

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ОКРАШИВАНИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ В ПЕЧЕНИ ПРИ ЕЕ ФИБРОЗАХ

Лебедева Е.И.

*Витебский государственный медицинский университет,
кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, г. Витебск*

Ключевые слова: фиброз печени, соединительная ткань, методы окрашивания.

Резюме: целью исследования явилась отработка методики окрашивания соединительной ткани в печени на экспериментальном и патоморфологическом материале. Результаты исследования показали, что наиболее результативной, доступной и информационной оказалась комбинация фиксирующей жидкости Рего с окраской по методу Маллори в собственной модификации.

Resume: purpose of the study was to work out methods for staining of connective tissue in the liver of the experimental and pathological material. The results showed that the most effective, affordable, and information was a combination fixing fluid Rego painted by the method of Mallory's own modification.

Актуальность. В условиях патологии при многих острых и хронических заболеваниях печени наблюдается образование избыточного количества соединительной ткани, что обозначается термином “фиброз печени (ФП)”. Этиология ФП очень полиморфна, по существу, все факторы, вызывающие поражение печени, играют определенную роль в генезе ФП. Патоморфоз ФП изучен недостаточно [3]. С помощью электронной микроскопии показана ведущая роль фибробластов и их предшественников, липоцитов, а также и других клеток (в частности, макрофагов) в продукции волокон соединительной ткани [4]. Факторы, стимулирующие активацию фибробластов в печени, окончательно не установлены. Известно, что усиленный неофиброгенез наблюдается при повреждении гепатоцитов, воспалении, пролиферации желчных протоков.

В печени найден коллаген I, III, IV и V типов. Коллаген I типа входит в состав капсулы, стромы портальных трактов и центральных вен. Коллаген III типа образует ретикулярные волокна, входит с коллагеном I типа в состав стромы портальных трактов и сосудов. Обнаружена тесная связь волокон этого типа с отростками клеток Ито. Содержание коллагена IV типа меньше, чем коллагена I и III типа, он находится в местах, где имеется базальная мембрана. Его выявляют вокруг артерий, лимфатических сосудов, желчных протоков, нервных окончаний, между эндотелиальной выстилкой синусоидов и печеночными пластинками, хотя, как известно, истинной базальной мембраны в синусоидах нет. Коллаген V типа обнаружен в различных участках печени, особенно много его вокруг сосудов. Встречается он и на синусоидальной поверхности гепатоцитов. Содержание коллагена в печени человека составляет $5,5 \pm 1,6$ мг/г ткани. Следует отметить, что оно значительно выше, чем у многих лабораторных животных, которые используются для моделирования цирроза печени. У крыс – наиболее частого объекта подобных экспериментов – содержание коллагена в 5 раз меньше [1].

Публикаций, посвященных морфологическим аспектам процессов хронизации и фиброгенеза при заболеваниях печени, немного. В то же время большое значение в клинической патологии имеет проблема возможности обратимости и ранней диагностики хронических воспалительных процессов. Ранняя диагностика позволяет принимать меры, обеспечивающие стабилизацию этих процессов на достаточно длительный период времени. Тем самым становится реальной профилактика раннего развития многочисленных осложнений цирротического процесса. Появляется возможность улучшения качества жизни больных циррозом печени и продления сроков заболевания. Это доказывает необходимость разработки новых, более совершенных способов прогнозирования риска развития цирроза печени, степени активности патологического процесса, развития возможных осложнений и эффективности проводимой терапии [2].

Морфологические методы исследования позволяют значительно расширить диагностические возможности клинициста. Морфологические изменения опережают изменения функциональных печеночных проб, что еще в 1965 г было отмечено А.С. Логиновым [1]. Даже при выраженном поражении печени могут отсутствовать изменения биохимических печеночных проб, в том числе у больных с хроническим гепатитом и даже циррозом. Н. Рорпер, отмечая меньшую информативность функ-

циональных проб при заболеваниях печени, чем при заболеваниях других органов, указывал, что биопсия может дать “более реальную картину поражения, чем функциональные пробы”, а ShSherlock назвал биопсию печени “золотым методом диагностики” в гепатологии (цитата по [1]).

