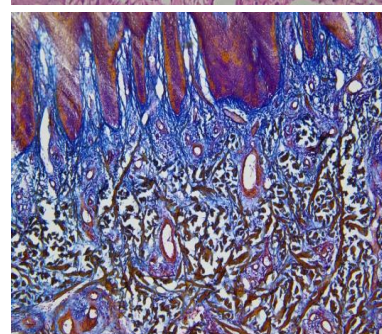
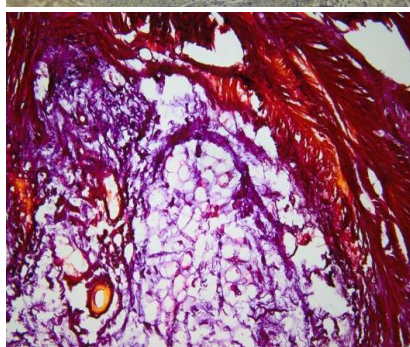
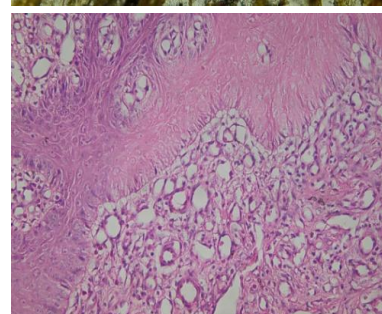
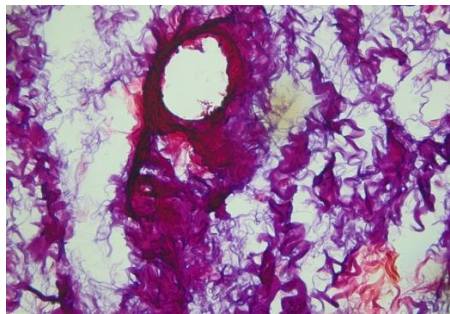
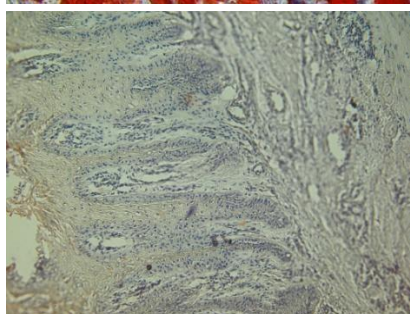
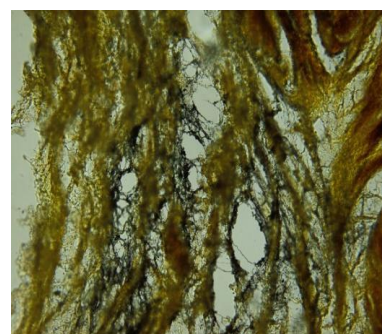
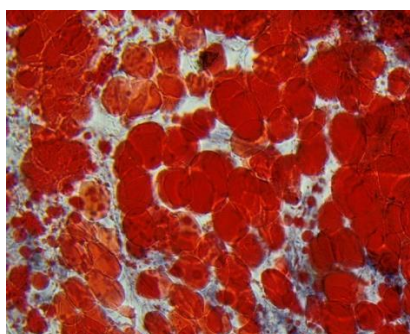


Учреждение образования
«Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия
ветеринарной медицины»

А. Л. Лях, Е. В. Ховайло

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЯЗВЕННЫХ ПАТОЛОГИЙ ПАЛЬЦЕВ У КОРОВ

РЕКОМЕНДАЦИИ



Витебск
ВГАВМ
2016

УДК 636.2:611.018(07)

ББК 45.266

Л98

Утверждены Департаментом ветеринарного и продовольственного
надзора Министерства сельского хозяйства и продовольствия
Республики Беларусь от 13 апреля 2016 г. (протокол № 2653)

Авторы:

кандидат ветеринарных наук, доцент *А. Л. Лях*, магистр ветеринарных наук
Е. В. Ховайло

Рецензенты:

доктор ветеринарных наук, профессор *В. М. Руколь*; доктор ветеринарных наук,
профессор *В.В. Малашко*

Лях А. Л.

Л98 Морфологическая диагностика язвенных патологий пальцев у коров :
рекомендации / А. Л. Лях, Е. В. Ховайло. – Витебск : ВГАВМ, 2016. – 48 с.

Рекомендации предназначены для ветеринарных специалистов, научных
работников, преподавателей, студентов, магистрантов, аспирантов, слушателей
ФПК и ПК с целью использования в научно-исследовательской, учебной и
практической работе

УДК 636.2:611.018(07)

ББК 45.266

© Лях А. Л., Ховайло Е. В., 2016

© УО «Витебская ордена «Знак Почета»
государственная академия
ветеринарной медицины», 2016

Содержание

Введение	4
1. Анатомические части пальца крупного рогатого скота	5
2. Макроскопические исследования копыт	9
2.1. Морфометрические параметры копыт	10
3. Твердость копытцевого рога	13
4. Микроскопические исследования копыт	14
4.1. Отбор проб	14
4.2. Методы фиксации тканей	18
4.3. Приготовление гистопрепаратов	21
4.4. Окрашивание гистопрепаратов	22
4.5. Микроскопия гистопрепаратов	31
4.5.1. Обзорные исследования	31
4.5.2. Микроморфометрия	33
Заключение	45
Литература	46

Введение

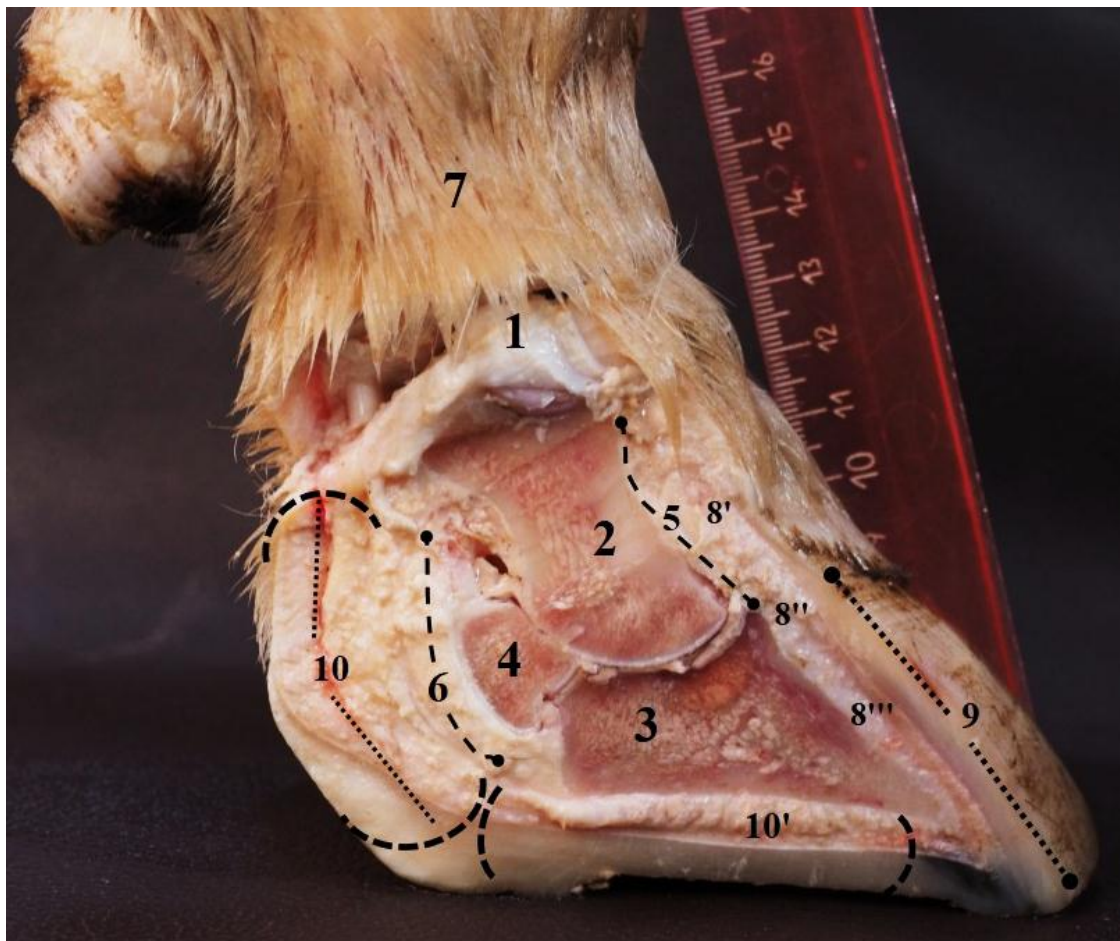
Ортопедическая патология у коров – одна из важных и до сих пор не решенных проблем в отечественном скотоводстве. Как правило, данный тип болезней является сферой изучения ветеринарной хирургии с использованием набора хирургических методов исследования, основанных на клиническом наблюдении, биохимических анализах и эксперименте. Возможно, расширение исследований в области ортопедии за счет применения морфологических методов позволит глубже изучить и понять механизм развития патологических процессов в копытцах коров, выявить основные и способствующие болезням факторы, а в последующем, изыскать новые способы их лечения и профилактики. Учитывая нарастающее влияние техногенных факторов в промышленном скотоводстве проблема ортопедических патологий у коров будет становиться лишь острее, а её решение потребует немалых затрат времени и средств.

Исследуя доступную литературу по ортопедии крупного рогатого скота, мы чрезвычайно редко находили информацию о морфологических изменениях в копытцах при различных видах ортопедической патологии. Ещё реже встречали описание самих методик морфологического исследования, что делало невозможным повторение экспериментов и подтверждение результатов. Более подробная информация с результатами гистологических исследований находилась в публикациях зарубежных авторов, что можно расценивать как более серьезный, разносторонний и глубокий подход к изучению проблемы. Таким образом, разрозненные морфологические данные единичных исследователей в ортопедии, зачастую, если не противоречат, но и не всегда подтверждают результаты друг друга. Не упорядоченные данные их исследований не составляют целостную и объективную картину по методике морфологического исследования тканей копытцев крупного рогатого скота и не содержат интерпретации полученных результатов с проекцией их на функциональное состояние копытцев.

Данные рекомендации вобрали в себя результаты нашего недолгого, но кропотливого труда по изучению тканей копытцев у коров. Мы постарались доступно и подробно изложить всю последовательность процессов от взятия проб тканей пальцев крупного рогатого скота до методик подсчета структурных элементов при микроскопическом исследовании гистологических препаратов. Надеемся, что наш опыт и полученные знания помогут исследователям избежать ошибок и получить достоверные научные результаты, оптимизировать затраты труда и средств, и, следовательно, внести свой вклад в пополнение базы знаний о патологии копытцев и решении проблемы массовых ортопедических болезней у коров.

1. Анатомические части пальца крупного рогатого скота

У крупного рогатого скота на кисти и стопе по два пальца. Скелет каждого пальца состоит из трех костей: путовой (первая фаланга), венечной (вторая фаланга) и копытцевой (третья фаланга) (рисунок 1.1).



1 – путовая кость (первая фаланга), 2 – венечная кость (вторая фаланга), 3 – копытцевая кость (третья фаланга), 4 – дистальная сесамовидная кость, 5 – сухожилие общего пальцевого разгибателя, 6 – сухожилие глубокого пальцевого сгибателя, 7 – кожа пальца с волосами, 8 – дерма: 8' – каймы, 8'' – венчика, 8''' – стенки, 9 – роговая стенка копытца, 10 – подушка пальцевого мякиша, 10' – подошвенная часть пальцевого мякиша

Рисунок 1.1 – Сагиттальный распил четвертого пальца крупного рогатого скота

В области пальцев три сустава. Пястно (плюсно)-фаланговый сустав (путовый, сустав первой фаланги) образован головками костей пясти, основанием первой фаланги и двумя проксимальными сесамовидными костями. Проксимальный межфаланговый сустав (венечный, сустав второй фаланги) образован головкой первой фаланги и основанием второй фаланги. Дистальный межфаланговый сустав (копытцевый, сустав третьей фаланги) образован головкой второй фаланги основанием третьей фаланги и сесамовидной костью. Сесамовидные кости находятся на пальмарной (плантарной) поверхности суставов, крепятся сесамовидными связками. Каждый из суставов имеет свою капсулу и боковые связки, которые обеспечивают одноосность движения. Пальцы между собой соединяются дополнительными связками: межпальцевыми проксимальной (соединяет путовые кости) и дисталь-

ными (соединяют венечные кости). На суставы пальцев действуют две группы мышц (флексоры и экстензоры). Сухожилия этих мышц заканчиваются в области пальцев. К экстензорам относятся общий (сухожилие заканчивается на разгибательном отростке венечного края копытцевой кости) и боковой (сухожилие заканчивается на проксимальном конце первой фаланги четвертого пальца) разгибатели пальцев. К флексорам относятся поверхностный и глубокий (заканчивается на пальмарной (плантарной) поверхности копытцевой кости) пальцевые сгибатели. Кровоснабжение пальцев крупного рогатого скота осуществляется по собственным пальмарным (плантарным) пальцевым артериям, а так же ветвям, которые отходят к пальцевому мякишу. Отток крови происходит по одноименным венам. Артерии и вены анастомозируют между собой. Иннервация осуществляется собственными пальмарными (плантарными) пальцевыми нервами.

Третья фаланга пальца погружена в копытце – видоизмененную кожу, которая образует твердый чехол из ороговевшего эпидермиса. Анатомически на копытцах различают кайму, венчик, стенку (рисунок 1.2) и подошву.

Копытцевая кайма (рисунок 1.2) это переход от волосистой кожи конечности к безволосой коже копытца. Находится спереди и с боков копытца в виде полосы шириной около 6-7 мм [6], а в задней его части без границ переходит в пальцевый мякиш. Копытцевая кайма состоит из эпидермиса, основы кожи (дермы) и подкожного слоя (гиподермы). Роговой слой эпидермиса, опускаясь на копытцевую стенку, формирует тонкий блестящий слой – глазурь (периопль), который у телят предохраняет нижележащие слои копытца от высыхания и размокания, обеспечивает сохранение необходимых физических свойств рога. У взрослых коров глазурь обычно разрушается или стирается, сохраняясь только в верхней части копытца, в пределах 1-1,5 см (рисунок 1.3). Основа кожи копытцевой каймы состоит из сосочкового слоя с короткими и заостренными сосочками и сетчатого слоя из переплетающихся коллагеновых и эластических волокон [6]. Подкожный слой развит слабо.



Рисунок 1.2 – Анатомические части копытца



Рисунок 1.3 – Глазурь в области копытцевой каймы у взрослой коровы

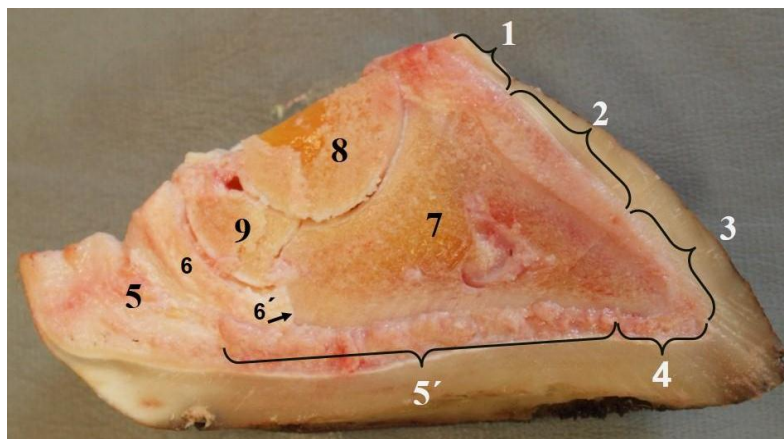
Копытцевый венчик (рисунок 1.4) располагается ниже копытцевой каймы, охватывает переднюю и боковые стенки копытца. Венчик имеет вид дугообразной

полосы, занимая приблизительно половину оставшейся высоты копытца. Под роговой капсулой он без четких границ переходит в копытцевую стенку. Венчик хорошо виден после снятия рогового башмака или на продольном распиле, он представляет собой упругий, пологий валик шириной до 20-25 мм (в отличие от лошади, где венчик представлен в виде сильно развитого валика шириной около 10 мм). Копытцевый венчик имеет эпидермис, основу кожи и подкожную клетчатку. Роговой слой эпидермиса трубчатого строения толстый, самый крепкий в копытце, не проницаем для воды. Трубочки представляют собой цилиндры, образованные эпидермисом, покрывающим округлые и вытянутые сосочки дермы. Каждая трубочка состоит из рыхлой сердцевины и плотной коры, которая обеспечивает прочность. Сердцевина трубочки образуется клетками эпидермиса, покрывающими верхушку сосочка. Эти клетки по мере роста трубочки и удаления от вершины сосочка становятся сморщенными, деградирующими (разрушающимися) роговыми пластинками, которые могут выкрашиваться при истончении коры трубочек, образуя полость внутри трубочки. Кора роговых трубочек состоит из тяжёлых ороговевших клеток, которые располагаются вокруг сердцевины или полости трубочки [6]. Роговые трубочки между собой скреплены аморфным межтрубчатым рогом. Дерма состоит из сосочкового и сетчатого слоев. Сосочки вытянутые, округлые в поперечном сечении, поэтому эпидермис, «сползающий» с них, формирует роговые трубочки венечного рога. В основе кожи (дерме) венчика разветвляется огромное количество сосудов и нервов, обеспечивающих отличное кровоснабжение этого участка и хорошее ощущение неровностей почвы, на которую ступает копытце. Подкожный слой хорошо развит, он составляет основу венечного валика, который смягчает давление копытцевого башмака на прилегающие мягкие ткани копытца.

Копытцевая стенка (рисунок 1.4) высотой около 20-28 мм, охватывает полукольцом копытце ниже венчика. Состоит стенка из эпидермиса и основы кожи. Эпидермис формирует роговые пластинки (листочки) между соединительнотканными сосочками (листочками) дермы, поэтому роговой слой эпидермиса стенки копытца называют листочковым рогом (в отличие от трубчатого рога венчика и глазури каймы). Листочковый рог из-за слабой пигментации имеет светло-серый цвет, опускаясь вниз, он формирует белую линию (зону), хорошо различимую на расчищенном копытце с его подошвенной (опорной) поверхности. Эта линия служит границей между рогом стенки и рогом подошвы. Поверх листочкового рога стенки наползает толстый, трубчатый рог венчика, покрытый, в свою очередь, слоем глазури (которая может отсутствовать), производимой каймой, формируя трехслойную роговую стенку (стенку рогового башмака). Толщина стенки рогового башмака не одинакова: в области внутренней боковой части рог очень тонкий, до 3 мм; в наружной боковой – несколько толще, до 5 мм; в зацепной (передней) части – в среднем 7 мм. Основа кожи стенки состоит из сосочкового (листочкового) и сетчатого слоев. Подкожный слой в стенке копытца отсутствует и дерма срастается с надкостницей копытцевой кости, обеспечивая прочную фиксацию рогового башмака на копытцевой кости. В задней части копытца основа кожи стенки сливается с основой кожи мякиша.

