образуются благодаря упорядоченному

сочетанию этих тканей, и их точное расположение обеспечивает функционирование каждого из них и организма в целом.

Из-за мелкого размера клеток и компонентов матрикса изучение гистологии зависит от использования микроскопов и молекулярных методов исследования. Достижения в области биохимии, молекулярной биологии, физиологии, иммунологии и патологии имеют большое значение для более глубокого понимания биологии тканей. Для правильного восприятия предмета в любой отрасли науки необходимо знакомство с используемыми приборами и методами. В этой главе рассмотрены общие методы, применяемые для изучения клеток и тканей, со специальной ориентацией на микроскопические подходы.

## › ПОДГОТОВКА ТКАНЕЙ К ИССЛЕДОВАНИЮ

Наиболее распространенной методикой, используемой в гистологических исследованиях, является приготовление тканевых пластинок — срезов, которые можно исследовать визуально в проходящем свете. Поскольку большинство тканей и органов обладают значительной толщиной и не пропускают свет, из них получают тонкие прозрачные срезы, которые помещают на предметные стекла для микроскопического исследования внутренних структур.

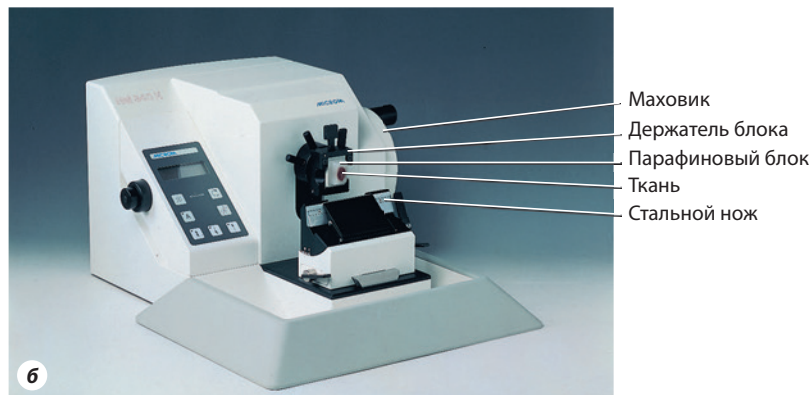
В идеальном микроскопическом препарате ткань сохранена таким образом, что на срезе она имеет те же структурные особенности, что были свойственны ей, когда она входила в состав организма. Однако это часто неосуществимо, поскольку процесс приготовления может удалять клеточные липиды и вносить небольшие искажения в структуру клетки. Основные этапы подготовки тканей для световой микроскопии показаны на рис. 1.1.

## Фиксация

Для того чтобы сохранить структуру ткани и предотвратить ее разрушение ферментами, которые выделяются клетками или микроорганизмами, кусочки органов помещают как можно скорее после их удаления из организма в растворы стабилизирующих или вызывающих образование поперечных связей соединений, называемых **фиксаторами**. Поскольку фиксатор должен полностью



а



б

**Рис. 1.1.** Приготовление срезов фиксированной и залитой в парафин ткани

Подготовка большинства тканей для гистологического исследования, как показано на рисунке, включает указанную последовательность этапов (**а**):

- **фиксация** — небольшие кусочки ткани помещают в растворы химических веществ, которые вызывают образование поперечных сшивок белковых молекул и инактивируют литические ферменты, что сохраняет структуру клеток и тканей;
- **обезвоживание** — ткань проводят через серию растворов спирта нарастающих концентраций до 100% концентрации, в результате вся вода удаляется;
- **просветление** — спирт удаляют органическими растворителями, которые смешиваются как со спиртом, так и с парафином;
- **заливка** — затем ткань помещают в расплавленный парафин, пока она полностью не пропитается этим веществом;
- **формирование блока** — пропитанную парафином ткань помещают в небольшую форму с расплавленным парафином и дают ей затвердеть;
- **подрезка блока (тримминг)** — полученный парафиновый блок обрезают, чтобы обнажить ткань для приготовления срезов на микротоме.

Аналогичные шаги свойственны процессу подготовки тканей к трансмиссионной электронной микроскопии, за исключением выбора специальных фиксаторов и дегидратирующих растворов, используемых с меньшими образцами тканей, а заливку производят в эпоксидные смолы, которые становятся тверже парафина, что позволяет получить очень тонкие срезы.

(**б**) Микротом используют для получения срезов залитых в парафин тканей для световой микроскопии. Подрезанный блок ткани устанавливают в держатель парафинового блока, и каждый поворот маховика гистологом продвигает держатель на регулируемое расстояние, обычно от 1 до 10 мкм. После каждого движения вперед блок ткани проходит над кромкой стального ножа, и получается срез, толщина которого равна расстоянию выдвижения блока. Парафиновые срезы помещают на стеклянные предметные стекла и приклеивают к их поверхности, депарафинируют и окрашивают для последующего исследования в световом микроскопе. Для трансмиссионной электронной микроскопии срезы толщиной менее 1 мкм получают из залитых в смолу клеток с помощью ультрамикротомов со стеклянным или алмазным ножом

диффундировать в ткани, чтобы сохранить все клетки, полученные ткани перед фиксацией обычно разрезают на мелкие фрагменты, облегчая тем самым проникновение фиксатора. Для улучшения сохранения клеток в крупных органах фиксаторы часто вводят через кровеносные сосуды, при этом сосудистая перфузия обеспечивает быструю фиксацию всех тканей.

Одним из широко применяемых фиксаторов для световой микроскопии является формалин в виде забуференного изотонического раствора 37% формальдегида. Как это соединение, так и глутаровый альдегид (глутаральдегид), фиксатор, используемый для электронной микроскопии, вступают в реакцию с аминогруппами ( $\text{NH}_2$ ) белков, предотвращая их разрушение обычными протеазами. Глутаровый альдегид вызывает также образование поперечных связей между соседними белковыми молекулами, что усиливает структуры клетки и ВКМ.

Электронная микроскопия обеспечивает гораздо большее увеличение и разрешение очень мелких клеточных структур, поэтому фиксация должна быть сделана очень тщательно, чтобы сохранить дополнительные «ультраструктурные» детали. Обычно в таких исследованиях обработанную глутаральдегидом ткань затем погружают в забуференный раствор тетроксид осмия, который сохраняет (и окрашивает) клеточные липиды, а также белки.

### Заливка и приготовление срезов

Для того чтобы получить тонкие срезы, фиксированные ткани пропитывают и заливают в материал, который придает им твердую консистенцию. Материалы для заливки включают парафин, обычно используемый для световой микроскопии, и пластиковые смолы, которые адаптированы как для световой, так и для электронной микроскопии.

Перед пропитыванием такими средами фиксированную ткань подвергают **дегидратации** (обезвоживанию), постепенно удаляя из нее воду путем проводки через ряд порций этанола нарастающих концентраций, вплоть до концентрации 100%. Затем этанол заменяют органическим растворителем, смешивающимся как со спиртом, так и с заливочной средой, что называется **просветлением**, поскольку пропитывание указанными реагентами придает ткани полупрозрачный вид.

После завершения просветления ткань помещают в расплавленный парафин в термостат при температуре 52–60 °С, которая обеспечивает испарение просветляющего растворителя, что способствует **пропитыванию** ткани парафином. Затем ткань **заливают**, позволяя ей затвердеть при комнатной температуре в небольшой емкости с парафином. Ткани, которые должны быть залиты в пластиковые

смолы, также обезвоживают в этаноле, а затем пропитывают растворимыми пластическими смолами, которые затвердевают при добавлении сшивающих полимеризаторов. Заливка в пластические смолы позволяет избежать более высоких температур, необходимых для парафина, что помогает предотвратить искажение структуры тканей.

Затвердевший блок, содержащий ткань, окруженную заливочной средой, обрезают и помещают для приготовления срезов в прибор, называемый **микротомом** (см. рис. 1.1). Парафиновые срезы обычно изготавливают толщиной 3–10 мкм для световой микроскопии, но для электронной микроскопии нужны срезы толщиной менее 1 мкм. Один микрометр (1 мкм) равен 1/1000 миллиметра (мм), или  $10^{-6}$  м. Другими пространственными (линейными) единицами, обычно используемыми в микроскопии, являются нанометр (1 нм = 0,001 мкм =  $10^{-6}$  мм =  $10^{-9}$  м) и ангстрем (1 Å = 0,1 нм, или  $10^{-4}$  мкм). Срезы приклеивают к стеклянным предметным стеклам и окрашивают для световой микроскопии или помещают на металлические сетки для электронно-микроскопического окрашивания и исследования.

### » Медицинское значение

Биопсия — это получение кусочка (образца) ткани во время операции или обычных медицинских процедур. Материал, полученный в операционной путем биопсии (биоптат), фиксируют в емкости с формалином и подвергают обработке и микроскопическому анализу в патологоанатомической лаборатории. Если результаты таких анализов необходимы до завершения медицинской процедуры, например, чтобы узнать, является ли опухоль злокачественной, прежде чем операционная рана у пациента будет зашита, применяют гораздо более быстрый метод обработки материала. Биоптат быстро замораживают в жидком азоте, что сохраняет клеточные структуры и в то же время делает ткань твердой и пригодной к получению срезов. Для резки такого блока с тканью используют микротом, помещенный в шкаф с температурой ниже 0°, называемый **криостатом**. Замороженные срезы помещают на предметные стекла, быстро окрашивают, после чего патолог проводит их микроскопическое исследование.