В патогистологической технике описываются специальные методы окрашивания соединительной ткани (Г. А. Меркулов, 1969; Б. Ромейс, 1953; Э. Пирс, 1962). Следует отметить, что отсутствуют исследования, в которых упоминалось бы о влиянии предварительных этапов приготовления гистопрепаратов, например, фиксирующей жидкости, на выбор метода выявления соединительной ткани. Не определены оптимальные методики для оценки результатов исследования с использованием современных морфометрических компьютерных программами анализа изображений.

Целью исследования явилось отработка методики окрашивания соединительной ткани в печени на экспериментальном и патоморфологическом материале.

Для реализации цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Смоделировать у белых крыс цирроз печени.
2. Изучить специальные методики, выявляющие соединительную ткань в печени.
3. Определить приемлемую по доступности и контрастности гистосрезовметоду для анализа изображения на компьютерном мониторе.

Материал и методы. Для исследования использовали кусочки печени человека и белой крысы. Модель токсического цирроза у животных вызывали длительным внутрижелудочным введением 40%-ного масляного раствора четыреххлористого углерода дважды в неделю и этанола методом свободного выпивания. Животных содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с санитарно-гигиеническими нормами и требованиями животных (приложение к приказу Министерства Здравоохранения Республики Беларусь № 31 от 31.10.2006). В качестве клинического материала использовали аутопсийный и биопсийный материал печени людей, страдающих токсическим, вирусным гепатитом и циррозом, взятый в УЗ «Витебская областная клиническая больница».

Для выявления соединительной ткани кусочки печени толщиной 5-8 мм фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, жидкости Рего и смеси Гелли в течение 48 часов. Проводку осуществляли в автомате для гистологической обработки ткани STP-120 (тип карусель, Германия), заливку – на станции для заливки ткани парафином ЕС350 (Германия). Из каждого блока с помощью ротационного микротомы НМ 340Е (MICROM, Laborgerate GmbH; Германия) получали серийные срезы (толщина срезов 4-5 мкм). После депарафинирования срезы окрашивали методом Маллори, Массона, Кассона. После фиксации материала в смеси Гелли для освобождения срезов от осадков сулемы использовали спиртовую йодную настойку, в которую на несколько минут погружали депарафинированные срезы. Для удаления йода срезы помещали в 0,25%-ный раствор гипосульфита натрия до исчезновения желтого окрашивания. Были апробированы несколько комбинаций окрашивания срезов:

1. Фиксирующая жидкость Рего – окраска методом Маллори, Массона, Кассона.

2. Фиксирующая жидкость Гелли – окраска методом Маллори, Массона, Кассона.

3. Фиксирующая жидкость 10%-ный нейтральный формалин – окраска методом Маллори, Массона, Кассона. Во всех случаях ядра предварительно докрашивали гематоксилином Рего, Гарриса и Вейгерта. После окраски срезы обезвоживали, просветляли и заключали в бальзам.

Микроскопическое исследование проводили с помощью микроскопа OLYMPUS BX 51 со встроенной видеокамерой OLYMPUS XC 30 (Япония).

Результаты исследования показали, что наиболее результативной, доступной и информационной оказалась комбинация фиксирующей жидкости Рего – окраска по методу Маллори в собственной модификации (таб.1).

Таблица 1 – Этапы окрашивания соединительной ткани

Основные этапы окрашивания	Экспозиция красителя
1. Деипарафинированные срезы из дистиллированной воды переносят в 0,5%-ный водный раствор кислого фуксина.	5 мин
2. Промывка в дистиллированной воде.	2-5 с
3. Закрепить окраску 1%-ным раствором фосфорномолибденовой кислоты.	10 мин
4. Промывка в дистиллированной воде	2-3 с
5. Срезы поместить в красящую смесь (в 100 мл дистиллированной воды растворить 0,5 г анилинового синего, 3 г оранжевого G и 2 г щавелевой кислоты).	2 мин
6. Промывка в дистиллированной воде.	2-5 с
7. Дифференцировка в 96° спирте. Обезвоживание, просветление и заключение в бальзам (полистерол).	
8. Ядра можно предварительно окрасить гематоксилином Гарриса.	2 мин

При правильном проведении окраски коллагеновые волокна окрашены чрезвычайно резко в синий цвет, ретикулярные волокна – в голубой, эритроциты – в красно-оранжевый. Зернистость в клетках в зависимости от ее свойства желтая, красная или красная с синим оттенком (рис. 1,2).

