

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ КРАСИТЕЛЬ НА ОСНОВЕ АНТОЦИАНОВ ЯГОД ЧЕРНОПЛОДНОЙ РЯБИНЫ (ARONIA MELANOCARPA)

ИШУНИНА Т.А., СОЛОНЕНКО О.В.

HISTOLOGICAL DYE BASED ON ANTHOCYANINS OF CHOKEBERRIES (ARONIA MELANOCARPA)

ISHUNINA T.A., SOLONENKO O.V.

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

Получен гистологический краситель путём экстрагирования красящих антоциановых пигментов из спиртовых настоев ягод черноплодной рябины и изучены его тинкториальные свойства. Показано, что краситель на основе ягод черноплодной рябины избирательно окрашивает ядра клеток и базофильные структуры цитоплазмы, обеспечивает стойкое окрашивание гистологических препаратов и может быть повторно использован в течение нескольких недель. Более того, он может использоваться не только для обзорных целей (изучение структуры органов) и морфометрического анализа, но и в качестве замены красителей, традиционно используемых для окраски нервной ткани, таких как тионин и крезиловый фиолетовый. Разработанные рецепты приготовления красителей из черноплодной рябины и методики окраски просты и дешёвы, в связи с чем могут широко использоваться в гистологической практике и, особенно, для изучения структур головного и спинного мозга.

Ключевые слова: гистологический краситель растительного происхождения, черноплодная рябина (*Aronia melanocarpa*), ядерный (основной) краситель.

Histological dye was obtained following extraction of anthocyanin pigments from ethanol extracts of chokeberries and its staining properties were studied. It was shown that the dye from chokeberries selectively stains the nuclei of the cells and basophilic structures of the cytoplasm. The novel dye provides strong staining of histological specimens and can be re-used during several weeks. Moreover, it can be applied not only for the general examination of the structure of different organs and

for the morphometric analysis, but it may also replace the dyes which are routine for the staining of the nervous tissue, such as the thionin and cresyl violet. The recipes of dyes from chokeberries and staining procedures are simple and cheap and can be widely used in histological studies and, in particular, for the study of the brain and spinal cord.

Key words: *vegetal histological dyes, chokeberries (Aronia melanocarpa), nuclear (basic) dye.*

Введение. Антоциановые красители широко используются в пищевой (кондитерской), косметической, фармацевтической, текстильной и кожевенной промышленности. Известно немало способов извлечения антоциановых пигментов из растительного сырья в промышленных масштабах [1, 2, 3, 4, 5]. Однако сведений об их использовании в гистологической практике очень мало. Впервые основным краситель на основе антоцианидинов дельфинидина и цианидина был получен из ягод черники М.Д. Лавдовским в 1887 году [6]. В 2004 году был запатентован способ приготовления гистологического красителя из покровной чешуи лукович лука, содержащей кверцетин, который наряду с антоцианидинами относится к флавоноидам [7]. В 2014 году нами был предложен способ получения красителя на основе свекольного сока, содержащего антоцианы и бетацианины [8].

Антоцианы представляют собой водорастворимые флавоновые гликозиды, которые при гидролизе распадаются на глюкозу и безуглеродный остаток – аглюкон. Последний также известен как антоцианидин, и относится к пироксониевым основаниям. Антоцианидины придают окраску розовым и красным сортам винограда, плодам вишни, черешни, черники, черноплодной рябины и др. Основными антоцианами ягод черноплодной рябины являются цианидин-3-галактозид, цианидин-3-арабинозид и, в меньшей степени, цианидин-3-глюкозид и цианидин-3-ксилозид [2]. В связи с тем, что аглюкон флавоноидов

черноплодной рябины растворим в спирте, для выделения её антоциановых пигментов в качестве экстрагента чаще используют этиловый спирт или его смесь с водой [4]. Поэтому в настоящей работе для получения гистологического красителя мы использовали концентрированный спиртовой настой плодов черноплодной рябины. Приготовление растительных красителей не обходится без вспомогательных веществ – протрав, в качестве которых чаще выступают металлы-комплексобразователи. Атомы таких металлов должны иметь вакантные d-орбитали и служить хорошими акцепторами электронов. Красящие вещества, выступающие в роли лигандов, должны представлять пары для образования связей с металлом-комплексобразователем. В этом случае происходит «закрепление» красителя на тканях, и краска не вымывается. У антоцианов донором электрона служит гетероциклический атом кислорода, входящий в состав хроменилиевого цикла, который и является хромофором. В качестве протрав мы апробировали железоаммонийные и хромокалиевые квасцы, сернокислый магний и медный купорос.

