**Министерство юстиции Республики Казахстан**

**РГКП «Центр судебной медицины Министерства юстиции РК»**

Методика окраски **хромотропом** 2Б-водный голубой в модификации Слннчеико аутол **тированных** материалов с судебно-гистологической верификацией патологических процессов

Составитель: **Панова** К,Е., судебно-медицинский эксперт-гистолог, к.м.н. (Центр судебной медицины М3 РК). Рецензент: Манекенова К.Б.; заведующая кафедрой патологической анатомии МУ А, профессор, д.м.н.

Астана 2016

ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1 | Наименование  методики | Методика окраски хромотропом 2Б- водный голубой в модификации Слинченко аутолизированных материалов с судебно-гистологической верификацией патологических процессов |
| 2 | Шифр  специальности  методики | 24.1 Судебно-гистологическое исследование (медицинское) |
| 3 | Информация о разработчике | Составитель: Оспанова К.Е., судебно­медицинский эксперт-гистолог, к.м.н, (Центр судебной медицины М3 РК). Рецензент: Манекенова К,Б., заведующая кафедрой патологической анатомии МУА, профессор, д.м.н. |
| 4 | Сущность методики | Выявление микроскопических изменений в аутолизированном аутопсийном материале с судебно-гистологической верификацией патологических процессов.  Данный метод можно применять как дополнительный при патологических процессах миокарда в случаях отравления алкоголем и его суррогатами, морфином и героином. |
| 4.1 | Экспертные задачи,  решаемые  методикой | Подтверждение и(или) установление судебно-медицинского диагноза |
| 4.2 | Объекты  исследования | Аутопсийный материал (фрагменты внутренних органов и частей трупа, забор которых производится во время вскрытия |
| 4.3 | Методы  исследования | Гистологический |
| 4.4 | Краткое поэтапное описание методики | Методика окраски. Депарафинизация, вода дистиллированная, гематоксилин Бемера — 10 минут, вода водопроводная — 10 минут, вода дистиллированная - 1 минута, раствор хромотропа 2Б - 1 минута, вода дистиллированная 30 секунд, раствор 0.5% фосфорно-вольфрамовой кислоты- до минуты (лучший результат - 40 секунд).  вода дистиллированная ополоснуть, раствор водного голубого- 15 секунд, спирты, ксилолы, заключение.  Результат: Коллaгeновые волокна - ярко - красные, мышечная ткань - пурпурно­-красная, фибрин от ярко-красного-бардового (по степени зрелости), гиалин — красного цвета, однородный, фиброзная ткань - ярко синяя, эритроциты — огненно красно- рыжие. Окраска (за исключением гематоксилина) не выцветает, что позволяет успешно заменить ее окраской по Ван-Гизон. Высокая красящая способность в отношении тромбов (окрашиваются в вишнево-красный цвет), позволила не использовать гистохимическую окраску по Шуенинову с модификациями.  Окрашивание в огненно-красный цвет как четких эритроцитов, так и их обломков позволяет избежать способа выявления продуктов разрушения эритроцитов методикой по Лепене с применением канцерогенного раствора бензидина. Поврежденные кардиомиоциты отмечаются во всех полях зрения за счет чередования гипертрофии и атрофии кардиомиоцитов с исчезновением поперечной исчерченности, изменения тинкториальных свойств саркоплазмы с участками миоцитолиза и глыбчатого распада миофибрилл. Кардиомиоциты имеют синий цвет с четкими миофибриллами темно-красного цвета. Градациями дистрофических изменений миокарда являются сегментарные контрактуры 1-2-3 степеней. Так при первой степени контрактур выявлены анизотропия дисков, без заметного укорочения изотропных дисков. При второй степени слияние анизотропных, при истончении изотропных дисков.  При необратимой третьей степени - анизотропные диски обнаруживаются в едином конгломерате с исчезновением изотропных.  В очагах сегментации и фрагментации мышечные волокна разобщены за счет строго перпендикулярных разрывов с очагами гиперсокращения миофибрилл до 5 в одном мышечном волокне. |
| 5 | Дата одобрения методики Ученым Советом | Протокол №2 от 05.12.2016 г. |
| 6 | Должностное лицо,  составившее паспорт методики | Имамбаева Н.Е., СМЭ высшей квалификационной категории отдела научного и методического обеспечения РГКП «Центр судебной медицины» МЮ РК |