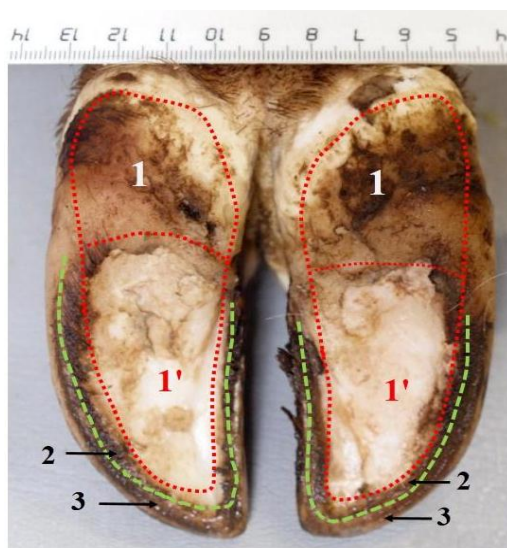
Копытцевая подошва у крупного рогатого скота, в отличие от лошадей, представляет собой тонкую дугообразную линию, которая снизу очерчивает копытце по внешнему контуру (рисунок 1.4). Наружная граница подошвы с копытцевой стенкой четко обозначена белой линией копытца. Внутренняя граница неразличима и сливается с подошвенной частью пальцевого мякиша, окаймляя его тонкой дугообразной по-

лосой. Подошва состоит из эпидермиса и дермы (основы кожи). Роговой слой копытцевой подошвы, толстый, плотный, обладает мощным трубчатым роговым слоем, по прочности, однако, уступающим трубчатому рогу венчика. Основа кожи копытцевой подошвы имеет сосочковый и сетчатый слои. Сосочки дермы округлые, вытянутые, что обуславливает трубчатое строение рогового слоя эпидермиса. Подкожный слой отсутствует – это способствует прочному сцеплению основы кожи подошвы с надкостницей копытцевой кости.



Анатомические части копыта: 1 – кайма, 2 – венчик, 3 – стенка, 4 – подошва. 5 – подушка мякиша, 5' – подошвенная часть мякиша, 6 – сухожилие глубокого пальцевого сгибателя, 6' – место прикрепления сухожилия (6) к копытцевой кости, 7 – копытцевая кость (третья фаланга), 8 – венечная кость (вторая фаланга), 9 – дистальная сесамовидная кость
Рисунок 1.4 – Сагиттальный распил латерального пальца крупного рогатого скота

Пальцевый мякиш непосредственно не относится к частям копыта, но тесно связан с ними анатомически и функционально. У крупного рогатого скота мякиш имеет форму клина, основание которого лежит сзади, между внутренней и наружной частями стенки копыта, а верхушка – по подошвенной (опорной) поверхности почти доходит до зацепной (передней) части стенки копыта (рисунок 1.5).



1 – пальцевый мякиш (подушка мякиша), 1' – подошвенная часть мякиша, 2 – подошва, 3 – стенка

Рисунок 1.5 – Копытце крупного рогатого скота, вид снизу

Пальцевый мякиш практически полностью занимает опорную поверхность копытка, подстилая собой копытцевую кость (не доходя 5-6 мм до ее переднего края), и прикрепляющееся к ней сухожилие глубокого сгибателя пальца. Основание клиновидного пальцевого мякиша в задней (пяточной) части копытка формирует мякишную подушку (дорсальная часть мякиша), а его верхушка – подошвенную (вентральную) часть мякиша. Состоит пальцевый мякиш из эпидермиса, дермы и гиподермы. Снаружи мякиш имеет вид роговой пластинки, состоящей из трубчатого рога. Основа кожи состоит из двух слоев: сетчатого, состоящего из плотной соединительной ткани, и сосочкового, представленного многочисленными мелкими, относительно одинаковыми по размерам вытянутыми, округлыми сосочками, наклоненными в сторону зацепа. Гиподерма пальцевого мякиша очень хорошо развита.

2. Макроскопические исследования копытцев

Макроскопическое исследование – изучение морфологических параметров копытцев невооруженным глазом или с использованием лупы. Для получения объективных цифровых показателей, подлежащих дальнейшей статистической обработке, данный вид исследований включает проведение промеров с использованием линейки, рулетки, штангельциркуля, угломера, отвеса. Для проведения такого рода измерений мы предлагаем делать сагиттальные (рисунок 2.6) и сегментальные (рисунок 2.7) распилы копытцев с использованием листовой пилы или электролобзика (рисунок 2.8).

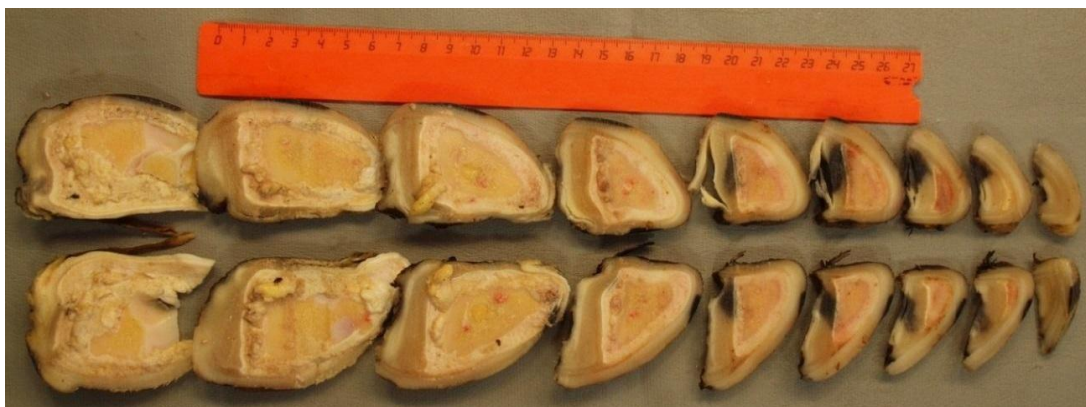


Рисунок 2.6 – Сегментальные распилы пальцев крупного рогатого скота

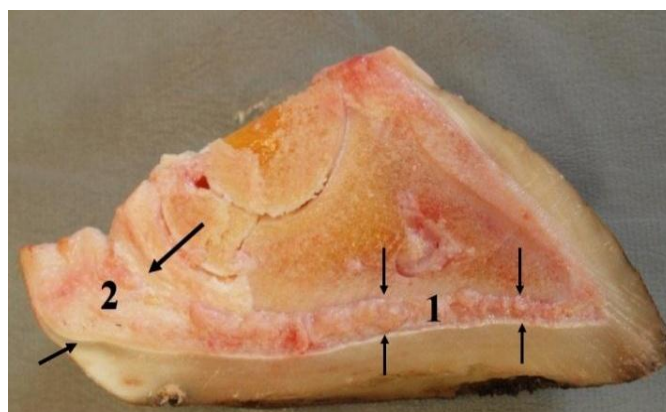


Рисунок 2.7 – Сагиттальные распилы третьего пальца крупного рогатого скота



Рисунок 2.8 – Изготовление сагиттальных распилов пальцев с применением электролобзика

Для удобства проведения распилов, пальцы крупного рогатого скота необходимо заморозить и только после этого проводить остальные манипуляции. Распиловы позволяют изучить и наглядно показать топографию, толщину (рисунок 2.9) и соотношение анатомических частей копытца и других тканей пальца, выявить скрытые патологии.



1 – толщина подошвенного мякиша,
2 – толщина подушки мякиша анатомически правильного копытца
Рисунок 2.9 – Сагиттальный распил четвертого пальца коровы

Изготовленные распиловы настоятельно рекомендуем фотографировать с линейкой. Создание базы цифровых фотографий избавит исследователя от необходимости хранить сами анатомические препараты и даст возможность в последующем провести необходимые дополнительные измерения (которые не были сделаны сразу) с использованием компьютерных программ.

2.1. Морфометрические параметры копытца

Для понимания, является ли копытцевый рог излишне отросшим или нет, необходимо знать критерии анатомически правильных копытца. Для проведения промеров используют линейку, угломер и транспортир.

Показатели **анатомически правильных копыт** (рисунок 2.1.10):

✓ угол наклона зацепной (передней) части копытцевой стенки к подошве $45-55^\circ$. Стенка прямая (или слабо дугообразная), проходит параллельно или слегка сходится с передней стенкой соседнего копыта.

✓ копытца одной конечности должны быть приблизительно одинаковой формы и величины.

✓ длина стенки в задней части копытца должна быть больше в 2 раза, чем длина стенки в передней части [1].

✓ отношение длины подошвы (опорной поверхности) к длине зацепной (передней) стенки копытца должна составлять примерно $1:0,7$. Другими словами, длина подошвы должна быть на четверть или на треть длиннее передней (зацепной) стенки копытца [1].

✓ ширина подошвы (в самом широком месте) должна быть примерно в 2 раза меньше ее длины [1].



Рисунок 2.1.10 – Анатомически правильное копыто коровы

При **отрастании копытцевого рога** (рисунки 2.1.11 и 2.1.12) происходят изменения параметров копыт:

✓ угол наклона зацепной (передней) части копытцевой стенки к подошве уменьшается до $31-45^\circ$. Стенка, как правило, заворачивается кверху или в бок.

✓ копытца будут значительно отличаться по форме и величине.

✓ длина задней стенки копытца будет в 3-3,2 раза больше, чем длина передней (зацепной) стенки.

✓ длины подошвы (опорной поверхности) к длине зацепной (передней) стенки копытцевого рога будет относиться как $1:0,9$ или даже $1:1$ и более.

✓ ширина подошвы (в самом широком месте) будет примерно в 2,5-3 раза меньше ее длины.



Рисунок 2.1.11 – Излишнее отрастание и деформация копытцевого рога



Рисунок 2.1.12 – Сагиттальный распил пальца крупного рогатого скота. Излишнее отрастание и деформация копытцевого рога. Увеличение длины подошвы и передней стенки копытцевого рога, уменьшение угла наклона передней части копытцевой стенки к подошве

Изменение параметров копытцев и их соотношений влечет за собой нарушение опорной и амортизационной функций. Залог здоровья копытцев – это сохранение анатомически правильных параметров. Копытца с неправильными параметрами тоже могут быть здоровыми, но они больше предрасположены к ортопедическим патологиям, развитие которых лишь вопрос времени.

3. Твердость копытцевого рога

Роговой чехол (башмак) копытца выполняет важные функции опоры и защиты копытца от внешних воздействий. Выполнение этих функций зависит от твердости рогового чехла копытца. Данный параметр рогового башмака мы измеряли с использованием дюрометра (твердомера) Шора типа А.

Твердость рога в разных участках рогового башмака анатомически правильных копытцев и копытцев с отросшим рогом будет отличаться (таблица 3.1).

Таблица 3.1. – Твердость разных частей рогового башмака, единиц Шора А (НА)

	анатомически правильное копытце	копытце с отросшим рогом
рог подушки мякиша	28-28,8	22-23,8
рог подошвенного мякиша	62-63	54,1-59
рог подошвы вблизи зацепа	67-67,3	85,6-90,3
рог стенки	97-98	89,7-90,7

При отрастании копытцевого рога, ввиду изменения углов и соотношений длины между частями копытцев, основная статическая нагрузка (при стоянии) смещается с подошвенного края копытцевой стенки с твердым роговым слоем на подушку мякиша с мягким роговым слоем, не предназначенным для повышенной нагрузки. В анатомически правильных копытцах подушка мякиша испытывает только динамическую нагрузку (при движении) в начальную стадию опирания, когда вес тела постепенно переносится на опорную конечность. Затем копытце «перекатывается» с подошвенного мякиша на подошвенный край стенки, перенося вес тела на самый прочный трубчатый рог стенки роговой капсулы. В последнюю фазу опирания, корова переносит вес тела на зацепную часть копытца, отталкиваясь ей от поверхности опоры, то есть прилагая наибольшее усилие именно к этой части копытца. Именно максимальная нагрузка на зацепную часть обуславливает наибольшую твердость рога в этой области копытца, причем как со стороны подошвы, так и со стороны стенки.

В результате различных причин (недостаток двигательной активности, отсутствие регулярных ортопедических обработок и т.п.) происходит излишнее отрастание копытцевого рога в зацепной части и смещение веса тела на мякишную подушку как в динамике (при движении) так и в статике (при стоянии). Чем больше отрастает копытцевый рог и увеличивается длина передней стенки рогового башмака, тем меньше будет опора на подошвенный мякиш и подошвенный край стенки с твердым роговым слоем (в 2 и более раза тверже, чем рог подушки мякиша). Перераспределение нагрузки способствует истончению мягкого рогового слоя подушки мякиша, не обладающего высокой твердостью (НА) и склонным к быстрому стиранию. Отрастание копытцевого рога часто приводит к заворачиванию зацепной стенки дорсально и делая отталкивание зацепом с твердым роговым слоем невозможным. Рог подошвы вблизи зацепа при отрастании становится тверже (НА), что ещё больше замедляет его стирание усугубляет проблему остроугольной деформации копытцев.

4. Микроскопические исследования пальцев

Микроскопическое исследование позволяет изучать копытца на клеточном и тканевом уровне, с проведением необходимых измерений в исследуемых объектах.

4.1. Отбор проб

Отбор проб тканей копытец может проводиться прижизненно (биопсия), с помощью специальных инструментов, во время ортопедических расчисток, так как при их проведении предполагается удаление некротизированных тканей, излишне отросшего рога, истончение рога вокруг патологического очага. Поскольку такие манипуляции болезненны для животного, то обязательно проводится местное обезболивание (проводниковая анестезия пальцевых нервов 2% раствором новокаина по 15-20 мл на введение). После введения новокаина необходимо выждать 5-10 минут, убедиться, что чувствительность в области предполагаемого места вмешательства отсутствует. Отбор проб тканей проводится на границе здоровых и пораженных участков (рисунок 4.1.13) с соблюдением правил асептики.



Рисунок 4.1.13 – Прижизненный отбор проб тканей пальцевого мякиша на границе здоровых и пораженных участков при язвенном дерматите (язве пальца)

Таким же образом, с применением скальпеля или ножниц можно проводить отбор здоровой и патологически разросшейся грануляционной ткани, фрагментов содержащих копытцевый рог, т.к. на границе пораженных и здоровых тканей его необходимо истончать. Если патологический процесс небольшой и довольно глубокий (язва Рустергольца), то можно использовать конический пробоотборник (рисунок 4.1.14).

Отбор проб для микроскопического исследования так же можно проводить и после убоя животных (аутопсия). Для этого удобно применять конический пробоотборник (рисунок 4.1.14) или насадку на дрель в виде трубки для высверливания пробок из дерева (рисунки 4.1.14, 4.1.15).



Рисунок 4.1.14 – Пробоотборники



Рисунок 4.1.15 – Отбор проб тканей пальца с использованием пробоотборника

Обращаем внимание, что для удобства отбора проб тканей на всю толщину копыльца (рисунок 4.1.16), пальцы крупного рогатого скота необходимо замораживать для уплотнения мягких тканей копыльца и только после этого проводить остальные манипуляции. Заморозка копытца перед отбором проб не повлияет на качество дальнейших исследований, т.к. ткани достаточно плотные и их разрыва от заморозки не произойдет. Без предварительной заморозки при отборе проб в области тех частей копытца, которые имеют подкожный слой (мякиш, кайма, венчик), при проворачивании трубки пробоотборника будет происходить расслоение между дермой и гиподермой, как следствие проба тканей не будет содержать всех слоев.



Рисунок 4.1.16 – Послойная проба тканей пальцев, полученная с использованием пробоотборника

Для гистологических исследований достаточно кусочков ткани толщиной 5 мм. Если предполагается проводить послойное исследование, то величина пробы не

должна превышать размет столлика (рисунок 4.1.17) для замораживающего микротомы или кассеты для заливки в парафин (рисунок 4.1.18). Необходимо учитывать, что сложно сделать срез с пробы тканей, если она слишком велика или если она состоит из тканей, значительно различающихся по плотности (в этом случае срез получится не однородный по толщине и будет сворачиваться на стекле).



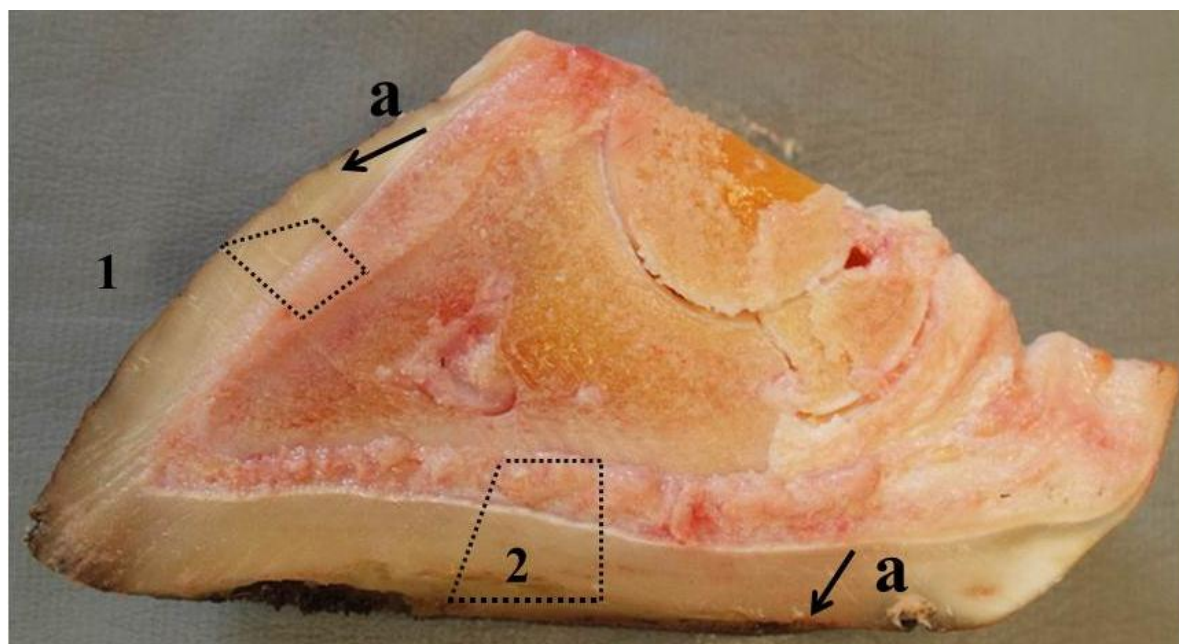
Рисунок 4.1.17 – Столик для замораживающего микротомы фирмы MICROM



Рисунок 4.1.18 – Кассеты для заливки в парафин



Перед началом исследований необходимо четко представлять, какие ткани копытца будут исследоваться и какими методами. От этого будет зависеть как отбор проб, так и фиксация тканей. Необходимо учитывать положение в копытце тканей, которые будут отбираться для исследований. Для этого кусочек нужно вырезать в форме, например, неравнобедренной трапеции (рисунок 4.1.19), основание которой будет направлено к подошве копытца, верхушка – к венчику, а скошенная сторона будет соответствовать передней копытцевой стенке.



