

ВЛИЯНИЕ ДИОКСИДА УГЛЕРОДА НА ИМПРЕГНАЦИЮ СЕРЕБРОМ НЕРВНОЙ ТКАНИ

© 2011 г. А.Г. Малыгин, Н.С. Косицын*, В.Д. Пономарева, Е.В. Голобородько*,
Д.А. Волкова*, М.М. Свинов*

Государственное учреждение Российской академии наук Институт биохимии им А.Н. Баха РАН,
119071, Москва, Ленинский проспект, 33;

E-mail: agmalygin@mail.ru

*Государственное учреждение Российской академии наук Институт высшей нервной деятельности
и нейрофизиологии РАН, 117865, Москва, ГСП-7 ул. Бутлерова, 5а

E-mail: svinov@ihna.ru

Поступила в редакцию 01.12.10 г.

Показано, что диоксид углерода (CO_2) при начальных концентрациях – 4 об.% в воздухе над реакционной смесью – ингибирует инициацию образования наночастиц серебра из комплексов с биогенными аминами: норадреналином и серотонином. Установлено, что при концентрации CO_2 4% в воздухе над раствором азотнокислого серебра, используемым для окрашивания серебром ткани мозга крысы по Гольджи, окрашиваются нейроны, в то время как при концентрации CO_2 0,06% окрашиваются сосуды. Полученные результаты объясняются беспрепятственным проникновением в нейроны растворимых соединений серебра в случае ингибирования центров инициации образования наночастиц серебра в сосудах высокими концентрациями CO_2 и осаждением серебра в сосудах отсутствия ингибирования при низких концентрациях CO_2 . Сделан вывод, что для получения стабильных результатов окрашивания серебром гистологических препаратов необходимо контролировать концентрацию CO_2 .

Ключевые слова: серебро, диоксид углерода, ингибирование, окрашивание по Гольджи, биогенные амины, сосуды, нейроны.

Окрашивание биологических препаратов импрегнацией серебра – давно применяемый в гистологии способ изучения тканевых и субклеточных структур. Этот метод был разработан К. Гольджи в 1873 г. Рамон-и-Кахаль модифицировал метод Гольджи и широко использовал его для окрашивания различных отделов нервной системы у многих видов животных на разных стадиях их онтогенеза. Можно сказать, что нейронаука как самостоятельная дисциплина начинается с работ Гольджи и Рамон-и-Кахаля, а основополагающий труд Рамон-и-Кахаля [1] до сих пор остается «библией» нейрогистолога. По сравнению с окрашиванием органическими красителями методы окрашивания серебром имеют существенно более высокую чувствительность. Кроме гистологии [2,3], они широко применяются для окрашивания биополимеров в полиакриламидном геле после их разделения методом электрофореза [4–6]. Однако при всех достоинствах метод окрашивания серебром обладает существенным недостатком: результаты окрашивания не всегда воспроизводимы. Плохая воспроизводимость этого метода отмечалась многими исследователями [7].

По мнению ряда авторов, это могло быть связано с неконтролируемыми условиями на стадии обработки материала бихроматом [8,9].

Вариабельность результатов окрашивания серебром особенно нежелательна при проявлении белков в полиакриламидном геле, где часто требуется количественная оценка анализируемого материала [4,5,10]. Попытки повысить воспроизводимость методик окрашивания серебром путем их модификации предпринимались неоднократно [11]. В качестве возможных причин вариабельности результатов в литературных источниках чаще других обсуждались две версии. По одной версии, основанной на высокой чувствительности соединений серебра к свету, в качестве причины выдвигалось отсутствие контроля освещения. По другой версии, менее распространенной, в качестве причины называлось влияние контакта проявляющего раствора с воздухом. В последнем случае обычно подразумевалось, а иногда и открыто декларировалось, что действующим началом является кислород воздуха [12–15].

