



ліквору. Отож динамічні зміни лазерних характеристик ППЛ показали ефективність методу у часовому моніторингу посмертних змін молекулярних комплексів ендогенних флуорофорів з метою визначення ДНС.

Давиденко І.С.

МОДИФІКАЦІЯ ГІСТОХІМІЧНОЇ МЕТОДИКИ НА «КИСЛІ» ТА «ОСНОВНІ» БІЛКИ ЗА MIKEL CALVO ДЛЯ МОЖЛИВОСТІ ЇЇ ЗАСТОСУВАННЯ НА ГІСТОЛОГІЧНИХ ЗРІЗАХ, МАЗКАХ КРОВІ ТА ПРЕПАРАТАХ-ВІДБИТКАХ

Кафедра патологічної анатомії

Вищий державний навчальний заклад України

«Буковинський державний медичний університет»

Гістохімічна методика на «кислі» та «основні» білки з бромфеноловим синім за Mikel Calvo (Мікель Кальво) придатна для оцінки змін у білках, коли міняється співвідношення між аміно- та карбоксильними чи гідроксильними групами в них, наприклад, при окиснювальній модифікації білків, при неферментативному чи ферментативному глікозуванні (глікуванні) протеїнів, при гідроксилуванні проліну та лізину в колагені в процесі його дозрівання, або при порушеннях синтезу білків зміненим геномом клітини (пухлинні клітини, клітини при тезаурисмозах-протеїнозах). Якісна оцінка може бути проведена візуально по певним особливостям забарвлення, а кількісна оцінка здійснюється методом комп'ютерної мікроспектрофотометрії.

Оригінальну процедуру гістохімічної методики на «кислі» та «основні» білки з бромфеноловим синім за Mikel Calvo (1957) можна знайти в книзі українського видавництва «Кононский А.И. Гистохимия. - Киев: Вища школа, 1976. - 278 с.» на сторінці 104. Методика виконується або на фіксованих заморожених зрізах, або на парафінових чи целоїдинових зрізах після попередньої фіксації в 10% нейтральному забуференому розчині формаліну чи в рідині Карнуа і включає такі етапи обробки скелець: 1. Зрізи беруть з води, фарбують 2-10 хвилин (для стандартизації слід застосовувати – 8 хвилин) у розчині «А» (21 мл етанолу, 9 мл крижаної оцтової кислоти, 0,03 г бромфенолового синього) або (56 мл етанолу, 24 мл крижаної оцтової кислоти, 0,08 г бромфенолового синього). 2. Диференціюють кожне скло окремо доти, поки не відійдуть жовто-зелені хмаринки фарби у розчині «В» (21 мл етанолу, 9 мл дистильованої води, 0,3 мл крижаної оцтової кислоти). 3. Зневоднювання в спиртах (етанолі) або ацетоні. Ксилол. Полістирол.

Результат забарвлення: «основні» білки – блакитні та сині тони, «кислі» білки – червоний, жовтий і зелений колір. Зазначена характеристика забарвлення підходить для візуальної оцінки, а для кількісної оцінки методом комп'ютерної мікроспектрофотометрії найбільш придатне співвідношення між величинами червоного та синього спектрів забарвлення шляхом обрахування коефіцієнту R/B (від англ. "Red" / "Blue").

Вишеказана оригінальна процедура добре працює на гістологічних парафінових чи целоїдинових зрізах, але непридатна для використання на мазках крові, препаратах відбитках чи нефіксованих заморожених зрізах з причини негативного впливу на біологічні структури високої концентрації кислоти в робочому розчині барвника, що призводить до повного або часткового руйнування клітин. Спроби працювати з буферними розчинами не дають позитивного результату.

Однак, нами винайдена така модифікація методики Mikel Calvo, яка придатна як для класичних гістологічних парафінових чи целоїдинових зрізів, так і для нефіксованих чи фіксованих мазків крові, препаратів-відбитків та заморожених зрізів.

Головним принципом даної модифікації є відмова від кислоти в робочому розчині барвника та в диференціюючому розчині. Однак, це не просто відмова від кислоти, а забезпечення реалізації хімізму реакції шляхом певних нюансів передобробки (рідина/реактив до робочого розчину барвника) та постобробки (рідина /реактив після робочого розчину барвника – диференціюючий розчин). Головна задача передобробки та постобробки – виключити потрапляння води чи кислоти в препарати.

Отже, гістологічні парафінові зрізи після депарафінізації в органічному розчиннику (ксилол, хлороформ, толуол тощо) промивають від органічного розчинника в двох порціях 96-градусного етанолу (по 5-10 хвилин в кожній порції), а мазки крові, препарати-відбитки чи заморожені зрізи спочатку ретельно висушують, а потім занурюють на 5 хвилин у 96-градусний етанол.

Далі процедура виконується за однаковим сценарієм: 1. Зрізи, мазки, препарати-відбитки беруть з 96-градусного етанолу, фарбують 8 хвилин у робочому розчині барвника (80 мл 96-градусного етанолу, 0,08 г бромфенолового синього). 2. Зрізи обробляють у двох порціях 96-градусного етанолу по 5 хвилин у кожній порції. Дуже важливо перед обробкою в етанолі не висушувати зрізи чи не обробляти їх рідинами, які містять воду або ж кислотою, інакше це може змінити хімізм реакції. Обробка в етанолі є процедурою диференціювання (вимиванням барвника з місць неспецифічного забарвлення), тобто є заміною процедури диференціювання в розчині «В» в оригінальному прописі методики за Mikel Calvo. 3. Зрізи промивають у двох порціях чистого ксилолу по 5-10 хвилин у кожній порції (вимивають етанол), після чого заключають у полістирол.

Заключення пофарбованих препаратів у полістирол є необхідним для фіксації результатів фарбування, щоби в препаратах не відбувалися випадкові хімічні реакції при подальшому збереженні пофарбованих препаратів, наприклад, при впливові кисню повітря. Варто зазначити, що не можна здійснювати закличення препаратів у канадський бальзам, бо він є кислим середовищем і здатний поміняти результати забарвлення.

Отже, застосування вказаної модифікації методики Mikel Calvo дозволяє виконати гістохімічну реакцію на «кислі» та «основні» білки не тільки на гістологічних парафінових чи целоїдинових зрізах, але і на мазках,



препаратах-відбитках і заморожених зрізах. Модифікація не є складною, а при застосуванні її на гістологічних парафінових зрізах навіть значно спрощує виконання всіх процедур у порівнянні з оригінальним прописом Mikel Calvo.

Давиденко І.С.

ТЛУМАЧЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ГІСТОХІМІЧНОЇ МЕТОДИКИ НА «КИСЛІ» ТА «ОСНОВНІ» БІЛКИ ЗА MIKEL CALVO (УЗАГАЛЬНЕННЯ ПОПЕРЕДНІХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ПЕРСПЕКТИВИ)

Кафедра патологічної анатомії

Вищий державний навчальний заклад України

«Буковинський державний медичний університет»

Опис гістохімічної методики на «кислі» та «основні» білки з бромфеноловим синім за Mikel Calvo (Мікель Кальво) можна знайти в книзі українського видавництва «Кононський А.І. Гистохимия. - Киев: Вища школа, 1976. - 278 с.» Методика виконується або на фіксованих заморожених зрізах, або на парафінових чи целоїдинових зрізах після попередньої фіксації в 10% нейтральному забуференому розчині формаліну чи в рідині Карнуа. Нами розроблена модифікація на «кислі» та «основні» білки за Mikel Calvo, яка придатна для виконання окрім на фіксованих заморожених зрізах, або на парафінових чи целоїдинових зрізах також і на мазках, препаратах-відбитках (нефіксованих чи фіксованих), а також на нефіксованій тканині заморожених зрізів (вироблених у мікротомі-кріостаті).

Сутність методики полягає в тому, що бромфеноловий синій при дотриманні певних процедур фарбування диференційовано забарвлює «кислі» та «основні» білки. Зокрема, «основні» білки забарвлюються в блакитні та сині тони, «кислі» білки – в червоний, жовтий і зелений кольори. Зазначена характеристика забарвлення підходить для візуальної оцінки, а для кількісної оцінки методом комп'ютерної мікроспектрофотометрії найбільш придатне визначення співвідношення між величинами червоного та синього спектрів забарвлення шляхом обрахування коефіцієнту R/B (від англ. "Red" / "Blue").

Згідно до оригінального тлумачення Mikel Calvo (1957), «кислі» білки, це ті білки в яких переважають карбоксильні групи над аміногрупами, а «основні» білки, це ті білки, в яких переважають аміногрупи над карбоксильними групами.

Перше, що слід враховувати при тлумаченні результатів методики Mikel Calvo це те, що в реальних об'єктах тканин білки зустрічаються, як правило, у складі «сумішей». Тому, при виконанні методики Mikel Calvo забарвлення завжди має плавні переходи і за спектральними характеристиками, і за інтенсивністю. Це є підставою для застосування кількісних досліджень.

Зміни в співвідношенні між «кислими» та «основними» білками можуть з'являтися при інтенсифікації процесів окиснювальної модифікації білків. Ці процеси, як відомо, характеризуються окисненням аміногруп амінокислот білків, що призводить до порушення співвідношення між вказаними функціональними групами на користь карбоксильних груп і при застосуванні методики Mikel Calvo буде відзначатися переважанням червоного компонента спектру, що видно буде по зростанню величини коефіцієнту R/B, який в рамках даного тлумачення буде мірою окиснювальної модифікації білків. На користь такого тлумачення нами в попередніх дослідженнях (починаючи з 2003 року) отримано багато доказів, які ґрунтуються як на встановлених фактах зростання інтенсивності вільнорадикальних процесів (особливо цінна інформація була отримана при застосуванні методу хемілюмінесценції з люмінолом на нітропероксидази в конкретних мікроскопічних об'єктах – клінічні дослідження) так і на експериментах, коли в печінці проводили паралельне дослідження окиснювальної модифікації білків біохімічним методом (в гомогенатах печінки). Даний метод добре себе показав в ситуаціях, коли має місце зростання інтенсивності вільнорадикальних процесів – при запаленні, гіпоксії, експериментальних отруєннях (дослідження Давиденко І., Мешішен І., Шендерюк О., Ленга Е., Давиденко О., Дікал М., Іліка В. – 2003-2016).

Однак, до змін у співвідношенні між «кислими» та «основними» білками може призвести не тільки інтенсифікація процесів окиснювальної модифікації білків, але й інші процеси.

Зокрема, такі процеси, як неферментативне та ферментативне глікозування (глікування) протеїнів вже на ранніх етапах спричиняє в першу чергу перетворення аміногруп білків, що призводить, так само як і при окиснювальній модифікації білків, до переважання «кислих» білків над «основними» білками. Це показано як на різному матеріалі клінічних досліджень (Пашковська Н., Давиденко І., Федів О., Оліник О., Сіуїнська І. – 2008-2016), так і особливо переконливо – на матеріалі спеціально планових для цих цілей експериментальних досліджень по стептозотациніндукованому цукровому діабету (Бойчук Т., Грищук М., Давиденко І. – 2013-2016).

Якщо дослідник має справу з матеріалом, коли порушений геном клітини (пухлинні клітини, клітини при тегаурисмозах-протеїнозах), то клітини з порушеним геномом гіпотетично можуть продукувати білки зі змінним співвідношенням між «кислими» та «основними» білками, причому співвідношення може мінятися в будь-який бік, залежно від конкретних особливостей порушень у геномі. Зокрема, такі дослідження проведені на клінічному матеріалі (Пересунько О., Давиденко І., Бозан Адель Бакко, Зелінська П., Мойсюк Т., Лазарук О. – 2009-2016), а для експериментального матеріалу перспектива таких досліджень знаходиться у стадії обговорення (Івашук О., Бодяка В., Давиденко І., Гушул І. – 2016). Щодо тегаурисмозів-протеїнозів, то на даний момент у нас не було можливості отримати придатний для застосування методики клінічний чи експериментальний матеріал.