

© Коллектив авторов, 2010
УДК 578.65

*И.П. Бобров^{1,2}, А.М. Авдалян², Т.М. Черданцева¹, В.В. Климачев¹, А.Ф. Лазарев²,
В.М. Брюханов¹, В.С. Дорошенко^{1,2}, В.Я. Гервальд¹, А.Ю. Долгатов¹ и М.В. Ковригин²*

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ АРГИРОФИЛЬНЫХ БЕЛКОВ ОБЛАСТИ ЯДРЫШКОВОГО ОРГАНИЗАТОРА НА ПАРАФИНОВЫХ СРЕЗАХ

¹ Центральная морфологическая лаборатория (зав. — канд. мед. наук Т.М. Черданцева), Алтайский государственный медицинский университет; ² отделение молекулярных методов исследования (зав. — канд. мед. наук А.М. Авдалян), Алтайский филиал РОНЦ им. Н.Н. Блохина, г. Барнаул, e-mail: ig.bobrov@yandex.ru

Представлен модифицированный метод окраски аргирофильных районов ядрышковых организаторов (AgNORs). Эта модификация устраняет недостатки оригинальной методики. Метод ускоряет окраску и предотвращает выпадение осадка.

Ключевые слова: ядрышковые организаторы, окрашивание нитратом серебра.

Практический опыт выявления ядрышковых организаторов методом импрегнации солями серебра срезов неизмененных тканей, при предраковых заболеваниях и опухолевом росте различных локализаций [1, 3–8] показывает, что он, при всей своей простоте, не лишен некоторых недостатков. К их числу мы относим: частое отклеивание срезов от предметного стекла во время окрашивания, перекрашивание или слабое окрашивание препаратов либо полностью отрицательные результаты окраски и выпадение осадков металлического серебра. Поэтому нами предложена модификация методики, улучшающая выявление ядрышковых организаторов.

В основу модификации положен двухэтапный метод Y. Daskal и соавт. [13], преимущество которого заключается в создании ядра серебрения на реакционноспособных группах аргирофильных белков (C23, B23) на первом этапе и дальнейшее проявление участков отложения серебра более сильным проявителем с применением формальдегида на втором этапе, что существенно укорачивает время окраски и устраняет выпадение осадков металлического серебра. При этом мы рекомендуем перед обработкой срезов раствором AgNO_3 (см. пункт 9) наносить на них стеклянной палочкой каплю коллоидного проявителя (2% желатина на 1% водном растворе муравьиной кислоты), размер которой определяют опытным путем, что усиливает связывание серебра с реакционноспособными химическими группами на первом этапе окрашивания.

Отклеивание срезов, особенно если не удастся приготовить тонкие срезы (3–4 мкм), в данной модификации предотвращается за счет замены дистиллированной воды в растворах на 96° этиловый спирт. Водный 2 н. раствор муравьиной

кислоты по Н.Н. Мамаеву и соавт. [10] нами заменен на спиртовой. Следует также отметить, что для предотвращения отклеивания срезов бывает полезно перед окрашиванием поддержать стекла с наклеенными срезами 2–3 сут в термостате при температуре 40–42 °С.