Замораживание тканей также эффективно при гистохимических исследованиях очень чувствительных ферментов или мелких молекул, поскольку замораживание, в отличие от фиксации, не инактивирует большинство ферментов. Наконец, поскольку просветляющие реагенты часто растворяют клеточные липиды в фиксированных тканях, замороженные срезы также полезны, когда необходимо провести гистологическое изучение структур, содержащих липиды.

### Окрашивание

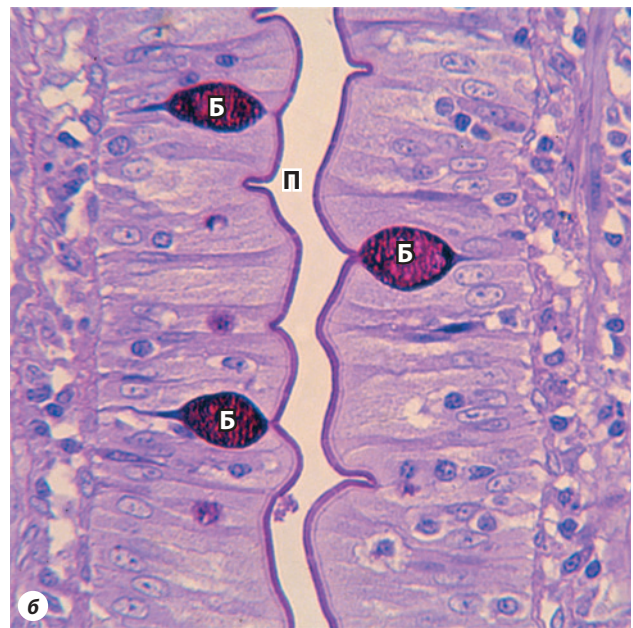
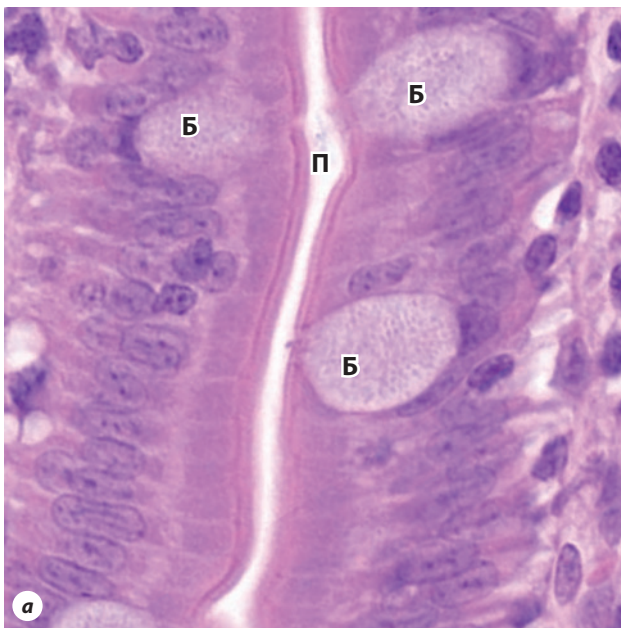
Большая часть клеток и внеклеточного материала полностью бесцветна, поэтому для микроскопии

ческого исследования срезы тканей должны быть окрашены. Разработаны методы окрашивания, которые делают различные компоненты ткани не только заметными, но и отличимыми друг от друга. Красители окрашивают материал более или менее избирательно, часто действуя подобно кислым или основным соединениям и образуя электростатические (солевые) связи с ионизируемыми радикалами макромолекул в тканях. Клеточные компоненты, такие как нуклеиновые кислоты, с общим отрицательным зарядом (анионные), имеют сродство к основным красителям и называются **базофильными**; катионные компоненты, такие как белки, со многими ионизированными аминогруппами, легче окрашиваются кислыми красителями и называются **ацидофильными**.

Примерами основных красителей являются толуидиновый синий, ализановый синий и метиленовый синий. Гематоксилин ведет себя как основной краситель, окрашивая базофильные компоненты ткани. Способность главных тканевых компонентов ионизироваться и вступать в реакции

с основными красителями обусловлена наличием в их составе кислот — дезоксирибонуклеиновой (ДНК), рибонуклеиновой (РНК) и гликозаминогликанов. Кислые красители (например, эозин, оранжевый G и кислый фуксин) окрашивают ацидофильные компоненты тканей, такие как митохондрии, секреторные гранулы и коллаген.

Из всех методов окрашивания чаще всего используют простую комбинацию гематоксилина и эозина (гематоксилин–эозин). Гематоксилин окрашивает ДНК в ядре клетки, богатые РНК участки цитоплазмы и матрикс хряща, придавая им темно-синий или фиолетовый цвет. Напротив, эозин окрашивает другие цитоплазматические структуры и коллаген в розовый цвет (рис. 1.2, *а*). В данном случае эозин рассматривают как **докраску** (контрастирующий краситель), которая обычно представляет собой один краситель, применяемый отдельно для выделения дополнительных признаков ткани. Более сложные методики, такие как трихромные окраски (например, трихром по Массону), позволяют более детально выявить



**Рис. 1.2.** Окраска гематоксилином и эозином и Шифф-йодной кислотой (ШИК-реакция, или PAS-реакция)

Микрофотографии эпителия, выстилающего тонкую кишку, препараты, окрашенные гематоксилином–эозином (*а*) и ШИК-реакцией на гликопротеины (*б*).

При использовании гематоксилина–эозина базофильные ядра клеток окрашиваются в фиолетовый цвет, а цитоплазма — в розовый. Участки клеток с обильными олигосахаридами, связанными с гликопротеинами, такие как края клеток, обращенные в просвет (*П*), или отдельные секреторные клетки (*Б*), окрашены слабо. При ШИК-реакции, однако, окраска клеток

наиболее интенсивна у просвета (*П*), где выступающие в него микроворсинки содержат заметный слой гликопротеинов. ШИК-реакция ярко окрашивает также богатые муцинами секреторные гранулы бокаловидных клеток. Гликопротеины клеточной поверхности и муцин являются ШИК-положительными (PAS-положительным) из-за высокого содержания в них олигосахаридов и полисахаридов соответственно. Окрашенные ШИК-реакцией ткани докрасены гематоксилином для выявления ядер клеток (*а* —  $\times 400$ ; *б* —  $\times 300$ )

различия между отдельными внеклеточными компонентами ткани.

**Реакция Шифф-йодная кислота (ШИК-реакция)** (англ. periodic acid–Schiff — PAS) позволяет выявить гексозные кольца полисахаридов и других богатых углеводами тканевых структур и отчетливо окрашивает такие макромолекулы в красно-фиолетовый или пурпурный цвет. На рис. 1.2, б показан пример клеток с богатыми углеводами участками, ярко окрашенными ШИК-реакцией. ДНК клеточных ядер может быть специфически окрашена с помощью модификации метода ШИК, называемой реакцией Фельгена.

Базофильный или ШИК-положительный материал может быть дополнительно идентифицирован с помощью ферментного переваривания — предварительной обработки среза ткани ферментом, который специфически переваривает один субстрат. Например, предварительная обработка рибонуклеазой существенно снижает цитоплазматическую базофилию при незначительном общем воздействии на ядро, что указывает на значение РНК в окраске цитоплазмы.

Богатые липидами структуры клеток выявляют, избегая тех стадий подготовки, которые удаляют липиды, таких как обработка теплом и органическими растворителями. Окрашивание проводят **жирорастворимыми красителями**, такими как **судан черный**, которые могут быть полезны в диагностике метаболических заболеваний, например, связанных с внутриклеточным накоплением холестерина, фосфолипидов или гликолипидов. Менее распространенные методы окрашивания могут включать импрегнацию металлами. Так, для выявления определенных волокон ВКМ и специфических клеточных элементов в нервной ткани часто используют растворы солей серебра. В Приложении перечислены важнейшие методики окрашивания, использованные при изготовлении большинства препаратов, представленных на световых микрофотографиях в этой книге.

Изготовление препарата, от фиксации ткани до его изучения с помощью светового микроскопа, может занять от 12 ч до 2,5 дня в зависимости от размера тканевого образца, характера заливочной среды и способа окрашивания. Последний шаг перед изучением препарата под микроскопом — заключение (монтаж) среза в прозрачную клеящую среду и помещение поверх него защитного покровного стекла.

## › СВЕТОВАЯ МИКРОСКОПИЯ

Обычная микроскопия в светлом поле и более специализированные методики, такие как флуо-

ресцентная, фазово-контрастная, конфокальная и поляризационная микроскопия — все они основаны на взаимодействии света с тканевыми компонентами и используются для выявления и изучения характеристик тканей.