а – направление роста роговых трубочек, 1 – поперечный срез сосочкового слоя дермы, 2 – продольный срез сосочкового слоя дермы

Рисунок 4.1.19 – Сагиттальный распил медийного пальца коровы. Форма проб при отборе тканей разных частей пальца

Например, при исследовании дермы нужно помнить, что в дерме подошвы сосочки идут практически перпендикулярно к поверхности опоры, несколько наклоняясь в сторону зацепа, а на копытцевой стенке – под острым углом к зацепу (рисунок 4.1.20).

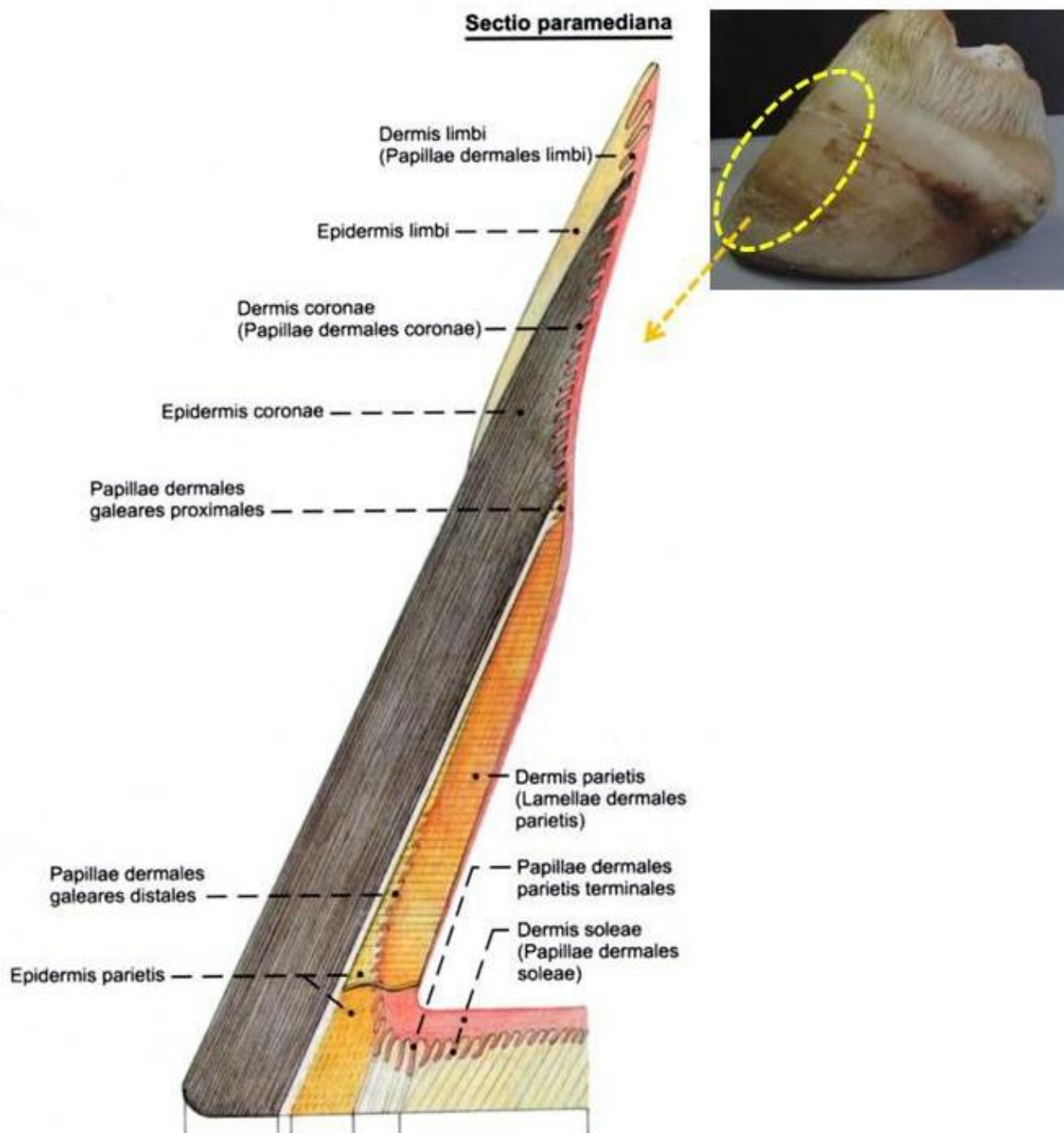
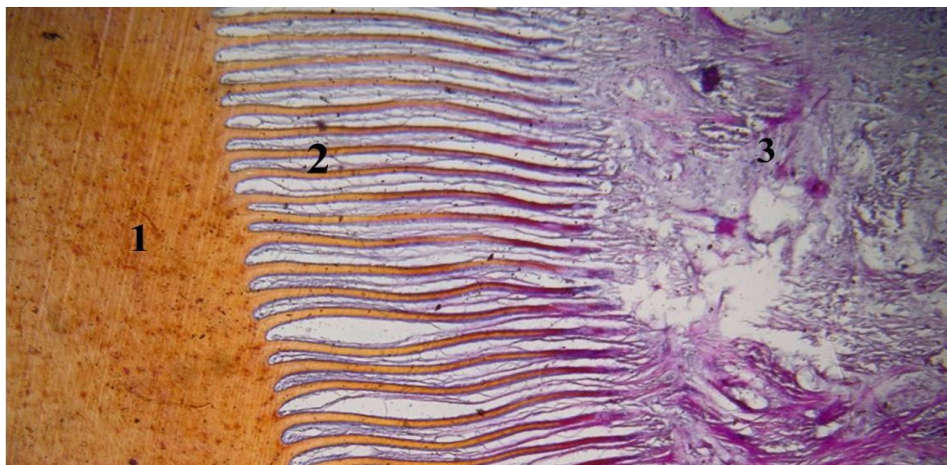


Рисунок 4.1.20 – Схема строения дермы и эпидермиса разных частей копытца (рисунок из атласа по Klaus-Dieter Budras, Anita Wünsche [7])

Учитывать положение в копытце тканей, которые будут отбираться для исследований, необходимо для удобства дальнейшего приготовления и микроскопирования гистопрепаратов. То есть, на столике для резки отобранная проба будет располагаться с учетом желаемого продольного (рисунок 4.1.21) или поперечного (рисунок 4.1.22) среза тканей или роговых трубочек.



1 – роговой слой, 2 – сосочковый слой дермы, 3 – сетчатый слой дермы
Рисунок 4.1.21 – Микрофото. Эпидермис и дерма (продольный срез) стенки копытца с отросшим рогом. Окраска по Маллори. X-125

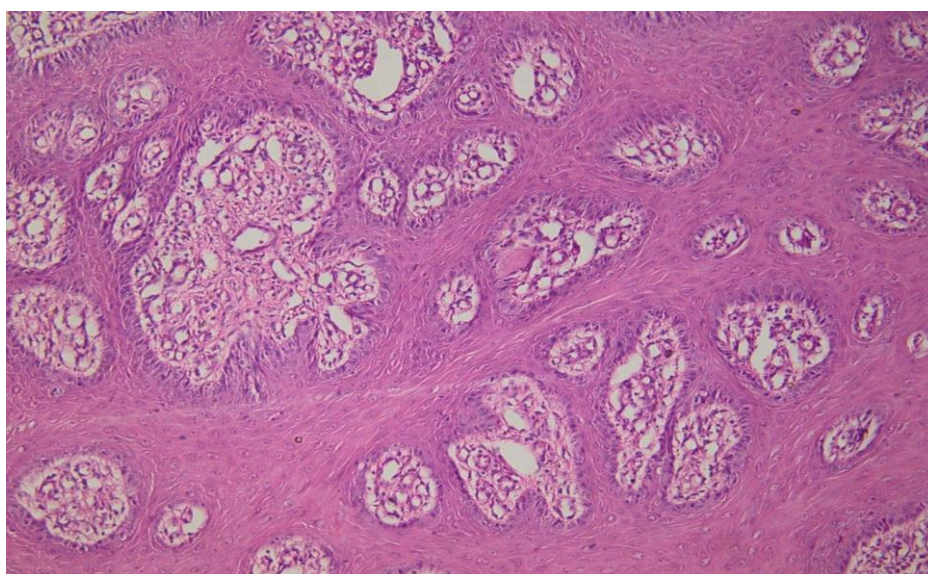


Рисунок 4.1.22 – Микрофото. Поперечный срез сосочков дермы Копытца с отросшим рогом. Окраска гематоксилин-эозином. X-250

4.2. Методы фиксации тканей

Фиксация – метод обработки ткани с целью закрепления ее прижизненной структуры. Сущность фиксации заключается в том, чтобы сохранить взятые кусочки тканей от гниения и процессов аутолиза, изменяющих их структуру. Недостаточно зафиксированный или излишне обезвоженный препарат, как правило, не пригоден

для дальнейших исследований. Поэтому необходимо соблюдать общие правила фиксации, контролировать качество реагентов для фиксирующих растворов. Кроме того, нужно заранее знать предполагаемые методы исследования и вид ткани, т.к. от этого будет зависеть выбор фиксирующей жидкости и продолжительность фиксации.

Фиксируемые ткани претерпевают ряд физико-химических изменений. Наиболее существенными из них являются: быстрое свертывание белков и частично липидов и переход их в такое состояние, при котором ткани не изменяются от длительного хранения и во время последующих обработок.

Необходимо соблюдать ряд правил, которые обеспечат полноценную фиксацию материала:

- ✓ кусочки тканей после отбора немедленно погружают в фиксирующую жидкость;
- ✓ объем фиксирующей жидкости должен превышать объем фиксируемого материала в 10-20 раз, так как тканевая жидкость может существенно изменить концентрацию фиксатора;
- ✓ если цвет фиксирующей жидкости изменяется после погружения в него кусочков ткани, то фиксирующую жидкость необходимо сменить;
- ✓ недопустимо повторное использование фиксирующей жидкости;
- ✓ необходимо соблюдать установленное время фиксации. Длительное пребывание материала возможно лишь в некоторых фиксаторах, например 10% нейтральном формалине, для тканей, окрашиваемых на жир;
- ✓ лучше использовать емкости с широкой горловиной, чтобы не возникло проблем с извлечением фиксированного материала;
- ✓ необходимо контролировать качество фиксации материала: на разрезе, на всю глубину проба тканей должна быть равномерного серого цвета.

Фиксацию тканей производят в жидкостях различного состава. Наиболее употребляемыми и удобными для тканей пальцев крупного рогатого скота являются такой простой фиксатор, как 10% раствор формалина, а так же сложный фиксатор – раствор кальций-формола по Бейкеру (см. ниже).

Фиксация формалином. Формалин является самым дешевым, универсальным и распространенным фиксатором. Формалин (40%-ный водный раствор формальдегида) применяется в виде 10% водного раствора (10 мл продажного формалина на 90 мл воды). Формалин в указанной концентрации сравнительно быстро (за 48-72 ч) пропитывает ткань и хорошо фиксирует ее, поэтому применяется даже для фиксации крупных объектов. Формалин придает ткани плотность, подходящую для резки на замораживающем микротоме. Существенное преимущество заключается в том, что препараты можно хранить в нем годами, при этом у них сохраняется способность к окрашиванию наиболее часто используемыми методами (гематоксилин-эозином, по Ван-Гизону). Особенно ценной является способность формалина сохранять липиды, что важно для фиксации жировой и нервной ткани.

Нельзя фиксировать материал в растворе формалина высокой (выше 10%) концентрации или в неразведенном продажном формалине. В этом случае поверхностные слои ткани быстро уплотняются, образуя корочку, которая препятствует проникновению фиксирующей жидкости вглубь пробы, где процессы аутолиза могут продолжаться. Высокая концентрация формалина в фиксирующем растворе препятствует заморозке ткани при использовании криотома.

Недостатки фиксации тканей формалином:

- некоторое ухудшение окраски тканей при продолжительной фиксации и хранении «влажного архива»;
- возможно выпадение формалиновых осадков, которые образуются в результате взаимодействия формальдегида с гемоглобином.

Фиксация кальций-формолом по Бейкеру. Данный раствор используется для фиксации липидов при подготовке к исследованию жировой ткани [4].

Приготовление раствора:

А. 10 мл 40 % формалина + 90 мл дистиллированной воды.

Б. 1 г хлорида кальция.

Растворы А и Б смешивают.

Продолжительность фиксации 24-48 ч при комнатной температуре.

Можно сначала делать гистосрезы из нефиксированных проб тканей, а затем помещать их в фиксирующую жидкость, т.к. без обезвоживания не получится провести окраску срезов.

Если планируется готовить гистосрезы только из рогового чехла копытца или проба тканей содержит роговой слой, то фиксацию проводить не следует, т.к. структура рогового башмака становится ещё плотнее и это значительно затрудняет или делает невозможным приготовление гистопрепаратов. Копытцевый рог или пробы тканей, содержащие его, сразу погружаются в специальный раствор для декальцинации, который, как правило, уже содержит формалин и который, в свою очередь, препятствует аутолизу мягких тканей.

Растворы для декальцинации:

- 5% раствор трихлоруксусной кислоты, содержащий 10-20% формалина. После декальцинации пробы тканей промывают в спирте (ни в кое случае не в воде!);
- жидкость Гудинга-Стеварта. Смесь состоит из 25 мл концентрированной муравьиной кислоты, 75 мл дистиллированной воды и 5 мл 40% формальдегида;
- лимонная кислота (10 г на 500 мл воды);
- уксус 9%.

Объем раствора для декальцинации должен быть в 50-100 раз больше, чем объем тканей. Банку с раствором и пробой тканей необходимо периодически встряхивать. Смену декальцинирующей жидкости проводить 1 раз в 2-3 дня. В декальцинирующем растворе пробы тканей остаются 7-15 дней до размягчения рогового слоя эпидермиса – это значительно облегчит приготовление гистосрезов. Для контроля декальцинации пробу рога необходимо проткнуть иглой – она должна свободно проходить его насквозь. Исходя из нашего опыта, для размягчения пробы рога размером 0,5х0,5х0,5 см требуется 7-9 дней.

Материал, извлеченный из фиксирующей (декальцинирующей) жидкости, содержащей формалин, перед приготовлением срезов в течение нескольких минут необходимо промыть в проточной воде, так как пары формалина оказывают раздражающее действие на слизистые оболочки глаз и органов дыхания человека, а так же для того, чтобы избавить ткань от избытка фиксатора и различных осадков.

4.3. Приготовление гистопрепаратов

Как правило, для изготовления гистологических срезов фиксированная ткань нуждается в дополнительном уплотнении. Для этого существует несколько методов: замораживание ткани, пропитывание ее застывающими жидкостями (парафином, целлоидном и т. п.). Парафин в воде не растворяется, и поэтому промытый после фиксации кусочки ткани необходимо предварительно обезводить, и только затем пропитывать.

Если планируется готовить гистосрезы только из рогового чехла или проба тканей содержит роговой чехол, то заливка в парафин не рекомендуется, так как он сильно обезживает и значительно уплотняет роговой чехол. После декальцинации таких проб тканей изготовление срезов лучше всего проводить на замораживающем микротоме.

После фиксации и уплотнения ткани тем или иным способом готовят гистосрезы. Для получения тонких срезов одинаковой толщины, пригодных для микроскопического исследования, пользуются аппаратами микротомами.

Замораживание ткани. При изготовлении гистологических препаратов на криотоме, применяют жидкую среду: специальный криогель или воду.

Этот метод имеет ряд преимуществ:

- ✓ позволяет быстро изготовить гистологические препараты;
- ✓ различная толщина (от 1 до 150 мкм) гистосрезом;
- ✓ используется при исследовании тканей на отложение в них жира и жирорасщепляющих веществ, поскольку жиры растворяются в спиртах, ксилоле и ацетоне (необходимые компоненты при заливке тканей в парафин);
- ✓ удобно использовать для плотных тканей, например, рогового чехла.

При заморозке копытцевого рога или проб тканей, содержащих его, температура в микротоме может быть – 10-12°C, т.е. достаточно лишь зафиксировать пробу ткани на столике, дополнительного уплотнения она не требует. При заморозке проб, содержащих жировую ткань температура микротомы должна быть ниже – 28-30°C. Это необходимо для дополнительного уплотнения ткани. При более низкой температуре заморозки жировая ткань будет размазываться по ножу, и сделать удачный срез не получится.

Заливка тканей в парафин. Мы использовали стандартные методики, описанные в литературе [2, 3, 4, 5]. Данную методику можно использовать для небольших фрагментов мягких тканей (например, грануляционной ткани).

Очень удобны в использовании и значительно ускоряют работу аппараты для проводки и заливки в парафин.

Срез должен получиться достаточно тонким и прозрачным, чтобы быть пригодным для окрашивания и микроскопирования. Обычно готовят срезы толщиной от 4 до 15 мкм. Но есть и исключения:

- роговой чехол – 2-4 мкм;
- мякиш, с большим количеством жировой ткани – 20-40 мкм;
- срез, включающий ткани различной плотности – 8-10 мкм.

Предметные стекла, применяемые для гистологических препаратов, как правило, специально упакованы и уже готовы к использованию. Но иногда гистосрез необходимо дополнительно фиксировать на предметном стекле, например, срезы рогового

чехла или срезы, включающие в себя ткани разной плотности. Для этого пользуются одним из способов:

➤ стекла окунают в раствор желатина и калиево-хромовых квасцов, а затем высушивают на воздухе при комнатной температуре.

Приготовление раствора (0,5 л готового раствора): 0,5 л воды, 2 г калиево-хромовых квасцов, 2,5-4 г желатина.

Калиево-хромовые квасцы растворить в воде, подогретой до 40-50°. Желатин полностью растворить в горячей воде (смотрите инструкцию на упаковке желатина). Смешать оба теплых раствора и обмакнуть в него предметные стекла.

Недостаток данного способа: чаще всего происходит окрашивание фона под препаратом. Это затрудняет выделение тканей с совпадающим по тону цветом при использовании компьютерных программ, но, как правило, практически не мешает морфометрии.

➤ свежий яичный белок взбивают и фильтруют через крупнопористый фильтр, смоченный дистиллированной водой, затем размешивают с равным объемом глицерина и добавляют несколько кристаллов тимола. Смесь хранится в течение нескольких месяцев. Для нанесения белка на обезжиренные предметные стекла в одну руку берут 5 — 6 стекол в виде веера, а в другую — чистую стеклянную палочку, которой наносят белок, прикасаясь к каждому стеклу. Затем белок растирают обезжиренным спиртом пальцем по поверхности стекла до его середины, прилагая небольшое усилие. Некоторые авторы рекомендуют натертые белком стекла прогревать в термостате, но опыт показывает, что это излишне, так как после переноса срезов на стекла их помещают в термостат или на специальный столик для просушивания, где одновременно происходит коагуляция белка [2, 3].

Недостаток метода: окрашивание фона под препаратом.

➤ готовые адгезивные препараты, которые улучшают прикрепление среза к предметному стеклу, не влияют на реакции окрашивания и не создают фона. Препараты улучшают адгезию также и в методиках, где используется нагревание.

К недостаткам можно отнести высокую стоимость препарата.

4.4. Окрашивание гистопрепаратов

Методы окрашивания выбираются, исходя из состава исследуемых тканей и основаны на неодинаковом сродстве тканевых элементов к определенным красителям.

Окраска гематоксилин-эозином. Наиболее распространённый метод окрашивания срезов, содержащих любые виды тканей. Этот метод применяется для обзорных исследований, позволяет установить отношения между частями тканей, отлично выявляя все клеточные элементы и некоторые не клеточные структуры. Окраска гематоксилин-эозином применяется практически во всех случаях, независимо от поставленной задачи. В большинстве случаев, для изучения структуры нормальной или измененной в результате болезни ткани копытец ограничиваются этим методом окраски. В других случаях, когда стоит специальная задача, например, выявить виды волокон, пользуются специальными методами окрашивая, но в то же время параллельно окрашивают ряд срезов гематоксилин-эозином.

Эта окраска является двойной: гематоксилин – основной краситель – окрашивает ядра клеток, эозин – кислый краситель – красит протоплазму клеток и в меньшей степени – различные неклеточные структуры.

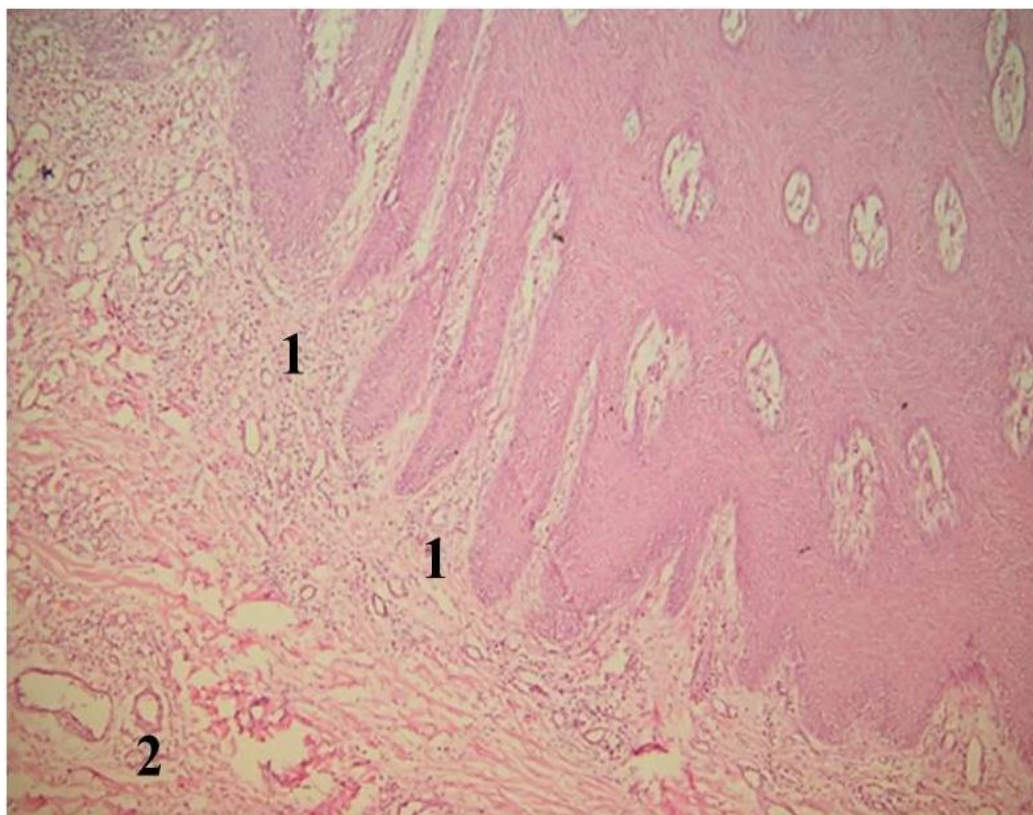
Замороженные гистосрезы мы окрашивали автоматически на аппарате HMS 70 фирмы MICROM.

Порядок проведения окраски:

1. Раствор гематоксилина (5 мин).
2. Водопроводная вода (1 мин).
3. Эозин (5 сек).
4. Водопроводная вода (1 мин).
5. Дистиллированная вода (30 сек).
6. Сушка (15 мин).
7. 96% спирт (5 сек).
8. Сушка (10 мин).
9. Ксилол (10 сек).
10. Сушка (10 мин).
11. Заключение в бальзам или полистирол.

Результат окрашивания: ядра синие, цитоплазма и межклеточное вещество розовые.

Пример окрашивания:



1 – сосочковый слой, 2 – сетчатый слой

Рисунок 4.4.23 – Микрофото. Основа кожи пальцевого мякиша анатомически правильного копыта. Окраска гематоксилин-эозином. X-250

Гистохимические методы окрашивания основаны на специфическом окрашивании исследуемых тканей определенными красителями. В наших исследованиях мы применяли гистохимические исследования для выявления и подсчета удельной площади коллагеновых и эластических волокон, вакуолей жира.

Окрашивание жиров и липидов. Суть методов заключается в том, что вещества, красящие жиры, хорошо в них растворяются и поэтому легко переходят из раствора в липиды.

Окрашивание Суданом III. Является наиболее распространенным методом выявления жира.

Приготовление раствора красителя. В 100 мл горячего 70% спирта засыпают 0,2-0,3 г порошка судана III, несколько раз взбалтывают и ставят в термостат (при 58°C) на несколько часов, затем охлаждают и фильтруют.

Порядок проведения окраски:

1. Замороженные срезы (из свежей или фиксированной в формалине ткани) ополоснуть в 50% спирте (30-60 сек).
2. Поместить в свежеприготовленный раствор судана III на 5-20 мин (бюксы следует закрывать, так как испарение спирта приводит к выпадению осадков красителя).
3. Быстро ополоснуть в 50% спирте (30 сек).
4. Промыть в водопроводной воде (10-30 мин).
5. Поместить в гематоксилин (30 сек – 3 мин).
6. Промыть в водопроводной воде (3-5 мин).
7. 1% раствор соляно-кислого спирта (3-5 сек) – если срезы перекрашены!
8. ЗаклЮчить гистосрезы в желатин, глицерин или глицерин-желатин.

Примечание: препараты сравнительно быстро выцветают, поэтому откладывать исследование не рекомендуется.

Результат окрашивания: жировые вещества интенсивно оранжевого цвета, ядра – синие.

Пример окрашивания:

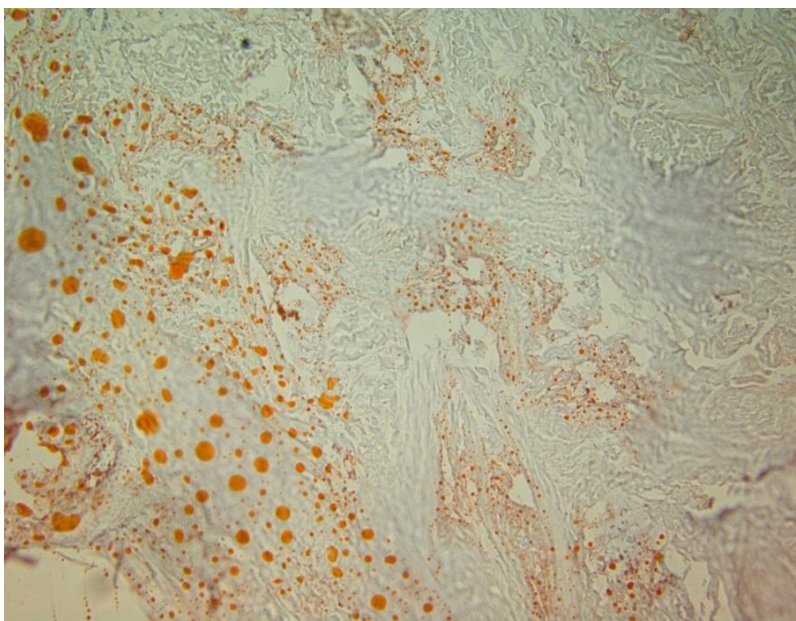


Рисунок 4.4.24 – Микрофото. Жировые вакуоли подошвенной части пальцевого мякиша анатомически правильных копыт. Окраска суданом III. X-250

Окраска нейтральных жиров жировым красным (OIL RED) по Лилли. Фиксирование тканей проводить только в кальций-формоле, гистосрезы готовить на замораживающем микротоме. *Преимущество* перед окрашиванием суданом III: жир из вакуолей не вымывается, окрашиваются даже самые мелкие капельки липидов.

Приготовление красителя: внести примерно 0,5 г жирового красного (OIL RED) в 100 мл 98% изопропанола (*исходный раствор*). Для окраски развести 6 мл исходного раствора в 4 мл воды, оставить на 24 часа. Затем раствор фильтруют через бумагу и применяют немедленно. Полученный фильтрат использовать как *основной краситель*.

Порядок проведения окраски:

1. Промыть замороженные срезы в воде и в 60% изопропаноле. Затем окрасить их свежим раствором жирового красного в течении 10 минут.
2. Быстро дифференцировать в 60% изопропаноле (раствор хранить в плотно закрытой посуде или каждый раз готовить свежий).
3. Промыть в воде.
4. Окрасить в гематоксилин-эозине (от 5-10 секунд до 10 минут).
5. Промыть в проточной воде (10 минут).
6. ЗаклЮчить в гумми-сироп (среда очень густая, ее необходимо предварительно разогреть в термостате; долго сохнет).

Результат окрашивания: липиды окрашиваются в красный (оранжевый) цвет, ядра – в синий.

Пример окрашивания:

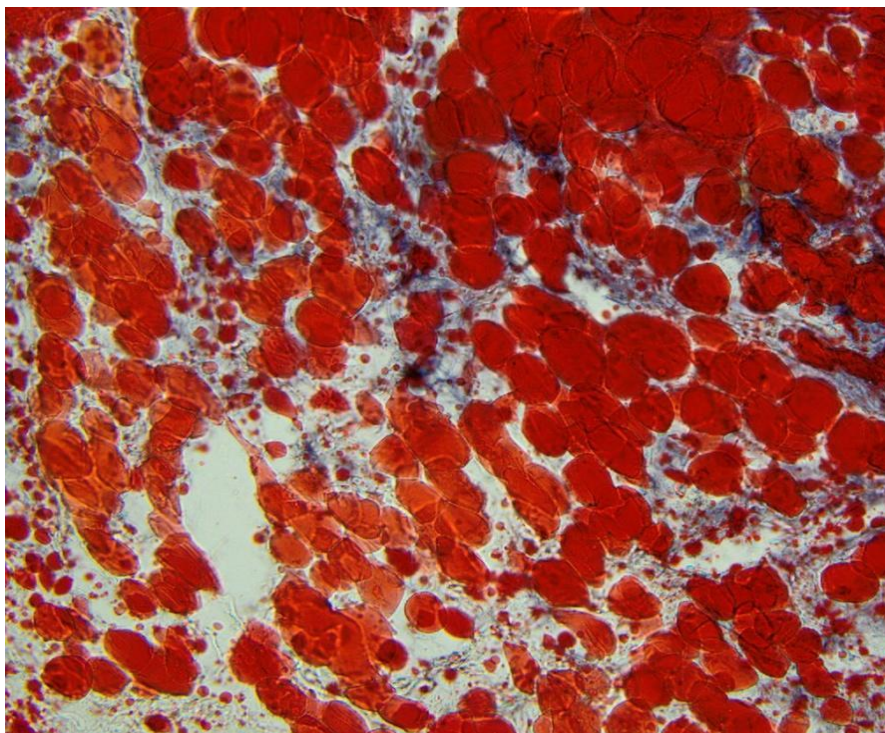


Рисунок 4.4.25 – Микрофото. Крупные жировые вакуоли пальцевого мякиша анатомически правильных копыт. Окраска жировым красным (OIL RED) по Лилли. X-250

Окрашивание волокон соединительной ткани

Окраска по методу Ван – Гизона. Окраска соединительной и мышечной тканей гематоксилин-пикрофуксином по методу Ван - Гизона широко используется в гистологической практике как для получения обзорных препаратов, так и для некоторых специальных целей. При этом волокна соединительной ткани за счет фуксинофилии контрастно будут выделяться на фоне других тканевых элементов, окрашенных в ярко-желтый цвет пикриновой кислотой. В качестве ядерной окраски применяется железный гематоксилин Вейгерта, который готовят непосредственно перед окрашиванием, смешивая равные объемы основных растворов Вейгерта (первого и второго), которые хранят отдельно.

Первый раствор Вейгерта: в 100 мл 96% спирта растворяют 1г гематоксилина.

Второй раствор Вейгерта: 4 мл 29% раствора хлорида железа (2-3% раствора железоаммониевых квасцов) сливают с 1 мл крепкой хлористоводородной кислоты и добавляют 95 мл дистиллированной воды.

При смешивании растворов приливают второй раствор к первому не в равном, а в несколько меньшем количестве, а затем добавляют второй раствор к полученной смеси по каплям из пипетки до равного количества с первым раствором. В силу изменения поверхностного натяжения раствора он начинает подниматься по стенкам сосуда (бюкса) и собирается в капли, которые вновь стекают в жидкость. Такое явление указывает на правильное количественное соотношение первого и второго растворов Вейгерта в смеси, и тогда добавление второго раствора надо прекратить.

Правильно приготовленный краситель имеет темно-фиолетовую окраску. Если он бурого цвета, то имеется избыток второго раствора. Ядра таким красителем будут окрашиваться не в черный, а в бурый цвет.

Растворы Вейгерта в отдельности можно хранить годами, а их смесь – не больше 3-4 дней, поэтому лучше всего пользоваться свежеприготовленным раствором.

Раствор пикрофуксина: к 100 мл насыщенного водного раствора пикриновой кислоты прибавляют 5-10 мл 1% водного раствора кислого фуксина.

Если нужно срочно приготовить очень небольшое количество раствора, то в пузырек из-под пенициллина наливают профильтрованный насыщенный раствор пикриновой кислоты (половину пузырька) и к нему по каплям прибавляют 1% раствор кислого фуксина. При этом контролем может служить капля смеси на фильтровальной бумаге, которая должна иметь цвет свежей крови.

Порядок проведения окраски:

1. Сполоснуть срезы в дистиллированной воде 1-2 секунды.
2. Окрасить срезы в железном гематоксилине Вейгерта 3-10 минут.
3. Промыть в двух порциях проточной воды 1-2 минут.
4. Окрасить в пикрофуксине 2-3 минуты.
5. Быстро сполоснуть в дистиллированной воде 5-15 секунд.
6. Быстро обезводить в двух порциях 96%-го этанола, одной порции абсолютного этанола (или карбол-ксилола), просветлить в двух порциях орто-ксилола. Время пребывания срезов в каждой порции 1-2 минуты.
7. ЗаклЮчить в полистирол или другую синтетическую среду.

Результат окрашивания: ядра клеток приобретают черный цвет, коллагеновые волокна – красный; цитоплазма, кератин, эластические волокна и другие тканевые элементы – желтые.

Пример окрашивания:



Рисунок 4.4.26 – Микрофото. Гиподерма пальцевого мякиша анатомически правильного копытца. Окраска по Ван-Гизону. X-250

Для более контрастной и полихромной картины, с выявлением форменных элементов крови, фибрина можно использовать **трехцветный метод Маллори**.

Приготовление красителя Маллори (реагенты): 100 мл 0,5% водного раствора кислого фуксина, 0,5 г анилинового синего водорастворимого, 2 г оранжев G, 1 г фосфорно-вольфрамовой кислоты, 100 мл дистиллированной воды. Последовательность растворения: в 100 мл дистиллированной воды растворяется 0,5 г кислого фуксина. Отдельно при комнатной температуре растворяется фосфорно-вольфрамовая кислота в воде, добавляется анилиновый синий и оранжев G. После растворения красителей жидкость фильтруется.

Порядок проведения окраски:

1. Срезы обрабатываются в 3% растворе бихромата калия – 20 минут.
2. Промыть в дистиллированной воде (1-2 минуты).
3. Окрасить в растворе кислого фуксина (5 минут).
4. Быстро ополоснуть срезы в дистиллированной воде.
5. Перенести в окрашивающий раствор Маллори (анилиновый синий и оранжев G на 1%-ной фосфорно-вольфрамовой кислоте) на 2 минуты (можно увеличить время для более контрастного окрашивания).
6. Быстро ополоснуть срезы в дистиллированной воде.
7. Дифференцировать окраску (до контрастной синей окраски коллагеновых волокон) в нескольких порциях 96%спирта.
8. Ксилол.
9. ЗаклЮчить в полистирол или другую синтетическую среду.

Результат окрашивания: ядра, коллагеновые волокна – красные, красно-оранжевые, оранжевые, эластические волокна – интенсивно синие, слизь синяя, эритроциты красно-оранжевые, мышечные волокна ярко-оранжевые.

