

## Способ гистологической окраски артерий сердца

Е.Г. Дмитриева<sup>1,2</sup>, С.Л. Хацко<sup>2</sup>, А.А. Якимов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Уральский государственный медицинский университет Минздрава России  
620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3

<sup>2</sup> Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина  
620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19

### Резюме

Одной из проблем при проведении исследований, посвященных изучению соединительной ткани, является одновременное выявление эластических и коллагеновых волокон на одном препарате для определения их пространственных взаимоотношений и относительной удельной плотности. Цель исследования – оценить возможность дифференцированного окрашивания эластических и коллагеновых волокон растворами резорцин-фуксина и прочного зеленого FCF на одном препарате и сравнить информативность предлагаемого способа с информативностью классических способов окраски соединительной ткани, выполненных по стандартным протоколам.

**Материал и методы.** Материалом служили препараты сердца людей, умерших от причин, не связанных с болезнями сердца. Для изготовления гистологических препаратов брали участок передней межжелудочковой артерии с подлежащим миокардом. После формалиновой фиксации материала, стандартной проводки и заливки в парафин изготавливали гистологические срезы. Препараты депарафинизировали, погружали в резорцин-фуксин на 15 минут, затем окрашивали железным гематоксилином Вейгерта 2 минуты, далее наносили на поверхность среза на 2 минуты 0,1%-й раствор прочного зеленого FCF, смешанный с насыщенным раствором пикриновой кислоты в соотношении 1:10 непосредственно перед окраской, препараты дегидратировали, просветляли и заключали в синтетическую монтирующую среду. **Результаты.** На полученных препаратах эластические волокна были окрашены в темно-синий цвет, а коллагеновые волокна – в оттенки зеленого, что позволяло дифференцировать их на основании различий окраски. **Заключение.** Разработан и апробирован способ окраски, который обеспечивает возможность одновременного выявления на одном препарате эластических и коллагеновых волокон при последовательном окрашивании растворами резорцин-фуксина и прочного зеленого FCF.

**Ключевые слова:** коллаген, эластические волокна, артерии, сердце, гистохимия.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Автор для переписки:** Дмитриева Е.Г., e-mail: anmayak@mail.ru

**Для цитирования:** Дмитриева Е.Г., Хацко С.Л., Якимов А.А. Способ гистологической окраски артерий сердца. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2022;42(3):47–51. doi: 10.18699/SSMJ20220305

## Staining method for coronary arteries

E.G. Dmitrieva<sup>1,2</sup>, S.L. Khatsko<sup>2</sup>, A.A. Yakimov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Ural State Medical University of Minzdrav of Russia  
620028, Yekaterinburg, Repin str., 3

<sup>2</sup> Ural Federal University n.a. the First President of Russia B.N. Yeltsin  
620002, Yekaterinburg, Mira str., 19

### Abstract

Detection of elastic and collagen fibers in the same histological section to determine their relationships and quantification is important for connective tissue investigations. The aim of the study was to assess the possibility of differentiated staining of elastic and collagen fibers with resorcin-fuchsin and fast green FCF in the same histological section and

compare the result of this method with the results of the classical methods of staining connective tissue, performed according to standard protocols. **Material and methods.** We studied adult human hearts, obtained from patients who died from non-cardiac causes. We cut tissue sections from the anterior interventricular artery and the underlying myocardium. After formalin fixation, standard processing and embedding in paraffin of the material, histological sections were made. Histological sections were deparaffinized and immersed resorcin-fuchsin for 15 minutes, then stained with Weigert's iron hematoxylin for 2 minutes, then for 2 minutes were applied to the preparation surface 0.1% solution of fast green FCF mixed with a saturated solution of picric acid immediately before staining in a ratio of 1:10, the histological sections were dehydrated, cleared and mounted in permanent mounting medium. **Results.** Elastic fibers were dyed in dark blue, and collagen fibers in different shades of green, which made it possible to differentiate them on the basis of color differences in one histological section. **Conclusion.** We have developed and tested the method of staining, which provides the possibility of simultaneous detection of elastic and collagen fibers with successive staining with solutions of resorcin-fuchsin and fast green FCF on one histological section.