## Микроскопия в светлом поле

С помощью **микроскопа светлого поля** исследуют окрашенные ткани, при этом через препарат проходит обычный свет. Как показано на рис. 1.3, микроскоп включает оптическую систему и механизмы для перемещения и фокусировки препарата. Оптическими компонентами являются **конденсор**, фокусирующий свет на объекте, подлежащем изучению; линза **объектива**, увеличивающая и проецирующая изображение объекта в направлении к наблюдателю; и **окуляр** (или окулярная линза), обеспечивающая дальнейшее увеличение этого изображения и его проекцию на сетчатку наблюдателя или на прибор с зарядовой связью (ПЗС), высокочувствительный к низким уровням освещенности и снабженный камерой и монитором. Общее увеличение получается путем умножения увеличительной способности линз объектива и окуляра.

Критическим фактором в получении четкого, детального изображения с помощью светового микроскопа служит его **разрешающая способность** (разрешение), определяемая как наименьшее расстояние между двумя структурами, на котором они видны как отдельные объекты. Максимальная разрешающая способность светового микроскопа составляет приблизительно 0,2 мкм; она обеспечивает хорошее изображение при увеличении 1000–1500 раз. Объекты, мельче или тоньше чем 0,2 мкм (такие как отдельная рибосома или цитоплазматический микрофиламент), при использовании этого прибора различить невозможно. Аналогичным образом две структуры, такие как митохондрии, будут выглядеть как единый объект, если разделяющее их расстояние составляет менее 0,2 мкм. Разрешающая способность микроскопа определяет качество его изображения — его четкость и богатство деталей и зависит главным образом от качества линзы его объектива. Увеличение ценно только в сочетании с высоким разрешением. Линзы объектива, дающие более высокое увеличение, обеспечивают также и более высокую разрешающую способность. Линза окуляра только увеличивает изображение, полученное с помощью объектива, и не улучшает разрешающую способность.

**Виртуальная микроскопия**, обычно используемая для изучения микроскопических препаратов в светлом поле, основана на преобразовании окрашенных препаратов тканей в цифровые изображения высокого разрешения. Она позволяет изучать



**Рис. 1.3.** Микроскоп светлого поля: компоненты и ход световых лучей

На фотографии светового микроскопа светлого поля показаны его механические детали и путь света от лампы освещения, расположенной под столиком, до глаза наблюдателя. Оптическая система состоит из трех комплектов линз.

- Конденсатор собирает и фокусирует конус света, который освещает предметное стекло на столике.
- Объективы увеличивают и проецируют освещенное изображение объекта на окуляр. Взаимозаменяемые объективы с различными увеличениями, обычно используемые в гистологии, включают  $\times 4$  для изучения большой площади (поля) ткани при низком увеличении;  $\times 10$  — для среднего увеличения меньшего поля;  $\times 40$  — для высокого увеличения более детальных областей.
- Два окуляра увеличивают это изображение еще в 10 раз и проецируют его наблюдателю; общее увеличение получается  $\times 40$ ,  $\times 100$  или  $\times 400$  (Использован с разрешения Nikon Instruments)

ткани с помощью компьютера или другого цифрового устройства в отсутствие реального окрашенного препарата или микроскопа. При этой методике участки препарата, лежащего на предметном стекле, «захватываются» цифровым устройством в виде сетки при различных увеличениях с помощью специализированного микроскопа, сканирующего препараты, и запоминаются в виде тысяч последовательных файлов изображений. Затем программное обеспечение преобразует этот набор данных для хранения на сервере, используя формат, который обеспечивает доступ, визуализацию и навигацию внутри исходного слайда с помощью обычных веб-браузеров или других устройств. Обладая преимуществами в стоимости и простоте применения, виртуальная микроскопия быстро заменяет световые микроскопы и коллекции стеклянных препаратов в лабораторных занятиях по гистологии для студентов.

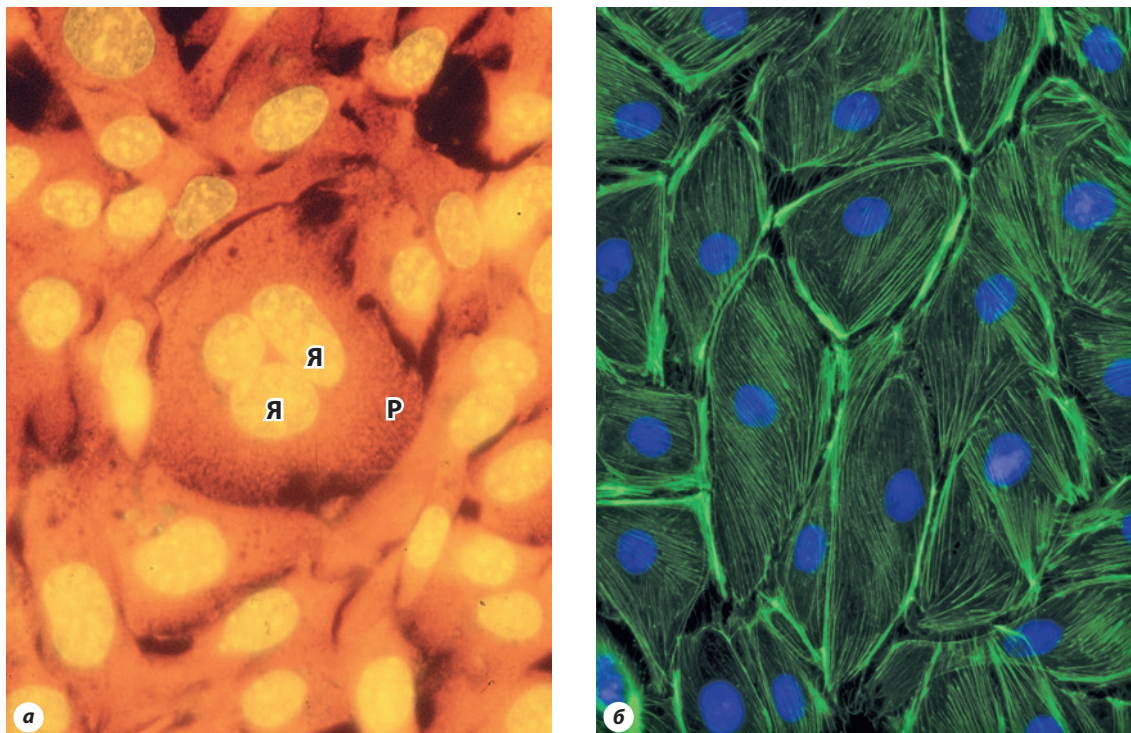
### Флуоресцентная микроскопия

Когда определенные вещества в клетке облучаются светом соответствующей длины волны, они излучают свет с большей длиной волны — явление, называемое **флуоресценцией**. При **флуоресцентной микроскопии** участки тканей обычно облучаются ультрафиолетовым (УФ) светом, а излучение происходит в видимой части спектра. Флуоресцентные вещества кажутся яркими на темном фоне. Прибор для флуоресцентной микроскопии содержит источник УФ или другого света и фильтры, которые отбирают лучи различных длин волн, испускаемые наблюдаемыми веществами.

В качестве флуоресцентных красителей могут быть применены флуоресцентные соединения, имеющие сродство к специфическим клеточным макромолекулам. Примером может служить акридиновый оранжевый, который связывается как с ДНК, так и с РНК. При наблюдении под флуоресцентным микроскопом эти нуклеиновые кислоты испускают несколько иную флуоресценцию, что позволяет локализовать их в клетках по отдельности (рис. 1.4, а). Другие соединения, такие как DAPI (4',6-диамино-2-фенилиндол) и краситель Hoechst, специфически связываются с ДНК и используются для окрашивания клеточных ядер, испуская характерную синюю флуоресценцию под УФ-излучением. Еще одно важное применение флуоресцентной микроскопии заключается в присоединении таких веществ, как флуоресцеин, к молекулам, которые специфически связываются с определенными клеточными компонентами и таким образом позволяют идентифицировать эти структуры под микроскопом (рис. 1.4, б). Антитела, меченные флуоресцентными соединениями, чрезвычайно важны при иммуногистологическом окрашивании (см. раздел «Визуализация конкретных молекул»).

### Фазово-контрастная микроскопия

Неокрашенные клетки и срезы тканей, которые обычно прозрачны и бесцветны, можно изучать с помощью этих модифицированных световых микроскопов. Клеточные детали обычно трудно увидеть в неокрашенных тканях потому, что все части образца имеют примерно одинаковую оптическую



**Рис. 1.4.** Строение клеток при флуоресцентной микроскопии

Компоненты клеток часто окрашивают соединениями, видимыми при флуоресцентной микроскопии.

(а) Акридиновый оранжевый связывается с нуклеиновыми кислотами, в результате чего ДНК в ядрах (Я) клеток почечного канальца излучает желтый свет, а богатая РНК цитоплазма (Р) — оранжевый.