Цель исследования - создать новый гистологический краситель на основе антоцианов ягод черноплодной рябины.

Материал и методы исследования. Свежие или засушенные ягоды черноплодной рябины разминают в ступке и плотно укладывают в стеклянную ёмкость. Затем заливают 90% этиловым спиртом и настаивают 2-3 дня. Затем выкладывают содержимое в марлю и отжимают. Полученную выжимку сливают в отдельную чистую посуду, плотно закрывают крышкой, оборачивают фольгой для исключения воздействия света и хранят при комнатной температуре до процедуры окраски. Непосредственно перед гистологическим окрашиванием в 50 мл полученного спиртового настоя добавляют 1.5 - 2 грамма сернокислого магния, либо такое же количество медного купороса, тщательно размешивают (5-7 минут) и фильтруют через обеззоленные фильтры. Значение pH полученного красителя находится в интервале от 0 до 1. При употреблении в качестве протравы/закрепителя сернокислого магния предпочтительнее использовать краситель через 1-2 недели. В этом случае окрашивание будет более интенсивным. Если в роли вспомогательного вещества выступает медный купорос, то более интенсивную окраску можно получить при использовании свежего раствора. Следует отметить, что в обоих случаях отчётливое окрашивание базофильных структур будет присутствовать при употреблении как свежих растворов, так и при их повторном использовании через несколько недель.

Результаты исследования и их обсужде-

ние. Депарафинированные срезы желудка, толстой кишки, легких, печени, спинного и головного мозга крыс помещали в свежеприготовленные красители на 20-25 минут. После быстрого проведения через 70% и 95% спирты срезы помещали в ксилол на 30 секунд и заключали под покровные стёкла. Так как красящий раствор является спиртовым, то можно исключить 70% спирт и сразу перенести срезы в 95% этанол. Существенной разницы в результатах окрашивания при этом не обнаруживается. 70% спирт лучше использовать для «дифференцировки» при наличии слишком интенсивной окраски. Во всех изученных тканях наблюдалось отчётливое окрашивание ядер и цитоплазмы некоторых разновидностей клеток в фиолетово-красный цвет. В ядрах хорошо прослеживалась структура хроматина (рис. 1, 2 и 3). При окрашивании срезов головного мозга можно хорошо рассмотреть цитоархитектонику различных структур мозга, чётко определить границы различных отделов головного мозга, легко дифференцировать нейроны и различные разновидности глиальных клеток. Контуры нейронов и их ядер визуализируются отчётливо, что в значительной степени облегчает морфометрический анализ (рис. 1). Отсутствует тёмный фон, нередко встречающийся на препаратах, окрашенных тионином и крезильовым фиолетовым. Окраска стойкая. При хранении срезы не обесцвечиваются (рис. 2).

Новый способ получения антоцианового красителя для гистологических исследований достаточно прост и практичен и в значительной степени отличается от более сложных технологий, предложенных для лёгкой промышленности [1, 2, 3, 4, 5]. В ранее описанных методах для экстрагирования антоциановых пигментов из растительного сырья помимо этанола, нагретого до 50-55 градусов [5], используют смесь воды и глицерина [3], горячую воду с подкислением лимонной кислотой [1] и даже глину [2]. Иногда осуществляют предварительное ацилирование, метилирование и алкилирование исходного сырья (например, обработка йодистым метилом [1]). С целью концентрации экстракты красителя упаривают в вакууме [1, 3]. Иногда в технологические схемы включают полимеры, например, поли-N-винилпирролидон, и сульфат аммония [5]. В предлагаемом нами способе приготовления красителя в качестве экстрагента используется 90% этиловый спирт при комнатной температуре, а для получения стойкого окрашивания добавляется небольшое количество либо сернокислого магния, либо медного купороса.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов получен ещё один гистологический краситель растительного происхождения. К его преимуществам стоит отнести доступность и