Пример окрашивания:

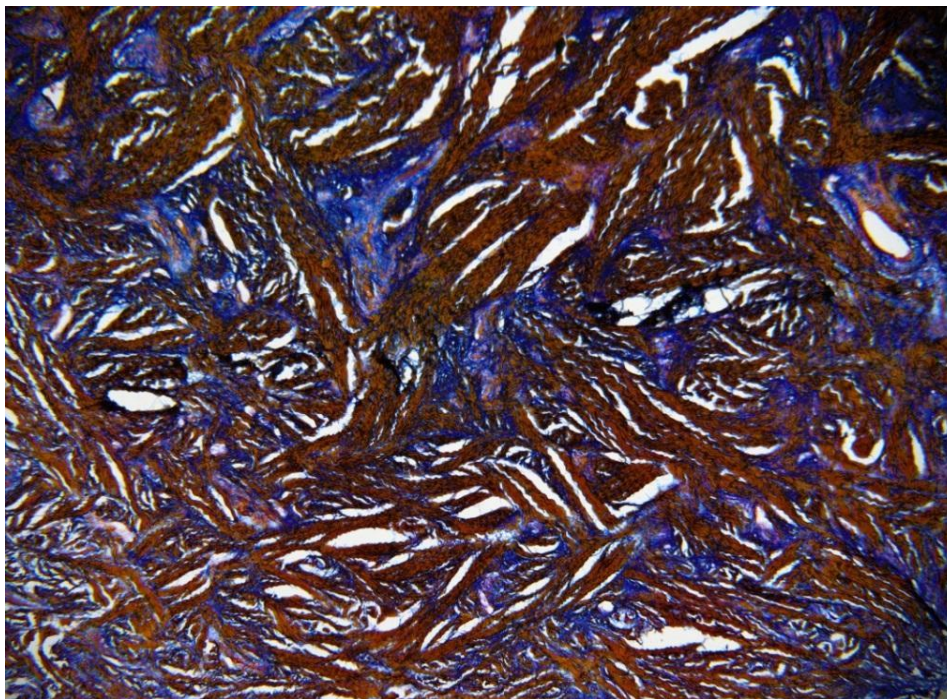


Рисунок 4.4.27 – Микрофото. Гиподерма пальцевого мякиша анатомически правильного копытка. Окраска по Маллори. X-125

Хорошие результаты окрашивания тканей пальцев дает модификации метода Маллори – **трёхцветный одномоментный метод Касона**.

Приготовление красящего раствора: в 200 мл дистиллированной воды последовательно растворяют 1 г фосфорно-молибденовой кислоты, 2 г оранже G, 1 г анилинового синего, 3 г кислого фуксина.

Порядок проведения окраски:

1. Срезы промыть в дистиллированной воде.
2. Окрашивают ядра в железном гематоксилине Вейгерта 5 минут (необязательный пункт).
3. Срезы промыть в дистиллированной воде 5-10 мину.
4. Красящий раствор (5 минут).
5. Промывка в проточной воде 3-5 секунд, высушить фильтровальной бумагой.
6. Провести срезы через 3 смены 100% спирта, ксилол, заключить в бальзам.

Результат окрашивания: ядра черные или коричневые, коллагеновые и ретикулярные волокна розовые, мышцы и цитоплазма клеток, эритроциты, кератин красные или оранжевые, фибрин красный, слизь, амилоид, гиалин – разные оттенки синего цвета, эластические волокна синие.

Пример окрашивания:

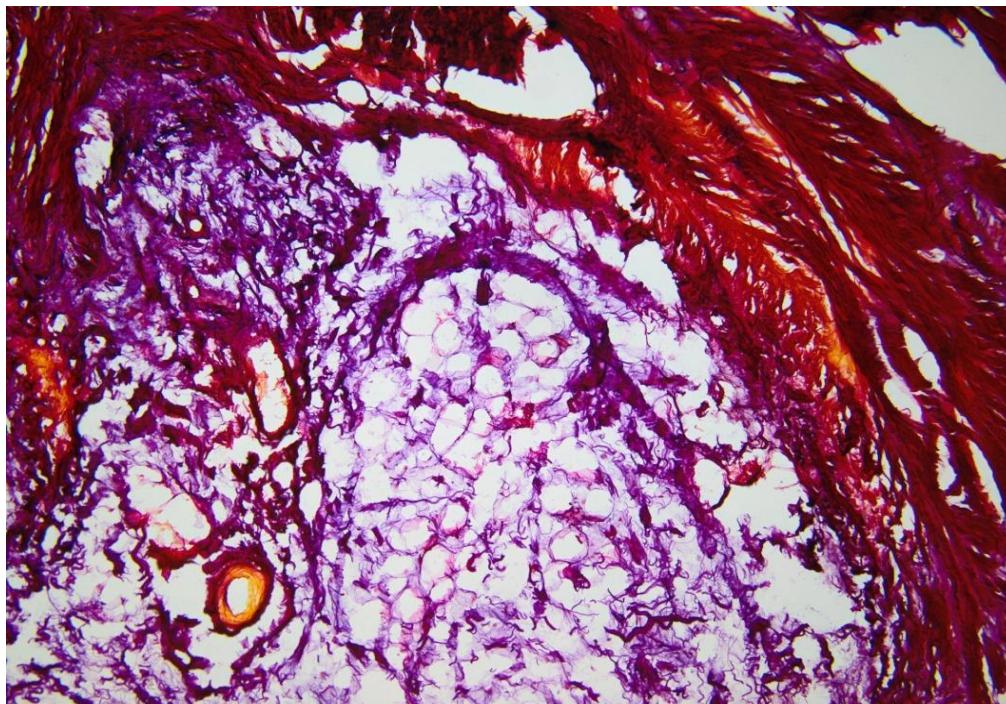


Рисунок 4.4.28 – Микрофото. Гиподерма пальцевого мякиша копытца с отросшим рогом. Окраска по Касону. X-125

Окраска нервной ткани, эластически и коллагеновых волокон, кровеносных сосудов азотнокислым серебром по Рассказовой, в модификации В.В. Малашко (2012 г.).

Приготовление серебра: концентрация от 15% до 30%. Например, 15 г серебра на 100 мл бидистиллированной воды, или 5 г серебра на 30 мл бидистиллированной воды.

Приготовление кислого формалина: 1% раствор – 10 мл формалина на 100 мл водопроводной воды, или 0,5% – 5 мл формалина на 100 мл воды.

Приготовление аммиачного серебра: готовится перед окраской. Титровать азотнокислое серебро до просветления 25% раствором аммиака. Необходимо уловить переход от темной окраски к светлой. Можно добавить 2-3 капли аммиака, чтобы срезы не были слишком темные. Если ткань светлая, то дополнительно аммиак добавлять не нужно.

Аммиачная вода: стандартный раствор: 5 мл 25% аммиака (нашатырный спирт) и добавить до 20 мл воды, т.е. соотношение 1:4. Раствор хранить в закрытой банке (запах).

Примечание: если срезы перекрашены, то в аммиачной воде они могут потерять окраску и тогда раствор нужно сделать крепче – 10:20; если не докрашены – то раствор аммиачной воды необходимо сделать слабее.

Нужно использовать только чистую лабораторную посуду и стеклянную палочку, которая должна храниться в дистиллированной воде и обязательно после формалина её нужно промывать в отдельном стаканчике с дистиллированной водой. Показатель чистоты – серебро не выпадет в осадок. Если образуется осадок, значит,

нарушена чистота лабораторной посуды. Импрегнацию серебром необходимо проводить при температуре в помещении не ниже 20°C.

Порядок проведения окраски:

1. Срезы последовательно переносим в нейтральный 10-12% формалин – дистиллированную воду – 96° спирт – 2-3 смены дистиллированной воды.

Примечание: если ткань жирная, то в спирте можно держать дольше.

2. Переносим срезы в азотнокислое серебро.

Примечание: раствор со срезами можно помещать в термостат (37°C) на 30 мин. – 60 мин., для ускорения импрегнации, но возможно выпадение осадка серебра.

3. Промываем срезы в 2-3 сменах дистиллированной воды.

4. Переносим в 1% раствор формалина (3 чашки. Смену чашки проводить после появления опалесцирующего облачка (помутнения формалина)). После формалина срезы промокнуть фильтровальной бумагой.

5. Аммиачное серебро (10-20 мин).

6. 0,5% раствор формалина (3 чашки).

Примечание: если срезы быстро темнеют, то раствор надо развести до 0,1%.

7. Дистиллированная вода.

8. Аммиачная вода 10-15 мин. (для просветления срезов).

9. Дистиллированная вода.

10. Спирт 70° – 2-3 секунды.

11. Спирт 96° – 2-3 секунды.

12. Ксилол – 3-5 секунд.

13. Срез заключить в бальзам.

Результат окрашивания: на желтовато-коричневом или светло-коричневом фоне черного цвета нервные волокна.

Пример окрашивания:

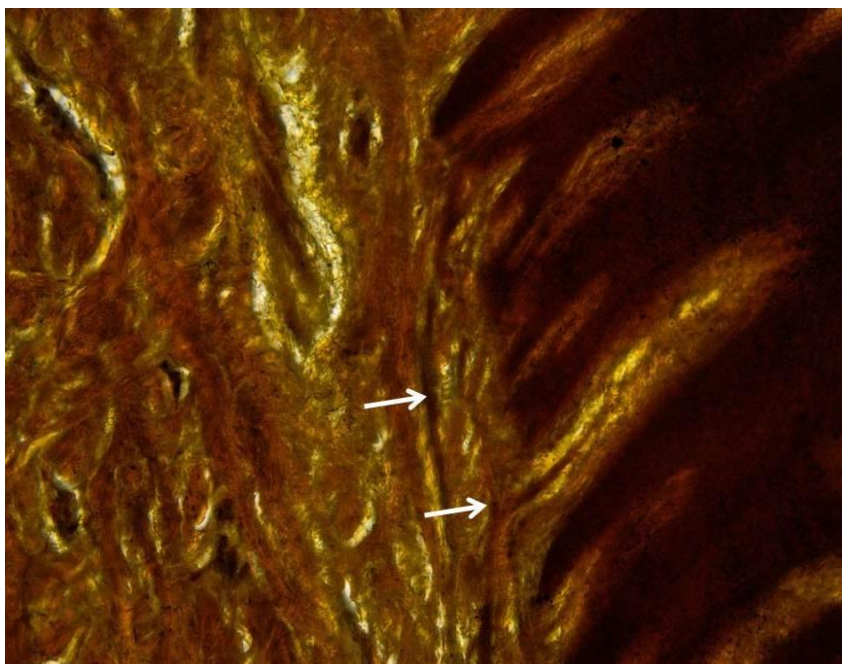
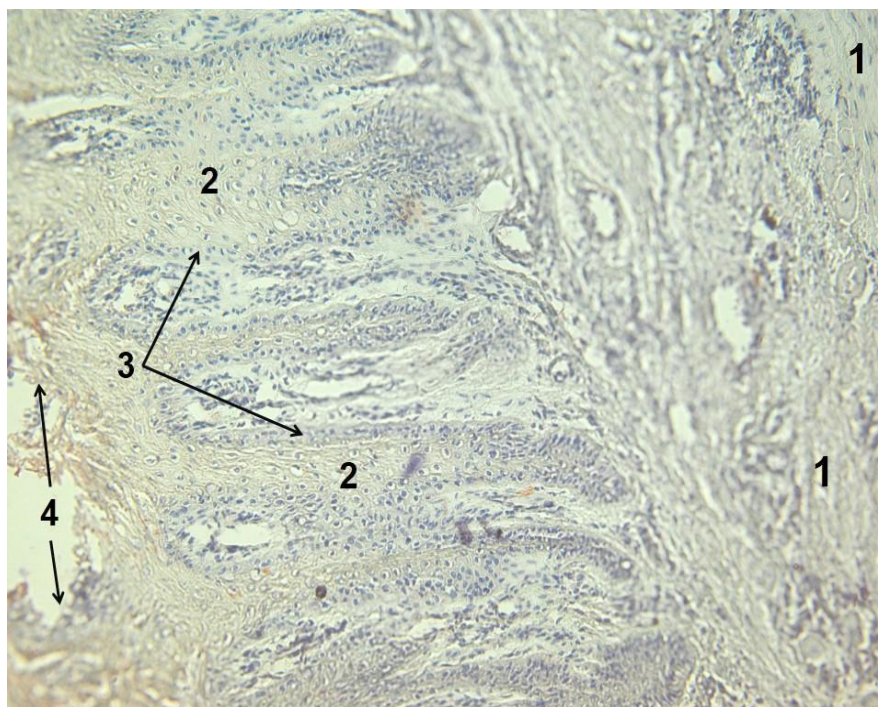


Рисунок 4.4.29 – Микрофото. Нервное волокно пальцевого мякиша. Импрегнация азотнокислым серебром по Рассказовой, в модификации В.В. Малашко. X-750

4.5. Микроскопия гистопрепаратов

4.5.1. Обзорные исследования

Для обзорных исследований удобно делать срезы, включающие послойно все ткани копытец. Но можно готовить срезы каждого слоя в отдельности, что несколько облегчает изготовление гистопрепаратов, т.к. ткани копытец отличаются по плотности. Обзорные исследования имеют диагностическое значение для выявления патологий копытец, позволяют оценить общую картину состояния тканей, выявить патоморфологические изменения в тканях копытец при отрастании и деформациях копытцевого рога, изучить патогенез ортопедических болезней. Данные исследования включают изучение топографии и строения тканей, их клеточного состава, взаимоотношения структурных компонентов, морфологии заживления патологического очага. В наших исследованиях мы оценивали форму волокон соединительной ткани (волнистые или распрямленные), структуру и вид слоев эпидермиса (рисунок 4.5.1.30); наличие, количество и вид кровеносных сосудов; количество и форму жировых вакуолей; форму сосочков дермы (правильные и деформированные).



1 – распрямление коллагеновых волокон, 2 – сосочки дермы, 3 – частичное отсутствие базального слоя эпидермиса, 4 – выкрошенный роговой слой эпидермиса

Рисунок 4.5.2.30 – Микрофото. Патология дермы и эпидермиса копытец с отросшим рогом. Окраска по Маллори. X-500

Иногда, при работе с толстыми гистологическими препаратами, не получается изучить структуры на всю глубину тканей из-за невозможности сфокусировать изображение. Мы делали несколько фотографий на разной глубине среза и использовали программу Helicon Focus, которая создает из нескольких частично сфокусированных изображений (рисунок 4.5.2.31), комбинируя сфокусированные области, одно полностью сфокусированное (рисунок 4.5.2.32). Программа создана для макрофотографий и

для обработки изображений, полученных при помощи оптических микроскопов, а так же решает проблему малой глубины резкости.

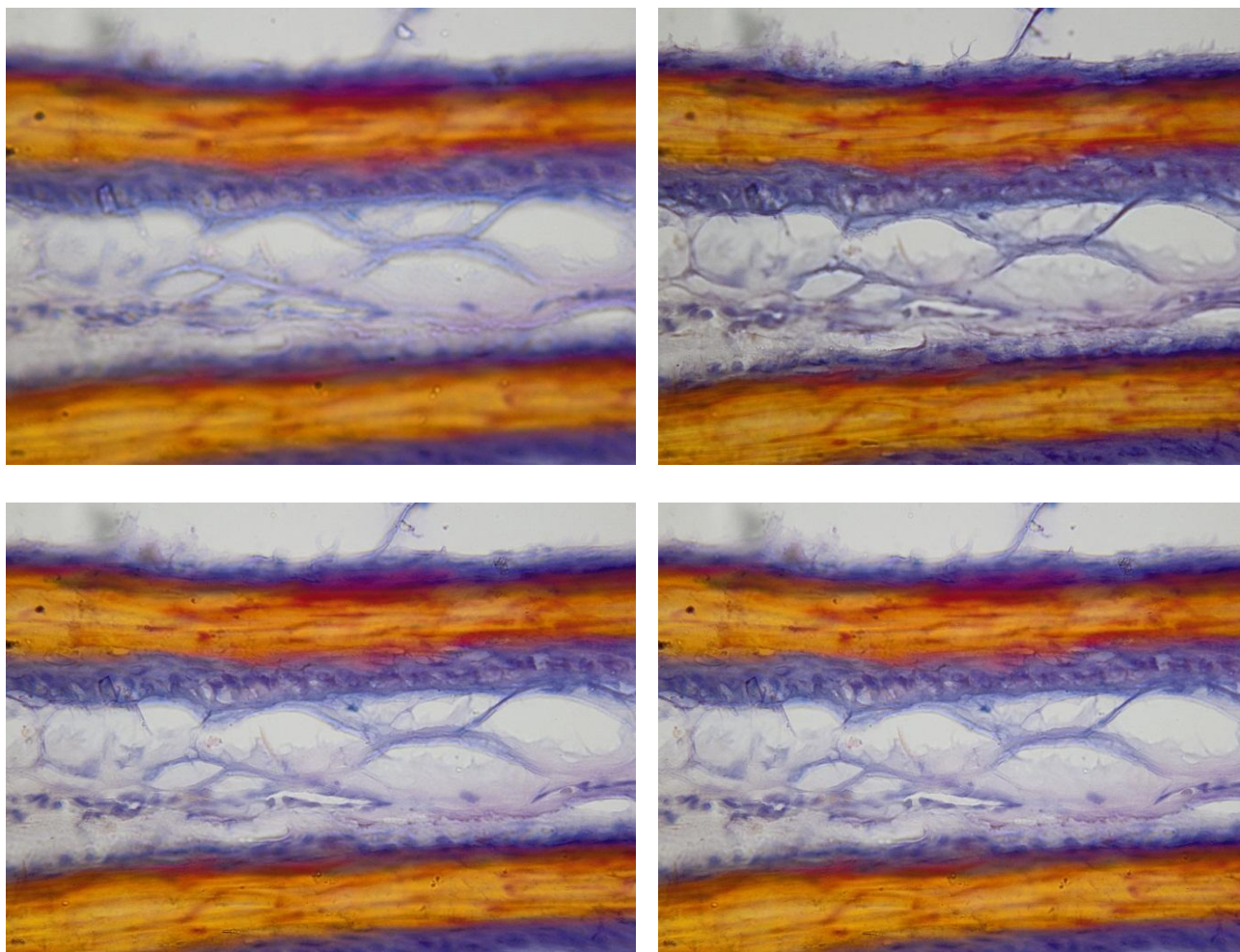


Рисунок 4.5.2.31 – Несколько частично сфокусированных изображений участка сосочка дермы

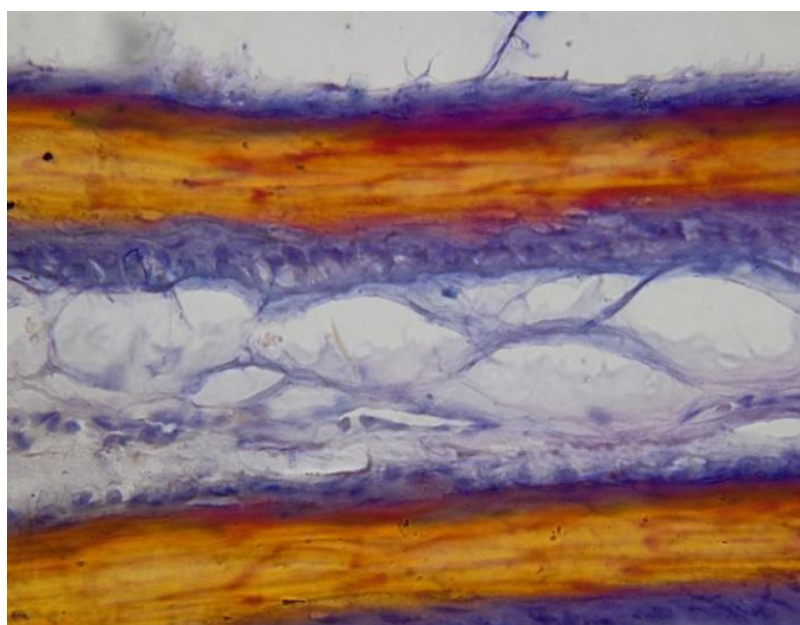


Рисунок 4.5.2.32 – Готовое, полностью сфокусированное изображение участка сосочка дермы. Окраска гематоксилин-эозином. X-750

4.5.2. Микроморфометрия

Морфометрия – исследования, направленные на измерение параметров (размер, углы, концентрация и т.п.) морфологических структур органов и тканей.