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

Методика окраски хромотропом 2Б-водный голубой в модификации Слинченко аутолизнроваиных материалов с судебно-гистологической верификацией патологических процессов

1. Общие положения 6
2. Перечень **использованных источников**

d

**МЕТОДИКА ОКРАСКИ ХРОМОТРОПОМ 2Б-ВОДНЫЙ ГОЛУБОЙ В МОДИФИКАЦИИ СЛИНЧЕНКО АУТОЛИЗИРОВАННЫХ МАТЕРИАЛОВ С СУДЕБНО-ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ ВЕРИФИКАЦИЕЙ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ**

Данный метод можно применять как дополнительный при патологических процессах миокарда в случаях отравления алкоголем к его суррогатами, морфином и героином. Гистохимическая окраска по Слинченко, столь часто применяемая для дифференциальной диагностики лейомиосархом и фибросарком заимствована из практики патологоанатомов. Для контроля необходимо применять окраску гематоксилином и эозином.

Как известно, аутолизированный материал сводит к минимуму гистологическое исследование. Применение 10-20 % раствора формалина в виду высокой коагулирующей способности чаще всего необоснованно. В случае использования гистохимической окраски по Слинченко необходимо применять *5%* раствор продажного формалина, а в случае сильного загрязнения его кровью добавлять для ее осаждения насыщенный раствор пикриновой кислоты - І мл на 200 мл разведенного формалина. Данная смесь позволяет улучшить фиксацию, не требует дифференцировки срезов в спирте, как при обычных методах с применением пикриновой кислоты. Фиксированный 3 суток материал обрабатывается по обычной гистологической проводке с применением хлороформа. Замена его ксилолом нисколько *таъ* ухудшает качество гистологических срезов, но и оказывается вполне приемлемой для изучения лимфатических узлов. Использование раствора водного голубого во многих гистологических отделениях затруднительно и связано с тем, что в продажу водного голубого поступает незначительное количество. Следует отметить наиболее распространенные его синонимы, такие как анилиновый голубой водорастворимый, Anil in **blue,** Methyl blue, Reinblau. **’**

**Приготовление** красителей.

Приготовление растворов на 100 мл.

Раствор I (Хромотроп 2Б - 0,2 г, ледяной уксусной кислоты - 30 мл, воды дметилированной - 70 мл). Приготовленный раствор темно-красный, прозрачный. Раствор **II** (Водный голубой — 0,2 г, вода дистиллированная - 100 мл, ледяной уксусной кислоты - 6 мл). Приготовленный раствор темно­синего цвета, прозрачный. Раствор **III** - 0,5% фосфорно-вольфрамовая кислота. 0,5% - на 100 мл дистиллированной воды 0,5 г кислоты.

**Результат:** мышечная ткань, фибрин, фибриноид- темно-красного цвета,

эритроциты- огненно- красные, соединительная ткань- голубого и синего цветов.

Методика окраски. Депарафинизация, вода дистиллированная, - гематоксилин Бемера - 10 минут, вода водопроводная - 10 минут, вода дистиллированная — ] минута, раствор хромотропа 2Б - 1 минута, вода дистиллированная 30 секунд, раствор 0.5% фосфорно-вольфрамовой кислоты до минуты (лучший результат - 40 секунд), вода дистиллированная ополоснуть, раствор водного голубого - 15 секунд, спирты, ксилолы, заключение.

Результат; Коллагеновые волокна - ярко - красные, мышечная ткань - пурпурно-красная, фибрин от ярко-красного- бардового (по степени зрелости), гиалин - красного цвета, однородный, фиброзная ткань - ярко синяя, эритроциты - огненно красно- рыжие. Окраска (за исключением. гематоксилина) не выцветает, что позволяет успешно заменить ее окраской по Ван-Гизон. Высокая красящая способность в отношении тромбов (окрашиваются в вишнево-красный цвет), позволила не использовать гистохимическую окраску по Шуенинову с модификациями- Окрашивание в огненно-красный цвет как четких эритроцитов, так и их обломков позволяет избежать способа выявления продуктов разрушения эритроцитов методикой по Лепене с применением канцерогенного раствора бензидина. Поврежденные кардиомиоциты отмечаются во всех полях зрения за счст чередования гипертрофии и атрофии кардиомиоцитов с исчезновением поперечной исчерченности, изменения тинкториальных свойств саркоплазмы с участками миоцитолиза и глыбчатого распада миофибрилл. Кардиомиоциты имеют синий цвет с четкими миофибриллами темно- красного цвета. Градациями дистрофических изменений миокарда являются сегментарные контрактуры 1-2-3 степеней.

