

Изъ анатомо-физиологической лабораторіи проф. В. М. Бехтерева.

О ТЕХНИКѢ СПОСОБА ОКРАСКИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПО MARCHI.

Д-ра **В. Н. Телятника.**

Какъ извѣстно, способъ окраски центральной нервной системы, предложенный Marchi, получилъ въ настоящее время очень большое распространеніе вслѣдствіе своихъ несомнѣнныхъ и незамѣнимыхъ достоинствъ. Въ самомъ дѣлѣ, при употребленіи этого способа всякій, занимающийся анатоміей нервной системы, можетъ получить результаты до того убѣдительно ясные той картины, которая изслѣдующему представляется на препаратѣ, что, разъ примѣнивъ этотъ методъ окраски, онъ въ аналогичныхъ случаяхъ едва-ли предпочтетъ ему другой какой-либо способъ изъ извѣстныхъ въ настоящее время. Если къ этому прибавить, что способъ Marchi весьма не сложенъ и что измѣненія, наступающія въ центральной нервной системѣ, при изслѣдованіи ея по методу вторичныхъ перерожденій, открываются посредствомъ окраски по Marchi, вообще говоря, очень скоро послѣ произведенной операціи, во всякомъ случаѣ, скорѣе, чѣмъ съ помощью другихъ способовъ, то станетъ вполне понятнымъ, почему въ послѣднее время при работахъ съ вторичнымъ перерожденіемъ авторы употребляютъ почти исключительно этотъ способъ.

По описанію самого Marchi ¹⁾, способъ его заключается

¹⁾ Rivista sperimentale di freniatria e di medicina legale, V. XII, 1886, p. 51.

главнѣйше въ слѣдующемъ. Кусочки мозга, подлежащіе изслѣдованію, уплотняются въ растворѣ двухромовислого калия, а затѣмъ переносятся въ смѣсь, состоящую изъ двухъ частей жидкости Müller'a и одной части 1% воднаго раствора осміевой кислоты. Въ означенной смѣси кусочки должны пребыть 4 или 5 дней, послѣ чего они оплотнѣваютъ настолько, что ихъ можно рѣзать на микротомѣ, даже не задѣлывая въ целлоидинъ. Обработка срѣзовъ производится, какъ обыкновенно: обезвоживаніе въ спиртѣ, просвѣтленіе въ гвоздичномъ маслѣ и задѣлываніе въ канадскій бальзамъ. При этомъ Marchi ставитъ необходимымъ условіемъ, чтобы изслѣдуемые кусочки мозга не превышали по объему одного куб. сантим.

Въ этомъ послѣднемъ условіи и заключается одно изъ неудобствъ способа Marchi. Если слѣдовать вышеприведенному совѣту Marchi, то едва-ли когда нибудь изслѣдователь натолкнется на непріятную неожиданность. Малый объемъ взятаго для изслѣдованія кусочка всегда даетъ возможность смѣси Marchi пропитать его вполне и окрасить перерожденныя волокна въ черный цвѣтъ. Но всякій разъ, когда окрашиваемый кусочекъ мозга будетъ въ какомъ-либо своемъ размѣрѣ превышать одинъ сантим., изслѣдователь рискуетъ встрѣтиться съ тѣмъ непріятнымъ обстоятельствомъ, что кусочекъ мозга будетъ пропитанъ смѣсью Marchi только въ периферическихъ своихъ частяхъ, а въ центрѣ кусочка останется непрокрашенное мѣсто. Однако всякому, кому приходится имѣть дѣло съ довольно большими кусками мозга, которые не всегда желательно, да и не всегда удобно раздроблять на кусочки, которые имѣли-бы въ объемѣ не болѣе 1-го куб. сантим., весьма попятно желаніе обойтись какимъ нибудь образомъ безъ особаго дробленія изслѣдуемаго куска.

