

# Универсальный способ окрасивания воспалительных очагов и неповрежденных участков ткани мозга в вибраторных и полутонких срезах

И.П.Дубровин<sup>1</sup>, С.В.Комиссарова<sup>1</sup>, С.А.Турыгина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, лаборатория регуляции репаративных процессов, Москва (зав. лабораторией — проф. А.А.Пальцын);

<sup>2</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии педиатрического факультета, Москва (зав. кафедрой — акад. РАМН, проф. О.В.Волкова)

Предложен новый метод окрасивания ткани мозга, контрастно выделяющий цитологические детали, в том числе ядро, цитоплазму, структуру хроматина и неразличаемую при использовании других методов границу цитоплазмы нейронов. Наряду с нервной тканью хорошо окрасивается и соединительная ткань, в частности сосуды, метакроматически окрасиваются макрофаги. Это дает возможность исследовать очаги циркуляторных и травматических повреждений мозга. Предлагаемая рецептура красителя универсальна и пригодна практически для всех объектов исследования в световом микроскопе: парафиновых, криотомных, вибраторных и полутонких срезов.

*Ключевые слова:* мозг, очаги воспаления, окрасивание срезов

## Universal method of staining of the inflammatory centers and the intact brain tissues in vibratomic and semithin sections

I.P.Dubrovin<sup>1</sup>, S.V.Komissarova<sup>1</sup>, S.A.Turygina<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of General Pathology and Pathophysiology of RAMS, Laboratory of Regulating Reparative Processes, Moscow

(Head of the Laboratory — Prof. A.A.Paltsyn);

The Russian National Research Medical University named after N.I.Pirogov, Department of Hystology, Embryology and Cytology of Pediatric Faculty, Moscow

(Head of the Department — Acad. of RAMS, Prof. O.V.Volkova)

It is suggested a new method of brain tissue staining which contrasts cell parts like nucleus, cytoplasm, chromatin ultrastructure and the border of neuron cytoplasm, indistinguished by other methods. Equally with nervous tissue connective tissue is stained well also, blood vessels in particular. Macrophages become metachromatic. The proposed formular is universal and it is suitable for almost all objects of the study in the light microscope: paraffin, cryotomic, vibratomic and semithin sections.

*Key words:* brain, inflammatory centres, sections staining

Ткань мозга окрасивается плохо практически любыми сочетаниями красителей [1–3]. Для успешной окраски классическим методом Ниссля необходимо качественное обезжиривание материала, в связи с чем обработка в спирте иногда затягивается на несколько недель [4]. По указанным причинам совершенствование способов окрасивания ткани мозга остается актуальной проблемой нейроморфологии.

В тех случаях, когда возникает необходимость анализировать не нормальную ткань мозга, а сочетания нормальных участков с зонами, в различной степени поврежденными патологическим процессом, проблема окрасивания срезов еще более осложняется. В таких случаях нужен способ окраски, одинаково пригодный для нервной и соединительной ткани.

Довольно часто появляется потребность исследовать определенные участки анализируемого образца с большим разрешением, чем может обеспечить парафиновый или вибраторный (5–20 мкм) срез. Повысить разрешение препарата можно путем перезаливки интересующего участка в эпоксидную смолу и приготовления из эпоксидного блока полутонких (1 мкм) срезов. Наиболее распространенным красителем для таких срезов является толудиновый синий.

### Для корреспонденции:

Дубровин Иван Петрович, младший научный сотрудник лаборатории регуляции репаративных процессов НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН

Адрес: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Телефон: (499) 151-1721

E-mail: lrrp@mail.ru

Статья поступила 09.12.2011, принята к печати 19.09.2012

Но окраска им нервной ткани, в отличие от многих других тканей, удается плохо. Серьезный недостаток окрашивания нервной ткани толуидиновым синим – плохая различимость, а чаще отсутствие границы между цитоплазмой нейронов и нейропилем.

Целью исследования стала разработка метода окраски, выявляющего структуру нервной ткани, воспалительных инфильтратов и пролифератов и пригодного для парафиновых, вибротомных и полутонких срезов. Дополнительными требованиями к методу были быстрота окрашивания, простота и воспроизводимость.