Так при первой степени контрактур выявлены анизотропия дисков, без заметного укорочения изотропных дисков. При второй степени слияние анизотропных, при истончении изотропных дисков. При необратимой третьей степени - анизотропные диски обнаруживаются в едином конгломерате с исчезновением изотропных. В очагах сегментации и фрагментации мышечные волокна разобщены за счет строго. перпендикулярных разрывов с очагами гиперсокращения миофибрилл до 5 в одном мышечном волокне.

В 71% исследований выявлены мелковолновые деформации пучков миофибрилл в с уб эн до кардиальных зонах миокарда.

В 17% круп но вол новые деформации кардиомиоцитов выявлены на всей толщи миокарда. Наличие крупноволновых и мелковолновых очагов деформации кардиомиоцитов, сегментарные контрактуры миокарда с преобладанием контрактурных изменений 3 степени трактуются как аритмогенные зоны миокарда. Межуточный отек миокарда не окрашивается, что позволяет в перивазальном пространстве спазмированных в виде. артериол со звездчатым и щелевидным просветом с вертикально расположенными ядрами эндотелиоцитов обнаружить от 2 до 6 макрофагов.

В 20% выявлены разрывы и надрывы капилляров с выходом четких и разрушенных эритроцитов в интерстициальную ткань. В 100% выявлено венозное полнокровие ткани.

При аутолизированной почке склеротически измененные почечные тельца, как и вся соединительная ткань имеют синий цвет, а фиброзированная ткань окрашивается в темно-синий цвет. Капилляры **как: и** ядра нефрона, окрашиваются в светло серый цвет. Цитоплазма эпителия канальцев розово-серая с четкими апикальными краями, В 7% **выявлены** субнуклеарные и супрануклеарные **вакуоли,** окрашенные **Суданом** III- **в** интенсивно желтый цвет, что позволило, обнаружить жировой нефроз с очагами базальной инкрустации нефроэпителия.

Таким образом, применение методики окраски гистологических срезов по Слинченко с док рас кой гематоксилином Бемера применима для аутолизированного материала, и позволяет на субмикроскопическом уровне выявить многие из патологических процессов, наблюдаемых под сборным термином «кардиомиопатии».

**Перечень использованных источников:**

1. «Инструкция по организации и производству судебно-медицинской экспертизы» (Приказ М3 РК от 20 мая 2010г. № 368) - Астана, 2010.
2. Г. А. Меркулов. Курс пато л ого гистологи чес кой техники. — 1967.
3. Микроскопическая техника: Руководство / Под редакцией Д, С. Саркисова и Ю.Л.Перова. — М.: Медицина, 1996. ISBN 5-225-02-820-9).
4. Новоселов В.П,, Савченко С.В., Романова Е.А, Циммерман ВТ. Пато морфология миокарда при ушибах сердца // Новосибирск: Наука 2002.- С.98- 137
5. Васильев Ю,В., Большаков М.А, Судебно-гистологическая верификация патологических процессов в аутолизированном материале с применением метода хромотроп 2Б-водный голубой в модификации по Слинченко // материалы Всероссийской Научно-практической конференции, посвященной 75-летию РЦСМЭ. Москва: 2006. - с.269-270
6. Дзяк В.Н., Микунис Р,И„ Скупник А.М. Алкогольная кардиомиопатия // Киев: Здоровье 1980. - с. 177-199
7. Пермяков А.В., Витер В.И. Судебно-медицинская гистология (руководство для врачей)//Ижевск: 1988.-c.ll6-129,16Ы71
8. Шакуль В.А. Пигментный нефроз при отравлении алкоголем// материалы I расширенной областной научно-практической конференции судебных медиков и криминалистов. Курган: 1972 - с.28-29.
9. Пальцев М.А. Аничков Н.М. Патологическая анатомия том 2 часть 1 *И* М.:Медицина 2001.-с. 105-111