При своихъ занятіяхъ я обратилъ вниманіе на эту сторону способа Marchi и послѣ нѣсколькихъ неудачныхъ попытокъ мнѣ удалось, наконецъ, выработать такой способъ дѣйствія, съ помощью котораго можно окрашивать по способу Marchi куски мозга даже весьма значительной величины, напр.,

получить окрашенными по этому способу лобные сръззы изъ головного мозга собаки.

Я поступаю слѣдующимъ образомъ. Допустимъ, что мнѣ предстоитъ изслѣдовать по способу Marchi головной мозгъ собаки. Вскрывъ черепъ и вынувъ мозгъ, я погружаю его или въ жидкость Müller'a, или просто въ 3% водный растворъ двухромокислаго калия, гдѣ мозгъ долженъ пролежать столько времени, чтобы его можно было безъ поврежденія разрѣзать бритвой отъ руки въ лобномъ направленіи на 3—4 части. Это разрѣзываніе, если только уплотняющая жидкость смѣняется черезъ 2—3 сутокъ, можетъ быть произведено дней черезъ 10 послѣ погруженія мозга въ уплотняющую жидкость. Цѣль его заключается въ томъ, чтобы уплотнѣніе мозга произошло по возможности быстро. Мозгъ, раздѣленный такимъ образомъ на части, продолжаетъ оставаться въ той же уплотняющей жидкости еще съ недѣлю, послѣ чего куски его становятся плотными уже на столько, что ихъ можно разрѣзать въ томъ-же лобномъ направленіи на пластинки въ $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{3}$ сант. толщины. Такіе пластинки мозга переносятся затѣмъ въ смѣсь Marchi.

При этомъ считаю не лишнимъ замѣтить, что на каждую такую пластинку мозга должно приходиться не менѣе 50 к. с. смѣси Marchi, и пластинки должны помѣщаться въ склянкѣ (герметически закупоренной, конечно, такъ какъ осміева кислота сильно летуча) такимъ образомъ, чтобы одна изъ пластинокъ никоимъ образомъ не налегала на другую, такъ какъ въ мѣстѣ соприкосновенія пластинокъ пропитыванія не происходитъ. Надо кромѣ того имѣть въ виду, что та сторона пластинки мозга, которая прилежитъ къ дву склянки, также очень плохо пропитывается смѣсью Marchi; по этому пластинку ежедневно слѣдуетъ переворачивать то на ту, то на другую сторону.

Поступая такимъ образомъ, я получалъ довольно удовлетворительные результаты; однако не всегда. Случалось, что и при сравнительно незначительной толщинѣ пластинокъ пол-

наго пропитыванія ихъ не получалось и гдѣ нибудь въ центрѣ оставалось непрокрашенное мѣсто. Я обратилъ тогда вниманіе на то обстоятельство, что кусочекъ мозга, имѣющій непрокрашенную середину при употребленіи какого нибудь раствора осміевоы кислоты, прокрашивается вполне, если этотъ растворъ замѣнить затѣмъ болѣе крѣпкимъ. Этого нельзя однако ожидать въ томъ случаѣ, когда кусочекъ пропитывался съ самаго начала крѣпкимъ растворомъ осміевоы кислоты. Такъ, напр., кусокъ, находившійся подъ вліяніемъ обыкновенной смѣси Marchi и имѣющій непрокрашенную середину, не пропитывается вполне нерѣдко и въ томъ даже случаѣ, если эту смѣсь, значительно, конечно, утерявшую въ своей концентраціи, замѣнить свѣжею. Въ этихъ случаяхъ подъ вліяніемъ крѣпкаго раствора осміевоы кислоты периферическіе слои кусочка пріобрѣтаютъ такую консистенцію, что становятся непроницаемыми для болѣе крѣпкихъ растворовъ. Если-же съ самаго начала для пропитыванія примѣнить смѣсь Marchi, разбавленную посредствомъ 3% раствора двухромокислаго калия, то, замѣнивъ эту жидкость черезъ нѣсколько дней ея дѣйствія обыкновенной смѣсью Marchi, можно съ увѣренностью ожидать, что непрокрашенныхъ мѣстъ въ кусочкѣ мозга не будетъ.

