

15. Sperling L. C. An atlas of hair pathology with clinical correlations. N. Y.: The Parthenon Publishing Group, 2003. P. 2–39.
16. Stenn K. Exogen is an active, separately controlled phase of the hair growth cycle // J. Am. Acad. Dermatol. 2005. Vol. 52. P. 374–375.
17. Tobin D. J. Human hair pigmentation — biological aspects // Intern. J. Cosmetic. Sci. 2008. Vol. 30. P. 233–257.
18. Tobin D. J., Gunin A., Magerl M. et al. Plasticity and cytokinetic dynamics of the hair follicle mesenchyme: implications for hair growth control // J. Invest. Dermatol. 2003. Vol. 120, № 3. P. 895–904.
19. Van Neste D., Leroy T., Conil S. Exogen hair characterization in human scalp // Skin Res. Technol. 2007. Vol. 13, № 4. P. 436–443.

Поступила в редакцию 15.12.2015
Получена после доработки 05.02.2016

METHODS OF MORPHOLOGICAL IDENTIFICATION OF THE HAIR FOLLICLE CYCLE PHASES

G. V. Trunova^{1, 2}, V. I. Nozdrin¹

This paper analyzes the characteristics of the structure of the hair follicles (HF) at various stages of the cycle of hair growth. The study was conducted on autopsy material of the scalp in women of middle age. The morphological description of the anagen, catagen and telogen HFs is illustrated with the photomicrographs of histological sections of HFs in different planes and supplemented by the appropriate schemes.

Key words: hair follicle cycle, anagen, catagen, telogen

¹ Scientific Department, «Retinoids» Pharmaceutical Research and Manufacturing Enterprise, Moscow; ² Laboratory of Inflammation Immunomorphology, Research Institute of Human Morphology, Moscow

© Коллектив авторов, 2016
УДК 578.65

В. В. Гусельникова¹, О. В. Кирик¹, Е. А. Федорова¹, М. М. Шавловский^{1, 2}, А. Я. Гудкова²,
Д. Э. Коржевский^{1, 2}

БЫСТРЫЙ СПОСОБ ОКРАСКИ АМИЛОИДА КОНГО КРАСНЫМ ДЛЯ СВЕТОВОЙ И ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

¹ Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (руков. — д-р мед. наук Д. Э. Коржевский), отдел общей и частной морфологии, Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург; ² лаборатория кардиомиопатий (зав. — проф. А. Я. Гудкова), Институт сердечно-сосудистых заболеваний, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова

Цель настоящей работы состояла в оптимизации гистохимического метода окраски амилоида, основанного на использовании конго красного. Материалом для исследования служили образцы миокарда левого желудочка сердца, взятые у людей с посмертно диагностированным амилоидозом миокарда. Показано, что положительное влияние на качество окрашивания амилоида оказывает процедура предварительного нагревания срезов в жидкости, особенно с кислым pH. Разработанный протокол окрашивания позволяет получить препараты, характеризующиеся высокой контрастностью окраски амилоида на световом уровне, а также высокой интенсивностью его флюоресценции. Преимуществом представленного протокола являются также значительное сокращение общей продолжительности окраски, увеличение устойчивости специфического окрашивания амилоида и отсутствие неспецифического фонового окрашивания.

Ключевые слова: амилоид, конго красный, гистохимия, флюоресцентная микроскопия

Отложения амилоида в тканях нередко являются признаком возрастных изменений, а в ряде случаев свидетельствуют и о наличии патологического процесса. При этом происходит формирование особых внеклеточных агрегатов фибриллярных форм некоторых белков [3, 6]. Для выяв-

ления скоплений амилоида предложены несколько гистохимических методов, среди которых наиболее часто используемым является окраска конго красным [1, 2]. Данный способ выявления амилоида, основанный на регистрации зеленого свечения амилоидных скоплений, окрашенных конго крас-

Сведения об авторах:

Гусельникова Валерия Владимировна, Кирик Ольга Викторовна (e-mail: olga_kirik@mail.ru), Федорова Елена Анатольевна, Шавловский Михаил Михайлович, Коржевский Дмитрий Эдуардович (e-mail: dek2@yandex.ru), лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, 197376, Санкт-Петербург ул. Акад. Павлова, 12

