

РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ КАЗЕННОЕ  
ПРЕДПРИЯТИЕ  
«ЦЕНТР СУДЕБНЫХ ЭКСПЕРТИЗ  
МИНИСТЕРСТВА ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН»



**МЕТОДИКА**

**СУДЕБНО-ЭКСПЕРТНОГО ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО  
ИССЛЕДОВАНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИМПРЕГНАЦИИ СРЕЗОВ  
СЕРЕБРОМ (МОДИФИЦИРОВАННАЯ МЕТОДИКА)**

(шифр специальности – 24.1)

## ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

1. Наименование методики	Методика судебно-экспертного гистологического исследования с применением импрегнации срезов серебром (модифицированная методика)
2. Шифр специальности методики	24.1(15)
3. Информация о разработчике методики	Сохарев Е.Ю. – врач-судебно-медицинский эксперт гистологического отделения ИСЭ по Костанайской области ЦСЭ МЮ РК
4. Сущность методики	Импрегнация ретикулиновых и нервных волокон солями серебра
4.1. Объекты исследования	<p>1. Химические реагенты</p> <p>2. Гистологические срезы внутренних органов</p> <p>3. Лабораторная посуда</p>
4.2. Методы исследования	<p>Методы исследования:</p> <p>1. Забор и вырезка гистологического материала</p> <p>2. Фиксация гистологического материала</p> <p>3. Проводка гистологического материала в спиртах</p> <p>4. Заливка в парафин</p> <p>5. Изготовление парафинового блока</p> <p>6. Изготовление гистологических срезов путём микротомирования с помещением их на предметное стекло</p> <p>7. Импрегнация срезов серебром</p> <p>8. Докраска эозином</p>
4.3. Краткое поэтапное описание методики	<p>1. Окисление среза: 0.25% водный перманганат калия</p> <p>2. Обесцвечивающий раствор: 1% щавелевая кислота</p> <p>3. Протрава: 5% железоаммонийные квасцы</p> <p>4. Аммиачное серебро: готовить непосредственно перед использованием.</p> <p>2 мл 10% водного нитрата серебра</p> <p>1 мл 10% водного гидроксида натрия (или калия)</p> <p>0.5 мл концентрированного аммиака</p> <p>Хорошо перемешать. Большая часть осадка растворится через 1-2 минуты.</p> <p>40 мл дистиллированной воды.</p> <p>5. проявитель:</p>

	<p>10 мл концентрированного формальдегида 40 мл дистиллированной воды. Готовить перед использованием.</p> <p>6. Востанавливающий р-р.: 5% водный тиосульфат натрия</p>
5. Дата одобрения методики Ученым Советом ЦСЭ МЮ РК	Протокол №2 от 20.09.2018г.
6. Информация о составителях паспорта методики	Сохарев Е.Ю. – врач-судебно-медицинский эксперт гистологического отделения ИСЭ по Костанайской области ЦСЭ МЮ РК

## I. ВВЕДЕНИЕ.

Судебно-медицинская гистологическая экспертиза является важным разделом судебно-медицинской экспертизы, которая в свою очередь является одним из базовых разделов медицинской деятельности. В современных условиях любая медицинская деятельности как на территории Республики Казахстан, так в большей части стран мира, осуществляется на принципах *доказательной медицины*(EvidenceBasedMedicineWorkingGroup, 1993). В основе функционирования современной медицинской науки и деятельности лежат базовые принципы: методологический подход, контролируемость, рандомизированность исследований и высокая презентативность результатов.

На основании вышеизложенного, расширение спектра методик применяемых в экспертной деятельности, позволяет повысить уровень доказательности результатов и тем самым повысить ценность проводимого исследования, что играет важнейшую роль не только в медицинской, но и в юридической практике.

Одной из таких методик является *метод импрегнации серебром*, ретикулиновых волокон, нервной ткани, а также патологический грибковой флоры, при глубоких(генерализованных) микозах.

Принцип окраски :

Это аргирофильтная неспецифическая реакция тонких стетеподобных поддерживающих волокон соединительной ткани (например, имеются в печени и костном мозге). Ретикулярные волокна – это молодые и тонкие отростки коллагеновых волокон, которые содержат в себе углеводные группы и способны связывать серебро, окисляясь до альдегидов. Но так как в них содержится очень мало углеводородов, необходима сенсибилизация (железоаммонийными квасцами).

Импрегнация гистологических элементов серебром является одним из наиболее трудных и капризных гистологических методов, предъявляющих высокие требования не только к качеству препаратов, но и к степени освещённости в лаборатории и уровню частоты лабораторной посуды, что не позволяет ввести данную методику в разряд рутинных в большинстве гистологических лабораторий. Поэтому поиск путей облегчения и, что не маловажно, удешевления данного вида исследований позволит повысить наглядность в гистологической практике судебного эксперта, а, следовательно, придать больший вес его экспертизе.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ:** Определить наличие и характеристики тонких соединительнотканых волокон (поврежденных при многих патологических состояниях).

