

ТРЕХЦВЕТНАЯ ОКРАСКА НА АМИЛОИД

© В. А. Козлов,¹ С. П. Сапожников, П. Б. Карышев

Чувашский государственный университет им. И. Н. Ульянова, Чебоксары, 428010;

¹ электронный адрес: rooh12@yandex.ru

Предложен трехцветный способ окрашивания гистологических срезов для выявления соединительнотканых волокон, мест локализации амилоида и увеличения цветового контраста. После инкубации в растворе ацидин-пепсина срезы депарафинируют и окрашивают последовательно пикрофуксином по Ван Гизону с докрасиванием ядер гематоксилином, Конго красным и пикро-индиго-кармином. В результате амилоид, связанный с коллагеновыми волокнами, окрашивается в кирпично-красный цвет, коллагеновые и ретикулиновые волокна, не связанные с амилоидом, — в сине-зеленый, цитоплазма клеток, не содержащих амилоида, — в желтый. Трехцветный способ окраски органов, пораженных амилоидозом, более информативен для анализа органов, пораженных амилоидозом, чем окраска только Конго красным.

Ключевые слова: амилоид, пикро-индиго-кармин, Конго красный, пикрофуксин по Ван Гизону, гематоксилин.

Принятые сокращения: КК — Конго красный.

Выявление амилоида в тканях с помощью окрашивания Конго красным (КК) остается золотым стандартом диагностики амилоидного поражения тканей (Sipe et al., 2016). Тем не менее этот метод не лишен ряда недостатков, ограничивающих его применение в экспериментальных исследованиях амилоидозов. Так, сочетание окраски неизменного коллагена пикрофуксином по Ван Гизону не позволяет сочетать этот метод с окраской КК в силу одинакового цвета красителей. Кроме того, окрашивание КК не позволяет выявить долю коллагеновых волокон в строме органа, ассоциированных с амилоидом. Существует несколько способов окраски срезов КК, каждый из которых имеет некоторые преимущества, но не решает главных противоречий этого метода исследования. Поэтому предпринимаются все новые попытки улучшить этот метод окрашивания амилоида. В частности, эти попытки обусловлены необходимостью устранения мешающего влияния коллагена, который, как и амилоид, является двулучепреломляющим объектом (Bély, Makovitzky, 2006). Кроме того, установлено, что амилоид в растворе при нейтральных значениях pH в результате взаимодействия с гепарином образуется быстрее, если в среде присутствуют коллагеновые волокна (Relini et al., 2008). Связывание белка-предшественника амилоида с коллагеном I и в меньшей степени IV типа по гепарин- или Zn-связывающим сайтам *in vitro* показано, например, в работе Бехера с соавторами (Behrer et al., 1996), что объясняет тропность амилоида к коллагенам в организме. Возможно, коллаген является матрицей для осаждения амилоидных одноосевых нанокристаллов.

Между тем классические подходы к окрашиванию амилоида не позволяют оценить на гистологическом препарате, связан ли амилоид с коллагеном и все ли коллаген-

новые волокна ассоциированы с амилоидом, хотя данная информация очень важна для количественной оценки тяжести амилоидного поражения.

Таким образом, целью настоящей работы стала разработка способа окраски гистологических срезов, позволяющая выявить точную локализацию осаждения амилоида на соединительнотканые волокна и увеличить цветовой контраст препаратов.

Материал и методика

Препараты селезенки человека с посмертно доказанным амилоидозом предоставлены бюро судебно-медицинской экспертизы по Чувашской Республике. Свободноплавающие 5-микронные парафиновые срезы депротенизировали путем инкубации в течение 2 ч в растворе препарата ацидин-пепсина при pH 4 (400 мг бетанина и 10 мг пепсина свиного на 100 мл воды) и 25 °C, затем монтировали их на предметные стекла и депарафинизировали.

Срезы окрашивали последовательно пикрофуксином по Ван Гизону, гематоксилином, КК (DIAPATH, Италия) по Х. Х. Бенхольду (Саркисов, Перов, 1996) и пикро-индиго-кармином (Саркисов, Перов, 1996), после чего заделывали в прозрачную среду. Для сравнения часть срезов окрасили без предварительной инкубации в ацидин-пепсине. Микрофотографии получены с помощью цифровой камеры Levenhuk C800 NG 8M, USB 2.0. Площади закрашивания выделенным цветом измеряли в Photoshop CS6 Extended.

