

ЛЕКЦИЯ 3

КРАСИТЕЛИ

Классификация.

Распространенные методы окраски цитологических препаратов.

КЛАССИФИКАЦИЯ КРАСИТЕЛЕЙ

- × Красители, используемые в цитологической диагностики, можно классифицировать по следующим критериям:

- × I. По происхождению:
 1. **Естественные** – к которым относятся краски растительного и животного происхождения.
 2. **Искусственные** (полученные при помощи химического синтеза).
- × Краской растительного происхождения является гематоксилин, который добывается из кампешевого дерева, растущего в Америке и в Армении.
- × К краскам животного происхождения относится кармин, который добывается из насекомых кошенили, живущих на кактусовых деревьях в Мексике, Армении и др.
- × В настоящее время большинство красок готовят синтетически.
- × II. По химическому составу:
 1. **Кислые** – кислоты и кислые соли (эозин, кислый фуксин).
 2. **Основные** – основные соли (гематоксилин, азур 2, кармин).
 3. **Нейтральные** – смесь двух красителей: основного (азур 2) и кислого (эозин).

КЛАССИФИКАЦИЯ КРАСИТЕЛЕЙ

- × гематоксилин, который окрашивает ядра клеток в фиолетовый цвет, и кислый краситель – эозин, окрашивающий цитоплазму в розово-желтый цвет. Избирательное сродство структур к определенным красителям обусловлено их химическим составом и физическими свойствами. Структуры, хорошо окрашивающиеся кислыми красителями, называются оксифильными, а окрашивающиеся основными – базофильными. Например, цитоплазма клеток чаще всего окрашивается оксифильно, а ядра клеток – окрашиваются базофильно. Структуры, воспринимающие как кислые, так и основные красители, являются нейтрофильными (гетерофильными).
- × 4. **Индифферентные красители** (судан III, судан IV).

КЛАССИФИКАЦИЯ КРАСИТЕЛЕЙ

- ✗ 5. **Флюорохромы** - это
- ✗ группа красителей, способных флюоресцировать при той или иной длине волны возбуждающего света.
- ✗ Несмотря на то, что мы выделили эти красители в самостоятельную группу, большинство из них следовало бы отнести к **цитоплазматическим** или, реже, к **ядерным красителям.**
- ✗ Так, например, **флюоресцеин**, поглощая свет с длиной волны 420–490 нм, излучает свет с длиной волны 520–540 нм. При этом объекты, окрашенные флюоресцеином в люминесцентном микроскопе, светятся зеленым светом.

КЛАССИФИКАЦИЯ КРАСИТЕЛЕЙ

- ✘ III. По способности окрашивать определенные цитологические структуры (по тинкториальным свойствам):
 - ✘ 1. Ядерные (окрашивание ядра). Представляют собой едва ли не самую многочисленную группу красителей вообще. Основная цель обработки данными веществами состоит в том, чтобы выявить материал, близкий к ДНК или РНК.
- ✘ По механизму окрашивания ядерные красители делят на две группы, принципиально отличающиеся друг от друга:
 - ✘ 1. основные красители
 - ✘ 2. протравные красители

КЛАССИФИКАЦИЯ КРАСИТЕЛЕЙ

- ✗ Применение основных красителей (все они являются «катионными») основано на образовании соединений типа солей в присутствии ДНК или РНК. К ним относятся:
 - ✗ - Азокрасители (янус зеленый В, бисмарк коричневый).
 - ✗ - Сафранины (сафранин Т, сафранин А, сафранин О, феносафранин).
 - ✗ - Оксазиновые красители (бриллиантовый крезиловый синий, крезиловый прочный фиолетовый).
 - ✗ - Тиазины (тионин; азуры С, А, В; метиленовый синий; толуидиновый синий).
 - ✗ - Трифенилметановые (парарозанилин, кристаллический фиолетовый, метиловый фиолетовый, метиловый зеленый, альциановый синий).

КЛАССИФИКАЦИЯ КРАСИТЕЛЕЙ

- ✘ В основу методик применения протравных красителей легла способность ряда соединений образовывать ярко окрашенные лаки с ионами металлов – лития, железа, хрома. В эту группу входят **гематоксилин, кармин (карминовая кислота), ализаринцианин, ализарин, бразиллин, галлоцианин** и т.д.
- ✘ В зависимости от того, ион какого металла входит в состав протравного реагента, конечный цвет окраски может меняться от красного до зеленовато-черного.