**Key words:** collagen, elastic fibers, artery, heart, histochemistry.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Corresponding author:** Dmitrieva E.G., e-mail: anmayak@mail.ru

**Citation:** Dmitrieva E.G., Khatsko S.L., Yakimov A.A. Staining method for coronary arteries. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2022;42(3):47–51. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20220305

## Введение

На фоне роста числа случаев коронарогенных заболеваний сердца является актуальным изучение патологических структурных преобразований соединительнотканых элементов стенки сосудов сердца и паравазальной соединительной ткани [1]. Одновременное выявление эластических и коллагеновых волокон на одном и том же препарате позволяет определить их пространственные взаимоотношения, при высокой контрастности окрашивания становится возможным рассчитать относительную удельную плотность компонентов соединительной ткани с помощью компьютерных программ для морфометрии.

Наиболее распространенными методами выявления эластических и коллагеновых волокон на одном и том же препарате являются способы окраски по Вейгерту–ван Гизону, по Маллори и по Массону с анилиновым синим [2]. При окрашивании препаратов по Вейгерту–ван Гизону эластические волокна окрашиваются резорцин-фуксином в темно-синий цвет, а коллагеновые волокна – пикрофуксином в различные оттенки красного. При окраске по Массону и по Маллори бывают различимы эластические волокна, окрашенные в бледно-розовый цвет, на фоне синих коллагеновых волокон. Для повышения контрастности препаратов вместо анилинового синего возможно использование светового зеленого. Известен способ трехцветной окраски по Массону в модификации Голднера со световым зеленым, при котором коллагеновые волокна ясно выделяются на фоне мышечной ткани [3]. Использование трехцветной окраски (гематоксилин, эозин) со световым зеленым считают оптимальным для

выявления коллагеновых волокон при патоморфологических исследованиях сердца [4]. Для более отчетливой визуализации эластических волокон может быть применено последовательное окрашивание препарата резорцин-фуксином и световым зеленым [5]. Есть сведения о том, что по сравнению со световым зеленым более насыщенную и стойкую окраску дает раствор прочного зеленого FCF [6]. Последний является компонентом многих красящих смесей, применяемых как для селективного выявления коллагеновых волокон, так и для контрастирования фона [2, 7, 8]. Описания способов, которые основаны на использовании растворов резорцин-фуксина и прочного зеленого FCF для выявления эластических и коллагеновых волокон на одном и том же препарате, нами не обнаружено.

Цель исследования – оценить возможность дифференцированного окрашивания эластических и коллагеновых волокон растворами резорцин-фуксина и прочного зеленого FCF на одном и том же препарате и сравнить информативность предлагаемого способа с информативностью классических способов окраски соединительной ткани, выполненных по стандартным протоколам.

## Материал и методы

Исследование проведено на десяти препаратах сердца людей 36–74 лет, умерших от причин, не связанных с патологией сердца и его сосудов. Материал был получен из патоморфологических отделений клинических баз Уральского государственного медицинского университета в соответствии с договорами о сотрудничестве. Протокол исследования одобрен локальным этическим

комитетом Уральского государственного медицинского университета (№ 5 от 24.05.2019). При работе с секционным материалом учитывали требования ст. 5 ФЗ № 8 «О погребении и похоронном деле» от 12.01.1996 (с изм. и доп. от 01.01.2017).

Для изготовления гистологических препаратов из каждого макропрепарата сердца на уровне средней трети передней межжелудочковой борозды брали участок передней межжелудочковой артерии с подлежащим миокардом. Материал фиксировали в 10%-м растворе нейтрального забуференного формалина в течение 24 ч, затем отмывали в проточной воде и осуществляли проводку по следующей схеме: спирт 1 (70 %) – 10 мин; спирт 2 (90 %) – 20 мин; спирт 3 (95 %) – 20 мин; спирт 4 (абсолютный) – 25 мин; спирт 5 (абсолютный) – 30 мин; спирт 6 (абсолютный) – 35 мин; спирт 7 (абсолютный) – 40 мин; ксилол 1 – 20 мин; ксилол 2 – 20 мин; парафин 1 – 60 мин; парафин 2 – 90 мин. После проводки кусочки заключали в парафин («Histomix extra», «БиоВитрум», Россия). С каждого из десяти парафиновых блоков на микротоме Thermo Scientific Microm HM 450 (Thermo Fisher Scientific, США) изготавливали по четыре среза толщиной 3 мкм.

