

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
Саратовский государственный аграрный университет
имени Н.И. Вавилова

СЕКЦИОННЫЙ КУРС И МЕТОДЫ ПАТОГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Методическое пособие по выполнению лабораторных работ

Специальность
36.05.01 Ветеринария

Саратов 2017

Секционный курс и методы патогистологических исследований: метод. пособие по выполнению лабораторных работ для студентов по специальности 36.05.01 Ветеринария / Сост.: И.Ю. Домницкий, В.В. Салаутин, А.А. Терентьев // ФГБОУ ВО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2017. – 50 с.

Методическое пособие по выполнению лабораторных работ составлено в соответствии с программой дисциплины и предназначено для студентов специальности 36.05.01 Ветеринария; содержит теоретический материал по основным вопросам секционного курса и методов патогистологических исследований в ветеринарии.

Направлено на формирование у обучающихся навыков пользования медико-технической и ветеринарной аппаратурой, инструментарием и оборудованием в лабораторных, диагностических и лечебных целях, владения техникой клинического исследования животных, назначения необходимого лечения, проведения вскрытия и посмертной диагностики с оценкой правильности проведенного лечения.

ВВЕДЕНИЕ

Секционный курс и методы патогистологических исследований в ветеринарной медицине — совокупность навыков профессиональной деятельности врачей ветеринарной медицины и фельдшеров. Это система методов и методик в работе ветеринарных специалистов, которые в специфической форме отражают профессиональные функции в ветеринарии.

Основными категориями секционного курса и методов патогистологических исследований являются такие понятия как умение правильно пользоваться медико-технической и ветеринарной аппаратурой, инструментарием и оборудованием в лабораторных, диагностических и лечебных целях, владение техникой клинического исследования животных, назначение необходимого лечения в соответствии с поставленным диагнозом, а также способность и готовность проводить вскрытие и профессионально ставить посмертный диагноз, оценивать правильность проведенного лечения в порядке судебно-ветеринарной экспертизы и арбитражного производства.

Методическое пособие по выполнению лабораторных работ по дисциплине «Секционный курс и методы патогистологических исследований» составлено в соответствии с рабочей программой дисциплины и предназначено для студентов специальности 36.05.01 «Ветеринария».

Методическое пособие по выполнению лабораторных работ содержит теоретический материал по основным вопросам секционного курса и методов патогистологических исследований. Направлено на формирование у обучающихся навыков пользования медико-технической и ветеринарной аппаратурой, инструментарием и оборудованием в лабораторных, диагностических и лечебных целях, владения техникой клинического исследования животных, назначения необходимого лечения, проведения вскрытия и посмертной диагностики с оценкой правильности проведенного лечения.

ТЕМА 1. ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ТЕХНИКА И ОБОРУДОВАНИЕ. ТЕХНИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ. ВЗЯТИЕ МАТЕРИАЛА

Цель: сформировать понятие о гистологической технике и оборудовании, о технике приготовления гистологических препаратов и взятии материала.

1.1 Гистологическая техника и оборудование Рабочий стол.

При отсутствии специального стола с успехом может быть приспособлен любой стол (желательно с ящиками) с площадью рабочей поверхности не менее 60*120 см.

Если крышка стола не имеет специального покрытия, то его следует сделать из какого либо влагоустойчивого материала. Однако участок стола, предназначенный для непосредственной работы по приготовлению препаратов, в любом случае необходимо накрыть стеклом и расположить под ним небольшие (9*12см) листы белой или черной бумаги. Этим создается соответствующий фон, облегчающий работу с окрашенными (белый лист) и не окрашенными (черный лист) объектами. Рекомендуется также на оба листа нанести контуры предметного стекла с обозначением места расположения и размеров покровного стекла. Это простой прием позволяет рационально разместить на предметном стекле срезы в процессе из заключения.

Для того, чтобы удобнее расположить необходимое оборудование, следует иметь двухъярусную полку для реактивов, растворов и посуды, которая устанавливается либо перед работающим (вдоль заднего края стола), либо сбоку в зависимости от расположения стола относительно источника света.

ЛАБОРАТОРНАЯ ПОСУДА

В настоящем разделе дается описание лишь самых необходимых образцов.

Широкогорлые банки с притертыми пробками различной вместимости от 50 до 200 мл— используют для составления гистологических батарей, предназначенных для подготовки кусочков тканей к заливке различными средами. Более крупные банки применяют для фиксации и хранения кусочков тканей в фиксирующих жидкостях, обработки предметных стекол, приготовления нейтрального формалина и пр.

Вместо банок с притертыми пробками можно использовать небольшие хозяйственные банки с жестяными закручивающимися крышками разного объема.

Бюксы—небольшие круглые стеклянные стаканчики различного диаметра и высоты с шлифованными крышками

Биологические стаканчики—круглые, овальные или четырехугольные (как и высокие бюксы) применяют для проводки гистологических срезов, монтированных на предметных стеклах. Для придания устойчивости и обеспечения порядка в расстановке их помещают в специальные стойки, изготовленные из дерева или пластмассы, по несколько штук в ряд в зависимости от методики обработки.

Чашки петри—широкие, плоские стеклянные чашки с крышками— пригодны для различных манипуляций (окраска свободно плавающих и наклеенных на предметные стекла срезов, использование в качестве подставок под бюксы и т.д.).

Мерная посуда— цилиндры и мензурки различной емкости (от 10 до 250-500 мл) воронки различных размеров.

Химические стаканчики—круглые стеклянные стаканчики без крышек вместимостью 50-100 мл— находят широкое применение при проведении гистохимических реакций, окраски срезов наклеенных на стекла и т.д.

Колбы (плоскодонные) вместимостью от 50 мл до 2 л. Малые колбы применяют для приготовления и хранения растворов различных красителей, большие — под дистиллированную воду и прочие жидкости, расходуемые в больших количествах.

Пипетки обычные (предназначенные для закапывания лекарств) используют для накапывания на срезы красителей и различных жидкостей, градуированные (вместимостью 0,1-100 мл) применяют для отмеривания малых количеств различных жидкостей. Можно использовать в настоящее время широко используемые автоматические пипетки различной вместительности.

Предметные стекла - прямоугольные пластины размером 76*25 мм толщиной 1 мм предназначенные для размещения гистологических срезов в процессе приготовления постоянных препаратов.

Покровные стекла представляют собой тонкие (0,15-0,2 мм толщины) пластинки различных размеров. Служат для покрытия обработанных срезов, расположенных на предметных стеклах. Размеры покровных стекол выбирают в зависимости от площади объекта.

Инструменты

Инструменты, используемые в гистологической лаборатории, включают пинцеты, скальпели, кровоостанавливающие зажимы, корнцанг, шпатели, препаровальные иглы – прямые и изогнутые, металлические и стеклянные. Стеклянные иглы необходимы при импрегнации серебром, когда металлические иглами пользоваться нельзя,

Так же необходимо иметь спиртовку, волосяную кисточку для снятия срезов с микротомного ножа, фильтровальную бумагу, иголки, нитки, плотную бумагу для этикетирования материала, лейкопластырь и карандаш по стеклу.

1.2 Техника приготовления гистологических препаратов

Взятие материала.

Материалом для гистологического исследования могут служить кусочки органов экспериментальных животных. Полученный путем прижизненного иссечения у человека кусочков тканей (биопсия), трупный материал, мазки жидких исследуемых материалов (крови, костного мозга).

После умерщвления тело животного быстро фиксируют в положении на спине. Лягушек, тритонов, мышей и других мелких лабораторных животных фиксируют на дощечках, восковых или пробковых пластинках, прикалывая за растянутые в стороны лапки. Для фиксации средних и крупных лабораторных животных используют специальные станки или же изготовленные для этих целей доски (оцинкованные или окрашенные с вбитыми по краям крючками или гвоздиками для привязывания конечностей)

Техника вскрытия брюшной и грудной полостей для всех лабораторных животных одинакова. Однако у животных имеющих шерстный покров, вначале следует иссечь достаточно широкий кожный лоскут, чтобы избежать загрязнения внутренних органов. Для этого, захватив и приподняв (с помощью хирургического пинцета) кожу нижней части стенки живота по средней линии, подрезают ножницами образовавшуюся складку по направлению к голове, срезая кожный лоскут на нужном протяжении.

Затем следует сменить ножницы (или очистить их от прилипшей шерсти) и удалить влажным тампоном шерсть, попавшую на образовавшуюся «дорожку».

Вскрытие брюшной полости.

Нижнюю часть стенки живота приподнимают пинцетом по средней линии (чтобы не повредить органы), прорезают ножницами вход в брюшную полость, ввода туда одну из браншей (но обязательно тупую) и разрезают стенку кверху до грудины. Затем

берут кровоостанавливающие зажимы, захватывают ими внутренние слои стенки живота вместе с брюшиной и отворачивают кнаружи, раскрывая брюшную полость.

Вскрытие грудной полости.

Вскрытие производится двумя разрезами через реберные хрящи по обе стороны от грудины снизу вверх. Образовавшийся костно-хрящевой лоскут удаляют.

У мелких лабораторных животных следует вскрыть одновременно брюшную и грудную полости для обеспечения достаточно свободного доступа к внутренним органам. У крупных животных надо вскрывать только ту полость, откуда необходимо брать органы для исследования.

Взятие материала.

Главным требованием при взятии материала являются: максимальное сокращение сроков взятия, минимальное травмирование тканей, создание оптимальных условий для фиксации.

Первое и второе требование обеспечивается хорошим освоением техники умерщвления и вскрытия, а также применением очень острых режущих инструментов (скальпель, бритва, ножницы).

При иссечении материала необходимо максимально бережно обращаться с тканями: участки органов, подвергшихся травмированию (например, при зажиме пинцетом) не следует оставлять для исследования.

Благоприятные условия для фиксации создаются правильным выбором размера фиксируемого материала, ибо необходимо обеспечить равномерное и сравнительно быстрое проникновение фиксирующей жидкости во всю его толщину. Поэтому нужно вырезать кусочки толщиной не более 5-10 мм. Поперечные же и продольные размеры не имеют столь важного значения и определяются задачами исследования.

Вырезание кусочков для фиксации является одним из ответственных этапов в приготовлении качественных микропрепаратов и исследовательской практике и, как правило, должно производиться самим исследователем.

Если орган состоит из участков, различных по своему строению, необходимо проводить разрез таким образом, что бы все они попали в кусочек, а при возможности - брать кусочки отдельно из каждого участка. Например, при взятии кусочков мозга человека или крупных лабораторных животных приходится вырезать участки из определенных отделов. Из почки можно вырезать один кусочек, охватывающий всю толщину органа от капсулы до лоханки, что обеспечивает попадание в него всех слоев. Если орган имеет однородное строение (большинство желез, мышцы), то выбор места для вырезания кусочка не имеет большого значения.

Если необходимо приготовить гистологические препараты из стенки кишечника, отсекают нужный отрезок органа, ополаскивают его в изотоническом растворе хлорида натрия (чтобы не высохла серозная оболочка), разрезают вдоль (напротив брыжейки) и накалывают с помощью игл на восковую или пробковую подушку в расправленном состоянии слизистой оболочкой кверху.

Взятие материала из легкого также имеет некоторые особенности, ибо легкое всегда содержит воздух, и ткань его плавает, не погружаясь полностью в фиксирующую жидкость. Для полного погружения необходимо кусочек органа завернуть в марлю вместе с каким-либо грузом.

Взятие и фиксация материала.

Важнейшими условиями получения высококачественных гистологических препаратов являются:

1. возможно более раннее получение материала,

2. минимальное травмирование ткани,
3. адекватная фиксация.

Оборудование

1. Монитор Samsung Sync Master 740n
2. Клавиатура Chicony KB-9810
3. Компьютерная мышь Logitech M-BT58
4. Видеомагнитофон Panasonic NV-MV21
5. Усилитель звука BENRINGER UB1204-PRO
6. Проектор DLP Texas Instruments
7. Сист.блок iStar TOP/iC-1700/20Gb/128Mb/DDR/GeForce 2MX-400 32Mb/CD-ROM 52XIC-Net Pro 200

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жаров А. В. Патологическая анатомия животных. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2013. – 620 с. – Режим доступа: ЭБС «Лань» (<http://e.lanbook.com>), ISBN: 978-5-8114-1450-5
2. Жаров А. В. Судебная ветеринарная медицина. Учебник. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2014. – 464 с. – Режим доступа: ЭБС «Лань» (<http://e.lanbook.com>), ISBN: 978-5-8114-1581-6
3. Латыпов Д.Г., Залялов И.Н. Вскрытие и патологоанатомическая диагностика болезней животных. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2015. – 384 с. – Режим доступа: ЭБС «Лань» (<http://e.lanbook.com>), ISBN: 978-5-8114-1976-0
4. Салимов В.А. Практикум по патологической анатомии животных: Учебное пособие. 2-е изд., перераб. – СПб.: Лань, 2013. - 256 с. – Режим доступа: ЭБС «Лань» (<http://e.lanbook.com>), ISBN 978-5-8114-1418-5
5. Дудка, И.А. Методы экспериментальной микологии / И. А. Дудка, С.П. Вассер, И. А. Элланская [и др.] // Справочник. – Киев, 1982. – С. 402 – 405.
6. Лилли, Р., Патогистологическая техника и практическая гистология / Р.Лилли; пер. с англ.; под ред. и с предисловием чл.-корр. АМН В.В. Португалова.-М.:Мир, 1969.-512с.
7. Меркулов, Г. А. Курс патологистологической техники / Г. А. Меркулов. – Л.: Медицина, 1969. – 423 с.
8. Пирс, Э. Гистохимия. / Э. Пирс. – М., 1962.- С. 751-754.

ТЕМА 2. ТЕХНИКА ВЫРЕЗКИ МАТЕРИАЛА. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ФИКСАЦИИ. ВОЗМОЖНЫЕ АРТЕФАКТЫ, СВЯЗАННЫЕ С ФИКСАЦИЕЙ И ИХ УСТРАНЕНИЕ

Цель: сформировать понятие и изучить технику вырезки материала, общие принципы фиксации, возможные артефакты, связанные с фиксацией и их устранение.

2.1 Техника вырезки материала

Оптимальная площадь кусочков ткани 2 - 3 см², толщина 5 - 7мм.

Вырезанные кусочки ткани непосредственно с лезвия ножа погружают в фиксатор. Недопустимы сдавливание кусочков, промывание их водой, а также очистка поверхности органа, особенно слизистой оболочки, инструментами, пальцами и т.д. После погружения кусочков в сосуд с фиксатором туда же опускают этикетку с номером (шифром, маркировкой), написанным карандашом или тушью на матовой поверхности фотобумаги. В тех случаях, когда возникает необходимость маркировки каждого кусочка, его вместе с этикеткой завязывают в марлевый мешочек. Возможно также нанизывание кусочков на нитку: сначала 2 - 3 раза прошивают этикетку первого

кусочка, затем сам кусочек, потом следующую этикетку и так далее до 10-15 кусочков. Проводится также маркировка кусочков органов на картонах с подписями несмываемыми чернилами, после подрезки кусочков маркированный картон укладывают в марлевый узелок вместе с подрезанным кусочком.

При наличии патологически измененных участков тканей и органов кусочки вырезают на границе с нормальной тканью.

Кусочки полых органов вырезают таким образом, чтобы в препарате были видны все слои стенки. Кусочки стенки полого органа удобно предварительно расправлять на фотобумаге или картоне.

Для изучения стенки сосуда на большом протяжении его разрезают вдоль, свертывают в виде рулона и прошивают посередине.

Для исследования рыхлой соединительной ткани готовят пленчатые препараты: после осторожной препаровки соединительнотканную пленку натягивают пинцетом на обезжиренное предметное стекло и фиксируют.

2.2 Общие принципы фиксации.

Фиксация обеспечивает стабилизацию тканевых структур и их уплотнение. Механизм действия фиксаторов основан на коагуляции белков и стабилизации липидов.

Фиксация всегда приводит к большим или меньшим изменениям структуры и объема ткани, степень выраженности которых зависит от рН фиксатора, его концентрации, температуры, продолжительности воздействия и других факторов. Концентрация ионов водорода фиксатора должна соответствовать таковой в тканях, поэтому фиксатор должен иметь рН, близкий к нейтральному. Увеличение температуры фиксатора ускоряет процесс, но вызывает еще большие изменения в тканях. Слишком продолжительная фиксация приводит к значительному уплотнению материала, что в дальнейшем затрудняет его обработку. Для каждого конкретного вида исследования подбирают наиболее приемлемый фиксатор. Чем меньшую деформацию будут претерпевать тканевые структуры при фиксации, чем быстрее и глубже будет их действие на ткань, тем лучшей считается фиксирующая жидкость.

Полноценная фиксация материала обеспечивается при соблюдении ряда требований.

1. После вырезки кусочка ткани его немедленно погружают в фиксатор.
2. Объем фиксатора должен превышать объем фиксируемого материала в 10-20 раз, так как тканевая жидкость может существенно изменить концентрацию фиксатора.
3. В том случае, если цвет фиксатора изменяется после погружения в него кусочков ткани, фиксатор необходимо немедленно сменить.
4. Недопустимо повторное использование фиксаторов.
5. Для каждого фиксатора следует соблюдать установленное время фиксации. Длительное пребывание материала возможно лишь в некоторых фиксаторах, например 10 % нейтральном формалине, жидкости Буэна.

Для фиксации лучше использовать емкости с широким горлом, чтобы не возникло проблем с извлечением фиксированного материала. Равномерность фиксации некоторых рыхлых тканей, например легочной, достигается помещением их на дно банки, а поверх них - прокладки из слоя марли или ваты. Данный приём позволяет избежать дефекта фиксации кусочков лёгочной ткани в виде прилипания их к крышке банки с последующим развитием аутолиза в кусочке. При большом количестве материала кусочки переслаивают ватой или марлей.