Гудкова Александра Яковлевна, лаборатория кардиомиопатий, Институт сердечно-сосудистых заболеваний, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, 197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6–8

ным, в поляризованном свете, обладает высокой специфичностью, однако имеет ряд существенных недостатков. Среди них можно отметить непостоянство зеленого оттенка амилоидных скоплений и большую общую продолжительность процедуры окрашивания, которая составляет не менее 2 ч, не считая времени на предварительную подготовку рабочих растворов. Кроме того, общепринятая методика окраски амилоида по Беннхольду [4] предполагает дифференцировку срезов в 80% этаноле после окрашивания конго красным. Продолжительность дифференцировки варьирует и, как следствие, процедура требует непрерывного наблюдения под микроскопом и потому не может быть автоматизирована. Подобрать единый по времени режим дифференцировки, необходимый для сохранения специфичности окраски, не представляется возможным, что, в свою очередь, часто приводит к сохранению на срезах неспецифического окрашивания. Наконец, рекомендованное для данной методики заключение препаратов в полистирол, предполагающее их обезвоживание в этаноле восходящей концентрации и просветление в ксилоле, усиливает выраженность остаточной неспецифической окраски, значительно ухудшая качество препаратов.

В связи с этим целью данной работы стало совершенствование метода окраски амилоида конго красным для сокращения общей продолжительности процедуры и увеличения устойчивости специфического окрашивания амилоида.

Исследование проведено на образцах миокарда левого желудочка сердца у 5 людей (мужчин и женщин) с посмертно диагностированным амилоидозом миокарда из архива лаборатории кардиомиопатий Института сердечно-сосудистых заболеваний Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова. Образцы были фиксированы в 10% растворе формалина и после стандартной гистологической проводки залиты в парафин по общепринятой методике. С парафиновых блоков делали срезы толщиной 5 мкм. Для выявления амилоида использовали 1% водный раствор конго красного (Sigma-Aldrich, США). Ядра клеток окрашивали гематоксилином Джилла (БиоВитрум, Россия).

В ходе отработки методики окрашивания нами были испробованы разные подходы. Все они предполагали окрашивание срезов раствором конго красного без последующей обработки в растворе карбоната лития и дифференцировки в 80% этаноле (как в случае окраски по Беннхольду). Часть срезов сразу после депарафинирования обрабатывали раствором красителя, в то время как другие — подвергали предварительному нагреванию

в различных жидкостях — дистиллированной воде, 2% растворе уксусной кислоты или специальном буфере S1700 (Dako, Дания), используемом в иммуногистохимических исследованиях для теплового демаскирования антигена. В качестве среды для заключения также были испробованы разные варианты, среди которых перманентная среда Cytoseal (Thermo Scientific, США), флюоресцентная среда Fluorescence Mounting Medium и среда Ultramount Aqueous Permanent Mounting Medium (Dako, Дания). Использование среды Cytoseal предполагает предварительное обезвоживание срезов в этаноле и просветление их в ксилоле, в то время как заключение в Fluorescence Mounting Medium или Ultramount Mounting Medium производится после промывки срезов в дистиллированной воде (без проведения препаратов через этанол и ксилол). Ultramount Mounting Medium (в отличие от двух других вариантов сред), согласно инструкции производителя, применяется без последующего заключения под покрывное стекло.

Сравнение полученных результатов окрашивания и заключения срезов, включающее как оценку окрашивания с использованием метода световой микроскопии, так и оценку интенсивности флюоресценции, позволило представить оптимальный протокол окраски амилоида.

1. Удалить парафин и регидратировать срезы обычным способом.

2. Промыть срезы в дистиллированной воде (2 мин).

3. Удалить избыток жидкости фильтровальной бумагой и нанести на срезы необходимое количество 2% раствора уксусной кислоты. Чтобы жидкость не растекалась по предметному стеклу, рекомендуется нарисовать специальным фломастером (Dako Pen) гидрофобный круг вокруг срезов.

4. Нагреть стекло со срезами и раствором уксусной кислоты над пламенем спиртовки до появления мелких пузырьков (приблизительно 95–99 °С), после чего незамедлительно переместить предметное стекло в подогретую до 50–60 °С дистиллированную воду и промывать в течение 3 мин при постоянном покачивании.