(б) Культивируемые клетки, окрашены DAPI (4', 6-диамино-2-фенилиндолом), который связывается с ДНК, и флуоресцеин фаллоидином, который связывается с

актиновыми нитями. Видны ядра, дающие синюю флуоресценцию, и актиновые нити, окрашенные в зеленый цвет. Хорошо заметны важные особенности строения клеток, такие как большая плотность микрофиламентов на периферии клетки (обе микрофотографии сделаны при  $\times 500$ )

(Рис. 1.4, б использован с разрешения докторов Клэр Е. Валчак и Рания Ризк, медицинский факультет Университета Индианы, Блумингтон, США)

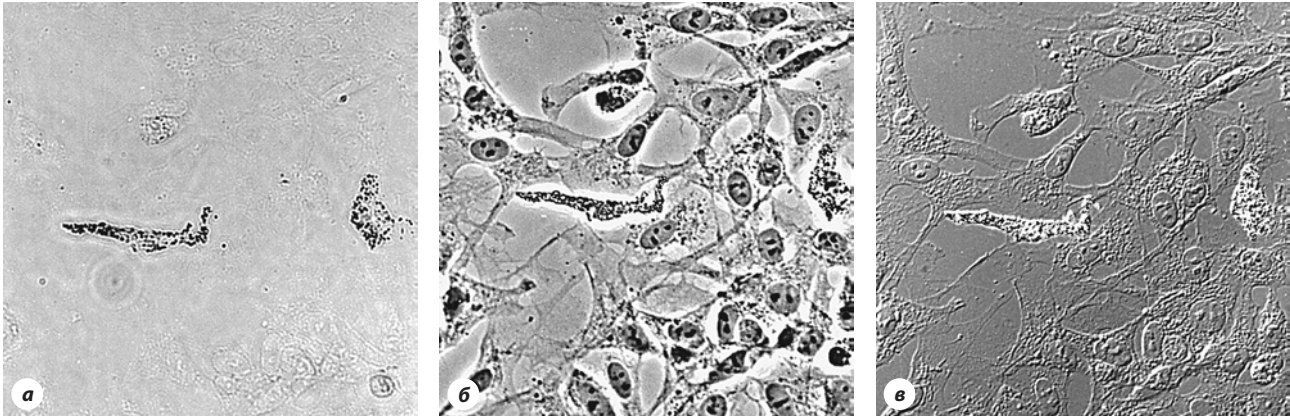
плотность. Для **фазово-контрастной микроскопии**, однако, применяют систему линз, которая дает видимые изображения прозрачных объектов и, что важно, может быть использована для изучения живых, культивируемых клеток (рис. 1.5).

Фазово-контрастная микроскопия основана на принципе изменения скорости света при прохождении через клеточные и внеклеточные структуры с различными показателями преломления. Эти изменения используют в системе фазового контраста, в которой одни структуры выглядят светлее, а другие — темнее друг относительно друга. Фазово-контрастные микроскопы представляют собой важные приборы во всех лабораториях культивирования клеток, поскольку они позволяют исследовать клетки без фиксации или окрашивания. Модификацией фазово-контрастной микроскопии является дифференциальная интерференционная контрастная микроскопия с оптикой Номарского, которая

дает изображение живых клеток с более очевидным трехмерным (3D) эффектом (рис. 1.5, в).

### Конфокальная микроскопия

При использовании обычного микроскопа со светлым полем пучок света относительно велик и заполняет образец. Рассеянный (избыточный) свет снижает контрастность изображения и ухудшает разрешающую способность линзы объектива. Конфокальная микроскопия (рис. 1.6) позволяет избежать этих проблем и достичь высокого разрешения и резкой фокусировки, используя небольшой точечный источник высокоинтенсивного света, часто излучаемого лазером, и пластину с точечным отверстием перед детектором изображения. Точечный источник света, фокусная точка объектива и точечная апертура детектора оптически сопряжены или выровнены друг с другом в фокальной (конфокальной) плоскости, причем несфокусированный свет не проходит через точечное отверстие.



**Рис. 1.5.** Внешний вид неокрашенных клеток при трех типах световой микроскопии

Живые клетки нервного гребня, растущие в культуре, имеют неодинаковый вид при различных методах световой микроскопии. Здесь *одно и то же поле* неокрашенных клеток, включая две дифференцируемые пигментные клетки, показано с использованием трех различных методов (все микрофотографии получены при  $\times 200$ ):

**(а) микроскопии в светлом поле** — без фиксации и окрашивания видны только две пигментные клетки;

**(б) фазово-контрастной микроскопии** — границы клеток, ядра и цитоплазматические структуры с различными показателями преломления по-разному влияют на син-

фазный свет и дают изображение этих структур во *всех* клетках;

**(в) дифференциальной интерференционной контрастной микроскопии** — детали клеточного строения выделяются по-другому при использовании оптики Номарского. Фазово-контрастную микроскопию с дифференциальной интерференцией или без нее широко используют для наблюдения живых клеток, растущих в культуре тканей

*(Использовано с разрешения доктора Шерри Роджерс, кафедры клеточной биологии и физиологии, Университет Нью-Мексико, Альбукерке, Нью-Мексико)*

Это значительно улучшает разрешение объекта в фокусе и позволяет локализовать компоненты образца с гораздо большей точностью, чем при применении микроскопа со светлым полем.

Конфокальные микроскопы включают компьютерную зеркальную систему (светоделитель) для автоматического и быстрого перемещения точки освещения по образцу. Цифровые изображения, снятые во многих отдельных точках в очень тонкой плоскости фокусировки, используют для получения «оптического сечения» этой плоскости. Создание таких оптических сечений в серии фокальных плоскостей сквозь образец позволяет провести их цифровую реконструкцию в 3D-изображение.

### Поляризационная микроскопия

Поляризационная микроскопия позволяет распознавать окрашенные или неокрашенные структуры, состоящие из высокоорганизованных субъединиц. Когда нормальный свет проходит через **поляризационный** фильтр, он выходит, колеблясь только в одном направлении. Если второй фильтр помещен в микроскоп над первым, причем его главная ось перпендикулярна первому фильтру, то свет через него не проходит. Однако если между двумя поляризационными фильтрами расположены тканевые компоненты, содержащие ориентированные макромолекулы, то их повторяющиеся элементы

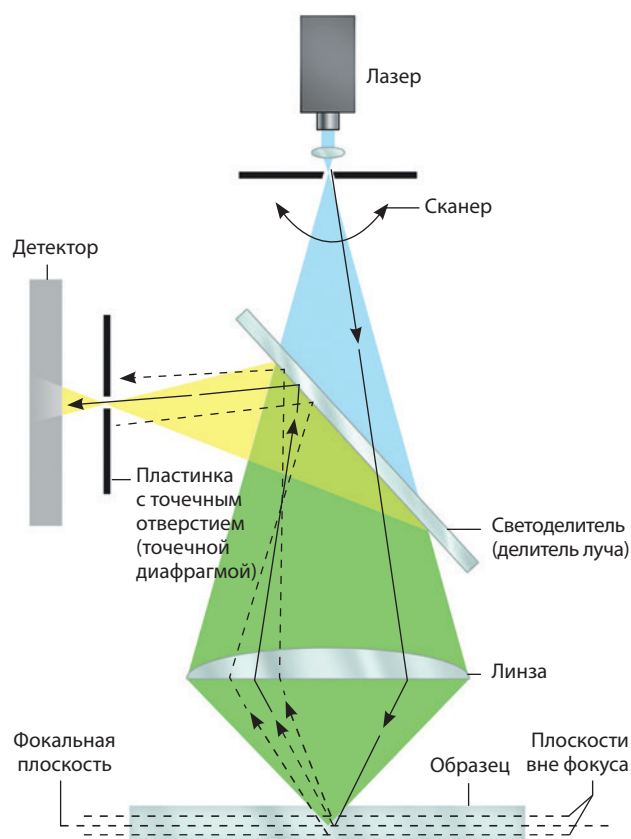
вращают ось света, выходящего из поляризатора, и они выглядят как яркие структуры на темном фоне (рис. 1.7). Способность вращать направление колебаний поляризованного света называется **двулучепреломлением (двойным лучепреломлением)** и является характерной чертой кристаллических соединений или веществ, содержащих высоко ориентированные молекулы, такие как целлюлоза, коллаген, микротрубочки и актиновые филаменты.

Эффективность всех методов световой микроскопии очень сильно повысилась за счет использования цифровых камер. Многие детали оцифрованных гистологических изображений можно проанализировать количественно, применяя соответствующее программное обеспечение. Возможно также улучшение качества таких изображений, в результате чего объекты, непосредственно невидимые через окуляры, могут быть изучены на мониторе.

## ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Трансмиссионные и сканирующие электронные микроскопы основаны на взаимодействии компонентов ткани с пучками электронов. Длина волны в электронном пучке намного короче, чем длина волны света, что позволяет увеличить разрешение в 1000 раз.