Чаще материал фиксируют при комнатной температуре, но для некоторых видов исследования (гистохимических, электронно-микроскопических и др.) необходимо проводить фиксацию при 4 °С. Материал срочных биопсий фиксируют при повышенной температуре фиксатора. При ускоренной фиксации в глубине объекта быстро развиваются аутолитические процессы.

Простые фиксирующие жидкости.

Формалин. Основным, широко применяемым фиксатором служит формалин, представляющий собой 40 % раствор формальдегида. Из него готовят нейтральный (забуференный до pH 7,0) 10-12 % формалин. Для этого в банку с 40% формалином засыпают карбонат кальция или магния либо смесь этих солей - доломит из расчета 100 г на 1 л формалина. Для получения 10 % нейтрального формалина через 24 ч к 1 части 40 % нейтрального формалина добавляют 9 частей водопроводной воды. Продолжительность фиксации 24-48 ч при 20 °С.

Универсальным фиксатором, пригодным для гистологических и большинства гистохимических исследований, является нейтральный формалин по Лилли.

Нейтрализация формалина. Примесь в формалине муравьиной кислоты придает раствору слабокислый характер, что нежелательно при применении ряда методов исследования (некоторые гистохимические реакции, серебрение раствором нитрата серебра). Способ нейтрализации формалина довольно прост: в сосуд засыпают карбонат кальция (или карбонат магния) в таком количестве, чтобы на дне образовался слой толщиной 1,5—2 см. Затем наливают формалин, несколько раз энергично встряхивают и оставляют стоять 24—48 ч. В течение этого времени происходит нейтрализация раствора.

Побочные действия формалина. Длительное хранение препаратов в концентрированном растворе формалина придает тканям чрезмерную плотность, затрудняющую дальнейшую обработку и ухудшающую качество препарата. Устранить этот недостаток можно путем помещения материала на 2 недели в 1% раствор нитрата серебра или 10% раствор лимонной кислоты. Длительное хранение в 10% растворе формалина приводит также к набуханию объекта, что необходимо помнить при его измерении после фиксации. При фиксации формалином в препаратах нередко появляется темно-коричневый кристаллический осадок — результат взаимодействия формалина с находящимся в тканях гемоглобином. Его удаляют путем помещения неокрашенных срезов в 1—5% раствор аммиака или 70% этиловый алкоголь на различные сроки (от 5 мин до 4 ч). Затем препарат тщательно промывают и ведут дальнейшую обработку.

Следует постоянно помнить, что длительное действие паров формалина сильно раздражает слизистые оболочки. Смачивание кожи формалином оказывает дубящий эффект, а при повторных частых контактах вызывает сухую экзему. Поэтому перед препарированием формалиновые препараты помещают в слабо аммиачную воду (для устранения запаха) и работают в резиновых перчатках (при возможности под вытяжным устройством).

А. 100 мл 40 % формалина + 900 мл дистиллированной воды.

Б. 4 г дигидроортофосфата натрия моногидрата (однозамещенного фосфата натрия).

В. 6,5 г гидроортофосфата натрия (двузамещенного фосфата натрия).

Если на дне банки с 40 % формалином образовался осадок белого цвета (параформальдегид), то его можно растворить, подогрев до 70-80 °С (в вытяжном шкафу!), и использовать для фиксации.

Этиловый спирт (80 %, 90 %, 96 % и 100 %). Его применяют в качестве фиксатора для выявления гликогена, железа, амилоида, но он растворяет липиды. Механизм действия основан на осаждении белков, при этом происходит обезвоживание объектов, что значительно ускоряет проводку. Продолжительность фиксации от 2 ч до 1 сут. Увеличение длительности фиксации, особенно в 100 % спирте, нежелательно, так как материал значительно уплотняется и происходит его пересушивание. Оптимальная температура для фиксации материала в спирте +4 °С, но ее можно проводить и при комнатной температуре. Если после спиртовой фиксации предстоит резать ткань на замораживающем микротоме или криостате, то кусочки промывают в течение 1-2 ч до их полного погружения на дно банки, при этом происходит насыщение ткани водой.

Ацетон (его действие подобно действию спирта). Ацетон используют для увеличения скорости фиксации. Применяют 100 % ацетон, для получения которого в коммерческий ацетон засыпают прокаленный сульфат меди (медный купорос) или силикагель. В ацетоне фиксируют кусочки толщиной 3-4 мм в течение 2 ч при 20 °С или 30 мин - 1 ч в термостате при 60 °С в плотно закрытой посуде. Ацетон значительно уплотняет ткань и при увеличении продолжительности фиксации возможно сморщивание объектов. Чаще ацетон применяют для обработки материала срочных биопсий при его заливке в парафин.

Сулема (дихлорид ртути). Сулему применяют в качестве фиксатора с начала развития гистологии. Готовят насыщенный раствор: 10 г сулемы на 100 мл дистиллированной воды или изотонического раствора хлорида натрия доводят до кипения, охлаждают, фильтруют. Продолжительность фиксации кусочков толщиной 3 мм 6-12 ч при 20 °С. При фиксации сулемой возможно появление в тканях кристаллического осадка, который удаляют путем обработки срезов йодированным 70 % спиртом (на 50 мл 70 % спирта - 5-10 капель 5 % спиртового раствора йода до появления оранжевого цвета). По мере обесцвечивания йодированного спирта со срезами его заменяют свежей порцией вплоть до полной потери цвета, затем срезы промывают в 3 - 4 сменах 70 % спирта.

Сложные фиксаторы (по Лили)

Жидкость Мюллера.

В настоящее время применение ее в чистом виде ограничено. Однако она служит исходным раствором для приготовления таких распространенных фиксаторов, как жидкости Ценкера, Орта, Максимова и др.

Состав:

Бихромат калия 2,5 г

Сульфат натрия 1,0 г.

Вода дистиллированная 100 мл.

Для лучшего растворения бихромата калия рекомендуется подогреть воду.

Фиксация по Навашину—Крылову.

Фиксация этим методом дает хорошие результаты при окраске ядер и протоплазматических структур железным гематоксилином.

Состав фиксатора Навашина:

Хромовой кислоты 1% р-р..... 10 мл

Формалин 10% р-р.10 мл

Вода дистиллированная.....90 мл.

Уксусная кислота ледяная.....2 мл (добавляют непосредственно перед фиксацией)

Кусочки толщиной 5 мм следует фиксировать 4—6 ч; затем тщательно промыть в проточной воде (24—36 ч) для удаления хромовой кислоты, остатки которой ухудшают окраску препаратов. Г. И. Крылов предложил перед промывкой проводить кусочки через несколько порций 5—10% формалина до прекращения желтого окрашивания раствора (формалин извлекает хромовую кислоту из тканей). Эта процедура сокращает сроки промывания в воде.

Фиксатор ФСУ

(формалин, спирт, уксусная кислота) Бродского.

Рекомендуется для изучения структуры тканей и количественного цитохимического анализа нуклеиновых кислот. Преимущество ФСУ перед фиксатором Карнуа в том, что формалин подавляет активность ферментов, разрушающих нуклеиновые кислоты (нуклеазы) в фиксируемых клетках, благодаря чему количественно лучше сохраняются ДНК и РНК.

Состав и способ употребления:

Формалин нейтральный разведенный3 части

Спирт этиловый 96°1 часть

Уксусная кислота ледяная0,3 части

Кусочки тканей 2 x 2 или 2 x 3 мм; время обработки 1—4ч в зависимости от свойств объекта.

После фиксации кусочки промыть водой в течение 12 ч или (для цитохимических целей) в течение того же времени тремя сменами 70% спирта. Быстро обезводить и залить в парафин.

Фиксатор Шабадша.

Рекомендуется как лучший фиксатор для гистохимического выявления гликогена (особенно, где его мало, — центральная нервная система).

Состав:

Первый раствор- Спирт этиловый 96%-100 мл., Нитрат меди-1,8 г., Нитрат кальция-0,9г., Формалин нейтральный-10 мл.

Второй раствор - Спирт этиловый 96%-100 мл., Нитрат кадмия-2,6 г., Формалин нейтральный -10 мл.

Кусочки органа (не более 3 x 3 мм) фиксировать 3 ч в первом растворе, затем перенести во второй раствор на 3 ч. Промыть в трех-четырёх сменах 70% спирта по 2 ч. Залить в парафин или целлоидин.

Составными частями сложных фиксаторов являются простые. Существует множество вариантов фиксирующих смесей. Ниже приведены наиболее распространенные.

Спирт-формол по Шафферу - 10 % нейтральный формалин, который готовят из 1 части нейтрального 40 % формалина и 2 - 3 частей 96 % спирта.

Продолжительность фиксации 24-48 ч. Дальнейшая промывка в воде не требуется, и материал сразу же помещают в 96 % спирт.

Солевой формол

Нейтральный 40 % формалин.....100 мл

Хлорид натрия.....8,5 г

Водопроводная вода.....900 мл

Продолжительность фиксации 48 ч при 20 °С с последующей промывкой в проточной воде в течение 6-12 ч.

Жидкость Буэна - классический фиксатор для экспериментальных исследований.

Насыщенный раствор пикриновой кислоты.....75 мл

Нейтральный 40 % формалин.....25 мл

Ледяная уксусная кислота.....5 мл

Продолжительность фиксации 1-24 ч при 20 °С.

Насыщенный раствор пикриновой кислоты готовят заранее из расчета 3г кристаллической пикриновой кислоты на 1л горячей дистиллированной воды. После фиксации кусочки отмывают от избытка пикриновой кислоты в 70 % спирте, затем заливают в парафин.

Кальций-формол по Бейкеру используют для фиксации липидов.

А. 10 мл 40 % формалина + 90 мл дистиллированной воды.

Б. 1 г хлорида кальция.

Растворы А и Б смешивают.

Продолжительность фиксации 24-48 ч при 20 °С.

Жидкость Карнуа - универсальный фиксатор для большинства гистологических и гистохимических исследований (кроме выявления липидов).

Спирт 100 % или 96 %.....60 мл

Хлороформ.....30 мл

Ледяная уксусная кислота.....10 мл

Продолжительность фиксации 2-4 ч при 4 °С или 1-2 ч при 20 °С. Затем материал помещают в 100 % спирт. Если материал не сразу подлежит проводке, то его можно перенести в 96 % спирт и держать в нем до 3 сут.

Используется также **фиксатор Карнуа I**, в состав которого входят 75 мл 100 % спирта и 25 мл ледяной уксусной кислоты. Условия фиксации те же.

В случае отсутствия этилового спирта вместо жидкости Карнуа можно использовать смесь следующего состава.

Изопропиловый спирт..... 60 мл

Пропионовая кислота.....30 мл

Ацетон.....10 мл

Диоксан.....10 мл.

Продолжительность фиксации 12-24 ч при 20 °С; для промывки и обезвоживания применяют изопропиловый спирт.

Правила работы с фиксаторами.

Практически все фиксаторы относятся к токсичным веществам (альдегиды, ацетоны, спирты), некоторые ядовиты (сулема, тетраоксид осмия, метанол), поэтому необходимо соблюдать правила техники безопасности при работе с реактивами, которые используют в гистологической практике.

Фиксацию и вырезку материала необходимо производить в вытяжном шкафу. Материал, извлеченный из фиксатора, содержащего формалин, желательнее в течение нескольких минут промыть в проточной воде, так как пары формалина оказывают раздражающее действие на слизистые оболочки глаз и органов дыхания.

2.3 Возможные артефакты, связанные с фиксацией и их устранение

При фиксации формалином, особенно кислым, возможно появление в срезах темно-коричневого пигмента в виде зернышек или глыбок (результат реакции формалина с гемоглобином ткани). Пигмент удаляют, помещая срезы на 15-20 мин в 1-5 % раствор аммиака или 70 % спирт. После промывания водой препарат можно окрашивать. Хорошо удаляется пигмент в растворе 1 % гидроксида калия в 80 % спирте (1:25): после 10-минутной экспозиции препарат промывают в проточной воде в течение 5 мин.

В случаях значительного уплотнения ткани в результате слишком продолжительной фиксации кусочки помещают на 1-2 ч в 10 % раствор лимонной кислоты (материал становится более мягким и пригодным для исследования).

Кристаллический осадок, образующийся после фиксации с применением сулемы, удаляют из кусочков или лучше срезов с помощью йодированного 70 % спирта.

Гистолог при исследовании микропрепаратов должен учитывать ряд возможных артефактов, вызванных фиксацией материала:

1. развитие в тканях аутолиза при крупных размерах объектов или плохой их фиксации, при этом оценка срезов ограничена (нельзя высказаться достоверно о степени выраженности отёка тканей, степени выраженности дистрофических изменений клеток, клеточной реакции, т.к. на фоне аутолиза клеточные элементы распадаются),

2. сжатие тканей при их фиксации (может достигать до 40% от первоначального объёма), а также набухание тканей при фиксации приводят к артефактам при микроморфометрии (например, увеличение количества лейкоцитов в поле зрения микроскопа при фиксации объекта мягких тканей 72 часа и более по сравнению с этим же кусочком мягких тканей, фиксированным 24-48 часов),

3. механическая травма нервной ткани при вскрытии черепа, исследовании головного мозга - сморщивание, гиперхромия ядер нейронов, их деформация,

4. постоянный артефакт в ЦНС - периваскулярные и перицеллюлярные щели, ошибочно диагностируемые как периваскулярный и перицеллюлярный отёк и др.

Оборудование

1. Монитор Samsung Sync Master 740n
2. Клавиатура Chicony KB-9810
3. Компьютерная мышь Logitech M-BT58
4. Видеомагнитофон Panasonic NV-MV21
5. Усилитель звука BENRINGER UB1204-PRO
6. Проектор DLP Texas Instruments
7. Сист.блок iStar TOP/iC-1700/20Gb/128Mb/DDR/GeForce 2MX-400 32Mb/CD-ROM 52XIC-Net Pro 200

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жаров А. В. Патологическая анатомия животных. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2013. – 620 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1450-5
2. Жаров А. В. Судебная ветеринарная медицина. Учебник. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2014. – 464 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1581-6
3. Латыпов Д.Г., Залялов И.Н. Вскрытие и патологоанатомическая диагностика болезней животных. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2015. – 384 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1976-0
4. Салимов В.А. Практикум по патологической анатомии животных: Учебное пособие. 2-е изд., перераб. – СПб.: Лань, 2013. - 256 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN 978-5-8114-1418-5
5. Дудка, И.А. Методы экспериментальной микологии / И. А. Дудка, С.П. Вассер, И. А. Элланская [и др.] // Справочник. – Киев, 1982. – С. 402 – 405.
6. Лилли, Р., Патогистологическая техника и практическая гистология / Р.Лилли; пер. с англ.; под ред. и с предисловием чл.-корр. АМН В.В. Португалова.-М.:Мир, 1969.-512с.
7. Меркулов, Г. А. Курс патологистологической техники / Г. А. Меркулов. – Л.: Медицина, 1969. – 423 с.
8. Пирс, Э. Гистохимия. / Э. Пирс. – М., 1962.- С. 751-754.

ТЕМА 3. СПОСОБЫ ОБЕЗВОЖИВАНИЯ ТКАНЕЙ. ЗАЛИВОЧНЫЕ СРЕДЫ. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПАРАФИНОВЫХ БЛОКОВ

Цель: сформировать понятие и изучить способы обезвоживания тканей, заливочные среды и приготовление парафиновых блоков.

3.1 Обезвоживание и заливка материала

(Микроскопическая техника: Руководство / Под редакцией Д.С.Саркисова и Ю.Л.Перова. - М.: Медицина, 1996. ISBN 5-225-02-820-9).

После фиксации, для которой применялся формалин, кусочки промывают в течение 6, 12 или 24 ч в проточной воде: на водопроводный кран надевают резиновую трубку, конец которой опускают в широкогорлую банку, закрытую марлей. Для промывки удобно использовать эксикаторы разных размеров, снабженные краном: в отверстие крышки эксикатора опускают шланг, по которому подают воду, а через кран эксикатора ее сливают.

В том случае, если в состав фиксатора входила пикриновая кислота, материал следует промыть в нескольких сменах 70 % спирта, после фиксации с использованием сулемы - в йодированном 70 % спирте.

В случае необходимости кусочки тканей перед обезвоживанием можно уменьшить, подровнять. Если материал после фиксации не сразу подлежит проводке, то его можно оставить в 70-80 % спирте.

Способы обезвоживания тканей.

Перед заливкой материала в парафин или целлоидин его необходимо обезвоживать. Существует несколько традиционных способов обезвоживания. Самым распространенным является обезвоживание в спиртах восходящей концентрации, начиная с 70 %. Обычно применяют батарею спиртов, состоящую из двух порций 96 % и двух - 100 % спирта. Продолжительность процесса обезвоживания в спиртах в среднем 48 ч в зависимости от качества материала (содержания жира в ткани) и размера кусочков, а также от их количества. При использовании автомата для заливки количество спиртов увеличивают, а при проведении кусочков по спиртовой батарее вручную их осторожно промокают фильтровальной бумагой или салфеткой из марли, что позволяет реже менять спирты в батарее.

Процесс обезвоживания можно ускорить, периодически встряхивая кусочки в банках со спиртами или поместив их в термостат при 37 °С. Спирты в батарее необходимо своевременно заменять. Контролировать пригодность спирта позволяет проба с водой. В отлитое из банки небольшое количество спирта добавляют 1 каплю воды. Помутнение раствора свидетельствует о необходимости замены спирта в батарее.

