

Лекция 11

Тема: Красители. Классификация.
Приготовление красителей.
Артефакты. Методы микроскопии.

В основе окрашивания клеток лежат физико-химические процессы (диффузия, адсорбция, растворимость). Эти процессы происходят как в красителе, так и в микроструктурах.

Классификация красителей

По происхождению:

- естественные – краски растительного и животного происхождения;

Гематоксилин – краска растительного происхождения, добывается из кампешевого дерева, растущего в Америке и в Армении (свежевырубленная древесина красного цвета, а на воздухе окисляется и становится темно-сиреневой).

Кармин – краска животного происхождения. Это красный краситель, получаемый из карминовой к-ты, производимой самками насекомых кошенили (тля), живущих на деревьях в Мексике, Армении.

Кампешевое дерево



Насекомых кошенили (тля)



кармин

- искусственные – краски, полученные при помощи химического синтеза.

По химическому составу:

- ☐ Кислые
- ☐ Основные
- ☐ Нейтральные
- ☐ Индифферентные
- ☐ Флюорохромы

❑ Основные красители

- Основные (щелочные) красители активно связываются со структурами, которые содержат кислоты и несут отрицательный заряд, н-р, ДНК и РНК.
- К ним относятся гематоксилин (окрашивает ядра клеток в фиолетовый цвет), толуидиновый синий, тионин, метиленовый синий и др.
- Структуры, связывающие эти красители, называются **базофильными**. Способность окрашиваться основными красителями называется **базофилией**.
- В клетке базофилией обладает ядро (из-за высокого содержания ДНК и РНК), иногда цитоплазма (при высоком содержании в ней рибосом или гранулярной ЭПС).

❑ Кислые красители

- Кислые красители связываются со структурами имеющими положительный заряд, н-р, белки.
- К таким красителям относятся эозин (*окрашивает цитоплазму в розовый цвет*), эритрозин, пикриновая кислота и др.
- Структуры, связывающие эти красители, называются **оксифильными**. Способность окрашиваться кислыми красителями называется **оксифилией**.
- Оксифилия свойственна цитоплазме клеток (особенно при высоком содержании в ней митохондрий и некоторых белковых секреторных гранул), эритроцитам (из-за высокого содержания в них гемоглобина).

❑ **Нейтральные красители**

- Представляют собой смесь двух красителей: основного и кислого.
- Используют для визуализации гранул и ядер.
- Структуры, воспринимающие как кислые, так и основные красители, являются **нейтрофильными**. Способность окрашиваться и кислыми, и основными красителями называется **нейтрофилией**.

❑ **Индифферентные красители** (судан III, судан IV). Им окрашиваются жировые капли (в которых он растворяется).

❑ **Флюорохромы**. Красители, способные флюоресцировать при определенной волне возбуждающего света.

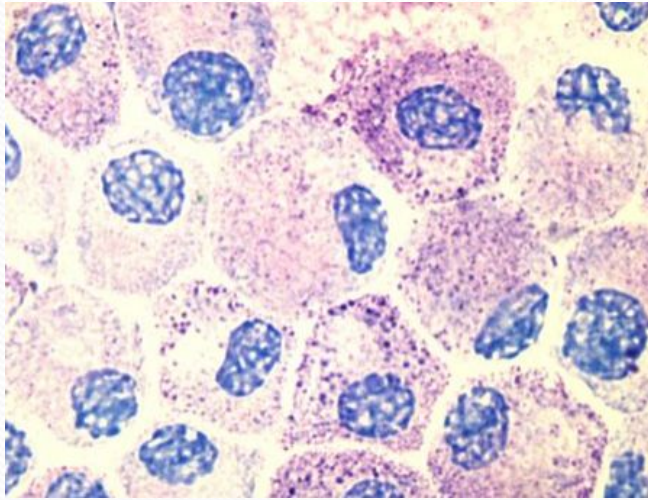
По способности окрашивать определенные цитологические структуры (по тинкториальным свойствам):

- **Ядерные** (окрашивание ядра). Цель обработки – выявить материал, близкий к ДНК или РНК. По механизму окрашивания их делят на две группы: основные красители и протравные красители (содержат ионы тяжелых металлов).
- **Цитоплазматические** (окрашивание цитоплазмы). Эта группа красителей представлена сульфоновыми и карбоновыми кислотами, которые в тканях прочно связываются с белками и в результате окрашивают большинство внеядерных структур.

