

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ В НЕРВНОЙ ТКАНИ

Лаборатория функциональной анатомии (зав. — проф. Л.М.Ерофеева), Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва

Высокая активность кислой фосфатазы в нервных клетках позволяет успешно использовать метод ее выявления для морфофункциональных исследований элементов нервной ткани. На примере нейронов звездчатого узла у коров показано, что тела и отростки нервных клеток имеют разную степень активности фермента. Нервные окончания — постоянно высокую. Метод позволяет проводить детальные морфологические исследования нейронов, а также оценивать их взаимоотношения. В статье приводится подробное описание усовершенствованного метода выявления активности кислой фосфатазы в структурах нервной ткани.

Ключевые слова: нервная клетка, нервная ткань, кислая фосфатаза

В последние десятилетия широкое распространение получили новые методы исследования, позволяющие на клеточном уровне с успехом изучать разнообразные физиологические и функциональные особенности биологических объектов [10] и практически перестали использоваться гистохимические методы, которые в ряде случаев до сих пор представляют собой несомненную ценность. К таким методам относится метод Гомори, позволяющий выявлять в тканях активность кислой фосфатазы (КФ), которая является важнейшим ферментом, относящимся к группе фосфомоноэстераз, участвующих в фосфорном обмене тканей. Она расщепляет макроэргические сложноэфирные связи в моноэфирах фосфорной кислоты с образованием свободного ортофосфата, высвобождением и переносом большого количества энергии [4]. Установлено, что КФ активно участвует в метаболизме клеток, регенерации органов, активизируется при компенсаторных состояниях органов, сокращениях мышц [2]. Большинство работ, связанных с изучением КФ, были направлены на выявление ее специфичности и возможностей диффузии в окружающие структуры. Как показали исследования, КФ широко распространена в природе [4, 8]. Она встречается практически во всех тканях животных и растительных организмов (включая микроорганизмы). Высокая активность КФ выявляется и в нервной ткани [3, 6, 12], содержится в лизосомах, комплексе Гольджи, пиноцитозных пузырьках и секреторных вакуолях, в большом количестве обнаруживается в макрофагах и остеокластах. Генетическое нарушение биосинтеза фосфатаз приводит к заболеваниям, связанным с нарушениями обмена гликогена. В качестве теста определение ее активности используется в клинической практике при лечении онкологических и других заболеваний, применяется в судебной медицине. Разрабатываются методы оценки ее состояния у гидробионтов для решения экологических проблем [8]. Большое количество КФ содержится в нервной ткани. Она участвует в белковом, жировом и углеводном обмене [1, 9].

Цель данной работы — продемонстрировать, что ценность редко используемого метода Гомори заключается в том, что, помимо гистохимического определения активности и локализации одного из важнейших ферментов в структурных элементах нервной ткани, этот метод позволяет изучать и их строение.

Метод выявления КФ в тканях на гистологических срезах Гомори разработал в 1941 г. [13], после чего ряд исследователей ввели некоторые изменения, которые позволили улучшить получаемые результаты. Модификация A.Wolf и соавт. [14] оказалась наиболее удачной для изучения элементов нервной системы. Суть данной гистохимической реакции сводится к необходимости перевода осадка, образующегося в области локализации КФ, сначала в нерастворимое состояние, а затем в видимую его форму.