С целью ускорения обезвоживания применяют **ацетон** без примесей (ЧДА), предварительно добавив в него силикагель для удаления остатков воды или дистиллированный ацетон. Обезвоживание проводят в 2-3 сменах ацетона от нескольких часов до 1 сут в зависимости от величины объектов.

Обезвоживание тканей возможно с помощью 99 % изопропилового спирта, который непосредственно смешивается с парафином без промежуточных растворителей (ксилон, хлороформ и др.).

Таким же свойством обладает **диоксан**, однако в связи с высокой токсичностью он не нашел широкого применения в патогистологической технике

Для обезвоживания **глицерином** [Беккер Г.М., 1958; Wolf J., 1939, и др.] кусочки ткани последовательно помещают в 60 %, 80 % и 100 % глицерин на 3 - 4 ч, а затем в смесь, состоящую из равных частей 100 % глицерина и ксилола.

Выраженное влияние на скорость обезвоживания оказывает микроволновое излучение. Объекты в 70 % спирте помещают на 20 с в микроволновую печь (2,5 Гц/500 В), а затем дообезвоживают в абсолютном спирте в течение 30-60 мин.

Секционный и биопсийный материал часто обезвоживают в аппаратах типа АТ-5 и др. с последующим пропитыванием толуолом, хлороформом или их смесью с парафином. При этом применяют две порции 96 % спирта и две -100 %. Общая продолжительность обезвоживания 48 ч. Преимущество использования аппаратов состоит в том, что в них материал постоянно перемешивается и находится во взвешенном состоянии. Однако аппарат не включается автоматически после внезапного перепада напряжения в электрической сети, что может привести к пересушиванию большого количества материала.

3.2 Заливочные среды

Для получения тонких (до 6 мкм) гистологических срезов необходимо фиксированный и промытый материал залить в плотную среду, предварительно пропитав ею кусочки тканей. В зависимости от способа растворения все заливочные среды разделяют на растворимые в органических растворителях и водорастворимые. К первым относятся парафин, пластические полимеры на основе парафина, целлоидин, ко вторым - желатин, полиэтиленгликоли, полиэфиры, некоторые метакрилаты и т.д.

Заливка ткани в парафин.

Парафин - смесь высокомолекулярных предельных углеводородов, продукт перегонки нефти; растворяется в анилине, бензоле, бергамотном масле, целлозольве, хлороформе, декалине, диоксане, бутаноле, пропаноле, толуоле, трихлорэтилене, ксилоле. Каждый из этих растворителей можно использовать в качестве промежуточной среды между спиртом и парафином. Температура плавления различных парафинов от 27 до 62 °С. В гистологической технике применяют парафин с температурой плавления 56 °С. Зарубежные фирмы производят специальный парафин для гистологических исследований, содержащий различные пластические полимеры, такие как диметилсульфоксид. Их коммерческие названия «Парапласт», «Парапласт плюс», «Гистопласт С», «Гистозес».

Важнейшим условием успешной заливки материала является своевременная смена реактивов в процессе их загрязнения, а также соблюдение рекомендуемых временных и температурных параметров. Кроме того, нужно стремиться к тому, чтобы одновременно заливать одинаковые по толщине и плотности кусочки ткани.

Схема Меркулова

Фиксация:

формалин 10 %	24 ч
спирт-формол	24 ч
жидкость Карнуа	2-4 ч
спирт 96-100%	12-24ч
промывание в проточной воде	12 -24 ч

Обезвоживание:

спирт 96 % I	24 ч
спирт 96 %II	2 ч
спирт 100 % I	24 ч
спирт 100 % II	2 ч

Заливка в парафин:	
Спирт + хлороформ (1:1)	6-12 ч
или спирт + ксилол (1:1)	1-3 ч
или хлороформ	6-12 ч
или ксилол	1-6 ч
хлороформ + парафин (1:1 - «каша») 37 °С	2-3ч
или ксилол + парафин (1:1 - «каша») 37 °С	1-2 ч
парафин I 56 °С	2 ч
парафин II 56 °С	1ч

Заливка в парапласт с помощью автомата

Фиксация в 5 % формалине	2 ч
Спирт 70 % I	2ч
Спирт 70 % II	1ч
Спирт 96 % I	1ч
Спирт 96 % II	1ч
Спирт 100 % I	1ч
Спирт 100 % II	1ч
Спирт 100 % III	1 ч
Хлороформ I (бензол)	1 ч
Хлороформ II (бензол)	1 ч
Парапласт I 60 °С	2 ч
Парапласт II 60 °С	3 ч
Продолжительность	17 ч

Наиболее быстрым, простым, не требующим применения специальной аппаратуры методом заливки материала является способ, разработанный Н.Н. Золотых в патологоанатомическом отделе Института хирургии им. А.В. Вишневского.

Фиксация в 96 % спирте	15 мин
Спирт 100 %	15 мин
Хлороформ	15 мин
Хлороформ-парафин при 56 °С	15 мин
Парафин при 56 °С, энергично встряхивая	1 мин
Парафин при 56 °С	45 мин
Продолжительность	2 ч 30 мин

3.3 Приготовление парафиновых блоков

Пропитанные парафином кусочки ткани выкладывают в специальные формочки и заливают расплавленным в термостате или на водяной бане при 60 °С парафином, в который добавлено 1-3 % воска.

Для получения парафиновых блоков нужной формы используют различные приспособления:

1. изготавливаемые самим лаборантом бумажные коробочки, на дно которых выкладывают кусочки, а рядом к боковой стенке ставят этикетку номером снаружи;
2. металлические Г-образные угольники или разъемные формочки, которые перед употреблением смазывают глицерином и помещают на нагретую металлическую пластинку, выполняющую роль дна формочек;
3. различные пластмассовые коробочки и формы, в частности используемые в микробиологии, особенно при заливке мелких объектов, таких как материал пункционных биопсий.

Специальные импортные аппараты для заливки в парафин (так называемые заливочные центры) снабжены набором различных формочек (кассет) и пинцетов. В них обеспечивается автоматическая подача дробных доз парафина оптимальной температуры.

Раскладывание кусочков в формочки и их ориентирование нужно проводить быстро теплым пинцетом. Если материала для заливки много и он быстро остывает, то можно использовать парафин, подогретый на водяной бане до 60 °С. Для охлаждения формочки с материалом рекомендуют помещать в воду при 10- 18 °С, но не погружать в нее. При застывании парафина поверхность блока стягивается, и в нем образуется кратерообразное углубление. Это нужно учитывать при заливке кусочков и в дальнейшей работе с блоками. Парафин должен на 3-4 мм выступать над поверхностью блока, если предстоит монтировать его на деревянную колодку. Возможны также заливка блока большим количеством парафина и резка без использования деревянных колодок, с успехом применяемая даже на санном микротоме.

В большинстве руководств рекомендуют после подравнивания и удаления лишнего парафина наклеивать блоки на деревянные бруски с помощью подогретого на спиртовке металлического шпателя или скальпеля. Затем для обеспечения более прочного приклеивания основания блок оплавливают с четырех боковых сторон тем же горячим шпателем или скальпелем.

Оборудование

1. Монитор Samsung Sync Master 740n
2. Клавиатура Chicony KB-9810
3. Компьютерная мышь Logitech M-BT58
4. Видеомагнитофон Panasonic NV-MV21
5. Усилитель звука BENRINGER UB1204-PRO
6. Проектор DLP Texas Instruments
7. Сист.блок iStar TOP/iC-1700/20Gb/128Mb/DDR/GeForce 2MX-400 32Mb/CD-ROM 52XIC-Net Pro 200

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жаров А. В. Патологическая анатомия животных. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2013. – 620 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1450-5
2. Жаров А. В. Судебная ветеринарная медицина. Учебник. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2014. – 464 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1581-6
3. Латыпов Д.Г., Залялов И.Н. Вскрытие и патологоанатомическая диагностика болезней животных. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2015. – 384 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1976-0
4. Салимов В.А. Практикум по патологической анатомии животных: Учебное пособие. 2-е изд., перераб. – СПб.: Лань, 2013. - 256 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN 978-5-8114-1418-5
5. Дудка, И.А. Методы экспериментальной микологии / И. А. Дудка, С.П. Вассер, И. А. Элланская [и др.] // Справочник. – Киев, 1982. – С. 402 – 405.
6. Лилли, Р., Патогистологическая техника и практическая гистология / Р.Лилли; пер. с англ.; под ред. и с предисловием чл.-корр. АМН В.В. Португалова.-М.:Мир, 1969.-512с.
7. Меркулов, Г. А. Курс патогистологической техники / Г. А. Меркулов. – Л.: Медицина, 1969. – 423 с.
8. Пирс, Э. Гистохимия. / Э. Пирс. – М., 1962.- С. 751-754.

ТЕМА 4. ЗАЛИВКА ТКАНИ В ЦЕЛЛОИДИН. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ СРЕЗОВ. ЗАТОЧКА МИКРОТОМНЫХ НОЖЕЙ

Цель: сформировать понятие и изучить заливку ткани в целлоидин, приготовление гистологических срезов и заточку микротомных ножей.

4.1 Заливка ткани в целлоидин

Целлоидин - хорошо растворяющаяся в эфире нитроклетчатка. В гистологической практике применяют 2 %, 4 % и 8 % растворы целлоидина, которые готовят из целлоидиновых пластин или отмытой от эмульсии и высушенной рентгеновской пленки.

Для приготовления 500 мл 2 % раствора целлоидина 10 г сухого целлоидина заливают 250 мл 100 % спирта и оставляют на 1сут, затем добавляют 250 мл безводного эфира, который растворяет набухший в спирте целлоидин. Для приготовления 4 % и 8 % растворов количество целлоидина увеличивают соответственно в 2 и 4 раза. Растворы хранят в плотно закрытой посуде.

Заливка ткани в целлоидин стала в настоящее время менее популярной, чем парафиновая, и ее применяют главным образом:

1. для обработки труднорежущихся тканей и объектов больших размеров, с которых трудно получить хорошие парафиновые срезы,
2. когда необходимо избежать воздействия на исследуемый материал высоких температур,
3. заливка материалов в целлоидин позволяет получить лучшие результаты при наличии в объектах больших полостей, лакун и слоев различной консистенции.

Эфир и сухой целлоидин огнеопасны, поэтому при работе с ними необходима осторожность.

Обезвоженный материал помещают в смесь 100 % спирта с эфиром (1:1) на 4-6 ч, переносят в 2 % раствор целлоидина на 2-3 дня, затем в 4 % и 8 % растворы на 5-7 дней в каждый. Пропитанный кусочек заливают свежим 8 % целлоидином и уплотняют в парах хлороформа (в эксикаторе). Уплотненный таким образом материал заливают 70 % спиртом для хранения. Вырезанные блоки наклеивают густым целлоидином на деревянные колодки на 1сут перед резкой.

4.2 Приготовление гистологических срезов

(Микроскопическая техника: Руководство / Под редакцией Д.С.Саркисова и Ю.Л.Перова. - М.: Медицина, 1996. ISBN 5-225-02-820-9).

Для получения гистологических срезов применяют специальные **микротомные ножи**, различающиеся по форме, длине и углу сечения лезвия. По форме они представляют собой сложный стальной клин, у которого режущий край имеет дополнительную клиновидную заточку. Длина ножа может составлять от 8 до 50 см.

По конфигурации лезвия различают три группы микротомных ножей: А, В и С. У микротомных ножей, относящихся к группе А, одна поверхность ровная, а другая вогнутая (их называют плоско-вогнутыми с большой кривизной вогнутой поверхности). Эти ножи чаще всего изготовлены из мягкой или относительно мягкой стали и предназначены для резки объектов, залитых в целлоидин.

Ножи, относящиеся к группе В, называются плоско-вогнутыми, но кривизна вогнутой поверхности у них значительно меньше, чем у ножей группы А. Они изготовлены из более твердой стали, используют их для приготовления целлоидиновых и целлоидин-парафиновых срезов.

У ножей, относящихся к группе С, обе поверхности клинка плоские. Их изготавливают из твердой стали и применяют для резки объектов, залитых в парафин, а также для получения срезов на замораживающем микротоме.

Кроме того, для приготовления парафиновых и полутонких срезов на микротоме и ультратоме используют металлические магнитные лезвия и стеклянные ножи. Металлическое магнитное лезвие (одноразовый нож) позволяет получить срезы с 50-60 парафиновых блоков, затем лезвие меняют.

4.3 Заточка микротомных ножей

Получить качественные гистологические срезы при целлоидиновой, целлоидин-парафиновой и парафиновой заливке материала можно с помощью микротомного ножа, толщина лезвия которого должна быть от 3 до 5 мкм. Для работы на замораживающем микротоме необходимо иметь острый нож без зазубрин на лезвии. Нож необходимо своевременно точить, а перед каждой резкой объектов править.

Микротомные ножи затачивают с помощью специальных аппаратов, например «Sakura» (Япония). Однако до сих пор не потеряла актуальности и применяется во многих лабораториях ручная заточка ножей. Вручную микротомные ножи точат на камне, имеющем форму бруска. Желтый, так называемый бельгийский камень используют для заточки первым, затем продолжают заточку на белом камне (арканзасе), который имеет более мелкую зернистость. Можно использовать природный аспидный камень, который также имеет крупнозернистую и мелкозернистую поверхность.

Перед заточкой на поверхность камня наносят машинное масло или керосин, глицерин, разведенный 70 % спиртом (1:1), мыльную воду. На спинку ножа надевают специальный обушок (желательно постоянно используемый для заточки одних и тех же ножей - это определяет угол заточки), а в стержень или отверстие в торцевой части ножа вкручивают ручку. Затем нож кладут обушком на камень, по которому скользит и лезвие под действием собственной тяжести. Нож проводят по камню с одного конца на другой, а затем, поворачивая через обушок, осуществляют движение в обратном направлении.

Продолжительность процесса зависит от квалификации лаборанта и состояния режущей кромки ножа. В среднем она составляет от 30 мин до 1 ч. Периодически контролируют качество заточки, осторожно укладывая нож на предметный столик микроскопа и перемещая его так, чтобы режущая кромка проходила через поле зрения при малом увеличении. Затем нож правят на широком ремне, натянутом на деревянную колодку. Правку проводят так же, как и заточку (через обушок).

Оборудование

1. Монитор Samsung Sync Master 740n
2. Клавиатура Chicony KB-9810
3. Компьютерная мышь Logitech M-BT58
4. Видеомагнитофон Panasonic NV-MV21
5. Усилитель звука BENRINGER UB1204-PRO
6. Проектор DLP Texas Instruments
7. Сист.блок iStar TOP/iC-1700/20Gb/128Mb/DDR/GeForce 2MX-400 32Mb/CD-ROM 52XIC-Net Pro 200

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жаров А. В. Патологическая анатомия животных. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2013. – 620 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1450-5

2. Жаров А. В. Судебная ветеринарная медицина. Учебник. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2014. – 464 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1581-6
3. Латыпов Д.Г., Залялов И.Н. Вскрытие и патологоанатомическая диагностика болезней животных. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2015. – 384 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1976-0
4. Салимов В.А. Практикум по патологической анатомии животных: Учебное пособие. 2-е изд., перераб. – СПб.: Лань, 2013. - 256 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN 978-5-8114-1418-5
5. Дудка, И.А. Методы экспериментальной микологии / И. А. Дудка, С.П. Вассер, И. А. Элланская [и др.] // Справочник. – Киев, 1982. – С. 402 – 405.
6. Лилли, Р., Патогистологическая техника и практическая гистология / Р.Лилли; пер. с англ.; под ред. и с предисловием чл.-корр. АМН В.В. Португалова.-М.:Мир, 1969.-512с.
7. Меркулов, Г. А. Курс патологистологической техники / Г. А. Меркулов. – Л.: Медицина, 1969. – 423 с.
8. Пирс, Э. Гистохимия. / Э. Пирс. – М., 1962.- С. 751-754.

ТЕМА 5. МИКРОТОМЫ И ОСОБЕННОСТИ РАБОТЫ НА НИХ. РЕЗАНИЕ ПАРАФИНОВЫХ БЛОКОВ НА САННОМ МИКРОТОМЕ. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ЦЕЛЛОИДИНОВЫХ СРЕЗОВ

Цель: сформировать понятие и изучить микротомы и особенности работы на них, резание парафиновых блоков на санном микротоме и приготовление целлоидиновых срезов.

5.1 Микротомы и особенности работы на них

Микротомы - это приборы, с помощью которых получают срезы тканей, залитых в различные среды, а также замороженных и нефиксированных. Микротомы позволяют получать гистологические срезы различной толщины. По принципу действия различают санные, ротационные, замораживающие микротомы, а также криостаты и вибраторы.

Санные микротомы характеризуются горизонтальным движением ножа и вертикальным подъемом блокодержателя. Их с успехом используют для резки объектов, залитых в целлоидин, целлоидин-парафин и парафин. Основные части микротомы располагаются на специальных салазках, отсюда происходит его название. Принцип работы санного микротомы заключается в том, что при обратном ходе ножа ножовые салазки толкают стержень со шкалой регулятора подачи, вызывая его перемещение. Движение стержня передается на тягу, которая с помощью «собачки» поворачивает храповик. Вращение храповика передается микровинту, который с помощью разъемной гайки перемещает салазки с блоком вверх. С каждым срезом блок поднимается все выше на расстояние, соответствующее толщине среза. После того как блокодержатель достигнет высшей точки, с помощью разъемной гайки надо опустить салазки с механизмом в крайнее нижнее положение. Существуют другие разновидности санных микротомов с различными вариантами способов подачи, зажимов для ножей и т.д.

