

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ КРАСИТЕЛИ НА ОСНОВЕ ЭКСТРАКТОВ КРАПИВЫ ДВУДОМНОЙ (URTICA DIOICA) И РЯБИНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (SORBUS AUCUPARIA)

ИШУНИНА Т.А., ЗЫК Е.И., РЯХОВСКАЯ Д.В.

HISTOLOGICAL DYES BASED ON NETTLE (URTICA DIOICA) AND ROWAN BERRIES (SORBUS AUCUPARIA) EXTRACTS

ISHUNINA T.A., ZYK E.I., RYANOVSKAYA D.V.

Кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии (зав. кафедрой – профессор А. В. Иванов), ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Курск.

Получены гистологические красители из водных настоев крапивы двудомной и плодов рябины обыкновенной и изучены их тинкториальные свойства. Показано, что новые красители относятся к группе цитоплазматических и могут сочетаться с ядерными красителями, например, ранее предложенным ядерным красителем на основе ягод черноплодной рябины. Разработанные рецепты приготовления и методики окраски просты и дешёвы и могут применяться для окрашивания гистологических срезов различных органов. Интересные результаты получены при окрашивании структур головного мозга. Методики позволяют дифференцировать нервные волокна и кровеносные сосуды и могут быть использованы для изучения миело- и ангиоархитектоники головного мозга.

Ключевые слова: *гистологический краситель растительного происхождения, крапива двудомная, рябина обыкновенная, цитоплазматические красители.*

Histological dyes were obtained from water extracts of nettle leaves and Rowan berries and their staining properties were studied. It was shown that new dyes are cytoplasmic and can be combined with nuclear dyes, for example, with the recently reported dye based on chokeberries. The recipes of dye preparation and staining procedures are simple and cheap and can be used for staining of histological specimens of different organs. Interesting results were obtained after staining of various brain structures. Techniques allow good visualization of nerve fibers and blood vessels and can be used for the study of the brain myelo- and angioarchitecture.

Key words: *vegetal histological dyes, nettle leaves, Rowan berries, cytoplasmic dyes.*

Введение. Настоящее исследование продолжает серию наших работ, направленных на расширение спектра гистологических красителей на растительной основе [1, 2]. Критериями отбора растительного сырья являются их повсеместное распространение в Центрально-Чернозёмном районе России, дешёвая себестоимость, отсутствие токсичности и наличие красящих пигментов в листьях или плодах. Таким условиям соответствуют, например, листья крапивы двудомной и плоды рябины обыкновенной. Красящим веществом листьев крапивы двудомной является хлорофилл. По химической структуре это магний-содержащий порфириновый пигмент, почти идентичный гемоглобину крови. Красно-оранжевая окраска плодов рябины обыкновенной обусловлена наличием в них бета-каротина. Молекула этого пигмента имеет симметричное строение, представленное двумя бета-иононовыми кольцами, связанными алифатической цепью с девятью ненасыщенными двойными связями. Известно применение натуральных красителей зелёного цвета на основе крапивы двудомной в пищевой (кондитерской) [3], косметической и текстильной промышленности. Возможно использование красок на основе ягод рябины для окрашивания тканей в текстильной отрасли. Данных об использовании таких красителей в гистологии нет. В связи с этим целью настоящего исследования стало изучение красильных свойств водных и спиртовых экстрактов крапивы и плодов рябины для гистологических препаратов. В качестве протрав мы апробировали железоаммонийные, хромокалиевые и алюмокалиевые квасцы, сернокислый магний, медный и железный купорос.