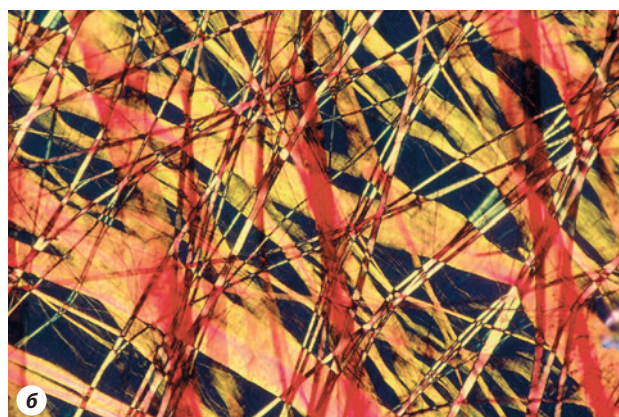
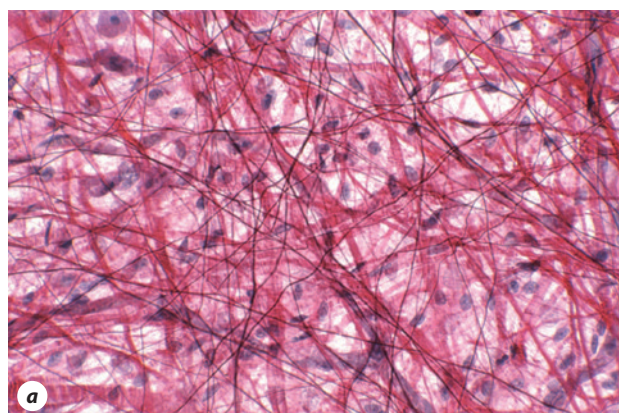


**Рис. 1.6.** Принцип конфокальной микроскопии

При данном методе микроскопии очень маленькое пятно света, исходящее из одной плоскости среза, проходит через мелкое отверстие и достигает регистрирующего устройства (детектора), а лучи, исходящие из других плоскостей, блокируются шторкой. Таким образом, одновременно в фокус попадает только одна очень тонкая плоскость образца. На схеме показано расположение узлов конфокального микроскопа. Свет от лазерного источника попадает на образец и отражается от него. Светоделиитель направляет отраженный свет в точечное отверстие и детектор. Свет, отраженный от компонентов образца, которые находятся выше или ниже фокальной плоскости, блокируется шторкой. Лазер сканирует образец таким образом, что можно наблюдать его большую площадь

## Трансмиссионная электронная микроскопия

**Трансмиссионный**, или просвечивающий, электронный микроскоп (ТЭМ) — это система визуализации изображения, которая обеспечивает разрешение около 3 нм. Такое высокое разрешение позволяет изучать детали строения изолированных частиц при увеличении до 400 тыс. раз. Как правило, с помощью ТЭМ изучают очень тонкие



**Рис. 1.7.** Вид ткани при использовании микроскопии в светлом поле и поляризационной микроскопии

Поляризационная световая микроскопия дает изображение только материала, имеющего повторяющуюся, периодическую макромолекулярную структуру; участки, не обладающие такой структурой, не видны. Кусочки тонкой, не подвергнутой резке брыжейки окрашивали красным пикросириусом, орсеином и гематоксилином, помещали на предметные стекла и наблюдали с помощью микроскопии в светлом поле (а) и поляризационной (б) микроскопии: (а) при микроскопии в светлом поле коллагеновые волокна выглядят красными, а тонкие эластические волокна и ядра клеток — более темными (×40); (б) при поляризационной микроскопии видны только коллагеновые волокна, которые обладают интенсивным желтым или оранжевым двулучепреломлением (а — ×40; б — ×100)

(40–90 нм) срезы тканей, залитых в смолу, при увеличении примерно до 120 тыс. раз.

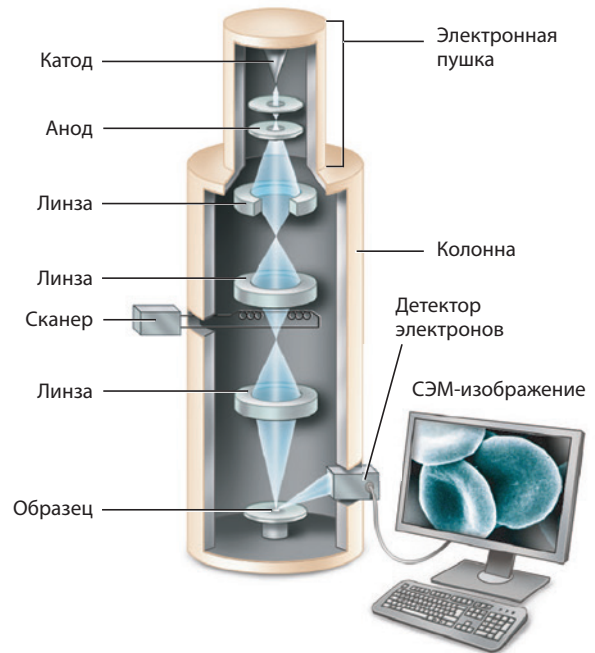
На рис. 1.8, а показаны компоненты ТЭМ и объяснены основные принципы его работы: пучок электронов, сфокусированный с помощью электромагнитных «линз», проходит через срез ткани и дает изображение, включающее участки, окрашенные в черный, белый цвета и промежуточные оттенки серого. Эти области электронной микрофотографии соответствуют участкам ткани, через которые

электроны проходили легко (они имеют более светлый, электронно-прозрачный вид), и участкам, где электроны поглощались или отклонялись (выглядят темнее — имеют более высокую электронную плотность). Для улучшения контраста и разрешения

ТЭМ в фиксирующие или дегидратирующие растворы, используемые для подготовки тканей, часто добавляют соединения с **ионами тяжелых металлов**. К ним относятся тетроксид (четырёхокись) осмия, цитрат свинца и соединения уранила, которые



а



б

**Рис. 1.8.** Электронные микроскопы

Электронные микроскопы — это крупные приборы, обычно размещаемые в специализированных электронно-микроскопических лабораториях.

(а) Схематическое изображение основных компонентов трансмиссионного электронного микроскопа, компоновка которого напоминает перевернутый вверх дном световой микроскоп. В колонне микроскопа в условиях вакуума металлическая (обычно вольфрамовая) нить накала (катод) сверху испускает электроны, которые перемещаются к аноду с ускоряющим напряжением между 60 и 120 кВ. Электроны, проходящие через отверстие в аноде, формируют луч, который подвергается **электромагнитной фокусировке** циркулярными электрическими катушками, аналогично тому, как оптические линзы воздействуют на свет.

Первая линза представляет собой конденсор, фокусирующий луч на срезе. Некоторые электроны взаимодействуют с атомами в этом срезе, поглощаясь или рассеиваясь ими в разной степени, в то время как другие просто передаются через образец без какого-либо взаимодействия. Электроны, достигающие линзы объектива, формируют изображение, которое затем увеличивается, и в конечном счете проецируются на флуоресцентный экран или прибор с зарядовой связью — монитор и камеру.

На изображении, полученном с помощью трансмиссионного электронного микроскопа, участки образца, через которые проходят электроны, выглядят светлыми (элек-

тронно-прозрачными), в то время как более плотные области или те, которые связывают ионы тяжелых металлов во время подготовки образца, поглощают или отклоняют электроны, имеют вид темных (электронно-плотных) участков. Именно поэтому такие изображения всегда содержат зоны, которые окрашиваются в черный, белый цвета и оттенки серого.

(б) Сканирующий электронный микроскоп обладает многими признаками, сходными с признаками трансмиссионного электронного микроскопа. Однако в сканирующем электронном микроскопе сфокусированный электронный луч не проходит через образец, а вместо этого последовательно перемещается (сканирует) от точки к точке по всей его поверхности подобно тому, как электронный луч сканирует телевизионную трубку или экран. Образцы для сканирующего электронного микроскопа покрывают атомами металла, с которыми взаимодействует пучок электронов, производя отраженные электроны и вновь испускаемые вторичные электроны. Все они улавливаются детектором, передаются в усилители и обрабатываются, в результате на экране компьютера получается черно-белое изображение. Сканирующий электронный микроскоп дает изображение только поверхности покрытого напылением образца, но они обладают поразительным 3D, затененным качеством. Содержимое органов или клеток можно анализировать после получения срезов, открывающих их внутренние поверхности.

связываются с клеточными макромолекулами, повышая их электронную плотность и различимость.

**Замораживание-скальвание (криофрактография)** и **замораживание-травление** — это методы, которые позволяют изучать клетки под ТЭМ без фиксации или заливки. Они оказались особенно полезными при изучении структуры мембран. При использовании этих методов очень маленькие образцы тканей быстро замораживают в жидком азоте, а затем разрезают или раскалывают ножом. В вакууме создается реплика замороженной открытой поверхности путем испарения и нанесения на нее тонких слоев платины или атомов других металлов. После удаления органического материала реплику поверхности скола можно исследовать под ТЭМ. В мембранах случайные плоскости скола часто расщепляют липидные бислои, обнажая белковые компоненты, размер, форму и распределение которых трудно изучить другими методами.

