



Методы фиксации, окраски в цитологии

Кондратьева С.В.

**К.м.н., Врач КЛД высшей категории
специалист Центра по лабораторному
делу и контролю качества Томской
области ОГАУЗ «ОПЦ»**

**Председатель правления ассоциации
специалистов лабораторной медицины
Томской области ТРОО «ПАСЛМ»**



Томск - 2016г.

Фиксация препаратов

Наиболее распространенные фиксаторы:

- Метанол (3-10 мин).
- Этиловый спирт, 96° (10-30 мин).
- Смесь Никифорова - спирт-эфирная смесь 1:1 (15-60 мин).
- 10 % формалин.
- Спирт-формалиновый р-р (10 мл 40% формалина и 90 мл 96° спирта).
- Жидкость Карнуа (смесь спирта, хлороформа, ледяной уксусной кислоты).
- Краски Мая-Грюнвальда, Лейшмана – одновременная фиксация.

Лучшим фиксатором для цитологических препаратов является **метанол**.

Фиксация препаратов

Для фиксации может быть также использован **абсолютный этиловый спирт** (100°). Время фиксации составляет 10-30 мин.

Для приготовления абсолютного спирта в лабораторных условиях используется прокаленный (безводный) медный купорос.

Приготовление безводного купороса

Берут химически чистый синий купорос (если он крупнокристаллический, то его предварительно толкут в фарфоровой ступке) и прокаливают в фарфоровой чашке. В результате прокаливания происходит удаление кристаллизированной воды из молекулы медного купороса ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) и получается безводный купорос белого цвета (CuSO_4). При соприкосновении с водой такой безводный купорос вновь жадно поглощает воду и дает первоначальное соединение синего цвета, на чем и основано его применение для обезвоживания спирта.

Приготовление безводного купороса

Прокаливание ведут с соблюдением известных предосторожностей, а именно: мелко размельченный медный купорос небольшими порциями прокаливают на малом огне через асбестовую сетку в фарфоровой чашке (или медной посуде) при постоянном помешивании фарфоровой или стеклянной лопаткой. Нельзя пользоваться металлическим шпателем и вести прокаливание в железной и никелированной посуде. Несоблюдение указанных правил может привести к пережиганию, точнее, к разложению медного купороса с образованием окислов меди (CuO). Последнее обстоятельство весьма неблагоприятно сказывается на способности купороса поглощать воду.

Приготовление безводного купороса

Хорошо и осторожно прокаленный медный купорос должен быть совершенно белым или слегка голубоватым: при перекаливании он приобретает серый цвет. Пережженный купорос при соединении с водой дает грязно-зеленые тона, что является нежелательным, ибо затрудняет контроль за ходом обезвоживания спирта. Очень хорошо вести прокаливание купороса на электрической плитке малой мощности или даже в термостате при температуре 60-70°; в этом последнем случае мелко растолченный купорос рассыпают тонким слоем на картоне. Прокаливание в термостате при 60-70° идет медленно, около 3 нед (при ежедневном перемешивании), а при температуре 100° – в течение 1-2 дней (в фарфоровой чашке).

Приготовление безводного купороса

При прокаливании медный купорос начинает отдавать кристаллизированную воду уже при температуре 60° , а при 100° – частично разлагается и становится серым. Прокаленный купорос хранят в банке с притертой пробкой.

Приготовление абсолютного спирта

Для приготовления абсолютного спирта прокаленный белый купорос насыпают в большую широкогорлую банку и заливают 96° спиртом из такого расчета, чтобы слой спирта над купоросом превышал толщину слоя последнего не больше чем в 4-5 раз. Содержимое банки ежедневно взбалтывают в течение 4-5 дней, добиваясь посинения всей толщи оседающего купороса. После этого в банку подсыпают еще порцию белого купороса, но уже в меньшем количестве, примерно в 2-3 раза, и оставляют на 1-2 дня. Подсыпание купороса повторяют до тех пор, пока последняя порция его не перестанет синеть, тогда абсолютный спирт считается готовым. Такой абсолютный спирт хранится постоянно на медном купоросе и используется по мере надобности для различных целей.

Если обезвоживанию подвергается 95-96° спирт, то купорос (прокаленный) приходится добавлять не больше 1-2 раз, и выход абсолютного спирта в этом случае составляет около 60-70%. Относительно небольшой выход абсолютного спирта объясняется тем, что значительная часть его остается на

Классификация красителей

I. По происхождению:

Естественные – к которым относятся краски растительного и животного происхождения.

- Краской растительного происхождения является **гемотоксилин**, 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.

2. Искусственные (полученные при помощи химического синтеза).
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).

4. Индифферентные красители (судан III, судан IV).

5. Флюорохромы.