5. Удалить избыток жидкости со срезов, нанести необходимое количество раствора гематоксилина Джилла (БиоВитрум, Россия) и инкубировать 1 мин при комнатной температуре.

6. Удалить раствор красителя со срезов и сполоснуть стекла в щелочной воде (2 капли 10% аммиака на 100 мл дистиллированной воды) в течение 1 мин.

7. Покачивая, промыть стекла в дистиллированной воде 3 мин.

8. Удалить избыток жидкости и нанести на срезы необходимое количество 1% водного раствора конго красного (Sigma-Aldrich, США).

9. Инкубировать срезы в растворе красителя в течение 2 мин при комнатной температуре.

10. Удалить краситель и промыть срезы в двух порциях дистиллированной воды (по 1 мин).

11. Максимально удалить жидкость со срезов и предметного стекла фильтровальной бумагой и нанести на срезы необходимое количество среды для заключения Ultramount Aqueous Permanent Mounting Medium, после чего либо оставить до высыхания среды, либо заключить срезы под покрывное стекло.

Общая продолжительность окраски по данному протоколу составляет около 50 мин, что в 2 раза меньше того времени, которое требуется на окраску классическим методом Беннхольда, приводимым в большинстве руководств по гистологической технике. Несмотря на значительное сокращение длительности обработки (в том числе и в растворе красителя), при использовании усовершенствованного протокола удается получить очень хорошее качество окраски амилоида (*рисунк*).

Вероятно, процедура предварительного нагревания в уксусной кислоте способствует более прочному связыванию красителя (конго красного) с амилоидом, вследствие чего последний приобретает насыщенно оранжево-розовый цвет. При анализе полученных препаратов под световым микроскопом скопления амилоида контрастно выявляются на фоне мышечной ткани сердца, окрашенной в голубовато-серый цвет. Это делает амилоид легко детектируемым даже при малом ($\times 10$) увеличении микроскопа. Процедура нагревания никак не сказывается на качестве окрашивания срезов гематоксилином (ядра клеток приобретают синий цвет при использовании стандартной процедуры докраски).

При использовании метода флюоресцентной микроскопии (см. рисунок) представленный протокол позволяет получить высокую интенсивность флюоресценции амилоида (в красном диапазоне спектра — 600–650 нм) при практически полном отсутствии флюоресценции мышечной ткани. Более контрастной флюоресцентной визуализации амилоида можно добиться, возбуждая автофлюоресценцию мышечной ткани коротковолновым светом (см. рисунок). Было отмечено, что полученное в данном случае оптимальное соотношение сигнал/фон наилучшим образом сохраняется при использовании в качестве среды