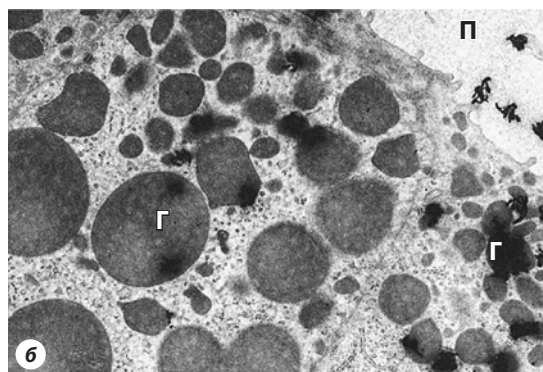
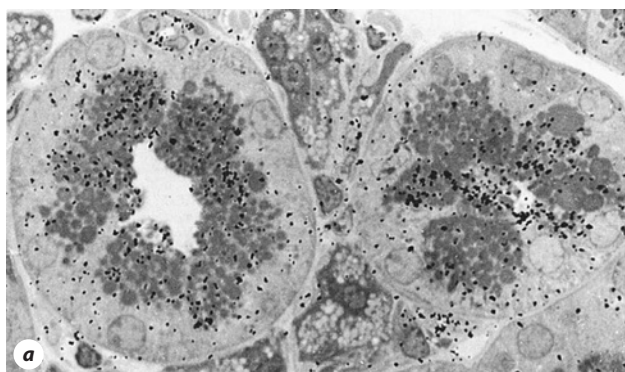
### Сканирующая электронная микроскопия

Сканирующая электронная микроскопия позволяет получить изображение поверхности клеток, тканей и органов с высоким разрешением. Как и в ТЭМ, в сканирующем электронном микроскопе образуется и фокусируется очень узкий пучок

электронов, но в нем он не проходит сквозь образец (рис. 1.8, б). Вместо этого поверхность образца сначала высушивают и путем напыления покрывают очень тонким слоем тяжелого металла (часто золота), который отражает электроны луча, сканирующего образец. Отраженные электроны улавливаются детектором, производя сигналы, которые обрабатываются и преобразуются в черно-белое изображение. Изображения, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа, обычно легко интерпретировать, потому что они имеют вид трехмерных структур, которые кажутся освещенными таким же образом, как и большие объекты, — на них выявляются ярко освещенные участки и тени.

### АВТОРАДИОГРАФИЯ

Микроскопическая **авторадиография** — это метод локализации вновь синтезированных макромолекул в клетках или тканевых срезах. Метаболиты, меченные радиоактивными изотопами (нуклеотиды, аминокислоты, сахара), поступающие в живые клетки, включаются в специфические макромолекулы (ДНК, РНК, белки, гликопротеины и полисахариды) и испускают слабое излучение, ограниченное теми участками, где расположены молекулы. Препараты с клетками или срезами



**Рис. 1.9.** Микроскопическая авторадиография

Авторадиографы — это препараты тканей, в которых частицы, называемые **зернами серебра**, указывают на клетки или области клеток, в которых были синтезированы специфические макромолекулы непосредственно перед фиксацией. Показаны авторадиографы слюнной железы мыши, которой вводили  $^3\text{H}$ -фукозу за 8 ч до фиксации ткани. Фукоза включилась в олигосахариды, а свободная  $^3\text{H}$ -фукоза была удалена во время фиксации и получения срезов железы. Авторадиографическая обработка и микроскопия позволяют выявить расположение вновь синтезированных гликопротеинов, содержащих этот сахар.

(а) Черные зерна серебра из светочувствительного материала, нанесенного на образец, видны над областями клеток с секреторными гранулами и протоком, указывая на расположение гликопротеинов ( $\times 1500$ ).

(б) В той же ткани, подготовленной для авторадиографии, при помощи трансмиссионного электронного микроскопа видны серебряные зерна в виде свернутых или аморфных структур, также расположенные главным образом над гранулами (Г) и в просвете железы (П) ( $\times 7500$ ) (Рис. 1.9, б использован с разрешения докторов Тициано Г. Лима и А. Антонио Хаддада, Медицинская школа, Рибейран-Прету, Бразилия)

тканей, меченными изотопами, покрывают в фотолаборатории фотоэмульсией, в которой кристаллы бромида серебра действуют как микродетекторы излучения — точно так же, как они реагируют на свет в фотопленке. После достаточного времени пребывания в светонепроницаемых коробках препараты «проявляют» как фотоснимки. Кристаллы бромида серебра, восстановленные излучением, образуют мелкие черные зерна металлического серебра, которые под световым микроскопом или ТЭМ указывают на расположение меченных радиоактивными изотопами макромолекул в ткани (рис. 1.9).

С помощью автордиографии открывается доступ к большому объему гистологической информации. Если используется радиоактивный предшественник ДНК (например, тимидин, меченный тритием), можно узнать, какие клетки в ткани (и сколько их) реплицируют ДНК и готовятся к делению. Могут быть проанализированы также и динамические процессы. Например, если требуется узнать, где в клетке вырабатывается белок, секретируется ли он и каков его путь в клетке до момента выделения, нескольким животным вводят радиоактивную аминокислоту и исследуют ткани спустя разное время после инъекции. Автордиография тканей, полученных последовательно через определенные интервалы времени, укажет на миграцию радиоактивных белков.

## » КУЛЬТУРА КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

Клетки и ткани можно сохранять в живом состоянии и исследовать вне организма в культуре (*in vitro*). В организме (*in vivo*) клетки омываются жидкостью, производной плазмы крови и содержащей множество различных молекул, необходимых для выживания и роста. Культура клеток позволяет непосредственно наблюдать за поведением клеток под фазово-контрастным микроскопом, причем многие эксперименты, технически невыполнимые на интактных животных, могут быть осуществлены в условиях *in vitro*.

Клетки и ткани выращивают в сложных растворах с известным составом (соли, аминокислоты, витамины), к которым добавляют сыворотку или специфические факторы роста. Клетки, подлежащие культивированию, выделяют из ткани или органа механическим или ферментным воздействием и помещают в стерильных условиях в прозрачную чашку, где они прилипают, как правило, в виде одного слоя (см. рис. 1.5). Такие препараты называются **первичными клеточными культурами**. Некоторые клетки могут сохраняться *in vitro* в течение длительных периодов времени,

потому что они становятся бессмертными и образуют постоянную **клеточную линию**. Большинство клеток, полученных из нормальных тканей, имеют конечную, генетически запрограммированную продолжительность жизни. Однако некоторые изменения (частично связанные с онкогенами; см. главу 3) могут способствовать бессмертию клеток в результате процесса, называемого **трансформацией**, похожего на начальные изменения в нормальной клетке, которая превращается в раковую. Совершенствование технологии культивирования и использование специфических факторов роста теперь позволяют поддерживать *in vitro* большинство типов клеток.

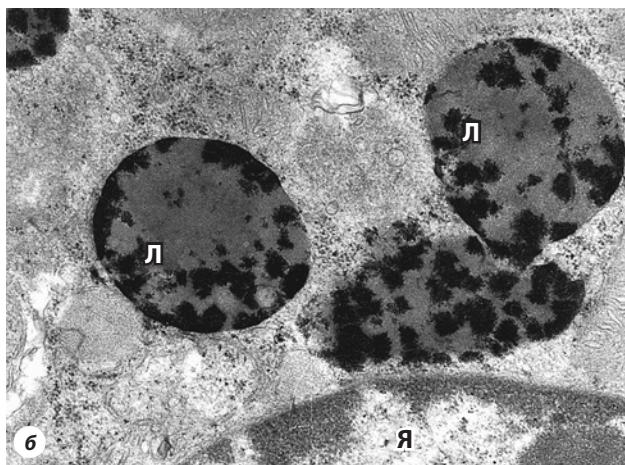
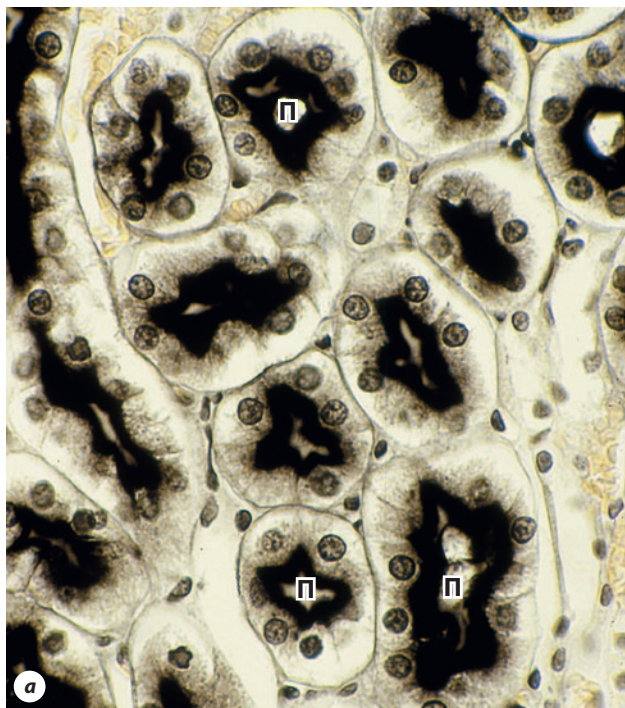
Как показано в главе 2, инкубация живых клеток *in vitro* с множеством недавно полученных флуоресцентных соединений, которые изолируются и метаболизируются в определенных отделах клетки, обеспечивает новый подход к пониманию как структурного, так и физиологического значения этих компартментов. Другие гистологические методы исследования, применяемые к культивируемым клеткам, оказались особенно эффективными для понимания расположения и функций микротрубочек, микрофиламентов и других компонентов цитоскелета.