КЛАССИФИКАЦИЯ КРАСИТЕЛЕЙ

- × 2. цитоплазматические (окрашивающие цитоплазмы), группа красителей представлена сульфоновыми и карбоновыми кислотами, которые в тканях прочно связываются с белками и в результате окрашивают большинство внеядерных структур.
- × К ним относятся:
- × эозин, пикрофуксин, аурамин О, эритрозин, конго красный и т.д.

КЛАССИФИКАЦИЯ КРАСИТЕЛЕЙ

- ✘ В большинстве методик цитоплазматические красители используются для контраста после окраски ядерными красителями. Несколько реже прибегают к такому свойству цитоплазматических красителей, как способность окрашивать живые клетки без нарушения функций последних (так называемые витальные красители); в таких методиках применяют очень большие разведения красителей – от 1:1000 до 1:20000.
- ✘ 3. Специальные, окрашивающие избирательно определенных структур клеток – судан III (**окрашивает жир в оранжевый цвет**), осмиевая кислота (**импрегнируемый ею жир окрашивается в черный цвет**).

МЕТАХРОМАЗИЯ

× Метахромазия :

× свойство клеток и тканей окрашиваться в цветовой тон, отличающийся от цвета самого красителя, а также свойство изменённых клеток и тканей окрашиваться в иной цвет по сравнению с нормальными клетками и тканями. Обусловлена полимеризацией молекул красителя под влиянием свободных отрицательных зарядов клеток или ткани.

× Отмечается при патологии соединительной ткани, опухолевом росте, некробиотических изменениях

СВЕТОВАЯ МИКРОСКОПИЯ

- ✘ Микроскопирование – основной метод изучения клеток. Современные микроскопы представляют собой разнообразные сложные оптические системы, обладающие высокой разрешающей способностью и позволяющие изучать очень тонкие детали строения клеток. Размер самой маленькой структуры, которую можно видеть в микроскопе, определяется наименьшим разрешаемым расстоянием (d_0). В основном оно зависит от длины световой волны λ , и эта зависимость приближенно выражается формулой $d_0 = \lambda / 2$.

СВЕТОВАЯ МИКРОСКОПИЯ

- ✘ Понятие «увеличение микроскопа» относится к его оптической системе и выражается в произведении увеличений объектива и окуляра. Однако «разрешение» микроскопа зависит от характеристик объектива и не зависит от окуляра.
- ✘ Для изучения **цитологических препаратов** чаще применяют **обычные световые микроскопы** различных марок, когда в качестве источника освещения используют **естественный или искусственный свет**.
- ✘ Минимальная длина волны видимой части спектра света соответствует примерно **0,4 мкм (фиолетовый спектр)**. Следовательно, для **обычного светового микроскопа разрешаемое расстояние** равно приблизительно **0,2 мкм**, а **общее увеличение** (произведение увеличения объектива на увеличение окуляра) достигает **2000 раз**.

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ

- ✗ микроскопия ведётся в проходящем свете, для чего препарат должен быть достаточно тонким;
- ✗ микроскоп даёт перевёрнутое изображение объекта.
- ✗ Для получения правильной информации необходимо последовательное микроскопическое изучение всего цитологического мазка. Обзор цитологической картины проводят под малым увеличением (x10), детализацию выбранных объектов – под увеличением (x20, x40); далее микроскопическое изучение мазка выполняется под иммерсионным объективом (x90, x100).

Вначале проводят систематическое изучение полей зрения по краю мазка. Затем мазок исследуют методом «систематического перекрестного двухразового шага», который позволяет практически без пропуска изучить каждый миллиметр площади препарата.

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ

- ✗ Люминесцентный метод - позволяет видеть клетки и различать их по цвету свечения, возникшего под влиянием флюорохрома;
- ✗ фазово-контрастный метод - позволяет рассмотреть особенность клеток, не прибегая к фиксации и окраске (в нативном состоянии) даже с иммерсионной системой.