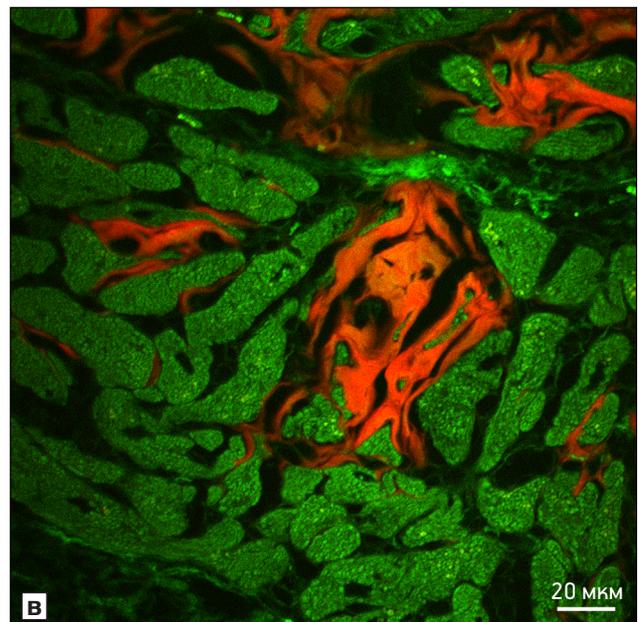
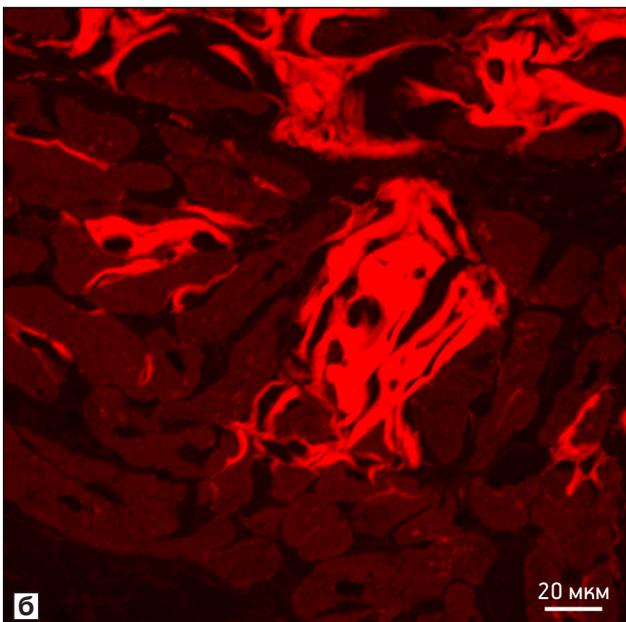
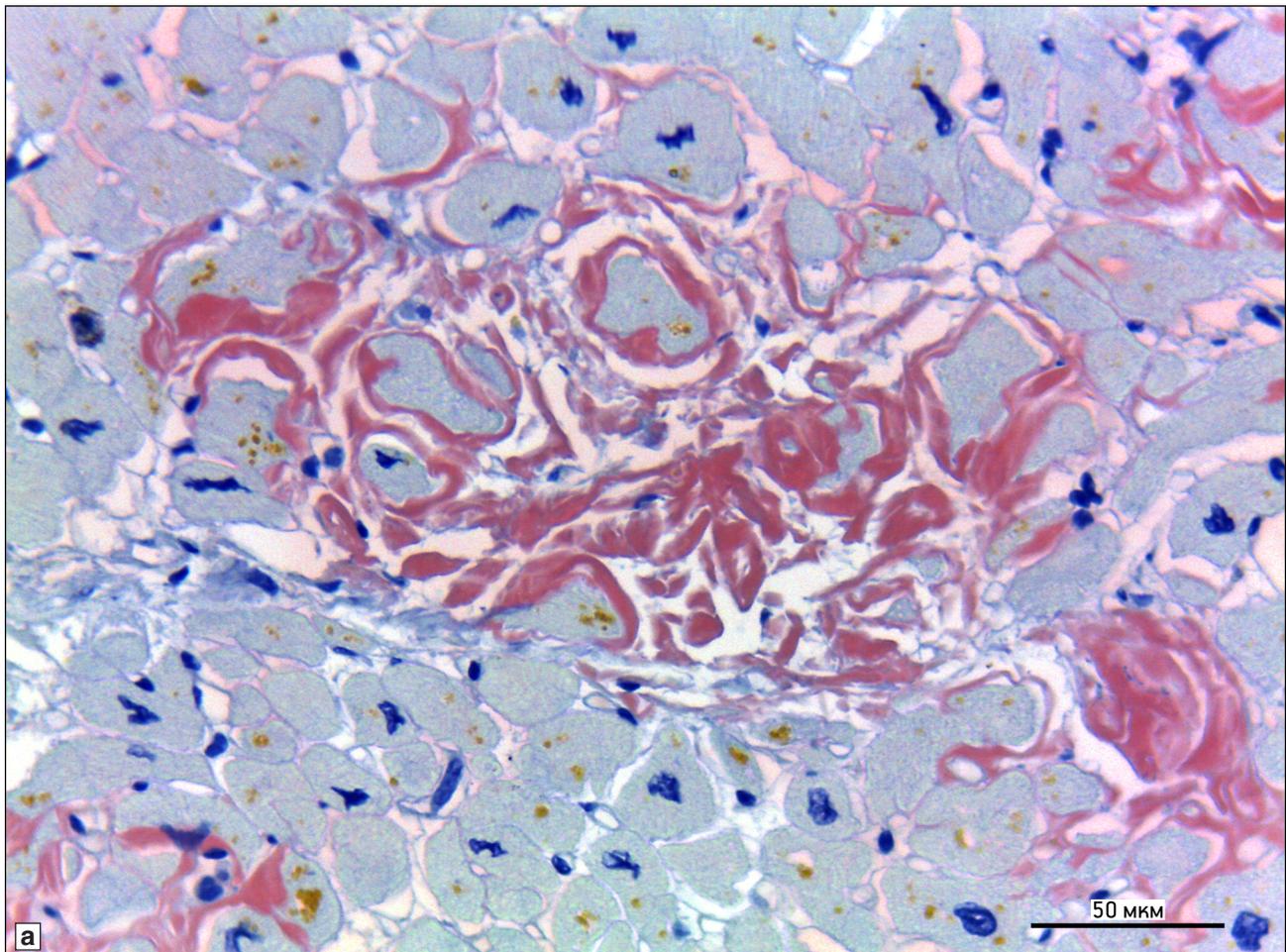
для заключения Ultramount Permanent Mounting Medium (Dako, Дания). Качество полученных препаратов было выше при сравнении с результатами использования более сложного «щелочного» метода окраски конго красным [5]. Сохранность препаратов, пригодных для анализа с использованием флюоресцентного или конфокального микроскопов, составляет не менее 4 мес.