## II. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### ***A) Спектр применения методики в судебной экспертизе:***

1. Визуализация диффузных аксональных повреждений на более раннем этапе их развития
2. Выявление гистоморфологических признаков дегенеративных заболеваний нервной системы (тяжёлая энцефалопатия, демиелинизирующие заболевания нервной системы, губчатый энцефаломиелит.).
3. В настоящее время данная методика является обязательным для оценки уровня фиброза ткани печени при циррозе, а также для установления стадии миелофиброза в красном костном мозге при JAK 2 +-заболеваниях костного мозга.
4. Изучения ретикулинового каркаса стромы доброкачественных и пограничных опухолей позволяет судить о степени их потенциальной злокачественности проводить

дифференциальную диагностику между доброкачественными и злокачественными опухолями.

## 5. Выявление грибковой флоры в поражённых органах.

### **Б) Целью нашего исследования явилось:**

1. внедрение методики импрегнации серебром,
2. поиски унификации и, при возможности, удешевления методики серебрения гистологических препаратов.
3. Разработка усовершенствованной методики

### **В) Материалы:**

1. Химические реактивы
2. Гистологические срезы внутренних органов
3. Лабораторная посуда

### **Г) Методы исследования:**

1. Забор и вырезка гистологического материала
2. Фиксация гистологического материала
3. Проводка гистологического материала в спиртах
4. Заливка в парафин
5. Изготовление парафинового блока
6. Изготовление гистологических срезов путём микротомирования с помещением их на предметное стекло
7. Импрегнация срезов серебром
8. окраска эозином

### **Д) В процессе исследования производились различные количественные и качественные исследования, как самой методики, так и получаемых результатов:**

1. Оценка времени импрегнации
2. Оценка степени и качества импрегнации
3. Расход химических реагентов

4. Воспроизведось этапов методики в зависимости от различных факторов внешней среды и субъективных условий

В процессе проводимого исследования нами были воспроизведены как «классическая» методика серебрения по Гоморри, также модифицированная нами методика серебрения.

**В процессе внедрения нами были использованы следующие реагенты:**

1. Перманганат калия ( $KMnO_4$ ) (водный раствор) 0,25%  
или 0,5%
2. Щавелевая кислота (водный раствор) 0,5%  
или 1%
3. Хлорид железа ( $FeCl_3$ )-4% раствор
4. Железоаммониевые квасцы- 5% р-р.
5. Хлорид золота ( $AuCl_3$ )-0,2%
6. 40% формалин
7. 20% формалин

8. Натрия тиосульфат ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )- 5% раствор
9. Нитрат серебра- 10% р-р.
10. Натрия гидрооксид ( $\text{NaOH}$ ) - 40%
11. Натрия гидрооксид ( $\text{NaOH}$ ) - 10%
12. Дисцилированная вода
13.  $\text{NH}_3$  (аммиак)- 25% р-р.

Т.к. данные прописи не содержали в себе все необходимые реактивы. Часть рекомендуется изготавливать месте.

#### **Е) Приготовление раствора аммиачного серебра (в бурую бутылку) №1 (Гоморри)**

2мл 10%  $\text{AgNO}_3$ +1мл 10% $\text{NaOH}$ +0,5 мл 25%  $\text{NH}_3$ = перемешивать до растворения осадка 1-2 мин.+ 40 мл дисцилированной воды

Приготовления проявителя

10мл 40% формалина+40 мл дисцилированной воды

Приготовление 5% водного раствора  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (тиосульфата натрия)

pH 8,0. 18,61 г соли помещают в химический стакан на 100 мл, добавляют 80 мл дистиллированной воды, интенсивно размешивают и доводят pH до  $8,0 \pm 0,1$  с помощью натрия гидроокиси. Раствор хранят в темной полипропиленовой посуде при температуре  $(4 \pm 2)$  °C до 3 мес.

#### **Приготовление раствора аммиачного серебра (в бурую бутылку) №2 (Модификация)**

20мл 10%  $\text{AgNO}_3$ +2-4 капли 40% $\text{NaOH}$ = перемешать  
+ 25%  $\text{NH}_3$ = добавлять по каплям до устранения помутнения  
+ довести до 80 мл дисцилированной водой

Приготовление 5% водного раствора  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (тиосульфата натрия)

pH 8,0. 18,61 г соли помещают в химический стакан на 100 мл, добавляют 80 мл дистиллированной воды, интенсивно размешивают и доводят pH до  $8,0 \pm 0,1$  с помощью натрия гидроокиси. Раствор хранят в темной полипропиленовой посуде при температуре  $(4 \pm 2)$  °C до 3 мес.

После того как все реактивы имелись в наличии, мы приступали к окраске депарафинизированных или криотомированных гистологических срезов, помещённых на предметное стекло.