Препараты окрашивали: а) по Вейгерту–ван Гизону («Лабико», Россия; протокол производителя), б) по Массону с анилиновым синим («БиоВитрум»; протокол производителя), в) по Маллори («БиоВитрум»; протокол производителя), г) резорцин-фуксином с докраской раствором прочного зеленого FCF (Sigma-Aldrich, США; собственный оригинальный способ). Для выявления эластических волокон использовали резорцин-фуксин, приготовленный по методике, описанной в руководстве Г.А. Меркулова [9]. Препараты помещали в резорцин-фуксин на 15 мин, затем быстро промывали в дистиллированной воде. Ядра окрашивали железным гематоксилином Вейгерта в течение 2 мин («Лабико»). Осушали поверхность среза фильтровальной бумагой и наносили на него на 2 мин 0,1%-й раствор прочного зеленого FCF, смешанный с насыщенным раствором пикриновой кислоты в соотношении 1:10 непосредственно перед окраской. Растворы готовили заранее: 0,1 г прочного зеленого FCF смешивали с 0,2 мл ледяной уксусной кислоты и добавляли 100 мл дистиллированной воды; 1,2 г пикриновой кислоты растворяли в 100 мл подогретой до 60–70 °С дистиллированной воды, после охлаждения наблюдали выпадение кристаллического осадка, что указывало на получение насыщенного раствора.

После окраски препараты дегидратировали, просветляли и заключали в синтетическую монтирующую среду («БиоВитрум»). Анализ и фотографирование гистологических препара-

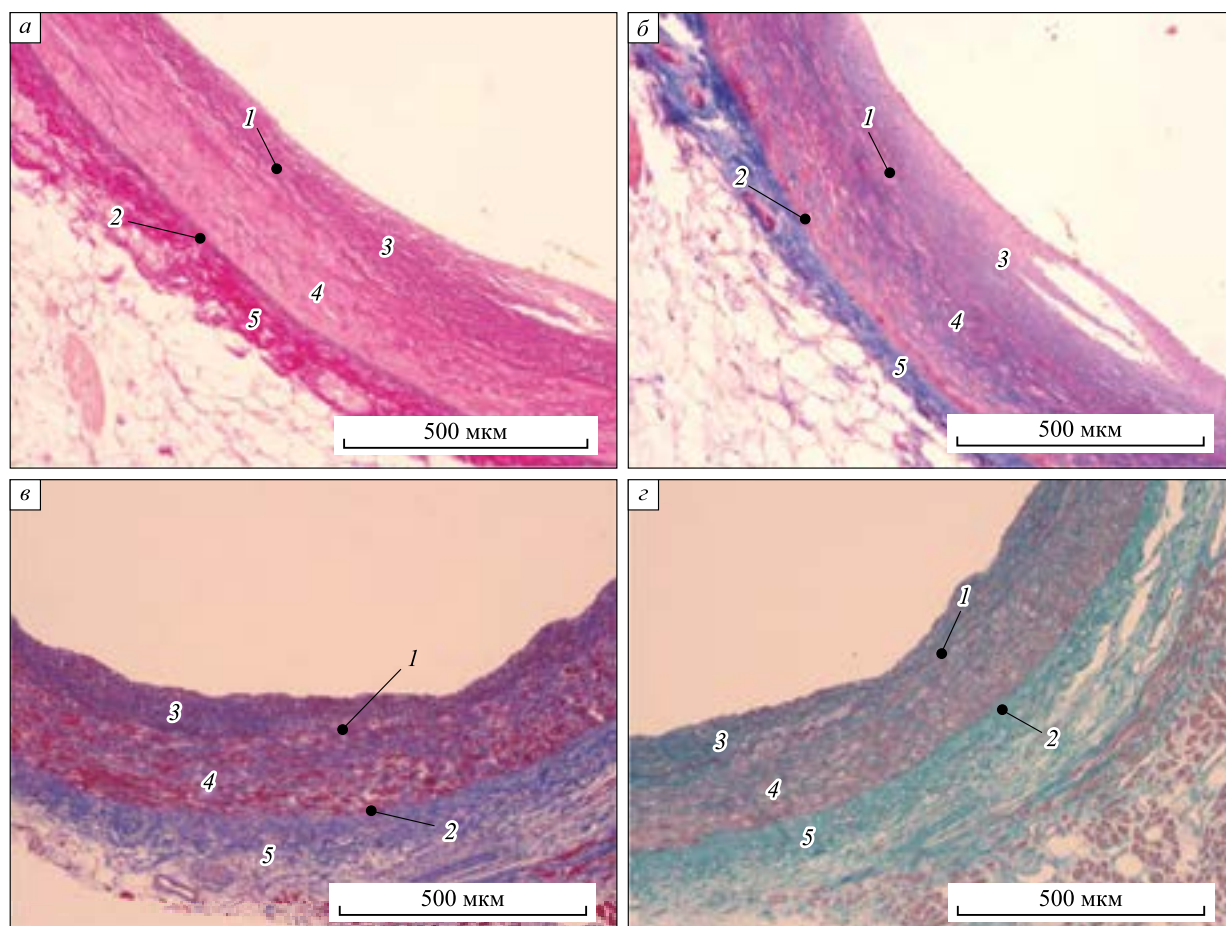
тов проводили с помощью микроскопа Olympus CX31RTSF (Olympus Corporation, Япония), цифровой камеры TouPCam U31SPM18000KPA 5.1 МП (TouPCam, Китай) и программного обеспечения ADF Image Capture 4.7 (2019). Результаты оценивали два исследователя независимо друг от друга. Оценивали различимость слоев стенки артерий, гладких миоцитов и коллагеновых волокон меди, четкость контуров эластических и коллагеновых волокон адвентиции.