### » Медицинское значение

Клеточная культура очень широко используется для изучения молекулярных изменений, которые встречаются при раке, для анализа вызывающих инфекции вирусов, микоплазм и некоторых простейших, а также для проведения многих стандартных генетических или хромосомных анализов. Опухолевые клетки, полученные от пациентки с раком шейки матки, которую позже идентифицировали как Генриетту Лакс, умершую от этой болезни в 1951 г., были использованы для создания одной из первых клеточных линий, названной **клетками HeLa**. Она до сих пор применяется во всем мире для исследования структуры и функций клеток.

## » ГИСТОХИМИЯ ФЕРМЕНТОВ

**Гистохимия ферментов** (или цитохимия) — это метод обнаружения клеточных структур путем выявления специфической ферментной активности, присутствующей в этих структурах. Для сохранения эндогенных ферментов при использовании гистохимических методов обычно берут незафиксированные или мягко фиксированные ткани, которые режут на криостате, чтобы избежать неблагоприятного воздействия тепла и органических растворителей на активность ферментов. В гистохимии ферментов: 1) срезы ткани погружают в раствор, содержащий субстрат фермента, который требуется локализовать; 2) фермент



**Рис. 1.10.** Гистохимия ферментов

(а) Микрофотография поперечных срезов почечных канальцев, обработанных гистохимически с целью выявления щелочной фосфатазы (с максимальной активностью при щелочном рН). Высокая активность этого фермента обнаруживается на апикальных поверхностях клеток вблизи просвета (П) канальцев (×200).

(б) Изображение, полученное с помощью трансмиссионного электронного микроскопа, клетки почки, в которой гистохимически выявлена кислая фосфатаза в трех лизосомах (Л) вблизи ядра (Я). Темным веществом внутри этих структур является фосфат свинца, который осаждается в участках активности кислой фосфатазы (×25 000)

(Рис. 1.10, б использован с разрешения доктора Эдуардо Качбуряна, кафедра морфологии, Федеральный университет Сан-Паулу, Бразилия)

взаимодействует со своим субстратом; 3) на срез затем воздействуют маркером, вступающим в реакцию с продуктом действия фермента на субстрат; 4) конечный продукт маркера, который должен быть нерастворим и виден при световой или электронной микроскопии, образует осадок в области расположения ферментов, указывая на их локализацию.

Ниже приведены примеры ферментов, которые могут быть обнаружены гистохимически<sup>1</sup>:

- **фосфатазы**, удаляющие фосфатные группы из макромолекул (рис. 1.10);
- **дегидрогеназы**, переносящие ионы водорода с одного субстрата на другой, например, многие ферменты цикла лимонной кислоты (Кребса); возможно проведение гистохимической идентификации этих ферментов в митохондриях;
- **пероксидаза**, способствующая окислению субстратов с переносом ионов водорода на перекись водорода.

#### »» Медицинское значение

Многие методы ферментной гистохимии применяют в медицинской лаборатории, включая реакцию Перлса с прусским синим на железо (используют для диагностики нарушений обмена железа, гемохроматоза и гемосидероза), реакции на полисахариды с ШИК-амилазой и альциановым синим (для выявления гликогеноза и мукополисахаридоза), а также реакции на липиды и сфинголипиды (для выявления сфинголипидоза).

### » ВИЗУАЛИЗАЦИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ

Специфическую макромолекулу, присутствующую в срезе ткани, можно также идентифицировать с помощью меченых соединений или макромолекул, которые *специфически* связываются с интересующей молекулой. Соединения, которые взаимодействуют с искомой молекулой, должны быть видны под световым или электронным микроскопом, что часто достигается их маркированием с помощью обнаруживаемой метки. Наиболее распространенными маркерами служат флуоресцентные соединения, радиоактивные атомы, которые могут быть обнаружены с помощью автордиографии, молекулы пероксидазы или других ферментов, выявляемые гистохимически, и металлические (обычно золотые) частицы, которые можно увидеть с помощью световой и электронной микроскопии. Эти методы могут быть использованы для обнаружения и локализации специфических сахаров, белков и нуклеиновых кислот.

<sup>1</sup> Гистохимические реакции, приводимые автором, не относятся к гистохимии ферментов. — Примеч. ред. перев.

Ниже приведены примеры молекул, которые специфически взаимодействуют с другими молекулами.

- **Фаллоидин** — соединение, выделенное из гриба *Amanita phalloides*, активно взаимодействует с актиновым белком микрофиламентов.
- **Белок А**, выделенный из бактерий золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*), связывается с Fc-участком молекул антител и поэтому может быть использован для локализации естественных или внесенных антител, связанных с клеточными структурами.
- **Лектины** — гликопротеины, полученные главным образом из семян растений, связываются с углеводами с высокой аффинностью и специфичностью. Различные лектины присоединяются к специфическим сахарам или последовательностям остатков сахара, что позволяет применять флуоресцентно меченные лектины для окрашивания определенных гликопротеинов или других макромолекул, содержащих специфические последовательности остатков сахара.

## Иммуногистохимия

Примером высокоспецифического взаимодействия между макромолекулами является связывание антигена со специфическим антителом. По этой причине меченые антитела обычно используют в **иммуногистохимии** для идентификации и локализации многих специфических белков, а не только тех, ферментативная активность которых может быть продемонстрирована гистохимически.

Иммунные клетки организма взаимодействуют с другими макромолекулами, называемыми антигенами, которые распознаются как «чужеродные», не являющиеся нормальной частью организма и потенциально опасные, в ответ на это взаимодействие иммунные клетки вырабатывают **антитела** к этим антигенам. Антитела относятся к **иммуноглобулиновому** семейству гликопротеинов и секретируются лимфоцитами. Эти молекулы обычно специфически связываются с антигенами, которые вызвали их выработку, и способствуют их элиминации из организма.

Иммуногистохимические методы, широко применяемые как в исследовательских, так и в диагностических целях, основаны на использовании антител к белку, который необходимо обнаружить. Это означает, что белок должен быть предварительно очищен с помощью биохимических или молекулярных методов, чтобы можно было получить к нему антитела. Для получения антител к белку *x* индивидуумов определенного вида (например, человека или крысы) выделенный белок вводят животному

другого вида (например, кролику или козе). Если аминокислотная последовательность белка отличается настолько, что животное распознает его как чужеродный, то есть как антиген, — животное будет вырабатывать антитела к этому белку.

Различные группы (клоны) лимфоцитов у животного, которому инъецировали белок *x*, распознают различные его части, и каждый клон вырабатывает антитела к этой части. Все антитела, выделенные из плазмы животного, представляют собой смесь **поликлональных антител**, каждое из которых способно связываться с различными участками белка *x*.

Однако можно также ввести белок *x* мышам, а через несколько дней выделить активированные лимфоциты и поместить их в культуру. Рост и активность этих клеток можно продлить до бесконечности путем их слияния с лимфоцитарными опухолевыми клетками для получения гибридных клеток. Отдельные клоны-гибридомы производят различные антитела к нескольким частям белка *x*, и каждый клон может быть выделен и культивирован отдельно, так что различные антитела к белку *x* можно собрать по отдельности. Каждое из таких антител является **моноклональным**. Преимущество использования моноклонального антитела вместо поликлональных антител заключается в том, что его можно отобрать по высокой специфичности и способности прочно связываться с выявляемым белком при меньшем неспецифическом связывании с другими белками, похожими на представляющий интерес белок.

В иммуногистохимии срез ткани, который предположительно содержит выявляемый белок, инкубируют в растворе, содержащем антитела (моноклональные или поликлональные) к этому белку. Антитела специфически связываются с белком, и после промывания среза расположение белка в ткани или клетке можно увидеть с помощью светового или электронного микроскопа посредством визуализации антител. Антитела обычно маркируются флуоресцентными соединениями, пероксидазой или щелочной фосфатазой для гистохимического выявления или электронно-плотными частицами золота для их обнаружения под ТЭМ.

Как показано на рис. 1.11, существуют **прямые** и **непрямые иммуногистохимические методы**. При прямом методе используют лишь меченые антитела, которые связываются с выявляемым белком.

Непрямой иммуногистохимический метод включает последовательное нанесение двух антител и дополнительные этапы промывки. Антитело, специфически связывающееся с искомым белком (первичное), не содержит метки. Выявляемая метка связана со **вторичным антителом**, полученным

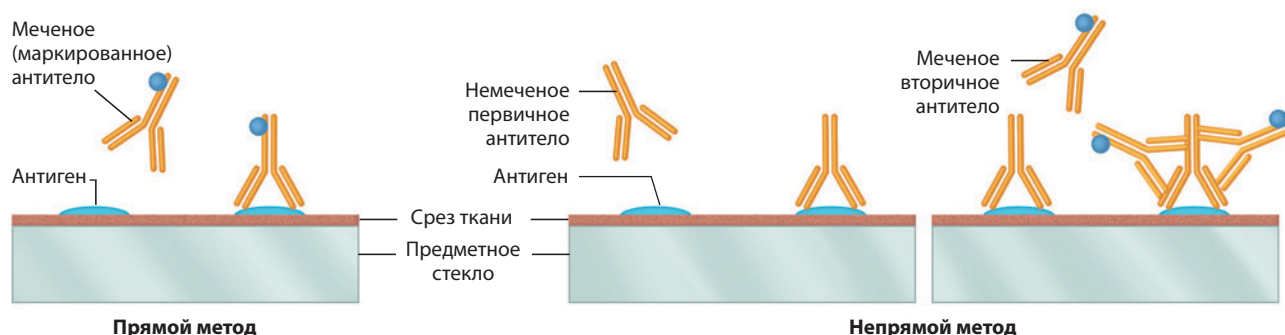


Рис. 1.11. Методы иммуноцитохимии

Имуноцитохимические (или иммуногистохимические) методы могут быть прямыми или непрямыми. При **прямом иммуноцитохимическом методе** (слева) используют антитело, полученное к искомому тканевому белку и непосредственно связанное с меткой, такой как флуоресцентное соединение или пероксидаза. Когда на предметное стекло со срезом ткани помещают эти меченые антитела, они специфически связываются с белком (антигеном), к которому они были выработаны, затем их можно визуализировать соответствующим методом.