Ротационные микротомы предназначены для резки парафиновых блоков, с их помощью можно получать серийные срезы. Важнейшая часть ротационного микротомы - механизм микроподачи, который включает в себя храповик, дифференциальный механизм, микровинт, лимб, косозубую передачу и кулачок. Приводной механизм при повороте вала с помощью «собачки» поворачивает на заданное количество зубьев

храповик, на оси которого находится зубчатое колесо, передающее через шестерню вращение микровинту. Винт перемещает каретку подачи объектодержателя. Толщина срезов устанавливается поворотом лимба.

Объектодержатель ротационного микротомы - винтовой зажим, вмонтированный в шаровую оправу каретки подачи. Шарнирный механизм позволяет подать блок под любым углом. Объектодержатель фиксируется в зажиме специальной рукояткой.

Держатель для ножа - массивная подставка с двумя вертикальными стойками, в которые вмонтированы двигающиеся держатели, приспособленные для установки ножа под нужным углом. Фиксация ножа осуществляется винтами. В переднем направлении нож перемещается по специальным направляющим с помощью винта. Постепенно приближая нож к объекту и одновременно поворачивая колесо подачи, подравнивают площадь резания, а затем нож фиксируют.

Ротационные микротомы снабжены специальной транспортной лентой, на которую с ножа попадает полоска (серия) срезов. На ленте их разделяют препаративными иглами и производят дальнейшие манипуляции. Снимать срезы с ножа ротационного микротомы можно кисточкой или препаративной иглой.

Замораживающие микротомы используют для резки не залитых, но фиксированных объектов, материала, залитого в желатин и водорастворимые пластмассы. Особенно широко применяются замораживающие микротомы для изготовления препаратов при исследовании материала срочных биопсий. По своей конструкции замораживающие микротомы относятся к микротомам санного типа, но в их устройстве есть некоторые особенности. Станина имеет приспособление для крепления к столу. Нож устанавливают под нужным углом в подвижной ручке с помощью одного или двух зажимов. Автоматическая подача осуществляется при каждом размахе ручки с ножом через систему рычагов. Замораживающий столик снабжен приспособлением для подачи углекислоты или охлаждается термоэлектрически с помощью полупроводниковых элементов.

Криостаты, вибраторы. С развитием гистохимии ферментов и иммуноморфологии возникла необходимость в обработке нефиксированного материала, которая была реализована с помощью специальных приборов - криостатов. Позднее появились криокиты и вибраторы.

Криостат - специализированная холодильная камера с установленным в ней микротомом, в которой имеются отверстия для рук, люминесцентная лампа и смотровое стекло. Надежная изоляция позволяет поддерживать в криостате температуру от -5 до -25 °С. Отрицательными моментами при работе с криостатом являются значительное переохлаждение рук оператора, недостаточная освещенность рабочего поля, а также невозможность ориентировать объект относительно кромки ножа. Эти недостатки практически устранены в криокитах зарубежного производства, управление которыми вынесено за пределы морозильной камеры. В них можно отдельно регулировать температуру объекта и ножа. Через 3-5 мин после включения прибора достигается низкая температура, причем охлаждение возможно до -65 °С, что предотвращает образование кристаллов в тканях.

Уход за микротомами и микротомными ножами. Все скользящие поверхности микротомов должны быть чистыми и смазаны тонким слоем машинного или вазелинового масла. При постоянной работе на микротоме все скользящие поверхности необходимо один раз в неделю протирать тряпочкой, смоченной бензином или толуолом, и смазывать. После окончания работы на микротоме объектодержатель и станину очищают от остатков парафина, предварительно вынув микротомный нож и

убрав его в футляр. Микротомные ножи никогда не оставляют в микротоме или на рабочем столе! Замораживающие микротомы и криостаты через 30 мин после выключения вытирают насухо и винтовую подачу смазывают вазелиновым маслом.

5.2 Резание парафиновых блоков на санном микротоме

Парафиновый блок, наклеенный на деревянную колодку или без нее (с большим слоем парафина), зажимают в объектодержатель. Установив нужный угол наклона ножа (оптимальный 13-15°) в зависимости от плотности ткани, медленно подводят нож к блоку, регулируют его высоту до соприкосновения с ножом. Сначала выравнивают поверхность блока, установив микрометрическую шкалу на получение толстых (20-25 мкм) срезов, затем шкалу переводят на б -8 мкм и приступают к резанию материала. Как правило, нож располагается перпендикулярно, но возможно также получение срезов (особенно с более плотных объектов) ножом, который установлен под углом к станине микротоме.

Срезы с блока осторожно снимают с помощью сухой или смоченной в спирте кисточки, используют также изогнутую препаровальную иглу или скальпель. Срезы обычно переносят в коробку, дно которой выстлано бумагой черного цвета, и укладывают матовой стороной вверх. После получения нужного количества срезов рядом с ними кладут блок или этикетку с номером. Удобнее сразу обработать 20-30 блоков, а затем приступить к монтированию срезов на предметные стекла.

Часто срезы наклеивают на предметное стекло непосредственно с ножа. Для этого их переносят в склянку с теплой (35-40 °С) дистиллированной или кипяченой водой, а затем вылавливают на предметные стекла, которые предварительно обезжиривают и натирают белком с глицерином. Срезы приклеивают на предметное стекло блестящей, обращенной к ножу стороной. Небольшие складочки на срезе можно расправить, осторожно дотрагиваясь до них углом согнутой препаровальной иглы.

Можно расправлять срезы непосредственно на стекле с помощью специального приспособления для сушки и расправления парафиновых срезов. Для этого на предметное стекло пипеткой наносят каплю воды и в нее опускают срез. Стекло со срезом помещают на нагреваемый столик прибора, где срез постепенно расправляется. После удаления избытка воды пипеткой или фильтровальной бумагой стекло со срезом подсушивают и одновременно срез плотно фиксируется на предметном стекле. На нагреваемом столике прибора помещается одновременно 45 предметных стекол, при его использовании не требуется дальнейшего просушивания стекол со срезами в термостате. Имеются специальные импортные ванночки для расправления срезов и переноса их на стекло. В них постоянно поддерживается оптимальная температура воды 38 °С.

Продолжительность просушивания срезов в термостате при 37 °С 6-12 ч. В случае необходимости проведения срочной окраски срезы можно поместить на 10-15 мин в термостат при 56 °С до начала плавления парафина, что способствует лучшей фиксации среза на предметном стекле. Однако при этом несколько затрудняется депарафинирование: требуется применение дополнительной порции ксилола и увеличение продолжительности депарафинирования.

Существует сухой способ приклеивания срезов к стеклу, который пригоден только для срезов отличного качества. На предметное стекло, смазанное тонким слоем белка с глицерином, помещают срез, аккуратно расправляют его препаровальной иглой или скальпелем и слегка подогревают на спиртовке или нагреваемом столике.

5.3 Приготовление целлоидиновых срезов

Для приготовления целлоидиновых срезов используют ножи типа А и Б. Целлоидиновые блоки закрепляют так же, как и парафиновые. После установки ножа в микротом к нему пододвигают объектодержатель с укрепленным в нем блоком. Выравнивают поверхность блока до тех пор, пока полностью не обнажится ткань кусочка, а затем приступают к приготовлению срезов желаемой толщины. Во время резания нож и объект обильно смачивают 70 % или 80 % спиртом, пользуясь кисточкой. Нож по салазкам микротома ведут плавно, без давления. Полученный срез расправляют на ноже с помощью кисточки, после чего срез снимают с ножа на подушечку указательного пальца, подложенного под нож. Срезы кладут в склянки с 70 % спиртом.

Оборудование

1. Монитор Samsung Sync Master 740n
2. Клавиатура Chicony KB-9810
3. Компьютерная мышь Logitech M-BT58
4. Видеомагнитофон Panasonic NV-MV21
5. Усилитель звука BENRINGER UB1204-PRO
6. Проектор DLP Texas Instruments
7. Сист.блок iStar TOP/iC-1700/20Gb/128Mb/DDR/GeForce 2MX-400 32Mb/CD-ROM 52XIC-Net Pro 200

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жаров А. В. Патологическая анатомия животных. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2013. – 620 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1450-5
2. Жаров А. В. Судебная ветеринарная медицина. Учебник. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2014. – 464 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1581-6
3. Латыпов Д.Г., Залялов И.Н. Вскрытие и патологоанатомическая диагностика болезней животных. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2015. – 384 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1976-0
4. Салимов В.А. Практикум по патологической анатомии животных: Учебное пособие. 2-е изд., перераб. – СПб.: Лань, 2013. – 256 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN 978-5-8114-1418-5
5. Дудка, И.А. Методы экспериментальной микологии / И. А. Дудка, С.П. Вассер, И. А. Элланская [и др.] // Справочник. – Киев, 1982. – С. 402 – 405.
6. Лилли, Р., Патогистологическая техника и практическая гистология / Р.Лилли; пер. с англ.; под ред. и с предисловием чл.-корр. АМН В.В. Португалова.-М.:Мир, 1969.-512с.
7. Меркулов, Г. А. Курс патологистологической техники / Г. А. Меркулов. – Л.: Медицина, 1969. – 423 с.
8. Пирс, Э. Гистохимия. / Э. Пирс. – М., 1962.- С. 751-754.

ТЕМА 6. ПОДГОТОВКА ПРЕДМЕТНЫХ СТЕКОЛ. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ И МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ТЕХНИКЕ ОКРАШИВАНИЯ

Цель: сформировать понятие и изучить подготовку предметных стекол, общие принципы и методы окрашивания гистологических препаратов, замечания по технике окрашивания.

6.1 Подготовка предметных стекол

Предметные стекла, применяемые для получения гистологических препаратов, необходимо предварительно подготовить. Исключение составляют готовые к использованию и специально упакованные импортные предметные стекла.

Предметные стекла моют в теплой мыльной воде или кипятят в 2-3 % растворе гидрокарбоната натрия, затем ополаскивают горячей водой и промывают в течение нескольких часов в проточной воде. Вымытые стекла протирают чистой хлопчатобумажной тканью и на несколько дней помещают в смесь Никифорова: 96 % спирт и эфир (1:1). Обезжиренные стекла извлекают пинцетом из этой смеси, протирают чистой тканью и складывают в коробочку.

Для обезжиривания предметных стекол используют также хромовую смесь, в состав которой входят 100г бихромата калия, концентрированной серной кислоты и 1000 мл горячей воды. Бихромат калия растворяют сначала в горячей воде, затем раствор охлаждают и после этого по стеклянной палочке осторожно по каплям добавляют серную кислоту. Стекла выдерживают в хромовой смеси 2-3 дня, а затем тщательно промывают в проточной воде в течение 1-2 дней.

Предметные стекла также хорошо обезжириваются в крепком растворе соляной кислоты. Через несколько суток их промывают проточной водой и высушивают.

Качество обезжиривания можно проверить, капнув на предметное стекло воду из пипетки: по обезжиренному стеклу вода растекается тонким слоем, а не собирается в каплю.

Для лучшей фиксации срезов на стекле его предварительно смазывают смесью белка с глицерином. Свежий яичный белок взбивают и фильтруют через крупнопористый фильтр, смоченный дистиллированной водой, затем размешивают с равным объемом глицерина и добавляют несколько кристаллов тимола. Смесь хранится в течение нескольких месяцев. Применяют также смесь, в состав которой входят 15 мл сыворотки крови, 5 мл дистиллированной воды и 6 мл 5 % формалина. После фильтрации смесь готова к нанесению на предметные стекла. Ее использование дает лучшие результаты, чем применение яичного белка, так как при окрашивании не образуется фон.

Разработан способ фиксации среза к предметному стеклу без предварительного натирания последнего белком с глицерином. В ванночку с теплой дистиллированной водой капают несколько капель жидкого казеинового клея и перемешивают. В полученную мутноватую жидкость опускают срезы, расправляют препаративной иглой и вылавливают на чистое обезжиренное стекло. Этот способ дает неизменно хороший эффект и вокруг среза отсутствует окрашенный фон, как это часто бывает при применении белка.

6.2 Общие принципы и методы окрашивания гистологических препаратов

В основе окрашивания клеток и тканей лежат физико-химические процессы (диффузия, адсорбция, абсорбция, растворимость и др.), происходящие как в красителе, так и в микроструктурах. Большое значение имеют плотность ткани и дисперсность красителя, которые определяют последовательность и скорость окрашивания.

Целью окрашивания является более отчетливое выявление различных компонентов клеток и тканей. Некоторые красители обеспечивают этот эффект, растворяясь в выявляемых компонентах, например нейтральных жирах. Другие красители вызывают химическую реакцию, например выявление железа с образованием берлинской лазури в кислой среде. Во многих случаях процесс окрашивания возможен только при наличии протравы, например гематоксилин окрашивает ткань в присутствии солей металлов.

В гистологической практике применяют основные, кислотные и нейтральные красители.

Основные, или ядерные, красители - это основания или их соли, которые окрашивают структуры кислой природы (хроматин ядер, ядрышко и др.) и называются базофильными (гематоксилин, тионин, кармин, метиловый зеленый и др.).

Кислотные красители - это кислоты или их соли, с помощью которых выявляют вещества и структуры основной природы (цитоплазматические структуры клеток, эритроциты и т.д.). Таковыми являются эозин, кислый фуксин, конго красный (конгорот), эритрозин.

Нейтральные красители: судан III, судан IV, метиленовый синий.

Процесс гистологического окрашивания условно подразделяют на прогрессивный и регрессивный, прямой и непрямой, простой и сложный. При прогрессивном типе окрашивания процесс идет до тех пор, пока не достигается интенсивное проникновение красителя в ткань. Регрессивный тип основан на первоначальном переокрашивании структур с последующей дифференцировкой до нужного уровня. Если раствор красителя непосредственно действует на ткань, то говорят о прямом окрашивании. Окрашивание после предварительной подготовки ткани (протравливания) называется непрямым. Окрашивание одним красителем - простое, а при использовании нескольких красителей - сложное.

Предварительная подготовка срезов к окрашиванию.

Депарафинирование срезов.

Парафиновые или целлоидин-парафиновые срезы перед окрашиванием освобождают от парафина с помощью любого его растворителя - бензола, толуола, ксилола, бензина. Особенно тщательно удаляют парафин перед исследованием ткани в поляризационном микроскопе, так как парафин обладает двоякопреломляющим свойством. Депарафинирование осуществляют по следующей схеме,

Ксилол I.....	10-15 мин (можно в термостате при 37 °С)
Ксилол II.....	3 - 5 мин
Спирт 100 % I.....	1-2 мин
Спирт 100 % II.....	ополоснуть
Спирт 96 % I.....	ополоснуть
Спирт 96% II.....	ополоснуть
Дистиллированная вода.....	2 смены

После депарафинирования 100-150 препаратов реактивы нужно менять. Депарафинированные препараты готовы к окрашиванию сразу же после промывания в дистиллированной воде, но во избежание отклеивания срезов, особенно при окраске по Ван-Гизону, их лучше подсушить на воздухе. Если окрашивание производят не сразу, то депарафинированные и высушенные препараты аккуратно, чтобы не повредить срезы, складывают в коробки и окрашивают по мере необходимости.

6.3 Замечания по технике окрашивания.

При окраске водными красителями срезы переносят в краситель из дистиллированной воды, а при окраске спиртовыми - из соответствующего раствора спирта. После того как препарат приобретает интенсивную окраску, его промывают в воде или спирте для удаления избытка красителя (дифференцировка), контролируя этот процесс под микроскопом.

Срезы тканей после целлоидиновой и парафиновой заливки, а также полученные на замораживающем микротоме окрашивают в широкогорлых бюксах или на часовых стеклах. Одновременно окрашивают несколько срезов, но промывают, дифференцируют и т.д. каждый срез отдельно.

Препараты можно помещать в красящий раствор в специальных контейнерах, предназначенных для одновременного окрашивания большого количества стекол. Если препаратов немного, то рациональнее краситель наносить непосредственно на срез по каплям с помощью пипетки. Остатки красителя можно слить в склянку и использовать повторно. Д. Кисели (1962) предлагал накрывать при этом срезы стеклянным колпаком, а для увлажнения среды оставлять под колпаком смоченную водой вату.

Просветление и заключение срезов.

Одним из основных условий, определяющих пригодность гистологических препаратов к микроскопическому исследованию, является их прозрачность. Кроме того, препараты должны быть защищены от высыхания и загрязнения. Все это обеспечивается просветлением и заключением в специальные среды, которые можно подразделить на смешивающиеся с водой (глицерин, гуммиарабик, поливиниловый спирт, желатин) и не смешивающиеся с водой (ксилол, толуол, их смеси с фенолом, эфирные масла).

Смешивающиеся с водой просветляющие вещества одновременно являются средой для заключения и приготовления постоянных препаратов.

Заключение в среды, смешивающиеся с водой.

Из этих сред чаще применяют глицерин-желатин. Используют также чистый глицерин, однако этот метод не позволяет готовить постоянные препараты.

Р. Лилли рекомендует для этих целей гумми-сироп Апати:

чистый гуммиарабик.....50 г

сахар-рафинад.....50 г

дистиллированная вода.....50мл

Смесь растворяют на водяной бане при постоянном помешивании, затем добавляют 500 мг тимола. Используют также поливиниловый спирт.

Среды, смешивающиеся с водой (кроме глицерина), предварительно нагревают на водяной бане, капают нагретой стеклянной палочкой или пипеткой на расплавленное срез, слегка подсушивают и покрывают чистым и сухим покровным стеклом. Чистой стеклянной палочкой или обезжиренным пальцем слегка прижимают покровное стекло. При этом излишки среды выдавливаются и их аккуратно удаляют чистой тканью.

Для длительного хранения препаратов, чтобы избежать их высыхания, многие авторы рекомендуют окантовывать покровное стекло тонким слоем парафина или целлоидина. Однако опыт показывает, что заключенные в глицерин-желатин препараты и без окантовки хорошо сохраняются свыше 10 лет.

