

*И. П. Григорьев, Е. А. Колос, Е. Г. Сухорукова, Д. Э. Коржевский*

## СОВРЕМЕННЫЕ ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТКАНЕВОГО ЖЕЛЕЗА, ОСНОВАННЫЕ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ РЕАКЦИИ ПЕРЛСА

Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (зав. — д-р мед. наук Д. Э. Коржевский), отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

В статье представлена информация о современных модификациях реакции Перлса с усилением диаминобензидином по R. Meguro и соавт. (для разных тканей), M. A. Smith и соавт. (для нервной ткани), S. M. Levine (для выявления железа в олигодендроцитах и миелиновых нервных волокнах) и собственном варианте, предназначенном для выявления ядрышкового железа. Проведен анализ преимуществ и недостатков указанных модификаций гистохимического определения железа. Показано, что использование новых методических приемов существенно повышает чувствительность реакции Перлса. Постановка контрольных процедур позволяет исключить возможность артефактов.

**Ключевые слова:** железо, гистохимия, реакция Перлса, нервная ткань, ядрышко

Железо является самым распространённым микроэлементом, входящим в состав различных белков организма человека и животных. Роль железа во многих жизненно важных процессах определяется его включением в состав гемовых простетических групп хромопротеинов, участвующих в обеспечении клеток кислородом (гемоглобина, миоглобина, нейроглобина, цитохромов дыхательной цепи). Существует и негемовая фракция железа, которая связана с белками, обеспечивающими его транспорт и депонирование в тканях (ферритин, трансферрин, ферропортин), а также железо (преимущественно в виде железосерных кластеров), входящее в состав огромного количества ферментов, катализирующих различные реакции цикла Кребса, синтеза и распада нейромедиаторов, липидов, углеводов и нуклеиновых кислот [4, 15, 18, 19]. При распаде железосодержащих белков образуется так называемое свободное, или ионизированное железо. Оно обладает высокой химической активностью и катализирует образование свободных радикалов, вызывающих повреждение клеток. В нервной системе негативное влияние реакций, катализируемых ионизированным железом, связывают с развитием нейродегенеративных заболеваний [5, 7, 13, 21]. Излишнее накопление железа в различных органах отмечено при некоторых заболеваниях (например, гемохроматозе, гемосидерозе, болезнях Альцгеймера и Паркинсона), а также при старении [17, 20, 21]. В связи с этим методы гистохимического определения железа широко используются как в диагностических, так и в исследовательских целях.

Одним из первых гистохимических методов определения железа был метод, предложенный в 1867 г. М. Перлсом (реакция образования берлинской лазури) [14]. Эта методика позволяет выявлять связанное с белками (но не гемовое) железо (III) — так называемое окисное железо. Позже были

предложены сульфидный метод (реакция Квинке), метод выявления «закисного» железа (II) по Тирману — Шмельцеру [9, 16], гематоксилиновый метод Маллори [10], динитрорезорциновый метод Хамфри [6] и ряд других. Несмотря на разнообразие методик, реакция Перлса до настоящего времени остается наиболее часто используемым методом выявления железа в гистологических срезах. Это обусловлено высокой специфичностью реакции и простотой ее постановки.

В последние годы получили распространение модификации реакции Перлса, основанные на открытом в 1980 г. [12] эффекте пероксидазо-подобной активности продукта реакции Перлса — берлинской лазури. В России эти методы малоизвестны, а их положительные и отрицательные особенности не всегда могут быть правильно оценены при изучении только литературных источников. В связи с этим цель настоящего исследования состояла в изложении особенностей новых методов гистохимического определения железа и оценки их достоинств на основании собственного опыта их использования.

Наиболее распространенным и простым гистохимическим способом выявления железа является постановка реакции Перлса на парафиновых срезах.

Основа метода состоит в реакции образования берлинской лазури в присутствии  $\text{Fe}^{3+}$ .