Микроморфометрию полученных изображений рекомендуем проводить на ПК с использованием специальных программ (cell Sens Standart, Image Scope M и т.п.).

Программа cellSens может быть использована для работы как с «живым» изображением без захвата (фотографирования и сохранения) или с сохраненным или загруженным фотоматериалом, Image Scope M – работает только с сохраненным изображением.

Чрезвычайно важно перед проведением измерений на изображении провести калибровку объективов (первично) (рисунок 4.5.2.33) и назначить соответствующий откалиброванный объектив (Измерения → калибровка размеров) (рисунок 4.5.2.34), то есть убедиться в соответствии увеличения объектива, на котором была сделана фотография, со стандартизированной шкалой расстояний, данные которой внесены в память программы. Это необходимо для точности морфометрии, в противном случае цифровые данные будут различаться в разы.

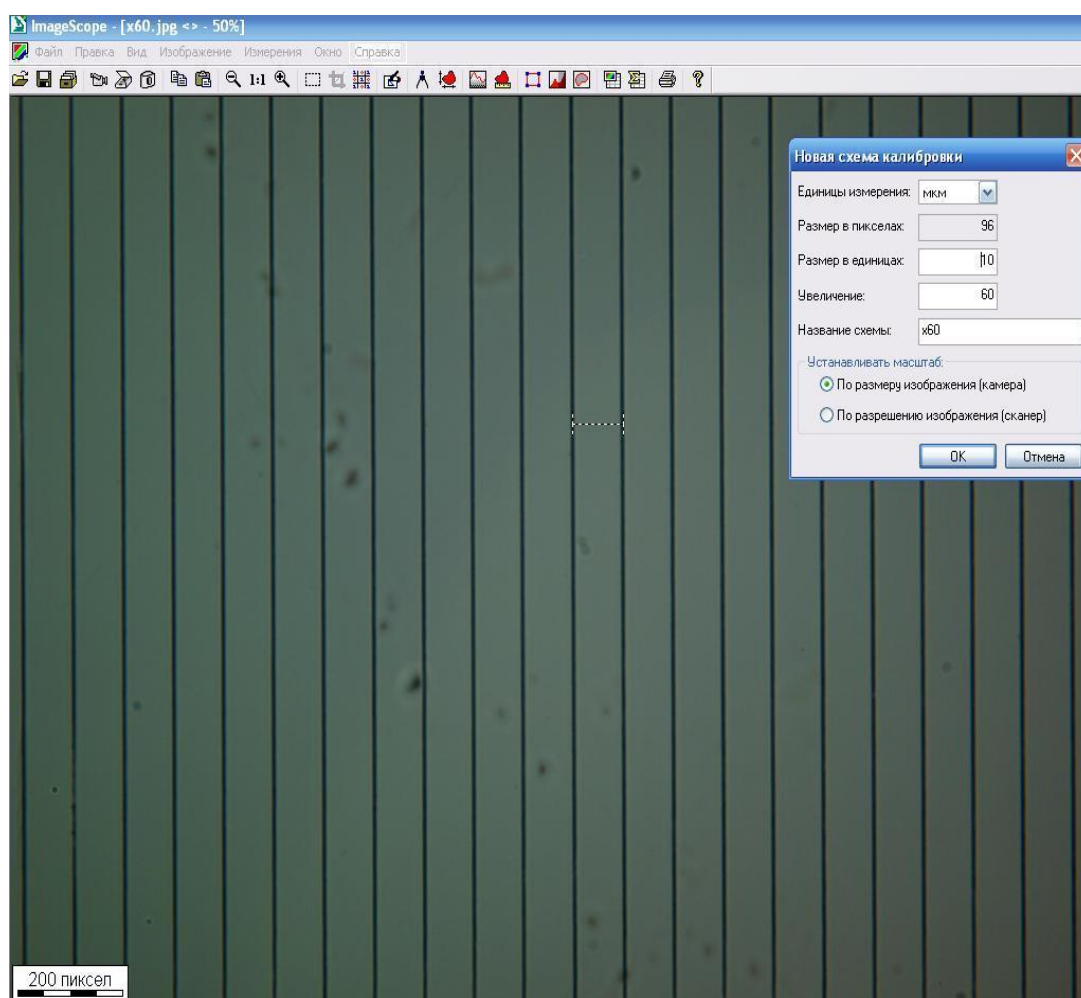


Рисунок 4.5.2.33 – Эталонная шкала для калибровки. Калибровка объектива X60

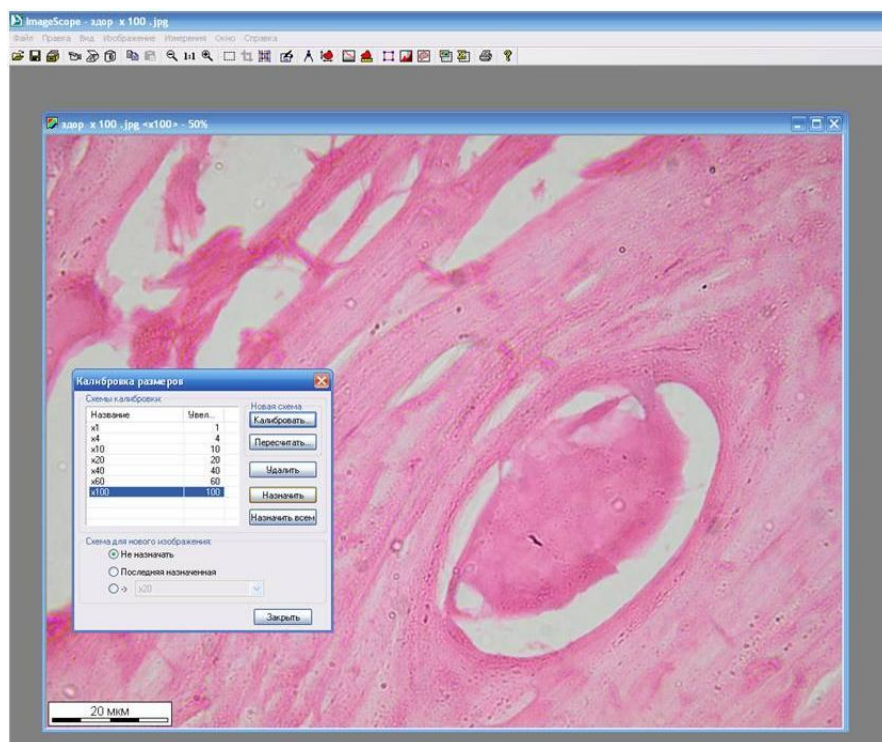


Рисунок 4.5.2.34 – Окно программы Image Score с фотографией роговой трубочки.
Калибровка изображения

После калибровки можно проводить измерения. Для измерений необходимо использовать такие инструменты, которые наиболее точно будут повторять форму измеряемого объекта. Например, для морфометрии роговых трубочек мы использовали инструмент «ломанная линия» (рисунок 4.5.2.35).

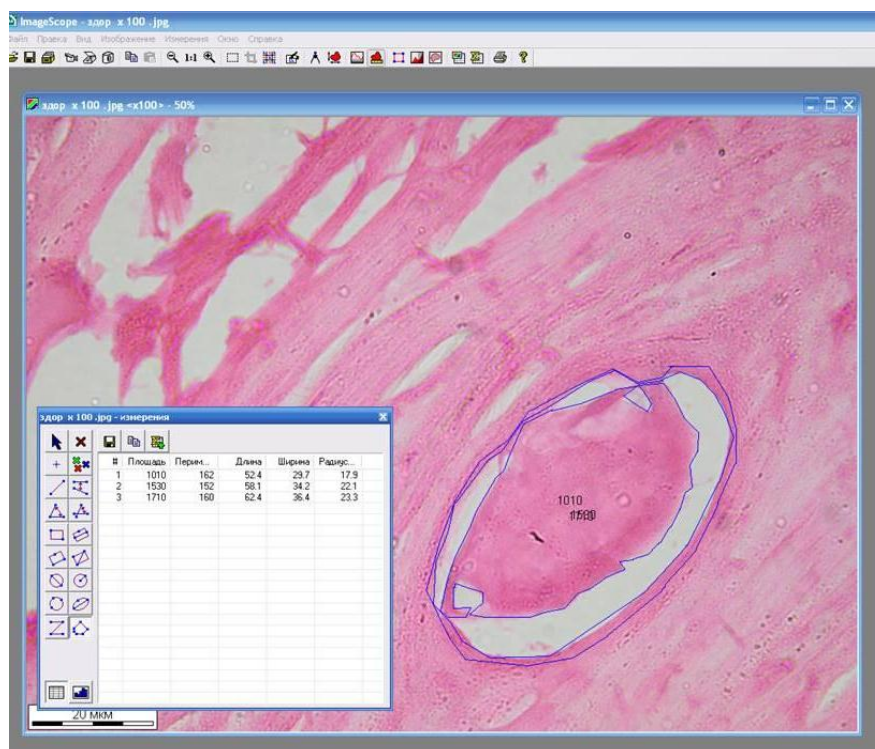
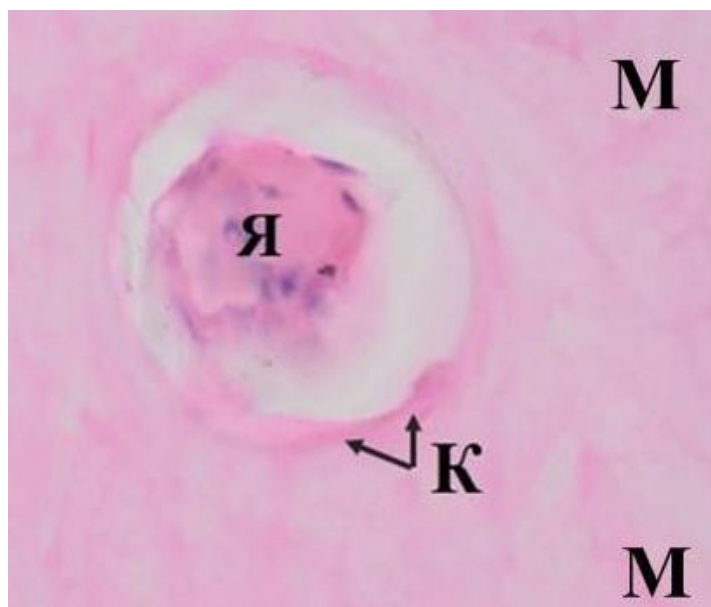
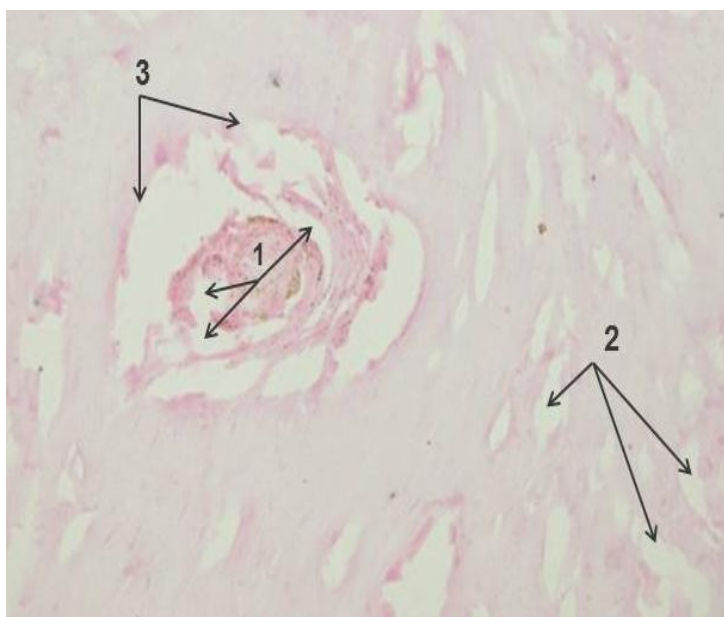


Рисунок 4.5.2.35 – Окно программы Image Score с фотографией роговой трубочки.
Измерение параметров роговой трубки инструментом «ломанная линия»

Так как морфофункциональной единицей копытцевого рога является трубочка, то от ее параметров напрямую зависит качество рога. Важно проводить измерение не только отдельных элементов трубочки, но и их соотношение. В наших исследованиях мы измеряли диаметр, общую площадь роговой трубочки, а так же площади коры и ядра. Рассчитывали отношение площади коры трубочки к площади ядра, выкрошенную площадь ядра трубочки. В отличие от здорового рога (рисунок 4.5.2.36) при отращивании копытцевого рога, а так же при наличии ортопедических патологий будет отмечаться расслоение межтрубчатого рога, истончение коры и выкрашивание ядра роговой трубочки (рисунок 4.5.2.37).



М – плотный межтрубчатый рог, Я – ядро трубки, К – кора трубки
Рисунок 4.5.2.36 – Трубчатый рог подошвы анатомически правильного копыта.
Окраска гематоксилин-эозином. X-500



1 – выкрошенное ядро, 2 – пустоты в межтрубчатом роге, 3 – истончение коры трубочки
Рисунок 4.5.2.37 – Трубчатый рог подошвы копыта с отросшим рогом.
Окраска гематоксилин-эозином. X-500

Измеряли расстояние между рядами трубочек и между трубочками в ряду (рисунки 4.5.2.38), а так же рассчитывали концентрацию роговых трубочек на единицу площади (штук/1 мкм²).

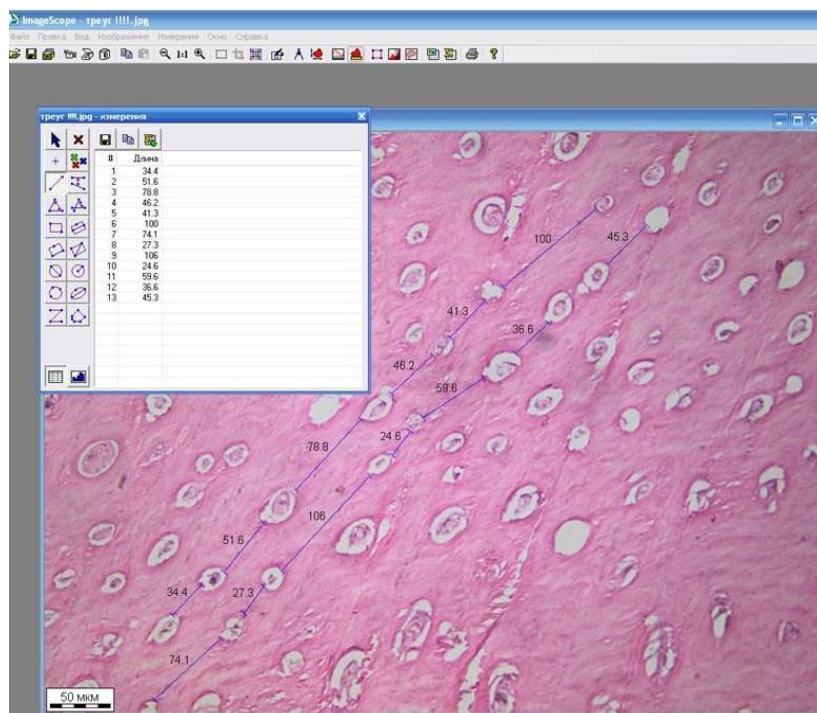


Рисунок 4.5.2.38 – Окно программы Image Scope с фотографией рога пальцевого мякиша анатомически правильного копытка. Измерение расстояния между трубочками в ряду

Концентрация роговых трубочек уменьшается при язвенных патологиях копыт, при отрастании копытцевого рога, что свидетельствует о снижении прочности рога, а, следовательно, и его защитных функций (рисунок 4.5.2.39).

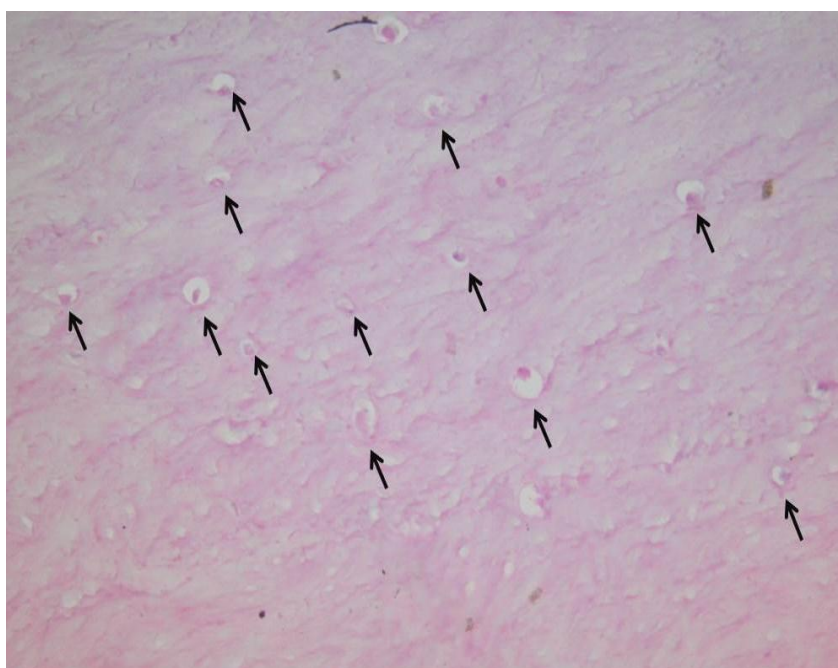


Рисунок 4.5.2.39 – Микрофото. Уменьшение концентрации трубочек в роге подушки мякиша при отрастании копытцевого рога. Окраска гематоксилин-эозином. X-250

Используя инструмент «отрезок», проводили измерение высоты и ширины сосочков в сосочковом слое дермы (рисунок 4.5.2.40).