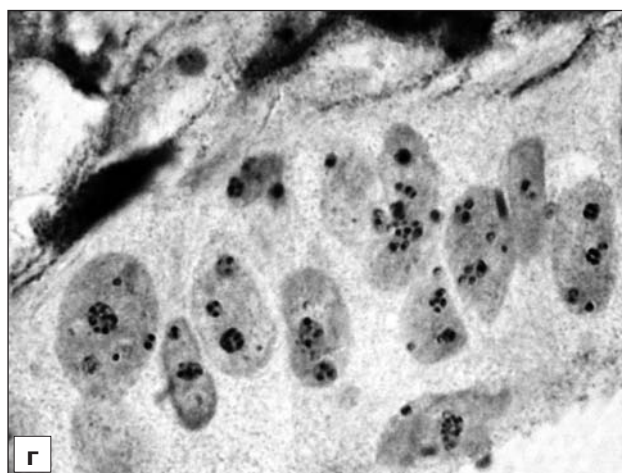
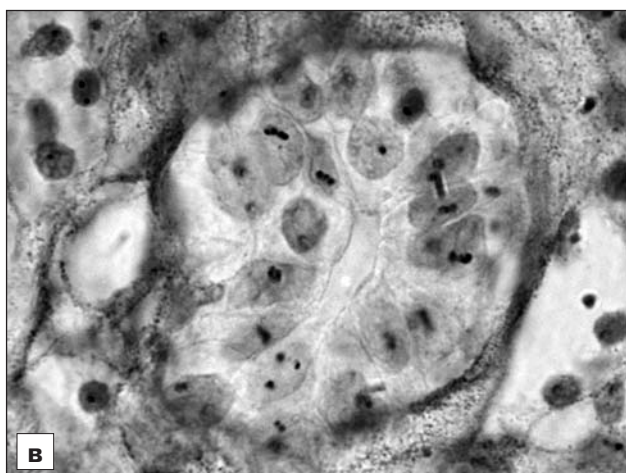
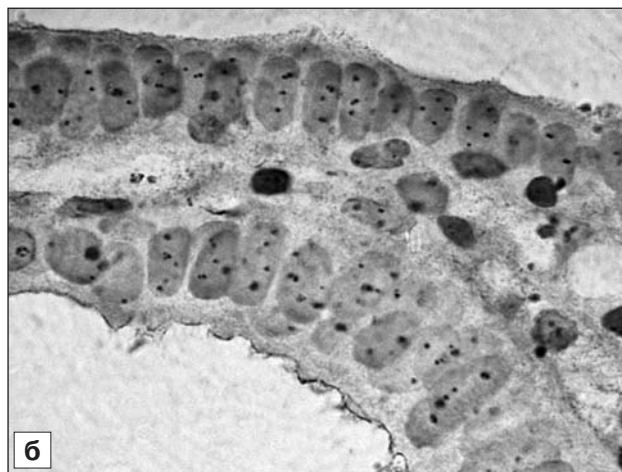
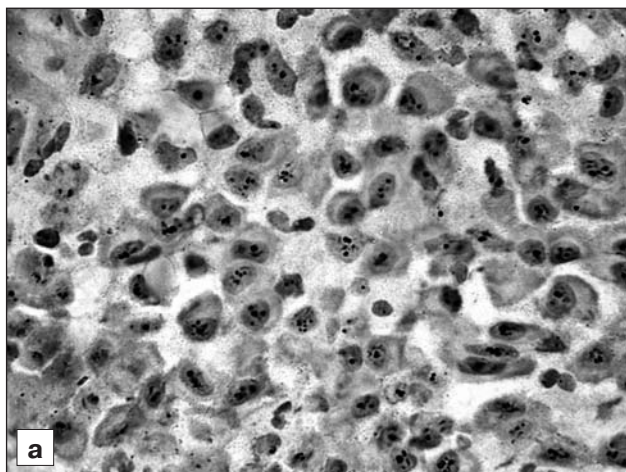
Экспериментальными исследованиями В.Я. Бирштейна [2] на препаратах хромосом, приготовленных из суспензии клеток костного мозга лабораторных мышей, было показано, что предварительная обработка препаратов в 0,1 н. водном растворе NaOH повышала интенсивность окраски ядрышковых организаторов. Апробировав данную процедуру на гистологических срезах, мы обнаружили, что обработка срезов в 0,1 н. растворе NaOH значительно улучшала результаты окраски. Химизм данного явления, по нашему мнению, сводится к разблокированию и умножению числа реакционноспособных S—S-, SH-, C—O-групп аргирофильных белков ядрышка. Данная процедура с успехом может заменить высокотемпературную обработку срезов, рекомендованную рядом авторов с аналогичной целью, при которой используются дорогостоящие автоклавы [12, 15].

