

Изобретение относится к области микроскопического исследования биологических объектов, а именно к выявлению нервных волокон импрегнацией.

Импрегнация азотнокислым серебром элементов периферического отдела нервной системы в материале залитом в парафин отличается от выявления их на замороженных срезах тем, что ухудшается выявляемость нервных волокон, проявляющаяся снижением интенсивности их окраски, ее неравномерностью и чрезмерным окрашиванием других тканевых структур.

Попытки, использовать хорошо знакомые и отработанные методы Кампоса, Рассказовой и ряд других для выявления нервных элементов в материале залитом в парафин не дали удовлетворительных результатов. Так, при изучении невротизации раневых регенератов дермы наблюдалась сильная гиперимпрегнация соединительнотканых волокон и чрезвычайно слабая импрегнация нервных элементов. Выявление нервных волокон в регенерирующем седалищном нерве также показала, что их импрегнация (по Кампосу, по Рассказовой) происходит в недостаточной мере. Однако, в последнем случае, после проведения импрегнации срезы сразу же промывали в растворе 1% кислого формалина и повторяли процедуру. При этом, нервные волокна импрегнировались достаточно интенсивно и после обработки золото-хлористоводородной кислотой получали препараты хорошего качества. Попытки повторно провести процедуру импрегнации срезов из области раны кожи (имеющим значительно большее содержание соединительнотканых волокон) приводили к сильному их потемнению, но не к выявлению нервных элементов. Последующая обработка срезов с целью удаления избытков серебра или золочение не привели к получению сколько-нибудь удовлетворительных результатов.

Учитывая выраженную гиперимпрегнацию соединительнотканых волокон были сделаны попытки устранения этого явления.

Известен способ, в соответствии с которым в раствор формалина, используемый для восстановления серебра, по рекомендации Секи [3] добавили 1% натрия лимоннокислого. Результатом этого было значительное уменьшение интенсивности окраски компонентов соединительной ткани, но это не приводит к существенному улучшению интенсивности окраски нервных элементов в материале залитом в парафин.

Для восстановления этих свойств периферических отделов нервной системы были использованы специально рекомендованные для этого методы [2,4,5,6], а также предварительная обработка депарафинированных срезов перед импрегнацией по Кампосу или по Рассказовой гидроокисью натрия (в соответствии с рекомендациями Шульце)[3] и пиридином [1,3].

Известен способ [3], в соответствии с которым предварительную обработку срезов осуществляют 0,1-4% водными или спиртовыми растворами гидроокиси натрия перед обработкой срезов азотнокислым серебром. Это в целом повышает интенсивность окраски нервных проводников. Однако при этом часто наблюдается неравномерность импрегнации осевых цилиндров и неудовлетворительная воспроизводимость результатов.

Наиболее близким по технической сущности является способ выявления нервных проводников по Коломийцеву и соавт. [1]. Основным отличительным моментом этого способа является предварительная обработка депарафинированных срезов пиридином 1-6 часов. Однако результаты импрегнации по этому способу не стабильны в отношении различных исследуемых объектов, и приходится кропотливо подбирать условия для проведения импрегнации для каждого образца. Данный способ не обеспечивает значительного подавления окраски фона, не всегда получается интенсивная и равномерная импрегнация нервных волокон. Так, в частности, в длгонезаживающих ранах кожи происходило наряду с сильной импрегнацией фибробластов окрашивание тонких соединительнотканых волокон, среди которых невозможно идентифицировать нервные проводники.

Решаемая техническая задача заключается в повышении интенсивности и равномерности окраски нервных волокон в материале залитом в парафин на фоне слабого окрашивания других тканевых структур.

Конкретный достигаемый результат состоит в получении высокоселективной окраски нервных волокон, позволяющей их легкую визуальную и аппаратную идентификацию за счет интенсивной и равномерной импрегнации осевых цилиндров, и слабого окрашивания других тканевых структур.

Поставленная задача достигается тем, что в известном способе выявления нервных волокон в материале залитом в парафин импрегнацией азотнокислым серебром, включающем предварительную обработку депарафинированных срезов, обработку срезов азотнокислым серебром и восстановление серебра, в соответствии с изобретением депарафинированные срезы предварительно обрабатывают в растворе, состоящем из 9 частей 95% этанола и 1 части 25% аммиака в течение 16-48 часов, и восстанавливают серебро в течение 30-60 сек в растворе, содержащем: глюкозу 20 г, глицерин 30 мл, цитрат натрия 10 г, воду водопроводную до 1 л, кислый формалин 5 мл.