## Материалы и методы

Способ окраски отработывали на материале интактной коры головного мозга крыс, мышей, а также на материале локальных очагов воспаления в коре головного мозга крыс при исследовании особенностей заживления очагов воспаления в различных условиях.

Методом проб и ошибок была выбрана комбинация следующих красителей.

1. Водный 0,25% раствор крезилового фиолетового.
2. Водный 0,5% раствор толуидинового синего.
3. Смесь водного 1% раствора метиленового синего (50 мл) и 0,5% раствора КОН (1,5 мл).
4. Водный 1% раствор метилового зеленого.
5. Спиртовой 1% раствор метиленового синего.

## Окраска толстых срезов

Разработанный способ можно использовать для окрашивания депарафинизированных криотомных и вибротомных срезов головного мозга. Способ пригоден как для нормальной, так и для деструктивно измененной ткани.

Все растворы фильтруют и перед применением хранят в стеклянных емкостях с герметичными крышками не менее 4 сут для созревания. Хранить готовые красители нужно в шкафу при комнатной температуре, в плотно закрытых темных склянках. При соблюдении условий хранения данные растворы не теряют своих красящих свойств в течение одного года.

Перед окрашиванием в первый гистологический стакан наливают раствор 5, во второй — смесь растворов 3 и 4 в пропорции 1 : 1, в третий — смесь растворов 1 и 2 в пропорции 1 : 1. Стаканы нумеруют, поскольку порядок использования смесей важен. Смесь растворов 1 и 2 желателно оставить для созревания на срок не менее 2 нед. Данная смесь может храниться до трех лет (в стеклянной таре с плотно закрывающейся крышкой в темном месте при комнатной температуре).

Окрашивание производят при комнатной температуре на предметном стекле. Для предотвращения растекания краски удобно предварительно обводить срезы гидрофобным карандашом ImmEdge pen (Vector).

На подсушенные срезы наносят раствор 5, каплями, до получения ровного слоя краски над препаратом. Окрашивают 7–10 мин, далее краску сливают, а срезы споласкивают в дистиллированной воде. Наносят смесь растворов 3 и 4. Окрашивают в течение 7–10 мин, споласкивают в дистиллированной воде и наносят смесь растворов 1 и 2. Окрашивают 10–15 мин, после чего споласкивают в дистиллированной воде и дифференцируют в 96° этаноле до приобретения срезами светло-фиолетового с синеватыми вкраплениями оттенка. Если препарат оказался сильно переокрашенным, то к дифференцирующему раствору добавляют ледяную уксусную кислоту из расчета 3–5 капель на 50 мл спирта. После дифференцирования образцы можно сразу переносить в орто-ксилол для дальнейшего просветления и заключения.

## Окраска полутонких срезов

Рабочую смесь готовят путем смешивания следующих красителей: 50 мл раствора 1, 50 мл раствора 2, 51,5 мл раствора 3, 50 мл раствора 4. При окраске полутонких срезов раствор 5 не используется. Полученную смесь фильтруют и перед применением оставляют в емкости с герметичной крышкой на срок не менее 3 сут для созревания. Рабочую смесь красителей хранят в таре с плотно закрывающейся крышкой при комнатной температуре в темном месте.

Предметные стекла со срезами перед окраской прогревают над пламенем спиртовки в течение 2–3 с. Прогревание предотвращает отклеивание срезов при окрашивании. Краску заливают в стакан Коплина и помещают его в термостат (60°C) на 30 мин. В прогретую красящую смесь погружают стекла со срезами на 8–10 мин. Далее срезы промывают в дистиллированной воде и высушивают на плитке. При необходимости проводят дифференцирование в 96° этаноле.

## Результаты исследования и их обсуждение

Результаты окраски предлагаемым способом сравнивали с окраской по Нисслю (модификация Био-Витрум). Для окрашивания нормальной ткани коры головного мозга предлагаемый метод удобнее и занимает меньше времени, но по качеству окраски не имеет каких-либо преимуществ перед методом Ниссля (рис. 1).