Таким образом, разработанная нами модификация выглядит следующим образом:

1) операционный или биопсийный материал фиксируют как можно раньше после его взятия в 10% растворе нейтрального формалина, забуференного по Р. Лилли (pH 7,4) [9] в течение 24 ч;

2) проводят и заливают материал в парафин по стандартной методике, получают гистологические срезы толщиной 3–4 мкм;

3) депарафинированные срезы обрабатывают в фиксаторе Карнуа (1 часть ледяной уксусной кислоты и 3 части 96° этилового спирта) в течение



Ядрышковые организаторы при импрегнации AgNO_3 .

а — лимфоплазмоцитарный инфильтрат в слизистой оболочке желудка; б — эндометрий в фазе секрции менструального цикла; в — непролиферативная форма железисто-фиброзной мастопатии; г — метастаз колоректального рака в печень. Ув. 1100.

45 мин при температуре 4°C по В.М. Погорелову [11];

4) промывают в двух порциях 96° этилового спирта;

5) обрабатывают срезы в 2 н. растворе муравьиной кислоты на 96° этиловом спирте в течение 20 мин;

6) промывают в двух порциях 96° этилового спирта, во второй порции спирта срезы оставляют (их можно окрашивать по мере надобности);

7) обрабатывают срезы в 0,1 н. NaOH , приготовленном на 50% растворе этилового спирта, в течение 2 мин 30 с;

8) промывают в 96° этиловом спирте и одновременно просушивают срезы на воздухе;

9) наслаивают на препарат одну каплю 100% раствора нитрата серебра (раствор готовят непосредственно перед проведением реакции, растворяя 1 г AgNO_3 в 1 мл дистиллированной воды)

и инкубируют в термостате при 60°C в течение 1 мин 40 с во влажной камере (чашка Петри с фильтром, смоченным дистиллированной водой);

10) препарат извлекают из термостата и наслаивают на срез 1 каплю 40% раствора формальдегида и 1 каплю коллоидного проявителя, приготовленного по W.M. Howell и D.A. Black (2% желатина на 1% водном растворе муравьиной кислоты) [14] и снова инкубируют в течение 20–50 с в термостате при той же температуре;

11) промывают срезы в 4 порциях дистиллированной воды;

12) обрабатывают срезы в ацетатном буфере (pH 2,4) в течение 1 мин;

12) докрашивают препараты 0,2% водным раствором метилового зеленого на ацетатном буфере (pH 2,4) в течение 10–15 с. Метилловый зеленый предварительно должен быть тщательно очищен хлороформом [9];

13) после кратковременной дифференцировки (2–3 мин) в п-бутиловом спирте препараты обрабатывают толуолом и заключают в полистирол.

Результат: на фоне окрашенной в зеленоватый цвет нуклеоплазмы определяются светло-коричневые ядрышки, в которых отчетливо видны гранулы черного цвета (рисунок, а – г).

