

**Застосування комбінованого зафарбовування гематоксиліном Майєра-азур2-еозіном
для дослідження кісткової тканини та її клітинних популяцій, зокрема, остеокластів.**

Полковенко О.В., к.б.н.

Ст. викладач кафедри мікробіології та сучасних біотехнологій
Відкритого університету «Україна»

Для дослідження гістоструктури кісткової тканини та її клітинних популяцій, зокрема, остеокластів, запропоновано застосування методу комбінованого зафарбовування гематоксиліном Майєра-азур2-еозіном. В результаті одержані гістопрепарати з гістоструктурами, що чітко виявляються завдяки їх різному забарвленню. Значно полегшується вивчення популяції остеокластів, їх морфометричний аналіз.

Ключові слова: гістологія, остеокласти, гематоксилін, азур2, еозин.

Для исследования гистоструктуры костной ткани и ее клеточных популяций, в частности, остеокластов, предложено использование метода комбинированного окрашивания гематоксилином Майера-азур2-эозином. В результате получены гистопрепараты с четко отличающимися по окраске различными гистологическими структурами. Значительно облегчается изучение популяций остеокластов в разных участках костной ткани, их морфометрический анализ.

Ключевые слова: гистология, остеокласты, гематоксилин, азур2, эозин.

A combined staining method with Mayer's hematoxylin-azur2-eozin is proposed for histological sections of the bone tissue. This method makes it possible to differentiate various cells and peculiar, osteoclasts in colour.

Key words: histology, osteoclasts, hematoxylin, azur2, eozin.

Гістологічні дослідження кісткової тканини проводяться вже багато десятиліть, але не втратили актуальність і до сьогоднішнього часу. Однак, при виготовленні гістопрепаратів виникають труднощі з зафарбовуванням кісткової тканини таким чином, щоб різні структури мали різний колір, що, в свою чергу, полегшує ідентифікацію, кількісне і якісне вивчення різних структур і клітинних популяцій кісткової тканини. Щоб вирішити цю проблему, вже давно застосовуються методики комбінованого зафарбовування кісткової тканини, коли різні гістологічні барвники зафарбовують різні структури тканин і клітин. Такі методи розроблені досить давно та стали досить класичними у використанні.

Ромейс (1954) описує зафарбовування азур-еозіном за Нохт-Максимовим мазків крові та гістозрізів сполучної тканини. Слід сказати, що кісткова тканина не згадується. Згідно цієї методики використовується суміш розчинів барвників, а не комбіноване зафарбовування.

В книзі Пірса (1962), де зібрані основні методики цитологічних і гістологічних досліджень різних клітин і тканин, методу зафарбовування кісткової тканини з метою дослідження остеокластів, подібного до запропонованого нами, взагалі не зустрічається.

Ліллі (1969) описує метод зафарбовування декальцинованої кісткової тканини сумішшю азура і еозина (за методом Ліллі і Пастернака). За його методом, барвники необхідно попередньо змішати і фарбувати протягом 1,5 хв. Однак, наші дослідження показали, в результаті не відбувається диференційованого забарвлення різних кісткових структур і клітин кісткової тканини, зокрема, остеокластів.

У збірнику гістологічних методик під загальною редакцією Елісеєва запропоновано використовувати метод зафарбовування азур2-еозіном для сполучної тканини та елементів крові. Про кісткову тканину та остеокласти мови не йде. Крім того, так же, як і у Ліллі пропонується фарбувати сумішшю гістологічних барвників, а не використовувати комбінований метод зафарбовування.

В теперішній час використовуються різні методи зафарбовування гістопрепаратів, зокрема толудіновим блакитним, Вон Косса (Beeton et al, 2006 та ін.), Голднера, Лайдевінг-трихром тощо, але за свідченням авторів (Хорн зі співавт., 2004) такі методи використовуються для дослідження ембріональних кісток, або культур клітин кісткової тканини. Крім того, використовуються недекальциновані кістки та застосовується зачленування їх у низькотемпературний метил-метакрилат (Хорн зі співавт., 2004). Тільки при виконанні цих умов можливе вивчення остеокластів. В дослідках на дорослих щурах найчастіше використовується зафарбовування гематоксилін-еозіном

Отже, вивчаючи популяції клітин кісткової тканини, зокрема, популяції остеокластів, ми відчули необхідність переглянути методики зафарбовування кісткової тканини. Так, при зафарбовуванні гематоксиліном Майєра-гіонін-еозіном [1] цитоплазма остеокластів має практично такий же колір, як мінералізований кістковий матрикс, тому знайти остеокласти стає досить нелегко. Крім того, ми досліджували кісткову тканину дорослих, статевозрілих щурів, у яких процеси ремоделювання не є такими активними, як наприклад, у молодих тварин, кількість остеокластів менша і це завдає додаткових складностей. Ми шукали таку методику зафарбовування, яка була б легкою у застосуванні, і, водночас, давала змогу без зусиль ідентифікувати остеокласти у кістковій тканині.

