

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

© В.Е.Соболев, Л.П.Тельцов, 2015
УДК 611.62.018:599.323.4

В.Е.Соболев¹, Л.П.Тельцов²

МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ИНТЕНСИВНОСТИ ГИСТОХИМИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ НА СУЛЬФАТИРОВАННЫЕ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНЫ В ТКАНЯХ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ КРЫС

¹ Лаборатория молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии (зав. — канд. мед. наук П.П.Бельтюков), Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека, Федеральное медико-биологическое агентство;

² кафедра морфологии и физиологии животных (зав. — проф. В.А.Здоровинин), Мордовский государственный университет им. Н.П.Огарева, г. Саранск

В статье предлагается метод количественной оценки концентрации сульфатированных гликозаминогликанов в тканях мочевого пузыря крыс с использованием градуировочных стандартов красителя альцианового синего (АС) в 20% водном растворе желатина. Из блоков, имеющих консистенцию плотного геля и служащих градуировочными стандартами красителя различной концентрации, приготавливают срезы толщиной 7 и 9 мкм и фотографируют. С помощью программы «ВидеоТест» 5.0 в срезах с различной концентрацией красителя определяют относительную оптическую плотность АС с построением графика ее зависимости от концентрации красителя. На основании калибровочного графика в гистологических срезах мочевого пузыря, окрашенных АС, можно определить его концентрацию. В срезах мочевого пузыря intactных крыс концентрация АС в слизи, покрывающей эпителиальный слой, составляет $2,2 \pm 1,3$ мг/см³, а в тканях собственной пластинки — $2,5 \pm 1,0$ мг/см³.

Ключевые слова: гистохимия, альциановый синий, мочевого пузыря, крыса

В ряде исследований [8, 9] показано, что слой гликозаминогликанов (ГАГ) на поверхности эпителия мочевого пузыря обеспечивает защиту слизистой оболочки от агрессивных компонентов мочи и, тем самым, препятствует развитию воспалительного процесса. Ранее с помощью методов гистохимической идентификации ГАГ в тканях мочевого пузыря крыс на модели химического цистита была обнаружена более интенсивная реакция у животных, получавших препараты ГАГ [5], чем у intactных животных. Однако визуальная оценка гистохимической реакции не позволяет сделать заключение о концентрации ГАГ в тканях мочевого пузыря. В этой связи в настоящей работе нами предлагается метод количественной оценки интенсивности гистохимической реакции на сульфатированные ГАГ в тканях мочевого пузыря крыс с использованием градуировочных стандартов красителя альцианового синего (АС).

Методика приготовления градуировочных стандартов АС адаптирована на основании рекомендаций Т.А.Силантьевой, Е.Н.Горбач [3, 4]. Из насыщенного водного раствора АС известной концентрации при температуре 37 °С готовили серии двукратных разведений на основе коллоидного раствора желатина с конечной концентрацией 20% (таблица). Растворы разливали в пластиковые контейнеры объемом 1 см³ и помещали для полимеризации в холодильную камеру бытового холодильника.

Через 1 сут из блоков, имеющих консистенцию плотного геля, лезвием вырезали образцы размером 5×5×5 мм, замораживали их в жидком азоте для предотвращения кристаллизации воды и помещали на охлажденные блокодержатели микротом-криостата SLEE Mainz (Medical GmbH, Германия). При температурном режиме –20 °С изготавливали срезы толщиной 7 и 9 мкм и монтировали на маркированные с указанием конечных концентраций красителя предметные стекла, высушивали на воздухе и заключали под покровные стекла в среду для заключения препаратов BioMount® (Bio Optica, Испания).

Далее полученные срезы, содержащие градуировочные стандарты АС, фотографировали при увеличении 50, 100, 200, 400. На полученных цифровых изображениях в программе «ВидеоТест» 5.0 для Windows XP методом случайного отбора при помощи инструмента «окружность» выбирали не менее 10 участков, в которых с помощью программы автоматически оценивали показатель оптической плотности в относительных единицах (рис. 1).

Полученные значения оптической плотности градуировочных стандартов использовали для построения графика калибровочной функции, которая представляла собой зависимость между концентрацией красителя в градуировочном стандарте (ось абсцисс) и полученным значением оптической плотности (ось ординат). Построение калибровочных кривых выполняли в приложении MS Excel 2007 (рис. 2).