В 1979 г. при изучении распределения двух нейротрейсеров, одним из которых был комплекс железа с декстраном, а другим — пероксидаза [3], было обнаружено, что продукт реакции Перлса (берлинская лазурь) способен взаимодействовать с бензидином, изменяя цвет пигмента с синего на черно-коричневый. В специальном исследовании было показано, что обнаруженный эффект обусловлен пероксидазо-подобными свойствами берлинской лазури [12]. При этом

### Сведения об авторах:

Григорьев Игорь Павлович (e-mail: ipg-iem@yandex.ru), Колос Елена Андреевна, Сухорукова Елена Геннадьевна (e-mail: len48@inbox.ru), Коржевский Дмитрий Эдуардович (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

происходит существенное усиление оптической плотности продукта гистохимической реакции и повышается ее чувствительность. Новый принцип усиления чувствительности реакции Перлса, предложенный J. Nguyen-Legros и соавт. [12] для обнаружения экзогенного железа, введенного в качестве нейротрейсера, в дальнейшем был использован в нескольких модификациях гистохимического метода, предназначенного для выявления эндогенного железа в гистологических срезах.

1. Вариант метода интенсификации продукта реакции Перлса, предложенный R. Meguro и соавт. [11].

Для фиксации материала эти исследователи рекомендуют использовать 4% параформальдегид, приготовленный на 0,1 М фосфатном буфере. Парафиновые срезы исследуемой ткани депарафинируют, подвергают регидратации и инкубируют в 1% растворе калия ферроцианида (гексацианоферрат калия, желтая кровяная соль,  $K_4[Fe(CN)_6]$ ) при pH 5,5–6 в течение 30 мин. Для ингибирования эндогенной активности пероксидазы и каталазы, а также с целью блокирования псевдопероксидазной активности эритроцитов материал промывают и обрабатывают метанолом, содержащим 0,01 М  $NaN_3$  и 0,3%  $H_2O_2$  в течение 60 мин. Далее после промывания в 0,1 М фосфатно-солевом буфере (ФСБ, pH 5,5) срезы обрабатывают раствором 0,1 М ФСБ, содержащим 0,025% 3,3'-диаминобензидина (ДАБ) и 0,005%  $H_2O_2$  в течение 30 мин. Останавливают реакцию путем промывания срезов в дистиллированной воде [11].

2. Вариант метода интенсификации продукта реакции Перлса, предложенный M.A. Smith и соавт. [17].

С целью повышения чувствительности реакции Перлса авторы рекомендуют применять растворы ферроцианида калия и соляной кислоты в повышенной концентрации, увеличить время инкубации до 1 ч при 37 °C или до 15 ч при комнатной температуре. Для данного варианта рекомендуется использовать фиксацию материала формалином. Методика состоит в следующем. После депарафинирования и регидратации исследуемые срезы инкубируют в течение 15 ч в 3% растворе соляной кислоты, содержащем 7% калия ферроцианида (для обнаружения железа III). После промывки срезов в 0,1 М ФСБ материал обрабатывают 0,1 М ФСБ, содержащим ДАБ (0,75 мг/мл) и 0,015%  $H_2O_2$  в течение 5–10 мин [17].

3. Вариант метода интенсификации продукта реакции Перлса, предложенный S.M. Levine [8].

Данный вариант реакции Перлса был предложен специально для выявления железа в олигодендрocyтах и миелиновых нервных волокнах. После депарафинирования и регидратации срезы инкубируют 30 мин при комнатной температуре в 0,1 М ФСБ, содержащем натрия борогидрид ( $NaBH_4$ ) в концентрации 10 мг/мл, что существенно уменьшает фоновое окрашивание без изменения структуры ткани. Далее препараты промывают в ФСБ и инкубируют при комнатной температуре 20 мин в растворе протеиназы К в 0,1 М ФСБ (30 мг/мл) с добавлением 0,1% Тритона X-100. После промывки препаратов в ФСБ их инкубируют в 0,125 Н HCl, содержащем 1% ферроцианида калия и 1% Тритона X-100 в течение 30 мин, промывают в 0,1 М ФСБ и погружают на 12 мин в раствор 1 мг ДАБ в 5 мл 0,01 М Tris HCl буфера (pH 7,6) с добавлением 10 мкл 30%  $H_2O_2$ . Далее исследуемые препараты промывают в 0,1 М ФСБ [8].

4. Вариант метода интенсификации продукта реакции Перлса, используемый для выявления внутриядерного железа в нервных клетках [1, 2].