Лишь в 2002 г. в результате детального исследования влияния воздуха на проявление белков серебром в полиакриламидном геле и в гомогенном растворе белка удалось обнаружить, что действующим началом при контакте проявляющего раствора с воздухом является не кислород, а содержащийся в воздухе в малых количествах диоксид углерода (CO_2) [16]. В частности, было показано, что CO_2 в низких концентрациях способен подавлять проявление серебром, в то время как очищенный от CO_2 кислород совершенно не влияет на процесс проявления. При этом было установлено, что как карбонат, так и бикарбонат ингибирующими свойствами не обладают. В 2008 г. эти результаты были подтверждены более широкими исследованиями с применением комплексов серебра с аммиаком, этаноламином и 3-аминопропанолом-1 [17]. Что касается влияния света на нестабильность окрашивания серебром, было выяснено, что даже при дневном освещении оно пренебрежимо мало. Можно предположить, что и вариабельность окрашивания серебром гистологических препаратов также связана с колебаниями содержания CO_2 в воздухе. Считается, что при импрегнации серебром нервной ткани восстановление серебра обусловлено, прежде всего, присутствием в ней аминных групп, в частности присутствием биогенных аминов: катехоламинов и 5-гидрокситриптамина (серотонина) [18], которые образуют комплексы с ионами серебра.

Настоящая работа посвящена выяснению вопроса о влиянии CO_2 воздуха на окрашивание серебром нервной ткани. Для этого проведены два исследования: первое – модельное исследование – проведено для выявления эффекта ингибирования содержащимся в воздухе CO_2 образования окрашенных коллоидов серебра из комплексов ионов серебра с характерными для нервной ткани биогенными аминами: норадреналином и серотонином; второе – прямое исследование – проведено с целью обнаружения влияния CO_2 воздуха на окрашивание препаратов тканей мозга серебром по методу Гольджи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали следующие реактивы: формальдегид («Реахим», хч); 5-гидрокситриптамин (серотонин) креатининсульфатный комплекс (Sigma, США); креатинин (Becker, Англия); (-)-артеренол (норадреналин) битартратмоногидрат (Sigma, США); гексокиназу (Fluka, Швейцария); альбумин (Calbiochem, Великобритания); глюкозооксидазу (Serva, Германия); гиа-

луронидазу (Reanal, Венгрия). Неорганические реактивы имели квалификацию хч.

Восстановление серебра в присутствии норадреналина. К 7,6 мл 0,2 мг/мл раствора гексокиназы добавляли 100 мкл 39,2 мМ раствора AgNO_3 и 214 мкл 40 мМ битартрата норадреналина. Смесь разливали в пробирки по 960 мкл в каждую. После этого в пробирки добавляли по 20 мкл содового раствора, содержащего 25 мМ NaHCO_3 и 25 мМ Na_2HCO_3 . Далее свободный объем пробирок заполняли смесью воздуха и CO_2 . Две пробирки содержали комнатный воздух с 0,06 об.% CO_2 . В две пробирки вводили шприцем по 120 мкл 98% CO_2 , что примерно соответствовало 4% CO_2 в объеме пробирки. Две последние пробирки заполняли 98% CO_2 . Сразу после ввода газовой смеси пробирки закрывали резиновыми пробками и инкубировали при комнатной температуре (18°C) в затененном месте.

Восстановление серебра в присутствии серотонина. К 7,7 мл 0,2 мг/мл раствора гексокиназы добавляли 112 мкл 39,2 мМ раствора AgNO_3 и 111 мкл 40 мМ креатинсульфатного комплекса серотонина. Смесь разливали в пробирки по 960 мкл в каждую. После этого в пробирки добавляли по 45 мкл содового раствора, содержащего 50 мМ NaHCO_3 и 50 мМ Na_2HCO_3 . Затем реакцию запускали 500 мкл 7,3 мМ формальдегида. Так же, как и в случае с норадреналином, свободный объем пробирок заполняли смесью воздуха и CO_2 . Две пробирки содержали комнатный воздух с 0,06 об.% CO_2 . В две другие пробирки вводили шприцем по 120 мкл 98% CO_2 . Две последние пробирки заполняли 98% CO_2 . Пробирки закрывали резиновыми пробками и инкубировали при комнатной температуре (22°C) в затененном месте.

Диоксид углерода получали разложением гидрокарбоната натрия серной кислотой [19] непосредственно в газометре.

Спектральные исследования. Для получения кривых поглощения в видимой области спектра реакции проводили непосредственно в пластиковых кюветах спектрофотометра Specord UV VIS.