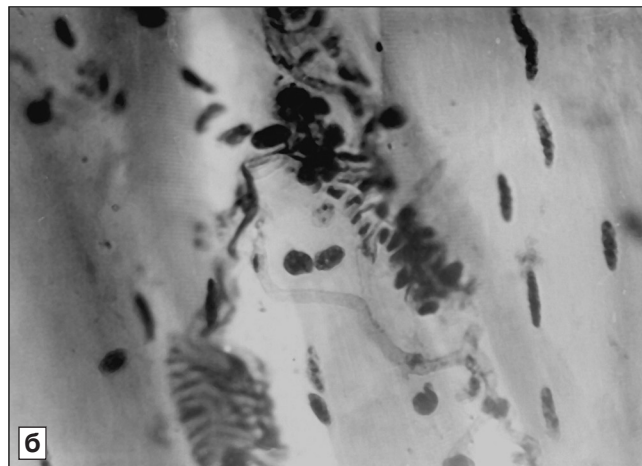
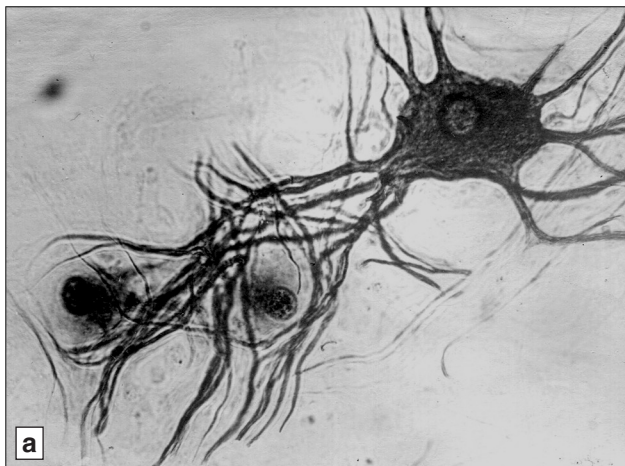
Преимуществом метода выявления активности КФ является возможность использования толстых замороженных гистологических срезов и тотальных препаратов, позволяющих исследовать не только структуру нейронов, но и их взаимоотношения (рисунк, а). Достоинством этого метода является быстрое получение результатов на неограниченном количестве материала.

К отрицательным сторонам метода можно отнести использование только свежего материала (крайним сроком являются 12 ч после смерти), что объясняется довольно быстрой инактивацией фермента. Некоторые неудобства представляют продолжительность проведения инкубации срезов (4 ч) и необходимость приготовления препаратов сразу после ее окончания. Возможные затруднения могут возникнуть также при подборе субстрата, на который действует фермент (β -глицерофосфат натрия или α -глицерофосфат натрия).

При проведении несложного контроля [1], наряду с изучением активности КФ в структурных элементах нейронов (телах, отростках, синапсах, колбах роста, нейрофибриллах), на тех же препаратах представляется возможность изучать и строение нервной ткани (см. рисунок). Помимо синаптических связей между нейронами, которые по методу

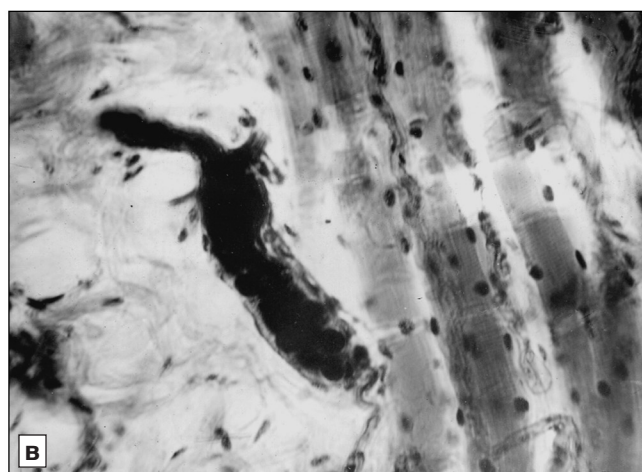
Сведения об авторе:

Аминова Гульшат Гареевна (e-mail: Lab-funkanat@yandex.ru), лаборатория функциональной анатомии, Научно-исследовательский институт морфологии человека, 117418, Москва, ул. Цюрупы, 3



Структурные элементы нейронов звездчатого ганглия.

а — крупный нейрон с умеренной активностью кислой фосфатазы (КФ), отростки которого оплетают нейроны со слабо положительной реакцией на КФ; б — нейромышечное веретено с высокой активностью КФ, моторная бляшка в икроножной мышце кошки; в — инкапсулированный рецептор в языке кошки. Фиксация 80° спиртом. Метод Гомори. Об. 40, ок. 7



Гомори выявляются в виде высокоактивных структур, на гистологических препаратах отчетливо выделяются взаимосвязи между нейронами в виде разнообразных форм сплетений отростков. По степени активности КФ можно судить о функциональном состоянии этих образований. Метод Гомори позволяет изучать также афферентные и эфферентные звенья нейронов (см. рисунок, б, в), а в некоторых случаях и нейроглию.

В морфологических работах метод Гомори успешно был применен для изучения структур нервной ткани у человека и домашних животных (крупный рогатый скот, собака, кошка, курица) [1–3, 5, 11] и с положительным результатом использован в экспериментальных исследованиях, в частности, при регенерации седалищного нерва, травмах спинного мозга и др. [5, 7, 12]. К сожалению, эти работы не получили дальнейшего развития.