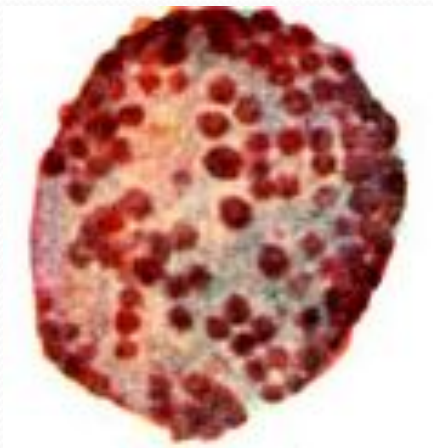
МЕТАХРОМАЗИЯ

Метахромазия (от греч. meta – изменение, chroma – цвет) – изменение цвета некоторых основных красителей при их связывании со структурами, обладающими специфическими химическими свойствами.

- К таким красителям относятся толуидиновый синий, азур II, тионин и др.
- Указанные красители окрашивают другие базофильные структуры в тех же тканях в свойственный им цвет, т.е. ортохроматически.
- Способностью метахроматически окрашиваться обладают гранулы базофильных лейкоцитов и тучных клеток.



Для визуализации гранул
тучных клеток используется
толуидиновый синий.



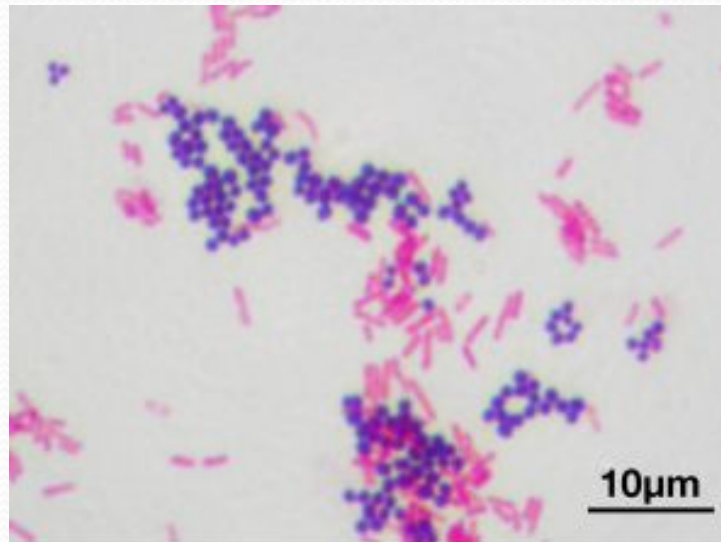
Базофильный лейкоцит: гранулы
состоят из гепарина, серотонина,
гистамина, поэтому при окраске по
Романовскому-Гимзе гранулы красно-
вишневого цвета, тогда как основной
краситель азур – синего цвета.



Тинкториальность – это способность воспринимать краски определенного цвета.

Тинкториальными свойствами обладают клеточные структуры бактерий, это отражает их способность вступать в реакцию с красителями, что дает возможность отличать бактерии друг от друга.

Суть окраски по Грамму Основной краситель (например, **кристаллический фиолетовый**) прочно фиксируется в стенке грамположительных бактерий, придавая им **иссиня-черный цвет**, и легко вымывается спиртом (или ацетоном) из стенки грамотрицательных бактерий, после чего они докрашиваются контрастным красителем (**сафранином**) в **красный цвет**.



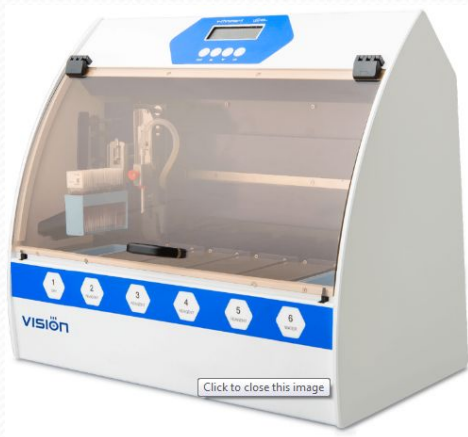
Окрашивание по Граму. Кокки (шаровидные)
— грамположительные и бациллы (палочки)
— грамотрицательные

Оценка качества цитологического препарата

Хороший качественно окрашенный мазок должен быть:

- равномерно окрашен;
- не содержать артефакты (рыхлые скопления краски и сморщенные клетки;
- иметь в достаточном количестве равномерно распределенные клетки (все участки мазка должны хорошо просматриваться);
- избирательно должны быть окрашены структуры цитоплазмы, ядра, ядерного хроматина, ядрышек.