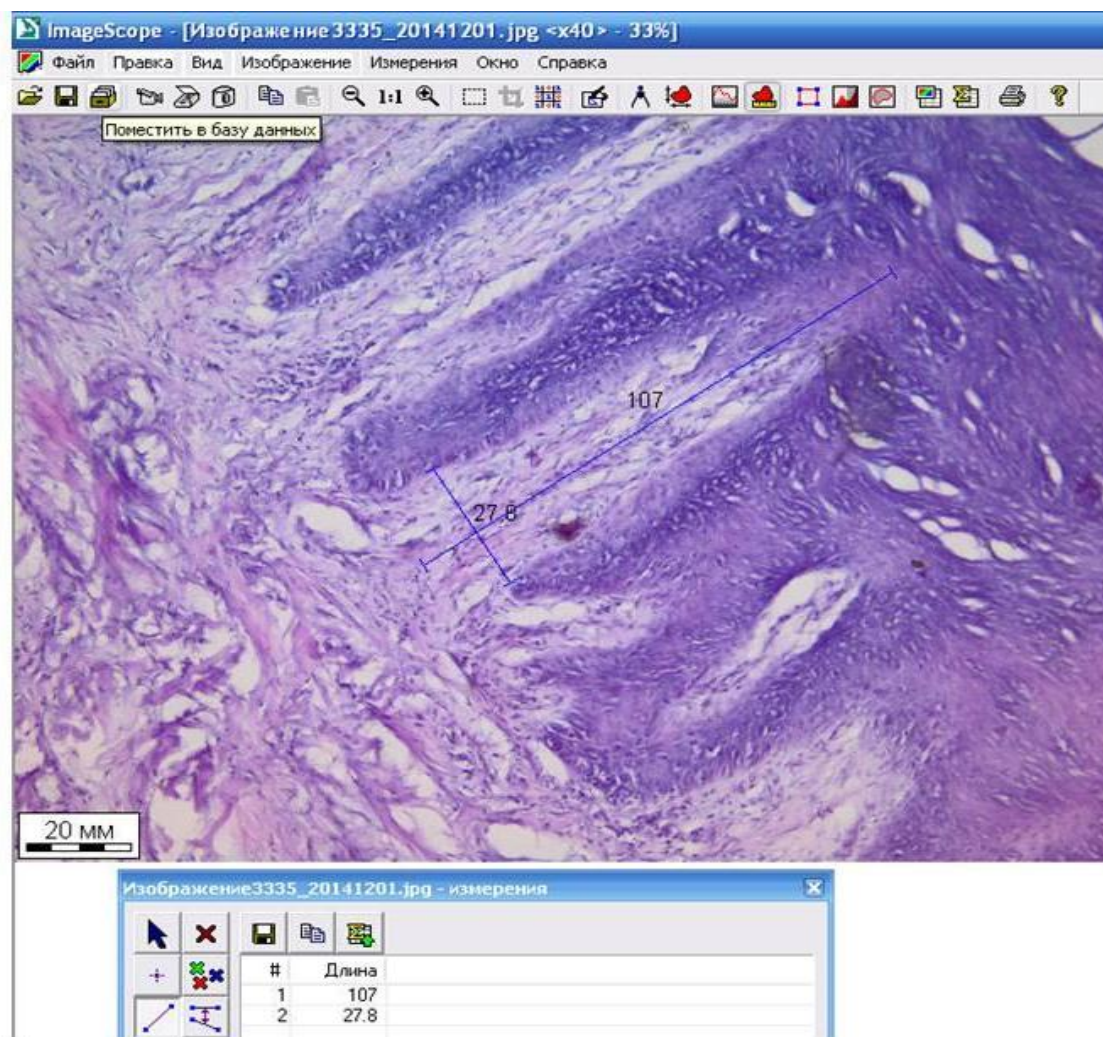


Рисунок 4.5.2.40 – Окно программы Image Score с фотографией дермы пальцевого мякша копытца с отросшим рогом. Измерение высоты и ширины сосочка дермы

Подсчитывали концентрацию сосочков дермы в разных частях копытцев в норме и при патологии. Язвенные патологии, а так же отрастание копытцевого рога способствует изменению формы сосочков, уменьшению их концентрации, как следствие, продуцируется не качественный копытцевый рог, не способный выполнять опорные и защитные функции.

Срезы, окрашенные гистохимическими методами так же можно подвергнуть морфометрии. Использование компьютерных программ (мы использовали Image Score M) позволяет переводить качественные показатели (например, наличие коллагеновых и эластических волокон или жира) в полуколичественные (удельная площадь, измеряемая в процентах или занимаемая площадь, измеряемая в μm^2). Критерием в оценке результатов гистохимической реакции служит не только локализация химических веществ, но и интенсивность окраски тканей.

Для полуколичественного анализа мы получали изображение исследуемого гистологического среза. Затем выбирали область интереса, чтобы узнать площадь, интересующего участка гистосреза на фотографии (рисунок 4.5.3.41).

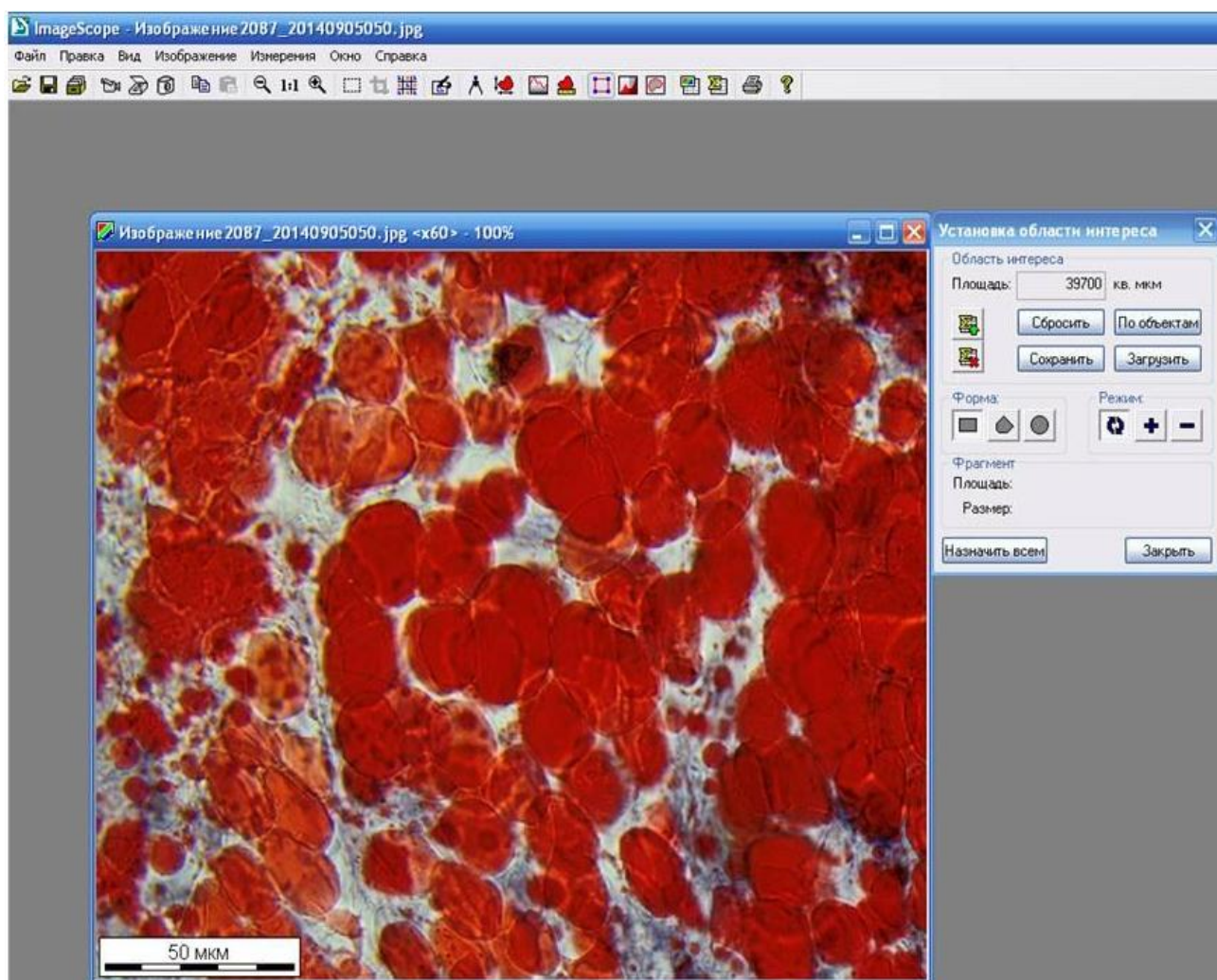


Рисунок 4.5.3.41 – Окно программы Image Score с фотографией жировых вакуолей пальцевого мякиша. Окраска OIL RED по Лилли. X-750.

Выбор области интереса. Площадь области интереса составляет 39700 мкм²

Далее использовали функцию «выделение объектов», регистрировали полученный результат и проводили его дальнейшую обработку. Такой способ обработки изображений мы применяли для подсчета удельной площади жировой ткани (рисунок 4.5.3.42), выяснения наличия и соотношения удельной площади коллагеновых (рисунок 4.5.3.43) и эластических волокон в анатомически правильных копытцах, при отращивании копытцевого рога и при наличии язвы пальцевого мякиша. Удельную площадь ткани выражали в процентах.

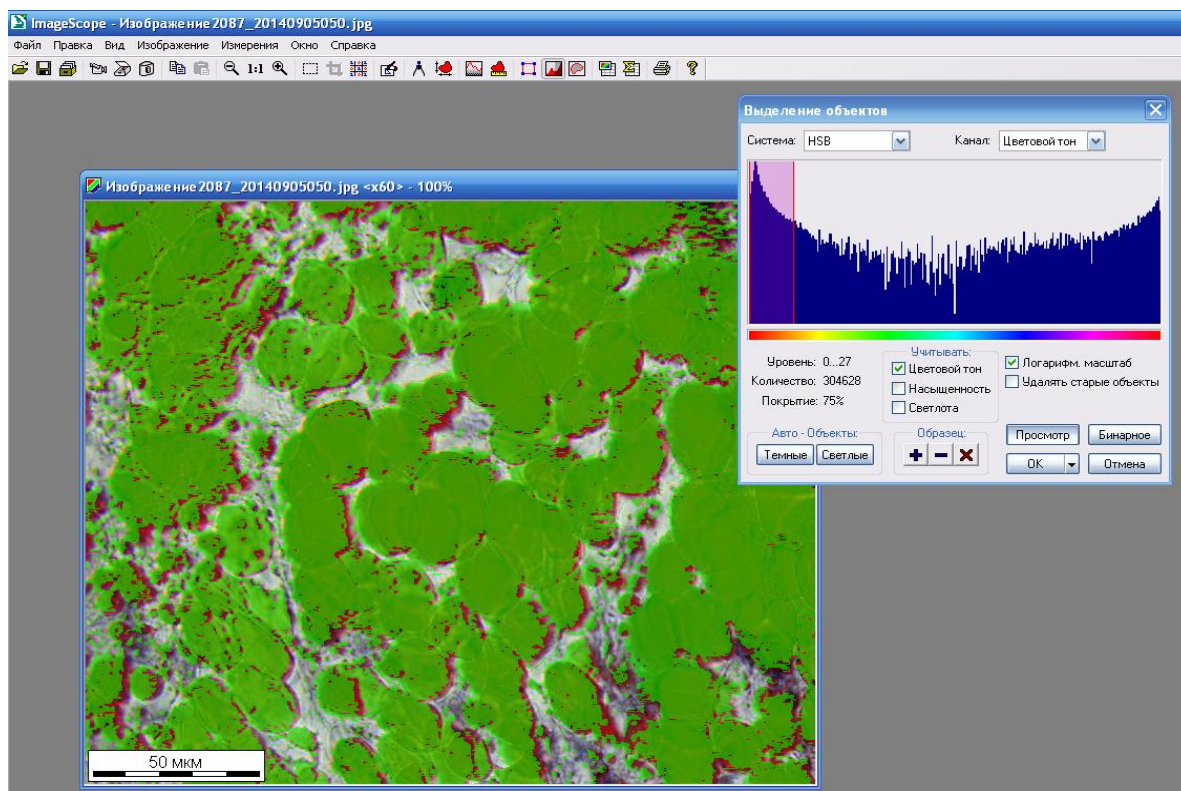


Рисунок 4.5.3.42 – Окно программы Image Score с фотографией жировых вакуолей пальцевого мякиша. Окраска OIL RED по Лилли. X-750.
Измерение удельной площади жира (75%)

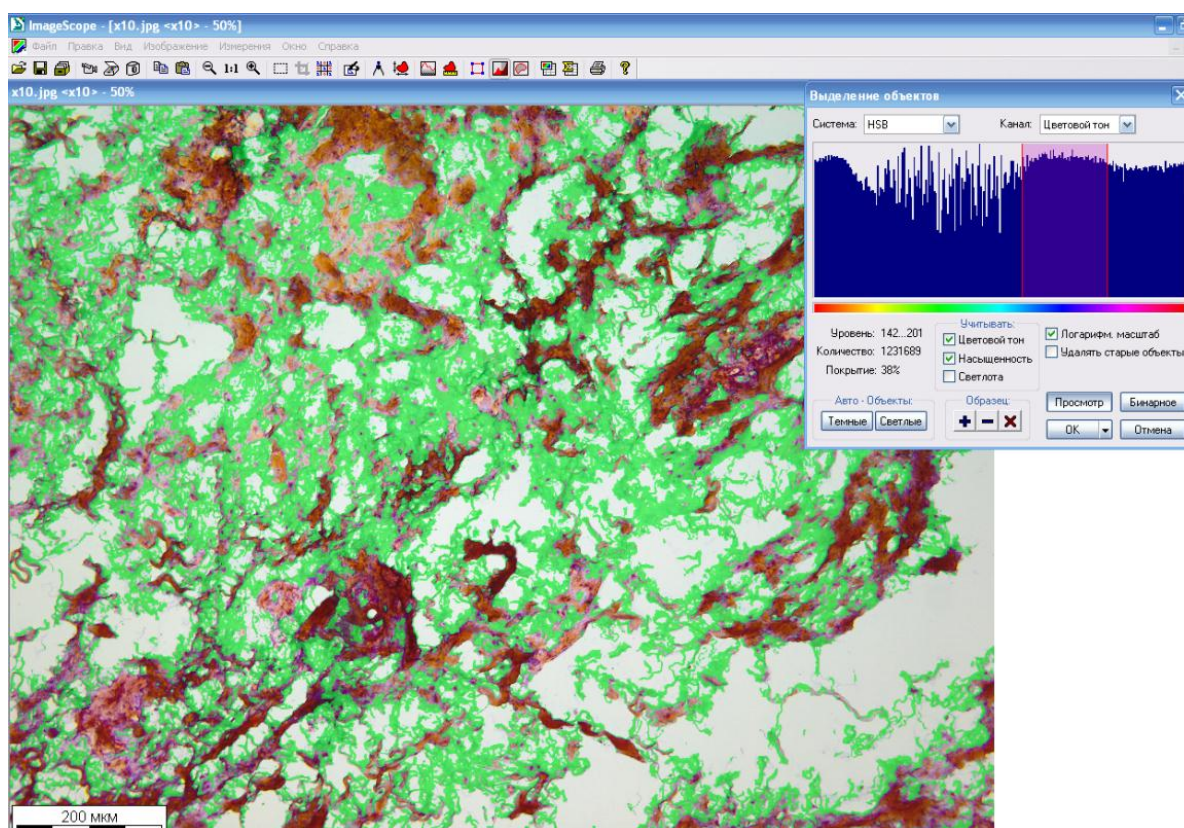
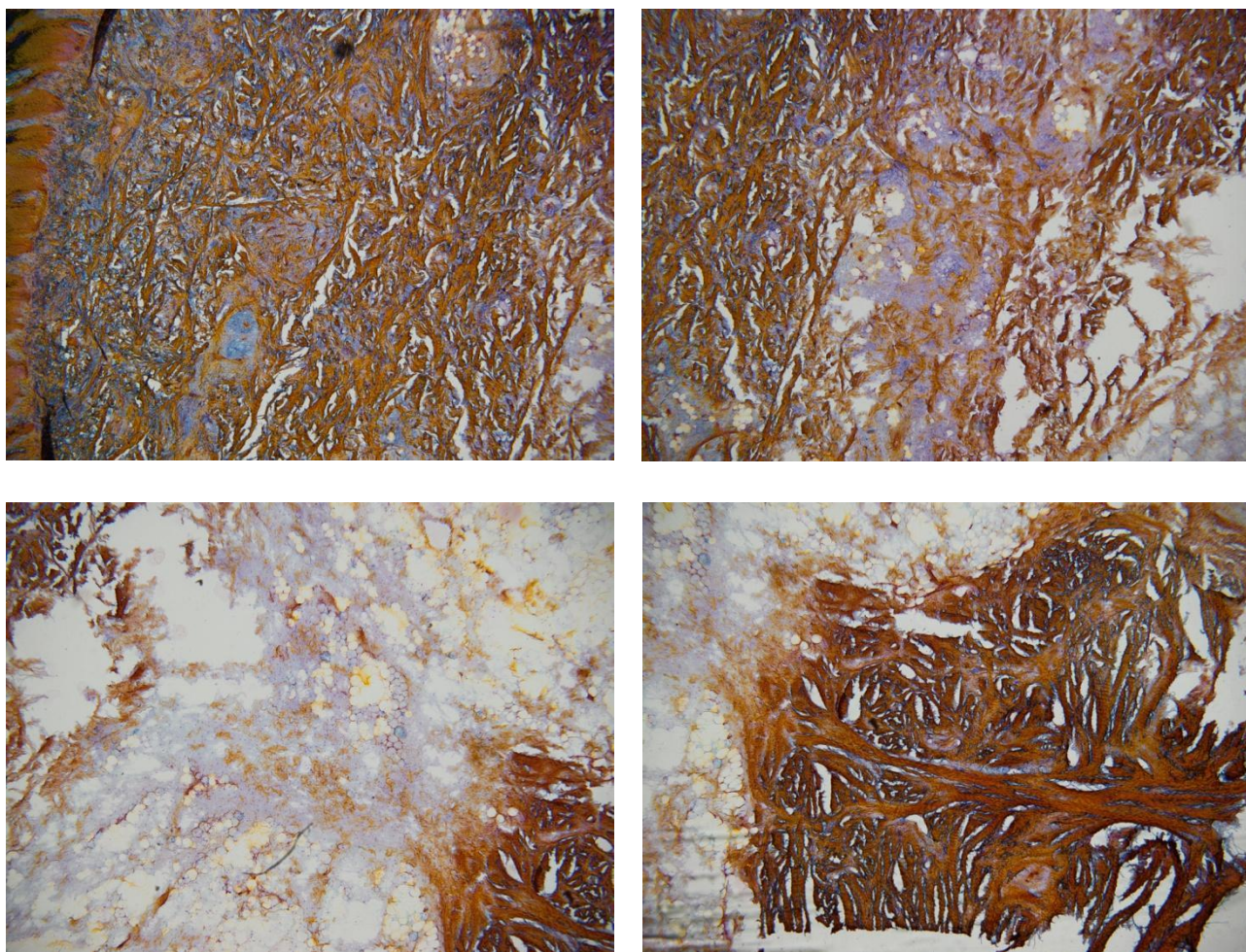


Рисунок 4.5.3.43 – Окно программы Image Score с фото гиподермы пальцевого мякиша. Окраска по Маллори. X-250. Удельная площадь коллагеновых волокон составляет 38%

Кроме того, мы подсчитывали соотношение удельной площади соединительной (коллагеновых и эластических волокон) и жировой ткани в разных частях пальцевого мякиша в норме и при отрастании копытцевого рога. Так, в анатомически правильных копытах в подушке мякиша коллагеновые волокна преобладают над эластическими. Количество коллагеновых волокон в латеральном и медиальном копытах увеличивается на 27% и 25%, а эластических – уменьшается на 62% и 61% соответственно, в направлении от дермы мякиша к сухожилию глубокого пальцевого сгибателя. Наибольшее количество жировых вакуолей находится в центральном участке подушки мякиша, где они выполняют амортизационную функцию. Кроме того, жировой ткани много вокруг сухожилия глубокого пальцевого сгибателя, что необходимо для защиты его от лишнего давления при опоре конечности. Вблизи дермы мякиша и сухожилия жировых вакуолей практически нет и много волокон соединительной ткани, что обеспечивает прочное соединение мякиша с этими частями копыта (рисунок 4.5.3.44).