Материалом для настоящего исследования послужили звездчатый и чревный узлы автономной нервной системы крупного рогатого скота, полученные на Московском мясокомбинате от 30 животных через 30 мин после их забоя. Также был использован материал от 3 кошек, умерщвленных с помощью эфирного наркоза.

Учитывая, что КФ является ферментом, теряющим свою активность при комнатной температуре, весь материал сразу помещали в термос с охлажденным 80° спиртом, затем перекладывали в новый 80° раствор спирта и продолжали фиксировать при температуре –4 °С в морозильном отделении холодильника в течение 1–2 сут. Усовершенствованная фиксация материала позволила максимально сохранить активность фермента, получить точные сведения о его локализации и четкую морфологическую картину структурных элементов нервной ткани (см. рисунок).

Очередность обработки материала.

1. Взятый материал сразу поместить в охлажденную фиксирующую жидкость. Наиболее приемлемым для этого является ацетон и 80° спирт. Так как спирт лучше сохраняет структуру нервной клетки, но несколько инактивирует фермент, поэтому фиксацию необходимо

проводить в холодильнике при очень низкой температуре (до –4 °С). Фиксировать материал в течение 1–2 сут в дважды сменяемом растворе.

2. Материал прополаскивать в холодной дистиллированной воде.
3. Изготовить срезы на замораживающем микротоме (криостате) толщиной около 30 мкм и погрузить в холодную дистиллированную воду.
4. Инкубировать срезы в заранее приготовленной среде («субстрате») в термостате при температуре 37–38 °С в течение 4 ч.
5. После окончания инкубации срезы тщательно сполоснуть в дистиллированной воде при комнатной температуре и погрузить в свежеприготовленный 0,1% раствор сернистого натрия, в котором нерастворимый осадок, выпавший в местах локализации фермента, переводится в видимую форму (срезы приобретают коричневый цвет).
6. После споласкивания в дистиллированной воде комнатной температуры срезы поместить на предметное стекло, обезвоживать, просветлить и заключить под покровное стекло.

Все манипуляции (за исключением инкубации) с каждым срезом проводить отдельно. Нельзя забывать, что весь процесс выявления КФ (как и приготовление и хранение готовых растворов) нужно проводить в химически чистой посуде (бюксиках и стаканчиках). Стекланный крючок, необходимый для переноса срезов, нужно постоянно споласкивать в дистиллированной воде.

Весь описанный процесс выявления активности КФ можно проводить и на парафиновых срезах при условии быстрой заливки материала. Однако результат будет более ограничен по площади срезов, а активность фермента ниже. Очень хорошие результаты получаются при использовании тотальных препаратов, полученных при расслоении стенок полых органов (например кишки).

Состав инкубационной смеси.

1. Ацетатная буферная смесь, рН 4,7 — 12 мл.
2. 1/10 М раствор азотнокислого свинца — 10 мл.
3. 2% раствор глицерофосфата натрия (β -глицерофосфат натрия или α - β -глицерофосфат натрия) — 6,5 мл.
4. Добавить дистиллированную воду до 100 мл. Образовавшийся осадок профильтровать.

Приготовление растворов для инкубационной смеси.

1. Ацетатная буферная смесь (если нет готового раствора), рН 4,7:
 - 1) дистиллированная вода 200 мл;
 - 2) ледяная уксусная кислота 12 мл.
 - 3) дистиллированная вода 300 мл;
 - 4) ацетат натрия 39,9 г.
 - 5) растворы слить, проверить рН.
2. 1/10 М раствор нитрата свинца:
 - 1) дистиллированная вода 100 мл;
 - 2) нитрат свинца 3,3 г.

Способы контроля гистохимической реакции.

1. Инактивация срезов при температуре 80 °С в течение 10 мин или при 90 °С — 5 мин. Далее — инкубация и все по прописи.
2. Добавить в инкубационную среду 0,01 М раствора фтористого натрия.
3. Исключить из инкубационной среды субстрат (глицерофосфат натрия) и добавить вместо него дистиллированной воды.