Результаты, полученные при использовании протокола, включающего этап нагревания срезов в специальном буфере S1700 (с заключением препаратов в среду Ultramount), были сопоставимы с результатами, полученными при использовании уксусной кислоты (с заключением препаратов в ту же среду). Различие состояло в более интенсивном (в случае использования S1700) окрашивании мышечной ткани, выявленном при анализе препаратов под световым микроскопом. Использование S1700 приводит к тому, что мышечная ткань приобретает более темный серо-коричневый цвет. Интенсивность окрашивания амилоида при этом не уменьшается, а контрастность даже несколько возрастает (за счет более темного фона). Отношение сигнал/фон, выявляемое с помощью флюоресцентного микроскопа, в случае использования S1700 сопоставимо с полученным при использовании процедуры нагревания срезов в растворе уксусной кислоты.

Тем не менее, несмотря на сходство результатов, мы считаем, что использование раствора уксусной кислоты имеет ряд преимуществ перед применением S1700. В частности, при анализе препаратов под световым микроскопом более темное окрашивание ткани в целом, полученное при использовании S1700, несколько усложняет общее восприятие препарата. Кроме того, раствор уксусной кислоты, в отличие от коммерческого буфера S1700, является общедоступным лабораторным реактивом.

При применении дистиллированной воды в качестве жидкости для предварительного нагревания срезов яркость окраски амилоида и интенсивность его флюоресценции были понижены по сравнению с получаемыми при использовании 2% раствора уксусной кислоты.

В целом процедура предварительного нагревания срезов в водной среде, особенно с кислым рН, оказывает положительное влияние на качество окрашивания амилоида и интенсивность его флюоресценции. Данное обстоятельство особенно существенно в силу того, что традиционно методом улучшения окрашивания конго красным считается обработка срезов в щелочном растворе [4]. Также можно отметить, что предварительное нагревание придает прочность окраске амилоида



Окраска амилоида в миокарде человека.

а — микроскопия в проходящем свете; б, в — конфокальная лазерная микроскопия, одиночный оптический срез, объектив LD Plan-Neofluar 40×/0,6 Corr M27. б — для возбуждения флюоресценции амилоида использован твердотельный лазер (561 нм). Для регистрации сигнала использована следующая комбинация фильтров — MBS:MBS 458/561, детектор Ch1 — 566–670 (красный цвет); в — для возбуждения флюоресценции амилоида использован твердотельный лазер (561 нм), для возбуждения автофлюоресценции кардиомиоцитов — диодный лазер (405 нм). Для регистрации сигнала использована следующая комбинация фильтров в режиме Single Track1 — MBS: MBS 488/561/633, MBS_InVis: MBS-405; детекторы Ch1 — 410–533 (зеленый цвет) и Ch2: 566–670 (красный цвет). Окраска конго красным и квасцовым гематоксилином

и делает ее устойчивой к длительному (до 20 мин) промыванию в воде.

