

**ОПИСАНИЕ  
ИЗОБРЕТЕНИЯ  
К ПАТЕНТУ**

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ  
СОБСТВЕННОСТИ

(19) **ВУ** (11) **20799**

(13) **С1**

(46) **2017.02.28**

(51) МПК

**G 01N 1/30** (2006.01)

(54)

**СПОСОБ ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ ОКРАСКИ  
СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ**

(21) Номер заявки: а 20140161

(22) 2014.03.10

(43) 2015.10.30

(71) Заявители: Государственное учреждение "Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека"; Учреждение образования "Гомельский государственный медицинский университет" (ВУ)

(72) Авторы: Зиновкин Дмитрий Александрович; Гуреев Сергей Александрович; Лызиков Анатолий Николаевич; Надыров Эльдар Аркадьевич (ВУ)

(73) Патентообладатели: Государственное учреждение "Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека"; Учреждение образования "Гомельский государственный медицинский университет" (ВУ)

(56) SU 1805317 A1, 1993.

SU 1629788 A1, 1991.

SU 1436999 A1, 1988.

САПОЖНИКОВ А.Г. и др. Гистологическая и микроскопическая техника. Руководство. - Смоленск: САУ, 2000. - С. 204-234.

ЛИЛЛИ Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. - М.: МИР, 1969. - С. 497-506.

(57)

Способ гистологической окраски соединительной ткани, заключающийся в том, что гистологический срез помещают в ксилол для удаления парафина, затем проводят срез через спирты нисходящей крепости до 80 %-ного этанола, окрашивают гематоксилином Майера в течение 8-11 мин, промывают в проточной и дистиллированной воде, окрашивают 1 %-ным раствором метиленового синего в течение 7-10 мин и промывают в дистиллированной воде в течение 5-15 с, после чего на срез капают смесью пикрофуксина по Ван Гизону и глицерина, взятых в соотношении 5:1, и инкубируют его на протяжении 1,0-1,5 мин, быстро промывают в дистиллированной воде, а затем в двух порциях 96 %-ного этанола и одной порции абсолютного этанола, просветляют в двух порциях ортоксилора в течение 1-2 мин в каждой и закрепляют в полистироле.

Изобретение относится к медицине, а именно к патологической анатомии и гистологии, и может быть использовано для выявления и дифференциации зрелых и незрелых коллагеновых волокон.

Известен способ окраски гистологических препаратов по Ван Гизону, согласно которому удаляют парафин из срезов в ксилоле и проводят срез через спирты нисходящей крепости до 80 % этанола, окрашивают железным гематоксилином Вейгерта в течение 3-15 минут, промывают в проточной воде в течение нескольких минут, промывают дистиллированной водой, окрашивают красителем Ван Гизона в течение 5 мин, быстро промывают

**ВУ 20799 С1 2017.02.28**

вают в дистиллированной воде, быстро промывают в двух порциях 96 % этанола, одной порции абсолютного этанола, просветляют в двух порциях орто-ксилола по 1-2 мин в каждой порции и закрепляют препарат нейтральным бальзамом. В результате окраски ядра клеток приобретают черный цвет, коллаген - красный, другие тканевые элементы, в том числе мышечные и эритроциты - желтые, фибрин - желтый и оранжевый [1] - прототип.

Однако в результате известного способа окраски невозможно дифференцировать эластические волокна, зрелые и незрелые коллагеновые волокна, гистологические препараты, окрашенные по Ван Гизону с течением времени выцветают и приобретают желтый цвет. Способ не обеспечивает возможности определения зрелости многослойного плоского эпителия, так как при воздействии пикрофуксином возможна дифференцировка только коллагеновых волокон.

Задача, на решение которой направлено изобретение, заключается в разработке способа гистологической окраски соединительной ткани, позволяющего дифференцировать многослойного плоского эпителия, степень зрелости коллагеновых волокон и выявить эластические волокна.

Задача решается за счет того, что способ гистологической окраски соединительной ткани, заключающийся в том, что гистологический срез помещают в ксилол для удаления парафина, затем проводят срез через спирты нисходящей крепости до 80 %-ного этанола, окрашивают гематоксилином Майера в течение 8-11 мин, промывают в проточной и дистиллированной воде, окрашивают 1 %-ным раствором метиленового синего в течение 7-10 мин и промывают в дистиллированной воде в течение 5-15 с, после чего на срез капают смесью пикрофуксина по Ван Гизону и глицерина, взятых в соотношении 5:1, и инкубируют его на протяжении 1,0-1,5 мин, быстро промывают в дистиллированной воде, а затем в двух порциях 96 %-ного этанола и одной порции абсолютного этанола, просветляют в двух порциях ортоксилола в течение 1-2 мин в каждой и закрепляют в полистироле.

Затем гистологический срез помещают под предметное стекло. При таком окрашивании ядра окрашиваются в сине-черный цвет, зрелые коллагеновые волокна - розовые, незрелые коллагеновые волокна - сине-фиолетовые, эластические волокна - оливково-зеленого цвета, многослойный плоский эпителий в зависимости от степени ороговения имеет цвет от темно-зеленого до коричневого.