Участки подушки мякиша: 1 – возле рогового башмака; 2, 3 – середина;
4 – вблизи копытцевой кости

Рисунок 4.5.3.44 – Микрофото. Разное соотношение волокон соединительной ткани и жировых вакуолей в разных участках подушки мякиша.

Окраска по Маллори. X-50

В подошвенном мякише коллагеновые волокон так же, как и в подушке мякиша преобладают над эластическими. Их больше на 68-75% (рисунок 4.5.3.45).

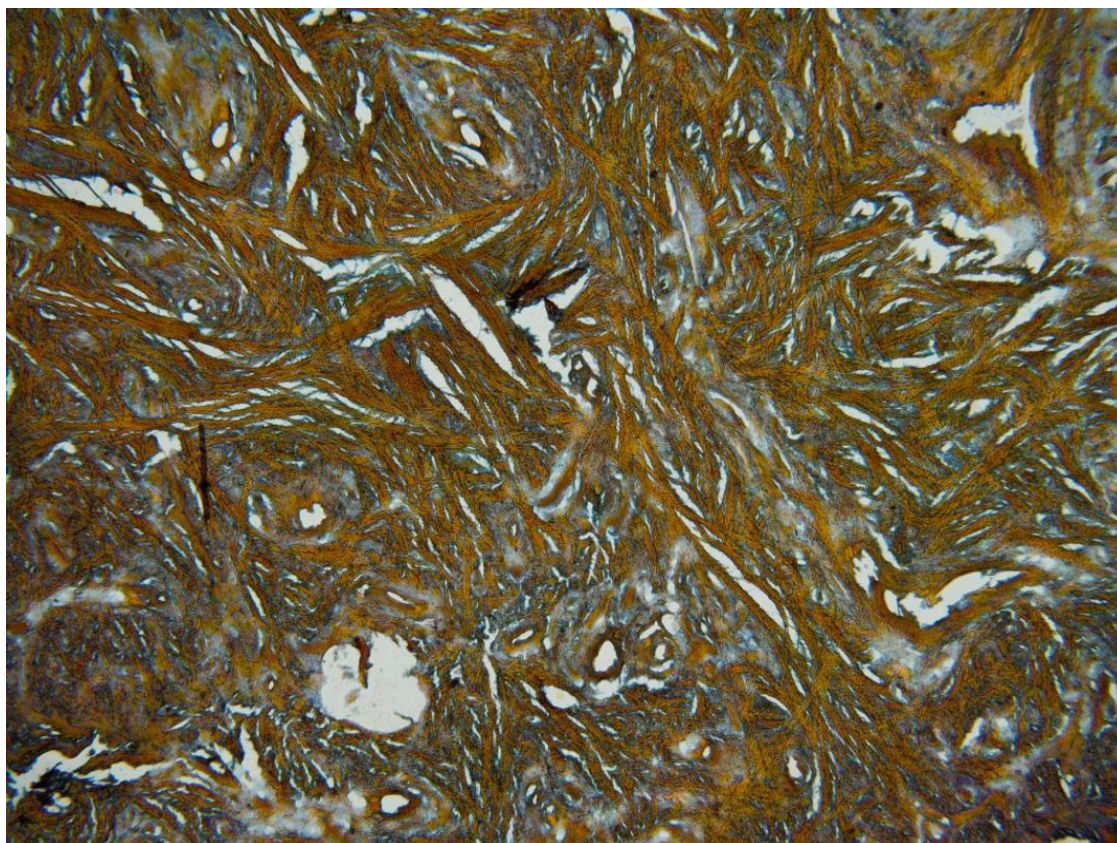


Рисунок 4.5.3.45 – Микрофото. Преобладание коллагеновых волокон (оранжевые) в гиподерме подошвенного мякиша. Окраска по Маллори. X-250

В целом, в подошвенном мякише больше волокон и меньше пакетов жировой ткани, что обеспечивает большую прочность этой части мякиша. Так, подошвенный мякиш, находясь между прочным роговым башмаком и копытцевой костью, имеет мало места для растяжения и испытывают большую нагрузку, по сравнению с подушкой мякиша. Общее удельное количество волокон соединительной ткани увеличивается в направлении от задней части подошвенного мякиша к передней примерно на 50%.

Больше всего жировых вакуолей находится в задней части подошвенного мякиша, под местом крепления сухожилия глубокого пальцевого сгибателя к копытцевой кости. Такая топография жировой ткани выполняет защитную функцию. Затем количество жировых вакуолей уменьшается в направлении от задней части подошвенного мякиша к передней на 96% и 89% в латеральном и медиальном копытцах соответственно. Вероятно, это связано с уменьшением нагрузки копытцевой кости на мякиш. В анатомически правильных копытцах вакуоли крупные, имеют округлую форму, собраны в виде скоплений и упакованы в ячейки, образованные коллагеновыми волокнами соединительной ткани (рисунок 4.5.2.46).

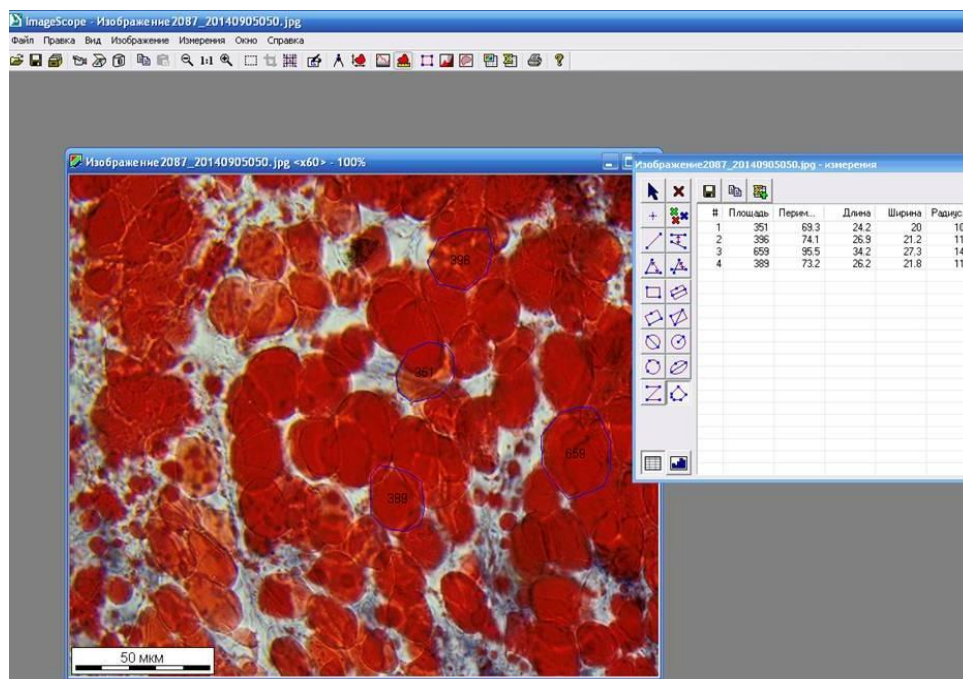


Рисунок 4.5.2.46 – Окно программы Image Score с фотографией крупных жировых вакуолей пальцевого мякиша анатомически правильных копытцев. Окраска OIL RED по Лилли. X-750. Измерение площади и диаметра жировых вакуолей

При отращании копытцевого рога возрастает статическая нагрузка на мякиш, в результате чего происходит уменьшение удельной площади жировой ткани в мякише, а так уменьшение размеров отдельных вакуолей (рисунок 4.5.2.47) на 48%, что нарушает работу мякиша как амортизатора, способствует развитию ортопедических патологий.

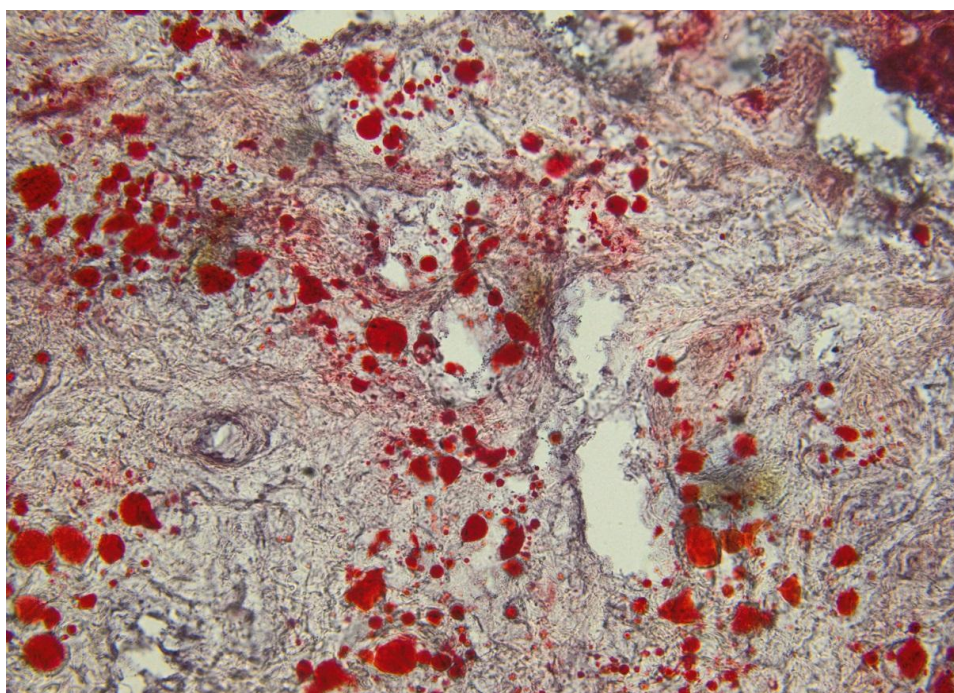


Рисунок 4.5.2.47 – Мелкие жировые вакуоли (оранжевые), уменьшение удельной площади жировой ткани в пальцевом мякише копытцев с отросшим рогом. Окраска OIL RED по Лилли. X-250

Основные результаты, полученные при морфологическом исследовании тканей пальцевого мякиша, а так же их интерпретация, изложены в таблице 4.5.3.2.

Таблица 4.5.3.2 – Функциональная характеристика морфологических показателей тканей пальцевого мякиша копытца в норме и при патологии

	Копытца		
	анатомически правильные	с отросшим копытцевым рогом	с язвенным поражением
Гиподерма	Трехмерная сеть с ячейками из извитых коллагеновых волокон, внутри заполненными кровеносными сосудами и (или) жировыми вакуолями, окруженными тонкими эластическими волокнами. Отдельные ячейки заполняются только эластическими волокнами. Ячеистое расположение волокон в гиподерме мякиша имеет важное значение в биомеханике копытца, обеспечивает работу пальцевого мякиша как насоса для покачивания крови и амортизатора, регулируя давление на сосуды и жировые вакуоли при опоре конечности	Распрямление коллагеновых и эластических волокон, уменьшение удельной площади жировых вакуолей, истончение гиподермы. Ячейки из коллагеновых волокон распадаются, фрагментируются. Такое нарушение трехмерной сети с ячейками увеличивает давление на кровеносные сосуды и жировые вакуоли при опоре конечности, что в свою очередь нарушает питание тканей копытца и работу мякиша как амортизатора	Зоны некроза, отек, распрямление и фрагментация волокон соединительной ткани. Формирование патологической грануляционной ткани. Мукоидное набухание стенок сосудов, что свидетельствует о кислородном голодании тканей. Неплотное прилегание клеток интимы сосудистой стенки, агрегирование форменных элементов крови и образование микротромбов влекут за собой нарушения микроциркуляции крови и трофики дермы, а так же способствуют расширению и углублению язвенного очага
Дерма	Ровные, высокие сосочки, сетчатый слой с извитыми коллагеновыми и эластическими волокнами, что обеспечивает механическую защиту гиподермы. Большое количество кровеносных сосудов обеспечивает хорошее питание тканей копытца	Деформированные сосочки, уменьшение концентрации сосочков на 1 мкм ² , распрямление коллагеновых и эластических волокон в сетчатом слое	Деформация сосочков и уменьшение их концентрации, распрямление коллагеновых и эластических волокон в сетчатом слое вблизи язвенного очага, что существенно нарушает архитектуру трехмерного ячеистого расположения волокон соединительной ткани, увеличивается давление на сосуды, расположенные внутри этих ячеек, нарушается питание тканей копытца. В

			самом очаге – зоны некроза, отек и фрагментация волокон соединительной ткани сетчатого слоя. Мукоидное набухание стенок сосудов, неплотное прилегание клеток интимы друг к другу. Изменения в сосудах провоцируют кровоизлияния в окружающие ткани и агрегирование эритроцитов в просвете кровеносных сосудов, образуются микротромбы, нарушается питание тканей копытца. Поэтому процессы пролиферации принимают патологический характер, созревание грануляционной ткани не происходит или идет вяло
Эпидермис	Наличие 4 слоев (базальный, шиповатый, зернистый (этот слой есть только в эпидермисе пальцевого мякиша, вблизи перехода его в эпидермис кожи с волосами), роговой). В роговом слое однородный, без пустот межтрубчатый рог, роговые трубки с толстой корой и не выкрошенным ядром. Таким образом, роговой башмак высокой прочности, способен полноценно выполнять защитные и опорные функции	Патоморфологические изменения в дерме ведут к нарушению питания эпидермиса, в результате чего нарушается его формирование. Фрагментация базального слоя. Уменьшение концентрации роговых трубок, пустоты в межтрубчатом роге способствуют увеличению влагоемкости рога. Такой рог легче повреждается и мацерируется. Истончение рогового слоя ведет к уменьшению его прочности, в результате чего значительно снижается защитная функция, и рог легче повреждается, открывая ворота для инфекции	Отсутствие эпидермиса на язвенном очаге, истончение эпидермиса – вблизи патологического очага, истончение или частичное отсутствие базального слоя, вакуолизация клеток шиповатого слоя. Значительное истончение коры трубочек, разрушение и выкрашивание ядра. Такой патологически измененный рог не может выполнять основную опорную и защитную функции. Так как процессы пролиферации принимают патологический характер, грануляционная ткань растет очень быстро, ее созревание не происходит или идет вяло, то процесс эпителизации не начинается и язвенная патология принимает хроническое течение

Заключение

Широкий набор морфологических исследований позволяет выявлять скрытые патологии на ранних стадиях развития, исследовать топографию патологического процесса, фундаментально, на тканевом или клеточном уровне изучать процессы, приводящие к развитию ортопедических болезней. Морфологические методы исследований кропотливые, относительно дешевые. Полученные результаты наглядны, доступны для статистической обработки, поэтому морфологические методы должны занять свое место в комплексном исследовании тканей пальцев. Описанные методы могут использоваться для получения достоверных и наглядных данных о влиянии различных факторов (новые условия содержания коров; наличие деформаций копытцевого рога; применение напольных покрытий разной твердости, копытцевых ванн, мочiona и т.п.) на возникновение ортопедических патологий, для изучения породных особенностей тканей копытцев в онтогенезе и при патологии.

Литература

1. Веремей, Э. И. Уход за копытами высокопродуктивного молочного крупного рогатого скота: практическое руководство / Э. И. Веремей. – Витебск : УО ВГАВМ, 2006. – 107 с.
2. Корженевский, Д. Э. Основы гистологической техники / Д. Э. Корженевский, А. В. Гиляров. – СПб. : СпецЛит, 2010. – 95 с.
3. Методы морфологических исследований : методическое пособие / С. М. Сулейманов и др. – Воронеж, 2012. – 104 с.
4. Микроскопическая техника : руководство / под. ред. Д. С. Саркисова и Ю. Л. Перова. – М. : Медицина, 1996. – 544 с. : ил.
5. Морфологическая диагностика. Подготовка материала для гистологического исследования и электронной микроскопии : руководство / под ред. Д. Э. Коржевского. – СПб. : СпецЛит, 2013. – 127 с.
6. Техвер, Ю. Т. Гистология кожного покрова домашних животных / Ю. Т. Техвер. – Тарту : эстонская сельскохозяйственная академия, 1971. – 112 с.
7. Atlas der Anatomie der Rindes. Klaus-Dieter Budras, Anita Wünsche / Schlütersche, 2002. 138 s.
8. Nowicki, M. Struktura histology cznarogu a jakosci stanzdrowotnyracic krow : монография / M. Nowicki; Akademirolniczo-tecnicznaim. Michala Oczapowskiego w Olstynie; Akademia Rolniczo-Technicznaim. MichalaOczapowskiego w Olsztynie. – Olsztyn : [s. n.], 1999. – 58 с.

Нормативное производственно-практическое издание

Лях Александр Леонтьевич
Ховайло Елизавета Владимировна

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЯЗВЕННЫХ ПАТОЛОГИЙ ПАЛЬЦЕВ У КОРОВ

Рекомендации

Ответственный за выпуск	А. А. Мацинович
Технический редактор	Е. А. Алисейко
Компьютерный набор	Е. В. Ховайло
Компьютерная верстка	Е. В. Ховайло
Корректор	Т. А. Драбо

Усл. п. л. 2,94. Уч.-изд. л. 1,70. Тираж 100 экз. Заказ №

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета»
государственная академия ветеринарной медицины».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/362 от 13.06.2014.
ЛИ №: 02330/470 от 01.10.2014 г.
Ул. 1-я Доватора, 7/11, 210026, г. Витебск.
Тел.: (0212) 35-99-82.
E-mail: rio_vsavm@tut.by
<http://www.vsavm.by>