Использованные реактивы: ацидин-пепсин (РУП Белмедпрепараты, Белоруссия); индиго-кармин вы-

сокоцистый (AC15744-0250, Югреактив, Россия); Конго красный (DIAPATH, Италия); пикриновая кислота (Таурус плюс, Россия); фуксин (Приокская Компания, Россия).

Результаты и обсуждение

Амилоид представляет собой надмолекулярную структуру — одноосевой кристалл, образуемый 6-олигопептидами, соединяющимися путем самосборки в нанотрубку (Serio et al., 2000). Гексапептиды амилоида собираются в кольца, которые затем организуются в фибриллы. При этом атомы одинаковых по химическому строению и порядковому номеру в цепи аминокислот выстраиваются в точности друг против друга, что характерно для кристаллов. По этой причине сборка амилоидной фибриллы может осуществляться несколькими способами. Фрагменты длиной 38—42 аминокислотных остатка вычлняются из белка предшественника путем —С—С— протеолиза (при этом разрыв пептидной цепи происходит не путем гидролиза пептидной связи, а между альфа-углеродным атомом и последующим за ним углеродным атомом карбоксильной группы) и уже в таком виде собираются в нанотрубку либо гексамеры без вычленения из белка-предшественника собираются в нанотрубку, которая оказывается соединенной с N- и C-концевыми фрагментами белка или белков-предшественников. В этом случае нанотрубка оказывается экранированной белками и труднодоступной для красителя. Эти фрагменты, вероятно, в условиях *in vivo* частично подвергаются протеолизу, но могут проявлять антигенные свойства, и именно это обстоятельство позволяет выявлять амилоид иммуногисто-

химическими методами. Еще один возможный способ — сборка 38—42 фрагментов из 6-олигопептидов, выделенных путем протеолиза из белков-предшественников.

Известно, что при иммуногистохимических реакциях доступ антитела к антигену нередко затруднен вследствие образования дополнительных пептидных связей между антигеном и белками в процессе фиксации препаратов формалином, что уменьшает интенсивность окраски. Эту проблему решают с помощью предварительной обработки (30 мин) срезов тканей 0.1%-ным раствором трипсина и 0.1%-ным раствором хлорида кальция в 0.05 М Трис-НС1-буфере в изотоническом растворе хлорида натрия, рН 7.6 (Саркисов, Перов, 1996). Также возможна обработка срезов 0.05%-ным раствором трипсина (рН 7.4) в течение 30—60 мин при 37 °С (Саркисов, Перов, 1996). Такая обработка удаляет лишние пептидные связи и увеличивает связывание антигена с антителами. По аналогии с описанной технологией нами разработана методика предварительной депротеинизации парафиновых срезов перед их окрашиванием.

Результаты окрашивания параллельных срезов органов, пораженных амилоидозом, показаны на рис. 1. На депротеинизированных срезах отмечается увеличение яркости окрашивания КК в соединительнотканых септах селезенки (рис. 1, б) и стенках артерий (рис. 1, з) и одновременно уменьшение неспецифического окрашивания ткани. По этой причине клеточные ядра, окрашенные гематоксилином, выглядят ярче, соответственно площадь закрашивания ядер гематоксилином без депротеинизации составляет 2.46 %, а на параллельном срезе после депротеинизации — 12.62 %. Площадь положительной реакции на амилоид составляет 61.7 (рис. 1, а) и 20 (рис. 1, б) %

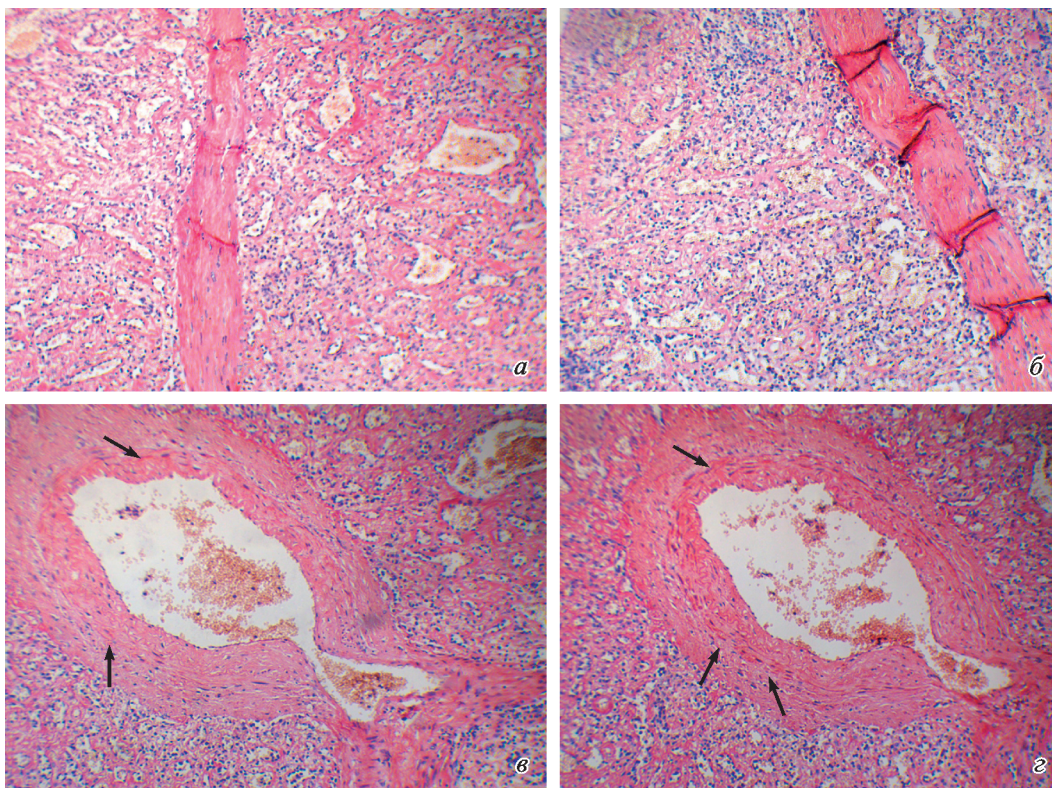


Рис. 1. Гистологическая картина срезов селезенки (а, б) и сосуда эластического типа (в, з) человека, окрашенных Конго красным, без предварительного депротеинизирования (а, в) и после него (б, з).

Увел. 100×. Стрелками отмечены амилоидные отложения.

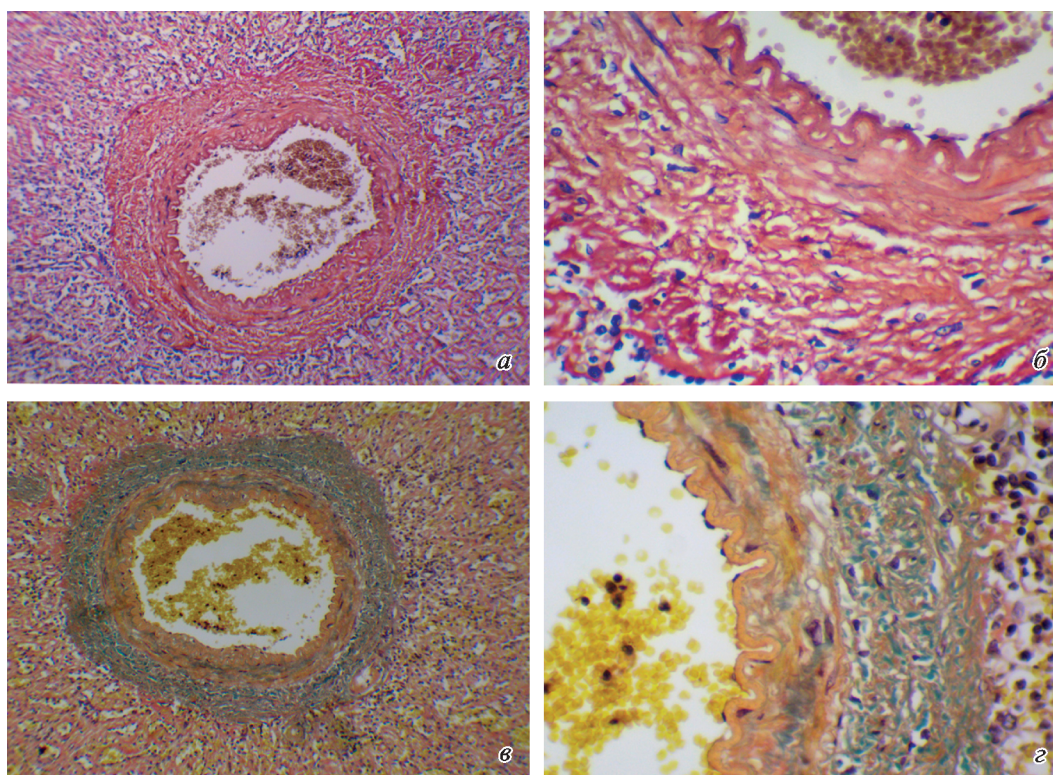


Рис. 2. Гистологическая картина срезов артерии человека, пораженной амилоидозом, окрашенных Конго красным (а, б) и трехцветным способом (в, з), при разном увеличении: 100× (а, в) и 400× (б, з).

Здесь и на рис. 3 фиолетовым цветом окрашены ядра клеток, голубым — индиго-положительные коллагеновые волокна, не связанные с амилоидом, красно-оранжевым — коллагеновые волокна, связанные с амилоидом и Конго-положительные амилоидные отложения.

соответственно, т. е. площадь окрашивания КК после депротенинизации уменьшается в 3 раза. Данный результат можно расценивать как снижение неспецифического окрашивания.

Также хорошо видно различие плотности окраски КК отложений амилоида в стенку артерии эластического типа в селезенке без депротенинизации (рис. 1, в) и после ее проведения (рис. 1, з). Отложения амилоида видны в интима, средней оболочке и адвентиции. Препарат после депротенинизации окрашен более равномерно, четче видна локализация амилоидных отложений (отмечены стрелками).

Известно, что образование амилоидного вещества при ряде патологий происходит вне клеток и тесно связано с волокнами соединительной ткани — ретикулярными или коллагеновыми: выделяют периретикулярный и периколлагеновый амилоидозы. Однако широко применяемые гистологические способы окраски (КК, генциановым фиолетовым, тиофлавином S или T) не позволяют выявить, рядом с какими волокнами — ретикулярными или коллагеновыми — локализован амилоид, что ограничивает экспериментальное изучение и патофизиологическое понимание этих патологий. Поскольку амилоид является надмолекулярной структурой — кристаллической нанотрубкой диаметром 7.5 и длиной до 800 нм (Serio et al., 2000), он по своим метрическим и физическим свойствам похож на коллаген. По этой причине при изучении гистологических срезов органов с амилоидным поражением возникает задача тонкой дифференцировки амилоидных и коллагеновых фибрилл.

Такое разделение может быть осуществлено при окрашивании КК с последующей докраской пикро-индиго-

кармином, которая выявляет компоненты соединительной ткани, содержащие в своем составе близко расположенные гликолевые или амингидроксильные группы, т. е. ретикулярные волокна (Agend, Kolts, 2002). Раздельное окрашивание разными красителями с последующим совмещением микрофотографий в графических редакторах требует применения технологии параллельных срезов и поэтому очень трудоемко и не может быть использовано в широкой клинической практике. Поэтому технологически более простым способом является последовательное окрашивание одного среза для выявления по-разному окрашенных объектов. Следует заметить, что при этом увеличивается цветовой контраст срезов, что облегчает процесс их чтения.

На рис. 2, а, б представлен срез селезенки, окрашенный КК, а на рис. 2, в, з — последовательный срез ее после трехцветного окрашивания по разработанной нами методике. Во втором случае хорошо выявляется дифференциация окрашивания, очевидно вследствие различия сродства коллагеновых волокон к использованным красителям. Так, в стенке артерии интима окрашивалась КК в срединной оболочке (площадь закрашивания 24.3 %), в адвентиции часть волокон была КК-положительной (площадь закрашивания 25 %), а часть — индиго-положительной (площадь закрашивания 3.1 %). Таким образом, поскольку КК окрашиваются коллагеновые волокна, связанные с амилоидом, а индиго-кармином — свободные от амилоида, данный способ окраски позволяет выявить коллагеновые волокна, не связанные с амилоидом.

На рис. 3 представлен край селезенки, включающий в себя капсулу и отходящую от нее септу. При традиционном окрашивании КК в нем также выявляются отложения

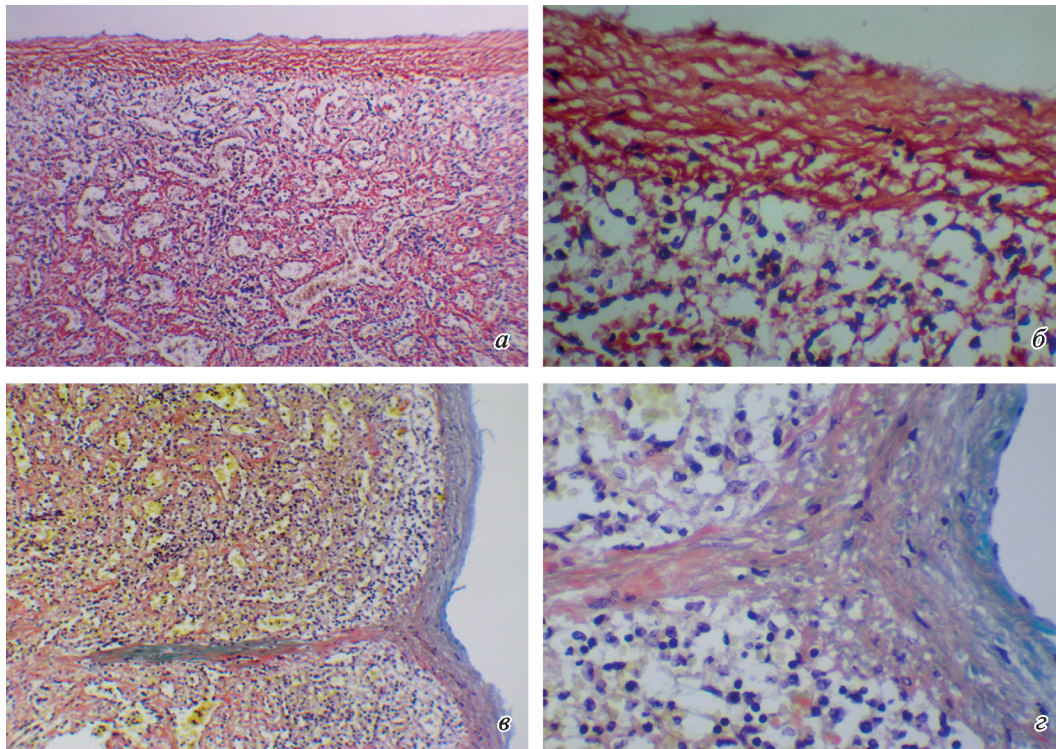


Рис. 3. Гистологическая картина срезов капсулы и септы селезенки человека, пораженной амилоидозом, окрашенных Конго красным (а, б) и трехцветным способом (в, г), при разном увеличении: 100× (а, в) и 400× (б, г).

амилоида (рис. 3, а, б). При трехцветном способе окрашивания можно отметить, что микроструктура отложений амилоида соответствует направлению коллагеновых волокон, причем отложения достаточно однородны, без изменения плотности окраски по поверхности среза. В капсуле селезенки наружные слои окрашены исключительно индиго-кармином (площадь окрашивания 43.4 %), а внутренние — КК (площадь окрашивания 52.3 %) (рис. 3, в). В септе участки, окрашенные КК, чередуются с окрашенными индиго (рис. 3, г).