При морфологическом анализе воспалительных очагов, участков регенерации нервной ткани разработанный способ позволяет видеть заметно больше деталей строения исследуемого материала, чем классический способ Ниссля. В частности, хорошо заметны сосуды, в том числе капилляры. Прослеживается эндотелиальная выстилка. Лучше, чем при окраске по Нисслю, различаются повреждения нейронов (рис. 2).

Воспалительные очаги в мозге отличаются от таковых в других областях тела тем, что в них практически нет нейтрофилов, и главными участниками

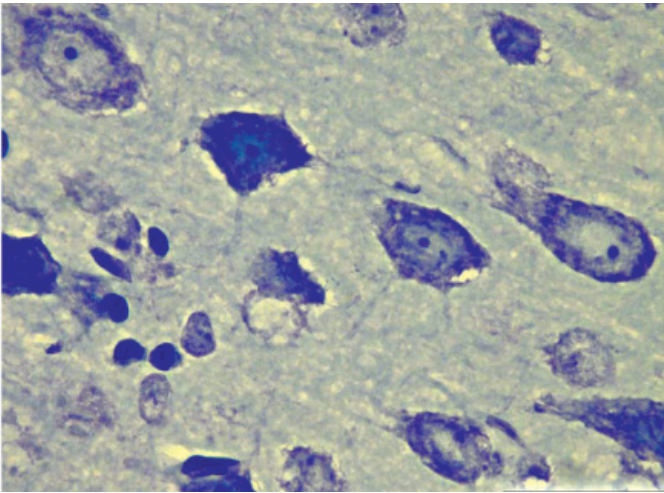


Рис. 1. **Нормальная ткань мозга.** Окраска предлагаемым методом. Вибратомный срез, 20 мкм. Ув. 1000.

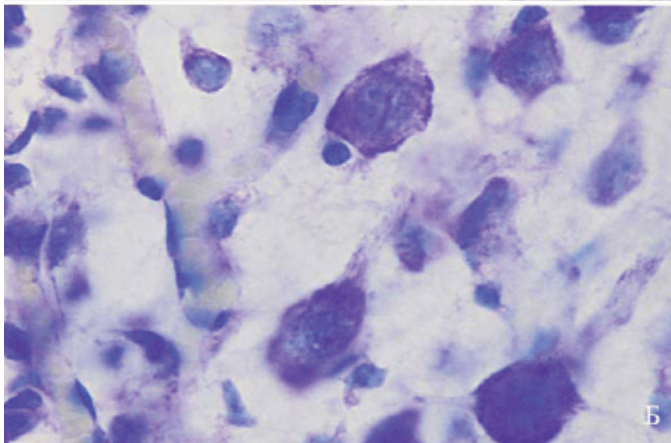
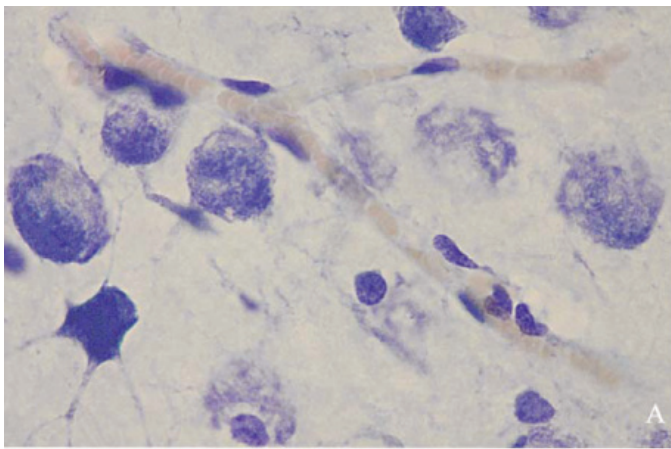


Рис. 2. **Зона реваскуляризации коры головного мозга на границе с сохранившимися нейронами.** А — окраска предлагаемым методом. Хорошо различим капилляр благодаря розоватым эритроцитам и контрастно очерченным ядрам эндотелиальных клеток. Тонкость, «структурированность» окраски нейронов убедительно проявляет их деструкцию. Б — окраска по Нисслю. Эритроциты плохо выделяются, практически незаметны. Эндотелиальные клетки очерчены не так четко, как в (А), в большей степени сливаются с фоном и поэтому не имеют такой яркой эндотелиальной конфигурации, как в (А). Нейроны имеют вид гиперхромных клякс, что не позволяет уверенно отличить пикноз от дефекта окраски. Вибратомные срезы, 20 мкм. Ув. 1000.