В результаті пошуків ми підібрали методику комбінованого зафарбовування гістологічних препаратів гематоксиліном Майєра-азур2-еозіном. Цей метод зафарбовування згадувався ще У 1974 році [1], але чомусь більш широко застосованим виявився метод зафарбовування гематоксиліном Майєра-еозіном.

Матеріал і методи дослідження.

Матеріалом дослідження слугували стегнові кістки статевозрілих білих щурів лінії Wistar. Відібраний біоматеріал фіксувався у 10% розчині параформальдегіду, після промивання кістки декальцинували 52 дні зі щотижневою зміною декальцинатора. Декальцинатор готували із трилону Б, 10% NaOH та дистильованої води. Після декальцинації біозразки кісток зневоднювали та заливали в парафін, згідно загальноприйнятих методик [2].

Виготовлені на санному мікромомі гістопрепарати, знепарафінували у ксилолах та спиртах, парафін зменшуючи етильованою водою. Час зафарбування підбирався експериментальним шляхом.

Виготовлення гістологічного барвника азур2 також є нескладним і не потребує значних зусиль. Для цього 100 мг порошку азур2 розчинялося у 100 мл кип'яченої та охолодженої до кімнатної температури дистильованої води. Також слід відмітити, що виготовлений розчин може довго зберігатися, не втрачаючи своїх якостей [2].

Для комбінованого зафарбування на гістопрепарат спочаку наносився гематоксилін Майєра на 40 с. Після цього препарат диференціювали у проточній воді протягом 10 хвилин (до посиніння гістозрізів). Потім ополіскували дистильованою водою та наносили азур 2 на 1,5 хв., ополіскували дистильованою водою та наносили еозин на 50 с.

Після зафарбовування гістозрізи зневоднювались у спиртах зростаючої концентрації та в ксилолі по 2-3 хв., а потім заключались у бальзам [2,3].

Слід сказати, що азур2 добре вимивається в спиртах, тому для отримання кращих результатів слід злегка перефарбовувати гістопрепарат, з тим, щоб при проведенні по спиртах добитися бажаної ступені зафарбування, контролюючи це під мікроскопом, а в подальшому, з набуттям певного досвіду, візуально. Час зафарбовування слід варіювати в залежності від товщини гістозрізу. Наведені нами часові діапазони застосовувались для гістозрізів товщиною 8-9 мкм.

Цей метод може застосовуватися також і для зафарбування гісторадіоавтографів, але потребує менш інтенсивного зафарбування ядер для того, що мітка була добре помітною.

В результаті одержували гістопрепарати, де різні структури мають досить виразне забарвлення та є легкими для вивчення. Так, хрящова тканина забарвлена у фіолетово-синій колір з синіми ядрами хондроцитів. На відміну від хрящової, кісткова тканина має від яскраво- до світло-рожевого кольору (рис.1).

Порушення гістоструктури кісткового матриксу (якщо такі мають місце) дуже добре виявляються у вигляді нерівномірності забарвлення (рис.2).

Клітини кісткового мозку забарвлюються в темно-синій колір. Еритроцити є помаранчево-рожевими. Ядра клітин (остеоцитів, остеобластів і остеокластів) мають темно-синій колір. Цитоплазма остеобластів блакитна. Цитоплазма остеокластів має світло-синій колір і чітко вирізняється від рожевого кольору мінералізованого кісткового матриксу (рис.3).

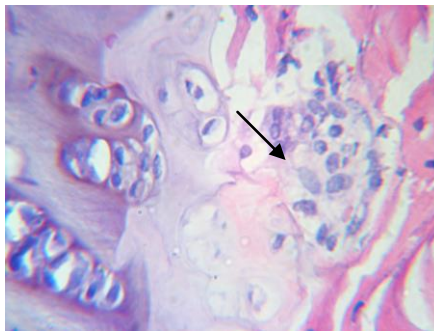


Рис.1. Фрагмент зони заміщення хрящової тканини кістковою. Спостерігається синьо-фіолетова хрящова тканина з синіми ядрами клітин та рожева кісткова тканина. Стрілкою позначений остеокласт. Білий щур, самець, 6 міс., Стегнова кістка. Мікрофото, гематоксилін-азур2-еозин, об.65, ок.12,5.

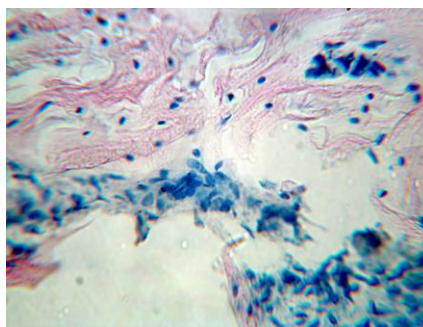


Рис. 2. Нерівномірність забарвлення, яка відображає порушення в гістоструктурі кісткової тканини в районі проксимального епіфізу стегнової кістки. Мікрофото, гематоксилін-азур2-еозин, об. 25, ок. 12,5.