Группа красителей, способных флюоресцировать при той или иной длине волны возбуждающего света.

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.

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. **Это основные красители и протравные красители.**

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 крезильный синий, крезильный прочный фиолетовый).
- Тиазины (тионин; азуры С, А, В; метиленовый синий; толуидиновый синий).
- Трифенилметановые (парарозанилин, кристаллический фиолетовый, метиловый фиолетовый, метиловый зеленый, альциановый синий).

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 зеленоваточерного.

ядерные красители красят ядра любых клеток в свой основной цвет.

Например:

1. *Гематоксилин* – окрашивает ядра в фиолетово-чернильный цвет.
2. *Азур* – красит ядра в синий цвет.
3. *Сафранин* – окрашивает ядра в красный цвет.

Поскольку химическая природа ядра кислая (ДНК, РНК), ядерный краситель имеет свойства основания.

В связи с этим, **способность** какой-либо структуры **окрашиваться** основными красителями называется **базофилия** (**basis–** основание, **philia-** любовь), а сама структура – **базофильной**.

Высокая концентрация РНК в цитоплазме может обусловить ее базофилию.

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

2. Цитоплазматические (окрашивающие цитоплазмы).

Эта группа красителей представлена большей частью 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.

Цитоплазматические красители в сочетании с:

- фосфорновольфрамовой кислотой,
 - фосфорномолибденовой кислотой
- могут окрашивать специфические структуры клеток и тканей, например, коллаген.

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.

Цитоплазматические красители красят цитоплазму любых клеток в свой основной цвет (цвет красителя).

1. *Эозин* – красит цитоплазму в оранжево-розовый цвет.
2. *Водная синька* – в голубой цвет
3. *Фуксин кислый* – интенсивно-розовый цвет

Большинство цитоплазматических красителей являются кислыми, так как гиалоплазма дифференцированных клеток насыщена основными белками.

Свойство какой-либо структуры **окрашиваться кислыми** красителями называется ***ацидофилия*** или ***оксифилия*** (acidicum – кислота, philia - любовь), а сама структура – ***ацидофильной***.

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

3. Специальные,

применяют в тех случаях, когда исследуемое образование общими красителями не окрашивается.

Например, включения жира и включения слизи при общей окраске остаются бесцветными.

муцикармин позволяет окрасить слизь в красный цвет,

осмиевая кислота окрасит жир в черный,

судан III – жир – оранжево-красный цвет,

пикриновая кислота – мышечная ткань – желтый цвет,

кармин Беста – гликоген – красный цвет

резорцин – фуксин - эластические волокна – сине-фиолетовый цвет

орсеин – эластические волокна – красно-бурый цвет

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.

При применении любой методики окрашивание мазка важно точно соблюдать последовательность процедур приготовления растворов и временные промежутки в течение процесса окрашивания.

Существующие в продаже партии красителя имеют различную интенсивность окраски.

Это обязывает **опытным путём** установить оптимальные концентрации (разведение) и время окрашивания для каждого флакона красителя, который устанавливает при окрашивании серии препаратов растворами с различной концентрацией красителя, меняя длительность его воздействия.

При приготовлении растворов **необходимо учитывать рН воды**: она должна быть нейтральной (рН 6,8–7,2), что обеспечивается использованием **буферных** растворов.

Окрашивание препаратов

Классические (диагностические) окраски:

- *азуром и эозином (смеси);*
- *гемотоксилином и эозином.*

Специальные методы:

- *на гемосидерин (по Перлсу);*
- *окраска на слизь (альциановым синим, муцикармином);*
- *на ДНК (по Фельгену);*
- *на РНК (по Браше);*
- *на гликоген (Mc-Manus);*
- *на пероксидазу;*
- *на липиды;*
- *на кислую фосфатазу, неспецифическую эстеразу.*

Необходимо помнить, что каждый из этих методов имеет свои достоинства: азур хорошо прокрашивает хроматин ядер и позволяет оценить его структуру, при гиперхромии ядер оценка структуры хроматина, а также наличие ядрышкового аппарата можно провести только с использованием гематоксилина.

В связи с этим необходимо, по возможности, оставлять неокрашенными 1-2 препарата, чтобы провести дополнительные способы окраски, в том числе, специальные.

Рекомендуемые методы окрашивания цитологических мазков:

- Азур - эозиновый,
- по Романовскому - Гимзе,
- Лейшману,
- Маю - Грюнвальду,
- Паппенгейму;
- гематоксилин - эозиновый,
- метод Папаниколау.

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 аллюминия, хрома, железа и др.

- Квасцовый гематоксилин Майера готовят следующим образом: в литре дистиллированной воды растворяют 1 г гематоксилина, 0,2 г йодновато-кислого натрия (K₂J₂O₈) и 50 г калийных квасцов. Затем добавляют 50 г хлоралгидрата и 1 г кристаллической лимонной кислоты. Раствор годен для немедленного употребления и долгое время хорошо сохраняется. Препарат красят в течение 5–10 минут, после чего 10 минут промывают в проточной воде.