В данном варианте рекомендуется использовать при фиксации материала цинк-этанол-формальдегид [2]. Фиксация в

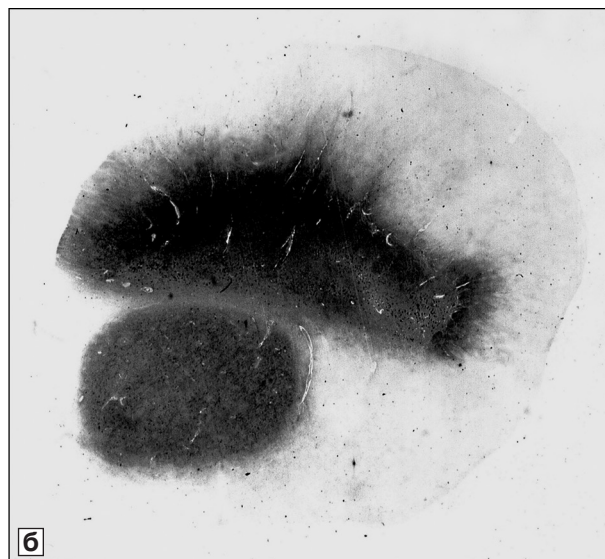
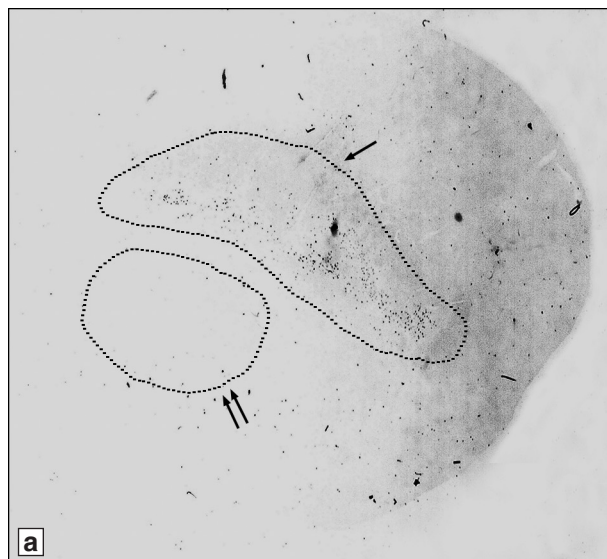
96% этаноле допустима, но дает менее убедительные результаты. Фиксация в формалине нежелательна.

После удаления парафина и регидратации срезы следует поместить в емкость с 3% перекисью водорода на 10 мин, затем промыть в дистиллированной воде 3–5 мин. Обработка срезов перекисью водорода позволяет, с одной стороны, дополнительно увеличить интенсивность гистохимической реакции [1], а с другой — заблокировать активность эндогенной пероксидазы. Предположительно, увеличение интенсивности классической реакции Перлса после обработки срезов перекисью водорода достигается за счет перехода негемового железа II в железо III, которое обнаруживается при проведении этой гистохимической реакции.

Далее обрабатывают срезы в свежеприготовленной смеси равных объемов 2% водного раствора ферроцианида калия (желтой кровяной соли) и 0,2 Н соляной кислоты. Инкубацию проводят 30 мин при комнатной температуре. Этот этап обработки соответствует классической реакции Перлса. После постановки реакции Перлса препараты тщательно промывают в дистиллированной воде (3 порции по 3–5 мин). После этого на срезы наносят рабочий раствор хромогена 3,3'-ДАБ, который готовят с использованием коммерческих двухкомпонентных наборов, например, DAB+ (Dako, Дания), DAB 2-Component (Spring Bioscience, США). По достижении оптимальной интенсивности окраски контрольного препарата (заведомо содержащего железо III или гемосидерин), что происходит обычно через 10–15 мин, хромоген смывают в 3 порциях дистиллированной воды. В результате реакции с бензидиновым хромогеном значительные скопления железа, которые имели синюю окраску после постановки классической реакции Перлса, приобретают черную окраску. Небольшие скопления железа, невидимые после постановки классической реакции Перлса, окрашиваются в коричневый цвет. Для докраски может быть использован 0,1–0,5% водный раствор астрового синего.