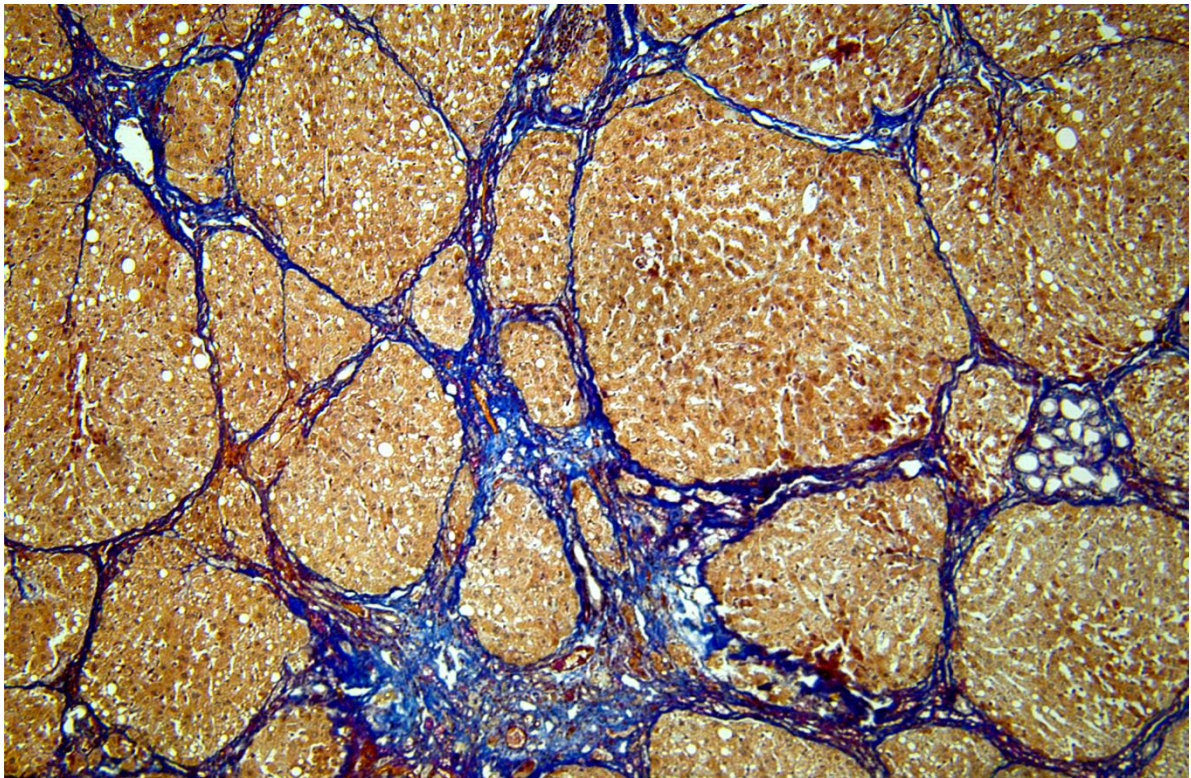


Рис. 1 – Срез печени крысы при экспериментальном циррозе.
Окраска соединительной ткани методом Маллори в собственной модификации. Об. 20×.