Полученная картина трехцветной гистологической окраски позволяет предположить, что часть коллагеновых волокон не связывается с амилоидом, по крайней мере в сосудах эластического типа и соединительнотканых септах чередование коллагеновых волокон, связанных с амилоидом и не связанных с ним, происходит преимущественно однородными слоями. Поскольку предполагается, что амилоид поступает в ткани из просвета сосудов, при одинаковой тропности коллагеновых волокон разного типа к амилоиду должна бы наблюдаться картина диффузного окрашивания стенки сосуда. Но поскольку наблюдается чередующееся послойное окрашивание, можно предполагать, что коллаген не всех типов является матрицей для осаждения амилоида.

Таким образом, в настоящей работе наглядно показаны преимущества трехцветного метода, выявляющего как амилоидные массы, так и неизмененные коллагеновые волокна. Кроме того, окрашивание по данному методу позволило обнаружить тончайшие индиго-положительные волокна в местах, соответствующих ретикулярной строме селезенки, которые не визуализируются при окраске по Ван Гизону. Т. е. данный способ окраски является более чувствительным по сравнению с методом Ван Гизона. Предлагаемый способ трехцветного окрашивания

может быть назван ПфКойн — Пикринофуксин, Конго, Индигокармин.

Разработанная нами трехцветная окраска срезов органов, подвергшихся амилоидному поражению, позволяет увеличить цветовой контраст, выявить тонкую ультраструктуру соединительнотканного матрикса, разделить области колокализации амилоида и коллагеновых волокон, что делает этот метод более информативным, чем окраска только КК.

Список литературы

- Саркисов Д. С., Перов Ю. Л.* 1996. Микроскопическая техника: руководство. М.: Медицина. 544 с. (*Sarkisov D. S., Perov Yu. L.* 1996. Microscopic technique: Manual. Moscow: Medicine. 544 p.)
- Arend A., Kolts I.* 2002. Carmine-picroidigo-carmine: an alternative multiple staining method. *Ann. Anat.* 184 : 149—152.
- Behr D., Hesse L., Masters C., Multhaup G.* 1996. Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *J. Biol. Chem.* 271 : 1613—1620.
- Bely M., Makovitzky J.* 2006. Sensitivity and specificity of Congo red staining according to Romhanyi. Comparison with Puchtler's or Bennhold's methods. *Acta Histochem.* 108 : 175—180.
- Relini A., DeStefano S., Torrassa S., Cavalleri O., Rolandi R., Gliozzi A., Giorgetti S., Raimondi S., Marchese L., Verga L., Rossi A., Stoppini M., Bellotti V.* 2008. Heparin strongly enhances the formation of beta2-microglobulin amyloid fibrils in the presence of type I collagen. *J. Biol. Chem.* 283 : 4912—4920.
- Serio T. R., Cashikar A. G., Kowal A. S., Sawicki J., Moslehi J. J., Serpell L., Arnsdorf M. F., Lindquist S. L.* 2000. Nucleated conformation conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science.* 289 : 1317—1321.

Sipe J. D., Benson M. D., Buxbaum J. N., Ikeda S. I., Merlini G., Saraiva M. J., Westermarck P. 2016. Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification

International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid*. 23 : 209—213.

Поступила 22 V 2017

THREE-COLORED STAINING METHOD OF AMYLOID

V. A. Kozlov,¹ S. P. Sapozhnikov, P. B. Karyshev

Chuvash State University named after I. N. Ulyanova, Cheboksary, 428010;

¹ e-mail: pooh12@yandex.ru

The three-color multiple staining method is proposed for revealing connective tissue fibers and sites of amyloid localization. Free-floating paraffin sections are incubated for 2—3 h in a solution of acid-pepsin (pH 4) at 25 °C, then mounted on slides. The dewaxed sections are stained by picrofuxin according to Van Gieson, followed by staining of the nuclei with hematoxylin, Congo red according to H. H. Benhold and picroindigocarmine, followed by the conclusion in a transparent environment. Amyloid structures bound to collagen fibers are stained in brick-red, collagen and reticulin fibers not associated with amyloid — in indigocarmine, cytoplasm of cells without amyloid — in yellow. The three-color method of staining is more informative and gives an increase in color contrast in comparison with the Congo red staining method and can be used in studying the pathogenesis in organs affected by amyloidosis.

Key words: amyloidosis, picroindigo carmine, Congo red, picrofuxin by Van Guison, hematoxylin.