Импрегнация серебром образцов тканей мозга по методу Гольджи. Образцы из сенсомоторной коры больших полушарий крысы помещали на трое суток в раствор, содержащий 4% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ и 1% $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, затем на девять суток в раствор 3% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 1% $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и 0,2% OsO_4 . После этого образцы отмывали 1,5% раствором AgNO_3 и помещали на трое суток в пробирки объемом 60 мл, содержащие по 20 мл этого же раствора при разной концентрации CO_2 в воздухе над раствором. Затем

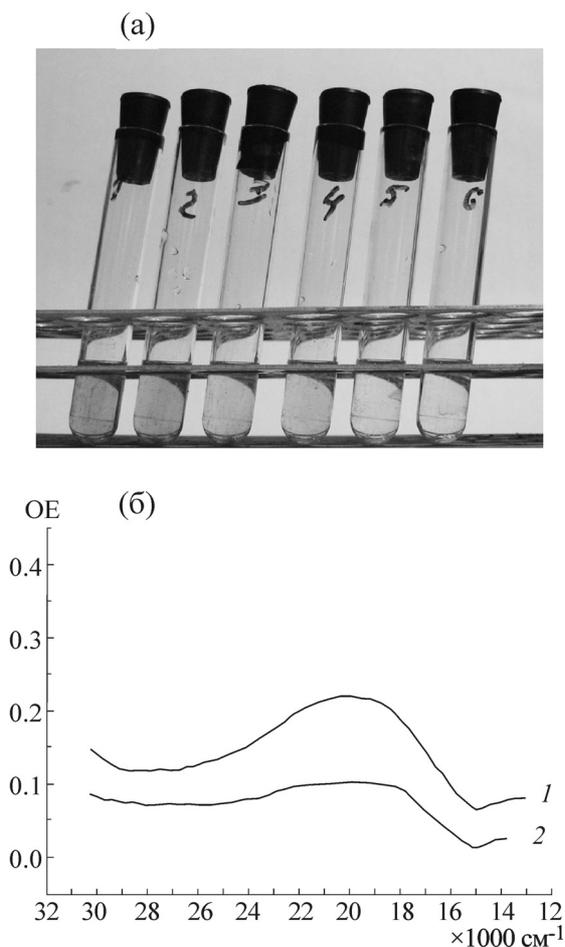


Рис. 1. Ингибирование образования наночастиц серебра диоксидом углерода при восстановлении норадреналином ионов серебра из комплекса с норадреналином: (а) – первая пара пробирок (1,2) – 0,06 об.% CO₂; вторая пара пробирок (3,4) – 4 об.% CO₂; третья пара пробирок (5,6) – 98 об.% CO₂; (б) – кривые поглощения в видимой области спектра растворов наночастиц серебра, образующихся через 1,5 ч инкубации при начальной концентрации CO₂ в воздухе пробирок: 1 – 0,06 об.% CO₂, 2 – 4 об.% CO₂.

образцы обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, проводили через смесь 100%-м спирта и эфира (1:1) и заливали в целлоидин. Для получения срезов использовали санный микротом (Reichert), толщина срезов – 70 и 90 мкм. Срезы освобождали от целлоидина 100%-м спиртом и заключали в канадский бальзам. Под световым микроскопом производили подсчет количества импрегнированных нейронов и площади, занимаемой окрашенными сосудами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние диоксида углерода на образование коллоидов металлического серебра в присут-

вии норадреналина и серотонина в растворе белка. Для выяснения возможности воздействия CO₂ воздуха на процесс окрашивания нервной ткани серебром, сначала было изучено его влияние на восстановление серебра в слабощелочном растворе в присутствии норадреналина и серотонина. С этой целью раствор азотнокислого серебра смешивали с раствором коммерческого препарата кислой соли норадреналина с винной кислотой в присутствии очищенного препарата гексокиназы. Отмечали время появления окрашенного коллоидного серебра при разных концентрациях CO₂ над раствором (≈0,06 об.%, 4 об.% и 98 об.% (рис. 1).