Просветление препаратов и заключение в среды, не смешивающиеся с водой

Срезы или наклеенные на стекло препараты тщательно обезвоживают в спиртах (70 %, 96 % и 100 %), а затем помещают в любые из просветляющих веществ. Установлено, что для разных исследований предпочтительнее то или иное просветляющее вещество. Так, при окраске по Нисслию и методу Грама - Вейгерта лучшим просветляющим и одновременно дифференцирующим средством является анилиновое масло, но для просветления препаратов при окраске по Ван-Гизону использование его недопустимо. Наиболее распространенными и индифферентными по отношению к красителям веществами являются толуол и ксилол, а также их смеси с фенолом (кристаллический фенол расплавляют в термостате при 56 °С и смешивают с ксилолом в пропорции 1:4 или 1:6).

Хорошо обезвоженные в спиртах и просветленные в карбол-ксилоле, а затем в чистом ксилоле препараты готовы к заключению в специальные смолы. С этой целью применяют смолы растительного происхождения - бальзамы (канадский, пихтовый и сибирский кедровый). Все они хорошо растворяются в толуоле и ксилоле.

Метод растворения: в склянку с сухой смолой заливают толуол, который постепенно растворяет верхние слои смолы. Процесс можно ускорить, если склянку поместить в термостат при 37 - 40 °С. Полученный густой раствор сливают в другую банку и добавляют новую порцию толуола, одновременно перемешивая раствор и доводя до консистенции жидкого меда. Слишком жидкий раствор по мере испарения толуола вновь загустевает. Приготовленный бальзам хранят в плотно, закрытой посуде.

В практической патоморфологии широко используют синтетическую пластмассу - полистирол. Способ применения этого пластического материала предложен Д.С. Саркисовым и подробно изложен в руководстве Г.А.Меркулова «Курс патологистологической техники» (1969). Полистирол хорошо растворяется в ксилоле и толуоле, прозрачен и быстро затвердевает под предметным стеклом, образуя тончайшую пленку. Метод растворения тот же, что и для смол растительного происхождения. Однако со временем полистирол становится хрупким, в пленке появляются трещины, что затрудняет микроскопическое исследование и совершенно неприемлемо для микросъемки. Для предотвращения этих недостатков в 30 % раствор полистирола в ксилоле добавляют пластификатор, придающий пленке эластичность и гибкость, устраняя все недостатки полистирола. В настоящее время в качестве пластификатора используют дибутилфталат, широко применяемый в электронной микроскопии. Существует несколько вариантов приготовления полистирола для заключения препаратов:

- 1) 94 мл 30 % раствора полистирола в ксилоле смешивают с 6 мл дибутилфталата;
- 2) смесь, состоящую из 100 г полистирола, 100 мл ксилола и 12 мл дибутилфталата, растворяют при 22 °С или в термостате при 37 °С, периодически перемешивая.

Готовую синтетическую смолу хранят в плотно закрытой посуде. Технология заключения срезов та же, что и при применении водорастворимых сред.

Оборудование

1. Монитор Samsung Sync Master 740n
2. Клавиатура Chicony KB-9810
3. Компьютерная мышь Logitech M-BT58
4. Видеомагнитофон Panasonic NV-MV21
5. Усилитель звука BENRINGER UB1204-PRO
6. Проектор DLP Texas Instruments
7. Сист.блок iStar TOP/iC-1700/20Gb/128Mb/DDR/GeForce 2MX-400 32Mb/CD-ROM 52XIC-Net Pro 200

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жаров А. В. Патологическая анатомия животных. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2013. – 620 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1450-5
2. Жаров А. В. Судебная ветеринарная медицина. Учебник. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2014. – 464 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1581-6
3. Латыпов Д.Г., Залялов И.Н. Вскрытие и патологоанатомическая диагностика болезней животных. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2015. – 384 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1976-0
4. Салимов В.А. Практикум по патологической анатомии животных: Учебное пособие. 2-е изд., перераб. – СПб.: Лань, 2013. – 256 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN 978-5-8114-1418-5
5. Дудка, И.А. Методы экспериментальной микологии / И. А. Дудка, С.П. Вассер, И. А. Элланская [и др.] // Справочник. – Киев, 1982. – С. 402 – 405.

6. Лилли, Р., Патогистологическая техника и практическая гистология / Р.Лилли; пер. с англ.; под ред. и с предисловием чл.-корр. АМН В.В. Португалова.-М.:Мир, 1969.-512с.
7. Меркулов, Г. А. Курс патологистологической техники / Г. А. Меркулов. – Л.: Медицина, 1969. – 423 с.
8. Пирс, Э. Гистохимия. / Э. Пирс. – М., 1962.- С. 751-754.

ТЕМА 7. ЯДЕРНЫЕ КРАСИТЕЛИ И ИХ ПРИГОТОВЛЕНИЕ. ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ КРАСИТЕЛИ. ОКРАСКА ГЕМАТОКСИЛИНОМ – ЭОЗИНОМ

Цель: сформировать понятие и изучить ядерные красители и их приготовление, цитоплазматические красители и окраску гематоксилином – эозином.

7.1 Ядерные красители и их приготовление

Окрашивание ядер клеток обусловлено двумя механизмами химического взаимодействия: 1) основные красители, например анилиновые, образуют соли в присутствии ДНК и РНК; 2) образуются комплексы с ионами металлов при применении протравы. В практической работе чаще используют протравные красители. К ним относятся гематоксилин, кармин, сафранин, галлоцианин, ализарин. Хорошо окрашивают ядра такие красители, как янус зеленый, основной коричневый, оксазиновые красители (крезиловый фиолетовый, нильский голубой), тианин, азуры, метиленовый синий, основной фуксин, метиловый зеленый и др. Следует упомянуть о хороших результатах окраски ядер соком черники, которая предложена М.Д. Лавдовским еще в 1887 г.

Гематоксилин и способы его приготовления.

Гематоксилин имеет растительное происхождение: его получают из эфирного экстракта кампешевого дерева. Гематоксилин хорошо растворяется в спирте и плохо в воде. Красящими свойствами обладает продукт окисления гематоксилина - гематеин, поэтому краситель становится пригодным только после созревания - окисления, на которое требуется от 10 дней до 2 - 3 нед. Созревание можно ускорить с помощью солей алюминия, хрома, железа и др.

Гематоксилин Эрлиха

Гематоксилин кристаллический.....	2гр
спирт96%.....	100мл
Дистиллированная вода.....	100мл
Глицерин.....	100мл
Алюмокалиевые или алюмоаммонийные квасцы.....	3г
Ледяная уксусная кислота.....	10мл

Гематоксилин растворяют в спирте, а квасцы - в дистиллированной воде, смешивают оба раствора и затем добавляют остальные компоненты. Раствор периодически перемешивают. Через 10-14 дней он приобретает темно-вишневый цвет, что свидетельствует о готовности красителя. Продолжительность окрашивания гематоксилином Эрлиха 4 - 6 мин. Затем следуют Промывание в дистиллированной, потом в водопроводной воде, Дифференцировка в 1 % солянокислом спирте, восстановление в аммиачной воде и окончательное промывание в дистиллированной воде.

Для приготовления солянокислого спирта к 100 мл 70 % спирта добавляют 1 мл концентрированной соляной кислоты; для приготовления аммиачной воды к 50 мл дистиллированной воды добавляют 2 капли крепкого аммиака.

Результат: ядра клеток (оболочка, хроматин) темно-синие, ядерный матрикс бледно-голубой или прозрачный.

Гематоксилин Гарриса

Гематоксилин
кристаллический.....5мг

Раствор I

Спирт 96 %..... 50мл

Алюмоаммонийные квасцы..... 100г

Раствор II

Дистиллированная вода..... 1000мл

Смешивают растворы I и II, затем добавляют 60 мл глицерина и 2,5г оксида ртути (красной или желтой). Раствор нагревают до 100 °С, остужают, фильтруют. Перед использованием к 100 мл раствора добавляют 2 мл ледяной уксусной кислоты. Преимуществами гематоксилина Гарриса являются быстрота приготовления и четкость окраски ядер.

Продолжительность окрашивания 3 - 4 мин. Затем следуют промывание и дифференцировка, восстановление в аммиачной воде и окончательное промывание в дистиллированной воде.

Результат: ядра ярко-синие.

Гематоксилин Маллори (водный).

Гематоксилин кристаллический.....2,5г
Алюмоаммонийные квасцы.....50г

Дистиллированная вода.....1000мл

Раствор выдерживают 10 сут при 25 °С, добавляют 440 мг перманганата калия и 2,5г тимола. Перемешивают несколько раз, перед окрашиванием фильтруют.

Продолжительность окрашивания 3 - 4 мин. Затем следуют те же процедуры, что и при окрашивании гематоксилином других модификаций.

Результат: ядра синие.

Сок черники

Свежие чистые ягоды черники разминают в фарфоровой ступке, смешивают с равным объемом 96 % спирта, настаивают 1 - 2 суток и фильтруют. Перед окрашиванием часть раствора разводят равным количеством 2 % водного раствора алюмокалиевых квасцов и добавляют 2 - 3 кристаллика тимола.

Продолжительность окрашивания 5 - 7 мин. Затем следуют промывание в дистиллированной воде, дифференцировка в солянокислом спирте, промывание в дистиллированной воде, обезвоживание, просветление и заключение.

Результат: ядра темно-фиолетовые.

7.2 Цитоплазматические красители

Окрашивание цитоплазмы клеток происходит в результате связывания оснований и белков кислотными красителями. В группу диффузных (кислых) красителей входят карбоновые и сульфоновые кислоты, нитро-, азокрасители и др. В гистологической практике постоянно применяют эозины, пикриновую кислоту, оранжевый Г, кислый фуксин, конго красный (конгорот), азокармин, эритрозин. Чаще используют 1 % водные растворы этих красителей, но можно применять и 1 % спиртовой раствор. Продолжительность окрашивания колеблется от 5 с до 3-5 мин в зависимости от сорта и серии красителя. Если препарат переокрашивается, то излишек краски легко удаляется

при ополаскивании в дистиллированной воде и последующем обезвоживании препарата или среза в спиртах.

7.3 Окраска гематоксилином - эозином

Окраска гематоксилин-эозином - наиболее распространённый метод окрашивания срезов. Этот метод позволяет установить отношения между частями органа, отлично выявляя все клеточные элементы и некоторые неклеточные структуры. Практически во всех случаях независимо от поставленной задачи применяется окраска гематоксилин-эозином. В большинстве случаев для изучения структуры нормального или измененного в результате болезни органа ограничиваются этим методом окраски. В других случаях, когда перед исследователем стоит специальная задача, пользуются особыми методами, окрашивая в то же время параллельно ряд срезов гематоксилин-эозином.

Эта окраска является двойной: гематоксилин - основной краситель - окрашивает ядра клеток, эозин - кислый краситель - красит протоплазму клеток и в меньшей степени - различные неклеточные структуры.

Гематоксилин представляет собой экстракт древесины кампешевого дерева, произрастающего в Америке. Эозин - искусственная краска. Растворы красителей должны быть приготовлены заранее. Гематоксилин сам по себе не является красящим веществом. Для того чтобы приготовить краску, гематоксилин подвергают окислению, в результате чего он превращается в красящее вещество - гематеин. В соединении с некоторыми солями гематеин дает четкое окрашивание ядер (используют гематоксилин Эрлиха, Майера, железный гематоксилин Гейденгайна).

Эозин - протоплазматический краситель; используется он в виде спиртовых или, гораздо чаще, водных растворов. Для приготовления эозина 0,1 г краски растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Подготовка срезов к окраске заключается в их кратковременной обработке спиртом. Поскольку при заливке в парафин или целлоидин материал обезвоживается в спиртах, срезы, полученные при этих способах заливки, в особой подготовке для окраски гематоксилин-эозином не нуждаются. Обрабатывать необходимо замороженные срезы. При этом происходит их обезжиривание и другие изменения в структуре, что значительно улучшает окрашивание гематоксилин-эозином. Срезы обрабатывают в 96° спирте не более 3-5 минут. Из спирта срезы переносят обратно в дистиллированную воду. Окраску производят сначала гематоксилином.

Порядок проведения окраски:

Дистиллированная вода	ополоснуть
Раствор гематоксилина	1-20 мин
Солянокислый спирт	дифференцировка
Аммиачная вода	срезы синеют (контроль под микроскопом)
Проточная вода	5-10 мин
Дистиллированная вода	ополоснуть
Раствор эозина	10с-3 мин
Спирт 96%, карбол-ксилол, заключение	

Результат: ядра синие, цитоплазма и межклеточное вещество розовые.

расправляют на ноже с помощью кисточки, после чего срез снимают с ножа на подушечку указательного пальца, подложенного под нож. Срезы кладут в склянки с 70 % спиртом.

Оборудование

1. Монитор Samsung Sync Master 740n

2. Клавиатура Chicony KB-9810
3. Компьютерная мышь Logitech M-BT58
4. Видеомагнитофон Panasonic NV-MV21
5. Усилитель звука BENRINGER UB1204-PRO
6. Проектор DLP Texas Instruments
7. Сист.блок iStar TOP/iC-1700/20Gb/128Mb/DDR/GeForce 2MX-400 32Mb/CD-ROM 52XIC-Net Pro 200

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жаров А. В. Патологическая анатомия животных. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2013. – 620 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1450-5
2. Жаров А. В. Судебная ветеринарная медицина. Учебник. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2014. – 464 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1581-6
3. Латыпов Д.Г., Залялов И.Н. Вскрытие и патологоанатомическая диагностика болезней животных. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2015. – 384 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1976-0
4. Салимов В.А. Практикум по патологической анатомии животных: Учебное пособие. 2-е изд., перераб. – СПб.: Лань, 2013. - 256 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN 978-5-8114-1418-5
5. Дудка, И.А. Методы экспериментальной микологии / И. А. Дудка, С.П. Вассер, И. А. Элланская [и др.] // Справочник. – Киев, 1982. – С. 402 – 405.
6. Лилли, Р., Патогистологическая техника и практическая гистология / Р.Лилли; пер. с англ.; под ред. и с предисловием чл.-корр. АМН В.В. Португалова.-М.:Мир, 1969.-512с.
7. Меркулов, Г. А. Курс патологистологической техники / Г. А. Меркулов. – Л.: Медицина, 1969. – 423 с.
8. Пирс, Э. Гистохимия. / Э. Пирс. – М., 1962.- С. 751-754.

ТЕМА 8. ОКРАСКА ГОФП-МЕТОДОМ ОКРАСКА ПО ВАН – ГИЗОНУ. ОКРАСКА ПО ЛЕПЕНЕ

Цель: сформировать понятие и изучить методики окрасок ГОФП-методом, по Ван – Гизону и по Лепене.

8.1 Окраска ГОФП-методом (по Лили).

Обработка теоретического материала по данной окраске проводилась совместно с судебно-медицинским экспертом Ю.В. Григорьевой.

Статья по данной теме опубликована в сборнике научных трудов «Вопросы судебной медицины, медицинского права и биоэтики» под редакцией А.П.Ардашкина, В.В.Сергеева в 2007 году (с. 63-65).

Название метода окраски по ГОФП произошло от первых букв используемых красителей: гематоксилин - основной фуксин - пикриновая кислота. Под названием «фуксиноррагический метод» он был описан Lie и соавторами в 1971 году. В том же году Bouchardy В. и Majno G. предложили диагностировать ранние повреждения по так называемой «волнистости миокарда». В последующем работами Hoch - Ligeti С., Lan С.W. и Pesonen E. была доказана применимость обоих методов для обнаружения повреждений миокарда в секционном материале [1, 3, 4, 5, 6].

Сущность данного метода заключается в окрашивании основным фуксином саркоплазмы ишемизированных кардиомиоцитов в красно - коричневый цвет, в отличие от интактных желто-коричневого или бледно-зеленого цветов. При небольшом

промежутке времени от начала кислородного голодания миокарда очаги ишемического «повреждения» будут мелкими, затем сливающимися друг с другом, с течением времени и нарастанием ишемии миокарда - средней величины, крупными и обширными очагами фуксинофильной дегенерации миокарда.

В опубликованных работах показана эффективность ГОФП-метода для объективного выявления ишемических, как коронарогенного, так и некоронарогенного происхождения повреждений миокарда, а также возможность выявления фибрина и соединительнотканых структур (рубцовая ткань окрашивается в серо-сиреневый цвет, эластические волокна - в ярко-красный цвет). Эритроциты в большинстве наблюдений выглядят ярко-красными.

В руководстве «Гистологическая и микроскопическая техника» указывается на возможность выявления ГОФП-методом фуксинофильной дегенерации миокарда (морфологическое проявление наиболее ранних изменений в сердечной мышце). Сущность данных изменений заключается в том, что в поражённых кардиомиоцитах появляется фуксинофильный субстрат (вначале вблизи ядра, затем по всей цитоплазме и распространяется на большую часть мышечного волокна). Отмечено, что данные изменения наблюдаются лишь на начальных стадиях поражения миокарда, а когда мышечные волокна начинают дезинтегрироваться и рассасываться, фуксинофильный субстрат полностью исчезает. Авторами указано, что ГОФП - методом подкрашиваются кардиомиоциты, имеющие контрактурные повреждения и находящиеся в пересокращённом состоянии.

Целью работы ряда экспертов гистологического отделения Самарского ОБСМЭ (Т.Н.Разматова, Е.И.Филиппенкова, Ю.В.Григорьева, С.В.Ким, Е.А.Егорова, 2004-2006гг.) явились обобщение результатов применения окраски срезов миокарда ГОФП - методом и оценка его диагностических возможностей в судебно-медицинской практике. В основу обобщения положена экспертная практика применения данного метода. Всего за период 1993-2006г.г. этот метод применялся более чем в 13.000 случаев гистологических исследований в целях выявления очагов острого ишемического и метаболического «повреждения» кардиомиоцитов.