В качестве вещества для окраски ядер использован гематоксилин Майера, который обеспечивает стойкое синее окрашивание ядер, так как не содержит в своем составе ни этилового, ни метилового спирта и хорошо проникает в ткани, не требует процедуры подсинения в слабом растворе аммиака [2]. Гликопротеиды являются белками мембран, при этом, при различной степени зрелости соединительнотканых волокон они обладают различными рН, ввиду чего окрашивание тканей происходит дифференциально [3]. Пикрофуксин по Ван Гизону обеспечивает визуализацию волокон соединительной ткани и дифференциальную окраску мышечной и соединительной ткани, добавление к нему глицерина в соотношении 5:1 позволяет создать концентрацию, увеличивающую гигроскопичность раствора и приводящую к улучшенному проникновению красителя в ткани [4, 5].

### **Пример 1.**

Пациент Б., 1949 г. р., обратился в поликлиническое отделение ГУ "РНПЦ РМиЭЧ" по поводу удаления образования кожи кисти левой руки. Пациенту под местной анестезией было произведено иссечение образования кожи диаметром до 0,6 см в пределах здоровых тканей, осуществлен гемостаз, наложен шов. При патогистологическом исследовании препарата, рутинно окрашенного гематоксилином и эозином, в подкожной клетчатке отмечалось доброкачественное образование с четко очерченными границами из веретеновидных клеток образующих муаровый рисунок. При окраске гистологического среза по Ван Гизону веретеновидные клетки опухоли окрасились в кирпично-красный цвет, мышечные волокна - в желтый цвет, ядра во всех клетках - черные. С целью установления

гистогенеза опухоли потребовалось проведение окраски в соответствии с заявляемым способом.

После удаления из гистологического среза парафина срез провели через спирты нисходящей крепости до 80 % этанола. После регидратации окрасили гематоксилином Майера в течение 9 мин. Промыли в проточной воде, затем в дистиллированной, затем срез дополнительно окрасили в течение 8 мин 1 % раствором метиленового синего, быстро промыли в дистиллированной воде. На гистологический срез капнули смесью пикрофуксина по Ван Гизону и глицерина в соотношении 5:1 и инкубировали 1,5 мин, в течение 10 с быстро промыли срез в дистиллированной воде, затем в двух порциях 96 % раствора этанола, одной порции абсолютного этанола, просветлили в двух порциях орто-ксилола, причем время пребывания срезов в каждой порции составило 2 мин. После закрепления препарата поместили срез под предметное стекло.

Таким образом, окраска предлагаемым способом выявила темно-зеленое окрашивание эпидермиса, при окрашивании опухолевой ткани определялись веретеновидные клетки, имевшие как розовое, так и сине-фиолетовый цвет, мышечные волокна были окрашены в желтый цвет, ядра во всех клетках имели сине-черный цвет. Таким образом, было установлено, что данная опухоль состоит из соединительнотканых волокон, патогистологическое заключение: дерматофиброма.

### **Пример 2.**

Пациентка Д., 1954 г.р., обратилась в поликлиническое отделение ГУ "РНПЦ РМиЭЧ" по поводу косметического удаления рубца передней брюшной стенки. Пациентке под местной анестезией был иссечен рубец в пределах здоровых тканей, произведен гемостаз и наложен косметический шов. При окраске среза по Ван Гизону, соединительнотканые волокна, идущие параллельно истонченному эпидермису, окрасились в кирпично-красный цвет, были отмечены единичные мышечные волокна желтого цвета, ядра клеток имели черное окрашивание. Однако это не позволило провести дифференциальную диагностику между обычным и гипертрофическим рубцом.

После удаления из гистологического среза парафина срез провели через спирты нисходящей крепости до 80 % этанола. После регидратации окрасили гематоксилином Майера в течение 11 мин. Промыли в проточной воде, затем в дистиллированной, затем срез дополнительно окрасили в течение 10 мин 1 % раствором метиленового синего, быстро промыли в дистиллированной воде. На гистологический срез капнули смесью пикрофуксина по Ван Гизону и глицерина в соотношении 5:1 и инкубировали 1 мин, в течение 15 с быстро промыли срез в дистиллированной воде, затем в двух порциях 96 % раствора этанола, одной порции абсолютного этанола, просветлили в двух порциях ортоксилола, причем время пребывания срезов в каждой порции составило 1,5 мин. После закрепления препарата поместили срез под предметное стекло.

При окраске предлагаемым способом эпидермис окрасился зеленым, часть соединительнотканых волокон имели розовое окрашивание, часть - сине-фиолетовое, отмечены очаги эластических волокон оливково-зеленого цвета, определены единичные мышечные волокна желтого цвета, ядра клеток имели сине-черное окрашивание. Патогистологическое заключение: гипертрофический рубец.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет дифференцировать коллагеновые и эластические волокна, зрелые и незрелые коллагеновые волокна, степень зрелости многослойного плоского эпителия. Способ не требует применения дорогих и сложных в изготовлении жидкостей и при своей простоте легко воспроизводим и демонстративен.

# ВУ 20799 С1 2017.02.28

Источники информации:

1. [http://www.muldyr.ru/a/a/okraska\\_po\\_van\\_gizonu](http://www.muldyr.ru/a/a/okraska_po_van_gizonu).
2. [http://www.histomix.ru/product\\_10.html](http://www.histomix.ru/product_10.html).
3. [http://histopathology.narod.ru/documents/gistohimija\\_uglevodov.html](http://histopathology.narod.ru/documents/gistohimija_uglevodov.html).
4. [http://www.histomix.ru/product\\_5.html](http://www.histomix.ru/product_5.html).
5. <http://www.himi.ru/glicerin/glicerin-full.htm>.