Сведения об авторах:

Соболев Владислав Евгеньевич (e-mail: vesob@mail.ru), лаборатория молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии, Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека, Федеральное медико-биологическое агентство России, 188663, Ленинградская обл, Всеволожский р-н, п. Кузьмолковский, к. 93

Тельцов Леонид Петрович (e-mail: kafedra_mfzh@agro.mrsu.ru), кафедра морфологии и физиологии животных, Мордовский государственный университет, 430005, г. Саранск, ул. Большевикская, 68

Гистологические криостатные срезы мочевого пузыря толщиной 7 и 9 мкм получали с помощью микротом-криостата Slee MEV (Slee Medical, Германия). Помещали в раствор АС (рН 2,5) на 10 мин, после чего промывали в проточной воде в течение 2 мин, обезвоживали в этаноле восходящей концентрации, просветляли орто-ксилолом или в растворе BioClear® (Bio Optica, Испания) в течение 2 мин и заключали в среду BioMount® (Bio Optica, Испания) под покровное стекло, фотографировали, а затем с помощью программы «ВидеоТест» 5.0 методом случайного отбора проводили оценку оптической плотности окрашенных участков поверхности эпителиоцитов и собственной пластинки слизистой оболочки. Далее с использованием графика калибровочных стандартов АС вычисляли концентрацию красителя на поверхности переходного эпителия и в собственной пластинке слизистой оболочки мочевого пузыря.

В результате оценки интенсивности окрашивания срезов мочевого пузыря толщиной 7 мкм установлено, что концентрация красителя в слизи, покрывающей поверхность эпителиального слоя, составляет $2,2 \pm 1,3$ мг/см³. Концентрация АС в тканях собственной пластинки несколько выше и составляет $2,5 \pm 1,0$ мг/см³ (рис. 3).

Подобные методы количественной оценки интенсивности гистохимических и иммуногистохимических реакций, основанные на измерении оптической плотности участков гистологических срезов, в настоящее время привлекают внимание исследователей [1, 2, 4, 10]. Методы количественной или полуколичественной оценки более точно отражают содержание исследуемых веществ, чем традиционной полуколичественной (балльной) оценки, основанной на субъективном восприятии исследователя [4]. Ранее с использованием иммуногистохимических методов было показано присутствие на поверхности эпителия мочевого пузыря у животных гепарансульфат-протеогликанов, а в собственной пластинке слизистой оболочки мочевого пузыря — хондроитин-4-

Приготовление градуировочных стандартов красителя альцианового синего

Соотношение — краситель/вода	Краситель, мкл	Вода, мкл	Концентрация, г/л*
1:400	2,5	997,5	0,0125
1:200	5	995	0,025
1:100	10	900	0,05
1:50	20	980	0,1
1:10	100	900	0,5
1:5	166	834	1,0
1:1	500	500	2,5
2:1	666	333	3,3
4:1	800	200	4
10:1	900	100	4,5
1:1	1000	1000	5,0
2:1	1335	665	6,6
4:1	1600	400	8,0

* Конечная концентрация в объеме 2 мл после смешивания стандарта в соотношении 1:1 с 20% раствором желатина.

сульфата и гиалуроновой кислоты [7]. Гистохимический метод, позволяющий идентифицировать в тканях мочевого пузыря сульфатированные ГАГ с помощью АС, в настоящее время продолжает использоваться в экспериментальной медицине и биологии в связи с простотой постановки реакции и достаточно высокой специфичностью [6]. В нашей работе впервые предпринята попытка количественной оценки интенсивности окрашивания тканей мочевого пузыря АС, позволяющая судить о содержании в них сульфатированных ГАГ.