Преимущества представленной модификации по сравнению с существующими вариантами метода выявления ядрышкообразующих районов хромосом состоят в отсутствии выпадения осадков металлического серебра, уменьшении закрашивания хроматина ядра, стабильности и отчетливости выявления гранул серебра в ядрышках, кроме этого даже толстые гистологические срезы не отклеиваются от предметного стекла во время окрашивания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авдалян А.М., Бобров И.П., Климачев В.В. и др. Связь экспрессии рецепторов к прогестерону и эстрогену α и активности аргирофильных белков области ядрышковых организаторов в гладкомышечных опухолях тела матки. *Арх. пат.*, 2009, т. 71, № 4, с. 50–54.
2. Бирштейн В.Я. К механизму окрашивания хромосом аммиачным серебром: влияние предобработок препаратов лизосимом и гиалуронидазой. *Цитология*, 1981, т. 23, № 4, с. 396–403.
3. Бобров И.П. Морфофункциональная характеристика ядрышкового аппарата клеток при фоновых, предраковых и злокачественных заболеваниях желудка: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Томск, 2005.
4. Бобров И.П., Авдалян А.М., Лазарев А.Ф. и др. Морфофункциональная характеристика белков областей ядрышкового организатора при гладкомышечных опухолях матки. *Арх. пат.*, 2008, т. 70, № 3, с. 18–23.
5. Лазарев А.Ф., Авдалян А.М., Бобров И.П. и др. Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ, рибосомных генов и развитие микроциркуляторного русла в гладкомышечных опухолях матки: клинико-морфологические параллели и дифференциальная диагностика. *Сибирск. онкол. журн.*, 2008, т. 29, № 5, с. 41–45.
6. Лазарев А.Ф., Авдалян А.М., Бобров И.П. и др. Коадаптация ферментных систем и уровня кровоснабжения в гладкомышечных опухолях тела матки. *Вопр. онкол.*, 2008, т. 54, № 5, с. 606–611.
7. Лазарев А.Ф., Климачев В.В., Бобров И.П. и Лубенников В.А. Характеристика ядрышкового аппарата опухолевых клеток при раке желудка. *Арх. пат.*, 2002, т. 64, № 6, с. 30–33.
8. Лазарев А.Ф., Кобяков Д.С. и Климачев В.В. Количественный анализ аргирофильных районов ядрышковых организаторов в аденомах толстой кишки и морфологические критерии риска малигнизации. *Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол.*, 2006, т. 16, № 5, с. 31–37.
9. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М., Мир, 1969.
10. Мамаев Н.Н., Гудкова А.Я., Аминев Х.К. и др. Метод оценки белоксинтетической функции кардиомиоцитов человека. *Арх. анат.*, 1989, т. 96, вып. 5, с. 69–72.
11. Погорелов В.М. Оценка Ag-положительных ядрышкообразующих районов хромосом в нуклеолах интерфазных злокачественных клеток. *Гематол. трансфузиол.*, 1990, № 11, с. 38–39.
12. Aubele M., Bieterferd S., Derenzini M. et al. Guidelines of AgNOR quantitation. *Zbl. Pathol.*, 1994, Bd. 140, S. 107–108.
13. Daskal Y., Smetana K. and Buch H. Evidence from studies on segregated nucleoli that nucleolar silver stained proteins C 23 and B 23 are in fibrillar components. *Exp. Cell Res.*, 1980, v. 127, p. 285–291.
14. Howell W.M. and Black D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloid developer: I-step method. *Experientia*, 1980, v. 8, p. 1014–1015.
15. Öfner D. and Schmid K.W. Standardized AgNOR analysis: its usefulness in surgical oncology. *Histochem. Cell Biol.*, 1996, v. 106, p. 193–196.

Поступила в редакцию 02.02.10

Получена после доработки 15.04.10

MODIFIED METHOD FOR THE DEMONSTRATION OF ARGYROPHILIC PROTEINS IN THE NUCLEOLAR ORGANIZER REGIONS IN PARAFFIN SECTIONS

I.P. Bobrov, A.M. Avdalyan, T.M. Cherdantseva, V.V. Klimachyov, A.F. Lazarev, V.M. Briukhanov, V.S. Doroshenko, V.Ya. Gervald, A.Yu. Dolgatov and M.V. Kovrigin

The modified method of staining of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) by silver nitrate is presented. This modification eliminates some disadvantages of an original technique. The method accelerates staining and prevents the precipitation of deposits.

Key words: *nucleolar organizer regions, silver nitrate staining*

Central Morphological Laboratory, Altai State Medical University; Division of Molecular Research Methods, Altai Branch of N.N. Blokhin Russian Oncological Scientific Center, Barnaul