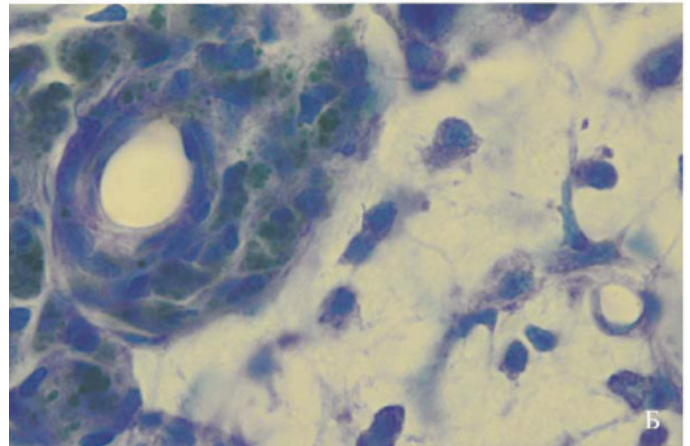
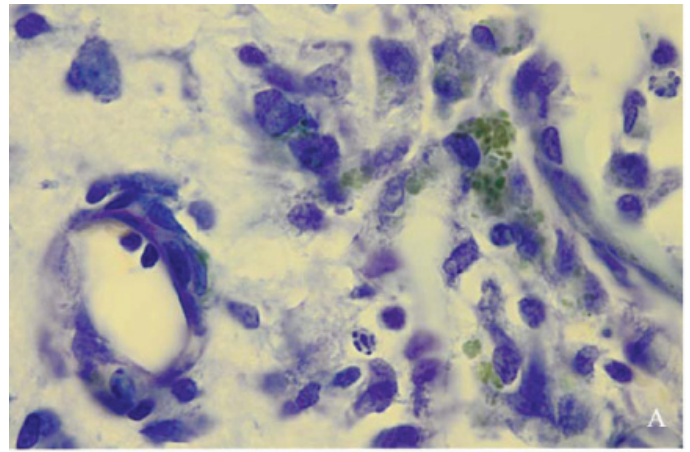


Рис. 3. **Зона воспалительного инфильтрата в коре головного мозга.** А — окрашивание предлагаемым методом. Отчетливо видны яркие зеленые гранулы макрофагов. Ядра клеток четко очерчены, интенсивно окрашены, цитоплазма отделяется от фона. Б — окрашивание по Нисслю. Изображение как бы в дымке, поэтому гранулы макрофагов тусклые и не так определенно окрашены, как в (А). Ядра клеток, по сравнению с (А), гипохромны. Клетки инфильтрата сливаются друг с другом, границы между ними не выражены. Вибратомные срезы, 20 мкм. Ув. 1000.

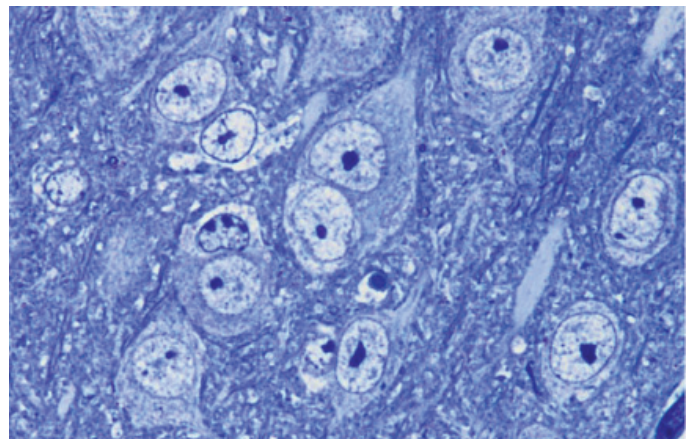


Рис. 4. **Нормальная ткань мозга.** Окраска предлагаемым методом. Нейроны «оторваны» от нейропиля, границы цитоплазмы четко очерчены. Резко выделяются ядра, ядерные мембраны, ядрышки и хроматин. Полутонкий срез, 1 мкм. Ув. 1000.

