

## МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ ЭЛЕМЕНТОВ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

**Фасахутдинова А.Н.**, кандидат биологических наук, доцент,

тел. +7 937 273 75 12, [fasahutdinova@mail.ru](mailto:fasahutdinova@mail.ru)

**Хохлова С.Н.**, кандидат биологических наук, доцент,

тел. +7 937 451 01 80, [xohlova\\_cveta@mail.ru](mailto:xohlova_cveta@mail.ru)

**Богданова М.А.**, кандидат биологических наук, доцент,

тел. +7 929 794 51 65, [bm2474@mail.ru](mailto:bm2474@mail.ru)

**ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ**

***Ключевые слова:** импрегнация, окраска, изготовление препаратов, гистологический препарат, азотнокислое серебро*

*Эта работа посвящена методам выявления элементов нервной системы, которые широко используются гистологами в лабораториях, медицинских и ветеринарных учреждениях, моргах, образовательных организациях, а также на кафедре морфологии, физиологии и патологии животных Ульяновского ГАУ.*

**Введение.** Нервная система среди функциональных систем организма животных занимает особое положение, так как обеспечивает взаимосвязь организма с окружающим миром. Нервная система состоит из нервной ткани, которая состоит из нервных клеток и нейроглии.

Для выявления элементов нервной системы центральной и периферической нервной системы обычно применяют различные способы импрегнации – серебром, золотом и осмием. Окрашивать тела нервных клеток и их отростки можно и метиленовой синью. Все эти методы имеют существенный недостаток, что являются эмпирическими. Поэтому исследователю всегда надо быть готовым к тому, что даже при строгом соблюдении всех условий импрегнации она часто не дает желаемого результата. Здесь имеют значение многие факторы, которые иногда трудно учесть - свойства нервной ткани, качество материала, качество и время фиксации

(формалин нейтральный или кислый), реакция и качество воды, чистота посуды и реактивов и т.д.

**Материалы и методы исследований.** В настоящей работе приведены сведения о методиках выявления элементов нервной системы – головного и спинного мозга, нервных клеток и волокон, узлов и ганглиев периферической нервной системы. Фиксирование нервной ткани имеет целью: предотвратить дальнейшие изменения ее, сохранив в стационарной форме структуру фиксируемого объекта и подготовить ткань к дальнейшим методам обработки.

Очень часто фиксированная ткань сохраняет строение, весьма близко напоминающее или даже идентичное строению ее в живом состоянии. Однако, при фиксации возможно и некоторое искажение истинной структуры ткани. Мы имеем право допускать в препарате известную условность, корректируя ее наблюдениями над живыми (свежими) объектами. Для этого, однако, совершенно необходимо, чтобы при применении одного и того же метода всегда одинаково фиксировались одни и те же структуры (хотя бы они и выглядели несколько иначе, чем в ткани живой). Только в этом случае мы получаем сравнимые между собой картины. Подобного рода, условно допускаемые артефакты необходимо отличать от таких недопустимых артефактов, которые обязаны своим происхождением неправильному применению метода обработки объекта.

Необходимым условием для избежания последних артефактов является равномерная и достаточно быстрая обработка фиксатором всего фиксируемого объекта. Так как различные фиксажи неодинаково быстро проникают в ткань, то быстрая и равномерная обработка последней может в каждом, конкретном случае распространяться лишь на известную глубину от поверхности кусочка. Поэтому допустимые размеры последних при употреблении различных методов фиксации неодинаковы, о чем конкретно будет сказано при описании каждого метода в отдельности.

Фиксация одновременно в большей или меньшей степени способствует уплотнению ткани, подготавливая последнюю к дальнейшей обработке (приготовлению срезов). Окончательное уплотнение ткани достигается при последующей заливке препаратов и замораживании кусочков.

Фиксация является одним из главных моментов в процессе приготовления гистологического препарата.

Существует много модификаций импрегнации нервных клеток и волокон миелиновых и безмиелиновых. Наиболее распространенным является метод Бильшовского-Грос. Окраску хромотофильного вещества в цитоплазме нервных клеток (глыбки Ниссля) производят по методу предложенным Францем Нисслем, немецким невропатологом и психиатром. Также известен своим методом окраски нервных волокон (метод Ниссля), изобретённый им ещё в студенческие годы, и открытой им хромофильной субстанцией в теле и дендритах нейронов (субстанция или глыбки Ниссля).

Мякотные оболочки нервных волокон окрашивают по методу Шпильмейера, или осмируют. Элементы глии выявляют специальными методами – Кахалу для макроглии и Белецкого для микроглии, а также используют методику прижизненной окраски метиленовым синим Эрлиха.

