

**ОПИСАНИЕ
ИЗОБРЕТЕНИЯ
К ПАТЕНТУ**

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) ВУ (11) 22819

(13) С1

(46) 2019.12.30

(51) МПК

G 01N 1/30 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ ОКРАСКИ ПЛОТНОЙ
ОФОРМЛЕННОЙ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ СВЯЗОЧНОГО
АППАРАТА ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЫРАЖЕННОСТИ
ДИСТРОФИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ СВЯЗОК**

(21) Номер заявки: а 20170300

(22) 2017.08.14

(43) 2019.04.30

(71) Заявители: Юрковский Алексей Михайлович; Ачинович Сергей Леонидович; Назаренко Ирина Вячеславовна (ВУ)

(72) Авторы: Юрковский Алексей Михайлович; Ачинович Сергей Леонидович; Назаренко Ирина Вячеславовна (ВУ)

(73) Патентообладатели: Юрковский Алексей Михайлович; Ачинович Сергей Леонидович; Назаренко Ирина Вячеславовна (ВУ)

(56) ЮРКОВСКИЙ А.М. и др. Журнал Гродненского государственного медицинского университета. - 2011. - № 4. - С. 74-77.

ВУ 20799 С1, 2017.

SU 1805317 А1, 1993.

Методы гистологической окраски. BioVitrum, 2009. - С. 10-32, [<https://studylib.ru/doc/6213499/okraski-biovitrum>].

Морфологическая диагностика. Подготовка материала для гистологического исследования и электронной микроскопии: руководство. - Санкт-Петербург: СпецЛит, 2013. - С. 69-72.

(57)

Способ гистологической окраски плотной оформленной соединительной ткани связочного аппарата для оценки выраженности дистрофических изменений связок, заключающийся в том, что готовят пленчатые препараты из плоскопараллельных срезов исследуемого участка связки, после чего сначала окрашивают их 0,45 %-ным раствором толуидинового синего, а затем 0,1 %-ным раствором ядерного прочного красного.

Изобретение относится к медицине, а именно к патологической анатомии, и может быть использовано для диагностики дистрофических изменений связочного аппарата.

Синдром боли в нижней части спины может быть следствием повреждения подвздошно-поясничных (ППС), задних длинных крестцово-подвздошных (ЗДКПС) и крестцово-бугорных (КБС) связок. Риск повреждения указанных связок зависит от выраженности имеющихся в них на момент перегрузки дистрофических изменений. Своевременное выявление таких изменений невозможно без уверенности в том, что используемые лучевые критерии надежны. Проверить же это можно только гистологически. Обычно с этой целью используют методику полуколичественной (балльной) оценки [1] либо, при наличии незначительного количества материала, методику косвенной оценки по величине показа-

ВУ 22819 С1 2019.12.30

теля, отражающего ядерно-цитоплазматическое отношение, или же отношение наибольшего поперечного размера ядра к продольному. При этом и в том, и в другом случае срезы связок окрашиваются гематоксилином и эозином. Однако при указанном способе окраски цитоплазма фибробластов и волокна коллагена окрашиваются почти одинаково, а потому и возникают ошибки при расчетах морфометрических показателей указанных клеток [2]. Отсюда и необходимость в разработке нового способа окраски плотной оформленной соединительной ткани связочного аппарата.

За прототип нами принят способ окраски плотной оформленной соединительной ткани связочного аппарата, заключающийся в окраске морфологического материала гематоксилином и эозином, при котором ядра окрашиваются в фиолетовый цвет с красноватым оттенком, а цитоплазма клеток, межклеточное вещество и коллагеновые волокна - в красные цвета [3].

Преимуществами вышеописанного способа окраски являются:
доступность материалов, необходимых для окраски;
отработанность технологии окраски.

Недостатками вышеописанного способа окраски являются:
большая длительность приготовления гистологических препаратов (около 3 суток);
проблематичность оценки фибробластов на участках со спиральным расположением волокон коллагена, поскольку указанные клетки могут оказываться в срезе на разных уровнях;

недостаточная четкость контуров цитоплазматической мембраны фибробластов (причина - почти одинаковая по интенсивности окраска цитоплазматической мембраны клеток и волокон коллагена).

Задача предлагаемого изобретения состоит в разработке нового способа окраски, учитывающего проблематичность оценки фибробластов на участках со спиральным расположением волокон коллагена, с целью более точной оценки выраженности дистрофических изменений связок.

Технический результат способа заключается в сокращении длительности процедуры окраски и снижении риска диагностических ошибок, обусловленных разноуровневым расположением фибробластов на участках со спиральным расположением волокон коллагена.

Задача решается предлагаемым способом окраски плотной оформленной соединительной ткани связочного аппарата, заключающимся в приготовлении гистологических препаратов, при этом готовят пленчатые препараты из плоскопараллельных срезов исследуемого участка связки, после чего сначала окрашивают их 0,45 %-ным раствором толуидинового синего, а затем 0,1 %-ным раствором ядерного прочного красного.

При гистологическом исследовании определяют изменения ядра и цитоплазмы клеток фибробластического дифферона, на основании полученных данных делают вывод о выраженности дистрофических изменений связок.