- Квасцовый гематоксилин по Эрлиху. Для приготовления красителя 2 г гематоксилина растворяют в 100 см³ 96-градусного спирта и добавляют 100 см³ воды, 100 см³ химически чистого глицерина, 3 г калийных квасцов и 10 см³ уксусной кислоты.

Краситель должен «созревать» примерно 14 дней. Раствор сохраняет свою красящую силу долгое время. Если вместо гематоксилина взять 0,25–0,5 г гематина, то краситель пригоден к употреблению тотчас же после изготовления. Окрашивание производят так же, как и гематоксилином Майера. Ядра окрашиваются в темно-синий цвет.

- Квасцовый гематоксилин по Карацци.

Преимуществом гематоксилин-эозиновых красителей является выраженное окрашивание ядер с атипией, в связи с чем этот метод хорошо использовать для исследования мазков при скрининге.

Окраска гематоксилин-эозином

Приготовление красителя гематоксилин

- Растворяют 50 г алюмокалиевых квасцов [$\text{KA1}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$] в 500 мл дистиллированной воды, доводят до кипения и всыпают в горячий раствор 1 г гематоксилина.
- Добавляют 500 мл дистиллированной воды и доводят до кипения, но не кипятят!
- Раствор остужают до комнатной температуры, прибавляют йодат калия (KIO_3).
- Марлей завязывают сосуд с краской и оставляют созревать на свету на 5 нед.
- По истечении 5 нед сосуд закупоривают и убирают в темное место (например, шкаф). Перед употреблением краску профильтровывают.

Окраска гематоксилин-эозином

- Препарат фиксируют в смеси равных частей эфира и 96° этилового спирта (смесь Никифорова) или в одном 96° этиловом спирте в течение 7-10 мин.
- Окрашивают гематоксилином в течение 5 мин.
- Промывают в проточной водопроводной воде – 1-2 мин.
- Окрашивают 0,3% спиртовым раствором воднорастворимого (желтоватого) эозина в течение 1 мин.
- Промывают проточной водой – 1-2 мин.
- Высушивают.

Окраска азур-эозиновыми красителями

Метод окрашивания по Романовскому (азур-эозиновой смесью) в разных лабораториях используется в разных модификациях – по 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 Гимзе

- Азур I – 3,772 г.
- Эозин – 2,165 г.
- Метиленовый синий – 1,563 г.
- Метанол (чистый) – 750,0 мл.
- Глицерин (чистый) – 256,0 мл.
 - Препарат давностью от 6 ч до 2-3 дней фиксируют в метаноле в течение 3 мин.
 - Опускают на 30 мин в красящую жидкость (5 мл стандартного раствора Гимзы и 20 мл дистиллированной воды с рН 6,8-7,2).
 - Споласкивают водопроводной водой, высушивают на воздухе.

Окраска по Романовскому-Гимзе.

Краситель состоит из щелочной части (азур II – ярко-синий цвет), и кислой части (эозин – розово-красный цвет).

В настоящее время используется готовый краситель, из которого перед началом работы готовят рабочий раствор из расчета 1 капля краски на 1 мл дистиллированной воды. Сухие мазки фиксируют в метиловом спирте или смеси Никифорова 5 и 15 мин соответственно.

Высохший фиксированный мазок помещается в кювету с рабочим раствором краски на 15–40 минут (конкретное время устанавливается опытным путем для каждой партии красителя). После этого промывают дистиллированной водой и высушивают

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.

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 –

Результаты окрашивания по Романовскому-Гимзе

- **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.
- **мазки 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

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.

Окраска по Паппенгейму.

Состав фиксатора Мая-Грюнвальда

- Порошок Мая-Грюнвальда – 250 мг.
- Метиловый спирт – 100 мл.

Раствор подогревают при 70 °С на водяной бане до полного растворения порошка, фильтруют и хранят в бутылке с притертой пробкой.

Перед окраской предварительной фиксации мазков не требуется. На подсохшие на воздухе мазки наливают краску – фиксатор Мая-Грюнвальда – на 3 мин. Не сливая краски, к ней добавляют такое же количество дистиллированной воды. Через минуту краску с мазка сливают и, не ополаскивая мазка, наливают рабочий раствор готовой краски Романовского-Гимзы (1мл краски:4мл дистиллированной воды с рН 6,8) на 5 - 15 мин.

Готовую краску Романовского-Гимзы перед приготовлением рабочего раствора фильтруют.

После окраски препараты промывают дистиллированной водой и высушивают на воздухе, установив вертикально в специально изготовленной сушилке.