Данный вариант усиления реакции Перлса, хотя и рекомендован для выявления ядрышкового железа в нервных клетках, может быть использован и для обнаружения любых других скоплений негемового железа. Иллюстрация сравнительной чувствительности обычного варианта реакции Перлса и реакции Перлса с усилением ДАБ представлена на рисунке.

Все приведенные методы отличаются очень высокой чувствительностью. Если учесть, что классическая реакция Перлса (без дополнительного усиления) является одним из наиболее чувствительных методов определения тканевого негемового железа [9], то реакция Перлса с усилением ДАБ по чувствительности вообще не имеет аналогов [11]. Эта положительная черта, однако, в отдельных случаях может оказаться недостатком. В первую очередь, это касается выявления достаточно больших скоплений негемового железа (например железа в макрофагах на месте кровоизлияния). Применение реакции Перлса в этом случае не нужно. Усиление ДАБ может смазать четкую картину, получаемую при реакции образования берлинской лазури, а иногда и «зачернить» всю исследуемую область препарата. В то же время, когда ведется поиск небольших скоплений негемового железа, усиление необходимо. В качестве контрольных процедур, применяемых для подтверждения надежности методики, может быть использована постановка реакции Перлса в усиленном и обычном варианте на соседних срезах. Это позволит четко дифференцировать структуры как с большим содержанием негемового железа, так и с малым.



Два последовательных среза фрагмента среднего мозга (сгus cerebri) мужчины 73 лет.

Стрелка — область расположения черного вещества; две стрелки — область расположения красного ядра. а — гистохимическая реакция на Fe III — реакция Перлса; б — гистохимическая реакция на Fe III — реакция Перлса с усилением диаминобензидином. Изображение получено путем сканирования исходных препаратов с помощью устройства Epson Stylus Photo RX640. Ув. 8

Одним из существенных недостатков метода усиления ДАБ является изменение цвета реакции с синего на коричневый. Поскольку синие эндогенные пигменты в тканях лабораторных животных и человека отсутствуют, берлинская лазурь определяется в препаратах очень хорошо. Коричневый же продукт усиленной реакции, если его довольно мало, при отсутствии опыта легко перепутать с формалиновым осадком, меланином, липофусцином, которые имеют сходную окраску. Для исключения такой возможности рекомендуется использовать контроль в виде неокрашенного среза изучаемого материала. Чтобы избежать ложноположительных результатов реакции, необходимо готовить все используемые растворы на дистиллированной воде и не допускать контакта материала с растворами солей железа.

В заключение следует заметить, что гистохимическая реакция Перлса и различные варианты ее усиления ДАБ позволяют выявить только негемовое железо в форме железа III. Более полное выявление железа с использованием этой реакции достигается при предварительном окислении «закисного» железа (II) в растворе перекиси водорода [1]. Однако общее количество железа в тканях (включая гемовую и негемовую формы) не может быть определено гистохимическими методами. Для количественного определения металлов в биологических образцах следует использовать методы атомно-абсорбционной спектроскопии и масс-спектрометрии.

Таким образом, гистохимические методы выявления тканевого железа, основанные на использовании реакции Перлса и усилении оптической плотности продукта этой реакции при помощи ДАБ, являются довольно простыми и высокочувствительными методами, которые при постановке соответствующих контрольных реакций позволяют надежно определять минимальные скопления негемового железа в гистологических препаратах.