Из рис. 1а видно, что серебро в пробирках с 0,06 об.% CO₂ над раствором (первая пара пробирок) восстанавливалось быстрее, чем в пробирках с 4% CO₂ (вторая пара пробирок) и совсем не восстанавливалось в пробирках, заполненных 98% CO₂ (третья пара пробирок). При этом в первой паре пробирок окрашенные коллоиды серебра появлялись через 20 мин после запуска реакции, а при 4% CO₂ этот процесс задерживался на 1,5 ч.

Аналогичные опыты были проведены с креатинсульфатным комплексом серотонина (рис. 2). Только в отличие от опытов с битартратом норадреналина в этом случае в качестве восстановителя служил не амин, а добавленный в систему формальдегид (см. рис. 2а).

Восстановление серебра формальдегидом в присутствии серотонина задерживалось диоксидом углерода в еще большей степени, чем при восстановлении норадреналином. Если восстановление серебра без добавления CO₂ в пробирки начиналось через 20 мин (первая пара пробирок), то задержка реакции при 4% CO₂ составляла 170 мин (вторая пара пробирок). При 98% концентрации CO₂ восстановления серебра не наблюдалось (третья пара пробирок).

Из сравнения кривых поглощения света коллоидными растворами серебра, полученными при восстановлении ионов серебра норадреналином из комплекса с норадреналином (рис. 1б) или формальдегидом из комплекса с серотонином (рис. 2б), видно, что максимумы поглощения растворов не совпадают. Максимум на рис. 1б смещен в длинноволновую область спектра, при этом раствор имеет розоватый оттенок. Максимум на рис. 2б смещен в коротковолновую область, а раствор имеет коричневую окраску. Это различие свидетельствует о том, что размеры и форма наночастиц серебра, образующихся из комплексов ионов серебра с аминами, зависят от природы восстановителя.

О том, что в реакции не участвует входящая в состав препарата норадреналина винная кислота, или входящий в состав препарата серотонина креатинин, свидетельствовали результаты контрольных опытов, проведенных с чистыми препаратами винной кислоты и креатинина.

В гистологии различают аргентаффинные реакции, когда окрашивание серебром происходит за счет восстановительной способности самих тканей, и аргирофильные, когда для проявления требуется внешний восстановитель. В необработанных окислителями тканей восстанавливающими агентами могут служить норадреналин и другие родственные ему по структуре катехоламины [18]. Поскольку в опытах с норадреналином происходило восстановление серебра самим амином, а в опыте с серотином в качестве восстановителя использовали формальдегид, то тем самым была доказана принципиальная возможность ингибирования диоксидом углерода обоих типов реакций.

Таким образом, модельные опыты с норадреналином и серотином показали, что влияние CO_2 на окрашивание препаратов нервной ткани серебром весьма вероятно.

Влияние диоксида углерода на импрегнацию серебра в образцы ткани мозга крысы по методу Гольджи. Для выяснения влияния CO_2 на окрашивание гистологических препаратов серебром была использована импрегнация серебра в кусочки ткани мозга по методу Гольджи. Особенность метода Гольджи состоит в том, что перед обработкой раствором AgNO_3 ткань фиксируют смесью двух окислителей – $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ и OsO_4 . При этом OsO_4 вызывает присоединение к ненасыщенным органическим соединениям гидроксильных групп по двойным связям, превращая их в диолы [20,21], а $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ окисляет гидроксильные группы, превращая последние, в зависимости от их положения в молекулах, в кетогруппы или в альдегидные группы [22]. В результате обогащенная альдегидными группами ткань становится аргентаффинной, т.е. способной восстанавливать ионы серебра без участия внешних восстановителей.

Зависимость окрашивания серебром структурных элементов препаратов мозга крысы от концентрации CO_2

Начальная концентрация CO_2 (над раствором AgNO_3 в воздухе пробирки), об.%	Среднее число окрашенных нейронов на 1 мм^2	Площадь, занимаемая окрашенными сосудами
0,06	$0,07 \pm 0,04^*$	$0,37 \pm 0,07^*$
4	$0,96 \pm 0,20$	$0,06 \pm 0,04$

Примечание: * – $p < 0,05$ (степень окрашивания тканевых элементов в среде с 0,06% CO_2 против 4% CO_2). Подсчет производили в области сенсомоторной коры больших полушарий при толщине срезов 90 мкм и площади исследуемой зоны 1200 мм^2 .