Окраска по Лейшману

Красители

- Краска Лейшмана.

2,5 г сухой краски Лейшмана на 1 л метилового спирта. Краска созревает 3-4 дня.

- Азур.

1 г сухой краски азур на 1 л дистиллированной воды. Краска созревает 3-4 нед.

- Эозин.

1 г сухой краски эозин на 1 л дистиллированной воды. Краска созревает 3-4 нед.

Окраска по Лейшману

- Высушить мазок на воздухе.
- Опустить в краску Лейшмана на 3 мин.
- Промыть водопроводной водой.
- Стряхнуть избыток воды.
- Залить препарат краской в составе: азор – 40 мл; эозин – 30 мл; дистиллированная вода – 70 мл.
- Краску готовят перед работой!
- Мазки окрашивают в течение 30-40 мин.
- Промыть водопроводной водой.
- Высушить на воздухе или промокнуть фильтровальной бумагой.

Окраска по Алексееву

Экспресс – методы окраски цитологических препаратов.

Окраски по Алексееву. Ответ дается уже через 5–10 минут. Метод Алексеева предусматривает ускоренную обработку цитологических препаратов азурэозиновыми смесями по принципу Романовского с целью получения привычной цитологической картины.

- Фиксируют в подогретом до 35–40°C растворе Мая-Грюнвальда в течение 30 с.
- Ополаскивают водой.
- Окрашивают в 0,1% растворе азур-эозина (в соотношении 2:1) в течение 2 мин.
- Ополаскивают водой.
- Промокают, высушивают.

Окраска по Папаниколау.

является наилучшим для гинекологических мазков, так как этот метод полихромный, он позволяет оценить степень созревания цитоплазмы (от синезеленого 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.

Необходимые реактивы:

1. Смесь Никифорова.
2. Спирт 95, 90, 80, 70 и 50°.
3. Гематоксилин Гарриса.
4. 0,25%-ный раствор соляной кислоты.
5. Краска оранжевая Г.
6. Краска (ЕА-36).
7. Абсолютный спирт.
8. Ксилол.
9. Канадский бальзам

Приготовление гематоксилина Гарриса:

1 г гематоксилина растворяют в 10 мл абсолютного спирта, 20 г калийных квцов растворяют при нагревании в 200 мл дистиллированной воды. Через 24 ч оба раствора соединяют и прибавляют 0,5 г красной или желтой окиси ртути. Раствор нагревают до кипения, остужают и через 24 ч фильтруют.

Приготовление раствора краски оранжевая Г:

К 100 мл 0,5%-ного спиртового раствора оранжевой краски Г добавляют 0,015 г фосфорно-вольфрамовой кислоты.

Приготовление составной краски (ЕА-36):

45 мл 0,5%-ного спиртового раствора светлой зеленой, 10 мл 0,5%-ного спиртового раствора бисмаркбраун, 45 мл 0,5%-ного спиртового раствора эозина желтоватого (вода - и спирторастворимого), 0,2 г фосфорновольфрамовой кислоты, капля насыщенного водного раствора углекислого лития.

Ход окраски:

Мазки после фиксации проводят последовательно через сосуды, содержащие 80, 70 и 50° спирты и дистиллированную воду. Затем 6 мин гематоксилином Гарриса, осторожно споласкивают дистиллированной водой и погружают (6 раз) в 0,25%-ный раствор соляной кислоты. Далее на 6 минут кладут в сосуд с проточной водопроводной водой и обмывают дистиллированной водой. Затем проводят через 50, 70, 80 и 95° спирты. Обезвоженные таким образом препараты окрашивают в течение 1,5 мин краской оранжевой Г, споласкивают в двух сменах 95° спирта и красят в течение 1,5 мин составной краской (ЕА-36). Мазки отмывают от избытка краски в трех сменах 95° спирта. Далее препараты просветляют проведением через абсолютный спирт, через смесь абсолютного спирта и ксилола в равных объемах и, наконец, через ксилол, после чего заключают в канадский бальзам.

Окраска по Папаниколау

Для окрашивания препаратов по методу Папаниколау обязательна влажная фиксация мазка. Мазок сразу же после получения, пока он еще влажный, фиксируют одним из перечисленных методов:

- специальными аэрозолями;
- капельным фиксатором;
- в 96° спирте (10–20 мин);
- в смеси Никифорова (30 мин).

Для окрашивания лучше всего пользоваться фирменными красителями, к которым обычно прилагается методика окрашивания.