Поэтому для полнаго прокрашиванія изслѣдуемаго мозга я примѣняю не только разрѣзывать его на тонкія пластинки, но и пропитываю эти пластинки сначала въ смѣси съ болѣе слабымъ содержаніемъ осміевоы кислоты, а затѣмъ въ болѣе крѣпкихъ растворахъ. Я начинаю пропитываніе съ помощью такой смѣси Marchi, которая только еле-еле даетъ запахъ осміевоы кислоты; въ такой смѣси пластинка мозга лежитъ 2-е сутокъ, сутки на одной сторонѣ своей и сутки на другой. Затѣмъ она переходитъ въ болѣе концентрированную смѣсь Marchi, также на 2-е сутокъ, и т. д., пока наконецъ на 6—8 сутки она помѣщается въ нормальную жидкость Marchi, пролежавъ въ которой 2-е сутокъ, она всегда окрашивается вполне во всѣхъ своихъ частяхъ. При своихъ работахъ я при приготовленіи

смѣсей Marchi съ различнымъ содержаніемъ осміевои кислоты руководствовался исключительно обоняніемъ, а потому точно процентнаго содержанія въ нихъ осміевои кислоты указать не могу. Для практическихъ цѣлей вполне достаточно установить 4—5 такихъ смѣсей, причемъ слабѣйшая изъ нихъ еле даетъ запахъ осміевои кислоты, а наиболѣе крѣпкая есть нормальная смѣсь Marchi съ $\frac{1}{3}\%$ содержаніемъ ея. Если предстоитъ изслѣдовать большой кусокъ мозга, то дѣло окраски обыкновенно затягивается и въ такомъ случаѣ установка жидкостей должна быть сдѣлана только для первыхъ 4—5 пластинокъ, а дальнѣйшій способъ дѣйствія будетъ заключаться въ слѣдующемъ.

Предположимъ, что мы имѣемъ 5 склянокъ А, Б и т. д. со смѣсями различной крѣпости, отъ самой незначительной до нормальной, и въ каждой изъ нихъ по пластинкѣ мозга: въ склянкѣ А находится пластинка № 5, въ склянкѣ Б—№ 4 и т. д.—А₅, Б₄, В₃, Г₂, Д₁. Черезъ 2 сутокъ каждая пластинка мозга должна быть помѣщена въ смѣсь, имѣющую большую крѣпость, чѣмъ та, въ которой она уже лежала. Наислабѣйшая смѣсь, находящаяся въ склянкѣ А, въ это время окончательно потеряла запахъ осміевои кислоты; смѣсь склянки Б теперь стала наиболѣе слабой во всемъ ряду; а пластинка № 1 прокрашена совершенно. Поэтому эту пластинку я вынимаю изъ жидкости и подвергаю дальнѣйшей обработкѣ. вмѣсто нея въ склянку Д я помѣщаю пластинку № 3. Въ освободившуюся склянку В помѣщается пластинка № 5. Изъ склянки А смѣсь выливается прочь, какъ негодная для дальнѣйшаго употребленія, и вмѣсто нея наливается нормальная смѣсь Marchi; сюда изъ склянки Г помѣщается пластинка № 2. Теперь остается только перенести пластинку № 4 изъ склянки Б въ склянку Г; въ такомъ случаѣ въ склянкахъ В, Г, Д и А размѣщены подлежащія дальнѣйшему пропитыванію пластинки №№ 5, 4, 3 и 2. Склянка Б, въ которой имѣется наислабѣйшая смѣсь, остается незанятою; въ нее я помѣщаю новую пластинку мозга № 6. Такимъ образомъ размѣщеніе

склянокъ въ томъ же порядкѣ увеличивающейся крѣпости содержащихся въ нихъ смѣсей и нумерація пластинокъ представляется теперь въ такомъ видѣ:

Б₆, В₅, Г₄, Д₃, А₂.