Секционный материал фиксировался в кислом 10% - ном растворе формалина. Кусочки миокарда заливали в парафин. Полученные срезы толщиной 5-10 мкм окрашивали гематоксилином - эозином и ГОФП-методом.

Приводим методику окраски ГОФП-методом по Lie с соавторами [1, 3].

Раствор А: алюмо-аммонийных квасцов 6г, гематоксилина 0,5г, жёлтой окиси ртути 0,25г, дистиллированной воды 70мл. Раствор кипятить 10 мин, охладить, добавить 30мл глицерина и 4мл ледяной уксусной кислоты.

Раствор В: 0,1% раствор основного фуксина в дистиллированной воде.

Раствор С: 0,1% раствор пикриновой кислоты в абсолютном ацетоне.

Все манипуляции проводятся при комнатной температуре. Раствор С и все промывные жидкости меняются после каждых 5-6 срезов.

Процедура окрашивания:

1. Депарафинирование, доведение до дистиллированной воды
2. Окрашивание раствором А 10с
3. Промывание в проточной воде 5мин
4. Окраска раствором В 3 мин
5. Ополаскивание в дистиллированной воде 5-10с
6. Ополаскивание в абсолютной ацетоне 5-10с

7. Раствор С 20с
8. Быстрое ополаскивание в абсолютном ацетоне 5-10с
9. Просветление в ксилоле и заключение в канадский бальзам

Результаты практического применения ГОФП - метода окраски позволили подтвердить и выявить следующие её особенности:

1. На ранних стадиях (до развития некроза) ишемического «повреждения» миокарда различного генеза, появившийся фуксинофильный субстрат в цитоплазме кардиомиоцитов окрашивается в красный цвет различных оттенков на фоне желто - зеленоватого или желто - коричневатого интактного миокарда.

2. ГОФП - методом «подкрашиваются» кардиомиоциты, имеющие контрактурные повреждения (при этом данные участки контрактур кардиомиоцитов имеют вид мелких очагов фуксинофилии, соседние участки релаксации кардиомиоцитов будут бледно - зелеными), что позволяет гистологически выявлять диагностически важные контрактуры кардиомиоцитов при ушибах сердца, воздействию на рефлексогенные зоны без проведения поляризационной микроскопии.

3. Результаты окраски по ГОФП миокарда в состоянии некроза являются недостоверными, так как при некрозе кардиомиоцитов фуксинофильный субстрат исчезает, наиболее вероятно ложноотрицательная окраска.

4. Окраска миокарда с аутолитическими и гнилостными изменениями часто дает ложноположительный результат, что, по нашему мнению, обусловлено изменением биохимического состава кардиомиоцитов.

5. Данным методом кроме очагов острого ишемического «повреждения» миокарда выявляются фибрин, рубцовая ткань и эластические волокна, что дает возможность проводить комплексную оценку состояния сердечной мышцы.

Наш опыт подтверждает простоту, доступность и эффективность ГОФП - метода окраски препаратов миокарда. Это позволяет рекомендовать его, но с вышеуказанными ограничениями, для применения в судебно-гистологической практике в целях выявления и доказательства ранних ишемических повреждений миокарда, а также для комплексной оценки состояния сердечной мышцы.

Окрашивание липидов и липоидов

Окрашивание жира и липоидов очень часто применяется в гистологической и патологоанатомической практике. Различные методики окраски позволяют не только обнаружить жиры и жироподобные вещества в клетках и тканях, но и судить о характере этих веществ.

Часто употребляют для этой цели судан III, IV, шарлах красный, нильблаусульфат и осмиевую кислоту.

Мы рассмотрим лишь окраску суданом III и красным шарлахом - как наиболее часто применяемые. Указанные красители выявляют все жиры и липоиды, нейтральные жиры интенсивно окрашиваются в оранжево-красный цвет.

Для выявления жиров требуется формалиновая фиксация; фиксировать нужно не более 48 часов. После промывки кусочки режут на замораживающем микротоме. Обычные методы заливки применять нельзя, так как эфир, ксилол и крепкие спирты, употребляемые при заливке, растворяют и извлекают жиры из изучаемых объектов.

Метод окраски суданом III и красным шарлахом основан на том, что эти краски хорошо растворяются в жирах. Из насыщенных спиртовых растворов судан III и шарлах

красный легко переходят в жир окрашиваемых тканей. Растворимость судана III и шарлаха красного в жирах гораздо выше, чем в спирте.

Окрашивание суданом III (О.В.Волкова, Ю.К.Елецкий, 1982). Является наиболее распространенным методом выявления жира.

Приготовление раствора красителя. В 100 мл горячего 70% спирта засыпают 0,2-0,3 г порошка судана III, несколько раз взбалтывают и ставят в термостат (при 58°C) на несколько часов, затем охлаждают и фильтруют.

Метод:

1. Замороженные срезы (из свежей или фиксированной в формалине ткани) на несколько минут переносят из воды в 50% спирт.
2. Помещают в спиртовой раствор красителя на 15-30 мин (при применении щелочного раствора судана III - на 5 минут).
3. Быстро ополаскивают в 50% спирте.
4. Промывают в дистиллированной воде.
5. Подкрашивают ядра кислым гемалауном или гематоксилином Эрлиха.
6. Промывают и заключают в желатин или глицерин-желатин

Результат: жировые вещества интенсивно оранжево-красного цвета, ядра - синие.

Окраску срезов раствором Судана III следует проводить в бюксе с закрытой крышкой. В противном случае спирт испаряется, и из насыщенного раствора судан III выпадает в виде осадка, который остается в препарате.

Шарлах красный для окраски жира употребляют точно в той же пропорции и вполне аналогичным способом, что и судан III.

Окраска шарлахом красным (О.В.Волкова, Ю.К.Елецкий, 1982).

Красители: в смесь из 50мл ацетона и 50 мл 70% спирта засыпают 0,2-0,3 г шарлаха. Хорошо закрывают и взбалтывают. Полученный раствор перед употреблением фильтруют.

Метод:

1. Замороженные срезы из свежей или фиксированной в формалине ткани помещают в 50% спирт на 2-4 мин.
2. Окрашивают в растворе красителя 2-3 мин.
3. Быстро ополаскивают в 70% спирте.
4. Промывают в воде.
5. Подкрашивают ядра кислым гемалауном или гематоксилином Эрлиха.
6. Промывают в воде и заключают в глицерин или глицерин-желатин.

Результат. Жировые вещества оранжево-красные, ядра - синие.

Окраска жира Суданом III и шарлахом красным довольно быстро выцветает, поэтому желательно исследовать препараты вскоре после их изготовления. Окрашенные на жир срезы нельзя обезвоживать и заключать обычным способом: это вызвало бы растворение и извлечение жира из препарата (ксилол, в котором растворяют бальзам, растворит и жиры). Учитывая сказанное, срезы после окраски на жир заключают в глицерин или глицерин-желатин, которые не растворяют жира и хорошо просветляют необезвоженный препарат. Жидкий глицерин не дает возможности фиксировать покровное стекло над препаратом. Для укрепления покровного стекла его по краям покрывают валиком из расплавленного парафина, а лучше из менделеевской замазки. Чтобы добиться хорошего прикрепления покровного стекла, надо, заключая препарат, наносить на него такое количество глицерина, которое не достигало бы краев покровного стекла. После заключения в глицерин-желатин при длительном хранении препаратов наблюдается выпадение судана III в виде красных кристаллов.

8.2 Окраска по Ван - Гизону

Окрашивание соединительной и мышечной тканей по методу Ван Гизона.

Окраска соединительной и мышечной тканей гематоксилин-пикрофуксином по методу Ван - Гизона широко используется в гистологической практике как для получения обзорных препаратов, так и для некоторых специальных целей. Этот метод имеет ряд преимуществ по сравнению с окраской гематоксилин-эозином, так как по-разному окрашивает различные ткани. Так, соединительная ткань после окраски пикрофуксином имеет ярко-красный цвет, а все остальные ткани - буровато-желтый или желто-зеленый. Метод Ван-Гизона позволяет дифференцировать гладкомышечные клетки от соединительнотканых в тех случаях, когда их трудно различить на препаратах, окрашенных другими методами. В качестве ядерной окраски применяется железный гематоксилин Вейгерта, дающий черную или буро-черную окраску ядер.

Гематоксилин Вейгерта (О.В.Волкова, Ю.К.Елецкий, 1982) готовят непосредственно перед окрашиванием, смешивая равные объемы основных растворов Вейгерта (первого и второго), которые хранят отдельно.

Первый раствор Вейгерта: в 100 мл 96% спирта растворяют 1г гематоксилина; второй раствор: 4 мл 29% раствора хлорида железа (3+, или 2-3% раствора железоаммониевых квасцов) сливают с 1мл крепкой хлористоводородной кислоты и добавляют 95 мл дистиллированной воды.

При смешивании растворов приливают второй раствор к первому не в равном, а в несколько меньшем количестве, а затем добавляют второй раствор к полученной смеси по каплям из пипетки до равного количества с первым раствором.

В силу изменения поверхностного натяжения раствора он начинает подниматься по стенкам сосуда (бюкса) и собирается в капли, которые вновь стекают в жидкость. Такое явление указывает на правильное количественное соотношение первого и второго растворов Вейгерта в смеси, и тогда добавление второго раствора надо прекратить. Краситель, если он правильно приготовлен, темно-фиолетового цвета. Если он бурого цвета, то имеется избыток второго раствора. Ядра таким красителем будут окрашиваться не в черный, а в бурый цвет.

Растворы Вейгерта в отдельности можно хранить годами, их смесь - не больше 3-4 дней, поэтому лучше всего пользоваться свежим раствором.

Раствор пикрофуксина: к 100мл насыщенного водного раствора пикриновой кислоты прибавляют 5-10 мл 1% водного раствора кислого фуксина.

Если нужно срочно приготовить очень небольшое количество раствора, то в пузырек из-под пенициллина наливают профильтрованный насыщенный раствор пикриновой кислоты (половину пузырька) и к нему по каплям прибавляют 1% раствор кислого фуксина. При этом контролем может служить капля смеси на фильтровальной бумаге, которая должна иметь цвет свежей крови.

Окрашивание (О.В.Волкова, Ю.К.Елецкий, 1982):

1. Из дистиллированной воды срезы перенести в гематоксилин Вейгерта на 2-5 мин. Окраску ядер надо контролировать под микроскопом.
2. Ополоснуть срезы в дистиллированной воде и перенести в водопроводную воду на 10 мин (воду нужно сменить).
3. Поместить срезы на 1-2-3 мин (иногда на 1/2 мин) в пикрофуксин.
4. Быстро (5-10 с) сполоснуть срезы в дистиллированной воде, провести их очень быстро через 96% спирт (можно сменить), просветлить в карбол-толуоле, толуоле и заключить в канадский бальзам.

Результат: коллагеновые волокна ярко-красного цвета, а мышечные и эластические - буровато-желтого или желто-зеленого. Ядра буро-коричневого или буро-черного цвета. Особенности окраски (О.В.Волкова, Ю.К.Елецкий, 1982). Необходим постоянный контроль под микроскопом. Если ядра приобретают бурый, а не черный цвет, то следует дольше подержать срезы в гематоксилине или меньше в пикрофуксине, так как пикрофуксин обладает сильно дифференцирующим действием в отношении гематоксилина.

Существенным недостатком этого метода является выцветание препаратов, поэтому их нельзя хранить длительное время. Можно использовать гематоксилин Майера, Караци, Эрлиха, но гематоксилин Вейгерта дает лучшую окраску.

Следует заметить, что в общем методика эта капризна и непостоянна. Из ряда моментов, определяющих успех или неуспех реакции, главным следует считать качество красителя: только при применении красителя высокого качества можно ожидать четкой и красивой реакции. Большое значение имеет также качество дистиллированной воды. Иногда во время споласкивания срезов в дистиллированной воде цвет окраски изменяется. В таком случае необходимо заменить воду. Вообще следует работать по возможности с дважды дистиллированной водой.

Надо учитывать (по А.Б.Шехтеру), что интенсивность окраски коллагеновых волокон зависит от плотности соединительной ткани и зрелости волокон. В зрелых волокнах плотность расположения молекул коллагена в протофибриллах и фибриллах, а фибрилл в самих волокнах выше, чем в незрелых. Вследствие этого создается более высокая концентрация химических групп белка, обеспечивающих связь с красителем, и уменьшается его диффузия. Незрелые волокна, богатые содержащим углевод цементирующим веществом, не окрашиваются. Беспорядочное расположение фибрилл и содержание большого количества протеогликанов также способствует снижению интенсивности окрашивания (например, хрящевая ткань). Денатурация коллагена, ведущая к разворачиванию спиральной структуры молекулы, как в желатине, также ослабляет окраску. В связи с этим, участки соединительной ткани, где отмечается фибриноидная или другая дезорганизация, имеют слабую окраску.

Окраска на амилоид

Морфологическая диагностика амилоидоза (по В.В.Серову, М.А.Пальцеву).

Макроскопическая диагностика амилоидоза: при действии на ткань люголевского раствора и 10% серной кислоты амилоид приобретает сине-фиолетовый или грязно-зеленый цвет.

Микроскопическая диагностика амилоида:

- а) при окраске гематоксилином и эозином амилоид представлен аморфными эозинофильными массами;
- б) при окраске конго красным (специфическая окраска на амилоид) амилоид окрашивается в кирпично-красный цвет;
- в) при просмотре окрашенных конго красным препаратов в поляризационном микроскопе обнаруживается двухцветность - дихроизм: красноватое и зелено-желтое свечение;
- г) при просмотре окрашенных тиофлавином Т препаратов в люминесцентном микроскопе обнаруживается специфическое зеленое свечение.

При выраженном амилоидозе органы увеличиваются, становятся очень плотными и ломкими, на разрезе приобретают сальный вид.

Амилоидоз печени (по В.В.Серову, М.А.Пальцеву).

Печень большая, плотная, светлая с сальным блеском на разрезе.

Амилоид откладывается по ходу синусоидов в дольках, в стенках сосудов.

Приводит к атрофии гепатоцитов и развитию печеночной недостаточности; при затруднении венозного оттока в связи с поражением центральных вен может сопровождаться портальной гипертензией.

Окраска конго красным (Микроскопическая техника: Руководство / Под ред. Д.С.Саркисова и Ю.Л. Перова. - М.: Медицина, 1996.):

Конго красный (1% водный раствор)	1-3 мин
Водопроводная вода	Ополоснуть
Спирт 70% или 80%	дифференцировка до бледно-розового цвета
Водопроводная вода	Ополоснуть
Квасцовый гематоксилин для докраски ядер	2-3 мин
Водопроводная вода	Ополоснуть

Затем обезвоживают, просветляют, заключают в смолу.

Результат: амилоид кирпично-красного цвета, ядра клеток - синеватые.

Можно вначале окрасить ядра гематоксилином, отдифференцировать в солянокислом спирте, а затем окрашивать конго красным.

8.3 Окраска по Лепене

Окраска гемоглибиновых пигментов трупных пятен и кровоизлияний по Лепене в аутолитически и гнилостно изменённых тканях.

Лепене способ (G. Lepchne, род. в 1887 г., нем. врач) - метод обнаружения гемоглибина в тканях, основанный на выявлении его пероксидазной активности путем помещения замороженных срезов в смесь раствора бензидина и перекиси водорода; эритроциты и гемоглибин окрашиваются в темно-коричневый цвет.

1. Деларафинированные срезы на 1 час в смеси Лепене (3мл раствора бензидина + 3 капли пергидроля)
2. Промыть дистиллированной водой 5-10 минут
3. Докрасить ядра гематоксилином 6 минут
4. Промыть дистиллированной водой 5-10 минут
5. Промыть в спирте 96% 30 минут, ксилолах, заключить.

Реактив:

2 мл 0,6% раствор бензидина (в 10 мл 96% этанола растворить 10мг сухого бензидина, профильтровать)

3 капли пергидроля

4,5 мл 70 (96) % этилового спирта

Рекомендуется окрашивание замороженных срезов.

На практике гемоглибиновый пигмент красится в жёлто-коричневый, буро-коричневый, жёлто-зелёный цвета на бледно-серо-голубом и бледно-бежевом фоне.

Обнаружение крупных и распространённых очагов отложения гемоглибинового пигмента в наиболее вероятной форме свидетельствует о прижизненном образовании повреждений. При наличии мелких очагов отложения гемоглибинового пигмента, а также при выявлении геморрагического пропитывания тканей высказаться о прижизненном происхождении повреждений не представляется возможным.

При резко выраженных гнилостных изменениях тканей, обильной гнилостной бактериальной и грибковой микрофлоре может быть ложноотрицательная реакция по Лепене (отрицательная окраска при имевшем место кровоизлиянии).

расправляют на ноже с помощью кисточки, после чего срез снимают с ножа на подушечку указательного пальца, подложенного под нож. Срезы кладут в склянки с 70 % спиртом.