Лабораторное оборудование для окраски больших партий мазков



*Автоматический стейнер для окраски
микроскопических препаратов V-Chromer.*

Обеспечивает равномерную, качественную окраску препаратов, с минимальным расходом реактивов.



*Автомат окраски мазков крови
ЭМКОСТЕЙНЕР*

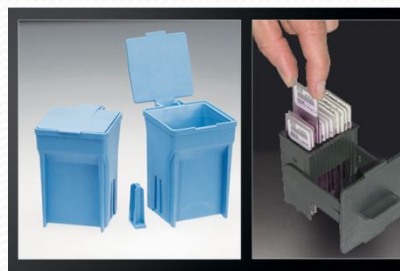
Окрашивание производится путём последовательного программируемого перемещения штативов с предметными стёклами по технологическим станциям, где проводится обработка препаратов.

Лабораторная посуда

- широкогорлые банки с притертыми крышками (50-200 мл., применяются для хранения химических реактивов);



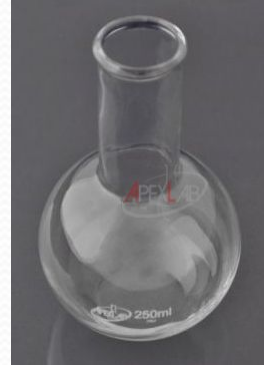
- **КЮВЕТЫ** — стеклянные или из высококачественной пластмассы (устойчивой к реагентам) для окраски препаратов;



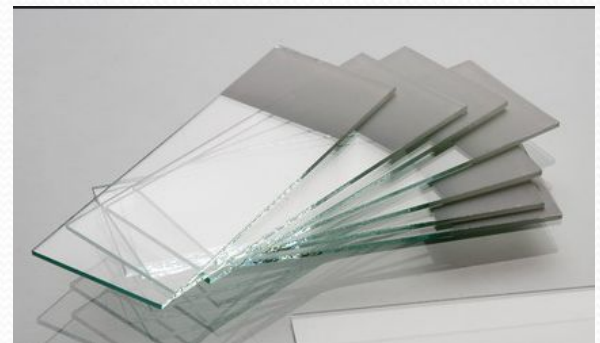
- **мерная посуда** — цилиндры и мензурки различной емкости



- **колбы** – (50мл - 2л) малые – для приготовления и хранения растворов различных красителей, большие – для дистиллированной воды.



- **Пипетки** обычные используют для накапывания на срезы красителей и различных жидкостей, градуированные (емкостью 0,1-100 мл) применяют для отмеривания малых количеств различных жидкостей.
- **Предметные стекла** - предназначенные для размещения цитологических препаратов.



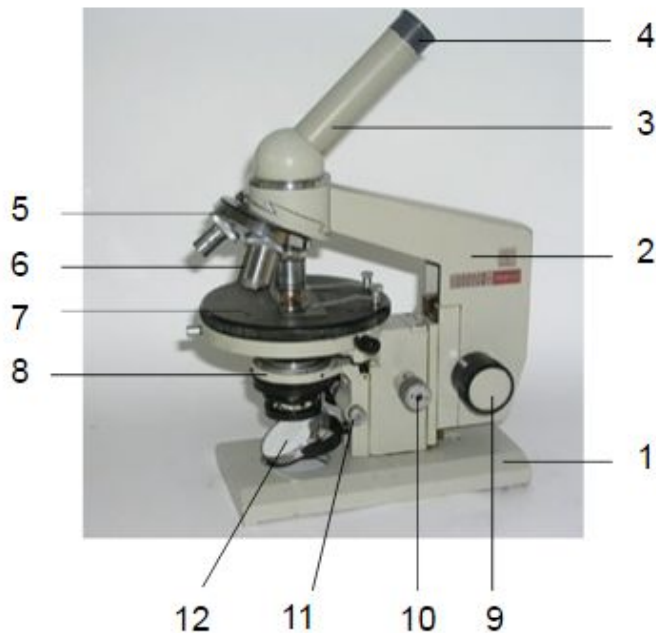
Световая микроскопия

МИКРОСКОПИРОВАНИЕ — основной метод изучения клеток.