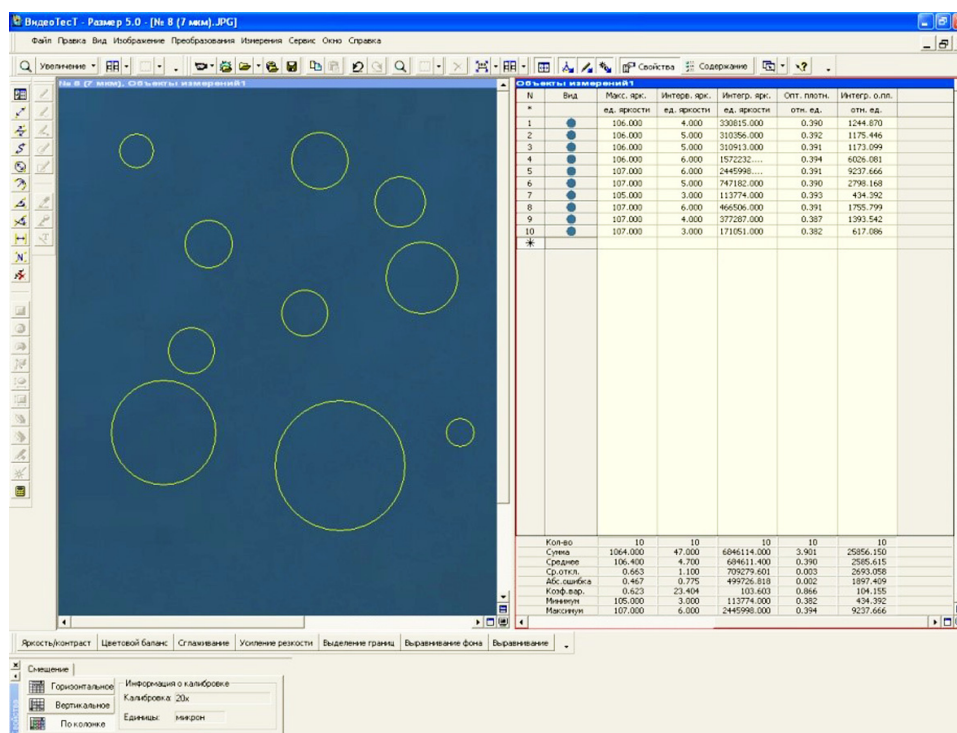


Рис. 1. Окно программы «ВидеоТест» 5.0.

Измерение оптической плотности градуировочного стандарта альцианового синего с концентрацией 4 г/л

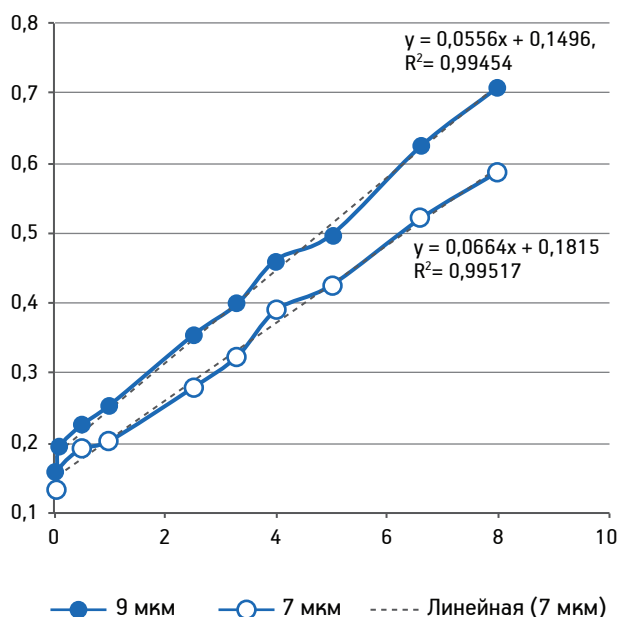


Рис. 2. График калибровочной функции градуировочных стандартов альцианового синего (АС) для гистологических срезов толщиной 7 и 9 мкм.

По оси абсцисс — концентрация АС (г/л); по оси ординат — оптическая плотность (отн. ед.)