Отличительной особенностью предлагаемого способа является использование обработки депарафинированных срезов в спиртовом растворе аммиака для повышения интенсивности и равномерности импрегнации нервных элементов, в сочетании с восстановлением серебра в среде, обеспечивающей минимальную окраску других тканевых компонентов, что обеспечивает наибольшую контрастность окраски осевых цилиндров.

Предлагаемый способ выявления нервных волокон импрегнацией азотнокислым серебром осуществляют следующим образом:

1. Парафиновые срезы толщиной 20-50 мкм депарафинируют (в случае кратковременной фиксации материала перед заливкой (1-2 суток в формалине, жидкости Лилли) срезы помещают в 10% нейтральный формалин на 2-7 дней, после чего промывают водопроводной и дистиллированной водой).
2. Срезы помещают в смесь 9 частей 95% этанола и 1 части 25% раствора аммиака на 24-40 часов.
3. Срезы тщательно промывают часто сменяемой дистиллированной водой 2-3 часа.
4. Помещают срезы в 20% раствор азотнокислого серебра на 1 час (в темноте).
5. Срезы быстро промывают в дистиллированной воде.
6. Проводят срезы через 3 порции 1% кислого раствора формалина, приготовленного на водопроводной воде (по 30 сек в каждой порции, повторное использование растворов не допускается).

7. Срезы просушивают фильтровальной бумагой и помещают в раствор аммиачного серебра на 30-40 сек. Его готовят путем добавления по каплям 25% раствора аммиака к 20% раствору азотнокислого серебра, подсчитывая при этом количество капель аммиака, которое необходимо до полного растворения первоначально образовавшегося осадка. После полного растворения осадка к аммиачному серебру добавляется раствор аммиака в количестве 1/5-1/2 от его объема затраченного для полного растворения осадка. Увеличение избытка аммиака уменьшает прежде всего импрегнацию ядер клеток.

8. Срезы быстро осушивают о фильтровальную бумагу и помещают в проявляющий раствор следующего состава: глюкоза 20 г, глицерин 30 мл, цитрат натрия 10 г, вода водопроводная до 1 л, кислый формалин 5 мл (формалин добавляется только после полного растворения предыдущих компонентов). Проявление срезов происходит в течение 30-60 сек, и они приобретают при этом светло-желтую окраску, после чего срезы переносят в другую порцию проявляющего раствора на такое же время (срезы при этом могут приобретать более темную желтую окраску но не коричневую).

9. Срезы переносят в аммиачную воду (1 часть 25% раствора аммиака и 3 части дистиллированной воды) на 10 минут. Следует воздерживаться от более длительного пребывания срезов в аммиачной воде, что может привести к ослаблению импрегнации нервных волокон, и возможно даже исчезновение наиболее тонких из них. Более короткое время пребывания срезов в аммиачной воде может привести в дальнейшем к сильному их потемнению.

10. Срезы тщательно промываются (можно оставить их в воде на 1-2 суток), обезвоживаются и заключаются в бальзам, или обрабатываются в растворе золотохлористоводородной кислоты, после чего возможна обычная в этих случаях докраска срезов гематоксилином, азуром или кармином, обезвоживание и заключение в бальзам.

Результат: нервные волокна и терминалы черного цвета, соединительная ткань окрашивается равномерно в желтый или светло-желтый цвет, ядра клеток в зависимости от избытка аммиака, добавленного к аммиачному серебру, окрашиваются от желтого до светло коричневого цвета. Метод дает хорошо воспроизводимые результаты как при импрегнации материала, недавно залитого в парафин, в парафин-целлоидин, так и того, который находился в блоках в течение нескольких лет.

Примерами конкретного выполнения предлагаемого метода является выявление нервных элементов в составе соединительнотканного регенерата кожи. Импрегнация грануляционной ткани по А.К.Коломийцеву и соавт. [1] (рис.1) дает достаточно четкое выявление нервных элементов, но наиболее тонкие терминалы гипоимпрегнированы, соединительнотканые элементы окрашены интенсивно, что затрудняет визуальную оценку состояния нервных структур. Импрегнация грануляционной ткани по предлагаемому методу (рис.2) дает интенсивное окрашивание как толстых так и тонких регенерирующих осевых цилиндров и незначительную окраску фона.