процесса становятся макрофаги. Последние морфологически гетерогенны, что, возможно, обусловлено различным происхождением — из крови или из местной микроглии. Наиболее заметное различие макрофагов — разная структура фагосом (гранул). Это различие гораздо надежнее распознается предлагаемым способом, чем методом Ниссля (рис. 3).

На полутонких срезах, окрашенных предлагаемым методом, четко различаются нейропилль, цитоплазма нейронов и все выявляемые световым микроскопом ядерные структуры (рис. 4).

Достоинство метода для повседневной, значительной по объему работы — возможность использовать один и тот же набор длительно хранящихся растворов красителей для анализа всевозможных срезов в световом микроскопе.

### Заключение

Предлагаемый метод удобен с точки зрения широты его использования в разных случаях морфологического анализа ткани мозга. В работе с нормальной тканью коры головного мозга преимущество предлагаемого способа состоит в сокращении времени изготовления гистологического препарата, в большей детализации структур в полутонких срезах и в отсутствии необходимости приготовления для каждого способа заливки и микротомии отдельного набора реактивов. В работе с воспалительными очагами предлагаемый способ заметно повышает качество изображений, часто отменяется потребность

просмотра серии срезов, окрашенных различными способами.

Предлагаемый способ окраски легко воспроизводим и не требует специальных приспособлений. Все используемые красители широко распространены и недороги. Качество получаемого изображения высокое, способ позволяет четко различать структурные элементы ткани и клетки в любых срезах.

### Литература

1. Кузнецова А.И. Ускоренный метод окраски нервных клеток при фиксации мозговой ткани формалином // Журн. невропатол. и психиатр. 1955. Т.55. №9. С.699–701.
2. Локтева Е.Я. Быстрый метод окраски нервных клеток после формалиновой фиксации мозга (модификация методики Ниссля) //Арх. патол. 1957. Т.19. №8. С.83–86.
3. Powers M., Clark G. An evaluation of cresyl echt violet acetate as a Nissl stain // Stain Technol. 1955. V.30. №2. P.83–84.
4. Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники. Л.: Медгиз, 1961. С.162–171.

### Информация об авторах:

Комиссарова Светлана Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории регуляции репаративных процессов НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН  
Адрес: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8  
Телефон: (499) 151-1721  
E-mail: lrrp@mail.ru

Турьгина Светлана Анатольевна, доцент кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии педиатрического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова  
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1  
Телефон: (495) 434-4000  
E-mail: lorans77@yandex.ru

## ИЗ ЖИЗНИ УНИВЕРСИТЕТА

### Учебники и монографии

**Стародубов В.И., Галанова Г.И.** Методологические технологии и руководство по управлению качеством медицинской помощи. М.: ИД «Менеджер здравоохранения», 2011. 208 с.

В монографии изложены новые подходы по обеспечению контроля и оценки качества медицинской помощи. В первом разделе рассматриваются вопросы обеспечения качества медицинской помощи. Приведены исторические и современные аспекты развития этой проблемы в отечественном и зарубежном здравоохранении, отражены концептуальные направления, методологические основы и технологии обеспечения качества медицинской помощи. Во втором разделе рассматривается научная методология улучшения качества, основные принципы улучшения, специфика управления в системе здравоохранения, затраты и роль руководства в управлении качеством. При подготовке этого раздела были использованы материалы по управлению качеством в рамках приоритетного направления «Доступность качественной медицинской помощи» Комитета по здравоохранению Российско-американской межправительственной комиссии по экономическому и технологическому сотрудничеству. В третьем разделе монографии авторы приводят примеры собственного опыта внедрения системы управления и совершенствования качества в различные лечебно-профилактические учреждения Российской Федерации. Монография предназначена для организаторов здравоохранения различных уровней управления, сотрудников организаций, работающих в системе обязательного и добровольного медицинского страхования, практических врачей.