

**Авторы:**

*Коржевский Дмитрий Эдуардович* — доктор медицинских наук, заведующий лабораторией функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины (ФГБНУ «ИЭМ»);

*Колос Елена Андреевна* — младший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ»;

*Карпенко Марина Николаевна* — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории нейробиологии интегративных функций мозга отдела физиологии им. И. П. Павлова ФГБНУ «ИЭМ»;

*Григорьев Игорь Павлович* — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ»;

*Сухорукова Елена Геннадьевна* — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ»

**Рецензент:**

*Иванов Игорь Николаевич* — доктор медицинских наук, профессор кафедры судебной медицины ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И. И. Мечникова

**Гистохимическое** определение металлов / Д. Э. Коржевский, Г51 Е. А. Колос, М. Н. Карпенко [и др.] ; под ред. Д. Э. Коржевского. — Санкт-Петербург : СпецЛит, 2016. — 63 с. — ISBN 978-5-299-00838-8.

В этой книге подробно рассматриваются вопросы, касающиеся возможностей определения различных металлов в гистологических препаратах (методы гистохимии металлов). Методы гистохимии металлов представляют собой необходимое дополнение к методам определения металлов в тканевых образцах, таких как атомно-абсорбционная спектрометрия и масс-спектрометрия, поскольку позволяют оценить внутриклеточное распределение изучаемого металла. В книге представлены сведения о классических и современных методах гистохимии наиболее важных металлов — марганца, кальция, цинка, железа, меди, свинца, кадмия, ртути, бария, стронция, серебра, золота, определение которых на клеточном и тканевом уровнях представляет интерес с научной и клинической точек зрения. В ряде случаев приведены примеры заболеваний, при которых методы гистохимии могут быть использованы с диагностической целью. Книга адресована широкому кругу специалистов, использующих гистологические и гистохимические методы при морфологической диагностике и в научной работе (гистологам, патологоанатомам, нейробиологам, физиологам, фармакологам, судебно-медицинским экспертам).

*Научные исследования авторского коллектива, результаты которых использованы в этой книге, выполнены при поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-00014).*

УДК 616-018

# ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Предисловие</b> .....	5
<b>Глава 1. Марганец в нервной системе и его гистохимическое выявление</b> ( <i>М. Н. Карпенко, И. П. Григорьев, Е. А. Колос</i> ) ...	6
1.1. Поступление марганца в организм .....	7
1.2. Токсическое действие марганца на клетки головного мозга	11
1.3. Гистохимическое определение марганца .....	14
Литература .....	15
<b>Глава 2. Болезнь Фара и гистохимическое определение кальция</b> ( <i>Е. Г. Сухорукова, Д. Э. Коржевский, Е. А. Колос</i> ) .....	20
Литература .....	24
<b>Глава 3. Цинкергические нейроны и гистохимическое выявление цинка</b> ( <i>Е. А. Колос</i> ) .....	26
Литература .....	30
<b>Глава 4. Железо в головном мозге и гистохимические методы его выявления</b> ( <i>И. П. Григорьев, Е. А. Колос, Д. Э. Коржевский</i> )	32
4.1. Обзор гистохимических методов выявления железа .....	34
4.2. Реакция Перлса и ее модификации .....	35
4.3. Реакция Тирмана .....	39
4.4. Реакция Квинке .....	40
4.5. Метод Маллори (гематоксилиновый метод) .....	41
4.6. Метод Хамфри .....	41
4.7. Флуоресцентные методы определения железа .....	42
Литература .....	44
<b>Глава 5. Гистохимическое выявление меди</b> ( <i>Е. А. Колос</i> ) .....	50
Литература .....	54
<b>Глава 6. Гистохимическое выявление других металлов</b> ( <i>Е. А. Колос</i> ) .....	57
6.1. Свинец .....	57

6.2. Кадмий .....	59
6.3. Ртуть .....	60
6.4. Барий и стронций .....	60
6.5. Серебро .....	61
6.6. Золото .....	62
Литература .....	62

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Хорошо известно, что соли металлов могут оказывать токсическое воздействие на организм человека, тем не менее в малых концентрациях многие металлы, токсические свойства которых хорошо изучены, являются необходимыми для функционирования клетки. В последние годы в научной литературе представлены убедительные свидетельства важной роли ионов металлов в обеспечении межклеточной коммуникации. Развитие ряда нейродегенеративных заболеваний связывают с избыточным накоплением в организме некоторых металлов. В связи с этим особое внимание уделяется количественным способам выявления металлов в различных органах и тканях. Среди них большое значение придается высокотехнологичным методам атомно-абсорбционной спектроскопии и масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. К сожалению, этими высокочувствительными количественными методами невозможно оценить распределение металлов на клеточном уровне. Решить эту задачу позволяют методы гистохимии металлов, которые представляют собой необходимое дополнение к количественным методам определения металлов в тканевых образцах. В этой книге представлены сведения о классических и современных методах гистохимии наиболее важных металлов — марганца, кальция, цинка, железа, меди, свинца, кадмия, ртути, бария, стронция, серебра и золота, определение которых на клеточном и тканевом уровнях представляет интерес с научной и клинической точек зрения. В ряде случаев приведены примеры заболеваний, при которых методы гистохимии могут быть использованы с диагностической целью.