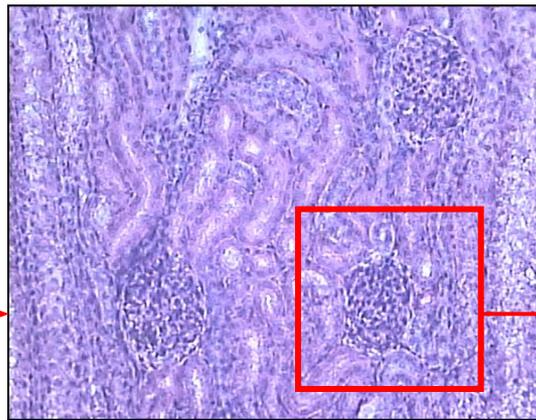
- Высушивают на воздухе.
- После окрашивания препарата его необходимо заключить в бальзам, для чего:
 - погружают препарат в смесь ксилола и спирта (1:1);
 - погружают препарат в ксилол;
 - наносят каплю бальзама и покрывают покровным стеклом, избегая образования пузырей.

Обзорная микроскопия с помощью объективов различного увеличения

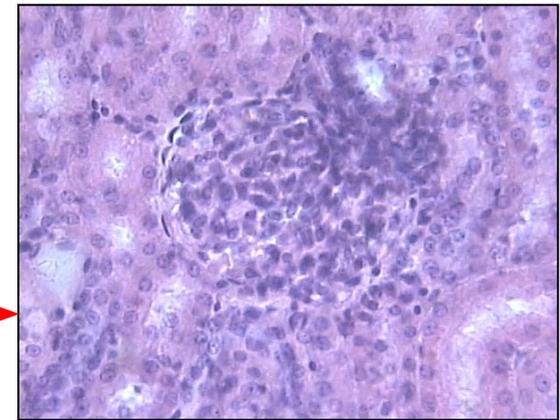
Используется для выявления общего плана строения органов, тканей, клеток.



Почка. Кортиковое вещество.
Окраска: гематоксилин-эозин.
(малое увеличение).



Почка. Кортиковое вещество.
Окраска: гематоксилин-эозин.
(большое увеличение).

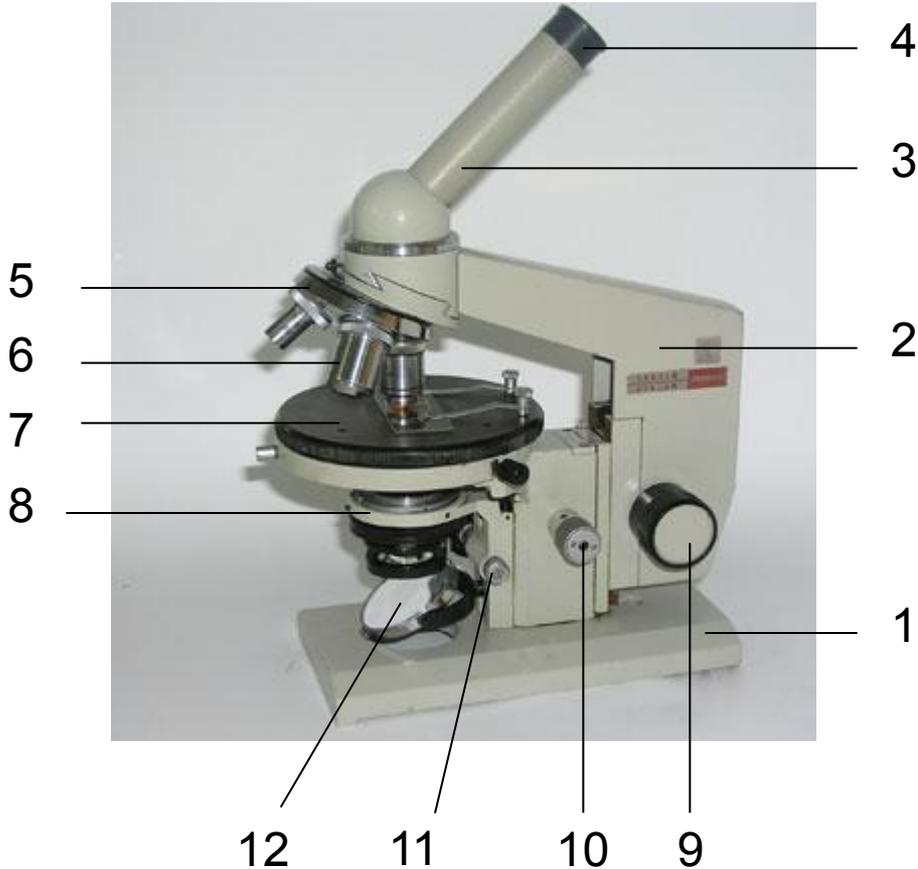


Почка. Почечное тельце.
Окраска: гематоксилин-эозин.
(иммерсионное увеличение).