Оборудование

1. Монитор Samsung Sync Master 740n
2. Клавиатура Chicony KB-9810
3. Компьютерная мышь Logitech M-BT58
4. Видеомагнитофон Panasonic NV-MV21
5. Усилитель звука BENRINGER UB1204-PRO
6. Проектор DLP Texas Instruments
7. Сист.блок iStar TOP/iC-1700/20Gb/128Mb/DDR/GeForce 2MX-400 32Mb/CD-ROM 52XIC-Net Pro 200

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жаров А. В. Патологическая анатомия животных. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2013. – 620 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1450-5
2. Жаров А. В. Судебная ветеринарная медицина. Учебник. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2014. – 464 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1581-6
3. Латыпов Д.Г., Залялов И.Н. Вскрытие и патологоанатомическая диагностика болезней животных. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2015. – 384 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1976-0
4. Салимов В.А. Практикум по патологической анатомии животных: Учебное пособие. 2-е изд., перераб. – СПб.: Лань, 2013. - 256 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN 978-5-8114-1418-5
5. Дудка, И.А. Методы экспериментальной микологии / И. А. Дудка, С.П. Вассер, И. А. Элланская [и др.] // Справочник. – Киев, 1982. – С. 402 – 405.
6. Лилли, Р., Патогистологическая техника и практическая гистология / Р.Лилли; пер. с англ.; под ред. и с предисловием чл.-корр. АМН В.В. Португалова.-М.:Мир, 1969.-512с.
7. Меркулов, Г. А. Курс патологистологической техники / Г. А. Меркулов. – Л.: Медицина, 1969. – 423 с.
8. Пирс, Э. Гистохимия. / Э. Пирс. – М., 1962.- С. 751-754.

ТЕМА 9. АЛГОРИТМ ОПИСАНИЯ МИКРОПРЕПАРАТОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА С ОБОЛОЧКАМИ, СЕРДЦА, ЛЁГКИХ, ПЕЧЕНИ, ПОЧЕК, СЕЛЕЗЁНКИ

Цель: сформировать понятие и изучить алгоритм описания микропрепаратов головного мозга с оболочками, сердца, лёгких, печени, почек, селезёнки.

9.1 Головной мозг с оболочками

Алгоритм описания микропрепаратов головного мозга с оболочками.

1. Состояние мягкой и твёрдой мозговых оболочек:

- наличие отёка различной степени выраженности (оболочки утолщены, разрыхлены, расслоены),
- кровенаполнение сосудов оболочек мозга (полнокровны, неравномерного кровенаполнения, слабого кровенаполнения, с преобладанием сосудов с пустыми просветами, в спавшемся состоянии),

- состояние сосудистых стенок (наличие патологических их изменений в виде склероза, плазматического пропитывания, гиалиноза, некроза, острого гнойного и продуктивного воспаления, аномалий строения),
- наличие кровоизлияний, клеточной инфильтрации (лептоменингит и пахименингит), некрозов в толще оболочек,
- наличие субарахноидальных кровоизлияний (без признаков организации, с признаками организации), эпи - и субдуральных гематом (острых, подострых и хронических), интрадуральных гематом с клеточной реакцией.

2. Состояние вещества мозга:

- степень кровенаполнение венозно-капиллярного русла, артерий, состояние сосудистых стенок (не изменены, с картиной склероза, плазматического пропитывания, гиалиноза, фибриноидного некроза, острого гнойного и продуктивного васкулита, аномалии развития),
- наличие кровоизлияний (указывается тип кровоизлияния - диапедезные с рыхлым расположением эритроцитов, деструктивные с нарушением строения ткани мозга; цвет - ярко-красные, насыщенно-красные, тёмно-красные, буровато-тёмно-красные; наличие и степень выраженности гемолиза эритроцитов, клеточная реакция в виде лейкоцитоза, макрофагальной реакции - скоплений «зернистых шаров», пролиферации фибробластов, наличия гемосидерофагов и глыбок внеклеточно расположенного гемосидерина),
- наличие очагов организации, глиальных рубцов,
- наличие и степень выраженности отёка вещества мозга (просветление периваскулярных, перивентрикулярных пространств и пространств вокруг глиальных элементов), наличие очагового или диффузного сетчатого (криброзного) отёка различной степени выраженности (вплоть до резко выраженного, деструктивного),
- состояние нейронов (степень выраженности дистрофических изменения нейроцитов, явления кариорексиса, кариолизиса, нейроцитоллизиса, «тающие» нейроциты, клетки-«тени», деформация и переориентация нейронов за счёт сдавления их кровоизлияниями и объёмными процессами в головном мозге).

«Тающие» нейроциты (В.Г.Науменко, Н.А.Митяева, 1980) - уродливая форма, зазубренные очертания, инкрустация клеточной мембраны и отростков, частичный хроматолиз, скопление глыбчатого базофильного вещества у аксона, вакуоли или сотовидные структуры в просветлённой части клетки, смещение ядра.

Клетки-«тени» - цитоплазма бледно окрашена, гомогенна, клеточная и ядерная мембраны не контурируются, иногда слабо намечается очень бледно окрашенное ядрышко.

1. Острые гематомы - нарастающий отёк твёрдой мозговой оболочки (ТМО), разволокнение коллагеновых волокон, волокна слабо окрашиваются, набухшие, имеют повышенную извилистость. Первоначальный спазм артерий сменяется дистонией с резко выраженным полнокровием. В ряде сосудов - плазматическое пропитывание стенок, их лейкоцитарная инфильтрация (картина острого гнойного васкулита), разделение крови на плазму и форменные элементы, плазмостазы, внутрисосудистый лейкоцитоз, пристеночное стояние лейкоцитов, активная миграция лейкоцитов за пределы сосудистой стенки с образованием небольших периваскулярных лейкоцитарных инфильтратов, идёт активный распад волокнистых структур с развитием фибриноидного некроза отдельных сосудов. Капилляры имеют чёткообразное строение за счёт сочетания и чередования участков расширения и участков сужения. К концу 2-х суток - гомогенизация и некроз ТМО на границе с

гематомой, параллельно распаду фиброцитов идёт пролиферация фибробластов, лейкоцитарная реакция максимальная, лейкоциты начинают разрушаться (их лизис, пикноз и рексис). Лейкоциты располагаются неравномерно, с тенденцией увеличения их числа на границе гематомы и твёрдой мозговой оболочки.

2. Подострая гематома - ТМО утолщена, разрыхлена, с распадом и набуханием коллагеновых волокнистых структур. Количество распадающихся лейкоцитов резко снижено, но увеличивается число лимфоцитов, макрофагов, тучных клеток, идёт интенсивная пролиферация фибробластов и гистиоцитов. Сосуды извиты, чёткообразные, с преобладанием расширений над сужениями. В стенках отдельных сосудов активный распад волокнистых структур, развитие фибриноидного некроза. Со стороны внутренней поверхности ТМО - выраженные явления пролиферации соединительнотканых элементов, выявляются гемосидерофаги. На 6-7-е сутки после травмы в формирующейся грануляционной ткани появляются эндотелиоподобные и фибробластоподобные тяжи, проникающие в изменённую массу крови с новообразованием сосудов. Фибрин от нежной тонкой сети, по мере эволюции кровяного свёртка, превращается в грубую сеть, приобретая к 10-11-м суткам вид зернистой массы.

3. Хроническая гематома - грануляционная ткань разрастается, со стороны ТМО подвергается фибротизации с формированием соединительнотканного слоя капсулы. Со стороны грануляционной ткани происходит новообразование сосудов и их вращание в гематому.

При гистологической исследовании капсула гематомы имеет 2 поверхности - наружную (дуральную) и внутреннюю (арахноидальную) - различной степени зрелости соединительная ткань с воспалительным инфильтратом.

9.2 Сердце

Алгоритм описания микропрепаратов сердца.

1. Наличие неравномерной окраски миокарда (при стандартном срезе миокарда толщиной 10-12 мкм, одинаковой толщины обусловлена наличием субсегментарных контрактур кардиомиоцитов - мелкие участки пересокращения кардиомиоцитов окрашены в более насыщенный цвет, соседние участки перерастяжения кардиомиоцитов более бледной окраски).

2. Состояние кровенаполнения миокарда (венозно-капиллярное русло, артерии):

- диффузное венозно-капиллярное полнокровие, эритростазы, диапедезные микрогеморрагии;

- неравномерное кровенаполнение миокарда: участки слабого кровенаполнения чередуются с очагами венозно-капиллярного полнокровия;

- преобладает слабое кровенаполнение миокарда, сосуды спавшиеся, с пустыми просветами (массивная кровопотеря, участок обескровливания миокарда при ОКН).

3. Наличие нарушений реологии крови: эритростазы, внутрисосудистый лейкоцитоз (лейкостазы), разделение крови на плазму и форменные элементы, плазмостазы, сладжи. Наличие тромбов (фибриновые, белые, смешанные, острые, с признаками организации, внутрисосудистые, пристеночные, с реканализацией).

4. Состояние межмышечной стромы:

- отёк стромы (незначительный, слабый, умеренный, выраженный, резко выраженный вплоть до деструктивного);

- сдавление стромы при преобладании отёка кардиомиоцитов (мышечные волокна миокарда гомогенизированы, представлены сплошными пластами, строма сдавлена);

- очаговая или диффузная клеточная инфильтрация (острая гнойная, продуктивная с преобладанием лимфоцитов или круглоклеточных элементов, полиморфноклеточная).

5. Состояние стенок коронарных артерий с указанием калибра сосуда (например, в срезах представлены единичные небольшие коронарные артерии с неравномерным утолщением стенок за счёт слабо-умеренного коронаросклероза). Состояние дистонии, спазма стенок сосудов.

6. Кардиосклероз периваскулярный, очаговый интрамуральный, сетчатого типа.

7. Состояние кардиомиоцитов (белковая зернистая дистрофия, мелко/среднекапельная жировая дистрофия или вакуолярная дистрофия на поперечных срезах кардиомиоцитов, гипертрофия с указанием степени выраженности, атрофия, некроз, миоцитоллиз). Очаговый липофусциноз кардиомиоцитов (в цитоплазме ряда кардиомиоцитов вокруг их ядер небольшие скопления золотисто-жёлтого пигмента липофусцина - пигмента старческого возраста).

9.3 Легкие

Алгоритм описания микропрепаратов лёгких.

1. Состояние кровенаполнения:

- диффузное или очаговое венозно-капиллярное полнокровие;
- неравномерное кровенаполнение с преобладанием венозно-капиллярного полнокровия, умеренного кровенаполнения или слабого кровенаполнения, спавшихся сосудов, сосудов с пустыми просветами.

2. Нарушения реологии крови: эритростазы, лейкостазы, разделение крови на плазму и форменные элементы, плазмостазы, фибриновые микротромбы, тромбы смешанные, белые, свежие, внутрипросветные, пристеночные, с признаками организации, реканализации.

3. Наличие в просветах сосудов на фоне эритроцитов небольших округлых оптических пустот, похожих на жировые эмболы (при травме). Возможны фрагменты тканей (тканевая эмболия при травме).

4. Дистония, спазм стенок сосудов. Изменения сосудистых стенок (дистония, спазм, картина острого гнойного или продуктивного васкулита, склероз).

5. Состояние лёгочной паренхимы:

- очаговая или диффузная эмфизема с указанием степени её выраженности, с образованием «птичьих шпор», указывающих на резко выраженную эмфизему при коротком агональном периоде,

- частичное спадение лёгочной ткани (дистелектазы) или полное её спадение (ателектазы);

- снижение или полное отсутствие воздушности лёгочной ткани при заполнении просветов альвеол воспалительным экссудатом, отёчной жидкостью, при наличии очагов казеозного некроза, пневмосклероза, разрастания атипичной ткани.

6. Состояние межальвеолярных перегородок: истончены, утолщены за счёт отёка, клеточной инфильтрации, склероза.

7. Альвеолярный отёк: незначительный мелкоочаговый (единичные альвеолы содержат небольшое количество отёчной жидкости), мелкоочаговый, слабый, умеренный, выраженный мелко/средне/крупноочаговый, выраженный распространённый, массивный.

8. Кровоизлияния: мелко/средне/крупноочаговые, слабые, умеренные, выраженные, возможен их деструктивный характер, указывается цвет эритроцитов (насыщенно-красные, буровато-тёмно-красные), степень гемолиза эритроцитов, клеточная реакция (с лейкоцитозом, макрофагальной реакцией, пролиферацией фибробластов).

Очаги гемосидероза (скопления гемосидерофагов в просветах альвеол - при ХСН, хронической интоксикации).

9. Состояние бронхов: наличие склероза, воспаления, дистонии, спазма стенок, что находится в просветах (слущенный эпителий, эритроциты, гемосидерофаги, инородные частицы), состояние перибронхиальной ткани (при её воспалении).

10. Состояние лёгочной плевры (не утолщена, без признаков склероза и воспаления; в состоянии умеренного или выраженного склероза и др.).

При умеренном и выраженном аутолизе уже нельзя отдифференцировать острую альвеолярную эмфизему и очаги гнилостной эмфиземы, нельзя говорить достоверно об альвеолярном отёке (может быть гнилостная жидкость).

Указывается, что на фоне аутолиза оценка срезов ограничена.

9.4 Печень

Алгоритм описания микропрепаратов печени.

1. Состояние кровенаполнения:

- синусоидных капилляров;
- центральных вен;
- вен портальных трактов.

2. Нарушения реологии крови: эритростазы, лейкостазы, разделение крови на плазму и форменные элементы, плазмостазы, микротромбы, тромбы.

3. Состояние стенок вышеуказанных сосудов: склероз, плазматическое пропитывание, гиалиноз, некроз, васкулит острый гнойный, продуктивный или полиморфноклеточный. Наличие периваскулярного склероза вокруг центральных вен (перивенулярный склероз, характерно для алкогольной печени).

4. Расширение (отёк) перисинусоидальных пространств Диссе.

5. Балочно-радиарное строение печёночных долек:

- сохранено, чёткое, прослеживается;
- стёрто при наличии умеренного, выраженного жирового гепатоза, мелкоочаговых некрозов;
- нарушено при наличии мостовидных (перекидывающихся с дольки на дольку) и мультилобулярных некрозов, картины неполного септального, моно - и мультилобулярного, смешанного цирроза печени, крупных очагов фиброза.

6. Наличие клеток Краевского (гепатоциты с признаками мобилизации гликогена, значительно набухшие, с просветлённой цитоплазмой, полигональной формы, расположены компактно, в виде «булыжной мостовой»).

7. Дистрофические изменения гепатоцитов: белковая зернистая дистрофия, вакуольная дистрофия, гидропическая дистрофия, жировая дистрофия (диссеминированная, мелкоочаговая, средне - и крупноочаговая, умеренная и выраженная диффузная, субтотальная, тотальная).

8. Некрозы гепатоцитов (мелких групп клеток, мелко/среднеочаговые в пределах дольки, мостовидные - перекидывающиеся с дольки на дольку, мультилобулярные - захватывающие несколько смежных долек).

9. Состояние портальных трактов (не расширены, без признаков склероза и воспаления; с отёком стромы, расширены за счёт склероза, со слабой, умеренной, выраженной очаговой или диффузной лейкоцитарной или лимфогистиоцитарной инфильтрацией с единичными сегментоядерными лейкоцитами; отхождение от склерозированных портальных трактов фиброзных тяжей различной толщины и протяжённости).

10. Наличие дефектов ткани (при травме).

11. Наличие разрастания атипичной ткани.
12. Состояние капсулы печени.

9.5 Почки

Алгоритм описания микропрепаратов почек.

1. Состояние кровенаполнения коркового и мозгового вещества (диффузное или очаговое венозно-капиллярное полнокровие, чередование участков слабого кровенаполнения и очагов венозно-капиллярного полнокровия, преобладание слабого кровенаполнения).
2. Нарушения реологических свойств крови (эритростазы, внутрисосудистый лейкоцитоз, пристеночное стояние лейкоцитов, разделение крови на плазму и форменные элементы, плазмостазы, тромбоз сосудов).
3. Состояние стенок почечных артерий, артериол (утолщены за счёт склероза, гиалиноза, плазматического пропитывания, с явлением некроза, острого гнойного или продуктивного васкулита).
4. Состояние интерстиция (очаговый или диффузный слабый, умеренный, выраженный отёк интерстиция).
5. Состояние почечных клубочков (строение их сохранено, клубочки в состоянии атрофии, склероза, гиалиноза, с наличием склероза капсулы Шумлянско-Боумана различной степени выраженности, с наличием в просвете капсулы Шумлянско-Боумана гомогенной бледно-розовой жидкости и слабо-зернистых бледно-розовых масс).
6. Наличие очагов нефросклероза, продуктивного или острого воспаления (мелко/средне/крупноочаговые, выраженные диффузные, сетчатого типа, тотальные).
7. Наличие очагов некроза почечной ткани (некронефроза), реактивная клеточная реакция, степень её выраженности.
 7. 1. Состояние эпителия почечных канальцев:
 - белковая зернистая дистрофия различной степени выраженности;
 - вакуольная (мелко/средне/крупновacuольная) дистрофия (по ходу базальной мембраны канальцев или во всём объёме цитоплазмы эпителиоцитов расположены белесоватые вакуоли);
 - гиалиново-капельная дистрофия различной степени выраженности;
 - гидropическая, водяночная дистрофия различной степени выраженности, вплоть до максимальной степени её выраженности - баллонной дистрофии (эпителиоциты значительно набухшие, с выраженным просветлением цитоплазмы);
 - некробиозы-некрозы отдельных эпителиоцитов, групп клеток, целых канальцев (ядра не видны, границы между клетками не прослеживаются).
8. Наличие канальцев в состоянии нефрокальциноза (эпителиоциты инкрустированы солями кальция или в просветах канальцев наличие мелких кальцинатов) - чаще всего имеет постнекротический генез, также может быть проявлением гиперкальциемии.
9. Признаки атрофии канальцев в виде истончения эпителия, расширения просветов (вплоть до очагов «щитовидной почки»).
10. Содержимое просветов канальцев (белковые массы, гиалиновые цилиндры, пигментные шлаки буро-коричневатого цвета, буро-красноватые зёрна миоглобина, слущенные эпителиоциты, свежие и выщелоченные эритроциты, кристаллы оксалатов при оксалатурии или отравлении антифризом).