Полученные в настоящем исследовании результаты дополняют имеющуюся информацию о распределении и содержании ГАГ в тканях, а метод количественной оценки интенсивности окрашивания тканей мочевого пузыря может быть использован в экспериментальной и практической деятельности специалистов в области нормальной и патологической морфологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамеев С.В., Недзведь А.М. Обработка оптических изображений клеточных структур в медицине. Минск: ОИПИ НАН Беларуси, 2005.
2. Ирьянов Ю.М., Силантьева Т.А., Горбач Е.Н. и др. Обработка и анализ изображений в гистологических исследованиях с применением стандартных компьютерных программ // Морфол. ведомости. 2004. № 1–2. С. 11–13.
3. Патент РФ № 2363949. Способ изготовления градуировочных стандартов / Т.А. Силантьева, Е.Н. Горбач. Заявка от 18.12.2007 г. Опул. в БИ. 2009. № 22. С. 10–15.
4. Силантьева Т.А., Горбач Е.Н. Количественная оценка интенсивности гистохимических реакций на оцифрованных изображениях гистологических препаратов с использованием градуировочных стандартов // Українськ. журн. телемедицини та медичної телематики. 2010. Т. 10, № 1. С. 32–39.
5. Соболев В.Е. Влияние экзогенных гликозаминогликанов на гистологическое строение мочевого пузыря крыс при экспериментальном цистите // Бюл. exper. биол. 2012. Т. 154, № 7. С. 121–126.
6. Anand M., Wang C., French J. et al. Estrogen affects the glycosaminoglycan Layer of the murine bladder // Female Pelvic Med. Reconstr. Surg. 2012. Vol. 18, № 3. P. 148–152.
7. Buckley M.S., Washington S., Laurent C. et al. Characterization and immunohistochemical localization of the glycoconjugates of the rabbit bladder mucosa // Arch. Biochem. Biophys. 1996. Vol. 330, № 1. P. 163–173.

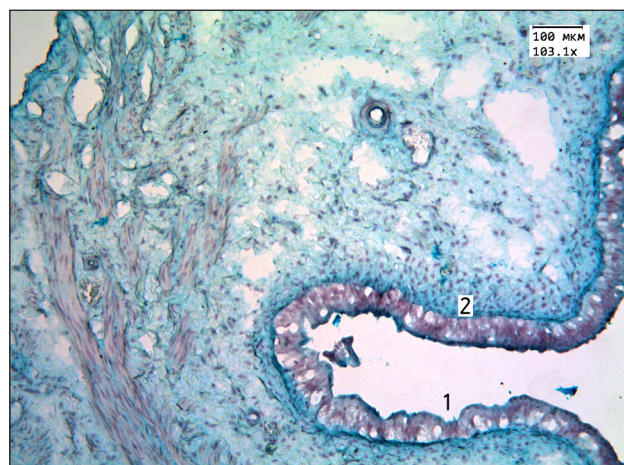


Рис. 3. Криостатный срез мочевого пузыря крысы.

1 — эпителий; 2 — собственная пластинка слизистой оболочки. Окрашка альциановым синим

8. Grist M., Chakraborty J. Identification of a mucin layer in the urinary bladder // Urology. 1994. Vol. 44. P. 26–33.
9. Hurst R.E., Roy J.B., Parsons C.L. The role of glycosaminoglycans in normal bladder physiology and the pathophysiology of interstitial cystitis // Interstitial Cystitis. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. P. 93–100.
10. Prasad K., Kumar B.P., Chakravarthy M., Prabhu G. Applications of 'TissueQuant' — a color intensity quantification tool for medical research // Comput. Methods Programs Biomed. 2012. Vol. 106, № 1. P. 27–36.

Поступила в редакцию 10.02.2015

Получена после доработки 30.04.2015

METHOD FOR QUANTITATIVE EVALUATION OF THE INTENSITY OF THE HISTOCHEMICAL REACTION FOR SULFATED GLYCOSAMINOGLYCANS IN THE TISSUES OF RAT URINARY BLADDER

V.Ye.Sobolev¹, L.P.Tel'tsov²

In this paper a method is proposed for the quantitative evaluation of the concentration of sulfated glycosaminoglycans in the tissues of rat bladder using the calibration standards of alcian blue (AB) in 20% aqueous solution of gelatin. The blocks that have the consistency of a dense gel and serve as calibration standards of different dye concentrations, sections 7 and 9 μm thick are cut, and photographed. Using the «Videotest 5.0» program, in the slices with different concentrations of the dye, relative optical density of AB was determined and the graph of its dependence on dye concentration was plotted. On the basis of a calibration graph, it was possible to determine AB concentration in the histological sections of the urinary bladder stained with AB. In the sections of the urinary bladder of the intact rats the concentration of AB in the mucus covering the epithelial layer, was $2.2 \pm 1.3 \text{ mg/cm}^3$, while in the tissues of its lamina propria it was equal to $2.5 \pm 1.0 \text{ mg/cm}^3$.

Key words: histochemistry, alcian blue, urinary bladder, rats

¹ Laboratory of Molecular Toxicology and Experimental Therapy, Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Federal Medical and Biological Agency of Russia, Leningrad Region; ² Department of Morphology and Animal Physiology, N.P.Ogaryov Mordovian State University, Saransk