

ФИЗИОЛОГИЯ

В. А. ДОРФМАН и С. М. ЭПШТЕИН

ГИСТОХИМИЯ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

ЦВЕТНОЙ МЕТОД ОБНАРУЖЕНИЯ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ

(Представлено академиком А. Д. Сперанским 13 III 1950)

Недавно введенный в обиход гистохимический метод обнаружения фосфатазы, щелочной и кислой, находит все большее применение (¹). Со времени его введения в 1939 г. появилось немало исследований, посвященных проверке его применения в разных условиях фиксации, инкубации срезов и т. п.

Приступая к исследованию фосфатазы в развивающихся зародышах амфибий, мы сразу наткнулись на отсутствие адекватного цветного метода обнаружения фосфатазы в срезах, а между тем наличие пигмента у многих из указанных форм сильно затрудняет или вообще делает невозможным обнаружение темных отложений фосфорнокислых солей среди черного пигмента.

Всего лишь в двух работах (^{2, 3}) был предложен цветной метод обнаружения щелочной фосфатазы. В этих работах целью являлся не цвет сам по себе, а выявление преформированного кальция или исключение возможной ошибки опыта, связанной с преформированным фосфатом. Один из этих методов сводится к окраске фосфата акридином, второй — к использованию в качестве субстрата Са β -нафтол-фосфата и с последующим выпадением нерастворимой азокраски при взаимодействии β -нафтола с диазотированным α -нафтиламином. Оба эти метода, однако, требуют применения специальных реактивов, отчасти даже синтеза таковых в лаборатории.

В связи с этим нами был разработан другой метод цветного выявления щелочной фосфатазы, который не только не усложняет существующий метод Гомори, но в известных отношениях упрощает его и требует самых доступных реактивов*.

Предлагаемый нами метод заключается в замене солей кобальта, на соответствующем этапе обработки препарата, солями железа, гистохимическое обнаружение которого не представляет затем никаких трудностей. Не исключена замена солей кобальта и другими солями тяжелых металлов, дающих в последующем цветную реакцию. В отсутствии в клетке неорганического свободного железа нетрудно убедиться при помощи соответствующего контроля.

Описываемый ниже метод был проверен на разнообразных нормальных тканях (печени, почке, двенадцатиперстной кишке, селезенке, се-

* В нашем методе отпадает потребность в обработке препарата сульфидами, хотя такая обработка, может быть, иногда оказывается полезной при проведении реакции на турбуллену синь.

меннике) белой мыши и отчасти лягушки, а также в нескольких опытах на раковой опухоли молочной железы. Техника определения щелочной фосфатазы на первых этапах повторяет обычную методику Гомори и сводится к следующему.

Кусочки ткани величиной 3—4 мм фиксируются в 80° спирту на холоду в течение 12 час. и затем заливаются в парафин обычным способом. Срезы ткани толщиной в 7 μ подвергаются дальнейшей обработке.

1. Инкубация в течение 24 час. при температуре 37° в обычной смеси Гомори, содержащей 25 см³ 2% глицерофосфата натрия, 25 см³ 2% медианала, 5 см³ 2% азотнокислого кальция, 2 см³ 2% сернокислого магния и 50 см³ дистиллированной воды. pH смеси 9,0—9,4. Контрольные срезы инкубируются в аналогичной смеси, лишенной, однако, субстрата — глицерофосфата натрия. Иногда в качестве контроля служили срезы, в которых фосфатаза инактивировалась 3-минутным кипячением при 100°.

2. После инкубации опытные и контрольные срезы споласкивались 0,5% раствором азотнокислого кальция и в течение 5 мин. обрабатывались 2% раствором закисной соли железа FeSO₄.

3. После тщательного промывания водой (3 смены) срезы подвергались в течение 1 мин. обработке 2% раствором красной кровяной соли, подкисленной равным объемом 0,1 N соляной кислоты (реакция на турнбуллеву синь).

4. Срезы споласкивались дистиллированной водой и обычным способом заключались в балзам.

В результате указанной обработки структуры, содержащие щелочную фосфатазу, окрашивались в ярко синий цвет. Голубой фон, который наблюдается и в контроле, нетрудно устранить соответствующей докраской препарата, например 0,1% раствором эозина.

Сравнительная обработка тех же тканей в тех же условиях опыта по методу Гомори (соответствующая обработка солями кобальта) показала полную идентичность обоих препаратов в смысле локализации и интенсивности реакции на щелочную фосфатазу.

Таким образом, чувствительность указанного метода оказывается не ниже чувствительности обычного метода Гомори, преимуществом же его является возможность выявления щелочной фосфатазы в пигментированных препаратах, а также более высокая степень контрастности и четкости гистохимической картины. Ряд других вопросов, связанных с применением предлагаемого нами цветного метода, в настоящее время изучается.

Институт экспериментальной биологии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
4 II 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ G. Gomori, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 42, 23 (1939). ² G. Gomori, Am. Journ. Path., 19, 197 (1943). ³ M. Menten, J. Junge and M. Green, Journ. Biol. Chem., 153, 471 (1944).