Материал и методы исследования. Свежие или засушенные листья крапивы двудомной

измельчают, плотно укладывают в кастрюлю, заливают водой, которая должна лишь слегка покрывать сырьё сверху, доводят до кипения, остужают, процеживают через марлю, снова доводят до кипения (пастеризация), переливают в стеклянную банку, оборачивают фольгой для исключения воздействия света и хранят в защищённом от света месте при комнатной температуре не более двух дней. Непосредственно перед гистологическим окрашиванием в 50 мл полученного раствора добавляют 3-4 грамма железного купороса, 2 гранулы едкого натра до значения pH 7 и фильтруют через обеззоленные фильтры. Возможен и другой вариант приготовления красителя, когда после короткой пастеризации раствор помещают в холодильник не более, чем на два дня. В этом случае перед гистологическим окрашиванием в 50 мл полученного раствора добавляют 2 грамма железного купороса и 2 грамма алюмокалиевых квасцов. С помощью гранулированного едкого натра (2-3 гранулы) pH раствора доводят до 5-6. Результаты окрашивания практически идентичны. Для приготовления красителя на основе плодов рябины обыкновенной, их разминают в ступке, доводят до кипения, как описано выше, процеживают, пастеризуют, укрывают фольгой и хранят в холодильнике 2-3 дня. Перед гистологическим окрашиванием в 50 мл полученного раствора добавляют 2 грамма железного купороса и 2 грамма

алюмокалиевых квасцов. С помощью гранулированного едкого натра (3 гранулы) pH раствора доводят до 7-8 и фильтруют через обеззоленные фильтры.

Результаты исследования и их обсуждение. Депарафинированные срезы желудка, тонкой и толстой кишки, печени, почек и головного мозга крыс помещали в свежеприготовленные красители на 20-25 минут. После быстрого проведения через 70% (5-10 секунд) и 95% спирты (15-20 секунд) срезы помещали в ксилол на 30-45 секунд и заключали под покровные стёкла. Во всех изученных тканях наблюдалось окрашивание цитоплазмы в зелёный цвет (рис. 1, 2). При окрашивании срезов головного мозга можно хорошо рассмотреть цито- и миелоархитектонику различных структур мозга и определить их анатомические границы. Окраска стойкая. При хранении срезы не обесцвечиваются. Для комбинированного окрашивания ядерным красителем и новыми цитоплазматическими красителями срезы помещали сначала в ядерный краситель на основе спиртового настоя ягод черноплодной рябины на 10 минут, затем в один из цитоплазматических красителей либо на 10 минут (для раствора на основе крапивы двудомной), либо на 20 минут (для раствора на основе рябины обыкновенной). В первом случае дегидратация в спиртах осуществлялась в течение 20-30 секунд, просветление в