Кроме указанных методов, можно окрашивать срезы для обзорных целей гематоксилин-эозином, что позволяет увидеть взаимоотношения нервных элементов с окружающими тканями. Нервные клетки головного и спинного мозга могут быть окрашены и другими методами, употребляемыми в гистологической технике.

Одним из наиболее распространенных методов импрегнации периферической нервной системы является метод Бильшовского-Грос в модификации Б.И. Лаврентьева. Материал фиксируют сразу после смерти; можно сделать это и в более поздние сроки, но с худшим результатом. Для фиксации используют 12-20% нейтральный формалин или жидкость АФА следующего состава: 96% спирт, 1% раствор мышьяковистой кислоты (р-р готовят заранее при температуре 37° в течение 3-5 дней) и нейтральный формалин в равных количествах. При фиксации в формалине в первые 2-3 дня следует сменить раствор фиксатора 2-3 раза, так как раствор мутнеет от крови и жира. Продолжительность фиксации 7 дней и больше. Фиксатор должен превышать 50-100 раз объем кусочков.

Фиксацию в жидкости АФА продолжают 1 час. После этого материал переносят в 10% нейтральный формалин, несколько раз меняют раствор, выдерживая по несколько часов в каждой порции. Затем материал переносят в 15-20% раствор нейтрального формалина, где может храниться длительное

время. Срезы готовят на замораживающем микротоме; толщина срезов 20-40 мкм. Перед резкой материал переносят из формалина в дистиллированную воду, срезы также опускают в баночку со свежей дистиллированной водой.

Из дистиллированной воды срезы стеклянной палочкой переносят в 20% раствор азотнокислого серебра (время от 3 до 30 минут в зависимости от объекта), затем срезы проводят через 3-4 порции 20% раствора кислого формалина. Срезы вынимают стеклянной палочкой и подсушивают фильтровальной бумагой, потом срезы переносят в аммиачное серебро. Предварительно к серебру добавляют 1-2 капли аммиака. Часовое стекло со срезами, погруженного в раствор аммиачного серебра, ставят на предметный столик для выявления нервных элементов. При четком выявлении нервных волокон и окончаний импрегнацию следует прекратить и на 10-15 минут перенести срезы в аммиачную воду, где импрегнация прекращается.

После этого срезы промывают в нескольких порциях дистиллированной воды, далее срезы переносят в раствор хлорного золота для ослабления импрегнации и контрастности нервных элементов. Затем на несколько минут в 5% водный раствор гипосульфита. Промыв срезы в нескольких порциях дистиллированной воды, их обезвоживают в спиртах и заключают в балзам. Элементы нервной системы выявляются в виде черных образований на светло-коричневом фоне [1-4].

Для изучения нервных элементов головного и спинного мозга можно использовать импрегнацию нервных структур азотнокислым серебром по В.К. Белецкому (1982г.). Для изготовления гистологических препаратов мы помещали спинной мозг в нейтральный формалин возрастающей крепости 3-10% на 5-20 дней. После фиксации материал промывался в проточной воде (одни сутки) и в дистиллированной воде (30 мин.). Срезы изготавливали на замораживающем микротоме толщиной 10-20 мкм. Затем срезы спинного мозга промывали в водопроводной воде в течение нескольких минут. Срезы высушивали фильтровальной бумаги, положили в чашки Петри с нейтральным формалином на 30 секунд, потом промывали дистиллированной водой, и также гистологические срезы спинного мозга промокнули фильтровальной бумагой. На заключительном этапе срезы положили в азотнокислое серебро до выявления гистологических структур спинного мозга (30с. – 60с.), затем извлеченные срезы промыли дистиллированной водой. Хорошо просушив

срезы фильтровальной бумагой, провели по батарее спиртов восходящей крепости, и обесцветили ксилолом. Гистологический препарат беличьей кисточкой натянули на предметное стекло, зафиксировали канадским бальзамом и накрыли покровным стеклом. Гистологический препарат готов для изучения нервных структур спинного мозга.

Метод Ниссля. Проведение метода зависит от ряда условий, которые надо заранее выяснить: 1) какую взять краску; 2) какова фиксация; 3) имеются ли дорогие реактивы - анилиновое и кайеупутовое масло; 4) заключить ли в целлоидин (парафин) или после формалина резать на замораживающем микротоме; 5) нельзя ли ввести дополнительную окраску.