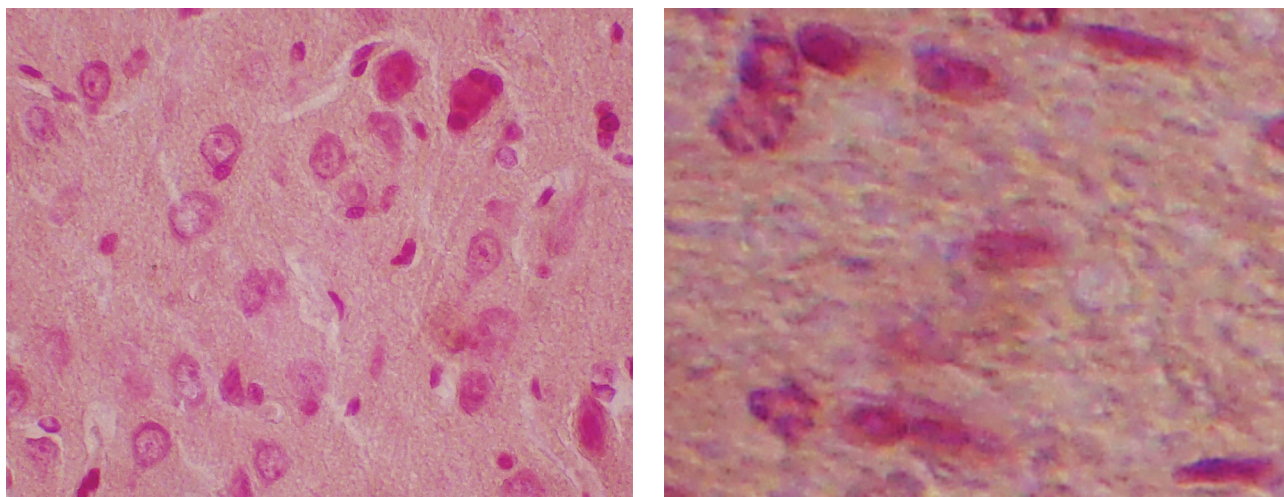


Рис. 1. Головной мозг крысы (а - нейроны; б - нейроглия). Окраска красителем на основе антоцианов ягод черноплодной рябины. Ув. 600.

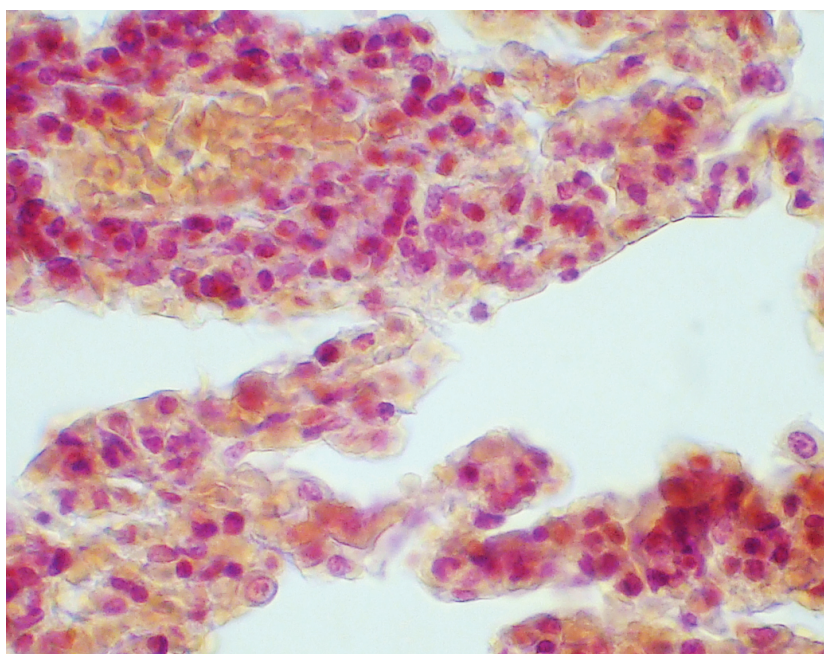


Рис. 2. Паренхима лёгкого крысы. Окраска красителем на основе антоцианов ягод черноплодной рябины. Ув. 600.

низкую себестоимость сырья, простоту приготовления раствора и процедуры окраски, а также применение нетоксичных ингредиентов и отсутствие необходимости нагревания красящих растворов. Специальных методов фиксации не требуется. Краситель используется для материала, зафиксированного в 10% растворе формалина.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Болотов, В.М., Черепнин В.С., Янова Л.А. Способ получения антоцианового красителя / Болотов, В.М., Черепнин В.С., Янова Л.А. // Патент РФ

№ 2008314. – 1994.