Техника микроскопирования

1. Микроскопирование препарата начинают с установки правильного *освещения*. Для этого с помощью [вогнутого зеркала](#). Для этого с помощью вогнутого зеркала, собирающего рассеянный пучок света, и [конденсора](#) достигают равномерного освещения поля зрения.
2. На предметный столик помещают препарат материалом вверх.
3. Изучение гистологического препарата начинают при [малом увеличении](#) (объективах x 4, 8), при этом расстояние между объективом и покровным стеклом должно быть около 1 см. *Установку резкости* проводят с помощью [макрвинта](#).
4. Рассматривают детали препарата по всей площади, перемещая его на предметном столике.
5. Устанавливают в центр поля зрения участок препарата, который следует изучить при [большом увеличении](#) (объектив x40).
6. С помощью [револьверного устройства](#) ставят объектив с более сильным увеличением (x40). *Установку резкости* проводят с помощью [микровинта](#).
7. Для изучения очень мелких структур используют [иммерсионный объектив](#) (x90).
 - На стекло с препаратом наносят каплю иммерсионного масла.
 - Осторожно опускают тубус до соприкосновения линзы объектива к маслу.
 - *Установку резкости* проводят с помощью [микровинта](#).
 - После окончания работы иммерсионное масло удаляют с объектива и стекла марлей.

Устройство светового микроскопа



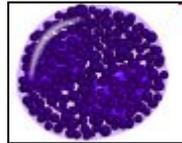
1. Основание микроскопа
2. Тубусодержатель
3. Тубус
4. Окуляр (чаще $\times 7$)
5. Револьвер микроскопа
6. Объективы
 - а) сухие: $\times 8$, $\times 20$, $\times 40$
 - б) иммерсионный $\times 90$
7. Предметный столик
8. Конденсор
9. Макрометрический винт
10. Микрометрический винт
11. Винт конденсора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

Общее увеличение микроскопа = увеличение объектива \times увеличение окуляра

Интерпретация окрашивания клеток и тканей

Метахромазия

зернистости
базофильного
гранулоцита



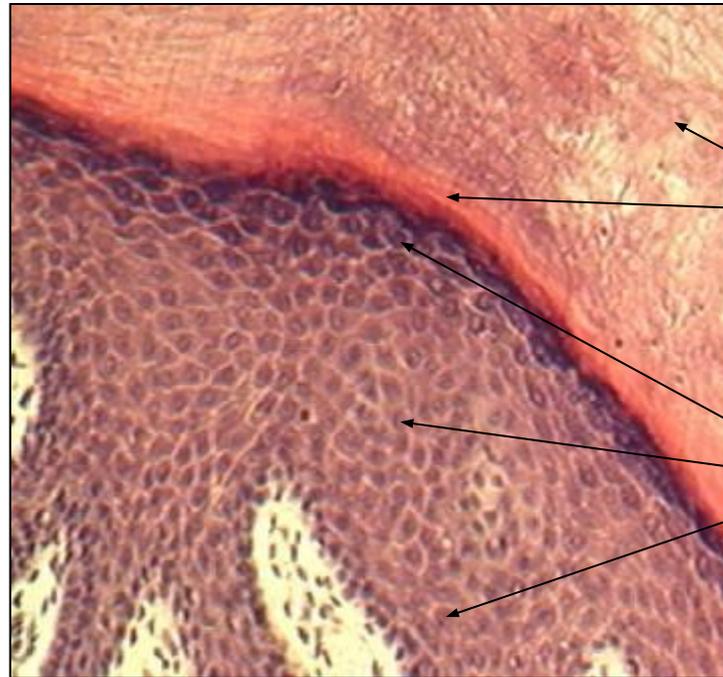
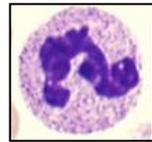
Оксифилия

зернистости
эозинофильного
гранулоцита



Нейтрофилия

зернистости
нейтрофильного
гранулоцита



Оксифилия
поверхностных
слоев

Базофилия
глубоких слоев

Зернистые лейкоциты.
Окраска по Романовскому-Гимзе.

**Многослойный плоский
ороговевающий эпителий.**
Окраска: гематоксилин-эозин.

Базофилия

Способность окрашиваться *основными* (щелочными) красителями называется **базофилией** (от греч. basis – основа и philia – любовь).

Основные (щелочные) красители активно связываются со структурами, которые содержат кислоты и несут отрицательный заряд, например, ДНК, РНК.

К ним, в частности, относятся гематоксилин, толуидиновый синий, тионин, метиленовый синий, азуры и др.

Поэтому структуры, связывающие эти красители, называются **базофильными**.

В клетке базофилией обладает ядро (вследствие высокого содержания ДНК и РНК), иногда цитоплазма (при высоком содержании в ней рибосом или гранулярной ЭПС).

