**Методы окрашивания гистологических препаратов**

*1. Типы красителей*

Все красители, используемые в гистологической технике, подразделяются на 4 типа.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Тип красителя | Пример | Окрашиваемые структуры |
| **Кислые красители** | Кислоты и кислые соли :  **эозин** (искусственная краска; название - от греч. эос - заря);  **кислый фуксин**. | а) Окрашиваемые структуры называются оксифильными (имеющими сродство к кислым красителям).  б) Это белковые компоненты цитоплазмы и неклеточные структуры (коллагеновые волокна). |
| **Основные красители** | Основные соли :  **гематоксилин** (точнее, продукт его окисления - гематеин);  **азур 2,**  **кармин**. | а) Красящиеся структуры - базофильные (сродство к основным красителям).  б) Это структуры, богатые нуклеиновыми или иными кислотами - ядра,рибосомы,аморфный компонент межклеточного вещества. |
| **Нейтральные красители** | Смесь двух красителей:  **основного (азур 2)** и **кислого (эозин).** | а) Структуры, воспринимающие кислые красители, окрасятся эозином; пример - специфические гранулы в эозинофильных лейкоцитах.  б) Ядра всех клеток окрашиваются азуром 2. |
| **Индифферентные**  **красители** | Судан III, судан IV | Суданом окрашиваются жировые капли (в которых он растворяется). |

Существует большое количество различных способов окраски. Те из них, которые встречаются в нашем курсе, перечислены ниже.

*2. Общие методы окраски*

|  |  |
| --- | --- |
| **1. Окраска гематоксилин -эозином** | 1.а) Самый распространённый метод окраски.  б) Сочетает основной и кислый красители.  в) Поэтому позволяет выявить почти все клетки и многие неклеточные структуры.  2. Ядра приобретают **сине-фиолетовый** цвет, цитоплазма -**желтовато-розовый**цвет.  3. Замечание: используемый гематоксилин готовится по методу Эрлиха: окисляется до гематеина калийными квасцами. |
| **2. Окраска железным гематоксилином (по методу Генденгайна)** | 1. Препарат  предварительно обрабатывают (протравляют) железноаммиачными квасцами, а потом обрабатывают гематоксилином.  2. Структуры приобретают **коричневато-серый** цвет.  3. Хорошо выявляются  структуры ядра, границы клеток,мышечные волокна. |

*3. Выявление неклеточных структур соединительной ткани*

|  |  |
| --- | --- |
| **1. Окраска по методу Ван Гизона** | а) Краситель - смесь растворов пикриновой кислоты и кислого фуксина.  б) Коллагеновые волокна (содержащиеся в межклеточном веществе соединительной ткани) окрашиваются в ярко-красный цвет, а элементы других тканей (напр., мышечные волокна) -в **жёлтый** цвет. |
| **2. Окраска по методу Маллори** | 1. Краситель является трёхцветным: это смесь  кислого фуксина, анилинового синего,оранжевого G, а также двух кислот.  2. а) Коллагеновые волокна соединительной ткани окрашиваются в **тёмно-синий цвет**;  б) многие другие структуры (ядра, мышечные волокна, эритроциты) - в **оранжевый** или красный цвет. |
| **3.Импрегнация**  **серебром** | 1. а) Препарат обрабатывают аммиачным раствором серебра, а затем - восстановителями.  б) В итоге, выделяющееся серебро осаждается на определённых волокнах соединительной ткани. –  2**. Ретикулярные** (аргирофильные) волокна приобретают **чёрный**цвет, коллагеновые волокна -**коричневый**, ядра клеток - **светло-коричневый**. |
| **4. Окраска орсеином** | **Эластические волокна**соединительной ткани окрашиваются в **тёмно-красный цвет**;  остальные структуры - в **слабо-розовый**цвет. |
| **5. Окраска гематоксилин-пикрофуксином** | Эластические волокна окрашиваются пикриновой кислотой **в жёлтый цвет,**  коллагеновые волокна - в **красный**цвет,  ядра клеток - окрашиваются гематоксилином в **тёмно-фиолетовый** цвет. |
| **6. Окраска по методу Шморля** | 1. Используется для окраски костей и дентина.  2. а) Предварительно кусочки материала подвергают **декальцинации** (с помощью кислоты), а затем выдерживают в растворе алюмокалиевых квасцов.  б) Краситель - раствор тионина.  3. а) Стенки костных полостей и канальцев (выстланные сетью коллагеновых волокон) окрашиваются в **тёмно-коричневый** цвет; б) остальной фон - светло-коричневый. |

*4. Окраска клеток соединительной ткани и крови*

|  |  |
| --- | --- |
| **1. Окраска азур 2 – эозином** | Базофильные элементы окрашиваются азуром 2 в тёмно-синий,  а оксифильные - в светло-красный цвет. |
| **2. Окраска мазков по методу Романовского** | 1. а) Краситель - тот же, что и в предыдущем случае (азур 2 – эозин).  б) Отличия же от приготовления срезов таковы:  фиксацию мазков проводят чистым метанолом; окрашивание продолжают всего 30-45 мин, а не 12-14 ч;для заключения под покровное стекло используют кедровое масло, а не канадский бальзам.  2. Эритроциты приобретают бледно-красный цвет,  цитоплазма лейкоцитов - голубой или синий цвет,  цитоплазматические гранулы окрашиваются в зависимости от их природы. |