Примѣняя описанный способъ, т. е. разрѣзая мозгъ на тонкія пластинки и окрашивая ихъ въ смѣсяхъ постепенно увеличивающейся крѣпости, я съ неизмѣнностью получалъ хорошіе препараты. Этотъ способъ имѣетъ кромѣ того значеніе въ отношеніи экономіи, такъ какъ въ такомъ случаѣ осмиева кислота утилизируется рѣшительно вся безъ остатка, чего обыкновенно не бываетъ въ томъ случаѣ, если совершенно точно слѣдовать совѣту Marchi.

По мѣрѣ того, какъ пластинки окрашиваются, онѣ подвергаются дальнѣйшей обработкѣ, которая заключается, коротко говоря, въ слѣдующемъ. Окрашенная пластинка подвергается сперва промывкѣ въ водѣ (хотя-бы и не перегнанной), для чего она помѣщается на сутки въ сосудъ съ водой, которую, если есть возможность, лучше перемѣнить раза два. Промытая въ водѣ пластинка подвергается обезвоживанію въ спиртѣ и пропитыванію въ целлоидинѣ совершенно такимъ-же образомъ, какъ это дѣлается обыкновенно. Затѣмъ она целлоидномъ же приклеивается къ деревянной дощечкѣ или къ пробкѣ и рѣжется на микротомѣ, причемъ нѣтъ надобности настаивать на производствѣ особенно тонкихъ срѣзовъ. Срѣзы, имѣющіе отъ 3 до 5 дѣленій по микротому Schantz'a вполне удовлетворяютъ цѣли. Замѣчу кромѣ того, что если въ распоряженіи изслѣдователя одновременно не одна, а 2 или болѣе послѣдовательно другъ за другомъ идущихъ окрашенныхъ пластинокъ мозга, то можно и наклеивать ихъ всѣ въ соответственномъ порядкѣ на одну и ту-же пробку такъ, чтобы взятыя пластинки образовали изъ себя одно цѣлое. Упомянувъ объ этомъ, я долженъ прибавить, что такого склеиванія пластинокъ я обыкновенно не дѣлаю, такъ какъ не вижу въ этомъ рѣшительно никакого преимущества передъ наклеиваніемъ пла-

стинокъ на отдѣльныя пробки. Наоборотъ, это только усложняетъ дѣло, а иногда, если пластинки не удастся хорошо приладить другъ къ другу, даже влечетъ за собой неприятности. Надѣлавъ срѣзовъ, я обезвоживаю ихъ въ спиртѣ и просвѣтляю въ гвоздичномъ маслѣ или въ креозотѣ. Послѣдній, хотя нѣсколько и растворяетъ черныя глыбки, образовавшіяся въ перерожденныхъ мѣстахъ, но такъ мало, что вполне можетъ быть употребляемъ для просвѣтленія срѣзовъ, окрашенныхъ по Marchi, особенно если обратить вниманіе на то, чтобы при наложеніи просвѣтленнаго въ креозотѣ срѣза на предметное стекло креозотъ былъ какъ можно тщательнѣе высушенъ посредствомъ пропускной бумаги. Въ противномъ случаѣ креозотъ продолжаетъ уже въ залитомъ канадскимъ бальзамомъ срѣзъ производить раствореніе черныхъ глыбокъ и, если не портить этимъ окончательно препарата, то во всякомъ случаѣ заволакиваетъ его буроватымъ облачкомъ, что придаетъ ему неприятный грязноватый оттѣнокъ и уничтожаетъ ясность микроскопической картины.