Книга адресована широкому кругу специалистов, использующих гистологические и гистохимические методы при морфологической диагностике и в научной работе (гистологам, патологоанатомам, нейробиологам, физиологам, фармакологам, судебно-медицинским экспертам).

Научные исследования авторского коллектива, результаты которых использованы в данной книге, выполнены при поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-00014).

*Д. Э. Коржевский*

## МАРГАНЕЦ В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ И ЕГО ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ

Марганец — это жизненно важный микроэлемент, который в живом организме необходим для функционирования многих ферментов, включая белки семейства оксидоредуктаз, трансфераз, гидролаз, лиаз, изомераз и лигаз. Он входит в состав целого ряда ферментов, таких как глутаминсинтетаза, аргиназа, пируватдекарбоксилаза, митохондриальная супероксиддисмутаза. Марганец необходим для образования тироксина — основного гормона щитовидной железы. В составе ферментов аргиназы и ацетилхолинэстеразы марганец вовлечен в процесс регуляции свертывании крови и активности мотонейронов. В составе пируваткарбоксилазы и фосфоглюкодисмутазы он влияет на углеводный обмен. Марганец необходим для синтеза витаминов группы В и вовлечен в процесс образования гемоглобина (Bouabid S. [et al.], 2015; Horning K. J. [et al.], 2015).

В среднем содержание марганца в тканях колеблется от 0,3 до 2,9 мкг/г ткани, наиболее обогащены марганцем клетки печени, почек, поджелудочной железы, трубчатых костей и мозга, а в мозге — базальные ганглии и мозжечок (Aschner J. L., Aschner M., 2005). Основным источником поступления марганца в организм являются пищевые продукты и питьевая вода. Всасывание марганца происходит на всем протяжении тонкого кишечника, при этом усваивается не более 5 %. Кроме этого, абсорбция марганца зависит от присутствия в пище других микроэлементов. Например, высокое содержание железа приводит к снижению уровня марганца в кровотоке, а у людей с железодефицитной анемией, напротив, всасывание марганца усиливается (Fitsanakis V. A. [et al.], 2011). Недостаточное поступление марганца с пищей у экспериментальных животных вызывает снижение скорости роста костей, приводит к развитию аномалий скелета, вызывает атаксию, нарушение метаболизма глюкозы, является причиной ультраструктурных нарушений сетчатки и роговицы глаза, уменьшения диаметра миелинизированных аксонов зрительного нерва (Endo K. [et al.], 2008; Gong H., Amemiya T.,

1999a; Gong H., Amemiya T., 1999b). У детей, содержание марганца в крови которых было ниже нормы, отмечались сниженная скорость мышления и была затруднена переключаемость внимания (Bhang S. Y. [et al.], 2013).

Повышение содержания марганца в организме, вызванное преимущественно промышленными отравлениями, приводит к развитию тяжелых нарушений ЦНС, напоминающих по симптоматике болезнь Паркинсона; такое состояние носит название — марганцевая энцефалопатия. Впервые нейротоксический эффект марганца был отмечен Соурег в 1837 г., когда он описал случаи паркинсонизма у рабочих по добыче марганцевых руд (цит. по: O'Neal S. L., Zheng W., 2015).

В последние десятилетия условия, при которых возможна интоксикация марганцем, хорошо изучены и описаны. Наиболее подвержены избыточному накоплению солей и оксидов марганца рабочие заводов ферросплавов и любых сварочных производств или же люди профессий, при которых возможен контакт с трикарбонил(метилциклопентаденил)марганцем, который используется в качестве присадки к бензину (Lucchini R. G. [et al.], 2007). Также к группе риска относятся люди, употребляющие суррогатные наркотические вещества, приготовленные с использованием перманганата калия (Яворская В. А. [и др.], 2005). Токсическая доза для человека составляет 40 мг марганца в день (Калинникова Т. Б. [и др.], 2011). Повышенное поступление марганца в организм приводит к его накоплению в клетках мозга. Например, интраперитонеальное введение лабораторным крысам раствора хлорида марганца в дозе 15 мг/кг массы в течение 30 дней вызывало 3-кратное увеличение содержания марганца в клетках стриатума (O'Neal S. L. [et al.], 2014). У людей, подвергшихся интоксикации соединениями марганца, его повышенное содержание выявляется в бледном шаре и стриатуме, что приводит к развитию психических и моторных расстройств (Lee E. Y. [et al.], 2016), которые служат клиническими проявлениями марганцевой энцефалопатии.

### **1.1. Поступление марганца в организм**

Марганец транспортируется в энтероциты с помощью активного транспорта через протон-зависимый переносчик — транспортер двухвалентных металлов (DMT1) (Au C. [et al.], 2008). Это интегральный мембранный белок, основной функцией которого является трансмембранный перенос  $Fe^{2+}$ . Уровень белка DMT1 зависит от содержания железа: при

дефиците железа продукция DMT1 увеличивается, что сопровождается повышением всасывания марганца и его накоплением преимущественно в мозге (Fitsanakis V. A. [et al.], 2011).

Механизм, с помощью которого марганец из эритроцитов попадает в кровяное русло, изучен мало. Полагают, что в этот процесс вовлечен белок ферропортин (Seo Y. A., Wessling-Resnick M., 2015). Попадая в кровоток, марганец быстро аккумулируется в различных тканях: в печени обнаруживается до 30 % от поступившего в организм марганца, в почках — 5 %, в поджелудочной железе — 5 %, в толстой кишке — 1 %, в мозге — 0,1 % и около 58 % остается в мягких тканях (Leggett R. W., 2011). На сегодняшний день выделяют три возможных пути, по которым марганец проникает в ЦНС: через церебральные капилляры, через хориоидное сплетение, трансаксонально через обонятельный или тройничный нервы (Aschner J. L., Aschner M., 2005; Yokel R. A., 2009). На молекулярном уровне хорошо описано несколько механизмов транспорта марганца в клетки ЦНС: трансферрин-зависимый и трансферрин-независимый путь (с помощью DMT1); с участием белков семейства ZIP (ZRT/IRT-related Proteins: ZRT (Zinc Regulated Transporter), IRT (Iron Regulated Transporter)); посредством переносчика дофамина DAT (dopamine transporter); через потенциал-зависимые  $Ca^{2+}$ -каналы; посредством цитратного челночного механизма (Tuschl K. [et al.], 2013; Chen P. [et al.], 2015).

Транспорт марганца в клетку по трансферрин-зависимому пути осуществляется при формировании комплекса  $Mn^{3+}$  (окисление происходит в крови) с трансферрином. Комплекс  $Mn^{3+}$ -трансферрин взаимодействует с внеклеточным доменом специфичного для трансферрина рецептора на плазматической мембране рецептора, после чего весь комплекс поглощается клеткой путем эндоцитоза. В сформированной везикуле изменяется pH, марганец меняет степень окисления с  $Fe^{3+}$  на  $Fe^{2+}$ ; белковая часть трансферрина вместе с рецептором выходит на поверхность клетки, где апотрансферрин отделяется и цикл повторяется, а марганец поступает в цитоплазму клетки через транспортер DMT1 (Malecki E. A., 2001; Gunter T. E. [et al.], 2013). С помощью этого механизма можно объяснить тропизм марганца к базальным ганглиям: нейроны прилежащего ядра, скорлупы и хвостатого ядра несут наибольшее количество трансферриновых рецепторов, захватывающих комплекс марганец-трансферрин, который затем с аксоплазматическим током достигает бледного шара и черной субстанции.

Существуют данные о том, что DMT1 экспрессируется и глиальными клетками, которые окружают церебральные кровеносные сосуды,

поэтому марганец может проникать в ЦНС без взаимодействия с трансферрином (Crossgrove J. S., Yokel R. A., 2004). Не связанный с трансферрином марганец попадает внутрь клетки с помощью белков семейства ZIP (ZIP-8 и ZIP-14), которые располагаются на апикальной поверхности эндотелиальных клеток капилляров (Girijashanker K. [et al.], 2008). Однако уровень экспрессии этих транспортеров в мозге мал и данный путь преимущественно реализуется при поступлении марганца в клетки печени (Jenkitkasemwong S. [et al.], 2012). Тем не менее ZIP-8 и ZIP-14 обнаруживаются в клетках назального эпителия и в обонятельных нейронах, поэтому аппликация марганца на обонятельную зону слизистой носа приводит к немедленному всасыванию марганца и попаданию в кровоток в непосредственной близости от анастомоза супраорбитальной и внутри-мозговой артерии, откуда марганец проникает в клетки основания мозга (Ma C. [et al.], 2008).

Также марганец проникает в нейроны через потенциал-зависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы: деполяризация нейрона и открытие кальциевых каналов увеличивает вход марганца в клетку (Chen P. [et al.], 2015).