2. Дейнека, Л.А., Блинова, И.П., Чулков, А.Н., Саенко, И.И., Дейнека, В.И., Сорокопудов, В.Н. / Дейнека, Л.А., Блинова, И.П., Чулков, А.Н., Саенко, И.И., Дейнека, В.И., Сорокопудов, В.Н. Метод экстракции и очистки антоцианов из плодов аронии черноплодной // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация.- 2012.-Том 18.- № 10-2(129).-С. 60-64.

3. Переверткина, И.В., Титова Н.Н. Способ получения антоцианового красителя из выжимок тёмных

сортот ягод / Переверткина, И.В., Титова Н.Н. // Патент РФ № 2515478. – 2014.

4. Саввин, П.Н., Комарова, Е.В., Болотов, В.М., Шичкина, Е.С. Исследование натуральных каротиноидно-антоциановых красителей / Саввин, П.Н., Комарова, Е.В., Болотов, В.М., Шичкина, Е.С. // Химия растительного сырья. -2010. -№4. -С. 135-138.

5. Чурилина, Е.В., Коренман, Я.И., Суханов, П.Т., Болотов, В.М., Шаталов, Г.В. Извлечение натуральных красителей гидрофильными полимерами / Чурилина, Е.В., Коренман, Я.И., Суханов, П.Т., Болотов, В.М., Шаталов, Г.В. // Химия растительного сырья. -2010. -№2. -С. 153-158.

6. Микроскопическая техника / под ред. Д.С. Саркисова и Ю.Л. Перова // М.: Медицина, 1996. – 544 с.

7. Момот, Н. В., Лапшин Л.В., Момот, Ю. А. Способ получения основного красителя для морфологических целей / Момот, Н. В., Лапшин Л.В., Момот, Ю. А. // Патент РФ № 2243246. – 2004.

8. 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.

REFERENCES:

1. Bolotov, V.M., Cherepnin V.S., Yanova L.A. Sposob polucheniya antotsianovogo krasitelya / Bolotov, V.M., Cherepnin V.S., Yanova L.A. // Patent RF № 2008314. – 1994.

2. Dejneka, L.A., Blinova, I.P., Chulkov, A.N., Saenko, I.I., Dejneka, V.I., Sorokopudov, V.N. / Dejneka, L.A., Blinova, I.P., Chulkov, A.N., Saenko, I.I., Dejneka, V.I., Sorokopudov, V.N. Metod ehkstraksii i ochistki antotsianovizplodovaronii chernoplodnoj // Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Meditsina. Farmatsiya. - 2012. - Tom 18. - № 10-2(129). -S. 60-64.

3. Perevertkina, I.V., Titova N.N. Sposob polucheniya antotsianovogo krasitelya iz vyzhimok tyomnykh sortov yagod / Perevertkina, I.V., Titova N.N. // Patent RF № 2515478. – 2014.

4. Savvin, P.N., Komarova, E.V., Bolotov, V.M., Shichkina, E.S. Issledovanie natural'nykh karotinoidno-antotsianovykh krasitelej / Savvin, P.N., Komarova, E.V., Bolotov, V.M., Shichkina, E.S. // Khimiya rastitel'nogo syr'ya. -2010. -№4. -S. 135-138.

5. Churilina, E.V., Korenman, YA.I., Sukhanov, P.T., Bolotov, V.M., Shatalov, G.V. Izvlechenie natural'nykh krasitelej gidrofil'nymi polimerami / Churilina, E.V., Korenman, YA.I., Sukhanov, P.T., Bolotov, V.M., Shatalov, G.V. // Khimiya rastitel'nogo syr'ya. -2010. -№2. -S. 153-158.

6. Mikroskopicheskaya tekhnika / pod red. D.S. Sarkisova i YU.L. Perova // M.: Meditsina, 1996. – 544 s.

7. Momot, N. V., Lapshin L.V., Momot, YU. A. Sposob polucheniya osnovnogo krasitelya dlya morfologicheskikh tselej / Momot, N. V., Lapshin L.V., Momot, YU. A. // Patent RF № 2243246. – 2004.

8. Ishunina, T.A., Barabanshnikova, T.N., Sgonnikova, A.O. Gistologicheskie krasiteli na osnove svekol'nogo i morkovnogo soka. / Ishunina, T.A., Barabanshnikova, T.N., Sgonnikova, A.O. // Morfologicheskie vedomosti. -2014. -№1. -S. 112-114.