При **непрямом иммуноцитохимическом методе** (справа) используют сначала **первичное антитело**, полученное к искомому белку (антигену), которое на-

носят на срез ткани для его связывания со специфическим антигеном. Потом получают **меченое вторичное антитело**, которое было (1) выработано у животного другого вида к иммуноглобулиновым белкам (антителам) того вида, у которого были получены первичные антитела, (2) маркировано флуоресцентным соединением или пероксидазой. Когда меченое вторичное антитело наносят на срез ткани, оно специфически связывается с первичными антителами, непрямым путем маркируя на срезе искомый белок. Поскольку с каждой молекулой первичного антитела могут связываться несколько меченых вторичных антител, маркировка искомого белка при применении непрямого метода усиливается

у животного другого вида, отличающегося от того, что вырабатывало первичное антитело. Например, первичные антитела, вырабатываемые лимфоцитами мыши (как большинство моноклональных антител), специфически распознаются и связываются антителами, полученными у кролика или козы, которым вводили иммуноглобулины мышинных антител.

Непрямой метод более широко применяют в научных исследованиях и при изучении патологического материала, потому что он более чувствителен, причем добавочный уровень связывания антител способствует усилению визуально выявляемого сигнала. Более того, один и тот же набор меченых вторичных антител может быть использован в исследованиях с различными первичными антителами (специфичными для различных антигенов), если все они проводятся на тех же видах. Существуют и другие не прямые методы, которые основаны на использовании иных промежуточных молекул, например, биотин-авидиновая методика, — все они связаны с усилением выявленных сигналов.

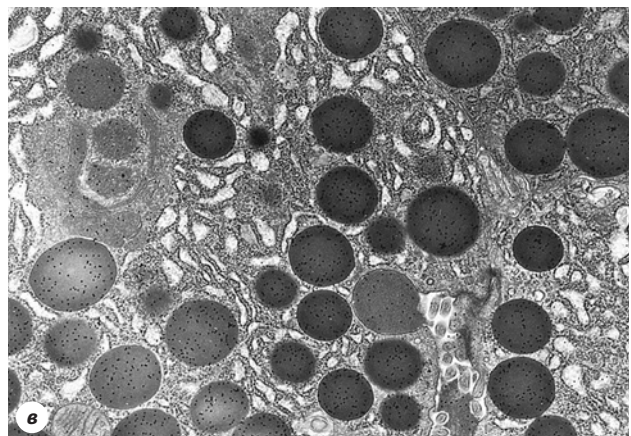
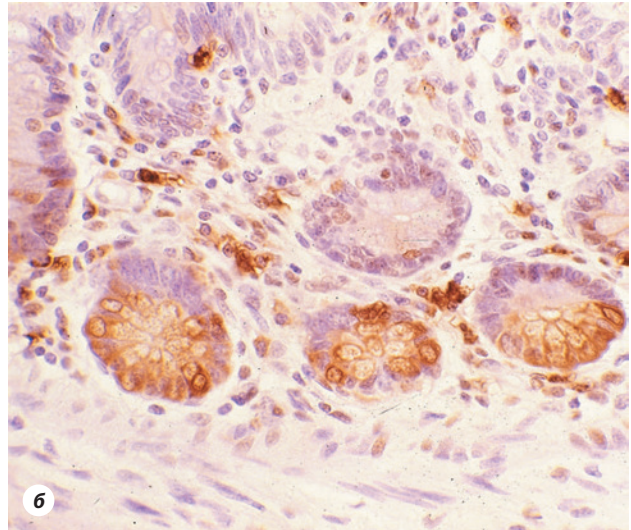
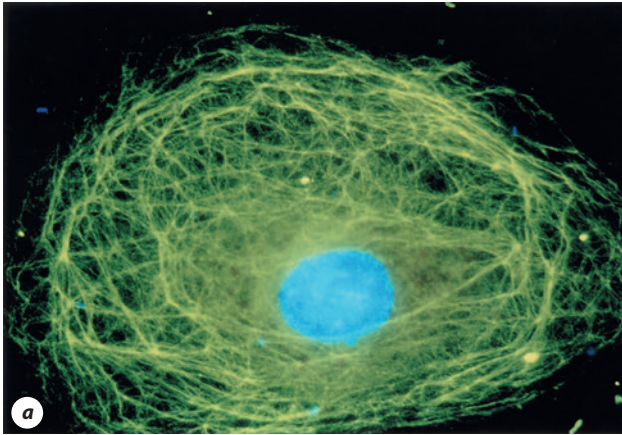
Примеры применения не прямых иммуноцитохимических методов приведены на рис. 1.12, демонстрирующем использование этого метода на клетках в культуре и на срезах тканей как для световой микроскопии, так и трансмиссионной электронной микроскопии.

### » Медицинское значение

Поскольку клетки при некоторых заболеваниях, в том числе и многие раковые клетки, часто производят белки, уникальные для конкретного патологического состояния, иммуногистохимические методы могут использоваться патологами для диагностики многих заболеваний, в том числе отдельных видов опухолей и некоторых клеток, зараженных вирусами. В табл. 1.1 показаны некоторые примеры применения иммуноцитохимических методов, распространенные в клинической практике.

### Методы гибридизации

**Гибридизацией** обычно называют специфическое связывание двух одиночных нитей нуклеиновой кислоты, которое возникает в соответствующих условиях, если нити являются комплементарными. Чем больше сходство нуклеотидных последовательностей, тем легче комплементарные нити образуют «гибридную» двойную молекулярную нить. Гибридизация в жестких условиях дает возможность специфической идентификации последовательностей в генах или РНК. Это может происходить с клеточной ДНК или РНК, когда последовательности нуклеиновых кислот в растворе наносят непосредственно на подготовленные клетки и участки тканей — такая процедура называется **гибридизацией *in situ*** (ISH).



**Рис. 1.12.** Клетки и ткани, окрашенные иммуногистохимическим методом

Иммуноцитохимические методы локализации специфических белков могут применяться на препаратах либо для световой микроскопии, либо для трансмиссионной электронной микроскопии с использованием различных меток.

(а) В одной культивированной клетке матки окрашивание флуоресцентным красителем позволяет выявить сеть промежуточных филаментов (зеленого цвета) по всей цитоплазме. Используются первичные антитела к белку десмину филаментов и меченные изотиоцианатом флуоресцеина (FITC) вторичные антитела в непрямом методе окрашивания, причем ядро было докрашено в синий цвет с помощью DAPI (×650).

(б) Срез тонкой кишки, инкубированный с антителами к ферменту лизоциму. Затем наносили вторичные антитела, меченные пероксидазой, которую выявляли гистохимически с субстратом пероксидазы 3,3'-диаминобензидином (DAB). На локализацию белка указывает коричневый цвет продукта реакции. Метод демонстрирует лизоцимсодержащие структуры в рассеянных макрофагах и в больших скоплениях клеток. Ядра докрашены гематоксилином (×100).

(в) Препарат, окрашенный с помощью трансмиссионной электронной микроскопии: срез клеток поджелудочной железы, инкубированный с антителом к ферменту амилазе, а затем с белком А, связанным с частицами золота. Белок А обладает высоким сродством к молекулам антител, поэтому полученное

изображение указывает на присутствие амилазы посредством частиц золота в виде очень маленьких черных точек, локализованных над плотными секреторными гранулами и формирующимися гранулами (слева). Меченый белок А, специфичный по отношению к молекулам иммуноглобулина, может быть использован для локализации любого первичного антитела (×5000)

(Рис. 1.12, в использован с разрешения доктора Мойза Бендаяна, кафедра патологии и клеточной биологии, Монреальский университет, Монреаль, Канада)

**Таблица 1.1.** Примеры специфических антигенов, имеющих диагностическое значение

| Антигены                         | Диагноз   |
|----------------------------------|---|
| Специфические цитokerатины       | Опухоли эпителиального происхождения  |
| Белковые и полипептидные гормоны | Некоторые эндокринные опухоли   |
| Раковозембриональный антиген     | Железистые опухоли, главным образом пищеварительного тракта и молочной железы |
| Рецепторы стероидных гормонов    | Опухоли клеток протоков молочной железы                                       |
| Антигены, продуцируемые вирусами | Специфические вирусные инфекции   |