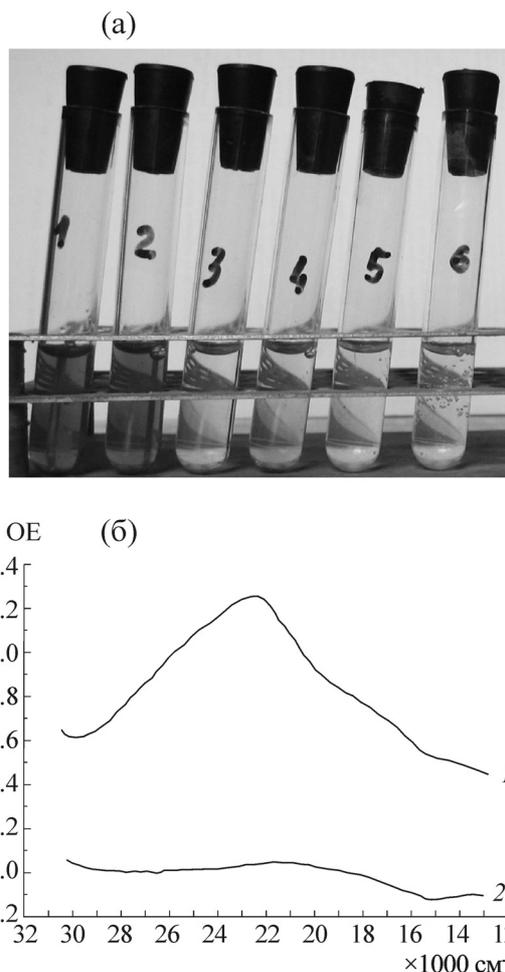


Рис. 2. Ингибирование образования наночастиц серебра диоксидом углерода при восстановлении формальдегидом ионов серебра из комплекса с серотином: (а) – первая пара пробирок (1,2) – 0,06 об.% CO_2 ; вторая пара пробирок (3,4) – 4 об.% CO_2 ; третья пара пробирок (5,6) – 98 об.% CO_2 ; (б) – кривые поглощения в видимой области спектра растворов наночастиц серебра, образующихся через 1,5 ч инкубации при начальной концентрации CO_2 в воздухе пробирок: 1 – 0,06 об.%, 2 – 4 об.% CO_2 .

Из представленных фотографий и данных таблицы видно, что при низких концентрациях CO_2 в воздухе окрашиваются сосуды и приле-