Первоначально для метода была предложена синька. Теперь она употребляется еще в сложных соединениях (Май-Грюнвальд, полихромная синька), но вытесняется толуидинблау (0,1%). Употребляется также тионин (0,1%- 1%), крезилвиолетт, азур II (1 г на 750 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и на каждые 10 см<sup>3</sup> 4 капли насыщенного раствора kalii carbonici). Для фиксации раньше применялся абсолютный спирт, теперь же употребляется 96° спирт; кусочки раньше резались без заключения в целлоидин, теперь - предпочитается последний. Основной метод Ниссля проводится в настоящее время так: кусочек, не слишком малый (ввиду сморщивания), фиксируется прямо в 96° спирте (меняют спирт) 5 дней и больше; резать без заключения в уплотняющие среды. Кусочек при этом обрезается, обсушивается фильтровальной бумагой и приклеивается гумми-арабиком к сухой деревяшке; дать затвердеть в 96° спирте; резать при косом положении ножа, смачивая его спиртом; красить с легким подогреванием в часовом стеклышке до появления первых пузырьков. Краска должна быть старая (не менее 3 месяцев). Состав: метиленовой синьки В. Patent 3,75, наструганного венецианского мыла 1,5, дистиллированной воды 1000,0. Каждый раз взбалтывать и фильтровать. Вместо синьки лучше взять толуидинблау или тионин (0,1%); срезы вылавливаются иглой и переносятся в дифференциатор, где расправляются на дне кристаллизатора. Состав: лучшее анилиновое масло 1 часть, 90° спирт 9 частей. Каждый раз готовится свежий; шпателем срез переносится на предметное стекло; обсушить кругом и хорошо промокнуть фильтровальной бумагой; быстро - кайеупутовое масло; слить масло и промокнуть фильтровальной бумагой. Поливать бензином (не давать высыхать); слить бензин и накапать ксилол-канифоли (не

давать высыхать). Приготовление: тонко натолочь канифоли и положить в сухую банку, залить на такой же объем ксилолом; дать стоять и сгущаться под стеклянным колпаком - при испарении; слить для употребления поверхностный сгустившийся желтовато-красноватый слой; накрыть покровным стеклом и слегка надавливать при повторном, легком подогревании.

**Заключение.** Исследователь может применять различные методы выявления нервных элементов, для успеха надо экспериментировать и использовать свежий материал, пользоваться только чистой стеклянной посудой и свежеприготовленными рабочими растворами, выдерживать технику импрегнации и методику окраски, а также этапы изготовления гистологического препарата.

#### **Библиографический список:**

1. Волкова, О.В. Основы гистологии с гистологической техникой / О.В. Волкова, Ю.К. Елецкий. – М.: Медицина, 1971. – 272с.
2. Симанова, Н.Г. Возрастные изменения ганглиев автономной нервной системы у собак / Н.Г. Симанова, С.Н. Хохлова, Т.Г. Скрипник, А.Н. Фасухудинова, Е.Н. Исаева // В сборнике: Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы III Международной научно-практической конференции. – Ульяновск: Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия. - 2011. - С. 168-172.
3. Фасухудинова, А.Н. Аспекты преподавания дисциплины «Цитология, гистология и эмбриология» / А.Н. Фасухудинова, С.Н. Хохлова, М.А. Богданова // В сборнике: Инновационные технологии в высшем образовании. Материалы Национальной научно-методической конференции профессорско-преподавательского состава. В 2-х частях. – Ульяновск: Ульяновский государственный аграрный университет. - 2018. - С. 71-75.
4. Фасухудинова, А.Н. Методика преподавания дисциплины «Гистологическая техника» на факультете ветеринарной медицины и биотехнологии / А.Н. Фасухудинова, С.Н. Хохлова // Профессиональное обучение: теория и практика. Материалы I международной научно-практической конференции, посвященной актуальным вопросам профессионального и

технологического образования в современных условиях. – Ульяновск, УлГПУ: факультет физико-математического и технологического образования, кафедра технологий профессионального обучения, май-июнь 2018г.-С.236-240.

## **METHODS FOR DETECTING NERVOUS SYSTEM ELEMENTS**

**Fasakhutdinova A.N., Khokhlova S.N., Bogdanova M.A.**

**Keywords:** *impregnation, staining, preparation of preparations, histological specimen, silver nitrate.*

*This work is devoted to methods of identifying elements of the nervous system, which are widely used by histologists in laboratories, medical and veterinary institutions, morgues, educational organizations, as well as at the Department of Morphology, Physiology and Pathology of animals of the Ulyanovsk State Agrarian University.m.*