Марганец может усваиваться клетками ЦНС с помощью DAT. Действительно, еще в 1999 г. R. T. Ingersoll с коллегами показали, что подавление активности DAT с помощью кокаина вызывает 10-кратное снижение уровня марганца в мозге (Ingersoll R. T. [et al.], 1999). У мышей с нокаутным геном белка DAT в стриатуме аккумулировалось значительно меньше марганца, чем у мышей дикого типа (Erikson K. M. [et al.], 2005).

Практически весь не связанный с белками марганец находится в форме цитрата марганца, который может преодолевать гематоэнцефалический барьер с помощью активного транспорта, что, по-видимому, является основным видом транспорта марганца из кровеносного русла в мозг (Crossgrove J. S. [et al.], 2003).

Так или иначе, оказавшись в ЦНС, марганец избирательно накапливается в клетках скорлупы, хвостатого ядра, бледного шара и в меньшей степени в вентральной части заднего мозга и в продолговатом мозге. Причем для человека содержание марганца в этих структурах увеличивается с возрастом даже при низком риске профессиональной интоксикации. У пациентов с болезнью Паркинсона наблюдается аномальное распределение марганца в ЦНС: в скорлупе его содержание повышено, а в верхней и средней височной извилине и в бледном шаре — снижено (Ramos P. [et al.], 2014). У лиц, подвергшихся интоксикации марганцем, его отложения визуализируются в клетках скорлупы, хвостатого ядра,

бледного шара, а также в клетках гиппокампа, таламуса, обонятельных луковиц, сосудистого сплетения, в стволе и в промежуточном мозге (Robison G. [et al.], 2013). Причем марганец в большей степени накапливается астроцитами, чем нейронами (Morello M. [et al.], 2008). На субклеточном уровне отложения марганца преимущественно обнаруживаются в митохондриях клеток ЦНС, а также в ядрах эпителия сосудистого сплетения и эпендимы; ядрах и аппарате Гольджи дофаминергических нейронов (Kalia K. [et al.], 2008; Carmona A. [et al.], 2014).

Описано несколько механизмов секвестирования марганца в клетке. Например, АТР13А2 (Park9) — мембранный лизосомальный белок, продукция которого наиболее значительна в клетках ЦНС, транспортирует неорганические катионы, включая марганец, из цитоплазмы в лизосомы, тем самым снижая токсическую нагрузку на клетки (Tan J. [et al.], 2011). SPCA1 (secretory pathway  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase pump type 1) — это  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -транспортная АТФаза, которая присутствует на аппарате Гольджи всех типов клеток, но в особенности клеток ЦНС, и осуществляет перенос ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  из цитоплазмы в цистерны аппарата Гольджи. Оказавшись в цистернах аппарата Гольджи, марганец связывается с трансмембранным белком GPP130 (cis-Golgi glycoprotein 130), вызывает его олигомеризацию с последующей транслокацией из аппарата Гольджи в мультивезикулярные тельца, а затем в лизосомы, где белок подвергается деградации, а марганец выводится из клетки (Mukhopadhyay S. [et al.], 2010). Поэтому сверхэкспрессия SPCA1 повышает толерантность клеток к марганцу, а нокадаун соответствующего гена, напротив, снижает жизнеспособность клеток после аппликации марганца (Leitch S. [et al.], 2011). Повышение концентрации внутриклеточного марганца приводит к увеличению продукции SPCA1 клетками. Например, при хроническом введении крысам  $\text{MnCl}_2$  в дозе 30 мг/кг массы животного в течение 30 дней наблюдается двукратное увеличение экспрессии SPCA1, которое может рассматриваться как компенсаторный детоксикационный процесс (Zhang S. [et al.], 2005). Однако дальнейшее повышение уровня марганца в клетках не влияет на уровень экспрессии SPCA1 и даже подавляет активность данной АТФазы (Sepúlveda M. R. [et al.], 2012).

Таким образом, содержание марганца в клетке определяется соотношением двух процессов: его поступлением из кровяного русла и функционированием систем детоксикации. При достижении пороговой концентрации начинают проявляться токсические эффекты, которые в большей степени сказываются на функционировании экстрапирамидной системы.

# **ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТАЛЛОВ**

*Под редакцией Д. Э. Коржевского*

Редактор *Пугачева Н. Г.*  
Корректор *Полушкина В. В.*  
Компьютерная верстка *Тархановой А. П.*

Подписано в печать 11.11.2016. Формат 60 × 88 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>.  
Печ. л. 4. Тираж 300 экз. Заказ №

ООО «Издательство „СпецЛит“».  
190103, Санкт-Петербург, 10-я Красноармейская ул., д. 15  
тел./факс: (812) 495-36-09, 495-36-12  
<http://www.speclit.spb.ru>

Отпечатано в ООО «Литография Принт».  
191119, Санкт-Петербург, Днепропетровская ул., д. 8