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ

- ✘ Метод нативного препарата при световом микроскопе в цитологическом исследовании играет **ориентировочную роль** и используется в общем клинико-лабораторном анализе.

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ОКРАШЕННОГО ЦИТОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА

- ✘ Качественное окрашивание позволяет правильно идентифицировать клеточные элементы мазка и оценить их особенности при микроскопии.
- ✘ Хороший качественно окрашенный мазок должен:
 - ✘ - равномерно окрашиваться;
 - ✘ - не содержать артефакты (рыхлые скопления краски) и сморщенные клетки;
 - ✘ - иметь в достаточном количестве равномерно распределенные клетки (все участки мазка должны хорошо просматриваться и не содержать "толстые участки", содержащие непросматриваемые (плохо просматриваемые) скопления или комплексы клеток);
 - ✘ - окрашивать селективно структуры цитоплазмы, ядра, ядерного хроматина, ядрышек.
- ✘ В основе окрашивания клеток лежат физико-химические процессы (диффузия, адсорбция, абсорбция, растворимость и др.), происходящие как в красителе, так и в микроструктурах.

МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ

- × Рекомендуемые методы окрашивания цитологических мазков:
- × аzur-эозиновый,
- × Романовскому-Гимзе,
- × Лейшману,
- × Маю-Грюнвальду,
- × Паппенгейму,
- × гематоксилин- эозиновый,
- × Папаниколау

МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ

- ✘ Самым распространённым методом окраски является окраска гематоксилин-эозином.
- ✘ Сочетает в себе основной и кислый красители, поэтому позволяет выявить почти все клетки и многие неклеточные структуры (ядра приобретают **сине-фиолетовый** цвет, цитоплазма – **желтовато-розовый** цвет).
- ✘ Гематоксилин сам по себе не является красящим веществом.
- ✘ Для того чтобы приготовить краску, гематоксилин подвергают окислению (по методу Эрлиха, Майеру, Караци – калийными квасцами), в результате чего он превращается в красящее вещество – гематеин (**сине-фиолетовый краситель**).
- ✘ При этом на окисление гематоксилина требуется от **10 дней до 2–3 недель**.
- ✘ Этот процесс ускоряют с помощью солей алюминия, хрома, железа и др.

ОКРАСКА АЗУР-ЭОЗИНОВЫМИ КРАСИТЕЛЯМИ

- ✘ Метод окрашивания по Романовскому (азур-эозиновой смесью) в разных лабораториях используется в разных модификациях:
- ✘ Паппенгейму (Май-Грюнвельду-Гимзе),
- ✘ Лейшману,
- ✘ Романовскому-Гимзе и т.д.
- ✘ **Преимущество метода является четкое прокрашивание ядер, вследствие чего хорошо просматриваются структуры хроматина, а также бактериальная флора и простейшие.**

ОКРАСКА ПО РОМАНОВСКОМУ-ГИМЗЕ

- ✘ Краситель состоит из щелочной части (азур II – ярко-синий цвет), и кислой части (эозин – розово-красный цвет).
- ✘ Бактерии окрашиваются в фиолетово-красный цвет, цитоплазма клеток – в голубой, ядра – в красный.
- ✘ При окрашивании простейших их цитоплазма приобретает голубой цвет, а ядра – красно-фиолетовый.

ОКРАСКА ПО РОМАНОВСКОМУ-ГИМЗЕ

- × Результаты окрашивания мазков **крови**:
- × **Ядра клеток** – красно-фиолетовые.
- × **Эозинофильные гранулы** – красновато-коричневые.
- × **Базофильные гранулы** – синие.
- × **Нейтрофильные гранулы** – фиолетовые.
- × **Цитоплазма лимфоцитов** – голубая.
- × **Эритроциты** – бледно-красные.
- × **Тромбоциты** – наружная часть синяя (более светлая); внутренняя – фиолетовая (более темная).

ОКРАСКА ПО МАЮ-ГРЮНВАЛЬДУ

- × Данный метод очень удобен для визуализации гранулоцитов.
- × Для окрашивания применяется готовый раствор эозин-метиленового синего по Маю-Грюнвальду. Мазок без предварительной фиксации заливают красителем, через 5 минут промывают и высушивают
- × Лимфоциты – ядра: сине-фиолетовые; цитоплазма: голубая
- × Моноциты – ядра: сине-фиолетовые; цитоплазма: серо-голубая.
- × Гранулоциты – ядра: сине-фиолетовые; гранулы: красные, фиолетовые, темно-синие (зависит от типа).
- × Тромбоциты – наружная часть голубая; внутренняя – фиолетовая
- × Эритроциты – розовые

ОКРАСКА ПО ПАППЕНГЕЙМУ

- × Представляет собой комбинацию двух предыдущих методов.
- × Ядра клеток – красно-фиолетовые.
- × Цитоплазма лимфоидных клеток – светло-синяя.
- × Лимфоидная азурная грануляция – ярко-синяя.
- × Миелоидная азурная грануляция – фиолетовая.
- × Нейтрофильные гранулы – светло-фиолетовые.
- × Эозинофильные гранулы – красные, красно-коричневые.
- × Базофильные гранулы – темно-фиолетовые, черные.
- × Эритроциты – розовые (полихроматофильные эритроциты - синеватые).
- × Тельца Жолли – красновато-фиолетовые.
- × Тельца Ауэра – ярко-красные.

МЕТОДИКА ОКРАСКИ ПО ЛЕЙШМАНУ

- ✘ Высушенные на воздухе препараты заливают краской Лейшмана на 3 мин., при этом препарат одновременно фиксируется.
 - ✘ После этого промывают водопроводной водой и заливают азур-эозиновой смесью (40 мл 0, 1% азура II и 30 мл 0,1% эозина К) на 15–20 мин.
 - ✘ Затем промывают водопроводной водой, высушивают на воздухе и микроскопируют.
- Используется для выявления **малярийных плазмодиев.**

ЭКСПРЕСС – МЕТОДЫ ОКРАСКИ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

- ✘ Окраска по Алексееву:
- ✘ Ответ дается уже через 5–10 минут.
- ✘ Метод Алексеева предусматривает ускоренную обработку цитологических препаратов азур-эозиновыми смесями по принципу Романовского с целью получения привычной цитологической картины.
- ✘ Окраска по этому методу тканевых и опухолевых клеток, лейкоцитов четко выделяет структуры ядер, хорошо видны нуклеолы, зернистость и включения протоплазмы.
- ✘ Эритроциты частично гемолизируются, что облегчает исследование.

ОКРАСКА ПО ПАПАНИКОЛАУ

- ✘ Является наилучшим для гинекологических мазков, так как этот метод **полихромный**, он позволяет оценить степень созревания цитоплазмы (**от сине-зеленого цвета в незрелых клетках до розового в клетках со зрелой цитоплазмой и оранжевого в клетках с ороговением**), благодаря влажной фиксации хорошо сохраняются ядра, клеточная мембрана и структура хроматина.
- ✘ Ответ дается через **15–20 минут**.

ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

- ✘ Основаны на специфической химической цветной реакции между химическим реактивом и определённым компонентом клетки для определения в клетках различных веществ (**под действием специально подобранных реактивов происходит окрашивание тех или иных веществ в цитоплазме, а по степени и характеру окраски судят о количестве или активности исследуемых веществ**).

ШИК-РЕАКЦИЯ ИЛИ PAS-РЕАКЦИЯ

✘ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЛИКОГЕНА.

Реактив – Шифф-периодная кислота (выделенные буквы и составляют аббревиатуру ШИК – шифф-йодная кислота).

✘ Под влиянием периодата калия гликоген окисляется с образованием альдегидных соединений, легко реагирующих с реактивом Шиффа (фуксин-сернистая кислота).

✘ В местах локализации гликогена выявляется **вишнево-фиолетовое окрашивание**, по интенсивности которого можно судить о количестве гликогена в клетках.

✘ Кроме гликогена, положительную реакцию могут давать такие ШИК-положительные вещества, как **кислые и нейтральные мукополисахариды, мукопротеины, гликопротеины** и др.

✘ Гликоген легко дифференцировать от других веществ пробой со слюной или диастазой.

МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ

- ✘ Оксидазы – ферменты, катализирующие окислительные процессы молекулярным кислородом. Среди них особое значение имеет миелопероксидаза (МП).
- ✘ Миелопероксидаза – лизосомальный фермент, катализирующий в присутствии перекиси водорода окисление различных субстратов.
- ✘ Локализуется преимущественно в **неспецифических азурофильных гранулах** в цитоплазме гранулоцитов и является маркером клеток миелоидного ряда.
- ✘ Выявляется в клетках **гранулоцитарного ряда, начиная с миелобласта. Активность фермента повышается по мере созревания клеток. Однако, по мере дифференцировки их в зрелые клетки, активность фермента снижается.**
- ✘ В клетках миелопероксидаза участвует в реакциях разрушения токсичной перекиси водорода.

МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ

В цитохимических реакциях активность миелопероксидазы определяется по окислению хромогенов (бензидина, о-дианизидина и других) **по методу Грэхема-Кноля или его модификаций.**

Реакция используется главным образом с целью диагностики **острых лейкозов.**

МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ

- × Щелочная фосфатаза (ЩФ)
- × фермент, который способен освободить фосфат, катализируя отщепление фосфатных групп из фосфомоноэфиров в **щелочной среде** и принимает участие в обмене липидов и нуклеиновых кислот.
- × Содержится исключительно в зрелых нейтрофилах.
- × В периферической крови активность щелочной фосфатазы значительно выше, чем в клетках костного мозга.
- × Фермент выявляется в виде желто-коричневых гранул в цитоплазме.

ВЫЯВЛЕНИЕ РНК- И ДНК-СОДЕРЖАЩИХ СТРУКТУР

× Реакция Браше

× Метод служит для выявления РНК.

× Используется реактив из смеси двух красителей: метилового зелёного и пиронина.

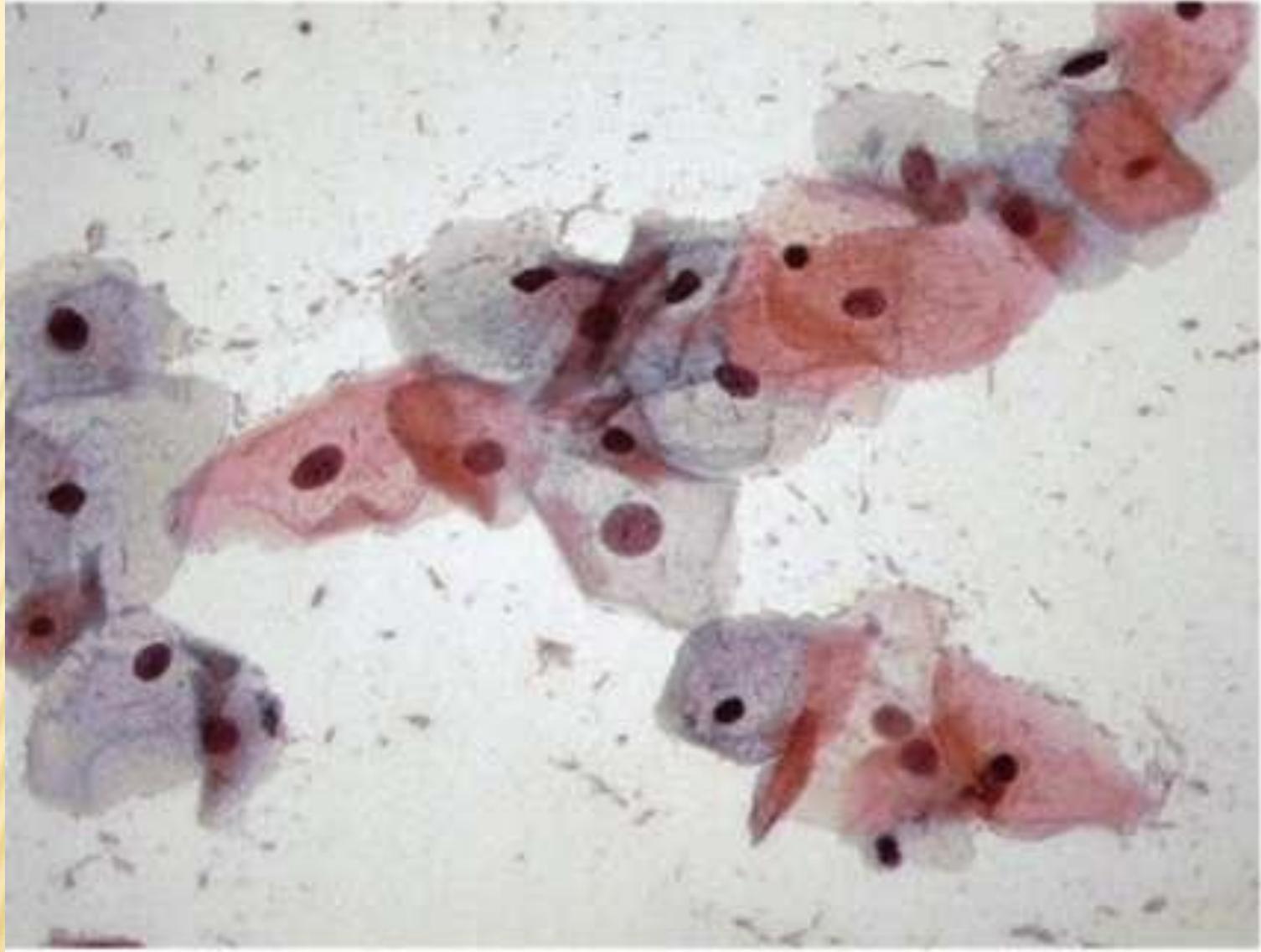
× Пиронин специфически окрашивает **РНК в красный цвет**. Поэтому на препарате ядрышки (в составе ядра) и рибосомбогатые участки цитоплазмы имеют **красный цвет**. **Другие структуры ядра (помимо ядрышек) – зелёные.**