9.6 Селезенка. Алгоритм описания микропрепаратов селезёнки.

Большое значение имеет и окраска гистопрепаратов. Для решения вопросов о давности повреждений селезенки, наряду с окраской препаратов гематоксилинэо-зином,

обязательным является использование дополнительных окрасок по Перлсу и ван-Гизон, определяющих наличие железосодержащих пигментов и соединительной ткани.

1. Состояние кровенаполнения красной пульпы (диффузное или очаговое полнокровие, умеренное кровенаполнение, слабое кровенаполнение, обескровливание), очаговые кровоизлияния, участки геморрагического пропитывания.

2. Состояние лимфатических фолликулов (средней величины, уменьшены, в состоянии атрофии, увеличены и сливаются друг с другом, в состоянии гиперплазии, с краевой или тотальной делимфатизацией, с расширенными реактивными центрами, с наличием в них мелких округлых гиалиновых включений, стенки центральных артерий фолликулов не изменены или с наличием склероза и гиалиноза).

3. Наличие патологических изменений (туберкулёзные гранулёмы, очаги белого инфаркта селезёнки, метастазы опухолей, кальцинаты и др.).

4. Состояние красной пульпы (наличие реактивного очагового или диффузного лейкоцитоза).

5. Состояние капсулы селезёнки (не утолщена, с явлением склероза, лейкоцитарной инфильтрации, с наложениями гнойно-фибринозного экссудата).

Оборудование

1. Монитор Samsung Sync Master 740n
2. Клавиатура Chicony KB-9810
3. Компьютерная мышь Logitech M-BT58
4. Видеомагнитофон Panasonic NV-MV21
5. Усилитель звука BENRINGER UB1204-PRO
6. Проектор DLP Texas Instruments
7. Сист.блок iStar TOP/iC-1700/20Gb/128Mb/DDR/GeForce 2MX-400 32Mb/CD-ROM 52XIC-Net Pro 200

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жаров А. В. Патологическая анатомия животных. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2013. – 620 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1450-5
2. Жаров А. В. Судебная ветеринарная медицина. Учебник. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2014. – 464 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1581-6
3. Латыпов Д.Г., Залялов И.Н. Вскрытие и патологоанатомическая диагностика болезней животных. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2015. – 384 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1976-0
4. Салимов В.А. Практикум по патологической анатомии животных: Учебное пособие. 2-е изд., перераб. – СПб.: Лань, 2013. - 256 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN 978-5-8114-1418-5
5. Дудка, И.А. Методы экспериментальной микологии / И. А. Дудка, С.П. Вассер, И. А. Элланская [и др.] // Справочник. – Киев, 1982. – С. 402 – 405.
6. Лилли, Р., Патогистологическая техника и практическая гистология / Р.Лилли; пер. с англ.; под ред. и с предисловием чл.-корр. АМН В.В. Португалова.-М.:Мир, 1969.-512с.
7. Меркулов, Г. А. Курс патологистологической техники / Г. А. Меркулов. – Л.: Медицина, 1969. – 423 с.
8. Пирс, Э. Гистохимия. / Э. Пирс. – М., 1962.- С. 751-754.

ТЕМА 10. АЛГОРИТМ ОПИСАНИЯ МИКРОПРЕПАРАТОВ НАДПОЧЕЧНИКА, ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ПИЩЕВОДА, ЖЕЛУДКА, КИШЕЧНИКА, МЯГКИХ ТКАНЕЙ ИЗ ЗОНЫ ПОВРЕЖДЕНИЙ

Цель: сформировать понятие и изучить алгоритм описания микропрепаратов надпочечника, поджелудочной железы, щитовидной железы, пищевода, желудка, кишечника, мягких тканей из зоны повреждений.

10.1 Надпочечники. Алгоритм описания микропрепаратов надпочечника.

1. Какие слои надпочечника представлены в срезах (корковый и мозговой, преобладает корковый слой), сохранность их строения и взаиморасположения.
2. Степень кровенаполнения (очаговое или диффузное капиллярно-венозное полнокровие, умеренное кровенаполнение, слабое кровенаполнение), нарушения реологических свойств крови (эритростазы с диапедезными микрогеморрагиями, лейкостазы, разделение крови на плазму и форменные элементы, плазмостазы).
3. Наличие делипидизации (делипоидизации) цитоплазмы адренокортикоцитов пучковой зон коры надпочечника (слабая, умеренная и выраженная, очаговая, очагово-диффузная, субтотальная и тотальная).
4. Наличие патологических состояний (некрозы, кровоизлияния, клеточная реакция в них, светлоклеточная и темноклеточные аденомы, метастазы опухолей и др.).

Поджелудочная железа

10.2 Алгоритм описания микропрепаратов поджелудочной железы.

1. Состояние кровенаполнения (очаговое или диффузное венозно-капиллярное полнокровие, умеренное кровенаполнение, слабое кровенаполнение, неравномерное кровенаполнение), нарушения реологических свойств крови (эритростазы с диапедезными микрогеморрагиями, лейкостазы, разделение крови на плазму и форменные элементы, плазмостазы). Состояние сосудистых стенок (не изменены, утолщены за счёт склероза, гиалиноза, плазматического пропитывания).
2. Наличие отёка стромы, кровоизлияний, характеристика последних (диапедезные, деструктивные, диапедезно-деструктивные, мелко-, средне- и крупноочаговые, сливающиеся друг с другом, цвет, наличие и степень выраженности гемолиза эритроцитов, клеточная реакция в виде реактивного лейкоцитоза, макрофагальной реакции, пролиферации фибробластов).
3. Склероз (очаговый, сетчатый, очагово-диффузный, распространённый фиброз с очагами круглоклеточной инфильтрации).
4. Очаги некроза железистой ткани, клеточная реакция.
5. Очаги липоматоза железы (мелкие, средней величины, крупные, сливающиеся друг с другом).
6. Состояние инсулярных островков Лангерганса (средней величины, мелкие в состоянии атрофии, крупные, с признаками гиперплазии, с отёком стромы, в небольшом, умеренном и большом количестве на площади изученных срезов).
7. Состояние протоков (стенки не изменены или утолщены за счёт склероза, остро гнойного или продуктивного воспаления, в состоянии дистонии, спазма, перидуктальный склероз). Содержимое просветов протоков (слущенный эпителий, бледно-розовое гомогенное содержимое, уплотнённое насыщенно-розовое содержимое, гнойный экссудат и др.).
8. Патологические состояния (опухоли и др.).

10.3 Щитовидная железа

Алгоритм описания микропрепаратов щитовидной железы.

1. Состояние кровенаполнения (очаговое или диффузное венозно-капиллярное полнокровие, умеренное кровенаполнение, слабое кровенаполнение), нарушения реологических свойств крови (эритростазы с диапедезными микрогеморрагиями, лейкостазы, разделение крови на плазму и форменные элементы, плазмостазы). Состояние сосудистых стенок (не изменены, утолщены за счёт склероза, гиалиноза, плазматического пропитывания).

2. Наличие отёка стромы, кровоизлияний.

3. Склероз (очаговый, сетчатый, очагово-диффузный, распространённый фиброз с очагами круглоклеточной инфильтрации).

4. Состояние фолликулов (средней величины, увеличены или уменьшены в размерах при макро - и микрофолликулярном коллоидном зобе, тиреоциты кубической, призматической формы, уплощены, краевая вакуолизация коллоида, уплотнение коллоида, гидropическая дистрофия тиреоцитов).

5. Очаги экстра - и интрафолликулярной пролиферации тиреоцитов.

6. Очаги аутоиммунного воспаления.

7. Доброкачественные и злокачественные опухоли щитовидной железы.

10.4 Пищевод, желудок, кишечник

Алгоритм описания микропрепаратов стенки пищевода, желудка, кишечника.

1. Какие представлены слои стенки желудка (слизистая оболочка с многослойным плоским неороговевающим, покровным и железистым эпителием, базальная мембрана, подслизистая основа, мышечная и серозная оболочка, их фрагменты).

2. Степень кровенаполнения сосудов:

- диффузное выраженное и резко выраженное венозно-капиллярное полнокровие, с эритростазами, диапедезными кровоизлияниями, внутрисосудистым лейкоцитозом, внутрисосудистым тромбозом, пристеночными тромбами, картиной острого гнойного, продуктивного или полиморфноклеточного васкулита;

- неравномерное кровенаполнение сосудов (одни сосуды в спавшемся состоянии, слабого и умеренного кровенаполнения, другие - полнокровны);

- слабое кровенаполнение (сосуды спавшиеся, с пустыми просветами или содержат небольшое количество крови).

3. Состояние слизистой оболочки (утолщена, истончена, с отёком стромы, наличие некрозов, очаговых или диффузных острой лейкоцитарной инфильтрации, продуктивного воспаления различной степени выраженности, наличие кровоизлияний различного типа и распространенности, клеточная реакция в них, пятна Вишневого - в различных стадиях).

4. Состояние подслизистой основы (утолщена, разрыхлена за счёт отёка, очаговых или диффузных острой лейкоцитарной инфильтрации, продуктивного воспаления различной степени выраженности, с кровоизлияниями различного типа и распространенности, клеточная реакция в них).

5. Состояние мышечной оболочки (в состоянии отёка, с клеточной инфильтрацией, некрозами, кровоизлияниями, замещением гладких мышечных клеток склерозом или атипичной тканью).

6. Состояние серозной оболочки (утолщена, с наличием очаговых или диффузных острой лейкоцитарной инфильтрации, продуктивного воспаления различной степени выраженности, наличие кровоизлияний различного типа и распространенности, клеточная реакция в них, наличие наложений крови, фибрина, гнойно-фибринозного

экссудата, наличие туберкулёзных гранулём, гигантских многоядерных макрофагов - клеток Пирогова-Ланганса или клеток инородных тел и др.).

10.5 Клеточная реакция

Алгоритм описания мягких тканей из зоны повреждений.

1. Какие ткани представлены в препарате (рыхлая или грубая волокнистая соединительная ткань, скелетная мышечная ткань, жировая клетчатка, фрагменты эластического хряща, слюнных желёз, нервных волокон и другое).

2. Наличие и степень выраженности отёка тканей (незначительный, слабо, умеренно выраженный, выраженный, резко выраженный, вплоть до деструктивного).

3. Степень кровенаполнения тканей (слабое кровенаполнение, сосуды в спавшемся состоянии, с пустыми просветами; неравномерное кровенаполнение с чередованием сосудов слабого кровенаполнения и умеренно полнокровных сосудов; выраженное диффузное полнокровие тканей, с переполнением сосудов кровью).

4. Сосудистые реакции (дистония, спазм стенок, внутрисосудистый лейкоцитоз различной степени выраженности, пристеночное стояние лейкоцитов, миграция лейкоцитов через сосудистые стенки в периваскулярные пространства, образование периваскулярных «муфт» из лейкоцитов и «дорожек» из них по направлению к кровоизлияниям).

5. Наличие и характеристика кровоизлияний

- по характеру (диапедезные с рыхлым расположением эритроцитов, деструктивные),
- по распространенности (незначительные мелкоочаговые, мелкоочаговые, среднеочаговые, крупноочаговые, распространённые крупноочаговые),
- по цвету (ярко-красные, насыщенно-красные, тёмно-красные с частичным гемолизом эритроцитов, буро-тёмно-красные с выраженным гемолизом эритроцитов),
- по клеточной реакции (с лейкоцитарной реакцией - слабой, умеренной, выраженной, с очагами лейкоцитарной инфильтрации, с распадом части сегментоядерных нейтрофильных лейкоцитов, с макрофагальной реакцией, пролиферацией фибробластов, наличием круглоклеточных элементов).

Оценка клеточной реакции проводится при 100х увеличении микроскопа, без учёта коэффициентов усадки тканей при фиксации их раствором формалина, толщины срезов. В наших рабочих случаях мы указываем название микроскопа, общее увеличение, увеличение окуляра, объектива, площадь в мкм, на которой производится подсчёт клеточных элементов (определена окуляром-микрометром для каждого микроскопа индивидуально).

Оборудование

1. Монитор Samsung Sync Master 740n
2. Клавиатура Chicony KB-9810
3. Компьютерная мышь Logitech M-BT58
4. Видеомагнитофон Panasonic NV-MV21
5. Усилитель звука BENRINGER UB1204-PRO
6. Проектор DLP Texas Instruments
7. Сист.блок iStar TOP/iC-1700/20Gb/128Mb/DDR/GeForce 2MX-400 32Mb/CD-ROM 52XIC-Net Pro 200

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жаров А. В. Патологическая анатомия животных. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2013. – 620 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1450-5

2. Жаров А. В. Судебная ветеринарная медицина. Учебник. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2014. – 464 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1581-6
3. Латыпов Д.Г., Залялов И.Н. Вскрытие и патологоанатомическая диагностика болезней животных. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2015. – 384 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN: 978-5-8114-1976-0
4. Салимов В.А. Практикум по патологической анатомии животных: Учебное пособие. 2-е изд., перераб. – СПб.: Лань, 2013. - 256 с. – Режим доступа: [ЭБС «Лань» \(http://e.lanbook.com\)](http://e.lanbook.com), ISBN 978-5-8114-1418-5
5. Дудка, И.А. Методы экспериментальной микологии / И. А. Дудка, С.П. Вассер, И. А. Элланская [и др.] // Справочник. – Киев, 1982. – С. 402 – 405.
6. Лилли, Р., Патогистологическая техника и практическая гистология / Р.Лилли; пер. с англ.; под ред. и с предисловием чл.-корр. АМН В.В. Португалова.-М.:Мир, 1969.-512с.
7. Меркулов, Г. А. Курс патологистологической техники / Г. А. Меркулов. – Л.: Медицина, 1969. – 423 с.
8. Пирс, Э. Гистохимия. / Э. Пирс. – М., 1962.- С. 751-754.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Дудка, И.А. Методы экспериментальной микологии / И. А. Дудка, С.П. Вассер, И. А. Элланская [и др.] // Справочник. – Киев, 1982. – С. 402 – 405.
2. Жаров А. В. Патологическая анатомия животных. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2013. – 620 с. – Режим доступа: ЭБС «Лань» (<http://e.lanbook.com>), ISBN: 978-5-8114-1450-5
3. Жаров А. В. Судебная ветеринарная медицина. Учебник. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2014. – 464 с. – Режим доступа: ЭБС «Лань» (<http://e.lanbook.com>), ISBN: 978-5-8114-1581-6
4. Латыпов Д.Г., Залялов И.Н. Вскрытие и патологоанатомическая диагностика болезней животных. – СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2015. – 384 с. – Режим доступа: ЭБС «Лань» (<http://e.lanbook.com>), ISBN: 978-5-8114-1976-0
5. Лилли, Р., Патогистологическая техника и практическая гистология / Р.Лилли; пер. с англ.; под ред. и с предисловием чл.-корр. АМН В.В. Португалова.-М.:Мир, 1969.-512с.
6. Меркулов, Г. А. Курс патологистологической техники / Г. А. Меркулов. – Л.: Медицина, 1969. – 423 с.
7. Пирс, Э. Гистохимия. / Э. Пирс. – М., 1962.- С. 751-754.
8. Салимов В.А. Практикум по патологической анатомии животных: Учебное пособие. 2-е изд., перераб. – СПб.: Лань, 2013. - 256 с. – Режим доступа: ЭБС «Лань» (<http://e.lanbook.com>), ISBN 978-5-8114-1418-5
9. Сапожников А.Г. , Доросевич А.Е. Гистологическая и микроскопическая техника // Смоленск. - 2000. - С. 151 - 153.
10. Серов Р.А., Чекарева Г.А., Рагузин К.К., Шмырева Т.А. Применение окраски ГОФП - методом для выявления повреждений миокарда различного генеза // Архив патологии. - 1977. - т. 34. - в. 5. - С. 70-72.
11. Bouchardy B., Majno G. - «Cardiology», 1971/1972, v. 56, p. 327.
12. Hoch - Ligeti C., Lan C.W. - «Am. J. clin. Path.», 1974, v. 62, p. 455.
13. Lie J.T., Holley K.F., Kampa W.R. et a. - «Proc. Mayo Clin.», 1971, v. 46, p. 319.
14. Pesonen E. «Acta path. Microbiol. Scand.», Sect. «A», 1974, v. 82, p. 648.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	3
Тема 1. Гистологическая техника и оборудование. Техника приготовления гистологических препаратов. Взятие материала	4
Тема 2. Техника вырезки материала. Общие принципы фиксации. Возможные артефакты, связанные с фиксацией и их устранение	7
Тема 3. Способы обезвоживания тканей. Заливочные среды. Приготовление парафиновых блоков	14
Тема 4. Заливка ткани в целлоидин. Приготовление гистологических срезов. Заточка микротомных ножей	18
Тема 5. Микротомы и особенности работы на них. Резание парафиновых блоков на санном микротоме. Приготовление целлоидиновых срезов	20
Тема 6. Подготовка предметных стекол. Общие принципы и методы окрашивания гистологических препаратов. Замечания по технике окрашивания	24
Тема 7. Ядерные красители и их приготовление. Цитоплазматические красители. Окраска гематоксилином – эозином	28
Тема 8. Окраска ГОФП-методом Окраска по Ван – Гизону. Окраска по Лепене	32
Тема 9. Алгоритм описания микропрепаратов головного мозга с оболочками, сердца, лёгких, печени, почек, селезёнки	39
Тема 10. Алгоритм описания микропрепаратов надпочечника, поджелудочной и щитовидной желез, пищевода, желудка, кишечника, мягких тканей из зоны повреждений	45
Литература	49
Содержание	50