## Результаты и их обсуждение

На препаратах, окрашенных по Вейгерту–ван Гизону, хорошо дифференцировались слои стенки артерии, ясно были видны наружная и внутренняя эластические мембраны темно-синего цвета, эластические волокна адвентиции выделялись на фоне красных коллагеновых волокон, однако за счет окрашивания цитоплазмы в желтый цвет гладкие миоциты меди были плохо различимы (рисунок, а). При использовании окрасок по Маллори и по Массону слои стенки артерии были хуже различимы за счет того, что наружная и внутренняя эластические мембраны сливались по цвету с цитоплазмой гладких миоцитов меди. Эластические волокна адвентиции, окрашенные в бледно-розовый цвет, слабо выделялись на фоне синих коллагеновых волокон. Гладкие миоциты меди были хорошо различимы на синем фоне благодаря яркому окрашиванию цитоплазмы в красный цвет (рисунок, б, в).

Таким образом, каждый из приведенных способов имел определенные преимущества и недостатки. На препаратах, окрашенных по Вейгерту–ван Гизону, хорошо дифференцировались эластические и коллагеновые волокна, однако гладкие миоциты меди были плохо различимы. При использовании окрасок по Массону и по Маллори гладкие миоциты меди контрастно выделялись на фоне коллагеновых волокон, однако дифференцировка эластических волокон в стенке артерии была затруднена. Это побудило нас к разработке альтернативного способа окраски.

На препаратах артерий, окрашенных резорцин-фуксином с последующим докрасиванием прочным зеленым FCF, отмечались тинкториальные различия между коллагеновыми и эластическими волокнами, более явные по сравнению с традиционными методами. Отчетливо были видны наружная и внутренняя эластические мембраны, на фоне коллагеновых волокон, окрашенных в зеленый цвет, выявлялись гладкие миоциты меди. В адвентиции артерии темно-синие эластические волокна были хорошо отличимы от коллагеновых волокон (рисунок, г).