*5. Выявление элементов нервной системы*

|  |  |
| --- | --- |
| **1.Импрегнация**  **Нитратом**  **серебра** | 1. Особенности предварительной обработки препарата.-  **Фиксацию** материала в формалине проводят **не менее 7 дней**.  **Уплотнение** образца осуществляют не путём заливки в парафин (или целлюлозу), а **путём замораживания**.  Срез готовят на специальном замораживающем микротоме.  2. При **окрашивании** срез последовательно обрабатывают растворами  азотнокислого серебра, формалина,аммиачного серебра.  3. а) Элементы **нервной системы** (волокна, клетки и т.д.) окрашиваются **в чёрный**цвет, б) **окружающие ткани** – **в светло-коричневый**цвет. |
| **2. Окраска толуидиновым синим по методу Ниссля** | 1. Толуидиновый синий окрашивает умеренно базофильные соединения в**синий**цвет**.**  2. С его помощью в цитоплазме нервных клеток обнаруживаются глыбки базофильного вещества (т.н. субстанция Ниссля). |
| **3. Окраска метиловым зелёным- пиронином по методу Браше** | 1. Метод служит для выявления РНК.  2. а) Как и предыдущий метод, относится к гистохимическим методам исследования. б) Поэтому подробней описывается ниже. |

*4. Гистохимические методы исследования*

а) Гистохимические методы основаны на специфической реакции между химическим реактивом и определённым компонентом препарата.

б) Образующийся продукт реакции имеет окраску, отличную от окраски исходного реактива.

|  |  |
| --- | --- |
| **1а) РНК** | **Реакция Браше.**  1. Реактив (как отмечалось, - смесь двух красителей: метилового зелёного и пиронина.  2. а) А. Пиронин специфически окрашивает РНК в красный цвет. Б. Поэтому на препарате ядрышки (в составе ядра) и рибосомбогатые участки цитоплазмы имеют **красный** цвет.  б) Другие структуры ядра (помимо ядрышек) - **зелёные**.  3. Обычно делают и контрольный препарат, который перед окрашиванием обрабатывают рибонуклеазой. |
| **1б) ДНК** | **Реакция Фёльгена.**  1. Основной реактив - фуксинсернистая кислота (реактив Шиффа).  2. ДНК-содержащие структуры окрашиваются в пурпурно-красный цвет. |
| **2. Белки** | Используются различные реакции; в том числе:  а) с бромфеноловым синим (у белков - тёмно-фиолетовая окраска); б) со смесью нингидрин-реактив Шиффа (белки приобретают красный цвет). |
| **3а) Полисахариды** | **ШИК-реакция.**  1. Реактив - Шифф-периодная кислота (выделенные буквы и составляют аббревиатуру ШИК).  2. Периодат способствует образованию в субстрате альдегидной группы, которая взаимодействует с реактивом Шиффа.  3. На препарате ШИК-положительные компоненты (например, гранулы гликогена) имеют тёмно-красный цвет. |
| **3б) Гликозамин-гликаны** | **Реакция с толуидиновым синим.**  1. При взаимодействии толуидинового синего с веществами, содержащими много кислотных групп, наблюдается метахромазия  - изменение окраски с синей на фиолетовую и красную.  2. Подобным свойством обладают, в частности, компоненты аморфного вещества соединительной ткани - гликозамингликаны  (являющиеся, как известно, гетерополисахаридами с высоким содержанием кислотных радикалов). |
| **4. Нейтральный жир** | **Реакция с суданом III** (о которой уже упоминалось).  Капли жира в жировой клетке окрашиваются в яркий оранжево-красный цвет благодаря растворению в них красителя. |

**Методика окрашивания гематоксилином и эозином целлоидиновых срезов**

1. Окрасить в гематоксилине в течение 2-3 мин.

2. Промыть сначала в водопроводной, а затем в дистиллированной воде по 2-5 мин.

3. Окрасить в эозине в течение 1-2 мин.

4. Промыть в дистиллированной воде в течение 0,5-1 мин.

5. Обезводить в спиртах восходящей концентрации (70, 96, 100%) по 1-2 мин.

6. Просветлить в карбол-ксилоле и ксилоле по 2-3 мин.

7. Заключить окрашенные срезы в бальзам.

**Методика окрашивания гематоксилином и эозином парафиновых срезов**

1. Наклеить срезы на предметное стекло.

2. Удалить парафин из срезов в трех порциях ксилола по 4-5 мин.

3. Удалить из срезов ксилол в абсолютном спирте в течение 2-3 мин.

4. Гидратировать срезы, проведя их через спирты нисходящей концентрации (96, 70%).

5. Промыть в дистиллированной воде в течение 2-3 мин.

6. Окрасить в водном растворе гематоксилина в течение 2-3 мин.

7. Промыть в водопроводной воде в течение 10 мин.

8. Ополоснуть в 70 градусном подкисленном спирте.

9. Промыть в дистиллированной воде 2-5 мин.

10. Окрасить в водном растворе эозина в течение 0,5-1 мин.

11. Промыть в дистиллированной воде в течение 0,5-1 мин.

12. Обезводить в спиртах восходящей концентрации (70, 96, 100%) по 2-5 мин.

13. Просветлить в карбол-ксилоле и в двух порциях ксилола по 2-5 мин.

14. Заключить окрашенные срезы в бальзам или полистирол.