Изобретение иллюстрируется следующими фигурами:

фиг. 1 - окраска плотной оформленной соединительной ткани толуидиновым синим и ядерным прочным красным;

фиг. 2 - окраска плотной оформленной соединительной ткани гематоксилином и эозином.

Способ окраски плотной оформленной соединительной ткани связочного аппарата для оценки выраженности дистрофических изменений связок осуществляют следующим образом:

1. Исследуемый участок связки зажимают пинцетом, а затем лезвием одноразового микротомного ножа или острыми ножницами производят продольные плоскопараллельные срезы толщиной менее 1 мм.

2. Полученные фрагменты связок наносят на предметное стекло и покрывают другим предметным стеклом. Далее предметные стекла прижимают друг к другу и делают отпечатки.

3. Полученные отпечатки фиксируют в ацетоне и высушивают при температуре 37° в течение 2 ч. После этого препараты обрабатывают 0,1н HCl при комнатной температуре в течение 8 мин и прополаскивают в дистиллированной воде трижды по 2 мин.

4. Далее на препарат наносят (на 2 мин) 0,45 %-ный раствор толуидинового синего на ТРИС-HCl буфере пополам с водой, pH = 9,1. Адекватность окраски оценивают под малым увеличением микроскопа: в случае если клетки оказываются недостаточно прокрашенными, время окрашивания увеличивают до 5 мин, в случае если клетки оказываются избыточно прокрашенными, производят отмывание препарата в 70 %-ном этаноле. По достижении требуемого результата препарат промывают проточной водой в течение 10 мин.

5. Далее на препарат наносят (на 5-10 мин) 0,1 %-ный раствор краситель ядерный прочный красный, после чего препарат промывают проточной водой в течение 10 мин.

6. На завершающем этапе препараты проводят через батарею спиртов, обрабатывают ксилолом (по 2 мин трижды) и заключают в перманентную монтирующую среду.

7. Затем осуществляют микроскопию гистологического препарата в проходящем свете на большом увеличении.

Клинический пример 1.

Пациент, 60 лет.

Для оценки выраженности дистрофических изменений подвздошно-поясничной связки был произведен забор материала из указанной связки. Затем были приготовлены пленчатые препараты, которые вначале были окрашены 0,45 %-ным раствором толуидинового синего, а затем 0,1 %-ным раствором ядерного прочного красного. На основании результатов гистологического исследования были получены следующие показатели:

площадь ядра - 491 мкм²;

площадь цитоплазмы - 1002,5 мкм²;

ядерно-цитоплазматическое отношение - 0,49 мкм².

В качестве метода сравнения был выбран метод окраски гематоксилином и эозином, получены следующие показатели:

площадь ядра - 539,7 мкм²;

площадь цитоплазмы - 999,5 мкм²;

ядерно-цитоплазматическое отношение - 0,54 мкм².

ядерно-цитоплазматическое отношение - 0,49 мкм².

Как следует из приведенных данных, при окраске гематоксилином и эозином показатель ядерно-цитоплазматического отношения оказался завышенным, а при окраске толуидиновым синим и ядерным красным оказался соответствующим возрастной норме.

Предложенный способ окраски плотной оформленной соединительной ткани связочного аппарата по сравнению с существующими обладает следующими преимуществами:

возможностью быстрого приготовления препарата, время от момента взятия материала до готового препарата составляет около 3 ч;

возможностью использования незначительных количеств материала в отличие от гистологического исследования с использованием крупных гистологических срезов (после фиксации в формалине и парафиновой проводки);

возможностью исследования отдельных клеток не только в одном препарате, как при цитологическом методе, но и во фрагментах ткани, как при гистологическом исследовании;

меньшим, чем при стандартной окраске, разбросом морфометрических данных, а значит, и большей точностью оценки выраженности дистрофических изменений.

Предложенный способ окраски плотной оформленной соединительной ткани связочного аппарата для оценки выраженности дистрофических изменений уменьшает риск диагностических ошибок, информативен, не требует дополнительных материальных затрат и дополнительного исследования с целью подтверждения точности оценки выраженности дистрофических изменений подвздошно-поясничной, задней длинной крестцово-под-

вздошной и крестцово-бугорной связок. Способ доступен для широкого внедрения в клиническую практику.

Эффективность представленного способа подтверждена результатами обследования 70 пациентов (возрастной диапазон 41-84 лет).

Источники информации:

1. Юрковский А.М., Ачинович С.Л., Кушнеров А.И. Подвздошно-поясничные, задние длинные крестцово-подвздошные и крестцово-бугорные связки в различные возрастные периоды: сонографические и гистологические сопоставления // Медицинский журнал. – 2015. - № 3. - С. 137-140.

2. Юрковский А.М., Ачинович С.Л. Диагностическая значимость морфометрических показателей клеток фибробластического дифферона при оценке выраженности дистрофических изменений подвздошно-поясничных связок // Проблемы здоровья и экологии. - 2014. - № 1. - С. 102-107.

3. Юрковский А.М., Анিকেев О.И., Ачинович С.Л. Сопоставление сонографических гистологических данных при дистрофических изменениях подвздошно-поясничной связки // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. - 2011. - № 4. - С. 74-77.



Фиг. 1



Фиг. 2