Базофильно может окрашиваться межклеточное вещество некоторых тканей – например, хрящевой.

Метахромазия

Метахромазия (от греч. meta – изменение и chroma – цвет, краска) – изменение цвета некоторых *основных* (щелочных) красителей при их связывании со структурами, обладающими специфическими химическими свойствами (обычно высокой концентрацией сульфатированных гликозаминогликанов).

К таким красителям относятся толуидиновый синий, азур II, тионин и др.

Способностью **метахроматически** окрашиваться обладают гранулы базофильных лейкоцитов, тучных клеток.

Указанные красители окрашивают другие базофильные структуры в тех же тканях в обычный свойственный им цвет, т.е. **ортохроматически** (от греч. orthos – правильный и chroma – краска).

Оксифилия

Способность окрашиваться *кислыми* красителями называется **оксифилией**, или **ацидофилией** (от греч. *oxys* или лат. *acidus* – кислый и греч. *philia* – любовь).

Кислые красители связываются со структурами, имеющими положительный заряд – например, белки.

К таким красителям относятся эозин, оранж G, эритрозин, пикриновая кислота и др.

Структуры, связывающие эти красители, называются **оксифильными** или **ацидофильными**.

Оксифилия свойственна цитоплазме клеток (особенно при высоком содержании в ней митохондрий и некоторых белковых секреторных гранул), эритроцитам (благодаря высокой концентрации в них гемоглобина).

Оксифильно окрашивается цитоплазма кардиомиоцитов, мышечных волокон скелетной мускулатуры, некоторые компоненты межклеточного вещества (например, коллагеновые волокна).

Нейтрофилия

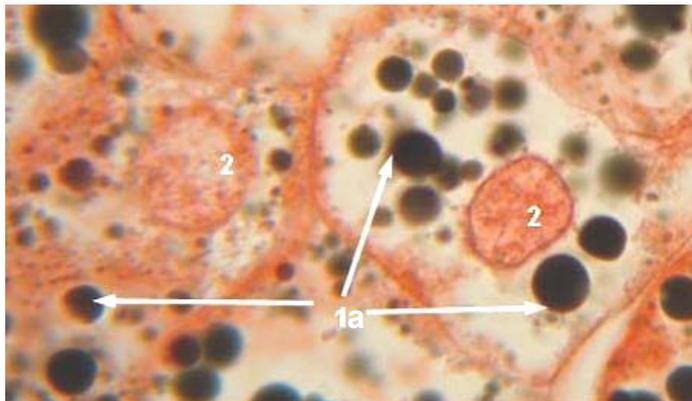
Нейтрофилия (от лат. neutrum – ни тот, ни другой и philia - предрасположение, любовь) – способность гистологических структур окрашиваться и *кислыми*, и *основными* красителями.

Гисто- и иммуноцитохимические методы

В основе лежит применение химических реакций для выявления распределения химических веществ в структурах клеток, тканей и органов. Современные [гистохимические методы](#) позволяют обнаруживать аминокислоты, белки, нуклеиновые кислоты, различные виды углеводов, липидов и др.

Для выявления специфических белков используют [иммуноцитохимические реакции](#). Для этого получают специфические сыворотки, содержащие антитела (например, против белка микротрубочек — тубулина). Далее химическим путем соединяют эти антитела с флюорохромом (или другим маркером). При нанесении меченых антител на гистологический срез они вступают в соединение с соответствующими белками клетки и возникает специфическое свечение, видимое в люминесцентном микроскопе.

Современные иммуноцитохимические методы, помимо флюорохромов, используют другие самые разнообразные специфические маркеры, позволяющие качественно и количественно оценивать содержание в клетке исследуемых соединений.



Окраска осмиевая кислота и сафранин

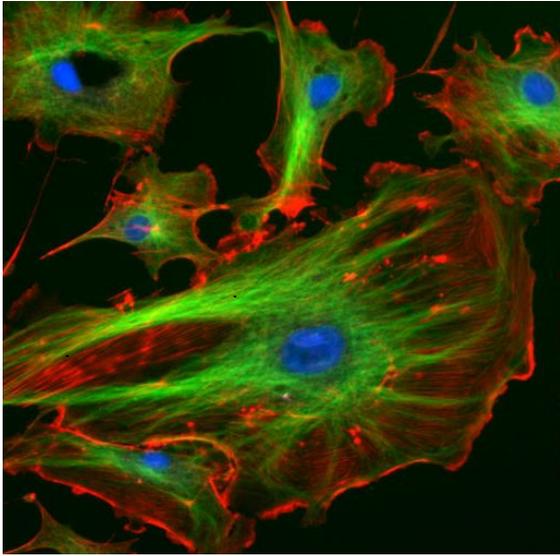


Окраска по Бесту

Клетки печени

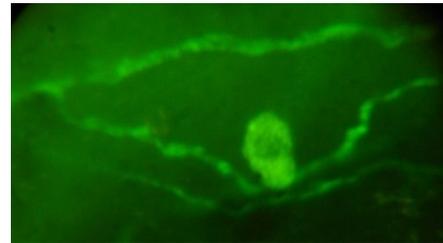
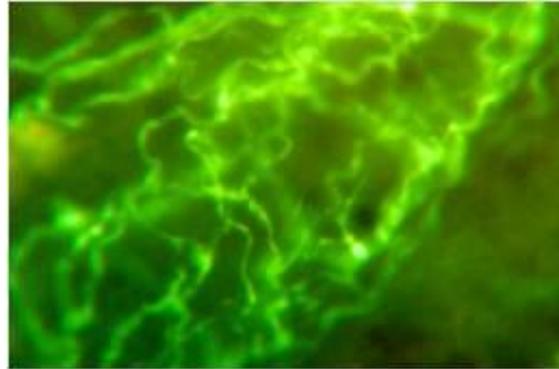
- 1a - включения липидов;
- 1b – включения гликогена;
- 2 – ядра

Гисто- и иммуноцитохимические методы (примеры)



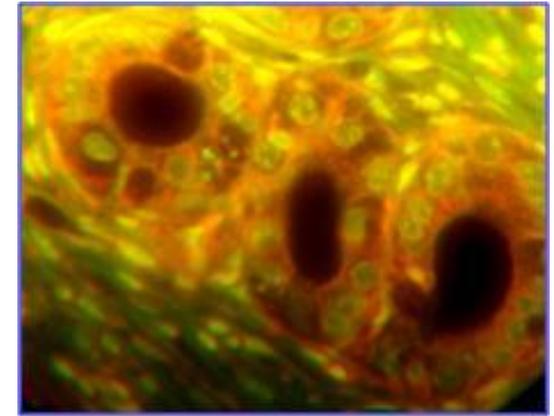
Цитоскелет эукариот
(эндотелиальные клетки быка)
*Имуноцитохимический метод
окрашивания*

Актиновые микрофиламенты
окрашены в красный,
микротрубочки — в зеленый, ядра
клеток — в голубой цвет.



**Симпатические
нервные сплетения**
*Гистохимический
метод Фалька*

Нейромедиаторы в
нервных волокнах и
клетках окрашены в
зеленый цвет.



**Нуклеиновые кислоты
в эпителии маточных
желез**

*Окраска акридиновым
оранжевым*

Ядерная ДНК окрашена в
зеленый цвет,
РНК — в красный.

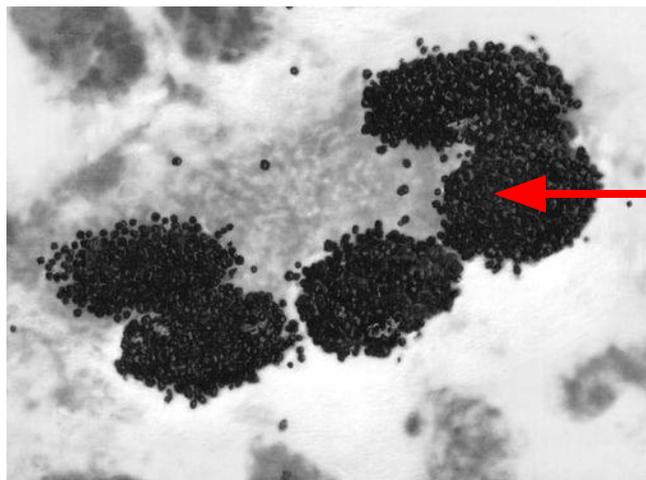
Метод радиоавтографии

Радиоавтография - метод изучения распределения радиоактивных веществ в исследуемом объекте при наложении на объект чувствительной к радиоактивным излучениям фотоэмульсии.

Введение в организм соединений, меченных радиоактивными изотопами, и дальнейшее исследование тканей и клеток позволяет получить точные данные о том, в каких именно клетках или клеточных структурах происходят те или иные процессы, локализуются те или иные вещества, установить временные параметры ряда процессов.

Так, например, применение радиоактивного фосфора дало возможность обнаружить присутствие интенсивного обмена веществ в растущей кости; применение радиоактивных изотопов иода позволили уточнить закономерности деятельности щитовидной железы; введение меченых тритием предшественников нуклеиновых кислот помогли уяснить роль в обмене этих жизненно важных соединений определённых клеточных структур.

Метод радиоавтографии позволяет определить не только локализацию радиоизотопа в биологическом объекте, но и его количество.



**Включение в ядра клеток
соединительной ткани меченного
тритием тимидина, идущего на
построение нуклеиновых кислот..**