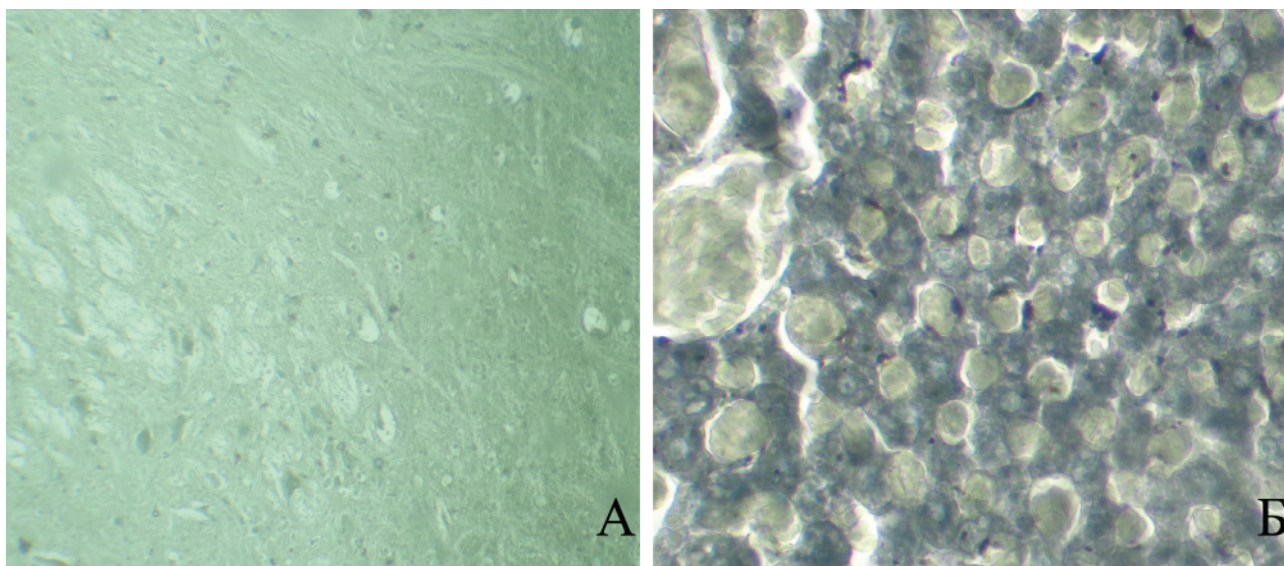


Рис. 1. А. Срез хвостатого ядра головного мозга крысы. Окраска новым растительным красителем на основе водного экстракта крапивы двудомной. Цитоплазма нейронов и нервные волокна окрашены в зелёный цвет. Б. Срез печени крысы. Комбинированная окраска новыми растительными красителями на основе плодов черноплодной рябины и листьев крапивы двудомной. Ядра гепатоцитов окрашены в синий цвет. Хорошо дифференцируются тёмные и светлые ядра. Границы клеток отчётливые. Безъядерные эритроциты в капиллярах светло-зелёные, окрашиваются красителем на основе крапивы и не окрашиваются ядерным красителем из черноплодной рябины. Это подтверждает цитоплазматический характер красителя на основе крапивы. Ув.600.

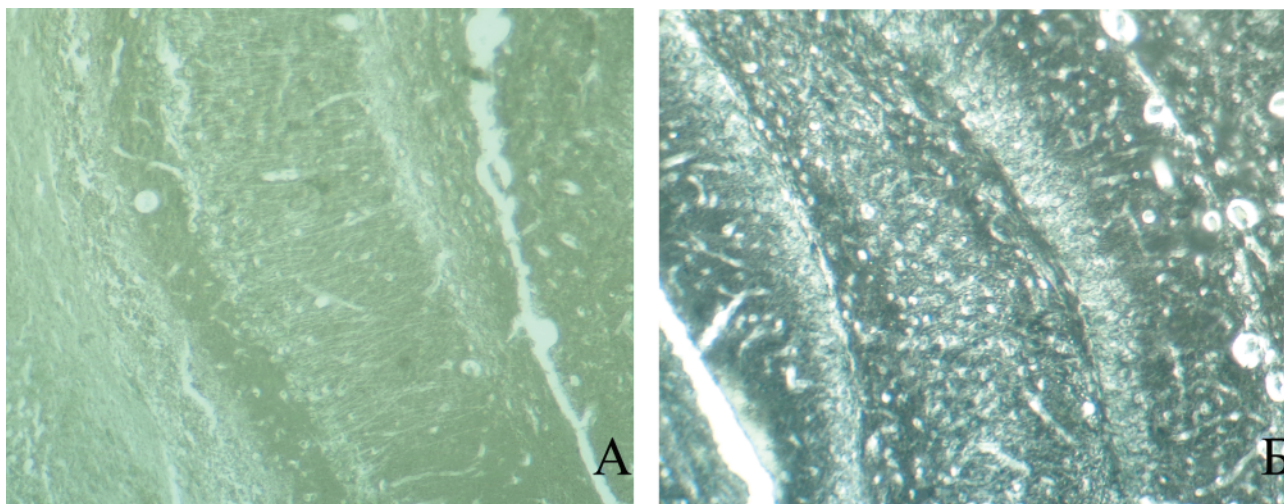


Рис. 2. Срезы головного мозга крысы на уровне гиппокампа. А. Окраска новым растительным красителем на основе экстракта плодов рябины обыкновенной. Б. Комбинированная окраска новыми растительными красителями на основе плодов черноплодной рябины и рябины обыкновенной. Отчётливо визуализируются кровеносные сосуды. Ув.600.