Особо следует отметить модификацию метода Гомори, которую предложил А.М. Чилингарян [9] для выявления подслизистого и межмышечного сплетений. Она заключается в том, что отпрепарированный наружный продольный слой мышечной оболочки кишки (вместе с межмышечным нервным сплетением) перед инкубацией предварительно нужно опустить в нагретую до 72 °С дистиллированную воду на 5 мин, а затем перенести в дистиллированную воду при комнатной температуре. Этот прием позволяет наиболее полно продемонстрировать состав нейронов, включая мелкие, которые до этого либо не выявлялись, либо выявлялись, но неполностью. Кроме того, инактивация фермента, находящегося в окружающих тканях кишки, способствует более четкой дифференциации структурных элементов нейронов и внутриганглиозных взаимоотношений. Этот метод в дальнейшем был успешно применен и другими исследователями [11].

Таким образом, метод выявления активности КФ, предложенный Гомори, в модификации А. Wolf и соавт. [14] является ценным методом, позволяющим, наряду с определением ее активности в структурных элементах нейрона при соблюдении правильной фиксации материала, проводить полноценные исследования как центральной, так и периферической нервной системы. В морфологических исследованиях его возможности полностью не исчерпаны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аминова Г.Г. Активность фосфатаз в симпатических и спинномозговых узлах крупного рогатого скота // Труды Московск. ветеринар. акад. 1958. Т. 22, вып. 2. С. 21–29.
2. Берстон М. Гистохимия ферментов. М.: Мир, 1965.
3. Давыдова Т.В. К сравнительной морфологии и гистохимии среднего мозга некоторых жвачных // Труды Московск. ветеринар. акад. 1958. Т. 22, вып. 1. С. 49–56.
4. Диксон М., Узбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1982. Т. 1.
5. Жанчипов Г.Ш. Об активности кислой фосфатазы и «концентрации ортофосфатов» в де- и регенерирующих нервах и нервных волокнах, подвергшихся трупным изменениям: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1957.
6. Петропавловская Н.Н. Реакция нервных клеток узлового и краниального шейного узлов на повреждение их отростков // Труды Московск. ветеринар. акад. 1958. Т. 22, вып. 1. С. 23–26.
7. Трухачев А.Н. Морфофункциональное состояние сенсорной коры при неравномерном электромагнитном облучении: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Ярославль, 2009.
8. Цветков И.Л., Зарубин С.Л., Урванцева Г.А. и др. Кислая фосфатаза гидробионтов как фермент-индикатор биохимической адаптации к воздействию токсических веществ // Изв. АН, сер. биол. 1997. № 5. С. 539–545.
9. Чилингарян А.М. Некоторые данные по гистохимии цитоархитектонике нервных сплетений кишечника: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1954.
10. Чумасов Е.И., Петрова Е.С., Коржевский Д.Э. Иннервация сердца крысы (иммуногистохимическое исследование) // Морфология. 2009. Т. 135, вып. 2. С. 33–37.
11. Эльберт М.Э. Некоторые данные по гистохимии кислой фосфатазы нейронов кишечника. Морфология и цитоархитектоника ауэрбахова сплетения кошек и собак: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1956.
12. Bodian D.A., Mellors R.C. The regenerative cycle of motoneurons with special reference to phosphatase activity // J. Exp. Medicine. 1945. Vol. 81, № 5. P. 469–487.
13. Gomori G. Distribution of acid phosphatase in the tissues under normal and pathologic conditions // Arch. Pathol. 1941. Vol. 32. P. 189–199.
14. Wolf A., Kabath E.A., Newman W. Histochemical studies on tissues enzymes. III. A study of the distribution of acid phosphatases with special reference to the nervous system // Am. J. Pathol. 1943. Vol. 19. P. 423–439.

Поступила в редакцию 17.08.2016

DEMONSTRATION OF ACID PHOSPHATASE ACTIVITY IN THE NERVOUS TISSUE

G.G. Aminova

High acid phosphatase activity in the nervous cells permits to use successfully the method of its demonstration for the morpho-functional studies of the elements of nervous tissue. On the example of stellate ganglion in cows, it was shown that nervous cell bodies and the processes had various degrees of enzyme activity, while nerve endings had constantly high activity. The method allows detailed morphological study of neurons, as well as of their relationships. The article provides a detailed description of an improved method for detection of acid phosphatase activity in the nervous tissue structures.

Key words: *nerve cell, nervous tissue, acid phosphatase*

Laboratory of Functional Anatomy, Research Institute of Human Morphology, Moscow