Анализ результатов использования различных сред для заключения показал, что во всех описанных выше случаях наиболее пригодной оказывается среда Ultramount Permanent Mounting Medium. Её применение способствует поддержанию яркости и контрастности окрашивания амилоида конго красным, а также сохранению соотношения специфической и фоновой флюоресценции (сама среда при этом характеризуется отсутствием автофлюоресценции). Согласно инструкции производителя, Ultramount Permanent Mounting Medium не требует заключения под покровное стекло, однако, как показывают результаты наших исследований, покровное стекло может быть использовано — это никак не влияет на качество окраски, но позволяет сократить время от момента нанесения среды на срезы до просмотра препаратов.

При использовании для заключения флюоресцентной среды Fluorescence Mounting Medium была отмечена постепенная диффузия окраски со срезов уже после заключения под покровное стекло. Это приводило к ухудшению получаемого в итоге качества окрашивания препаратов, а также существенно усиливало фоновую флюоресценцию. Применение перманентной среды Cytoseal (с предварительным проведением препаратов через этанол восходящей концентрации и ксилол) приводило к изменению оттенка окраски мышечной ткани на более розовый, что существенно снижало контрастность амилоида и затрудняло его детекцию при малом увеличении микроскопа. В случае использования Cytoseal также было отмечено снижение интенсивности флюоресценции амилоида (по сравнению с использованием Ultramount).

Таким образом, разработан усовершенствованный протокол окраски амилоида конго красным, позволяющий селективно выявлять амилоид при световой и флюоресцентной микроскопии. Препараты, полученные согласно представленному протоколу, характеризуются высокой контрастностью окраски амилоида при исследовании на световом уровне, а также высокой интенсивностью его флюоресценции. Преимуществом разработанного протокола перед описанными ранее является значительное сокращение общей продолжительности окраски, увеличение устойчивости специфического окрашивания амилоида и

исключение из протокола этапа дифференцировки. Последнее позволяет стандартизировать протокол по времени (постоянный контроль окрашивания под микроскопом в этом случае не требуется) и избежать сохранения неспецифического окрашивания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистохимической техники. СПб.: СпецЛит, 2010.
2. Рыбакова М.Г., Кузнецова И.А., Семернин Е.Н. и др. Информативность биопсии слизистой оболочки полости рта для диагностики системного амилоидоза // Арх. пат. 2013. Т. 75, № 5. С. 3–7.
3. Шавловский М.М. Молекулярные и генетические основы этиопатогенеза амилоидозов // Мед. акад. журн. 2010. Т. 10, № 4. С. 63–81.
4. Bennhold H. Eine spezifische Amyloidfärbung mit Kongorot // Münch. Med. Wschr. 1922. Bd. 44. S. 1537–1538.
5. Clement C.G., Truong L.D. An evaluation of Congo red fluorescence for the diagnosis of amyloidosis // Human Pathology. 2014. Vol. 45. P. 1766–1772.
6. Gillmore J.D., Hawkins P.N. Pathophysiology and treatment of systemic amyloidosis // Nat. Rev. Nephrol. 2013. Vol. 9, № 10. P. 574–586.

Поступила в редакцию 08.10.2015

RAPID METHOD OF THE AMYLOID STAINING WITH CONGO RED FOR LIGHT AND FLUORESCENCE MICROSCOPY

V.V. Gusel'nikova¹, O.V. Kirik, Ye.A. Fyodorova¹, M.M. Shavlovskiy^{1,2}, A.Ya. Gudkova², D.E. Korzhevskiy^{1,2}

The aim of the present study was to optimize the histochemical method of amyloid staining using Congo red. The study was performed on specimens of the myocardium of left ventricle of the heart obtained at autopsy from the patients with amyloidosis of myocardium diagnosed postmortem. It was shown that a positive impact on the quality of the staining of amyloid is provided by a procedure of pre-heating the slides in the liquid, especially at an acidic pH. The staining protocol was developed allowing to obtain preparations characterized by high-contrast staining of amyloid at light microscopic level and by high intensity of its fluorescence. The advantage of the protocol presented is also a significant reduction in the total duration of staining, an increase in stability of the specific staining of amyloid and the absence of nonspecific background staining.

Key words: amyloid, Congo red, histochemistry, fluorescence microscopy

¹ 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; ² Laboratory of Cardiomyopathies, Institute of Cardiovascular Diseases, I.P.Pavlov First St. Petersburg State Medical University