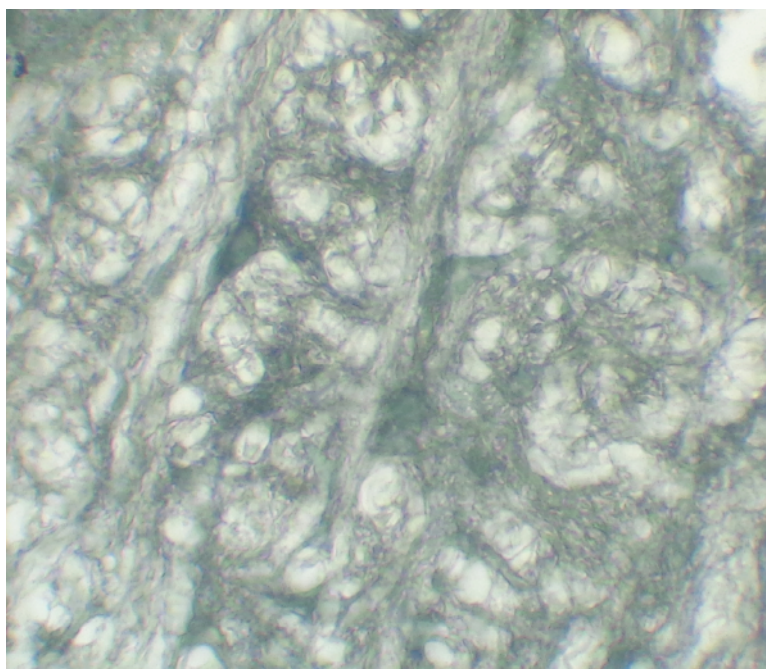


Рис. 3. Срез хвостатого ядра головного мозга крысы. Комбинированная окраска растительными красителями на основе плодов черноплодной рябины и рябины обыкновенной. Отчётливо дифференцируются нейроны и нервные волокна. Ув.600.

ксилоле – в течение 1 минуты. Во втором случае дегидратация в спиртах и ксилоле проводится быстро (не более 5 секунд в каждом растворе). В результате комбинированного окрашивания растительными красителями ядра клеток приобретают сине-фиолетовый цвет, спектр окраски цитоплазмы колеблется от тёмно-серого до си-

не-зелёного. Безъядерные эритроциты выглядят светло зелёными (рис. 1, 2, 3).

Наилучшие результаты получены при использовании водных настоев сырья. Возможно использование спиртового настоя крапивы, но в этом случае окрашивание нестойкое и буквально исчезает в спиртах и ксилоле при экспозиции

более двух-трёх секунд. Интересные результаты получены при сочетанном окрашивании срезов головного мозга красителями на основе плодов черноплодной и обыкновенной рябины (Рис. 2Б и 3). При этом дифференцируются не только нейроны и глиальные клетки, как в случае с красителем из черноплодной рябины [2], но и нервные волокна. Поэтому такой метод окраски может быть полезным для изучения миелоархитектоники головного мозга. Более того, в связи с отчётливой визуализацией кровеносных сосудов, данная методика пригодна для исследования ангиоархитектоники головного мозга, в том числе и для определения таких количественных характеристик, как размеры и плотность расположения кровеносных сосудов.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов получены ещё два гистологических красителя растительного происхождения. К их преимуществам можно отнести доступность и низкую себестоимость сырья, простоту приготовления раствора и процедуры окраски, а также применение нетоксичных ингредиентов. Красители подходят для материала, зафиксированного в 10% растворе формалина.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Ишунина, Т.А., Барабанщикова, Т.Н., Сгонникова, А.О. Гистологические красители на основе свекольного и морковного сока. / Ишунина, Т.А., Барабанщикова, Т.Н., Сгонникова, А.О. // *Морфологические ведомости*. -2014. -№ 1. -С. 112-114.
2. Ишунина, Т.А., Солоненко, О.В. Гистологический краситель на основе антоцианов ягод черноплодной рябины (*Aronia melanocarpa*). / Ишунина, Т.А., Солоненко, О.В. // *Морфологические ведомости*. -2014. -№4. -С. 58-61.
3. Рыжова Н.В., Иванова Л.А., Бутова С.Н. Способ получения натурального пищевого красителя из растительного сырья и отходов переработки растительного сырья и натуральный пищевой краситель, полученный по этому способу / Рыжова Н.В., Иванова Л.А., Бутова С.Н. // Патент РФ № 2285708. - 2006.

Авторская справка:

Ишунина Татьяна Александровна, доцент, кандидат медицинских наук; 305041, г. Курск, ул. Карла Маркса 3, КГМУ, кафедра гистологии, 8 9606891979, E-mail: ishunina@gmail.com.

Зык Екатерина Игоревна, студентка лечебного факультета Курского государственного медицинского университета; 305041, г. Курск, ул. Карла Маркса 3, КГМУ, кафедра гистологии.

Ряховская Дарья Владимировна, студентка лечебного факультета Курского государственного медицинского университета; 305041, г. Курск, ул. Карла Маркса 3, КГМУ, кафедра гистологии.