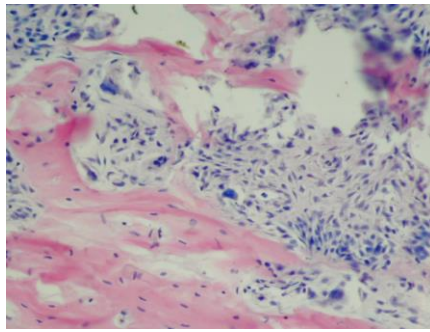


Рис.3. 5 остеокластів в полі зору на кісткових трабекулах. Помітні деструктивні зміни кісткової тканини трабекул. Проксимальний епіфіз стегнової кістки білого щура віком 6 міс.. Мікрофото, гематоксилін-азур2-еозін, об.65, ок.12,5.

Тому остеокласти досить добре помітні на гістопрепараті і їх ідентифікація стає набагато легшою, ніж у випадку зафарбування гематоксиліном Майєра-еозіном чи гематоксиліном Майєра-тіонін-еозіном. Через те, що ядра остеокластів мають більш інтенсивний, ніж цитоплазма, синій колір, підрахунок кількості ядер теж не викликає труднощів (рис. 3, 4).

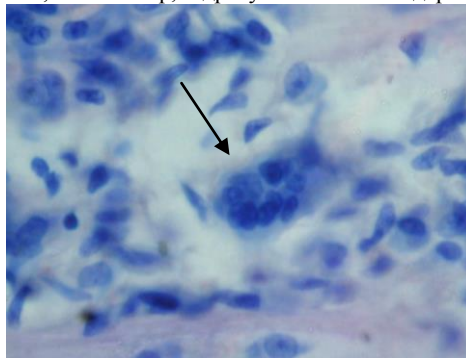


Рис.3. Остеокласт на кістковій трабекул (позначений стрілкою). Помітний світло-синій колір його цитоплазми та темно-синій колір ядер. Стрілкою позначений остеокласт. Проксимальний метафіз стегнової кістки білого щура. Мікрофото, гематоксилін-азур2-еозін, об.100, ок.12,5.

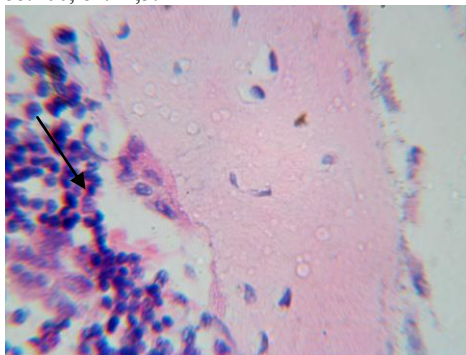


Рис.4. Остеокласт на кістковій трабекул (позначений стрілкою). Помітно, що колір його цитоплазми майже не відрізняється від кольору кісткової тканини. Проксимальний метафіз білого щура віком 6 міс. Мікрофото, гематоксилін-тіонін-еозін, об.65, ок.12,5.

Отже, можна сказати що застосування даного методу зафарбовування гістопрепаратів дозволяє добре розрізнити різні гістологічні структури кісткової тканини, чітко вирізнити остеокласти та значно полегшує їх ідентифікацію, кількісну та якісну оцінку, а також морфометричне дослідження клітинних популяцій остеокластів в різних ділянках довгих кісток. Це також стосується інших клітинних популяцій кісткової тканини.

Література

1. П.М. Мажуга, Т.П. Вечерская. Способ комбинированного окрашивания клеточных и тканевых структур на гистологических срезах костно-хрящевой ткани. Цитология и генетика, 2, 1974, с.160.
2. Основы гистологии и гистологической техники. Под ред. В.Г. Елисеєва. Медицина, М., 1967, 267 с.
3. Роскин Г.И., Левинсон Л.Б. Микроскопическая техника. М., 1957, 197с.
4. Ромейс Б. Микроскопическая техника. Изд-во «Иностранная литература», М.: 1954, 718 с.
5. Пирс Э. Гистохимия. Изд-во «Иностранная литература», М.: 1962, 962 с.
6. Р. Лилли. Патологическая техника и практическая гистология. М: Мир, 1969, 645 с.
7. Horn, D. A.; Garrett, I. R.. A novel method for embedding neonatal murine calvaria in methyl methacrylate suitable for visualizing mineralization, cellular and structural detail. Biotechnic & Histochemistry, 2004, Vol. 79 Issue 3/4, p151-158.
8. Beeton C.A., Bord S., Ireland D., Compston J.E. Osteoclast formation and bone resorption are inhibited by megacariocytes. Bone, 2006