Авторская справка:

1. Ишунина Татьяна Александровна - доцент, кандидат медицинских наук; кафедра гистологии ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава РФ; 305041, г. Курск, ул. Карла Маркса 3, КГМУ 8 9606891979, E-mail: ishunina@gmail.com;

2. Солоненко Олег Владимирович - студент лечебного факультета ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава РФ; 305041, г. Курск, ул. Карла Маркса 3, КГМУ.

РАЗДЕЛ 5 РЕЦЕНЗИИ И ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

ГИСТОСТРУКТУРА, МИКРОСОСУДИСТОЕ РУСЛО И БИОМЕХАНИКА ЯЗЫКА ЧЕЛОВЕКА

РАССОЛОВ В.Н.¹, СЕМЕНОВА Г.И.¹, ГАЛАХОВ Б.Б.², БАРОВ А.В.²

HISTOSTRUCTURE, MICROVESSELS AND BIOMECHANICS OF HUMAN TONGUE IN HEALTH

RASSOLOV V.N., SEMYONOVA G.I., GALAKHOV B.B., BAROV A.V.

¹Научно-исследовательская лаборатория по проблемам морфологии (руководитель – профессор И.И.Марков) НОУ ВПО Медицинский институт «Реавиз»; ²кафедра анатомии человека (зав.кафедрой – профессор Г.Н.Суворова) ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ.

В настоящее время язык рассматривается как богатейший источник информации о состоянии здоровья человека и как индикатор общесоматической патологии организма. Особый клинический интерес представляет язык в системе: «ротовая полость – язык – желудочно-кишечный тракт» из-за их тесной эмбриологической связи. Обзор литературы дает современные представления о функциональной морфологии и биомеханике языка человека.

Ключевые слова: язык, гистоструктура, микрососуды, биомеханика.

Nowadays tongue is considered to be the richest source of information on human health and an indicator of general somatic pathology in the organism. Tongue is of special clinical interest within the "oral cavity - tongue - gastro-intestinal tract" system due to their close embryologic connection. The review of literature gives a state-of-the-art overview of the functional morphology and biomechanics of human tongue.

Key words: tongue, histostructure, microvessels, biomechanics.

Ранее существующее мнения о том, что «язык - зеркало желудка», переросла в обоснованное понятия «язык - зеркало организма» [1]. В настоящее время язык рассматривается как богатейший источник информации о состоянии здоровья человека и показатель общесоматической патологии организма [2-7]. Особый клинический интерес представляет язык в системе «ротовая полость-язык-желудочно-кишечный тракт» из-за

их тесной эмбриогенетической связи [8-13]. В свою очередь, взаимоотношение языка и полости рта, а так же языка с зубным, особенно съёмным протезом во время жевания и глотания, приводят к формированию функциональной макроглоссии [11, 14]. Такой язык создаёт дополнительные сложности для эффективного ортопедического лечения пациентов с полной вторичной адентией [7, 14, 15]. И, тем не менее, наблюдается некий парадокс: с одной стороны большинство стоматологов признают ведущую роль языка в формировании и росте альвеолярных отростков челюстей [9, 16-20], а с другой - при планировании, как дентальной имплантации, так и съёмного протезирования, его роль сводят к минимуму [14].

Вместе с тем, оценка морфофункциональной особенностей языка (размеров, положения, мышечного тонуса, гемоциркуляции) даёт необходимую достоверную информацию для выбора оптимальной конструкции полного съёмного протеза и методов, способствующих эффективному протезированию. Однако, в общепринятом протоколе ведения пациентов с полной вторичной адентией отсутствуют разделы, отражающие морфофункциональное состояние языка. В литературе нет так же данных о влиянии мышечной активности языка на продолжительность адаптации протезного ложа к съёмному протезу. В этом отношении особый интерес приобретает вопрос о целесообразности использования адгезивных средств, способствующих сокращению постпротетического адаптационного периода. Однако этот вопрос в отечественной литературе не обсуждался. Более того, значительное число стоматологов не информированы о адгезивных средствах и поэтому не располагают данными о их положительном влиянии на фиксацию протеза и адаптацию к нему [21]. В связи с этим, они не видят смысла в их использовании. В зарубежных же клиниках врачи достаточно часто назначают адгезивы в качестве эффективного средства, дающего пациенту возможность облегчить адаптацию