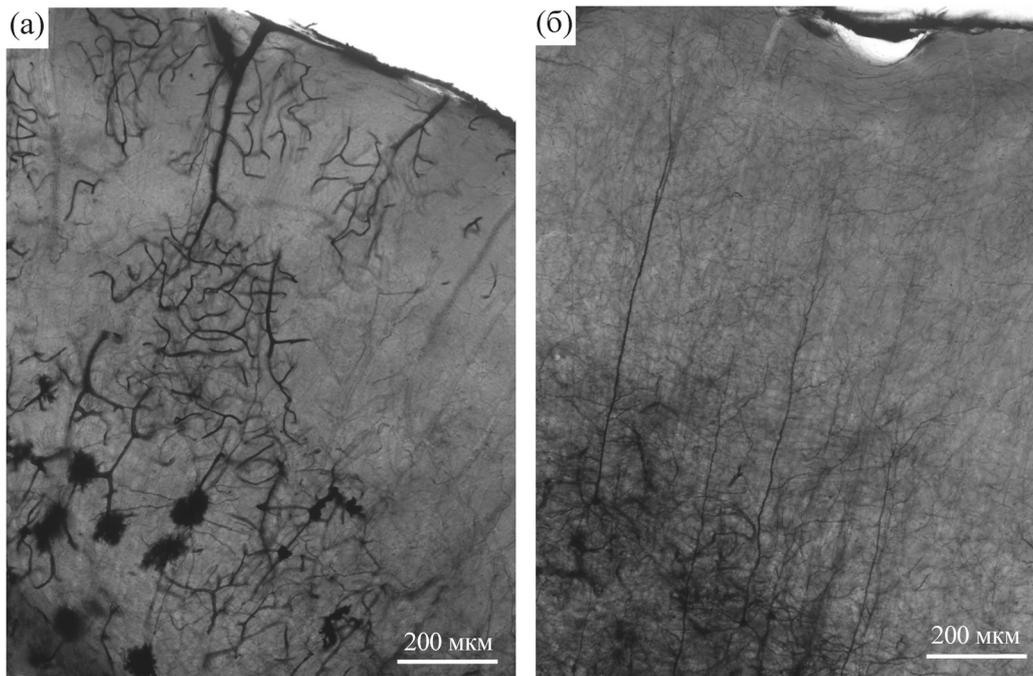


Рис. 3. Срезы импрегнированных серебром образцов нервной ткани при разных концентрациях CO_2 в воздухе над раствором AgNO_3 : (а) – при 0,06% CO_2 преимущественно прокрашиваются сосуды; (б) – при 4% CO_2 преимущественно прокрашиваются нейроны. Масштаб 200 мкм.

гающие к ним глиальные астроциты, а нейроны не окрашиваются (рис. 3а), в то время как повышение концентрации CO_2 приводит к исчезновению окрашенных сосудов и появлению окрашенных нейронов (рис. 3б). На первый взгляд, наблюдаемый эффект не похож на эффект ингибирования диоксидом углерода проявления белков серебром в растворе. Однако этот результат легко объяснить с позиций механизма получения позитивного изображения в фотографии, называемого диффузионным проявлением [23].

Суть диффузионного проявления состоит в том, что одновременно проявляются два слоя нанесенного на пластинку фотоматериала. Один из них содержит скрытое изображение в виде активированных светом центров инициации проявления, в то время как во втором центре инициации равномерно распределены по всей площади пластинки в результате ее предварительной засветки при малой экспозиции. По мере того как скрытое изображение первого слоя превращается в явное негативное изображение, ионы серебра из второго равномерно засвеченного слоя диффундируют на темнеющие участки изображения в первом слое. При этом концентрация ионов серебра на соответствующих участках второго слоя уменьшается, а рост центров инициации восстановления серебра замедляется. В то же время из незасве-

ченных участков первого слоя ионы серебра, наоборот, диффундируют во второй слой, способствуя росту центров инициации на соответствующих участках равномерно засвеченного слоя. В результате во втором слое формируется позитивное изображение.

Если процесс диффузионного фотопроявления основан на иницировании восстановления серебра светом, то особенности восстановления ионов серебра, диффундирующих в образцы ткани мозга, можно объяснить на основе ингибирования центров инициации восстановления серебра диоксидом углерода следующим образом. При обработке ткани раствором соединений серебра в условиях низкой концентрации CO_2 в воздухе центры инициации на стенках сосудов сорбируют и восстанавливают все поступающее в сосуды серебро. В результате растворимые соединения серебра не проходят дальше стенок сосудов и нейроны остаются неокрашенными. При высокой концентрации CO_2 он проникает в сосуды в количествах, достаточных для того, чтобы подавить центры инициации образования наночастиц серебра на их стенках. В результате растворимые соединения серебра не задерживаются в сосудах, а диффундируют к расположенным в ткани нейронам. При этом биогенные амины нейронов восстанавливают все проникающее в ткань серебро, вследствие чего нейроны приобретают

окраску. Таким образом, окрашивание серебром преимущественно нейронов в присутствии CO_2 и окрашивание преимущественно сосудов в его отсутствие объясняется тем же эффектом ингибирования восстановления серебра диоксидом углерода, который имеет место при окрашивании серебром белков и в полиакриламидном геле и в растворе.