Есть еще одна сторона дѣла, которая заслуживаетъ вниманія при примѣненіи способа Marchi. Всякому, кому пришлось имѣть съ нимъ дѣло, извѣстно, что нерѣдко черныя глыбки, служащія указателемъ перерожденныхъ волоконъ, получаютъ на препаратѣ не только въ тѣхъ мѣстахъ, гдѣ это перерожденіе существуетъ, на даже и въ тѣхъ, гдѣ о немъ завѣдомо и рѣчи быть не можетъ. Иногда подобное случайное появленіе черныхъ глыбокъ ставитъ въ затрудненіе изслѣдователя и заставляетъ его скептически относиться вообще къ способу Marchi. Относительно причинъ этого явленія высказывались различныя, болѣе или менѣе вѣроятныя предположенія, но я о нихъ распространяться не буду, такъ какъ вопросъ все-же остается пока недостаточно выясненнымъ. Я съ своей стороны замѣтилъ, что случайныя черныя глыбки появляются на препаратѣ въ особенно большомъ количествѣ въ тѣхъ случаяхъ, когда въ смѣси Marchi окрашиваются куски мозга, пролежавшіе въ двуххромокисломъ калиѣ или въ жидкости Mül-

тѣмъ болѣе того времени, какое требуется для хорошаго уплотненія, т. е. куски мозга переуплотненные. Отсюда слѣдуетъ, что, не доводя дѣло до переуплотненія мозга, можно избѣжать появленія случайныхъ глыбокъ, если и не во всѣхъ, то во многихъ случаяхъ. По моимъ наблюденіямъ, лучше окрашивать въ смѣси Marchi недоуплотненные куски мозга, чѣмъ переуплотненные; въ первомъ случаѣ самое худшее, что можетъ быть, это нѣкоторое неравномѣрное сморщиваніе мозговой пластинки, именно, въ мѣстахъ, соответствующихъ бѣлому веществу мозга; на пластинкѣ образуется небольшое вдавленіе, что въ результатѣ даетъ потерю нѣсколькихъ срѣзовъ. Въ силу того-же обстоятельства, что случайныя глыбки отлагаются преимущественно въ переуплотненномъ мозгу, никогда не слѣдуетъ затягивать окраски, а производить ее поскорѣе и при этомъ начинать съ менѣе объемистыхъ частей (спинной мозгъ, продолговатый), которые уплотняются раньше, чѣмъ болѣе объемистыя.

Что-же касается до того, какъ поступить въ томъ случаѣ, когда вслѣдствіе той или другой причины срѣзы получаютъ съ большимъ количествомъ случайныхъ глыбокъ, то въ этомъ отношеніи я при своихъ опытахъ не могъ получить безупречныхъ результатовъ. Однако мнѣ все-же удалось найти средство, съ помощью котораго препараты, почти сплошь заполненные случайными глыбками, можно сдѣлать годными для обсужденія. Средство это заключается въ томъ, что срѣзы, окрашенные по Marchi, подвергаются тому самому обезцвѣчиванію, которое предѣлывается съ срѣзами, окрашенными гематоксилиномъ по способу Pal'я. А именно, срѣзы сперва подвергаются 3—5 минутному дѣйствію $\frac{1}{2}\%$ воднаго раствора марганцовокислаго калия, а затѣмъ находятся подъ дѣйствіемъ слѣдующаго раствора: Acid oxalyc. 4, Natrii sulfurosi 4,0, Aq. destill. 1000,0 до тѣхъ поръ, пока желтизна, приобретенная срѣзами въ марганцовокисломъ калиѣ, исчезнетъ совершенно. Послѣ такого обезцвѣчиванія болѣе мелкія изъ случайныхъ глыбокъ исчезаютъ совершенно, глыбки болѣе

крупныя оставляютъ на своемъ мѣстѣ только буроватый кружокъ, соотвѣтственно очертаніямъ мякоти, облегающей осевой цилиндръ. Глыбки-же, соотвѣтствующія дѣйствительно перерожденнымъ волокнамъ, остаются въ полной неприкосновенности; слѣдовательно, препараты, до того бывшіе совершенно испорченными, становятся годными для дѣла, и въ этомъ я вижу уже нѣкоторый успѣхъ. Къ сожалѣнію, обезцвѣчиванію подвергаются не только случайныя глыбки, но и общій желтовато-бурый тонъ срѣзовъ, отчего они становятся болѣе свѣтлыми и нѣсколько теряютъ въ изяществѣ и отчетливости по сравненію съ хорошо удавшимися срѣзами по Marchi.