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-15-00014).*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д. Э., Сухорукова Е. Г., Григорьев И. П. Распределение железа в микроанатомических структурах черного вещества головного мозга человека // Журн. неврол. и психиатр. 2013. Т. 113, № 6. С. 70–73.
2. Сухорукова Е. Г., Григорьев И. П., Колос Е. А., Коржевский Д. Э. Ядрышко клетки — место накопления железа в нейронах черного вещества головного мозга человека // Морфология. 2012. Т. 142, вып. 6. С. 61–63.
3. Cesaro P., Nguyen-Legros J., Berger B. et al. Double labelling of blanched neurons in the central nervous system of the rat by retrograde axonal transport of horseradish peroxidase and iron dextran complex // Neurosci. Lett. 1979. Vol. 15, № 1. P. 1–7.
4. Connor J. R., Menzies S. L. Relationship of iron to oligodendrocytes and myelination // Glia. 1996. Vol. 17. P. 83–93.
5. Gille G., Reichmann H. Iron-dependent functions of mitochondria — relation to neurodegeneration // J. Neural. Transm. 2011. Vol. 118, № 3. P. 349–359.
6. Humphrey A. A. Dinitrosoresorcinol — a new specific stain for iron in tissues // Arch. Path. 1935. Vol. 20. P. 256–258.
7. Robb-Gaspers S. J., Connor J. R. Metals and Oxidative Damage in Neurological Disorders. New York: Plenum Press, 1997.
8. Levine S. M. Oligodendrocytes and myelin sheaths in normal, quaking and shiverer brains are enriched in iron // J. Neurosci. Res. 1991. Vol. 29, № 3. P. 413–419.
9. Lison L., Gérard P. Histochemie Animale: Méthodes et Problèmes. Paris: Gauthier-Villars, 1936.
10. Mallory F. B. Pathological Technique. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1938.
11. Meguro R., Asano Y., Odagiri S. et al. Nonheme-iron histochemistry for light and electron microscopy: a historical, theoretical and technical review // Arch. Histol. Cytol. 2007. Vol. 70, № 1. P. 1–19.
12. Nguyen-Legros J., Bizot J., Bolesse M., Pulicani J.-P. Noir de diaminobenzidine: une nouvelle méthode histochemique de

- r  velation du fer exog  ne // Histochemistry. 1980. Vol. 66, № 3. P. 239–244.
13. Outten F.W., Theil E.C. Iron-based redox switches in biology // Antioxid. Redox. Signal. 2009. Vol. 11, № 5. P. 1029–1046.
  14. Perls M. Nachweis von Eisenoxid in gewissen Pigmenten // Virch. Arch. Path. Anat. 1867. Bd. 39, H. 1. S. 42–48.
  15. Pinero D.J., Connor J.R. Iron in the brain: an important contributor in normal and diseased states // Neuroscientist. 2000. Vol. 6. P. 435–453.
  16. Quincke H.J.   ber das Verhalten der Eisensalze im Tierk  rper // Arch. Anat. Phys. 1868. Bd. 35. S. 756–757.
  17. Smith M.A., Harris P.L., Sayre L.M., Perry G. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. Vol. 94, № 18. P. 9866–9868.
  18. Stehling O., Vashisht A.A., Mascarenhas J. et al. MMS19 assembles iron-sulfur proteins required for DNA metabolism and genomic integrity // Science. 2012. Vol. 337. P. 195–199.
  19. White M.F., Dillingham M.S. Iron-sulphur clusters in nucleic acid processing enzymes // Curr. Opin. Struct. Biol. 2012. Vol. 22, № 1. P. 94–100.
  20. Youdim M.B., Stephenson G., Ben Shachar D. Ironing iron out in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases with iron chelators: a lesson from 6-hydroxydopamine and iron chelators, desferal and VK-28 // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2004. Vol. 1012. P. 306–325.

21. Zecca L., Youdim M.B.H., Riederer P. et al. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders // Nat. Rev. Neurosci. 2004. Vol. 5, № 11. P. 863–873.

Поступила в редакцию 15.04.2015

## CURRENT HISTOCHEMICAL METHODS OF TISSUE IRON DEMONSTRATION BASED ON PERLS' REACTION

*I.P. Grigoriyev, Ye.A. Kolos, Ye.G. Sukhorukova, D.E. Korzhevskiy*

The article presents the information on the modern modifications of Perls' reaction including diaminobenzidine enhancement according to R. Meguro (for various tissues), M.A. Smith (for nervous tissue), S.M. Levine (for detection of iron in oligodendrocytes and myelinated nervous fibers), and our own modification for visualization of the nucleolar iron. The analysis is performed of the advantages and disadvantages of these modifications of histochemical demonstration of iron. It is shown that the use of new methodological approaches significantly increases the sensitivity of Perls' reaction. Control procedures allow to eliminate the possibility of artifacts.

**Key words:** *iron, histochemistry, Perls' reaction, nervous tissue, nucleolus*

Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAS Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg