

ТІНКТОРІАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ ХОРІОНА ЛЮДИНИ НА ДОСОМІТНОМУ ЕТАПІ ЕМБРІОГЕНЕЗУ ПРИ КОНТРАСТУВАННІ ЗА МЕТОДОМ АВ Н&Е

©М.П. Барсуков, А.І. Брусіловський, О.Ю. Шаповалова, Г.О. Юнсі,
Н.М. Романенко, О.М. Барсуков

Кримський державний медичний університет ім. С.І. Георгієвського

РЕЗЮМЕ. Наведено дані із вивчення особливостей контрастування структурних компонентів хоріона людини на досомітному етапі ембріонального розвитку за методом АВ Н&Е, порівняно із забарвленням мікропрепаратів гематоксиліном і еозином, в традиційній послідовності і амідно-чорним 10В. Показано, що метод АВ Н&Е є специфічним для ідентифікації сполучень, що містять амфотерні білки, які у великій кількості присутні в трофобласті хоріона людини вже на 17-ту добу ембріогенезу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: хоріон людини, гістологія, методи фарбування.

Вступ. В останні роки з'явилися нові методи морфологічних досліджень, що дозволили в деяких випадках досконало по-новому оцінювати колишні досягнення у області цито- і гістоморфології, які здавалося б раніше претендували на роль аксіоми. Яскравим прикладом цьому служить заперечення одного із способів репродукції клітин - амітозу, існування якого ще донедавна вважалося непорушним. Все ширше упроваджуються в практику гістологічних досліджень методи імуноцитохімії, що дозволяють виявляти якнайтонші механізми внутрішньоклітинних перетворень на генному рівні в процесі диференціювання і функціонального становлення клітин, визначати терміни експресії окремих генів і початку їх роботи, з високою достовірністю встановлювати діагноз при патологічних станах [1]. Проте досить висока вартість реактивів, які застосовуються для імуноцитохімічних досліджень, є стримувальним чинником їх використання в гістологічній практиці.

Разом з тим ще не повною мірою оцінені можливості, порівняно недорогих фарбників гематоксиліну і еозину, які одержали заслужене визнання морфологів. Гематоксилін, будучи ядерним фарбником, дозволяє виявляти кислі структури клітин і проміжної речовини, вловлювати досить тонкі відтінки контрастованих елементів, відмінних між собою на вельми незначні величини значень рН середовища. Еозин, який використовують після гематоксиліну, вступає в реакцію з основними компонентами цитоплазми клітин і проміжної речовини тканин, головними серед яких є структурні білки. При цьому, залежно від величин значень рН середовища, він може давати різну кольорову гаму [2]. Отже, теоретично його можна використовувати для аналізу не тільки якісного, але і кількісного складу тканинних компонентів, чому донедавна не надавалося особливого значення.

Один з авторів даного повідомлення [3-6] зробив спробу перевірити це на практиці, змінивши при цьому традиційну послідовність фарбування мікропрепаратів гематоксиліном і еозином. Одні з серійних зрізів були контрастовані цими фарбниками в традиційній послідовності, а інші - навпаки.

Результати фарбування мікропрепаратів спочатку еозином, а потім гематоксиліном перевершили всі очікування - структури набули абсолютно інший більш насичений колорит. Мало того, як в цитоплазмі, так і в міжклітинній речовині виявляли забарвлені компоненти, які при застосуванні фарбників в звичайній послідовності не виявляли. Даний метод, про який ми повідомляли раніше [7, 8], був запатентований в США як "Спосіб контрастування гістологічних зрізів АВ Н&Е". Автором запропоновано універсальний набір реактивів, який дозволяє забарвлювати мікропрепарати експрес-методом [6], що істотно прискорює отримання кінцевого результату і є вельми цінним при cito-діагностиці, у тому числі і під час проведення хірургічних втручань (докладні консультації із застосування методу можна одержати по E-mail: arkbruhist@aol.com).

Виникає питання: чим же може бути обумовлений такий феномен? Відповідь, ми вважаємо, полягає у тому, що багато органічних сполук, до складу яких входять амінокислоти, є амфотерними, тобто залежно від значень рН середовища вони можуть проявляти або кислотні, або лужні властивості.

При контрастуванні гістологічних зрізів гематоксиліном і еозином в традиційній послідовності гематоксилін зв'язується не тільки нуклеїновими кислотами і нуклеопротеїдами, але і карбоксильними групами амінокислот, що входять до складу різних білків, які мають амфотерні властивості. Мабуть, одночасно з цим здійснюється блокуван-

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, короткі повідомлення, замітки з практики

ня й їх аміногруп, тому вони не можуть вступати в реакцію з кислим фарбником еозином, який застосовують після гематоксиліну. Якщо ж еозин використовується як перший фарбник, то він повною мірою реагує зі всіма хімічними групами, значення рН яких вище 7.0.

Мета дослідження - зіставлення результатів контрастування мікропрепаратів за методом АВ Н&Е з їх фарбуванням гематоксиліном і еозином (г.-е.) в звичайній послідовності і іншими методами фарбування для ідентифікації білків.

Матеріал і методи дослідження. Матеріалом дослідження були парафінові зрізи плодового міхура 17-добового зародка людини "Крим", тиінкторіальні особливості структур якого при фарбуванні гематоксиліном і еозином в традиційній послідовності і використуванні ряду цитохімічних реакцій детально описані в наших попередніх публікаціях [9-11].

Результати й обговорення. Плодова оболонка людини на 17-ту добу ембріогенезу утворена хоріальною пластинкою з численними вторинними і третинними ворсинками, які дихотомічно гілкуються (рис. 1). Строма хоріона представлена позазародковою сполучною тканиною, основними клітинними елементами якої

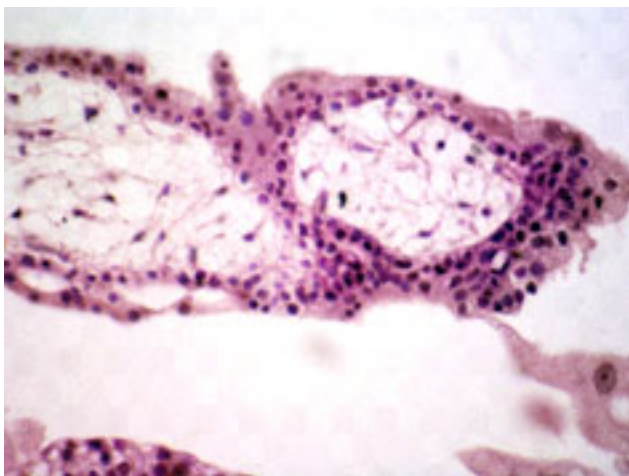


Рис. 1. Фрагмент плодової оболонки 17-добового зародка людини. Г.-е. Зб.: об. 40, ок. 10.

є фіброласти і невелика кількість круглих клітин Кашенко-Хофбауера. Цитоплазма цих клітин при фарбуванні гематоксиліном і еозином в традиційній послідовності проявляє слабовиражену базофілію, а при застосуванні амідочорного 10В виявляє в ній білок. Основна речовина міститься у вигляді компонентів, що коагулювали. Вона також забарвлюється гематоксиліном і проявляє метакромазію з толуїдиновим синім при значеннях рН нижче 4.0. Між клітками виявляють аргірофільні волокна, що містять в дос-

татній кількості загальний білок. Структури основного компонента міжклітинної речовини відносно еозину практично негативні.

Хоріальна пластинка і ворсинки покриті двохаровим трофобластом. Внутрішній його шар - цитотрофобласт - утворений великими клітинами з помірно забарвленими гематоксиліном ядрами, тоді як їх цитоплазма контрастується значно слабше. Зовнішній шар - симпластотрофобласт - містить численні ядра, розміри яких менші, ніж в клітинному шарі. Протоплазма симпласта інтенсивно забарвлюється гематоксиліном. Характерною особливістю цитоплазми клітин і симпластотрофобласта є те, що вона не сприймає еозин. При фарбуванні амідочорним 10В в цитоплазмі клітинного шару трофобласта виявляється вельми слабке фарбування на загальний білок, тому вони виглядають дуже світлими, тоді як протоплазматичні компоненти симпластичного шару містять досить велику його кількість. Загальний білок виявляється і в щітковій облямівці симпластотрофобласта.

Фарбування мікропрепаратів за методом АВ Н&Е, порівняно з традиційним фарбуванням г.-е., дає абсолютно іншу картину, яка дуже схожа з такою при забарвленні амідочорним 10В. (рис. 2 і 3). Стромальні структури хоріона виглядають контрастнішими. У фібробластих значно чіткіше і на більшому протязі простежуються цитоплазматичні відростки. Від них відходять ще тонші відгалуження, які не виявляються при традиційному фарбуванні г.-е. Вони контактують між собою і разом з волоконними компонентами утворюють ніжну сітку. До речі, волоконні структури при традиційному фарбуванні г.-е. фактично не виявляються. Значно чіткіше визначається стінка судинних щілин і гемокапілярів, навколо яких

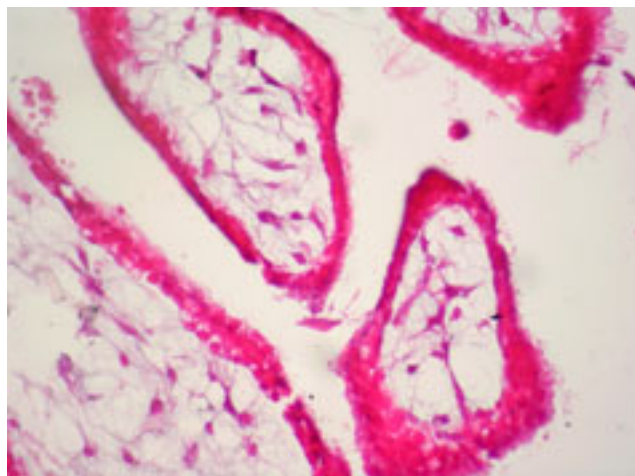


Рис. 2. Фрагмент плодової оболонки 17-добового зародка людини. АВ Н&Е. Зб.: об. 40, ок. 10.



Рис. 3. Фрагмент плодової оболонки 17-добового зародка людини. Амідо-чорний 10В. Зб.: об. 40, ок. 10.

виявляють тонкі ободочки гомогенно забарвлених еозинофільних структур.

Трофобластичні елементи відрізняються насиченим бузковим кольором, мабуть, внаслідок одночасної взаємодії їх разом і з еозином, і з гематоксилином. Цитоплазма гігантських клітин трофобласта базофільна. Якщо при фарбуванні г.-е. у звичайній послідовності цитоплазма клітинних елементів трофобласта проявляє слабкопозитивну реакцію з гематоксилином і нега-

тивну з еозином, то при контрастуванні за методом АВ Н&Е в ній виявляють еозинофільні елементи, які створюють дуже ніжну сіточку навколо ядра. Еритроцити материнської крові, що знаходяться в інтервільозному просторі, забарвлюються еозином в яскраво-червоний колір.

Слід погодитися, що еозин, перш за все, зв'язується з аміногрупами амфотерних білків [2], утворюючи еозинати протеїнів [12]. Саме цим можна пояснити вельми інтенсивне зафарбовування трофобласта, який, як відомо, не тільки бере участь в транспорті білків матері до плода, але і активно синтезує їх з амінокислот, які поступають з плазми материнської крові [13], що підтверджено нами при зафарбовуванні мікропрепаратів з цієї ж серії амідо-чорним 10В для виявлення загального білка [10, 11].

Висновок. Таким чином, можна з впевненістю констатувати, що контрастування гістологічних препаратів за методом АВ Н&Е є специфічним для виявлення й ідентифікації структур, що містять амфотерні білки, які не завжди виявляють при використанні гематоксилину і еозину в традиційній послідовності.

Перспективи подальших досліджень. Дослідження в даному напрямку дозволять ширше впроваджувати нові методи гістологічних забарвлень в клінічній практиці.

ЛІТЕРАТУРА

1. Айламазян Э.К., Лапина Е.А., Кветной И.М. Иммуногистохимические критерии оценки функциональной зрелости плаценты // Журнал акушерства и женских болезней. – 2005. – Т. LIV, № 2. – С. 3-8.
2. Хэм А., Кормак Д. Гистология: Пер. с англ. – М.: Мир, 1982. – Т. 1. – С. 35-36.
3. Brusilovskiy A.I. The new phenomenon in histology twin stain – phenotypes of cells: HxЕ and АВ HxЕ // Newsletter (Russian publication). – Los Angeles, 2004, January-June.
4. Brusilovskiy A. Revolutionary new stain АВ HxЕ – discovery for frozen and permanent sections – which brings up amphoteric substances as well as acidophilic and basophilic ones in cyto- and histological sections // II Международная конференция „Молекулярная медицина и безопасность” (20-21 октября 2005 г., Москва, Россия). – М., 2005. – С. 30.
5. Brusilovskiy A.I. New stain АВ H&E – discovery for frozen and permanent sections – Which brings up amphoteric substances as well as acidophilic and basophilic ones in cyto- and histological sections // Current aspects of oncology publications of scientific meeting, dedicated to 60-years of National center of oncology. – Erevan, 2006. – P. 223-224.
6. Brusilovskiy A.I. Eosin-Hematoxylin stain (AB H&E) for frozen and permanent sections: New very reasonable and effective tool in research and surgical pathology diagnostic fields // AJCP. Am. J. Clin. Pathol. – 2006. – V. 126, № 4. – P. 481-662.
7. Брусиловский А.И., Барсуков Н.П., Шаповалова Е.Ю., Юнси Г.А. Метод определения амфотерных соединений в клетках и межклеточном веществе: новый феномен в гистологии // Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения: Тр. Крымск. гос. мед. ун-та им. С.И. Георгиевского. – Том 142. – Ч. I. – Симферополь, 2006. – С. 129-130.
8. Брусиловский А.И., Барсуков Н.П., Шаповалова Е.Ю., Юнси Г.А. Новый этап в развитии принципов гистологической техники: эозин как первый краситель в сочетании с гематоксилином и роль этой окраски в изучении темпов гистогенеза и их органоспецифических особенностей в раннем эмбриональном развитии человека // Таврический медико-биологический вестник. – 2006. – Т. 9. – № 3. – Ч. III. – С. 25-26.
9. Шаповалов Ю.Н., Барсуков Н.П. Морфофункциональная характеристика дефинитивных и провизорных структур нормального 17-дневного зародыша человека // Арх. анат. – 1979. – Т. 77, вып. 9. – С. 25-33.
10. Шаповалов Ю.Н., Барсуков Н.П. Нормальный 17-дневный зародыш человека. Качественная и количественная характеристика белковых компонентов // Арх. анат. – 1981. – Т. 81, вып. 7. – С. 102-110.
11. Шаповалов Ю.Н., Брусиловский А.И., Барсуков Н.П. Специфика распределения белков в ядре и цитоплазме клеток провизорных и дефинитивных струк-

тур ранних зародышей человека // Цитология и генетика – 1982. – Т. 16, № 3. – С. 7-12.

12. Gray Peter (Edit.) The encyclopedia of microscopy and microtechnique. – New York: VNR, 1973. – P. 547-552.

13. Субботин М.Я., Донских Н.В., Брусиловский А.И., Новиков В.Д. Плацента человека // Гистофизиология и гистопатология внезародышевых органов млекопитающих и человека: Тр. Новосиб. мед. ин-т. – Новосибирск, 1971. – С. 3-62.

TINCTORIAL CHARACTERISTICS OF HUMAN CHORION DURING DOSOMYTAL PERIOD OF EMBRYOGENESIS AT STAINING ACCORDING TO AB H&E TECHNIQUE

©M.P. Barsukov, A.I. Brusilovskiy, O.Yu. Shapovalova, H.O. Yunsi, N.M. Romanenko, O.M. Barsukov

Crimean State Medical University by S.I. Heorhiyevsky

SUMMARY. Data on research of characteristics of human chorion's structural components staining according to AB H&E technique during presomital period of embryogenesis in comparison with hematoxylin and eosin staining of micropreparations according to traditional sequence and amido-black 10B had been demonstrated. It also had been revealed that AB H&E technique is specific for identification of amphoteric proteins containing compounds, which are already present in large amounts in human chorion trophoblast on the 17th day of embryogenesis.

KEY WORD: human chorion, histology, staining methods.

УДК: 611.16:611.33.018.25]:57.086.3:616.441-008.6:612.08

УЛЬТРАСТРУКТУРА ЗАЛОЗ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЩУРІВ НА РАННІХ СТРОКАХ ПІСЛЯ ТИРЕОЇДЕКТОМІЇ

©М.А. Безштанько, Л.О. Стеченко, Т.П. Куфтирева, Л.К. Горovenko

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

РЕЗЮМЕ. Електронно-мікроскопічно досліджені залози тіла шлунка 5 щурів з маніфестним гіпотиреозом через 14 діб після тиреоїдектомії та 5 інтактних тварин. Стан маніфестного гіпотиреозу тваринам моделювали шляхом проведення тотальної тиреоїдектомії під кетаміновим наркозом. Було встановлено, що вже на ранніх післяопераційних строках в слизовій оболонці шлунка щурів всі структурні компоненти залоз зазнають різного ступеня виразності зміни. Ці зміни пов'язані саме з нестачею тиреоїдних гормонів, а не з реакцією на післяопераційний стрес. Найбільших ультраструктурних змін зазнають парієтальні клітини, частина з яких гине шляхом апоптозу, а в інших спостерігається редукція внутрішньоклітинних каналців. Ендокринні клітини в цей термін спостережень зазнають менш виразних змін, тобто є більш стійкими до гіпотиреозу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: щури, гіпотиреоз, шлунок, власні залози, електронна мікроскопія.

Вступ. Останнім часом захворювання на гіпотиреоз є одним із найрозповсюдженіших захворювань ендокринної системи [1]. Цей клінічний синдром викликаний довготривалою стійкою недостатністю гормонів щитоподібної залози в організмі чи зниженням їх біологічного ефекту на тканинному рівні. Гіпотиреоз може розвинути як внаслідок безпосереднього ураження залози (первинний гіпотиреоз), так і внаслідок порушення тиреотропної функції гіпоталамо-гіпофізарної системи (вторинний гіпотиреоз) [1]. Гіпотиреоз може бути вродженим чи набутиим [1]. Зниження функції щитоподібної залози істотно впливає на метаболізм білків, ліпідів та вуглеводів, що часто призводить до патології травного тракту та є актуальною проблемою сучасної педіатрії та гаст-

роентерології [2, 3]. Разом з тим, в літературі недостатньо висвітлені питання структурної перебудови різних відділів травної системи і, в першу чергу, шлунка при гіпотиреозі.

Мета дослідження - вивчити ультраструктурні особливості змін залоз слизової оболонки шлунка на ранніх стадіях розвитку післяопераційного гіпотиреозу.

Матеріал і методи дослідження. Дослідження проводили на 10 білих щурах-самках лінії Вістар масою 180-200 г. Утримання та використання лабораторних тварин відповідало "Загальним етичним принципам експериментів на тваринах". Тваринам моделювали стан маніфестного гіпотиреозу шляхом проведення тотальної тиреоїдектомії під кетаміновим наркозом.