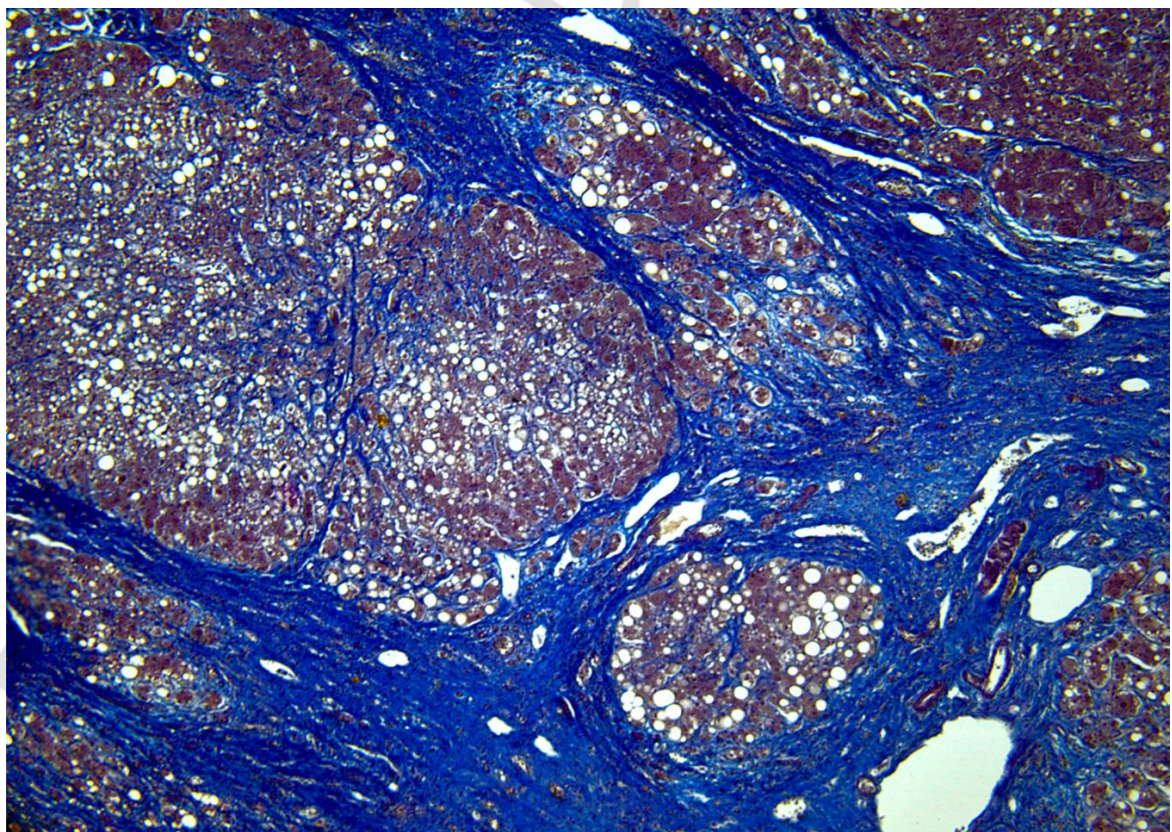


Рис. 2 – Срез печени аутопсийного материала.
Окраска соединительной ткани методом Маллори в собственной модификации. Об. 10×.

Преимуществом данного варианта является сокращения времени окрашивания срезов за счет совмещения этапов, простоте приготовления красящих растворов, доступностью реактивов и их более низкой стоимостью при сравнении с окраской по методу Массона. Окраска по Массону была более трудоемкой, кроме того, срезы были менее контрастными. Даже при соблюдении всех правил проведения окраски коллагеновые волокна не всегда окрашивались в темно-синий цвет, теряли очертания и сливались с окружающими структурами.

Метод окраски по Кассону дал неудовлетворительные результаты.

Выводы. Для выявления соединительной ткани в паренхиме печени лучше использовать фиксирующую жидкость Рего. Если нет такой возможности, после формалиновой фиксации необходимо хромировать срезы. Окраска методом Маллори в собственной модификации предпочтительнее в использовании, так как позволяет получить более контрастную окраску срезов, что необходимо для изучения топографии, степени выраженности и возможности подсчета количества соединительной ткани с помощью современных морфометрических программ. Собственная модификация метода Маллори, таким образом, включает следующие позиции:

1. Увеличена концентрация и экспозиция раствора кислого фуксина;
2. Увеличено время обработки срезов раствором 1%-ной фосфорномолибденовой кислоты;
3. В красящем растворе увеличена концентрация оранжевого G.

Литература

1. Логинов, А.С. Клиническая морфология печени / А.С. Логинов. – М: Медицина, 1985. – 240 с.
2. Медянцева Л.Г. Особенности фенотипа HLA и исходы цирроза печени // Л.Г. Медянцева // Астраханский медицинский журнал. – 2010. – Т. 5, №2. – С. 58-65.
3. Садовникова И.И. Циррозы печени. Вопросы этиологии, патогенеза, клиники, диагностики, лечения / И.И. Садовникова // Русский медицинский журнал. – 2003. – Т. 5, №2. – С. 88 – 98.
4. Controlled production of cirrhosis in the rat liver / H. Rose [et al.] // *Ard Gastroenterol.* – 1991. – Vol. 28, N 1. – P. 39-43.