Учитывая, что концентрация диоксида углерода в выдыхаемом воздухе достигает 5%, в то время как его концентрация в воздухе помещений обычно не превышает 0,06%, правомерно сделать вывод, что колебания концентрации диоксида углерода могут быть причиной, препятствующей окрашиванию серебром гистологических препаратов. Следовательно, для получения стабильных результатов окрашивания серебром необходимо контролировать концентрацию CO_2 в зоне проведения эксперимента.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, гранты №08-04-00864-а, 10-06-00946-а и РГНФ №10-04-01785а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cajal, S. Ramon, *Textura del Sistema Nervioso del hombre y de los vertebrados*, Moya (Madrid, 1899), Томо I.
2. Н. С. Косицын, *Микроструктура дендритов и аксо-дендритических связей в центральной нервной системе* (Наука, М., 1976).
3. Н. С. Косицын и М. М. Свинов, Бюл. эксперим. биологии и медицины **109**, 486 (1990).
4. A. Gorg, in *Proteomics: A Trends Guide* (Jule, 2000), pp. 3–6.
5. M. Chevallet, S. Luche, and T. Rabilloud, *Nat. Protoc.* **1** (4), 1852 (2006).
6. C. Lelong, M. Chevallet, S. Luche, and T. Rabilloud, *Methods Mol. Biol.* **519**, 339 (2009).
7. Р. Лили, *Патогистологическая техника и практическая гистохимия* (Мир, М., 1969).
8. A. Angulo, E. Fernández, J. A. Merchán, and M. Molina, *J. Neurosci. Methods* **66**, 55 (1996).
9. G. Rosoklija, B. Mancevski, B. Ilievski, et al., *J. Neurosci. Methods* **131**, 1 (2003).
10. А. И. Арчаков, *Вопр. мед. химии* **46** (1), 335 (2000).
11. D. C. Ochs, E. H. McConkey, and D. W. Sammons, *Electrophoresis* **2**, 304 (1981).
12. B. Oakley, D. R. Kirsh, and D. Morris, *Anal. Biochem.* **105**, 361 (1980).
13. Н.-М. Poehling and V. Neuhoff, *Electroforesis* **2**, 141 (1981).
14. W. Gray, *Anal. Biochem.* **118**, 197 (1981).
15. А. Г. Докучаев, Т. Г. Мясова и А. А. Ревина, *Химия высоких энергий* **31**, 353 (1997).
16. А. Г. Малыгин и Д. О. Султанова, *Докл. РАН* **386** (1), 1 (2002).
17. А. Г. Малыгин и В. Д. Пономарева, *Биоорганическая химия* **34** (6), 764 (2008).
18. Х. Лупа, *Основы гистохимии* (Мир, М., 1980).
19. Ю. В. Карякин и И. И. Ангелов, *Чистые химические вещества* (Химия, М., 1974).
20. Ф. Д. Ганстон, в кн. *Успехи органической химии*, под ред. И. Л. Кнунянца (Изд-во ИЛ., М., 1963), т. 1, с. 114.
21. Н. К. Кочетков, Э. И. Будовский, Е. Д. Свердлов и др., *Органическая химия нуклеиновых кислот* (Химия, М., 1970).
22. А. Н. Несмеянов и Н. А. Несмеянов, *Начала органической химии* (Химия, М., 1969), т. 1.
23. К. Б. Неблит, *Фотография* (Искусство, М., 1958).

Influence of Carbon Dioxide on the Impregnation of the Nervous Tissue by Silver

A.G. Malygin*, N.S. Kositsyn**, V.D. Ponomareva*, E.V. Goloborodko**,
D.A. Volkova**, and M.M. Svinov**

*Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii prospect 33, Moscow, 119071 Russia

**Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences,
ul. Butlerova 5a, Moscow, 117865 Russia

It has been shown that 4% carbon dioxide (CO_2) in the air above reaction mixture inhibits the initiation of the formation of silver nanoparticles from complexes with biogenic amines (noradrenaline and serotonin). At the same concentration of CO_2 in the air above solution of AgNO_3 , which is used for staining nerve tissues by the method of Golgi, neurons are preferentially stained, whereas at a concentration of 0.06%, vessels and poor neurons are stained. It is suggested that the entry of free silver ions to neurons is due to the inhibition of sites of initiation of silver nanoparticles in vessels at high CO_2 concentrations, while the lack of inhibition leads to silver precipitation in vessels at low CO_2 concentrations. It can be assumed that, for stable silver impregnation, the concentration of CO_2 must be controlled.

Key words: silver, carbon dioxide, inhibition, Golgi staining, biogenic amines, vessels, neurons