#### **Ж) Серебрение по Гоморри- Гротту (методика оригинальная)**

**На замороженный срез.**

1. Промыть срез в  $\text{H}_2\text{O}_{(\text{дисц.})}$ -**20 сек.**
2.  $\text{KMnO}_4$  (марганцовка) 0,5% - **2 мин.** (побурение среза)
3. Промыть в  $\text{H}_2\text{O}$ - **1 мин.**
4. Щавелевая кислота 0,5% - **1-2 мин.** до обесцвечивания среза
5. Промыть в  $\text{H}_2\text{O}$ - **1 мин.**
6.  $\text{FeCl}_3$  (хлорид железа) 4%- **2 мин.**
7. Промыть в проточной воде - **3 мин.**
8. Промыть срез в  $\text{H}_2\text{O}_{(\text{дисц.})}$ - **3-5 мин.**

9. В раствор аммиачного серебра **-1-5 мин.** ( в тёмном стакане) до потемнения срезов
10. Промыть срез в  $H_2O_{(дисц.)}$  **- 20 сек.** (1-2 макания)
11. Формалин **20%- 1 мин.**
12.  $AuCl_3$ <sub>(хлорид золота)</sub> **0,2%- 10 мин.**
13. Промыть в  $H_2O_{(дисц.)}$  **- 2мин**
14.  $Na_2S_2O_3$  <sub>(натрия тиосульфат)</sub> **5% -1-5 мин.**
15. Промыть в  $H_2O_{(дисц.)}$  **- 1мин.**
16. Докрасить Ван-Гизон или Эозином

Общее время окраски в зависимости от толщины среза от **27 мин. 40 сек. до 42 мин. 40 сек.**  
Рабочие этапы- **16**

#### ***Полученные результаты:***

- А. фон серо-коричневый
- Б. ретикулярные волокна- чёрные
- В. Ядра клеток- розовые

### **3) Серебрение (методика модифицированная)**

#### **На депарафинированный срез.**

1. Промыть срез в  $H_2O_{(дисц.)}$  **- 20 сек.**
2.  $KMnO_4$  <sub>(марганцовка)</sub> **0,25%- 5 мин.** до побурения среза
3. Промыть в  $H_2O$  **- 1мин.**
4. Щавелевая кислота **1% - 1 мин.** до обесцвечивания среза
5. Промыть в  $H_2O$  **- 1мин.**
6. Железоаммониевые квасцы **5%- 5 мин.**
7. Промыть в воде - **по 3 мин.** в 4-х сменах (итого 12 минут)
8. Промыть в  $H_2O_{(дисц.)}$  **- по 3 мин.** в 2-х сменах (итого 6 минут)
9. В раствор аммиачного серебра - **5 мин.** ( в тёмном стакане) до потемнения срезов
10. Промыть срез в  $H_2O_{(дисц.)}$  **- 20 сек.** (1-2 макания)
11. Формалин **30%- 1 мин.**
12.  $Na_2S_2O_3$  <sub>(натрия тиосульфат)</sub> **5% -1 мин.**
13. Промыть в  $H_2O_{(дисц.)}$  **- 1мин.**

Общее время окраски в зависимости от толщины среза от **35 мин. 40 сек. до 49 мин. 10 сек.**  
Рабочие этапы-**13**

#### ***Полученные результаты:***

- А. фон желтоватый
- Б. ретикулярные волокна- чёрные
- В. Ядра клеток не окрашены

### III. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, после проведения исследований и анализа полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Модифицированная методика позволяет сократить число рабочих этапов, что несколько упрощает проведения исследования
2. При сравнении давности проведения исследования, существенных различий получено не было
3. При сравнительном анализе качества получаемой окраски, отсутствие резкого фонового окрашивания, как и не перекрашивание ядер, нисколько не умоляет диагностической значимости морфологической картины гистологического объекта
4. В целом модифицированная методика была надёжно воспроизводима, в большем проценте проведённых исследований.
5. Отсутствие необходимости в изготовлении замороженных срезов, позволяет применять модифицированную методику на регулярной основе, не отвлекая лаборанта-гистолога другим видом деятельности (криотомирование).
6. Внедрение данной методики расширяет спектр и повышает уровень визуализации ряда патологических изменений в тканях и органах.

#### IV. Используемая литература:

1. Лилли Р. Патогистологическая техника практическая " гистохимия: Пер. с англ. М-: Мир, 1969. - 845 с, .
2. Локтев Н. А. Основы количественной гистохимии. - Ставрополь, 1999.- 128 с.
3. Цивилько В. С. Основные гистологические методики окраски центральной нервной системы: Методические рекомендации. - М., 1978. - 36 с.
4. Сапожников А.В., Доросевич А. Е. Гистологическая и микроскопическая техника: Руководство.- Смоленск, 2000. - 442с.