Стенка передней межжелудочковой артерии. 1 – внутренняя эластическая мембрана; 2 – наружная эластическая мембрана; 3 – интима; 4 – медиа; 5 – адвентиция. Окраски: а – по Вейгерту–ван Гизону; б – по Маллори; в – по Массону; г – резорцин-фуксином с докрасиванием прочным зеленым FCF. Ув. ×100

The anterior interventricular artery wall. 1 – the internal elastic lamina; 2 – the outer elastic lamina; 3 – tunica intima; 4 – tunica media; 5 – tunica adventitia. Stain methods: а – Weigert – van Gieson; б – Mallory; в – Masson; г – resorcin-fuchsin with fast green FCF. ×100

## Заключение

Доказана возможность дифференцированного окрашивания эластических и коллагеновых волокон растворами резорцин-фуксина и прочного зеленого FCF на одном препарате. На образцах артерий сердца взрослого человека разработан и апробирован протокол этой окраски. Главным преимуществом предложенного способа по сравнению с классическими методами окраски является лучшая визуализация коллагеновых и эластических волокон за счет их окрашивания в разные цвета. Кроме того, он предполагает использование доступных и недорогих красителей и меньшее количество этапов окраски. Описанный способ может быть использован для выявления эластических и коллагеновых волокон не только в сердце, но и в различных органах и тканях человека и животных.

## Список литературы / References

1. Никель В.В., Касимцев А.А., Ефремова В.П. Паравазальная соединительная ткань внутрисстеночных кровеносных сосудов сердца в возрастном аспекте. *Успехи геронтол.* 2012;25(4):612–616.
2. Nikel V.V., Kasimtsev A.A., Efremova V.P. Age-related features of paravasal connective tissue of intraparietal blood vessels of the heart. *Uspekhi gerontologii = Advances in Gerontology.* 2013;3(3):201–204. [In Russian]. doi: 10.1134/S2079057013030089
3. Bancroft J.D., Suvarna S.K., Layton C. Bancroft's theory and practice of histological techniques. 7th ed. Oxford: Elsevier Churchill Livingstone; 2013. 604 p.
3. Suvik A., Effendy A.W.M. The use of modified Masson's trichrome staining in collagen evaluation in wound healing study. *Mal. J. Vet. Res.* 2012;3(1):39–47.

4. Розенберг В.Д., Непомнящих Л.М. Патоморфологические проявления аритмогенного сердца. *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 2003;136(7):106–110.

Rozenberg V.D., Nepomnyashchikh L.M. Pathomorphological criteria of arrhythmogenic heart. *Vyulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine (Bull. Exp. Biol. Med.)*. 2003;136(7):93–96. [In Russian]. doi: 10.1023/a:1026061501921

5. Ромейс Б. Микроскопическая техника. М.: Изд-во иностр. лит., 1954. 719 с.

Romeys B. Microscopic technique. Moscow: Foreign Literature, 1954. 719 p. [In Russian].

6. Fast Green FCF. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fast-Green-FCF>

7. Sarasquete C., Gutiérrez M. New tetrachromic VOF stain (Type III-GS) for normal and pathological fish tissues. *Eur. J. Histochem.* 2005;49(2):105–114. doi: 10.4081/945

8. Segnani C., Ippolito C., Antonioli L., Pellegrini C., Blandizz C., Dolf A., Bernardini N. Histochemical detection of collagen fibers by sirius red/fast green is more sensitive than van gieson or sirius red alone in normal and inflamed rat colon. *PLoS One.* 2015;10(12):e0144630. doi: 10.1371/journal.pone.0144630

9. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. Л.: Медицина, 1969. 423 с.

Merkulov G.A. Course of pathohistological technique. Leningrad: Meditsina, 1969. 423 p. [In Russian].

#### Сведения об авторах:

Евгения Германовна Дмитриева, ORCID: 0000-0002-2973-3481, e-mail: anmayak@mail.ru

Сергей Леонидович Хацко, ORCID: 0000-0001-5921-6680, e-mail: hardscore@mail.ru

Андрей Аркадьевич Якимов, к.м.н., ORCID: 0000-0001-8267-2895, e-mail: ayakimov07@mail.ru

#### Information about authors:

Evgenia G. Dmitrieva, ORCID: 0000-0002-2973-3481, e-mail: anmayak@mail.ru

Sergey L. Khatsko, ORCID: 0000-0001-5921-6680, e-mail: hardscore@mail.ru

Andrei A. Yakimov, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0001-8267-2895, e-mail: ayakimov07@mail.ru

Поступила в редакцию 23.03.2022

Принята к публикации 29.04.2022

Received 23.03.2022

Accepted 29.04.2022