- Современные микроскопы – это сложные оптические системы, обладающие высокой разрешающей способностью и позволяющие изучать детали строения клеток.

Устройство светового микроскопа

В микроскоп входят **3 системы**: - оптическая,
- осветительная,
- механическая.



1. Основание микроскопа
2. Тубусодержатель
3. Тубус
4. Окуляр (чаще $\times 7$)
5. Револьвер микроскопа
6. Объективы
 - а) сухие: $\times 8$, $\times 20$, $\times 40$
 - б) иммерсионный $\times 90$
7. Предметный столик
8. Конденсор
9. Макрометрический винт
10. Микрометрический винт
11. Винт конденсора
12. Зеркало

Световые лучи проходят следующий путь:
источник света, зеркало, конденсор, диафрагма, препарат,
объектив, тубус, окуляр.

Микроскопия нативных препаратов

НАТИВНЫЕ ПРЕПАРАТЫ – это нефиксированные и неокрашенные препараты.

- Путем микроскопии в препарате выявляют живые микроорганизмы, оценивают подвижность и морфологические свойства возбудителя.

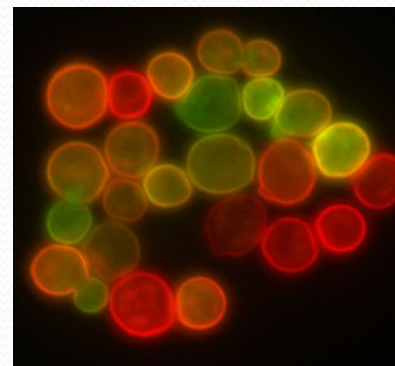
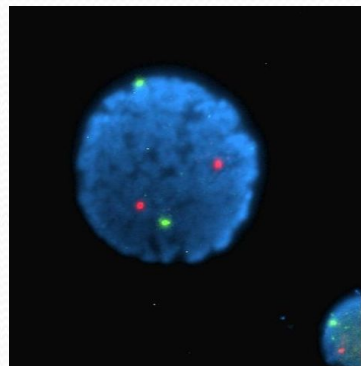
Н-р, микроскопию нативных препаратов используют в диагностике сифилиса, тифа, кандидоза или др. грибковых заболеваний.

Фазово-контрастная и люминесцентная микроскопия мазков

Люминесцентный метод позволяет видеть клетки и различать их по цвету свечения, возникшего под влиянием флюорохрома.

- Применяется при массовых профилактических осмотрах женщин, при диагностике злокачественных новообразований в соскобах, пунктатах, мокроте, промывных водах.
- Препарат ярко окрашен, атипичные клетки выделяются ярким свечением.

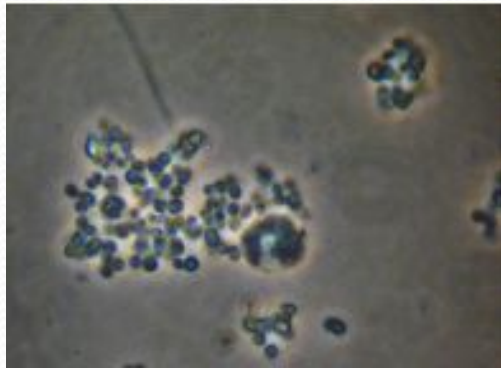
лимфоцит
человека



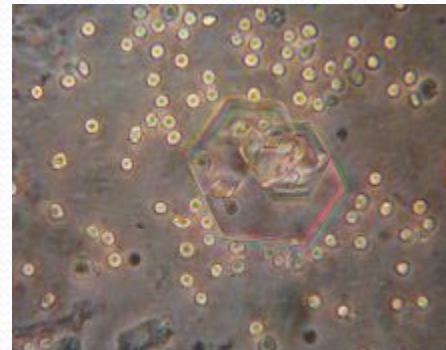
клеточная
оболочка
дрожжевой
клетки

Фазово-контрастный метод служит для получения контрастных изображений прозрачных и бесцветных объектов, позволяет изучать неокрашенные препараты (нативные).

Суть: световая волна, проходя через разные элементы препарата, претерпевает разные изменения по фазе. Эти фазовые изменения не воспринимаются глазом, но с помощью спец. оптического устройства изменяется амплитуда световой волны, которая уже различима глазом.



Скопления стафилококков в
мочевом осадке, $\times 100$



Кристаллы цистина в
мочевом осадке, $\times 40$