× Реакция Фёльгена

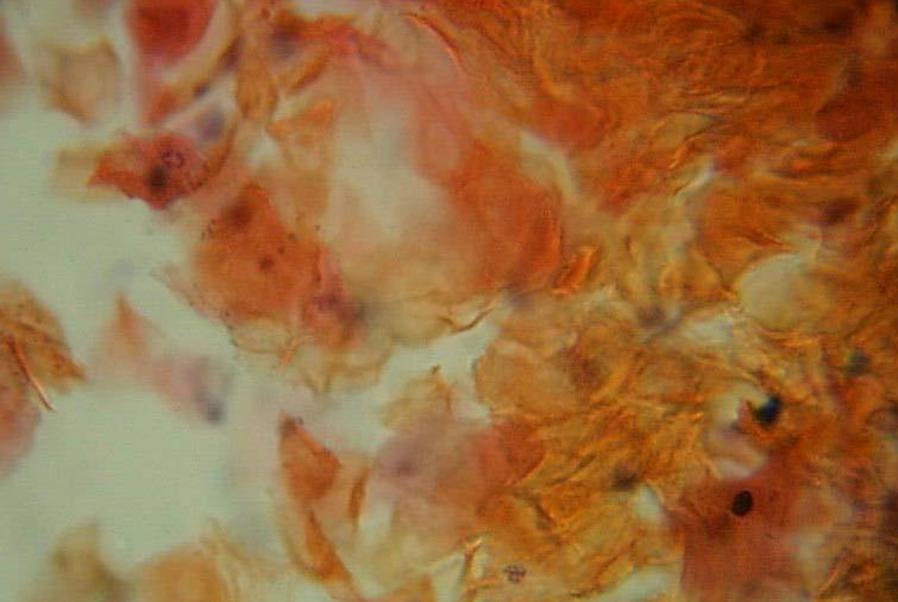
× Основной реактив – фуксинсернистая кислота (реактив Шиффа). ДНК-содержащие структуры окрашиваются в **пурпурно-красный цвет**.

ЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПИДОВ

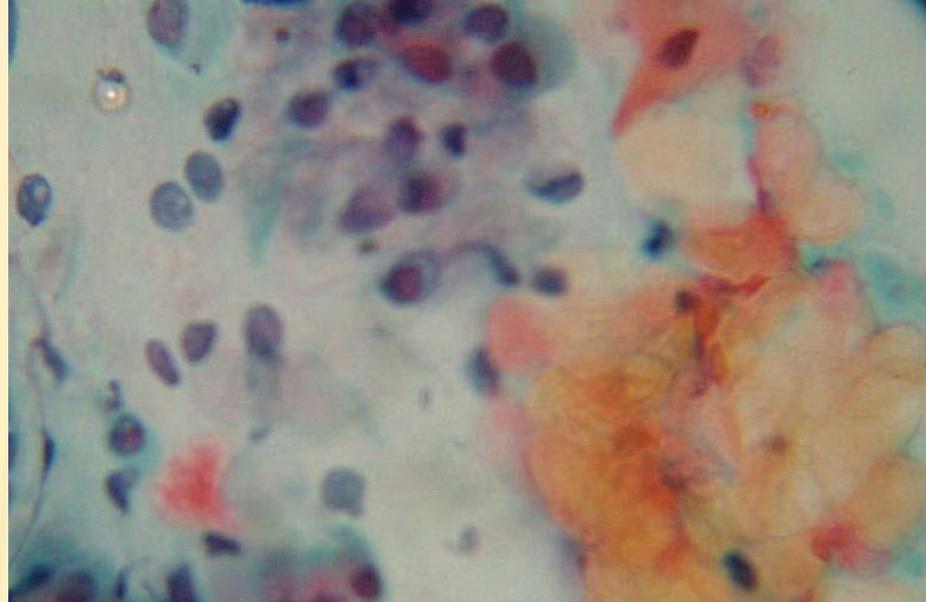
- ✗ Липиды локализуются в цитоплазме клеток главным образом в мембранах органелл и обнаруживаются преимущественно в нейтрофильных гранулоцитах.
- ✗ Играют важную роль в проницаемости мембран.
- ✗ Цитохимическое исследование липидов основано на применении красящих веществ, растворяющихся в жирах (судан III, судан IV, черный судан и др.). Для выявления нейтрального жира пользуются суданом III, окрашивающим жир в оранжевый цвет.
- ✗ Липоиды выявляются лучше суданом черным (черное окрашивание).



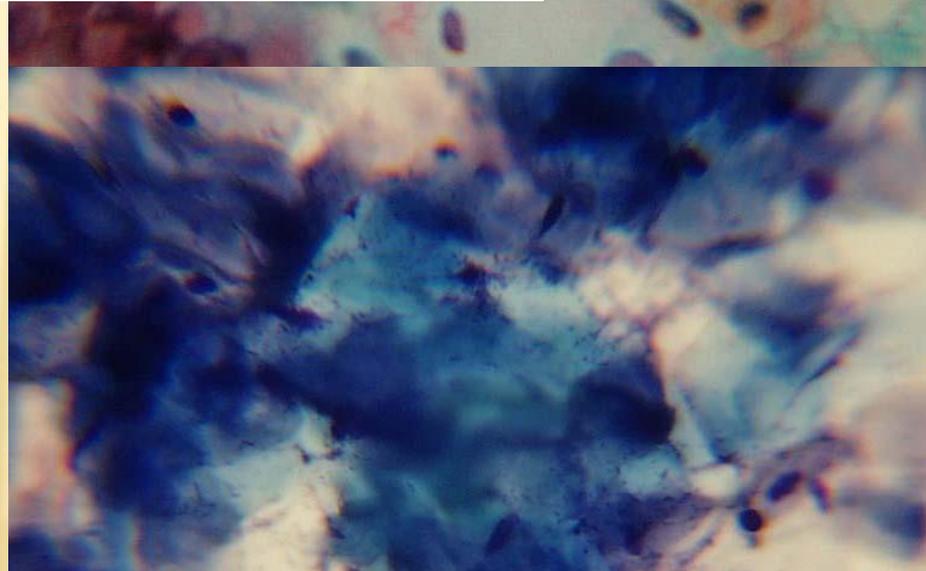
@ Шабалова И.П., Полонская Н.Ю. Мазок из шейки матки. Норма. Зрелые клетки плоского эпителия крупного размера; ядра мелкие, правильной овальной и округлой формы, окрашены равномерно. Окрашивание по Папаниколау. Увеличение -400



Окрашивание по Папаниколау



Окрашивание гематоксилин-эозином



Окрашивание по Паппенгейму